

# 環境変異原研究

**Environmental  
Mutagen  
Research**

**Vol.18 No.3 1996**

# 分子薬理学研究用試薬

〈研究用試薬〉

Xenometrix社は、創薬のコストを大幅に低減するために、従来動物実験で行われてきた安全性試験を *in vitro* で代替する系を提供します。例えば、肝毒性物質に対応する各種遺伝子を CAT レポーター遺伝子支配下に組み込んだ系、ストレス遺伝子を *lacZ* レポーター遺伝子で検出する系等を提供し

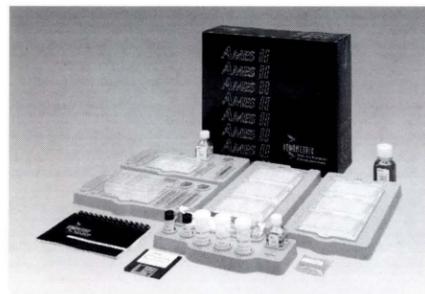
ています。また、AMES 試験を高感度・自動化して処理する系も提供しています。これらを用いれば、簡便かつ多面的に毒性・変異原性のスクリーニングを行うことができ、特に Combinatorial Chemistry Libraries, Peptide Display Systems 等により得られた候補物質を短期間で選別することが可能です。

**キャンペーン! '97年6月末日まで**  
期間中、下記の製品をご注文いただくと、更に1キットを添付致します。詳細はお問い合わせ下さい。

**プラス1  
キャンペーン!**

## マイクロタイター方式による遺伝毒性解析システム

The New AMES II™ ASSAY  
The AMAX™ Automated System  
The AMAX™ Manual System



### YEAST DEL ASSAY

*his 3* 遺伝子に変異を有する *Saccharomyces cerevisiae* XY 2 株を用い、遺伝子の欠失頻度を測定することにより、遺伝毒性を有する物質を検出するシステム

### E. Coli TRP ASSAY

トリプトファン合成酵素の遺伝子 *trp E65* に、ナンセンスコドン (オーカー) を含む *E. coli* WP 2 株を用いて、突然変異原物質を検出するシステム

## マイクロタイター方式によるストレス遺伝子アッセイシステム

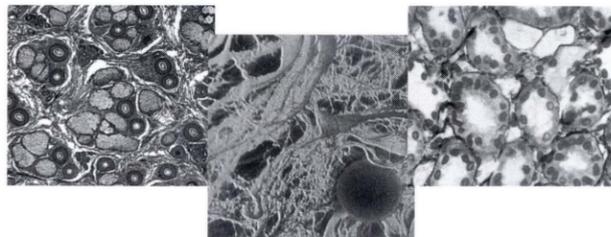
PRO - TOX ( C )  
PRO - TOX ( DNA )

*E. Coli* の *lacZ* レポーター遺伝子の上位に、それぞれ異なるストレス遺伝子のプロモーターが組み込まれており、この *lacZ* レポーター遺伝子の発現度を測定することにより、化合物の分子毒性を特異的に検出するシステム

### CAT - TOX ( Liver )

Cat\*レポーター遺伝子の発現度を測定することにより、化合物の毒性効果をヒト肝細胞レベルで検出するシステム

\* CAT = Chloramphenicol acetyltransferase



※ 詳細は、下記宛にお問い合わせ下さい。

フナコシのライフサイエンス研究用試薬と機器  
日本総代理店

## フナコシ株式会社

〒113 東京都文京区本郷2丁目9番7号 ユビテル・ユニビルディング  
http://www.funakoshi.co.jp/ e-mail: funa@gol.com

価格・納期・営業に関するお問い合わせ  
Tel. 03-5684-1615 Fax. 03-5684-1634

製品内容・資料請求に関するお問い合わせ

試薬に関して: Tel. 03-5684-1620 Fax. 03-5684-1775 e-mail: fshiyaku@gol.com  
機器に関して: Tel. 03-5684-1619 Fax. 03-5684-1775

## 2-Aminoanthracene, 1,2-dimethylhydrazine 及び膵発癌性 N-ニトロソ化合物に対する胆汁酸の助変異原性

### Comutagenic effect of bile acids with 2-aminoanthracene, 1,2-dimethylhydrazine and pancreas-carcinogenic N-nitroso compounds

森 幸雄<sup>1</sup>, 高橋みどり<sup>1</sup>, 飯村和徳<sup>1</sup>, 堅田充宏<sup>1</sup>  
小出彰宏<sup>1</sup>, 小西陽一<sup>2</sup>

Yukio Mori<sup>1</sup>, Midori Takahashi<sup>1</sup>, Kazunori Iimura<sup>1</sup>, Mitsuhiro Katada<sup>1</sup>,  
Akihiro Koide<sup>1</sup> and Yoichi Konishi<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> 奈良医科大学がんセンター腫瘍病理 634 橿原市四條町 840

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

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

(受付: 1996年8月14日; 受理: 1996年11月5日)

### Summary

To study the role of bile acids in *N*-nitrosamine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters, the comutagenic activities of cholic (CA), chenodeoxycholic (CDCA), deoxycholic (DCA), lithocholic (LCA) and ursodeoxycholic (UDCA) acids were examined in the presence of hamster liver S9-mix using nine pancreatic carcinogens. These included *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine and its diacetyl (BAP), 2-oxopropyl, methyl and morpholine derivatives, together with 2-aminoanthracene (2-AA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) as positive controls. DMH showed positive mutagenicity in strain TA100 only when pre-incubated with DCA, LCA or UDCA with or without liver S9-mix. LCA enhanced the mutagenicity of 2-AA in strain TA98 with metabolic activation but DCA, UDCA, CA and CDCA did not. On the other hand, the mutagenic activity of BAP in strain TA100 with metabolic activation was increased (up to 7.4 times) on adding any of the five bile acids. Such a comutagenic effect of primary and/or secondary bile acids was also observed in the methyl, 2-oxopropyl and morpholine derivatives. In accordance with previous findings observed with rat liver S9-mix, the comutagenic effect with DMH and 2-AA seems to be restricted to the secondary bile acids. In contrast, both primary and secondary bile acids show comutagenic activity in the case of pancreatic carcinogens. The possible roles of metabolic activation in these comutagenic actions, and of bile acids in the initiation of pancreatic carcinogenesis, are also discussed.

**Keywords:** comutagenicity, bile acid, hamster liver S9-mix, pancreatic carcinogen, metabolic activation

### 緒言

難治性癌である膵癌の発生における危険因子の1つとしては、大腸癌の場合と共通して (Hill, 1990; Reddy et al., 1977, 1989), 食事性因子, すなわち肉食, 高脂肪食, コレステロールの過剰摂取などが挙げられている (Wynder et al., 1973; 小西, 1991). *N*-Nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) およびその関連 *N*-ニトロソ化

合物によるハムスター膵管腺癌発生の実験系 (小西, 1988; Pour et al., 1980) においても、胆汁酸濃度に影響するこれらの食事性因子による促進効果 (Birt et al., 1989; Longnecker et al., 1985; Ogawa et al., 1991, 1992), 更に2次胆汁酸のプロモーション作用 (Makino et al., 1986; Ura et al., 1986) が報告されている。

解剖学的には膵・胆管合流異常を始め、機能的な胆汁

の膵管への逆流が実験動物での成果からも推定されている (Havey *et al.*, 1989; 上原ら, 1995). 更に, 膵炎患者の膵液中には 1 次および 2 次胆汁酸が検出され, その発症に胆汁酸の膵管内への逆流が重要であることも報告されている (上原ら, 1995). 最近我々は, イヌの膵管内に直接 *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (Kamano *et al.*, 1988) や *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP, Kamano *et al.*, 1996) を投与することにより, 膵管上皮細胞由来の癌または過形成や異形成が発生することを明らかにした. すなわち, 膵管-膵液を介して化学物質による膵癌が発生することを実験的に示したものである. 以上のことは, BHP を血行性に投与しても膵液中に BHP とその代謝産物が分泌されるという事実 (小西, 1993) も考慮すると, 標的部位 (膵管) でのイニシエーション段階における逆流した胆汁酸の膵癌発生への関与を示唆し, 胆汁酸の作用について *in vitro* 系での検討の重要性を意味している.

胆汁酸の *in vitro* 変異原性については, ラット肝 S9 共存下での Ames 試験 (Mckillop *et al.*, 1983; Mori *et al.*, 1991; Silverman and Andrews, 1977) または fluctuation 試験 (Mori *et al.*, 1991; Venitt *et al.*, 1987), ラット初代培養肝細胞系による不定期 DNA 合成試験 (Sakamoto *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1982) および rec-assay (Yamada *et al.*, 1993) などで詳しく検討されたが, いずれも陰性か無視できる (rec-assay) 結果が得られていることから, 胆汁酸は *in vitro* 短期検索法ではイニシエーション活性を示さないことが報告されている. 一方, 胆汁酸が 1,2-dimethylhydrazine (DMH, Wilpart *et al.*, 1983a, b) や 2-aminoanthracene (2-AA) などの芳香族アミン (Kawalek *et al.*, 1983; Silverman and Andrews, 1977) に対して Ames 試験で助変異原性を示すことはよく知られている. しかし, ラットの膵腺房細胞を標的にするものも含めて, 膵発癌物質に対する助変異原効果については全く検討されていない. そこで, 本論文では, 膵癌発生における胆汁酸の役割を明らかにする目的で, ハムスター膵管細胞を標的とする 9 種発癌物質に対する 5 種胆汁酸の助変異原性を, 陽性コントロールとしての 2-AA と DMH と共に, 代謝活性化にハムスター肝 S9 を用いて検討した.

#### 実験材料および方法

##### 1. 試薬

Cholic acid (CA, CAS No. 81-25-4), chenodeoxycholic acid (CDCA, 474-25-9), deoxycholic acid (DCA, 83-44-3), lithocholic acid (LCA, 434-13-9), ursodeoxycholic acid (UDCA, 128-13-2), CA の Na 塩, 2-AA (613-13-8), 牛血清アルブミン (BSA) および dimethyl sulfoxide (DMSO) は和光純薬工業株式会社より購入した. Glucose 6-phosphate と NADP<sup>+</sup> はオリエンタル酵母工業株式会社, DMH·2HCl (540-73-8) は Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA) および DCA の Na 塩は

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より入手した. BHP (53609-64-6), BOP (60599-38-4), *N*-nitroso(2-hydroxypropyl) (2-oxopropyl)amine (HPOP, 61499-28-3), *N*-nitrosobis(2-acetoxypopyl)amine (BAP, 60414-81-5), *N*-nitroso (2,3-dihydroxypropyl) (2-hydroxypropyl)amine (DHPHP, 89911-79-5), *N*-nitrosomethyl(2-hydroxypropyl)amine (MHP, 75411-83-5), *N*-nitrosomethyl(2,3-dihydroxypropyl)amine (MDHP, 86451-37-8), *N*-nitrosomethyl(2-oxopropyl)amine (MOP, 55984-51-5) および *N*-nitroso-2,6-dimethylmorpholine (NDMM, 1456-28-6) は当研究室で合成した (Mori *et al.*, 1984, 1985b, 1986a). これらの *N*-ニトロソ化合物の純度は高速液体クロマトグラフ法により 99% 以上であることを確認した.

##### 2. 肝 9,000×g 上清 (S9) の調製

雄性 Syrian golden ハムスターは 6 週齢で日本エスエルシー株式会社より入手した. Phenobarbital (PB) 80 mg/kg 用量を 1 日に 1 回, 3 日間腹腔内に投与し, 最終投与から 24 時間 (18 時間の絶食) 後に, 氷冷した 1.15% KCl で灌流後肝を摘出した. 3 倍量の 1.15% KCl でホモジネイトし, 常法に従い S9 画分を調製した (Mori *et al.*, 1985b).

##### 3. 変異原性試験

各試験は, *Salmonella typhimurium* TA 98 または TA100 株を用いて, すべてプレインキュベーション法 (Yahagi *et al.*, 1977) で行った. 助変異原性試験での化合物の用量は, それぞれ報告されている条件に従い, 2-AA が 2 μg, DMH·2HCl が 1.7 μmol, 胆汁酸が 100~500 μg (Silverman and Andrews, 1977; Wilpart *et al.*, 1983a, b) および *N*-ニトロソ化合物が 10 mg (Mori *et al.*, 1985b) を採用した. *N*-ニトロソ化合物と胆汁酸の Na 塩を試験する時は 0.1 ml 水に, また free の胆汁酸との試験では 0.1 ml DMSO にそれぞれ溶解した. また 2-AA は DMSO に, DMH·2HCl は水に溶解した.

#### 結 果

##### 1. 2-AA と DMH に対する影響

5 種胆汁酸のハムスター肝 S9 共存下での変異原性について 10~500 μg 用量で *N*-ニトロソ化合物に対して感受性を示す菌株 TA100 (Mori *et al.*, 1985b) を用いて検討したところ, 使用した胆汁酸は未処置または PB 処置したハムスター肝 S9 共存下のいずれの場合においても陰性であり, 更に CA と DCA の Na 塩も同様であった.

Fig. 1 には, 未処置または PB 処置ハムスター肝共存下での 2-AA の変異原性におよぼす胆汁酸の影響を示した. 2-AA は未処置肝 S9 共存下でも明らかな変異原性を示し, CA, CDCA, UDCA および DCA はこの活性に全く影響しなかったが, LCA は用量依存的に活性増強作用を現わし, 500 μg 用量において 3.4 倍に上昇させた. PB 処置により 2-AA の変異原活性は約 3.3 倍に誘導され, CA と CDCA が 1.2 倍までの上昇であるのに対し

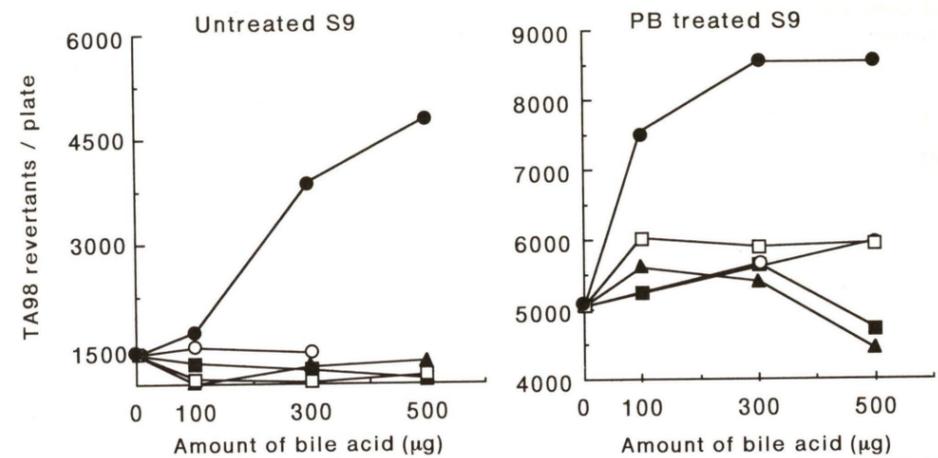


Fig. 1. Comutagenic activity of CA(□), CDCA(○), UDCA(▲), LCA(●) and DCA(■) in *S. typhimurium* TA98 preincubated with 2-aminoanthracene in the presence of hamster liver S9. Each point corresponds to the mean value from two experiments done in duplicate.

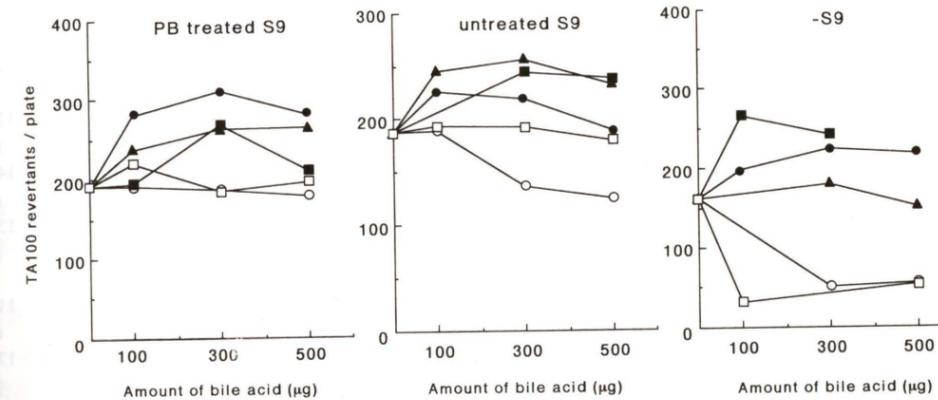


Fig. 2. Comutagenic activity of CA(□), CDCA(○), UDCA(▲), LCA(●) and DCA(■) in *S. typhimurium* TA100 preincubated with 1,2-dimethylhydrazine in the absence or presence of hamster liver S9. Each point corresponds to the mean value from two experiments done in duplicate.

て, LCA の効果は顕著であり, 500 μg 用量において 1.7 倍に上昇させた.

一方, DMH については肝 S9 非共存下でも検討したが (Fig. 2), いずれにおいても変異原性は認められなかった. CA と CDCA はいずれの場合も活性増強作用を示さなかったのに対して, LCA と DCA は肝 S9 の非共存下と共存下の両方において効果を現わし, LCA では PB 誘導の影響も弱いが認められた. また UDCA は未処置または PB 誘導肝 S9 共存下で DMH の変異原性を陽性とした.

##### 2. 未処置肝 S9 共存下での *N*-ニトロソ化合物に対する影響

Table 1 には, 試料溶媒に DMSO を使用したときの 6 種 *N*-ニトロソ化合物の未処置肝 S9 共存下での変異原性とそれに対する胆汁酸の作用を示した. BAP, HPOP および MDHP は自然復帰変異数の 1.5 倍以下であったが, その他の 3 種化合物はその 2 倍以上の変異原活性を示し

た. CA と CDCA は BAP と HPOP の活性を 1.3 倍以上に上昇させたが, BOP, MHP および MDHP に対しては逆に阻害作用を示した. BOP と MHP における阻害作用は 3 種の 2 次胆汁酸の添加によっても認められたが, DCA は BAP と HPOP の, UDCA は MDHP のおおよそ LCA は BAP と MDHP の変異原活性を 1.3 倍以上に上昇させた. しかし, BAP と MDHP に対する胆汁酸の作用は, BAP に対する 500 μg CDCA の場合を除き, いずれも自然復帰変異数レベルまでの上昇であった.

##### 3. 胆汁酸 Na 塩の未処置肝 S9 共存下での *N*-ニトロソ化合物に対する影響

Table 2 には, 試料溶媒に水を使用したときの 9 種 *N*-ニトロソ化合物の未処置肝 S9 共存下での変異原性とそれに対する CA と DCA の Na 塩の作用を示した. DMSO を用いたときの 6 種化合物の活性 (Table 1) と比較すると, 水を溶媒にすると BOP を除く化合物の変異原活性は 1.6~3.3 倍上昇した. CA の Na 塩も MDHP

Table 1. Comutagenic activity of bile acid in TA100 strain preincubated with *N*-nitrosamine in the presence of liver S9 from untreated hamsters.

Bile acid ( $\mu$ g)	TA100 revertants/plate					
	BAP	BOP	NDMM	HPOP	MHP	MDHP
None (DMSO)	59 $\pm$ 5	294 $\pm$ 14	325 $\pm$ 11	195 $\pm$ 40	482 $\pm$ 59	109 $\pm$ 5
Cholic acid						
100	84 $\pm$ 8 (1.4)	189 $\pm$ 4 (0.6)	373 $\pm$ 10 (1.1)	279 $\pm$ 10* (1.4)	289 $\pm$ 109 (0.6)	100 $\pm$ 3 (0.9)
300	78 $\pm$ 1* (1.3)	113 $\pm$ 4 (0.4)	316 $\pm$ 58 (1.0)	184 $\pm$ 20 (0.9)	432 $\pm$ 33 (0.9)	96 $\pm$ 1 (0.8)
500	111 $\pm$ 19* (1.9)	152 $\pm$ 52 (0.5)	297 $\pm$ 140 (0.9)	200 $\pm$ 40 (1.0)	295 $\pm$ 55 (0.6)	68 $\pm$ 9 (0.6)
Chenodeoxycholic acid						
100	138 $\pm$ 18** (2.3)	242 $\pm$ 85 (0.8)	228 $\pm$ 40 (0.7)	236 $\pm$ 25 (1.2)	261 $\pm$ 21 (0.5)	68 $\pm$ 4 (0.6)
300	106 $\pm$ 3** (1.8)	230 $\pm$ 118 (0.8)	207 $\pm$ 13 (0.6)	220 $\pm$ 40 (1.1)	285 $\pm$ 1 (0.6)	62 $\pm$ 15 (0.6)
500	220 $\pm$ 76* (3.7)	173 $\pm$ 38 (0.6)	218 $\pm$ 39 (0.7)	323 $\pm$ 42* (1.7)	197 $\pm$ 26 (0.4)	76 $\pm$ 13 (0.7)
Deoxycholic acid						
100	124 $\pm$ 1** (2.1)	177 $\pm$ 1 (0.6)	158 $\pm$ 42 (0.5)	259 $\pm$ 14 (1.3)	290 $\pm$ 37 (0.6)	86 $\pm$ 13 (0.8)
300	95 $\pm$ 11* (1.6)	245 $\pm$ 32 (0.8)	206 $\pm$ 29 (0.6)	380 $\pm$ 3** (1.9)	233 $\pm$ 7 (0.5)	102 $\pm$ 2 (0.9)
500	0 $\pm$ 5 (0.3)	98 $\pm$ 5 (0.3)	178 $\pm$ 58 (0.5)	273 $\pm$ 50 (1.4)	193 $\pm$ 66 (0.4)	80 $\pm$ 2 (0.7)
Ursodeoxycholic acid						
100	71 $\pm$ 14 (1.2)	145 $\pm$ 42 (0.5)	257 $\pm$ 7 (0.8)	200 $\pm$ 11 (1.0)	382 $\pm$ 3 (0.8)	126 $\pm$ 1 (1.2)
300	71 $\pm$ 1 (1.2)	215 $\pm$ 35 (0.7)	249 $\pm$ 7 (0.8)	186 $\pm$ 1 (1.0)	343 $\pm$ 66 (0.7)	140 $\pm$ 7* (1.3)
500	19 $\pm$ 26 (0.3)	182 $\pm$ 39 (0.6)	254 $\pm$ 20 (0.8)	204 $\pm$ 11 (1.0)	284 $\pm$ 81 (0.6)	138 $\pm$ 19 (1.3)
Lithocholic acid						
100	85 $\pm$ 8 (1.4)	145 $\pm$ 42 (0.5)	215 $\pm$ 23 (0.7)	163 $\pm$ 19 (0.8)	216 $\pm$ 77 (0.4)	117 $\pm$ 12 (1.1)
300	137 $\pm$ 11** (2.3)	215 $\pm$ 35 (0.7)	47 $\pm$ 6 (0.1)	130 $\pm$ 4 (0.7)	162 $\pm$ 28 (0.3)	174 $\pm$ 5** (1.6)
500	62 $\pm$ 25 (1.1)	182 $\pm$ 39 (0.6)	44 $\pm$ 19 (0.1)	75 $\pm$ 25 (0.4)	33 $\pm$ 36 (0.1)	137 $\pm$ 11 (1.3)

Each value is a mean of three experiments done in duplicate with 10 mg carcinogen dissolved in 0.1 ml of DMSO. Spontaneous revertants (135) were subtracted, and values in parentheses show the ratio to the activity obtained without bile acid.  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared to the revertants observed without bile acid (Student's *t*-test).

に対しては阻害効果を示したが、BAPに対してはDMSOを溶媒に使用したときに比較してより顕著な活性増強作用を示し、さらにNDMM, HPOPおよびMHPにおいても効果が認められた。またDCAのNa塩は、HPOP, BAPおよびMHPの活性をそれぞれ1.4, 1.6および1.8倍まで上昇させた。

#### 4. PB処置肝S9共存下での8種N-ニトロソ化合物に対する影響

DMSOに溶解したときの6種N-ニトロソ化合物の変異原活性 (Table 1) は、Table 3に示したように、PB処置により、BOPを除きいずれも明らかに誘導された (1.4~5.5倍)。CDCAはBAP, HPOPおよびMOPに、またCAはそれに加えてNDMMとMHPに対して明らかな活性増強作用を示し、MDHPを除くと顕著な阻害作用は認められなかった。一方、2次胆汁酸で共通して活性

増強作用が認められたのはBAPであり、DCAでは加えてMHPとMDHPに、またUDCAではさらにBOPに対しても効果を現わした。これらの1次および2次胆汁酸の作用は未誘導肝S9共存下のとき (Table 1) よりも顕著な効果であった。

#### 5. 直接変異原に対する影響

BOPは肝S9の代わりにBSAの共存下で、またHPOPは肝S9非共存下でも弱い活性ながら変異原性が陽性となる (Mori *et al.*, 1985b, 1986b)。そこで、ハムスター肝S9非共存下での胆汁酸の影響を観察するために、BOPに対しては3% BSA共存下で、5種胆汁酸すべてについて同様に検討したが、両化合物の直接変異原性に対していずれの胆汁酸も活性増強作用を示さなかった。

Table 2. Comutagenic activity of bile acid salt in TA100 strain preincubated with *N*-nitrosamine in the presence of liver S9 from untreated hamsters.

Bile acid ( $\mu$ g)	TA100 revertants/plate								
	BAP	BOP	NDMM	HPOP	MHP	MOP	MDHP	BHP	DHPHP
None (water)	194 $\pm$ 20	266 $\pm$ 53	572 $\pm$ 24	383 $\pm$ 42	813 $\pm$ 135	209 $\pm$ 35	172 $\pm$ 17	77 $\pm$ 18	40 $\pm$ 13
Cholic acid									
100	697 $\pm$ 13** (3.6)	208 $\pm$ 36 (0.8)	691 $\pm$ 120 (1.2)	516 $\pm$ 37* (1.3)	2881 $\pm$ 132** (3.5)	227 $\pm$ 52 (1.1)	121 $\pm$ 42 (0.7)	115 $\pm$ 54 (1.5)	46 $\pm$ 1 (1.2)
300	437 $\pm$ 19** (2.3)	231 $\pm$ 28 (0.9)	905 $\pm$ 86* (1.6)	442 $\pm$ 29 (1.2)	1177 $\pm$ 71 (1.4)	314 $\pm$ 91 (1.5)	151 $\pm$ 37 (0.9)	79 $\pm$ 32 (1.0)	31 $\pm$ 1 (0.8)
500	349 $\pm$ 11** (1.8)	227 $\pm$ 24 (0.9)	630 $\pm$ 226 (1.1)	326 $\pm$ 40 (0.9)	1066 $\pm$ 309 (1.3)	90 $\pm$ 16 (0.4)	110 $\pm$ 11 (0.6)	52 $\pm$ 50 (0.7)	48 $\pm$ 11 (1.2)
Deoxycholic acid									
100	318 $\pm$ 33* (1.6)	307 $\pm$ 33 (1.2)	652 $\pm$ 42 (1.1)	529 $\pm$ 27* (1.4)	1495 $\pm$ 153* (1.8)	269 $\pm$ 35 (1.3)	129 $\pm$ 28 (0.8)	85 $\pm$ 18 (1.1)	35 $\pm$ 6 (0.9)
300	77 $\pm$ 11 (0.4)	171 $\pm$ 15 (0.6)	441 $\pm$ 71 (0.8)	443 $\pm$ 43 (1.2)	1105 $\pm$ 348 (1.4)	104 $\pm$ 28 (0.5)	50 $\pm$ 28 (0.3)	71 $\pm$ 5 (0.9)	17 $\pm$ 9 (0.4)
500	3 $\pm$ 4 (0.0)	99 $\pm$ 17 (0.4)	64 $\pm$ 68 (0.1)	287 $\pm$ 25 (0.7)	259 $\pm$ 117 (0.3)	77 $\pm$ 38 (0.4)	20 $\pm$ 4 (0.1)	11 $\pm$ 6 (0.1)	14 $\pm$ 4 (0.4)

Each value is a mean of three experiments done in duplicate with 10 mg *N*-nitrosamine dissolved in 0.1 ml of water. Spontaneous revertants (135) were subtracted, and values in parentheses show the ratio to the activity obtained without bile acid.  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared to the revertants observed without bile acid (Student's *t*-test).

#### 考 察

一連の胆汁酸のラット肝S9共存下におけるAmes試験の結果に一致して、使用した5種胆汁酸の変異原性は代謝活性化系にハムスター肝S9を用いても陰性であり、合計で30種の5 $\beta$ -cholanoic acid誘導体が常法のAmes試験で変異原性を示さないことになる (Mckillop *et al.*, 1983; Mori *et al.*, 1991; Silverman and Andrews, 1977)。

LCAのみの2-AAに対する助変異原性は、PB処置肝に加えて、未処置ハムスター肝S9共存下においても新たに証明された (Fig. 1)。LCAの助変異原効果がポリ塩化ビフェニルで誘導したラット肝S9では発現しないこと (Kawalek *et al.*, 1983; Silverman and Andrews, 1977) を考え合わせると、2-AAに対するLCAの助変異原作用は特異的な肝チトクロムP-450 (CYP) に依存すること、すなわち常在性でしかもPBにより誘導されるCYP分子種がこれに関与することを意味している。DMHの変異原性については、ラット肝細胞を代謝活性化系に用いるとTA1530株に対しては陽性でTA100株では陰性となること (Malaveille *et al.*, 1983)、また最近になり、methyltransferase活性の欠損株 (*Escherichia coli* と *S. typhimurium*) で直接変異原性を示すこと (Xiao *et al.*, 1996) などが知られている。しかしDMHが直接変異原性を示さず、ハムスター肝S9共存下 (Fig. 2) でもラット肝S9を用いても (Wilpart *et al.*, 1983a) 陰性であるという結果から、DMHはTA100株に代謝活性化の有無にかかわらず変異原性を示さないことが判明した。UDCAを除く4種胆汁酸のハムスター肝S9共存下での助変異原作用はその活性値と共にWilpartら (1983a, b) の結果とよく一致し、さらに未誘導動物肝を用いても同様であることを明らかにした。またUDCAについての助変異原作用の

結果は初めての知見である。UDCAについては胆石溶解剤としての有用性が、ラットにDMHを投与後その大腸粘膜に対する影響の観察から、報告されている (松本ら, 1988)。しかし、彼等の観察がDMH単独投与群でも大腸癌の発生しない期間の実験系であることと今回の助変異原性が認められた事実とを考えると、プロモーション作用についてのさらなる検討の必要性が示唆される。

我々は、使用したN-ニトロソ化合物の変異原活性を指標とした代謝活性化にはPBで誘導される各種動物の肝CYPが関与すること (Mori *et al.*, 1985b, 1986b)、またこれらの変異原活性は各種の試料溶媒により顕著に抑制され、その阻害機構はラット肝による代謝活性化に対する作用であること (Mori *et al.*, 1985a) などを明らかにしている。Table 1と2で比較したように、DMSOによる顕著な阻害効果がハムスター肝S9による代謝活性化においても、BOPの場合を除き、観察された。BOPの活性がDMSOにより阻害されないのは、BOPの変異原性発現には非特異的な蛋白、例えば熱変性S9, BSAなどが関与すること (Mori *et al.*, 1985b, 1986b)、すなわちCYPの寄与がほとんどないためと考えられる。

陽性コントロールとして検討した2-AAとDMHにおいて明らかな助変異原性が認められたのは2次胆汁酸のみであったが、膀胱癌性N-ニトロソ化合物の場合には1次胆汁酸も顕著な助変異原作用を示した。緒言でも述べたように2次胆汁酸の助変異原性についてはよく知られているが、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineによるC3H/10T1/2 fibroblast cellの*in vitro* トランスフォーム活性が1次および2次胆汁酸の両方により促進されるという例 (Kaibara *et al.*, 1984) はあるが、N-ニトロソ化合物について1次胆汁酸が助変異原性を示したのは初めての知見である。

Table 3. Comutagenic activity of bile acid in TA100 strain preincubated with *N*-nitrosamine in the presence of liver S9 from PB-treated hamsters.

Bile acid ( $\mu$ g)	TA100 revertants/plate							
	BAP	BOP	NDMM	HPOP	MHP	MOP	MDHP	BHP
None (DMSO)	231 $\pm$ 90	346 $\pm$ 25	1390 $\pm$ 108	1077 $\pm$ 51	2508 $\pm$ 201	200 $\pm$ 9	150 $\pm$ 10	375 $\pm$ 82
Cholic acid								
100	520 $\pm$ 218 (2.3)	320 $\pm$ 33 (0.9)	1949 $\pm$ 176* (1.4)	1275 $\pm$ 92 (1.2)	4082 $\pm$ 397* (1.6)	208 $\pm$ 21 (1.0)	233 $\pm$ 13 (0.9)	435 $\pm$ 31 (0.9)
300	799 $\pm$ 26** (3.5)	328 $\pm$ 41 (0.9)	1301 $\pm$ 321 (0.9)	1427 $\pm$ 75* (1.3)	4365 $\pm$ 445* (1.7)	257 $\pm$ 18* (1.3)	222 $\pm$ 30 (0.9)	396 $\pm$ 40 (1.1)
500	846 $\pm$ 79** (3.7)	365 $\pm$ 62 (1.1)	1215 $\pm$ 551 (0.9)	1353 $\pm$ 90* (1.3)	3263 $\pm$ 530 (1.3)	217 $\pm$ 43 (1.1)	217 $\pm$ 20 (0.9)	410 $\pm$ 101 (1.1)
Chenodeoxycholic acid								
100	637 $\pm$ 43** (2.8)	389 $\pm$ 148 (1.1)	1491 $\pm$ 667 (1.1)	1856 $\pm$ 245* (1.7)	2200 $\pm$ 48 (0.9)	298 $\pm$ 17* (1.5)	187 $\pm$ 41 (0.7)	419 $\pm$ 37 (1.1)
300	571 $\pm$ 45* (2.5)	345 $\pm$ 70 (1.0)	1061 $\pm$ 408 (0.8)	991 $\pm$ 201 (0.9)	1738 $\pm$ 309 (0.7)	283 $\pm$ 4* (1.4)	59 $\pm$ 15 (0.2)	343 $\pm$ 59 (0.9)
500	576 $\pm$ 10** (2.5)	288 $\pm$ 17 (0.8)	1009 $\pm$ 232 (0.7)	905 $\pm$ 100 (0.8)	2452 $\pm$ 120 (1.0)	204 $\pm$ 50 (1.0)	47 $\pm$ 16 (0.2)	390 $\pm$ 30 (1.0)
Deoxycholic acid								
100	568 $\pm$ 101* (2.5)	368 $\pm$ 128 (1.1)	1672 $\pm$ 307 (1.2)	1027 $\pm$ 209 (1.0)	3458 $\pm$ 277* (1.4)	244 $\pm$ 21 (1.2)	224 $\pm$ 10* (1.5)	341 $\pm$ 29 (0.9)
300	429 $\pm$ 134 (1.9)	237 $\pm$ 51 (0.7)	1124 $\pm$ 78 (0.8)	990 $\pm$ 148 (0.9)	2599 $\pm$ 322 (1.0)	186 $\pm$ 17 (0.9)	65 $\pm$ 7 (0.4)	292 $\pm$ 74 (0.8)
500	214 $\pm$ 4 (0.9)	340 $\pm$ 2 (1.0)	842 $\pm$ 352 (0.6)	951 $\pm$ 124 (0.9)	2415 $\pm$ 337 (1.0)	187 $\pm$ 35 (0.9)	84 $\pm$ 2 (0.6)	272 $\pm$ 13 (0.7)
Ursodeoxycholic acid								
100	1441 $\pm$ 37** (6.2)	567 $\pm$ 21** (1.6)	1457 $\pm$ 390 (1.0)	1049 $\pm$ 173 (1.0)	3671 $\pm$ 353* (1.5)	309 $\pm$ 64 (1.5)	287 $\pm$ 25* (1.9)	283 $\pm$ 46 (0.8)
300	803 $\pm$ 144** (3.5)	361 $\pm$ 30 (1.0)	958 $\pm$ 453 (0.7)	1306 $\pm$ 165 (1.2)	2908 $\pm$ 421 (1.2)	255 $\pm$ 16 (1.3)	219 $\pm$ 18 (1.5)	296 $\pm$ 38 (0.8)
500	781 $\pm$ 4** (3.4)	283 $\pm$ 5 (0.8)	1069 $\pm$ 357 (0.8)	1261 $\pm$ 217 (1.2)	2934 $\pm$ 221 (1.2)	260 $\pm$ 11 (1.3)	237 $\pm$ 18* (1.6)	347 $\pm$ 34 (0.9)
Lithocholic acid								
100	1711 $\pm$ 271** (7.4)	344 $\pm$ 15 (1.0)	1561 $\pm$ 335 (1.1)	1202 $\pm$ 100 (1.1)	2347 $\pm$ 337 (0.8)	201 $\pm$ 10 (1.0)	121 $\pm$ 7 (0.8)	463 $\pm$ 25 (1.2)
300	1100 $\pm$ 285** (4.7)	279 $\pm$ 42 (0.8)	1658 $\pm$ 410 (1.2)	1066 $\pm$ 204 (1.0)	1587 $\pm$ 192 (0.6)	199 $\pm$ 18 (1.0)	43 $\pm$ 9 (0.3)	359 $\pm$ 68 (1.0)
500	682 $\pm$ 51** (3.0)	158 $\pm$ 14 (0.5)	1045 $\pm$ 85 (0.8)	1204 $\pm$ 254 (1.1)	1417 $\pm$ 136 (0.6)	246 $\pm$ 26 (1.2)	68 $\pm$ 19 (0.5)	368 $\pm$ 60 (1.0)

Each value is a mean of three experiments done in duplicate with 10 mg carcinogen dissolved in 0.1 ml of DMSO. Spontaneous revertants (135) were subtracted, and values in parentheses show the ratio to the activity obtained without bile acid. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared to the revertants observed without bile acid (Student's *t*-test).

胆汁酸の助変異原性の作用機構についてはさらに詳細な検討が必要であるが、1次および2次胆汁酸によるこれらの助変異原性は、溶媒に水を用いたとき (Table 2) および PB 誘導肝 S9 を用いたとき (Table 3) により顕著であり、逆に BOP の場合は、PB 肝 S9 共存下の UDCA の効果を例外に、全く助変異原性が認められないこと、さらに BOP と HPOP の直接変異原性を示す条件で検討した場合も全く影響しなかったこと、また胆汁酸が CYP の内因性の基質であること (Kawalek, *et al.*, 1983) などと考え合わせると、胆汁酸の膀胱癌性 *N*-ニトロソ化合物に対する助変異原作用は肝 CYP による代謝活性化反応に大きく依存することが判明した。9 種の *N*-ニトロソ化合物のなかで最も顕著に、また使用した胆汁酸すべてに助変異原性が認められたのは BAP のみであるが、BAP はこれらの化合物のなかでは最も極性が低

い物質である。2-AA と DMH について報告されている胆汁酸による助変異原作用においても、5 種胆汁酸のなかで最も極性の低い LCA が最も強い活性を示す事実を考え合わせると、*in vitro* の助変異原性を試験する反応系においては、変異原物質と助変異原物質の極性はその活性を左右する重要な因子の 1 つとなることが推察される。

胆汁酸の助変異原作用が代謝活性化機構に依存することと胆汁の膵管への逆流 (Havey *et al.*, 1989; 上原ら, 1995)、膵液中での 1 次および 2 次胆汁酸の検出 (上原ら, 1995)、膵液中での膀胱癌物質の検出 (小西, 1993)、膵管内に直接膀胱癌物質を投与することによる膵管腺癌の発生 (Kamano *et al.*, 1988; Kamano *et al.*, 1996)、ラードを大腸癌発生のイニシエーション段階で作用させることによる糞中胆汁酸濃度の増加に伴う促進効果 (Reddy

and Maruyama, 1986) などと考え合わせると、標的部位でのイニシエーション過程での代謝活性化への作用による胆汁酸の膀胱癌発生への関与も示唆される。

BHP がその原料アミンや市販の化粧品中に検出され (Eisenbrand *et al.*, 1991)、また BHP が実験動物の胃内で前駆体アミンと亜硝酸との反応により容易に生成し (Konishi *et al.*, 1987)、さらに日本での年間生産量が 1000 トンを超しているこれら前駆体アミンの亜硝酸共存下での変異原性 (Mori *et al.*, 1988) と発癌性 (Yamamoto *et al.*, 1989, 1995) のあることなどが証明されている。したがって、ヒトの膀胱癌における胆汁酸と *N*-ニトロソ化合物の関与についての詳細な研究は重要な課題と考えられる。

#### 参考文献

- Birt, D. F., A. D. Julius, L. T. White and P. M. Pour (1989) Enhancement of pancreatic carcinogenesis in hamsters fed a high-fat diet ad libitum and at a controlled calorie intake, *Cancer Res.*, **49**, 5848-5851.
- Eisenbrand, G., H. Blankart, H. Sommer and B. Weber (1991) *N*-Nitrosoalkanolamines in cosmetics, In I. K. O'Neill, H. Bartsch and J. Chen (eds.) *Relevance to Human Cancer of N-Nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Micotoxins*, IARC Scientific Publication No. 105, IARC, Lyon, France, pp. 238-241.
- Havey, M. H., K. R. Wedgwood, J. A. Austin and H. A. Reber (1989) Pancreatic duct pressure, duct permeability and acute pancreatitis, *Br. J. Surg.*, **76**, 859-862.
- Hill, M. J. (1990) Bile flow and colon cancer, *Mutat. Res.*, **238**, 313-320.
- Kaibara, N., E. Yurugi and S. Koga (1984) Promoting effect of bile acids on the chemical transformation of C3H/10T1/2 fibroblasts *in vitro*, *Cancer Res.*, **44**, 5482-5485.
- Kamano, T., N. Azuma, A. Katami, J. Tamura, N. Sakakibara, M. Matsumoto, K. Mizumoto, S. Kitazawa and Y. Konishi (1988) Preliminary observation on pancreatic duct adenocarcinoma induced by intraductal administration of *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in dogs, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 1-4.
- Kamano, T., Y. Mori, K. Suda, M. Takahashi, T. Uchida, T. Takada, M. Tsutsumi and Y. Konishi (1996) Mutagenic activation of *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine by pancreatic juice and assessment of its ductal tumorigenicity following intraductal administration in dogs, *Int. J. Pancreatol.*, **20**, 51-57.
- Kawalek, J. C., R. K. Hallmark and A. W. Andrews (1983) Effect of lithocholic acid on the mutagenicity of some substituted aromatic amines, *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**, 293-298.
- Konishi, Y., Y. Yokose, Y. Mori, H. Yamazaki, K. Yamamoto, A. Nakajima and A. Denda (1987) Lung carcinogenesis by *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine-related compounds and their formation in rats, In Bartsch, H., I. K. O'Neill and R. Schulte-Hermann (eds.) *Relevance of N-Nitroso Compounds to Human Cancer: Exposure and Mechanisms*, IARC Scientific Publication No. 84, IARC, Lyon, France, pp. 250-252.
- 小西陽一 (1988) 膀胱癌の実験モデル, *医学のあゆみ*, **144**, 424-426.
- 小西陽一 (1991) 膀胱癌に関する研究—ヒトの膀胱癌克服を目指して, *代謝*, **28**, 29-35.
- 小西陽一 (1993) 膀胱癌の発生, *日本病理学会誌*, **82**, 47-79.
- Longnecker, D. S., B. D. Roebuck and E. T. Kuhlmann (1985) Enhancement of pancreatic carcinogenesis by a dietary unsaturated fat in rats treated with saline or *N*-nitroso(2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl)amine, *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 219-222.
- Makino, T., T. Obara, H. Ura, T. Kinugasa, H. Kobayashi, S. Takahashi and Y. Konishi (1986) Effects of phenobarbital and secondary bile acids on liver, gallbladder and pancreas carcinogenesis initiated by *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in hamsters, *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 967-975.
- Malaveille, C., G. Brun and H. Bartsch (1983) Studies on the efficiency of the Salmonella/rat hepatocyte assay for the detection of carcinogens as mutagens: activation of 1,2-dimethylhydrazine and procarbazine into bacterial mutagens, *Carcinogenesis*, **4**, 449-455.
- 松本英男, 八木田旭邦, 立川 勲, 福住直由 (1988) 胆石溶解剤 chenodeoxycholic acid および ursodeoxycholic acid の大腸粘膜に対する影響, *医学のあゆみ*, **146**, 807-808.
- Mckillop, C. A., R. W. Owen, R. F. Bilton and E. A. Haslam (1983) Mutagenicity testing of steroids obtained from bile acids and cholesterol, *Carcinogenesis*, **4**, 1179-1183.
- Mori, Y., A. Masuda, K. Mizumoto, Y. Konishi, M. Une and T. Hoshita (1991) Absence of mutagenic action of 5 $\beta$ -cholan-24-oic acid derivatives in the bacterial fluctuation and standard Ames tests, *Mutat. Res.*, **262**, 267-274.
- Mori, Y., H. Takahashi, H. Yamazaki, K. Toyoshi, T. Makino, Y. Yokose and Y. Konishi (1984) Distribution, metabolism and excretion of *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in Wistar rats, *Carcinogenesis*, **5**, 1443-1447.
- Mori, Y., H. Yamazaki, K. Toyoshi, A. Denda and Y. Konishi (1986a) Mutagenic activation of carcinogenic *N*-nitrosopropylamines by liver S9 fractions from mice, rats and hamsters: evidence for a cytochrome P-450 dependent reaction, *Carcinogenesis*, **7**, 375-379.
- Mori, Y., H. Yamazaki, K. Toyoshi, Y. Emi, K. Uchida, M. Tsutsumi and Y. Konishi (1985a) Inhibitory effect of organic solvents on the mutagenicity of *N*-nitrosodialkylamines in Salmonella, *Mutat. Res.*, **142**, 153-158.
- Mori, Y., H. Yamazaki, K. Toyoshi, T. Makino, T. Obara, Y. Yokose and Y. Konishi (1985b) Mutagenic activation of carcinogenic *N*-nitrosopropylamines by rat liver: evidence for a cytochrome P-450 dependent reaction, *Carcinogenesis*, **6**, 415-420.
- Mori, Y., H. Yamazaki, K. Toyoshi, H. Maruyama and Y. Konishi (1986b) Activation of carcinogenic *N*-nitrosopropylamines to mutagens by lung and pancreas S9 fractions from various animal species and man, *Mutat. Res.*, **160**, 159-169.
- Mori, Y., H. Yamazaki, K. Yamamoto, A. Nakajima, Y. Yokose and Y. Konishi (1988) Mutagenesis of isopropanolamines and ethanolamines after reaction with sodium nitrite, *Exp. Oncol. (Life Science Adv.)*, **7**, 45-50.
- Ogawa, T., T. Makino, K. Kosahara, A. Koga and F. Nakayama (1992) Promoting effects of both dietary cholesterol and cholestyramine on pancreatic carcinogenesis initiated by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters, *Carcinogenesis*, **13**, 2047-2052.
- Ogawa, T., T. Makino, K. Mizumoto and F. Nakayama (1991) Promoting effect of truncal vagotomy on pancreatic carcinogenesis initiated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters, *Carcinogenesis*, **12**, 1227-1230.
- Pour, P. M. and R. B. Wilson (1980) Experimental tumors of the pancreas, in Moosa, A. R. (ed.), *Tumors of the Pancreas*, Williams and Wilkins, Baltimore, London, pp. 37-158.
- Reddy, B., A. Engle, S. Katsifis, B. Simi, H.-P. Bartram, P. Perrino and C. Mahan (1989) Biochemical epidemiology of colon cancer: Effect of types of dietary fiber on fecal mutagens, acid and neutral sterols in healthy subjects, *Cancer Res.*, **49**, 4629-4635.
- Reddy, B. S. and H. Maruyama (1986) Effect of different levels of dietary corn oil and lard during the initiation phase of colon carcinogenesis in F344 rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 815-822.

- Reddy, B. S., K. Watanabe, J. H. Weisburger and E. L. Wynder (1977) Promoting effect of bile acid in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats, *Cancer Res.*, **37**, 3238-3242.
- Sakamoto, Y., T. Nakashima, T. Shima, T. Nakajima, Y. Seto, T. Takino and H. Nishino (1988) Suppressive effect of bile acid on unscheduled DNA synthesis in primary cultured rat hepatocyte, *Hepatology*, **8**, 1399.
- Silverman, S. J. and A. W. Andrews (1977) Bile acids: Co-mutagenic activity in the Salmonella-mammalian-microsome mutagenicity test, *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 1557-1559.
- 上原総一郎, 本庄恭補, 半田 洋, 辻 靖, 川西譲児, 片桐江里, 佐川 保, 泉山 滋, 平山亮夫 (1995) 慢性膵炎症例における膵液中胆汁酸の測定について, *膵臓*, **10**, 280-285.
- Ura, H., T. Makino, S. Ito, M. Tsutsumi, T. Kinugasa, T. Kamano, H. Ichimiya and Y. Konishi (1986) Combined effects of cholecystectomy and lithocholic acid on *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in Syrian golden hamsters, *Cancer Res.*, **46**, 4782-4786.
- Venitt, S., D. Bosworth and D. F. Easton (1987) Lack of mutagenic activity of bile acids in bacterial fluctuation tests, *Mutat. Res.*, **190**, 191-196.
- Williams, G. M., M. F. Laspia and V. C. Dunkel (1982) Reliability of the hepatocyte primary culture/DNA repair test in testing coded carcinogens and noncarcinogens, *Mutat. Res.*, **97**, 359-370.
- Wilpart, M., P. Mainguet, A. Maskers and M. Roberfroid (1983a) Mutagenicity of 1,2-dimethylhydrazine towards *Salmonella typhimurium*, co-mutagenic effect of secondary biliary acids, *Carcinogenesis*, **4**, 45-48.
- Wilpart, M., P. Mainguet, A. Maskers and M. Roberfroid (1983b) Structure-activity relationship amongst biliary acids showing co-mutagenic activity towards 1,2-dimethylhydrazine *Carcinogenesis*, **4**, 1239-1241.
- Wynder, E. L., K. Mabuchi, N. Maruchi and J. G. Fortner (1973) Epidemiology of cancer of the pancreas, *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**, 645-667.
- Xiao, W., M. Nowak, S. Laferte and T. Fontanie (1996) Mutagenicity and toxicity of the DNA alkylation carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Mutagenesis*, **11**, 241-245.
- Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, *Mutat. Res.*, **48**, 121-130.
- Yamada, K., B. O. Lim, M. Nonaka and M. Sugano (1993) Measurements of mutagenic and antimutagenic activities of bile acids by rec-assay, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 599-602.
- Yamamoto, K., A. Nakajima, H. Eimoto, M. Tsutsumi, H. Maruyama, A. Denda, Y. Mori and Y. Konishi (1989) Carcinogenic activity of endogenously synthesized *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats administered bis(2-hydroxypropyl)amine and sodium nitrite, *Carcinogenesis*, **9**, 1607-1611.
- Yamamoto, K., M. Tsutsumi, E. Kobayashi, T. Endoh, O. Noguchi, E. Okajima, A. Denda, Y. Mori and Y. Konishi (1995) Initiation of hepatocarcinogenesis by endogenously formed *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine, *N*-nitrosodiethanolamine and *N*-nitroso-2,6-dimethylmorpholine in rats, *Carcinogenesis*, **16**, 2633-2636.

## 新しい *in vivo* 遺伝毒性試験としての マウス多臓器 SCG 試験

### Alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs as a new *in vivo* genotoxicity testing system

佐々木 有, 泉山房子, 西館 絵美

Yu F. Sasaki, Fusako Izumiyama and Emi Nishidate

八戸工業高等専門学校物質工学科 039-11 青森県八戸市田面木字上野平 16-1

Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering,  
Hachinohe National College of Technology, Tamonoki Uwanotai 16-1,  
Hachinohe Aomori 039-11, Japan

(受付: 1996年9月30日; 受理: 1996年12月4日)

#### Summary

The effect of seven model chemical mutagens on DNA was evaluated using alkaline single cell gel (SCG) electrophoresis (Comet) assay in five mouse organs - liver, lung, kidney, spleen and bone marrow. Mice were sacrificed 3 and 24 hours after the administration of each mutagen. Each organ was minced, suspended at a concentration of 1 g/ml in chilled homogenizing buffer (pH 7.5) containing 0.075 M NaCl and 0.024 M Na<sub>2</sub>EDTA, homogenized gently using a Potter-type homogenizer at 500-800 rpm set in ice. Centrifuged nuclei were used for the alkaline SCG assay.

Two alkylating agents, MMS and ENU; crosslinking agent MMC; aromatic amines, 2AAF; polycyclic aromatic hydrocarbon B[a]P; and inorganic chemicals, KBrO<sub>3</sub>, were genotoxic. Colchicine, on the other hand, produced negative responses. These results demonstrated that the alkaline SCG assay detects the mutagenic effects of chemicals in a manner predicted by their mode of action.

The genotoxic effect of four liver-targeting carcinogens was evaluated using alkaline SCG assay. The selected carcinogens produced negative responses in the micronucleus test. Auramine, *p*-dimethylaminoazobenzene, phenobarbital sodium and styrene-7,8-oxide induced DNA damage, mainly in the liver. We suggest that it may be possible to use the alkaline SCG assay to detect the genotoxicity of chemicals *in vivo* in their target organs. The *in vivo* alkaline SCG assay with our modification was shown to be applicable to rats, suggesting that this assay could be combined with general toxicity tests.

**Keywords:** alkaline SCG assay, comet assay, multiple organs, *in vivo* genotoxicity

#### 緒 言

現在, もっとも汎用されている変異原性試験は微生物を用いる Ames 試験, 培養細胞を用いる染色体異常試験, マウスを用いる小核試験の3つである。中でも, 小核試験は *in vivo* の試験系として, 現在, 唯一ルーチン的に用いられているものとして重要なものである。小核試験は実験方法もきわめて簡便であり, UDS 試験のように放射性物質使用設備を必要としないなど, ルーチン試験としての優れた特質を有している。しかしながら, 現在汎用されている小核試験は骨髓細胞や末梢血液細胞を観察対象とするものであり, それゆえの欠点を有してい

る。最近, 日本環境変異原学会 (JEMS) 哺乳動物試験 (MMS) 研究会は国際癌研究機構 (IARC) がヒトに対する発癌性の疑いを認めた化学物質について, 小核試験で *in vivo* の変異原性を検討した (Morita *et al.*, in press)。それによると, 造血組織や肺を標的組織とする化学物質に対しては高い検出率を示すが, 肝臓を標的臓器とする場合は 40% 程度と低い検出率であった。そのため, Ames 試験や染色体異常試験で陽性であるにも関わらず小核試験で陰性である場合, その原因として, *in vivo* では真に変異原性がない, 被験物質が標的である骨髓細胞に到達していないために変異原性が検出されない, というこ

Table 1. List of chemicals tested.

Chemical tested	Abbreviation	Cas No.	Source <sup>a</sup>	Vehicle <sup>b</sup>	Route
Alkylating agents					
Methyl methanesulfonate	MMS	66-27-3	A	S	ip
N-Ethyl-N-nitrosourea	ENU	759-73-9	N	P	ip
Cross-linking agent					
Mitomycin C	MMC	50-07-7	K	S	ip
Aromatic amines					
2-Acetylaminofluorene	2AAF	53-96-3	W	T	ip
Polycyclic aromatic hydrocarbon					
Benzo[a]pyrene	B[a]P	50-32-8	S	T	po
Inorganic chemicals					
Potassium bromate	KBrO <sub>3</sub>	7758-01-2	W	S	ip
Spindle poison					
Colchicine		64-86-8	W	S	ip
Liver targeting carcinogens					
Auramine		492-80-8	W	S	ip
p-Dimethylamino-azobenzene	DAB		W	T	po
Phenobarbital sodium		57-30-7	Sa	S	ip
Styrene-7,8-oxide		96-09-3	W	T	ip
Other					
Pyrimethamine		58-14-0	S	S	po

<sup>a</sup> A: Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI (U.S.A.); K: Kyowa Hakko Kogyo Co., Tokyo (Japan); N: Nacalai Tesque Inc., Kyoto (Japan); S: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO (U.S.A.); Sa: Sankyo Co., Inc., Tokyo (Japan); W: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka (Japan).

<sup>b</sup> P: Phosphate buffer (pH 6.0); S: Saline; T: 2% Tween 80.

が考えられる。再生肝や腸管を用いた小核試験も試みられているが、造血組織以外での実施には困難であり、結果として造血組織以外の臓器に高い特異性を持つ化学物質では変異原性の検出が難しいものと推察される。

DNA 損傷を検出する試験系として、近年、アルカリ単細胞ゲル電気泳動法 (SCG 法) が注目されている。本試験法は DNA 鎖切断とアルカリ感受性部位の形成を指標とするものである (Singh *et al.*, 1988)。この方法は染色体異常の形成を指標とするものではないことから、造血組織以外の分裂能のない組織の DNA 損傷を検出できる可能性がある (Fairbairn *et al.*, 1995)。従来、SCG 法を動物組織に応用するときには collagenase や trypsin などの酵素処理によって単離細胞が調製されてきた (Schmezer *et al.*, 1994; Monteith *et al.*, 1995; Altamirano-Lozano *et al.*, 1996)。しかし、酵素処理による単離細胞の調製は手法上も煩雑であるだけでなく、例えば、trypsin 処理によって DNA の断片化が促進されるという問題もあった (Singh *et al.*, 1991)。我々は酵素処理によらずにマウス組織で SCG 試験を実施する簡便な手法を開発したが (Sasaki *et al.*, in press)、ここでは小核試験の欠点を補うことができる *in vivo* 変異原性試験の一つとしての SCG 試験の有効性を検討した結果について報告する。

#### 実験材料および方法

##### 1. 被験物質

本研究で用いた被験物質を Table 1 に示した。マウスとラットはそれぞれ 7 週齢の CD-1 雄と 5 週齢の Fisher

雄であり、いずれも日本チャールスリバーから購入し、1 週間の馴致の後、実験に用いた。馴致と実験の期間、餌 (オリエンタル酵母 MF) と飲水は自由に摂取させた。

##### 2. 単離核の調製

被験物質の投与用量として小核試験で用いられた最高用量を用い、投与経路も小核試験 (CSGMT, 1992; Ono and Yoshimura, 1996; 小形ら, 1996; Morita *et al.*, in press) と同一とした (Table 1)。投与 0 (対照), 3, 24 時間後に頸椎脱臼により動物を屠殺し、直ちに肝臓、腎臓、脾臓、肺、両側大腿骨を摘出した。大腿骨を除いて解剖鉢で細切し、臓器湿重量 1 g あたり約 1 ml の冷却したホモジナイズ緩衝液 (0.075 M NaCl; 0.024 M Na<sub>2</sub>EDTA; pH 6.5~7.5) を加えてクリアランスの緩いテフロン製のポッター型ホモジナイザーで 500~700 rpm で緩やかにホモジナイズした。700 g で 10 分間冷却遠沈し、沈殿した核分画に臓器湿重量 1 g あたり約 1 ml の冷却したホモジナイズ緩衝液を加えて再懸濁し、第 2 層ゲル作製まで水中に保存した。両側大腿骨からは 0.5 ml のホモジナイズ緩衝液で骨髓細胞を採取し、同様に水中に保存した。

##### 3. アガロースゲルの作製

SCG 試験に用いたアガロース (第 1, 3 層は普通アガロース GP42, 第 2 層は低ゲル化温度アガロース LTG) はナカライテスクから購入した。GP42 および LTG は生理食塩水を用いてそれぞれ 1% と 2% になるように電子レンジで加熱溶解した。第 1 層ゲルは溶解した GP42 の 75  $\mu$ l を全面フロストスライドガラス (マツナミ) 上に置き、直ちにその上にスライドガラス (マツナミ) を

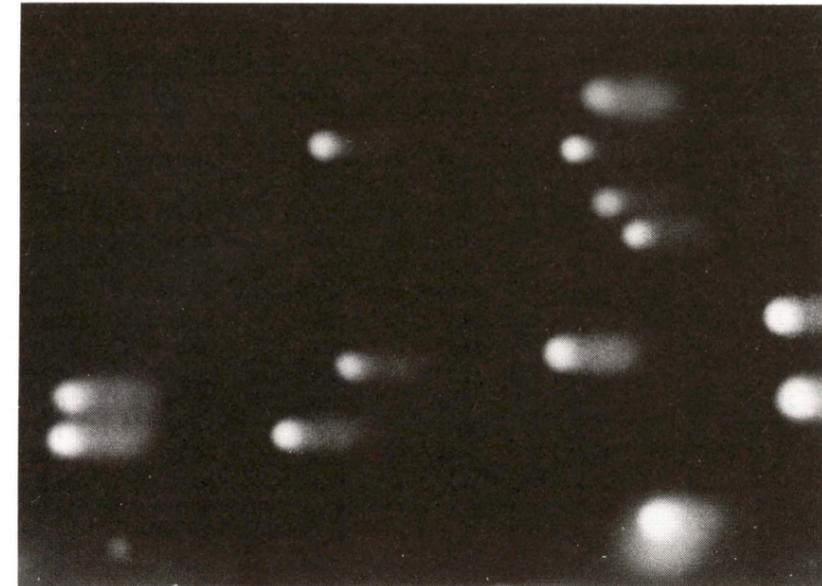


Fig. 1. Comet images showing liver DNA damaged by MMS.

かぶせてアガロースを広げ、室温で水平に置いてアガロースを固化させた。アガロースが固化したところを見計らって (GP42 の場合は約 1 分程度)、かぶせたスライドガラスを横に滑らせるようにして引き剥がした。アガロース LTG は加熱溶解後約 45°C に保温しておき、第 2 層ゲル作製の直前に先に調製した核懸濁液または骨髓細胞懸濁液と 1:1 で混合した。その 75  $\mu$ l を固化した第 1 層ゲルに重層し、直ちにスライドガラスをかぶせて固化させた。アガロースが固化した頃を見計らってスライドガラスを引き剥がし、更に第 3 層ゲルとして GP42 を 100  $\mu$ l 重層して同様に固化させた。

##### 4. 核溶解および電気泳動

作製したアガロースゲルを 10 cm ガラスシャーレに水平に置き、直ちに氷冷しておいた核溶解液 (2.5 M NaCl; 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA; 10 mM Tris; 1% Sidium N-dodecanoylsalcosinate; 10% DMSO; 1% Triton X-100; pH 10) をアガロースゲルが完全に浸るまで静かに加えた (Singh *et al.*, 1988)。そのまま静かに 0°C にセットした低温インキュベーターに移し、1 時間静置して核を溶解させた。その後、直ちにアガロースゲルをサブマリン型電気泳動槽に移して陽極寄りに一線に並べ、氷冷しておいた電気泳動緩衝液 (0.3 M NaOH; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH > 13) をアガロースゲルが完全に浸るまで静かに加え、電気泳動槽ごと 0°C にセットした低温インキュベーターに移した。そのまま 10 分間静置して DNA を unwinding させた後、25 V で 15 分間、定電圧電気泳動を行った (Sasaki *et al.*, in press)。このとき、電流が 250 mA 程度になるように電気泳動液の量を調整した。電気泳動が終了したアガロースゲルを静かに引き上げ、10 cm ガラスシャーレに水平に置き、アガロースゲルが完全に浸るまで静かに中和液 (0.4 M Tris; pH 7.5) を加え、10~20 分

間静置した。アガロースゲルを静かに引き上げ、20  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド液 50  $\mu$ l を滴下して染色し、カバーガラスをかけた。

G 励起系のフィルターを装着した蛍光顕微鏡を用いて総倍率 200 倍で写真 (フジフィルム, ネオパンプレスト, ASA400) を撮影し (Fig. 1)、各臓器 50 核についてネガ上でコメット像の全長、核の直径を測定し、全長から核の直径を減じて migration とした。Migration について、Student の t 検定により処理群と対照群を比較した。なお、核とコメットテールが完全に分離しているコメット像は細胞死による DNA の低分子化をあらわすとされているため (Fairbairn *et al.*, 1995)、このようなコメット像は計測の対象から外した。

#### 結 果

##### 1. 小核試験陽性物質

MMS 研究会の小核試験共同研究 (CSGMT, 1992) で用いられた小核誘発陽性対照物質から作用機序によって選んだものについて、SCG 試験を行った。各臓器の migration の平均値を Table 2 に示した。

アルキル化剤 (MMS, ENU) を腹腔内に投与し、3, 24 時間後に屠殺したときの migration の分布を Fig. 2 (対照群の migration の分布は省略、以下同様) に示した。投与 3 時間後には 5 つの臓器すべてで migration の有意な増大が認められ、24 時間後には減少する傾向にあった。MMC (DNA 架橋形成剤) の投与 3 時間後には 5 つの臓器すべてにおいて migration の有意な増大が認められ、24 時間後には、肺を除いて、減少した (Fig. 3)。2AAF (芳香族アミン) の投与 3 時間後には肝、腎、肺、骨髓に、24 時間後には肝のみに migration の有意な増大が認められた (Fig. 4)。B[a]P (多環芳香族) の投与 3 時間後には

Table 2. Migration of nuclear DNA from five organs of mice treated with mutagens.

Mutagen	mg/kg	Sampling time (h)	Animal No.	Migration ( $\mu\text{m}$ )				
				Liver	Kidney	Lung	Spleen	Bone marrow
<b>Alkylating agents</b>								
MMS	80	0	1	0.25	0.00	0.72	0.77	0.88
			2	0.93	1.03	0.26	1.19	0.00
			Pooled	0.59	0.52	0.49	0.98	0.44
		3	1	51.9	57.1	48.0	61.5	50.3
			2	44.1	52.0	47.2	64.1	55.2
			Pooled	47.0***	54.6***	47.6***	62.8***	52.8***
		24	1	25.2	24.4	26.6	25.6	5.07
			2	34.2	21.4	18.9	23.1	5.30
			Pooled	29.7***	22.4***	22.8***	24.4***	5.19**
ENU	25	0	1	0.25	0.00	0.72	0.77	0.88
			2	0.93	1.03	0.26	1.19	0.00
			Pooled	0.59	0.52	0.49	0.98	0.44
		3	1	53.2	37.9	37.2	24.5	15.4
			2	62.8	51.6	33.7	20.7	7.43
			Pooled	58.0***	44.7***	35.4***	22.6***	11.4***
		24	1	12.6	1.39	4.18	6.71	1.24
			2	10.1	1.70	3.20	5.68	0.93
			Pooled	11.4***	1.55	3.69**	6.19***	1.08
<b>DNA crosslinking agent</b>								
MMC	2	0	1	3.66	2.94	2.22	2.32	2.74
			2	3.46	4.49	2.74	0.77	1.70
			Pooled	3.56	3.72	2.48	1.55	2.22
		3	1	64.1	50.8	37.1	26.3	8.15
			2	66.7	43.6	34.1	33.0	10.3
			Pooled	65.4***	47.2***	35.8***	29.7***	9.24***
		24	1	35.0	25.2	33.5	17.5	5.86
			2	44.7	27.5	37.6	22.1	7.20
			Pooled	39.9***	26.3***	35.5***	19.8***	6.53**
<b>Aromatic amines</b>								
2AAF	400	0	1	1.75	1.86	1.91	0.36	0.88
			2	2.43	1.81	0.77	0.41	2.12
			Pooled	2.09	1.83	1.34	0.39	1.50
		3	1	8.83	8.72	6.09	0.72	4.59
			2	13.9	12.8	9.70	0.00	4.90
			Pooled	11.4***	10.8***	7.90***	0.36	4.75
		24	1	12.8	1.29	4.89	0.00	5.37
			2	9.50	2.32	4.66	1.86	3.35
			Pooled	11.1***	1.81	4.77	0.93	4.36
<b>Polycyclic aromatic hydrocarbon</b>								
B[a]P	250	0	1	2.58	1.66	1.03	2.53	1.75
			2	1.86	2.78	1.29	3.20	0.52
			Pooled	2.22	2.22	1.16	2.86	1.14
		3	1	14.8	3.82	15.4	1.50	1.24
			2	8.72	5.57	14.7	2.68	0.26
			Pooled	11.7***	4.70	15.0***	2.09	0.75
		24	1	1.75	0.77	5.21	0.67	0.00
			2	3.77	3.20	6.05	2.32	1.70
			Pooled	2.76	1.99	5.63*	0.72	0.85
<b>Inorganic chemicals</b>								
KBrO <sub>3</sub>	200	0	1	0.98	1.70	1.45	1.39	0.62
			2	1.96	1.29	1.24	1.03	0.88
			Pooled	1.47	1.50	1.34	1.21	0.75
		3	1	14.4	16.3	7.28	4.03	1.08
			2	10.2	12.8	5.01	2.74	1.91
			Pooled	12.3***	14.6***	6.14***	3.38	1.50
		24	1	3.71	2.79	5.11	0.00	1.39
			2	5.83	6.76	2.32	1.91	1.55
			Pooled	4.77	4.77	3.72	0.95	1.47

Table 2. continued

Mutagen	mg/kg	Sampling time (h)	Animal No.	Migration ( $\mu\text{m}$ )				
				Liver	Kidney	Lung	Spleen	Bone marrow
<b>Spindle poison</b>								
Colchicine	2	0	1	1.75	1.86	1.91	0.36	0.88
			2	2.43	1.81	0.77	0.41	2.12
			Pooled	2.09	1.83	1.34	0.39	1.50
		3	1	1.81	1.65	3.35	0.41	0.00
			2	2.32	2.68	2.58	0.77	1.75
			Pooled	2.06	2.17	2.97	0.59	0.88
		24	1	1.55	2.01	2.06	1.55	1.19
			2	1.29	2.32	1.81	0.00	2.32
			Pooled	1.42	2.17	1.94	0.77	1.75

Significant difference: \*0.01 < P < 0.05; \*\*0.001 < P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 (Student's *t* test).

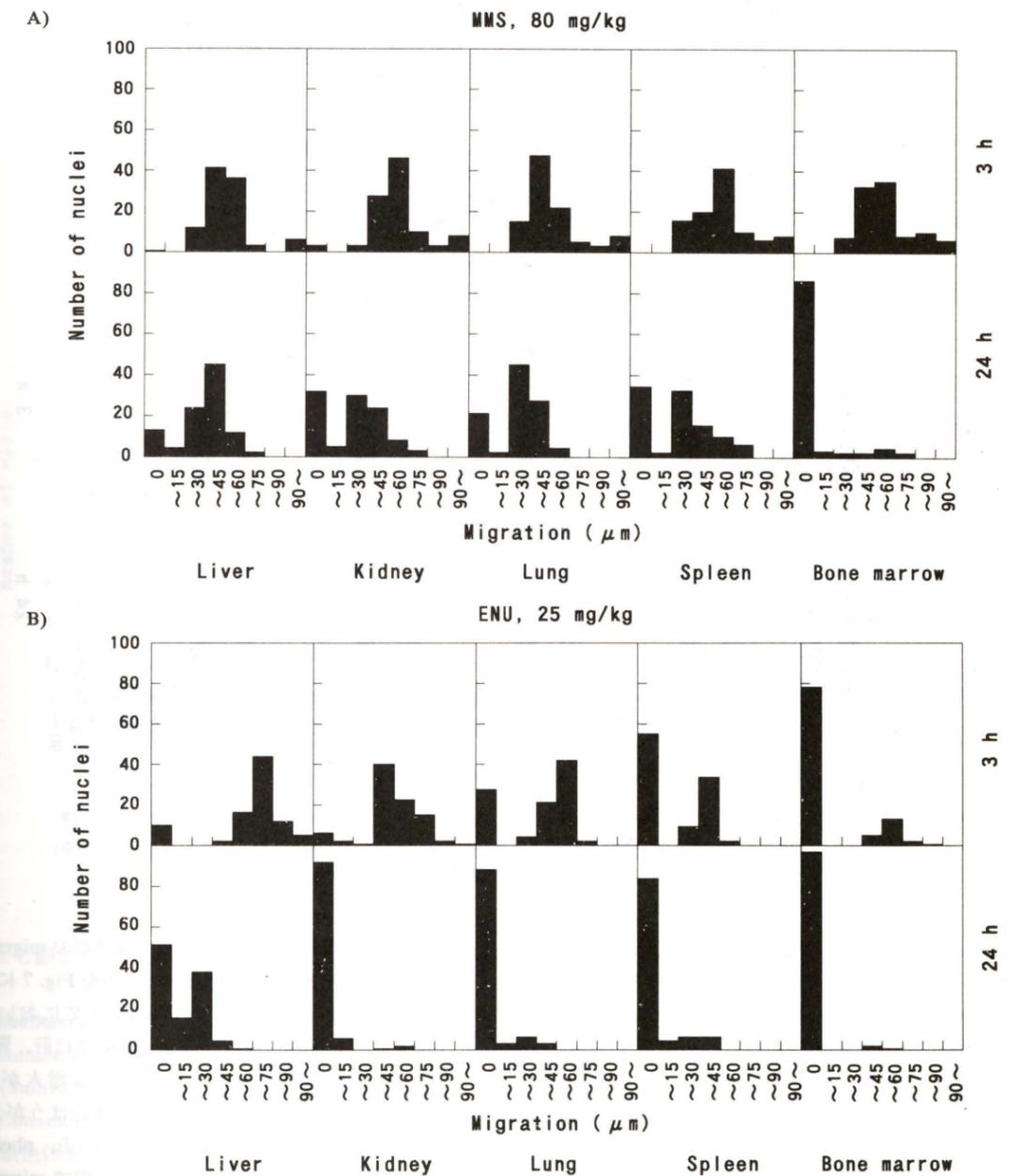


Fig. 2. The distribution of migration of nuclear DNA isolated from organs of mice treated with alkylating agents. Migration was measured for 50 nuclei per mouse. A) MMS, B) ENU.

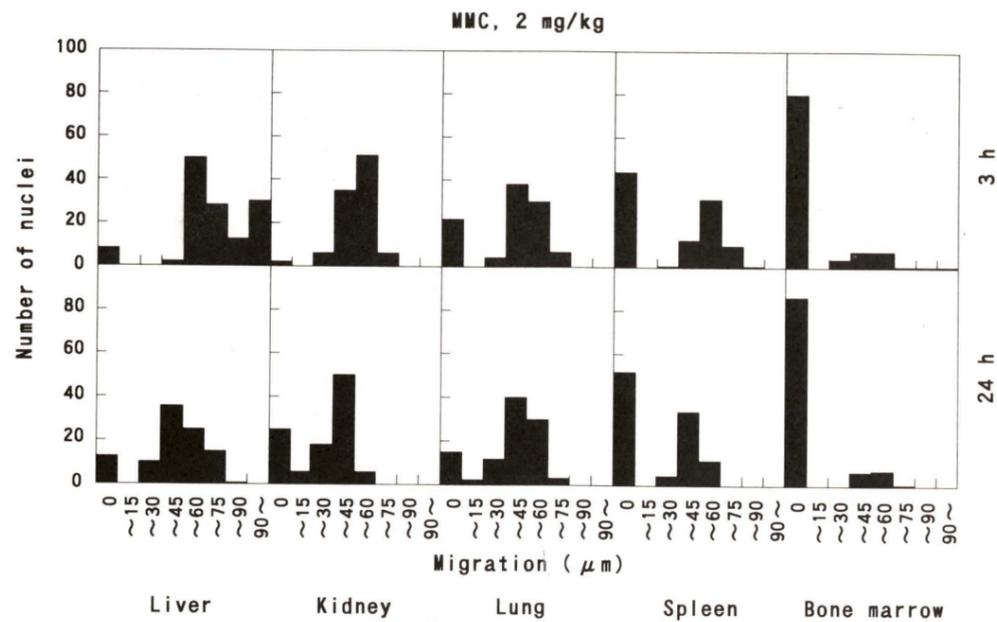


Fig. 3. The distribution of migration of nuclear DNA isolated from organs of MMC-treated mice. Migration was measured for 50 nuclei per mouse.

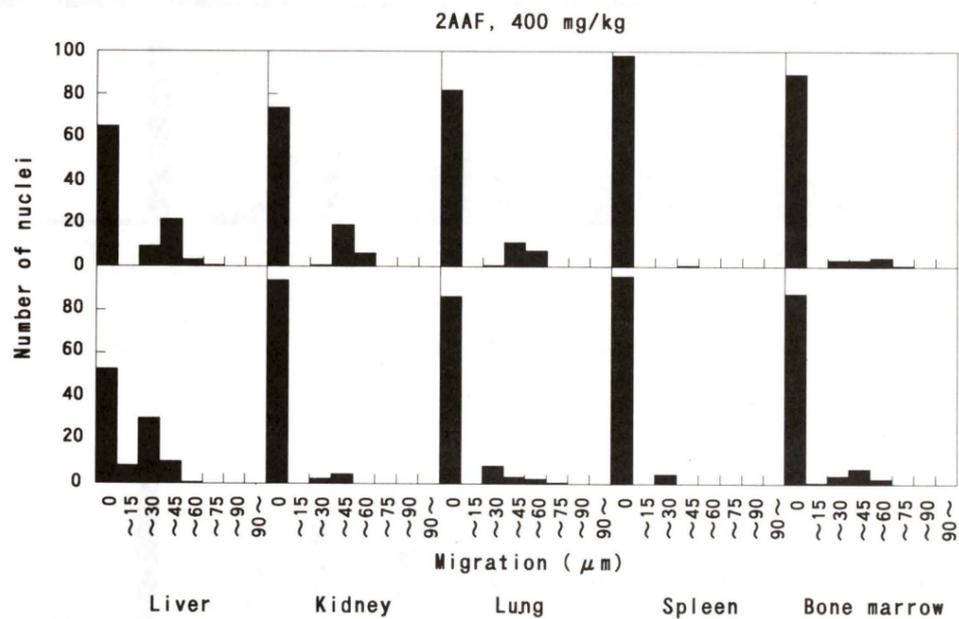


Fig. 4. The distribution of migration of nuclear DNA isolated from organs of 2AAF-treated mice. Migration was measured for 50 nuclei per mouse.

肝と肺に migration の有意な増大が認められた (Fig. 5).  $\text{KBrO}_3$  (無機金属塩) の投与3時間後には肝、腎、肺で migration の有意な増大が認められた (Fig. 6). 分裂阻害剤の colchicine の投与ではいずれの臓器でも migration の有意な増大は認められなかった。

## 2. 肝癌誘発剤

肝に特異性が示唆される IARC group 2A, 2B の化合物のうち、MMS 研究会の小核試験共同研究で小核試験が陰性であったもの (Morita *et al.*, in press) から選んだもの

について SCG 試験を行った。各臓器の migration の平均値を Table 3 に、migration の分布を Fig. 7 に示した。Styrene-7,8-oxide では5つの臓器すべてにおいて migration の増大が認められた。Auramine では肝、腎、肺、脾に、DAB では肝に migration の有意な増大が認められた。いずれの場合にも、投与3時間後のほうが24時間後よりも陽性結果が顕著であった。一方、phenobarbital sodium では投与24時間後の肝、肺、脾で migration の有意な増大が認められた。いずれの被験物質についても、

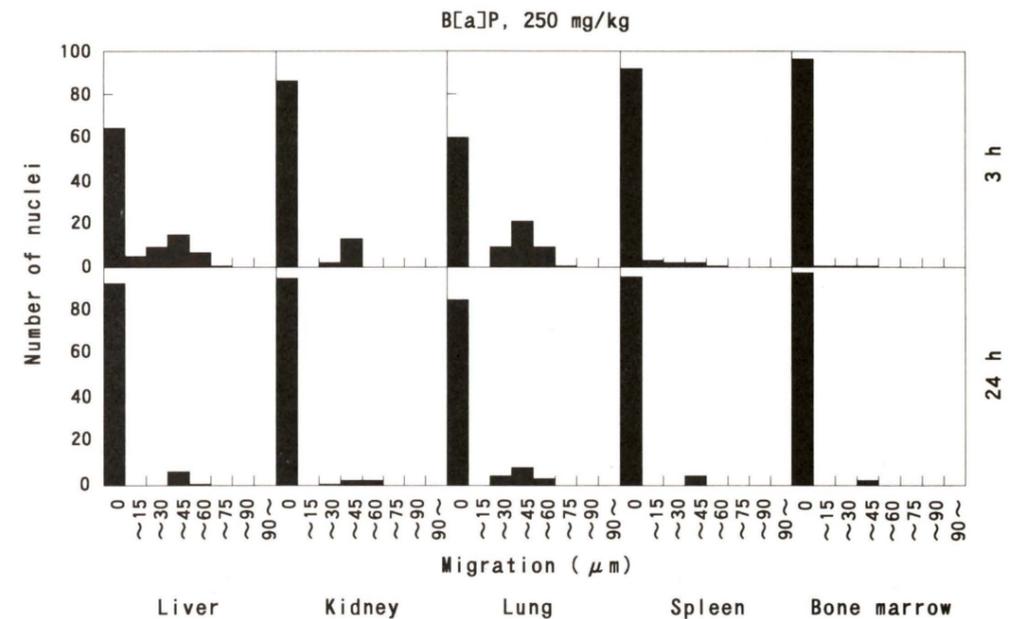


Fig. 5. The distribution of migration of nuclear DNA isolated from organs of B[a]P-treated mice. Migration was measured for 50 nuclei per mouse.

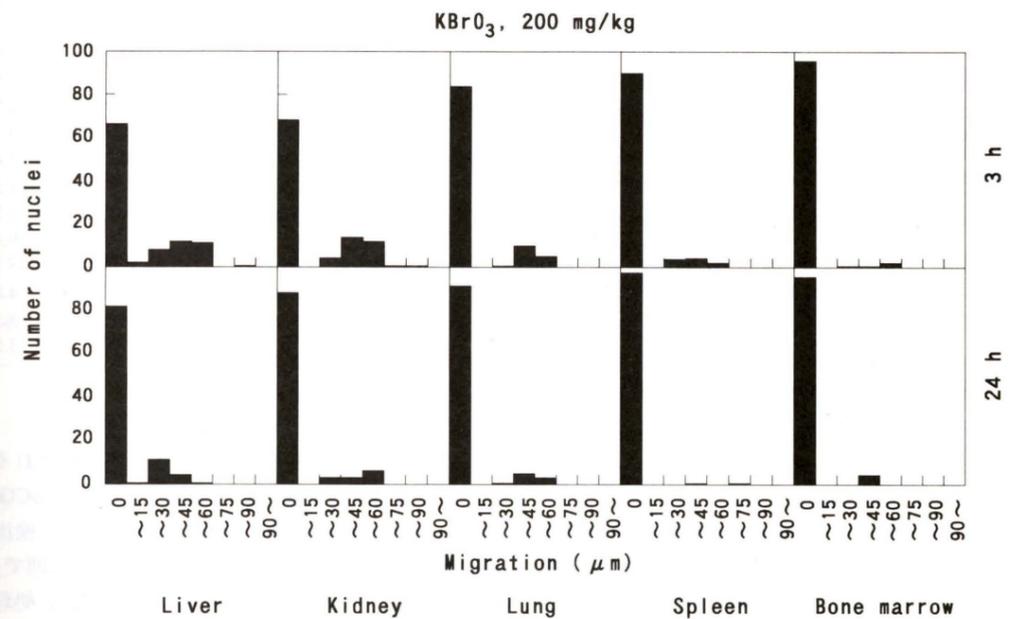


Fig. 6. The distribution of migration of nuclear DNA isolated from organs of  $\text{KBrO}_3$ -treated mice. Migration was measured for 50 nuclei per mouse.

肝でもっとも顕著な migration の増大が認められる傾向にあった。

## 3. Pyrimethamine

Pyrimethamine は動物用駆虫薬であり、催奇性が知られている (Sullivan and Takacs, 1971; Tangapregasson *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1984; Satoh *et al.*, 1991). 本剤は *in vitro* 染色体異常試験 (Egeli and Erdogan, 1991; Ono *et al.*, 1994) とラット骨髄での小核試験では陽性 (小形ら, 1996), Ames 試験 (Ohta *et al.*, 1980) とマウス骨髄で

の小核試験では陰性 (Ono and Yoshimura, 1996) の結果が得られている。そこで、マウスとラットを用いて SCG 試験を行った結果を Table 4 に示した。マウスとラットの両種で投与3時間後に肝、腎、肺で陽性結果が得られた。この結果から、pyrimethamine はマウスとラットの両方で遺伝毒性を示すこと、マウスを用いて開発された本試験法がラットにも適用できることが示された。

Table 3. Migration of nuclear DNA from five organs of mice treated with liver-targeting carcinogens.

Carcinogens	mg/kg	Sampling time (h)	Animal No.	Migration ( $\mu\text{m}$ )					
				Liver	Kidney	Lung	Spleen	Bone marrow	
Auramine	80	0	1	1.70	1.19	2.06	0.88	1.70	
			2	3.56	2.84	3.66	1.08	1.70	
			Pooled	2.63	2.01	2.86	0.98	1.70	
		3	1	35.0	10.3	10.1	4.89	1.70	
			2	40.1	19.8	14.0	5.33	3.46	
			Pooled	37.5***	15.1***	12.1***	5.11*	2.58	
	24	1	35.8	12.4	8.62	2.89	3.34		
		2	36.4	11.1	13.2	2.22	3.52		
		Pooled	36.1***	11.7***	10.9**	2.55	3.43		
	DAB	500	0	1	0.25	0.00	0.72	0.77	0.88
				2	0.93	1.03	0.26	1.19	0.00
				Pooled	0.59	0.52	0.49	0.98	0.44
3			1	31.3	0.88	1.45	1.55	0.77	
			2	31.0	1.39	0.93	1.70	0.00	
			Pooled	31.2***	1.14	1.19	1.63	0.39	
24		1	15.2	0.26	0.93	0.00	0.00		
		2	16.0	1.29	2.22	0.77	1.29		
		Pooled	15.6***	0.77	1.57	0.39	0.65		
Phenobarbital sodium		140	0	1	1.03	0.62	0.98	0.67	0.77
				2	1.19	1.14	0.88	1.03	0.77
				Pooled	1.11	0.88	0.93	0.85	0.77
	3		1	1.19	1.19	0.00	0.00	0.62	
			2	0.00	1.03	0.00	0.00	0.00	
			Pooled	0.59	1.11	0.00	0.00	0.31	
	24	1	13.6	1.65	4.49	3.72	0.00		
		2	15.5	2.27	3.15	3.05	1.55		
		Pooled	14.6***	1.96	4.26**	3.38**	0.77		
	Styrene-7,8-oxide	400	0	1	1.29	0.92	1.96	1.14	0.72
				2	2.06	2.84	2.47	1.34	2.43
				Pooled	1.68	1.88	2.22	1.24	1.57
3			1	59.5	51.8	51.6	52.4	31.2	
			2	75.0	61.1	68.5	67.0	59.4	
			Pooled	67.2***	56.4***	60.1***	59.7***	45.3***	
24		1	29.9	13.3	10.6	6.45	4.06		
		2	19.1	8.77	11.1	10.5	3.12		
		Pooled	24.5***	11.0***	10.9***	8.49***	3.59		

Significant difference: \*0.01 < P < 0.05; \*\*0.001 < P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 (Student's *t* test).

## 考 察

## 1. マウス多臓器 SCG 試験のパリテーション

本試験が *in vivo* 変異原性試験としてルーチン的に利用されるためには、(1) 変異原性試験としての十分な感度を有すること、(2) 安定した陰性対照値が得られること、(3) 試験結果に再現性があること、の3点が重要である。

(1) 本研究で用いたアルキル化剤の MMS, ENU, DNA 架橋形成剤の MMC, 芳香族アミンの 2AAF, 多環芳香族炭化水素の B[a]P, 無機金属塩の KBrO<sub>3</sub> はいずれも陽性結果を示した。以上の化学物質は作用機構の相違はあるものの、いずれも DNA に損傷を形成し、骨髄での小核試験で陽性となる物質であることから、本試験が小核試験と同等程度の検出感度を有することが示唆される。MMC のように DNA 鎖間に架橋が形成される場合は、DNA の低分子化が抑制されるため migration が認められないとする実験結果も報告されている (宮前

ら, 1995)。しかしながら、架橋損傷が修復される場合には架橋損傷の半切除が行われることから、SCG 試験が DNA 損傷の形成とそれに続く修復も併せて検出すると考えれば今回の MMC での陽性結果は不合理ではない。このことは、L5178Y 細胞において、MMC 処理後に回復時間を設けることで陽性結果を得ている報告 (宮前ら, 1995) とも合致するものである。B[a]P と KBrO<sub>3</sub> については骨髄で陽性結果が得られなかった。また、pyrimethamine の小核試験ではマウスとラットで明確な種差 (マウスで陰性、ラットで陽性) が認められているが、この点も SCG 試験では明確ではなかった。その一方で、styrene-7,8-oxide は骨髄で強い SCG 陽性結果が得られているにも関わらず、小核試験が陰性である。今回の実験では投与後 3, 24 時間後に標本作製しているが、各臓器によって SCG 試験に至る適な標本作製時間が異なっている可能性 (佐々木ら, 1996)、SCG 試験が検出している損傷の修復がきわめて早い場合には DNA 複製での鎖切

Table 4. Migration of nuclear DNA from five organs of mice and rats treated with pyrimethamine.

Species	Sampling time (h)	Animal No.	Migration ( $\mu\text{m}$ )				
			Liver	Kidney	Lung	Spleen	Bone marrow
Mouse	0	1	2.79	2.89	3.10	2.01	1.60
		2	2.22	2.12	3.87	1.08	1.50
		Pooled	2.50	2.50	3.48	1.55	1.55
	3	1	31.2	2.43	10.1	0.88	1.03
		2	35.1	3.10	10.4	3.05	2.17
		Pooled	33.1***	2.76	10.3**	1.96	1.60
Rat	0	1	1.52	0.41	1.03	1.03	1.03
		2	1.14	0.77	0.26	0.00	1.14
		Pooled	1.33	0.59	0.65	0.52	1.09
	3	1	9.65	21.0	11.0	0.00	0.57
		2	15.3	21.2	9.24	4.34	0.67
		Pooled	12.5***	21.1***	10.1***	2.17	0.62

Mice and rats were orally dosed pyrimethamine at 50 mg/kg and 120 mg/kg, respectively. Significant difference: \*0.01 < P < 0.05; \*\*0.001 < P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 (Student's *t* test).

断に至らない可能性があることなどが小核試験と SCG 試験の結果の食い違いの原因の一つと考えられ、今後の解析が必要である。骨髄での小核試験が陽性である紡錘体形成阻害剤の colchicine は、検討したすべての臓器で陰性であった。SCG 法はアルキル感受性部位や DNA 鎖切断を検出対象とするため、この陰性結果は合理的である。以上の結果より、*in vivo* の SCG 試験が変異原の作用機序から推測される通りの結果を挙げていることが示唆される。

(2) 本研究においては各被験物質毎に陰性対照をとっているが、その migration の値に大きな変動は認められなかった。このような安定した陰性対照値は、組織のホモジナイズからゲル作製までを概ね 2 時間以内とし、核溶解から電気泳動終了までを 0°C に設定した低温インキュベーター中で、常に同一実験条件下の冷却遮光によって得られたものである。Trypsin などの酵素処理によって DNA の断片化が助長されることを考慮すると (Singh *et al.*, 1991)、我々が確立した物理的な核分散法によって安定した陰性対照値が得られたと考えられる。また、凍結した単離核を用いても、凍結しない場合と同等な陰性対照値が得られた (データ略、この場合、単離核をホモジネート緩衝液に再懸濁したものに DMSO を 10% (v/v) で添加してセラムチューブに入れ、細胞凍結用コンテナ (ヌンク) を用いて -80°C で凍結した)。本研究では各投与群 2 匹の動物を用いて一回の電気泳動で結果を得ているが、*in vivo* 変異原性試験として多数の動物を用いるときにも、凍結という手法を用いることで限られた設備でも実験が可能であると考えられる。

(3) 本研究では各投与群とも 2 匹の動物を用いているが、この 2 匹の間に有意な変動が認められた群はなかった。宮前らは、国内 5 機関が参加した共同研究で、各機関から得られた MMS と diethylnitrosoamine の結果に本質的な差がないことを報告している (宮前ら, 1996)。これらの結果は、本試験法の再現性を明確に示す

ものである。

## 2. マウス多臓器 SCG 試験の有効性

緒言で述べた通り、現在もっとも汎用されている *in vivo* 変異原性試験であるマウス骨髄細胞または末梢血を用いた小核試験は、臓器特異性の高い化学物質については比較的検出率が低い傾向にある。そこで、本研究ではマウス多臓器 SCG 試験の有効性の検討を目的として、肝臓を標的臓器とする発癌物質の評価を試みた。本研究で用いた auramine, DAB, styrene-7,8-oxide, phenobarbital sodium は Ames 試験と *in vitro* 染色体異常試験が陽性であり、マウスで肝癌誘発性が知られているが、小核試験陰性の化合物である (Morita *et al.*, *in press*)。いずれもが SCG 試験では陽性の結果であり、肝の損傷の程度がもっとも著しいものであった。このことから、SCG 試験における臓器特異性と発癌の標的臓器の間には何らかの関連が予想され、この点については肝以外に特異性がある発癌物質を用いた今後の解析が必要である。

3. *in vivo* 変異原性試験としての多臓器 SCG 試験

以上述べたように、我々が考案した方法による多臓器 SCG 試験は、変異原性試験としての十分な検出感度を持つものである。*in vivo* 変異原性試験としての本法の利点として以下の点が挙げられる。

(1) 骨髄以外の臓器に高い特異性をもつ化合物の変異原性を評価することができる。すなわち、マウス多臓器 SCG 試験で従来の骨髄細胞または末梢血を用いる小核試験では検出できなかった臓器特異性の高い化合物の変異原性を検出できることが示唆される。この点は、小核試験の欠点を補うものである。

(2) 同一個体から複数の臓器の DNA 損傷を検出することができる。このような試験系として、トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験が考案されている。トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験では遺伝子突然変異を検出し、SCG 試験では DNA 損傷を検出するというように、両試験は検出対象が異なる。し

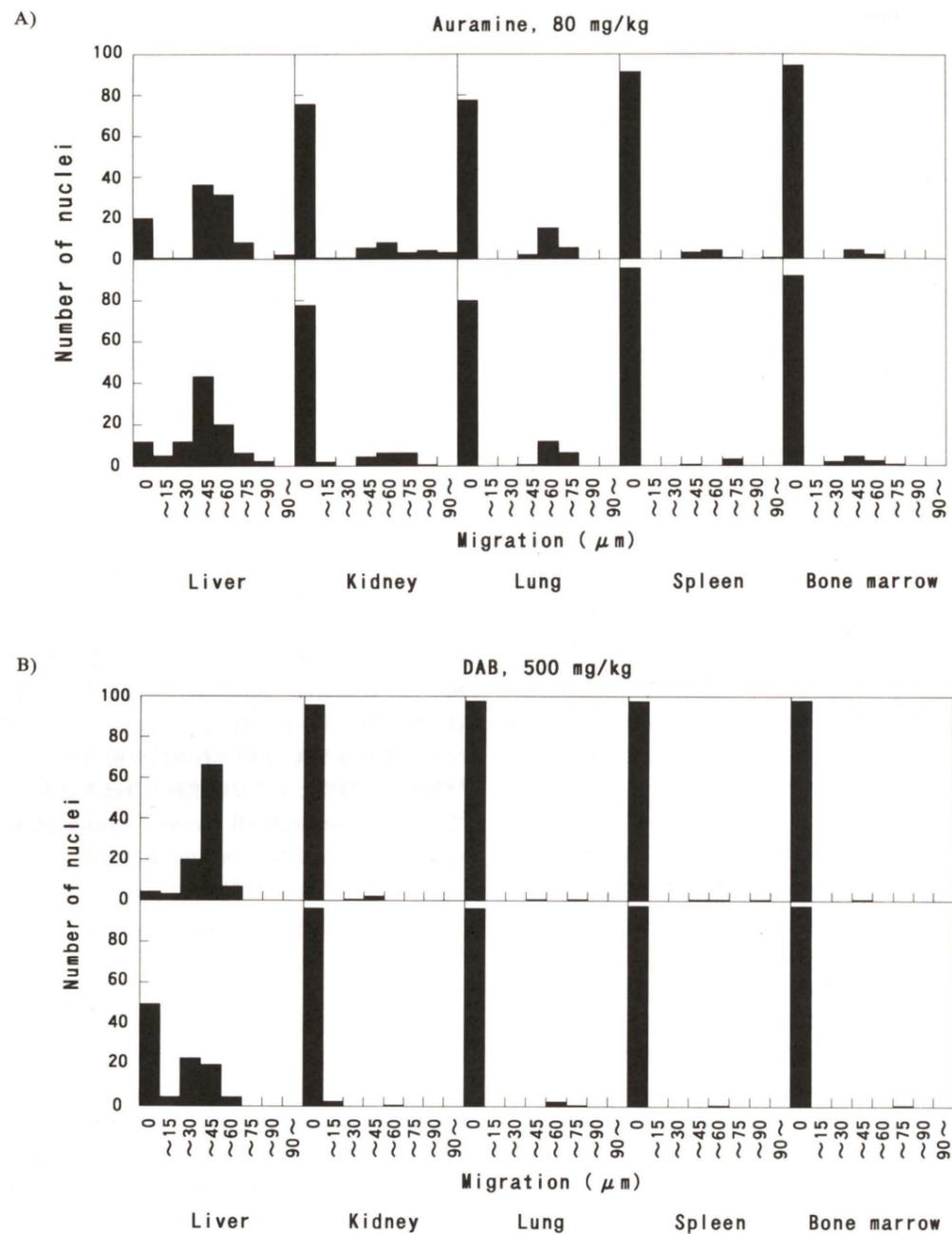


Fig. 7. The distribution of migration of nuclear DNA isolated from organs of carcinogen-treated mice. Migration was measured for 50 cells per mouse. A) auramine, B) DAB, C) phenobarbital sodium, D) styrene-7,8-oxide.

かし、両者とも遺伝毒性を検出するという点にたてば、本法では特別な系統の高価なマウスを必要としない点からルーチン的に実施する試験としてはよりふさわしいものと考えられる。また、pyrimethamine の例で示されたように、本試験法はそのままラットにも応用できるものである。SCG 試験はごく少量の細胞で実施可能であるため、ラットを用いる一般毒性試験の解剖で摘出された臓器の一部を材料とすることで、一般毒性試験において臓器の DNA 損傷を検出する一項目となり得る可能性も考えられる。

(3) 迅速に結果を得ることができる。SCG 試験は DNA の損傷を直接的に検出するものであり、突然変異や染色体異常を指標とする場合のように DNA 損傷が固定されるための時間が不要である。SCG 試験を *in vivo* で行った研究では投与後に長時間の標本作製時間をおかずに 1~4 時間後に屠殺している (Schmezer *et al.*, 1994; Monteith *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1995; Altamirano-Lozano *et al.*, 1996)。本研究においても、phenobarbital sodium を除いて投与 3 時間後の屠殺で陽性の結果が得られている。このような迅速性もルーチン的に実施する

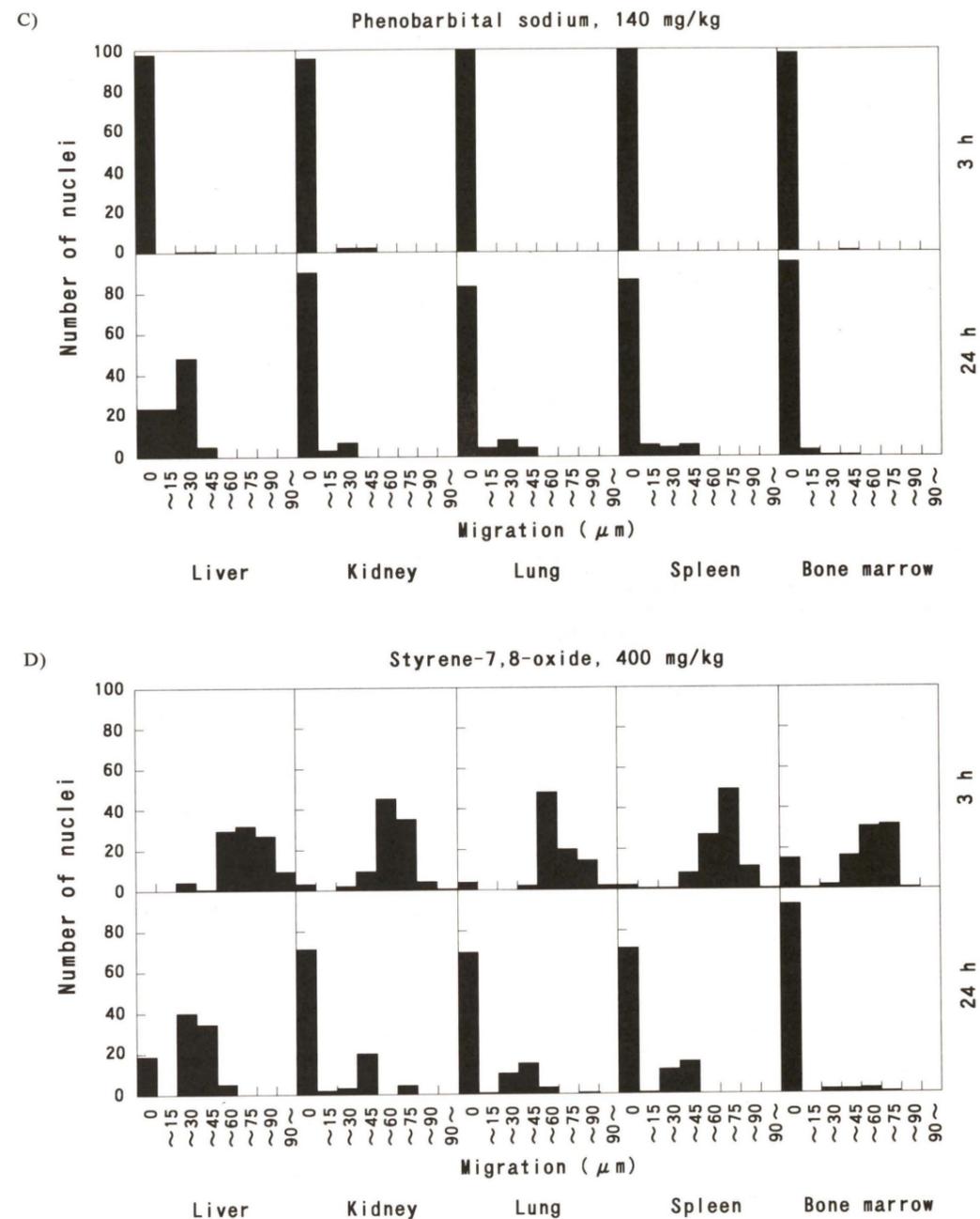


Fig. 7. continued.

試験にはふさわしいものと考えられる。しかし、本研究では phenobarbital sodium の投与 24 時間後に陽性結果が得られることを見出した。このことから、偽陰性の結果を防ぐためには、投与後に複数の標本作製時間（例えば、3, 24 時間）を設定することが望ましいと考えられる。

その一方で、(1) 標本を長期保管することができない、(2) 試験手法は小核試験ほど簡便ではない、(3) 結果が温度などの実験条件に左右されるため、実験条件の管理が必要である、(4) SCG 法そのものが新しい試験系であ

るため、結果を示すパラメーターに何をを用いるか未だ議論がある、という欠点も考えられる。しかしながら、多臓器 SCG 試験は、小核試験では検出できない非分裂性の臓器の DNA 損傷を比較的簡便に検出することができる試験系であり、今後、ルーチン的に実施され得る *in vivo* 変異原性試験としての可能性をもっているものと考えられる。

謝 辞

本研究は公益信託土川記念哺乳動物研究助成基金平成

7, 8年度助成金によって行われたものであり, 同基金に深く感謝し, 本稿を故土川 清博士の御霊前に捧げます。また, 別途, 研究資金の御援助を賜りました有限会社しらかば農園代表取締役社長・村木通良氏に深謝申し上げます。本稿をまとめるにあたり, 御助言を賜りました東京薬科大学生命科学部・太田敏博博士, 岩手大学農学部・津田修治博士, 東京農業大学客員教授・白須泰彦博士に感謝申し上げます。

#### 参考文献

- Altamirano-Lozano, M., L. Alvarez-Barrera, F. Basurto-Alcayara, M. Valverde and E. Rojas (1996) Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice, *Terato. Carcino. Mutagenesis*, **16**, 7-17.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS. *MMS, Mutat. Res.*, **278**, 83-98.
- Egeli, U. and G. Erdigan (1991) The clastogenic effects of pyrimethamine (Daraprim) on human chromosomes in lymphocyte cultures, *Cell. Biol. Toxicol.*, **7**, 347-356.
- Fairbairn, D. W., P. L. Olive and K. L. O'Neill (1995) The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.*, **339**, 37-59.
- 宮前陽一, 財前和代, 小原 要, 峯 靖弘, 佐々木 有, 田中真紀子, 村上道子 (1995) 培養細胞を用いた Single Cell Gel assay (SCG assay) による DNA 損傷の検出, 日本環境変異原学会第 24 回大会要旨集, 105.
- 宮前陽一, 佐々木 有, 小林 浩, 五十嵐美由紀, 下位香代子, 林 真 (1996) マウスの各種臓器を用いた *in vivo* SCG assay, 日本環境変異原学会第 25 回大会要旨集, 80.
- Monteith, D. K. and J. Vanstone (1995) Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the induction of DNA damage, *Mutat. Res.*, **345**, 97-103.
- Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y. F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi, Evaluation of the rodent micronucleus assay to screen IARC carcinogens (group 1, 2A, and 2B), The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS. *MMS, Mutat. Res.*, in press.
- Ohta, T., M. Moriya, Y. Kaneda, K. Watanabe, T. Miyazawa, F.

- Sugiyama and Y. Shirasu (1980) Mutagenicity screening of feed additives in the microbial system, *Mutat. Res.*, **77**, 21-30.
- Ono, T., M. Norimatsu and H. Yoshimura (1994) Induction of chromosome aberrations by pyrimethamine in cultured Chinese hamster (CHL) cells, *Mutat. Res.*, **323**, 197-201.
- Ono, T. and H. Yoshimura (1996) Analysis of micronucleus induction of pyrimethamine in *in vitro* CHL cells and *in vivo* mouse bone marrow cells, *Mutagenesis*, **11**, 85-88.
- 小形智子, 関谷辰朗, 高橋美幸, 太田敏博 (1996) ピリメタミンの小核誘発における種差, 日本環境変異原学会第 25 回大会要旨集, 104.
- 佐々木 有, 泉山房子, 西館絵美 (1996) 小核試験陰性肝癌誘発物質の DNA 損傷性のマウス多臓器 SCG 法による検出, 日本環境変異原学会第 25 回大会要旨集, 100.
- Sasaki, Y. F., S. Tsuda, F. Izumiyama and E. Nishidate, Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutat. Res.*, in press.
- Satoh, K., N. Kojima, N. Furuno, E. Kokue and T. Hayama (1991) Ameliorative effect of folic acid on pyrimethamine teratogenesis in pigs, *Cong. Anom.*, **31**, 323-328.
- Schmezer, P., C. Eckert and U. M. Liegibel (1994) Tissue-specific induction of mutations by streptozotocin *in vivo*, *Mutat. Res.*, **307**, 495-499.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell. Res.*, **175**, 184-191.
- Singh, N. P., R. R. Tice, R. E. Stephens and E. L. Schneider (1991) A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides, *Mutat. Res.*, **252**, 289-296.
- Singh, N. P., H. Lai and A. Khan (1995) Ethanol-induced single-strand DNA breaks in rat brain cells, *Mutat. Res.*, **345**, 191-196.
- Sullivan, G. E. and E. Takacs (1971) Comparative teratogenicity of pyrimethamine in rats and hamsters, *Teratology*, **4**, 205-210.
- Tangapregassom, A.-M., M. J. Tangapregassom, C. Harvath, M. Trecul, M. Boucher-Ehrensperger and C. Petter (1985) Vascular anomalies and pyrimethamine-induced malformations in the rat, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **5**, 55-62.
- Yamamoto, Y., M. Ohnishi, E. Kokue, T. Hayama, H. Aoyama, M. Kaneda and S. Teramoto (1984) Pyrimethamine teratogenesis by short term administration in Goettingen miniature pig, *Cong. Anom.*, **24**, 83-87.

## 細菌を用いる復帰変異試験のデータ解析における判定方法の検討: ネズミチフス菌 TA102, TA2638 および大腸菌 WP2/pKM101, WP2 *uvrA*/pKM101 株を用いた共同研究のデータに基づく評価

### Comparison of evaluation methods on data analysis of bacterial mutagenicity test: evaluation based on a collaborative study using *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638 and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101

日本環境変異原学会・微生物変異原性試験研究会 (JEMS・BMS)

渡辺佳津子<sup>1</sup>, 坂本京子<sup>2</sup>, 佐々木俊明<sup>3</sup>, 吉村 功<sup>4</sup>

JEMS・BMS

Kazuko Watanabe<sup>1</sup>, Kyoko Sakamoto<sup>2</sup>, Toshiaki Sasaki<sup>3</sup> and Isao Yoshimura<sup>4</sup>

<sup>1</sup> (財)残留農薬研究所 187 東京都小平市鈴木町 2-772

<sup>2</sup> (財)食品薬品安全センター-秦野研究所 257 神奈川県秦野市落合 729-5

<sup>3</sup> 日本バイオアッセイ研究センター 257 神奈川県秦野市平沢 2445

<sup>4</sup> 東京理科大学工学部 162 東京都新宿区神楽坂 1-3

<sup>1</sup> The Institute of Environmental Toxicology, 2-772 Suzuki-cho, Kodaira-shi, Tokyo 187, Japan

<sup>2</sup> Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan

<sup>3</sup> Japan Bioassay Laboratory, 2445 Hirasawa, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan

<sup>4</sup> Faculty of Engineering, Science University of Tokyo, 1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

(受付: 1996年9月30日; 受理: 1997年1月31日)

#### Summary

Bacterial mutagenicity test data collected in a collaborative study from 13 laboratories, using *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638 and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101, were analyzed using three evaluation methods. The two-fold rule, a usual evaluation method in Japan or other countries, and two statistical methods recommended by the UKEMS, i.e. the linear regression test and Dunnett's test, were used for data analysis. These evaluation methods were compared between those laboratories which obtained a positive result and the total number of laboratories which obtained reproducible results (positive rate). Sixteen sets of mutagenic activity data (Rank 1-16) were obtained from each laboratory because four chemicals (mitomycin C, cumene hydroperoxide, glyoxal and bleomycin) were each tested in four bacterial strains. In analyzing the mutagenic activity data of some Ranks, the positive rate was 100% using the two statistical methods, but 67-92% using the two-fold rule. The strains in these Ranks were all TA102. The possibility of false negatives in TA102 is suggested using the two-fold rule because the spontaneous reversion rate in this strain is very high compared to that of other strains. On the other hand, a specific dose-response pattern for a positive result was observed between the two statistical methods. The dose-response curve in the linear regression test had a positive slope, whereas in Dunnett's test it was zero or negative. Optionally, a combined test of the linear

regression test and Dunnett's test was used for data analysis because of each defect of the two statistical methods. In this study, of the three methods used, we recommend the combined test of the linear regression test and Dunnett's test as the best evaluation method for bacterial mutagenicity test data. However, further similar studies need to be conducted for the establishment of more objective evaluation method.

**Keywords:** bacterial mutagenicity test, collaborative study, data analysis, two-fold rule, statistical analysis

## 緒言

細菌を用いる復帰変異試験は簡便で感受性の高い変異原性試験 (Ames *et al.*, 1975; Maron and Ames, 1983) として世界中で広く用いられている。しかし、得られたデータから化合物の変異原性を判定する客観的な方法は確立されていない。対照に比べて2倍以上コロニー数が増加していれば変異原性が陽性であると判定する2倍法が日本やその他多くの国で用いられている (Ames *et al.*, 1975; Mahon *et al.*, 1989)。また、統計学的手法として種々 (Edler, 1992) あるが、英国環境変異原学会では線形回帰分析法と Dunnett 法を推奨している (Mahon *et al.*, 1989)。このような判定方法の不統一には細菌を用いる復帰変異試験の特殊性があるとして、Mahon *et al.* (1989) および吉村・大橋 (1992) がその問題点とそれに対する方針を論じている。しかし、実際に得られたデータを用いて判定方法の違いを比較検討した例は少ない。

ところで細菌を用いる復帰変異試験において、TA102 株は種々の oxidative mutagen および crosslinking agent を検出できる菌株 (Levin *et al.*, 1982) として知られているが、自然復帰変異コロニー数が多いため安定したコロニー数になるように菌株を維持するのが難しい、また、ある化合物ではプラスミドのコピー数を変動させるなどの問題点 (Albertini and Gocke, 1988) も指摘されている。TA102 および TA2638 株は *hisG428* 遺伝子の AT 塩基対に変異を有しており、TA102 株ではプラスミド pAQ1 上にその変異遺伝子 (染色体上の *hisG428* 遺伝子は欠損、

細胞あたり約 30 コピー) があり、TA2638 株では細胞自体の染色体上に変異遺伝子 (細胞あたり 1 コピー) が存在する (Levin *et al.*, 1982)。これに対して、大腸菌 WP2/pKM101 および WP2 *uvrA*/pKM101 株は細胞自体の染色体上にある *trpE56* 遺伝子 (Bridges *et al.*, 1967) の AT 塩基対に変異を有しており、両菌株の組合せで TA102 株と同様の活性が得られるとの報告がある (Wilcox *et al.*, 1990)。しかし、これらの菌株を用いて試験した化合物は少ない。そこで我が国において BMS 研究会により、ネズミチフス菌 TA102, TA2638 および大腸菌 WP2/pKM101, WP2 *uvrA*/pKM101 の 4 菌株を用いて種々の化合物の変異原性を比較し、これらの菌株の有用性を検討する共同研究が実施された (Watanabe *et al.*, 1996)、その中に、13 機関 (Table 1) が 4 化合物を試験したデータがある (Watanabe *et al.*, 1995)。今回我々はこの共同研究で得られたデータを 2 倍法、線形回帰分析法および Dunnett 法の 3 通りの方法で解析し、判定方法の違いによる変異原性の評価の違いを検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 被験物質

Mitomycin C (MMC) [50-07-7], cumene hydroperoxide (CH) [80-15-9], glyoxal [107-22-2] および bleomycin (BLM) [9041-93-4] はそれぞれ協和発酵株式会社, Aldrich chemical Co., Inc., 東京化成工業株式会社および和光純薬工業株式会社より購入し、同一ロットの化

Table 1. Participating laboratories in this experiment.

Laboratory	Investigators
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides Canon Inc.	M. Nakashima, M. Fuziwaru
Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.	F. Ando, S. Chou, H. Hayashi
Food & Drug Safety Center Hatano Research Institute	H. Shimada, M. Igarashi
Fuji Photo Film Co., Ltd.	K. Sakamoto, N. Horiya, K. Kawakami
Japan Bioassay Laboratory	T. Izushi, A. Yanagikawa, F. Soga
Japan Food Research Laboratories	A. Araki, T. Sasaki
Kikkoman Corporation	H. Sato, Y. Shinmei
Nihon Bioresearch Hashima Laboratory	M. Kikuchi, S. Nagano
Seiwa Experimental Animals, Ltd.	Y. Nagasawa, K. Kimura
The Center of Japan Biological Chemistry Co., Ltd.	M. Uenohata, Y. Higashiyama
The Institute of Environmental Toxicology Tsumura & Co.	M. Kato, M. Kitahata, Y. Okano, K. Mastumoto, K. Watanabe, H. Kuboniwa

Laboratories were listed in alphabetical order.

合物を各参加機関に配付した。MMC, glyoxal および BLM は滅菌水, CH は dimethyl sulfoxide (DMSO, Table 2) [67-68-5] に溶解した。

### 2. 菌株

ネズミチフス菌 TA102 (*hisG428*, *rfa*, pKM101, pAQ1), TA2638 株 (*hisG428*, *rfa*, pKM101) および大腸菌 WP2/pKM101 (*trpE56*, pKM101), WP2 *uvrA*/pKM101 株 (*trpE56*, *uvrA*, pKM101) の 4 菌株を用いた。大腸菌 WP2/pKM101 および WP2 *uvrA*/pKM101 株は大腸菌 WP2 および WP2 *uvrA* 株にプラスミド pKM101 をそれぞれ導入して作製した (石沢, 1979)。同一バッチの菌株を各参加機関に配付した。受領後直ちに菌株を抗生物質 [TA102 株には 25  $\mu$ g/ml ampicillin (Ap) と 2  $\mu$ g/ml tetracycline (Tc), 他の 3 菌株には 25  $\mu$ g/ml Ap] を添加したニュートリエントブロス液体培地 (Oxoid No. 2) で培養し、各菌株の特性および自然復帰変異コロニー数を確認したのち、8% DMSO を添加して分注凍結保存した (original stock culture)。この時点で、各菌株の特性および自然復帰変異コロニー数の許容範囲 (TA102; 300~500, TA2638; 30~50, WP2/pKM101; 40~60, WP2 *uvrA*/pKM101; 70~110) の確認を厳密に行った。

### 3. 試験方法

試験は代謝活性化をしないプレート法により Maron and Ames (1983) の方法に従って行った。菌株は original stock culture から抗生物質 (TA102 株には 25  $\mu$ g/ml Ap と 2  $\mu$ g/ml Tc, 他の 3 菌株には 25  $\mu$ g/ml Ap) を添加したニュートリエントブロス液体培地に接種し、各機関で実施している培養条件で培養した。培養終了後 2 時間以内に、各機関で通常に実施している手順に従い試験を行った。2 ml のアミノ酸添加軟寒天液に菌液 0.1 ml, 被験物質溶液 0.1 ml およびリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加え、最少グルコース寒天培地上に広げた。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニー数をコロニーカウンターあるいは目視により計数した。各機関で使用した最少グルコース寒天培地およびコロニー計数方法を Table 2 に示す。試験は指定された 4 用量で用量あたり 3 枚のプレートを用いて行い、2 回実験を繰り返した。実験ごとの溶媒対照群のコロニー数の平均が、各機関におけるそれぞれの菌株の全実験を通した溶媒対照群のコロニー数の平均  $\pm 2SD$  の範囲内であった場合に、その実験は成立したとして、得られたデータを解析の対象とした。

### 4. データ解析法

#### 4-1. 2 倍法 (two-fold rule)

生育阻害が認められない用量群において用量反応関係があり、溶媒対照群のコロニー数の平均に対して処理群におけるコロニー数の平均が 2 倍以上になっている場合に陽性と判定した。ここで、次の二つの場合を生育阻害

Table 2. List of source of DMSO, MM plate used and colony count.

Lab. No.	Source of DMSO	MM plate used	Colony count
1	Dojindo	AM-N	Manually
2	Dojindo	AM-N	Manually
3	Dojindo	Self-prepared	Manually
4	Wako	AM-N	Manually
5	Wako	AM-N	Colony counter
6	Tokyo Kasei	AM-N	Colony counter
7	Merck	AM-N	Colony counter
8	Wako	Self-prepared	Colony counter
9	Merck	AM-N	Colony counter
10	Kanto	Self-prepared	Colony counter
11	Wako	AM-N	Colony counter
12	Merck	AM-N	Colony counter
13	Wako	AM-N	Colony counter

Source of DMSO; DMSO was used as a solvent of cumene hydroperoxide. Dojindo, Dojindo Laboratories, Kumamoto (Japan); Kanto, Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo (Japan); Merck, E. Merck, Darmstadt (Germany); Tokyo Kasei, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo (Japan); Wako, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka (Japan).

MM plate; Minimal glucose agar plate. AM-N plates were purchased from Nisshin Flour Milling Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Colony count; Colony counter, Automatic colony counter.

が認められたとした。1. 実体顕微鏡で観察してバックグラウンドの菌に減少が認められた場合 (溶媒対照群のバックグラウンドに比べ薄いか透明になった場合)。ただし、バックグラウンドの菌に減少が認められた用量においても、用量の増加に伴いコロニー数が増加した場合はデータ解析の対象とした。2. バックグラウンドの菌に減少は認められないが、用量の増加に伴い復帰変異コロニー数が減少した場合。

#### 4-2. 線形回帰分析法 (linear regression test)

用量を独立変数、コロニー数を従属変数として直線にあてはめ、得られた回帰係数の有意差検定を行い、有意水準 1% で有意になった場合を陽性とした。ただし、4-1 で述べた生育阻害が認められた場合には、その用量のデータを直線にあてはめることなく除外した。

#### 4-3. Dunnett 法

溶媒対照群のコロニー数の平均と処理群のどれかの用量でのコロニー数の平均の差が、Dunnett の多重比較法 (Dunnett, 1964) の限界値に比べて有意水準 1% で大きかった場合を陽性とした。

## 結果

MMC, CH, glyoxal および BLM 処理により得られた生データを Appendix 1, 2, 3 および 4 に示す。また、2 倍法および線形回帰分析法で陽性と判定された実験あるいは Dunnett 法で陽性と判定された用量が分かるように、各 Appendix 中に表記した。生育阻害 (表中 a 印) が認められたのは、MMC では TA2638 株の最高用量 (1 機

Table 3. Results of data analysis by two-fold rule, linear regression test and Dunnett's test.

Compound	Strain	No. of laboratories <sup>a</sup> showing positive results by			
		Two-fold rule	Linear regression test	Dunnett's test	Rank <sup>b</sup>
Mitomycin C	TA102	12	13	13	8
	TA2638	12 (1)	13	12 (1)	10
	WP2/pKM101	13	13	13	12
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	0	0	0	1
Cumene hydroperoxide	TA102	11 (2 <sup>c</sup> )	12 (1 <sup>c</sup> )	12 (1 <sup>c</sup> )	9
	TA2638	13	13	13	13
	WP2/pKM101	13	13	13	14
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	13	13	13	15
Glyoxal	TA102	10 (2)	13	13	7
	TA2638	13	13	13	11
	WP2/pKM101	7 (2)	12 (1)	12	5
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	13	13	13	16
Bleomycin	TA102	6 (4)	12 (1)	11 (2)	6
	TA2638	3 (1)	6 (4)	5 (7)	4
	WP2/pKM101	0	1 (7)	1 (7)	3
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	0	0 (4)	1 (2)	2

a: All values are the number of laboratories which obtained a positive result with reproducibility. Parentheses are the number of laboratories which obtained a positive result in one of the two experiments.

b: Each strain of each compound was ranked in ascending order of the number of laboratories obtained a positive result.

c: One laboratory (No. 3) obtained a positive result in only one experiment because of no data submitted in other experiment.

関), WP2 *uvrA*/pKM101 株の 2~3 用量 (3 機関) および最高用量 (1 機関) であった (Appendix 1). BLM では TA102 株の最高用量 (3 機関), TA2638 株の 2 用量 (2 機関) および最高用量 (1 機関) で認められた (Appendix 4). 一方, 溶媒対照群での復帰変異コロニー数に関して, 各菌株における全機関の全実験を通じた平均と標準偏差は, TA102 株で  $434 \pm 116$ , TA2638 株で  $36 \pm 9$ , WP2/pKM101 株で  $58 \pm 13$  および WP2 *uvrA*/pKM101 株で  $96 \pm 25$  であり, original stock culture 調製時の自然復帰変異コロニー数の許容範囲内であった. このことは, 溶媒対照群のコロニー数が参加機関全体で大きな偏りがなく維持されていたと言える. また, 全ての機関の全ての実験で, 実験毎の溶媒対照群のコロニー数の平均は, 各機関における各菌株の全実験を通じた溶媒対照群のコロニー数の平均  $\pm 2SD$  の範囲内であり, すなわち, 各機関における許容範囲内にあった. 従って, 本共同研究で実施した実験は全てが成立しており, データ全部を解析の対象とした.

データ評価にあたって, 2 倍法, 線形回帰分析法および Dunnett 法の 3 方法におけるデータ解析の結果, 判定が 2 回の実験で一致したもの, すなわち, 再現性のあったものについて検討した. 各化合物の各菌株で陽性と判定された機関数を Table 3 に示す. Table 3 の右端の Rank は陽性と判定された機関数の少ない順に順位を付けたもの, 言い替えば, 変異原活性の弱い順に順位付けをしたものである. 4 化合物をそれぞれ 4 菌株で試験したので 16 通りの変異原活性が得られている (Rank 1~16). 各化合物の各菌株における機関毎の用量反応関係を Fig. 1 に, 再現性があった全機関数のうちの陽性と

なった機関数の割合 (陽性率, positive rate) の各判定方法間での違い (一般的評価) を Fig. 2 に示す. Rank 1 の物質・菌株はすべての判定方法で陽性率 0% (0/13) すなわち陰性であった. 逆に, Rank 9~16 の物質・菌株はすべての判定方法で陽性率 100% (11/11~13/13) であった. Rank 2, 3 の物質・菌株は 2 倍法では全機関で陰性 (0/13) であったが, 線形回帰分析法では Rank 3 で 17% (1/6), Dunnett 法では Rank 2 で 9% (1/11), Rank 3 で 17% (1/6) が陽性となった. 一方, Rank 6~8 の物質・菌株は 2 倍法以外では陽性率 100% (線形回帰分析法; 12/12~13/13, Dunnett 法; 11/11~13/13) であった. Rank 4, 5 の物質・菌株では 3 つの判定方法で陽性率に 25~100% (3/12~12/12) の幅があり, 判定方法による違いが認められた.

線形回帰分析法と Dunnett 法を比べると, 線形回帰分析法のみで陽性となったのが 7 回の実験, Dunnett 法のみで陽性となったのが 5 回の実験であった. それら食い違いがあった場合の用量反応関係のパターン (個別の評価) を Fig. 3 に示す. 線形回帰分析法のみで陽性 (No. 1~No. 7) となるのは右上がりの用量反応関係がある場合であり, Dunnett 法のみで陽性 (No. 8~No. 12) となるのはほぼ水平か右下がりの用量反応関係がある場合であった.

#### 考 察

本共同研究は, 判定方法の検討のために計画されたものではなかった. しかし, この共同研究は, 我が国でこの試験法を繁用している機関が参加し, 厳密に管理され

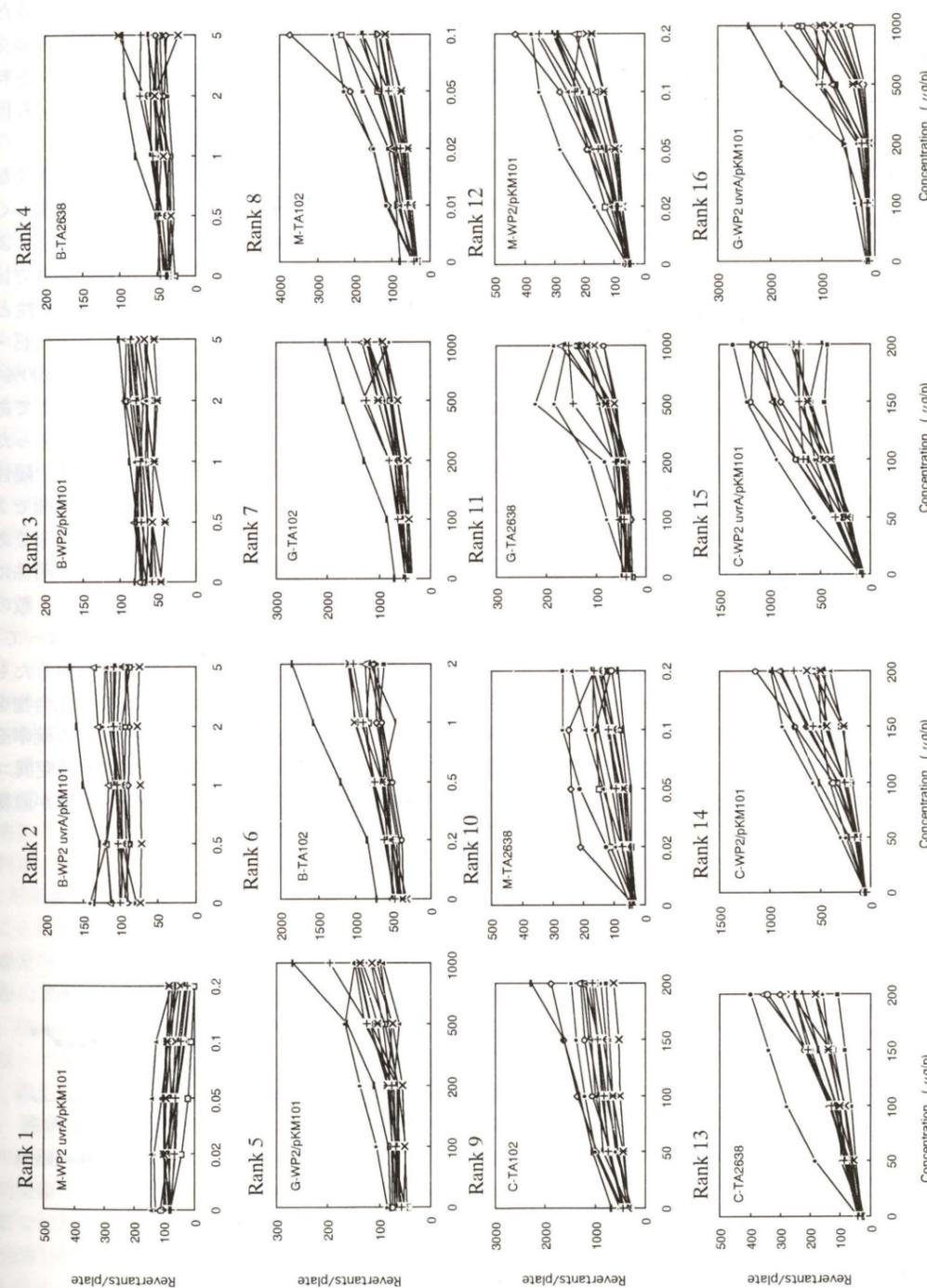


Fig. 1. Dose-response curves with mitomycin C, cumene hydroperoxide, glyoxal and bleomycin in *S. typhimurium* TA102 and TA2638 and *E. coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101. Dose-response curves were arranged in order of rank shown in Table 3. Each curve was plotted as the mean number of revertant colonies of 2 experiments carried out at each laboratory. M: mitomycin C, C: cumene hydroperoxide, G: glyoxal, B: bleomycin.

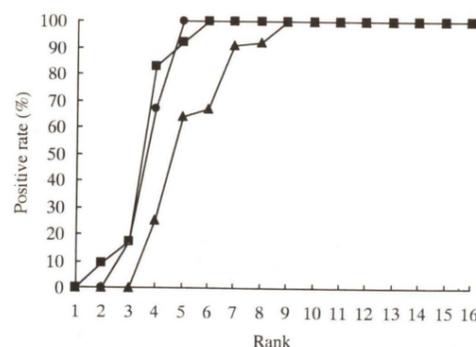


Fig. 2. Comparison among three evaluation methods on positive ratio. Ranking was shown in Table 3. The positive ratio was indicated as a percentage of those laboratories which obtained a positive result to the total number of laboratories which obtained reproducible results. ▲: two-fold rule, ●: linear regression test, ■: Dunnett's test.

た菌株を用いて、各参加機関が通常実施している手順に従って実験を行ったものである。さらに、実験の結果、得られた溶媒対照群のコロニー数は参加機関全体で大きな偏りがなく維持されており、実験毎の溶媒対照群のコロニー数の平均は各機関における許容範囲内であった。従って、各機関で得られたデータは現実のデータとみなすことができる。データを評価する上で、そのような現実のデータに適用できないような方法では判定方法として価値がないことになるので、現実のデータ全てを用いて判定方法を検討することが大切であり意味があると考え、本共同研究の全データを解析の対象とした。

微生物を用いる変異原性試験における陽性判定の一般的方法は、(1)生育阻害が発現しない用量範囲で用量増加に伴い単調に増加する関係(用量反応関係)がある、

## Result

L D

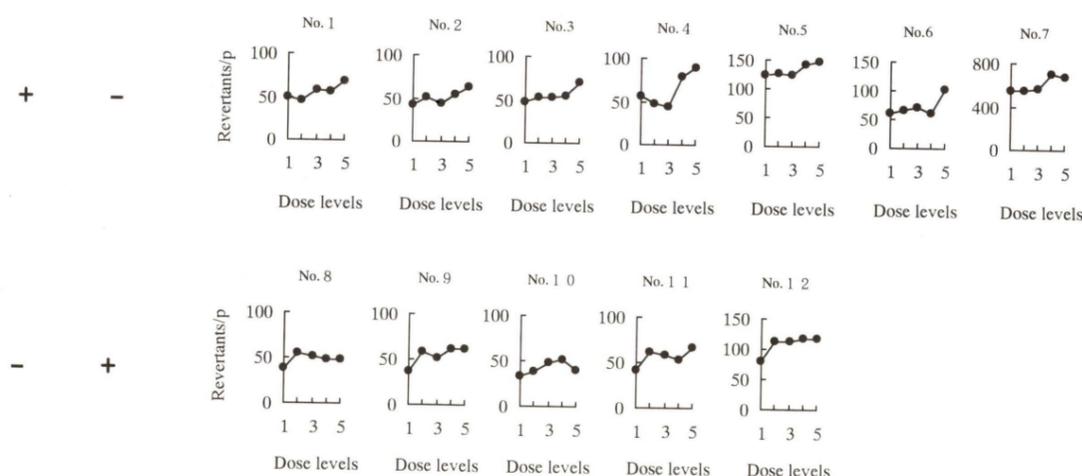


Fig. 3. Dose-response patterns for a positive result between the two statistical evaluation methods: linear regression test and Dunnett's test. L: linear regression test, D: Dunnett's test.

(2) 対照群と比べてある程度以上反応が大きい用量がある、(3) 結果に再現性がある、という3条件を用いることであろう。(3)の再現性は繰り返し実験の結果についての判定であるから、単独の実験ではまず何らかの判定方法を用いて結果が陽性であるかどうかを判定しなければならない。しかし、この場合(1),(2)を確かめるための客観的手順、データ解析手法が問題となる。本論文では、実験毎に得られたデータからまず陽性か否かを判定するのにどの方法を用いれば良いのかを検討する目的で、実際に使われている3方法の比較を行った。

一般的評価において、コロニー数を全く増加させない物質・菌株(Rank 1)、あるいは、コロニー数を著しく増加させる物質・菌株(Rank 9~16)では判定方法による違いはなかった。しかし、それ以外の物質・菌株では線形回帰分析法とDunnett法に比べて2倍法で陽性と判定される割合が低かった。特に、Rank 6~8の物質・菌株は線形回帰分析法とDunnett法が陽性率100%であったのに対して、2倍法では陽性率が92%以下であった。これらのRankの菌株は全てがTA102株であった。また、Rank 9の物質・菌株は、全ての判定方法で陽性率が100%であったが、2倍法においてのみ1機関で2回の実験結果が違っていた。この菌株もTA102株であった。TA102株の自然復帰変異コロニー数は他の菌株に比べて著しく多い(約400)ので、少し位のコロニー数の増加では線形回帰分析法とDunnett法で陽性となっても、2倍法では陰性の結果となり、低い陽性率を示したものと考えられる。この陽性率の低さは、陽性の化合物を陰性と判定する第2種の過誤(false negative)の確率を増加することになる。Chuら(1981)は自然復帰変異コロニー数が100~200のTA100株において、反応が直線的

に増加しており陽性であると考えられるが2倍には達しない化合物では、2倍法では第2種の過誤を生じる可能性があるとして指摘した。また、Snee and Irr (1984)は統計学的手法であるPower transformation法を用いることで、溶媒対照群のコロニー数の平均が140のTA100株の場合に57%程度コロニー数を増加させる物質を陽性として検出できると報告している。今回試験した4化合物はTA102株で陽性となることが知られている(Levin et al., 1982; Wilcox et al., 1990; Jung et al., 1992)。従って、自然復帰変異コロニー数が非常に多いTA102株では、2倍法で第2種の過誤の確率が増加する可能性があると言える。他方、TA102株の1機関(Lab. No. 13)では、溶媒対照群のコロニー数の平均が高めの数値(720±89)を示したため、Rank 8においてこの機関では2倍法で陽性とならず、結果として陽性率が低くなったことも考えられる。

線形回帰分析法とDunnett法を比べると、一般的評価ではほぼ同様の陽性率であったが、個別の評価では各判定方法で陽性となる用量反応関係に一定のパターンが認められた。即ち、線形回帰分析法のみで陽性パターンときは右上がりの用量反応関係となり、Dunnett法のみで陽性パターンときはほぼ水平か右下がりの用量反応関係となった。変異原性の陽性判定の条件の一つは前述したように、(1)単調に増加する用量反応関係があることである。即ち、右上がりの用量反応関係となることなので、Dunnett法にはあてはまらない。従って、線形回帰分析法の方がより良いように思われる。しかし、線形回帰分析法は用量反応関係の有意性を判定する方法であり、Dunnett法は対照群と処理群との有意性を判定する方法であることから、線形回帰分析法では用量反応のある増加が、対照群に比べて処理群で有意な増加であるかは判定できない。前述した変異原性の陽性判定の条件(2)対照群と比べてある程度以上反応が大きい用量があることを客観的に判定できないのである。そこで、我々は線形回帰分析法とDunnett法を併用する方法を検討対象に含めた。線形回帰分析法を有意水準1%で適用し、Dunnett法を有意水準5%で適用し、両方とも有意になった場合に陽性と判定した。この判定条件において、線形回帰分析法のみに陽性となった7つの実験の内、線形回帰分析法とDunnett法を併用する方法では2つの実験(No. 5, No. 6)で陰性の結果となった。この2つの実験では、用量反応のある増加が対照群に比べて処理群での有意な増加ではなかったことになる。なお、線形回帰分析法における陽性率には変動はなかった。

2倍法では自然復帰変異コロニー数が非常に多いTA102株において第2種の過誤の確率が増加する可能性がある。Dunnett法では用量反応関係がないものが陽性と判定され、線形回帰分析法で陽性と判定されたものでも、対照群に比べて処理群で有意な増加を示さないものが含まれていた。以上のことから、我々は線形回帰分析

法とDunnett法を併用する方法が細菌を用いる復帰変異試験のデータ解析における合理的な判定方法であると結論した。

今回我々は共同研究により得られた現実のデータを用いて、より客観的なデータ解析法を見出すための検討を試みた。しかし、本論文の結論は、物質においても、参加機関においても、再現性の実験においても、限られた条件から導き出された結論であるので、これを無条件で一般化することはできないであろう。陽性判定の客観的なデータ解析法を得るためには、さらに同様な検討を他の機会に行うことが必要であると考え、本論文がそのための一つの参考資料となれば幸いである。

## 謝辞

本論文作成にあたりご協力頂いた武田薬品工業株式会社坂本 豊博士に感謝いたします。

## 参考文献

- Albertini, S. and E. Gocke (1988) Plasmid copy number and mutant frequencies in *S. typhimurium* TA102, *Environ. Mol. Mutagen.*, **12**, 353-363.
- 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.
- Bridges, B. A., R. E. Dennis and R. J. Munson (1967) Differential induction and repair of ultraviolet damage leading to true reversions and external suppressor mutations of an ochre codon in *Escherichia coli* B/r WP2, *Genetics*, **57**, 897-908.
- Chu, K. C., K. M. Patel, A. H. Lin, R. E. Tarone, M. S. Linhart and V. C. Dunkel (1981) Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays, *Mutat. Res.*, **85**, 119-132.
- Dunnett, C. W. (1964) New table for multiple comparison with a control, *Biometrics*, **20**, 482-492.
- Eidler, L. (1992) Statistical methods for short-term tests in genetic toxicology: The first fifteen years, *Mutat. Res.*, **277**, 11-33.
- 石沢 実 (1979) 大腸菌 WP2 株の改良, 変異原と毒性, **8**, 29-36.
- Jung, R., G. Engelhart, B. Herbolt, R. Jackh and W. Muller (1992) Collaborative study of mutagenicity with *Salmonella typhimurium* TA102, *Mutat. Res.*, **278**, 265-270.
- 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.
- Mahon, G. A. T., M. H. L. Green, B. Middleton, I. G. Mitchell, W. D. Robinson and D. J. Tweats (1989) Analysis of data from microbial colony assays, In: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical evaluation of mutagenicity test data*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 26-65.
- Maron, D. M. and B. M. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215.
- Snee, R. D. and J. D. Irr (1984) A procedure for the statistical evaluation of Ames Salmonella assay results Comparison of results among 4 laboratories, *Mutat. Res.*, **128**, 115-125.
- Watanabe, K., K. Sakamoto and T. Sasaki (1995) Collaborative study of interlaboratory variability in *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638 and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101, *Mutagenesis*, **10**, 235-241.
- Watanabe, K., K. Sakamoto and T. Sasaki (1996) Comparisons

on chemically-induced mutagenicity among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101: Collaborative study I, *Mutat. Res.*, **361**, 143-155.  
 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.  
 吉村 功, 大橋靖雄 (1992) 毒性試験データの統計解析, 地人書館, pp. 147-156.

Appendix 1. Individual data of mitomycin C in *S. typhimurium* TA102 and TA2638 and *E. coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101.

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
TA102	I	0	L,T	L											
			402	291	370	492	492	312	421	463	361	326	474	339	801
			412	262	432	425	486	299	432	461	309	322	396	411	719
			468	239	384	458	529	320	435	379	293	368	357	252	744
			720	642 D	496 D	1001 D	634	496 D	1275 D	552 D	501 D	376	544	695 D	887 D
	0.01	748	518	527	1016	748	477	1246	510	507	384	524	750	902	
		812	648	489	1073	656	500	1218	558	486	402	586	739	891	
		752	724 D	554 D	1552 D	806 D	628 D	1745 D	694 D	612 D	539 D	795 D	1014 D	837	
		804	848	615	1280	791	665	1683	595	675	559	706	1033	867	
		1172	844	562	1172	864	605	1717	617	613	503	713	1136	884	
	0.05	1608 D	1180 D	916 D	2142 D	1120 D	1072 D	2346 D	741 D	950 D	714 D	1225 D	1711 D	1188 D	
		1728	1284	779	1940	1249	1090	2505	826	940	682	1100	1781	1182	
		2010	1036	920	2048	1178	1071	2516	798	953	715	1094	1328	1164	
		1710 D	2592 D	1087 D	3456 D	1159 D	1418 D	2825 D	1182 D	1219 D	1340 D	1746 D	2261 D	1463 D	
		2496	2384	1046	3260	1675	1346	2873	1172	1183	1130	1943	2255	1532	
0.1	2868	2024	987	3128	1598	1347	2981	1243	1189	1090	2087	2503	1317		
	L,T	L,T	L,T	L,T	L,T	L,T	L,T	L,T	L,T	L,T	L,T	L,T	L		
	394	368	372	480	491	411	436	485	336	362	445	315	827		
	410	334	402	464	504	395	515	472	376	337	409	296	932		
	470	293	442	439	497	409	438	447	370	367	426	368	662		
II	0	0.01	L,T	L											
			804	782 D	630 D	1165 D	901 D	597 D	1075 D	527	656 D	571 D	614 D	361	837
			900	743	612	1155	864	591	1041	509	580	525	619	368	837
			1028	836	609	1179	967	581	1029	557	573	528	574	521	1029
			900 D	1124 D	784 D	1969 D	1182 D	733 D	1404 D	693 D	790 D	596 D	839 D	571 D	874
0.02	1404	1176	819	1614	1108	740	1411	687	818	720	804	746	853		
	1512	1062	780	1452	1165	765	1428	651	794	616	875	781	933		
	1328 D	1608 D	875 D	2052 D	1656 D	1083 D	2092 D	765 D	1160 D	743 D	1134 D	1225 D	1310 D		
	1808	1592	1039	1992	1686	1063	2020	792	1131	824	1044	1165	1312		
	2204	1564	1159	2548	1241	1152	2287	769	1179	796	1048	1007	1439		
0.1	0.05	0.1	L,T	L											
			1868 D	2200 D	1315 D	4236 D	2177 D	1334 D	2316 D	1058 D	1444 D	1412 D	1529 D	1276 D	1272 D
			2688	2680	1213	4012	2152	1314	2331	1136	1488	1109	1496	1085	1378
			2920	2144	1378	4224	2146	1329	2239	1187	1420	1087	1796	1402	1664

Appendix 1. (continued-1)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate													
		Lab. No.													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
TA2638	I	0	26	41	36	44	41	29	47	34	41	42	32	31	23
		33	22	35	42	33	32	32	49	45	38	30	35	33	28
		42	23	38	42	47	31	31	61	39	26	38	40	32	59
		61 D	98 D	110 D	170 D	64	42	42	119 D	53	53	62 D	60 D	58 D	27
		62	105	95	145	51	47	47	136	45	46	67	52	98	49
	0.05	63	86	103	162	49	40	142	51	54	58	61	90	48	48
		80 D	123 D	134 D	229 D	95 D	67 D	219 D	47	72 D	65 D	73 D	125 D	41	41
		87	119	140	223	90	80	212	39	81	82	93	148	53	53
		94	109	133	213	102	67	223	77	79	73	79	117	50	50
		114 D	109 D	161 D	230 D	153 D	117 D	295 D	59	98 D	116 D	100 D	160 D	51	51
	0.2	125	172	205	266	150	96	280	66	102	108	112	174	67	67
		130	145	175	236	152	101	263	68	89	118	126	188	64	64
		128 D	115 D	158 D	212 D	237 D	150 D	269 D	101 D	153 D	184 D	140 D	193 D	90 D	90 D
		130	99	186	201	199	166	266 a	111	174	164	166	182	93	93
		160	99	187	180	186	149	253	87	144	184	163	200	77	77
II	0	20	54	37	30	25	27	36	33	33	33	42	40	37	55
		24	48	37	35	32	31	47	34	34	30	36	49	51	61
		24	26	33	30	27	30	42	42	42	33	35	39	27	53
		53 D	125 D	93 D	245 D	94 D	59 D	103 D	50	59 D	74 D	64 D	55	55	55
		56	109	72	252	99	40	122	46	77	48	87	65	40	40
	0.05	66	150	103	270	111	48	139	51	61	61	48	93	77	46
		65 D	168 D	112 D	274 D	185 D	56 D	195 D	66 D	99 D	70 D	103 D	96 D	30	30
		70	179	113	270	198	64	202	51	96	72	100	83	46	46
		74	181	146	268	154	53	215	81	90	54	106	80	53	53
		112 D	179 D	168 D	263 D	215 D	106 D	249 D	86 D	126 D	108 D	111 D	129 D	108	108
	0.2	119	195	147	256	242	96	243	103	150	85	139	142	69	69
		130	169	160	232	240	93	281	91	129	99	138	123	61	61
		123 D	116 D	169 D	122 D	289 D	109 D	263 D	124 D	183 D	113 D	183 D	141 D	69	69
		139	106	157	138	269	107	283 a	111	185	123	159	158	80	80
		161	140	153	149	265	136	265	120	167	142	176	171	117	117

Appendix 1. (continued-2)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
WP2/pKM101	I	0	52	56	74	57	53	52	61	60	41	53	43	48	47	
		61	57	65	45	58	49	49	58	80	80	46	58	40	49	64
		70	37	63	49	56	40	63	63	59	43	43	51	48	59	51
		93 D	148 D	78	128 D	96 D	63 D	63 D	163 D	79	67 D	67 D	96 D	84 D	120 D	93 D
		98	116	93	123	94	67	67	191	71	71	67	102	79	76	93
	0.05	108	147	85	120	87	76	157	77	77	88	75	88	99	110	110
		133 D	199 D	120 D	223 D	130 D	101 D	294 D	109 D	89 D	107 D	146 D	172 D	136 D	136 D	
		137	210	154	218	126	112	316	90	93	101	163	156	158	158	
		156	192	126	200	127	110	279	101	79	104	146	166	122	122	
		197 D	232 D	204 D	296 D	198 D	153 D	343 D	109 D	130 D	154 D	235 D	252 D	206 D	206 D	
	0.2	206	205	195	296	192	132	336	138	139	146	226	292	216	216	
		216	272	194	320	202	160	378	124	122	140	246	277	180	180	
		281 D	252 D	280 D	456 D	268 D	197 D	342 D	162 D	181 D	203 D	339 D	448 D	284 D	284 D	
		285	163	281	443	290	179	376	166	185	207	348	379	325	325	
		309	186	267	469	295	206	378	182	205	176	331	364	313	313	
II	0	53	48	62	41	45	60	54	68	46	54	44	41	41	41	
		59	54	80	43	57	62	62	63	59	47	56	43	48	41	
		62	56	54	49	67	48	53	53	60	66	55	43	43	51	
		96 D	123 D	116 D	95 D	127 D	79	182 D	67	77	77	62	80 D	74 D	62 D	
		99	113	110	81	134	83	155	86	79	80	95	92	99	99	
	0.05	115	128	95	94	145	69	150	65	67	85	94	84	93	93	
		134 D	176 D	159 D	168 D	205 D	110 D	247 D	105	111 D	94 D	152 D	150 D	116 D	116 D	
		137	184	162	146	241	106	271	81	79	100	167	113	112	112	
		138	164	193	178	209	112	272	77	77	78	150	93	121	121	
		188 D	243 D	261 D	277 D	310 D	161 D	370 D	173 D	131 D	114 D	225 D	194 D	174 D	174 D	
	0.2	215	266	231	257	317	185	353	127	136	129	221	168	155	155	
		230	222	248	247	321	175	342	145	126	142	233	146	171	171	
		289 D	240 D	332 D	414 D	426 D	249 D	375 D	179 D	205 D	164 D	409 D	201 D	265 D	265 D	
		302	220	308	384	440	273	350	261	205	132	350	234	281	281	
		313	225	328	413	468	287	434	198	206	168	337	201	267	267	

Appendix 1. (continued-3)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	0	56	91	122	100	155	79	87	135	76	98	77	95	84
		67	83	142	99	124	70	107	110	84	95	74	88	91
		82	77	129	104	130	71	83	98	87	91	72	64	91
	0.02	62	47	114	82	144	87	66	89	85	102	60	69	96
		64	42	122	78	137	107	76	93	79	99	54	68	96
		65	42	121	89	124	81	79	97	96	88	53	97	102
	0.05	50	15 a	111	51	129	71	67 a	68	68	89	46	106	93
		54	18	103	54	138	77	50	72	77	102	52	76	88
		63	21	103	55	154	93	63	93	79	97	62	69	97
	0.1	43	6 a	79	34 a	140	63	61 a	86	69	95	45	55	93
		50	13	106	37	130	77	57	114	70	84	47	48	104
		55	4	96	36	137	73	57	81	60	90	31	67	83
		25	0 a	55	19 a	92	73	13 a	80	41	102	25	45	62
	25	0	63	21	88	54	7	94	39	78	16	24	62	
	37	0	51	30	86	77	5	91	47	78	25	36	58	
II	0	84	81	122	101	124	95	77	84	71	98	77	79	57
		90	71	142	93	165	91	83	125	71	105	96	64	77
		92	81	129	99	161	96	83	118	76	85	71	102	89
	0.02	58	31	129	105	152	108	96	85	94	104	77	91	106
		58	42	152	112	151	102	68	71	76	114	74	92	101
		72	42	156	119	164	106	96	90	87	92	85	85	104
	0.05	50	32 a	104	64	125	97	61 a	91	62	102	88	90	92
		51	27	124	64	156	107	64	65	66	99	70	61	117
		72	21	112	72	138	115	52	77	70	88	68	60	121
	0.1	52	11 a	73	31 a	123	84	45 a	73	56	102	58	59	95
		53	11	73	36	113	86	45	67	61	93	51	49	103
		62	14	95	23	122	70	37	77	57	86	45	46	91
	0.2	6 a	0 a	31	7 a	72	77	19 a	58	47	82	26	30	86
	23	3	63	5	79	61	12	65	53	79	19	24	60	
	38	3	53	7	52	60	18	54	34	83	30	26	44	

L and T are an experiment obtained a positive result by linear regression test and two-fold rule, respectively, and D is a dose obtained a positive result by Dunnett's test.

a; toxic at a dose

Appendix 2. Individual data of cumene hydroperoxide in *S. typhimurium* TA102 and TA2638 and *E. coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101.

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TA102	0	286	336	291	478	434	429	465	499	358	320	412	365	688
		343	327	281	475	400	392	485	500	323	331	422	366	717
		383	298	263	492	437	413	499	456	299	335	397	360	685
	50	514 D	606 D	575 D	1132 D	563	645 D	1010 D	621 D	413 D	454 D	785 D	937 D	1039 D
		521	630	585	1060	458	651	1029	656	414	432	683	960	1019
		532	538	595	1090	570	611	1010	581	384	465	670	1089	1043
	100	598 D	756 D	714 D	1524 D	737 D	752 D	1145 D	1049 D	475 D	604 D	805 D	1168 D	1247 D
		632	830	766	1460	720	732	1272	1011	480	662	772	1078	1155
		640	712	722	1336	797	718	976	1033	452	697	732	909	1223
	150	653 D	856 D	783 D	1620 D	745 D	849 D	1225 D	1173 D	493 D	747 D	865 D	1110 D	1690 D
		673	860	819	1808	907	843	1335	1232	509	817	879	1146	1665
		696	904	764	1564	967	788	1331	1120	585	798	933	1105	1628
	200	706 D	1140 D	890 D	1976 D	1023 D	859 D	1357 D	1322 D	670 D	876 D	1040 D	1364 D	2313 D
	714	1325	899	2052	1048	900	1438	1156	621	897	1043	1265	2227	
	722	1272	868	1988	988	907	1415	1235	687	918	1149	1315	2048	
II	0	322	255	ND	436	393	484	494	430	350	333	470	332	580
		402	313		432	420	486	540	451	324	313	470	298	675
		409	247		475	389	522	503	387	326	347	447	298	748
	50	554 D	428 D	ND	830 D	897 D	820 D	914 D	708 D	443 D	419 D	758 D	685 D	966 D
		586	556		918	934	829	1032	784	419	414	745	637	1197
		604	537		855	897	769	1014	765	396	429	775	699	1080
	100	662 D	774 D	ND	1200 D	1218 D	959 D	1249 D	1165 D	511 D	629 D	809 D	851 D	1396 D
		674	870		1298	1239	1004	1377	988	531	637	903	672	1361
		682	740		1259	1201	1036	1166	1086	527	651	856	865	1516
	150	745 D	1006 D	ND	1620 D	1279 D	1086 D	1443 D	1260 D	591 D	898 D	989 D	1154 D	1548 D
		756	970		1500	1292	1048	1476	1040	541	846	1030	1090	1598
		770	960		1648	1298	1059	1385	1368	456	941	1045	1120	1600
	200	819 D	1152 D	ND	1816 D	1221 D	1307 D	1614 D	1250 D	627 D	1095 D	1020 D	1197 D	2724 D
	820	1248		1800	1337	1340	1626	1331	623	1134	1012	1213	2251	
	886	1104		1689	1458	1357	1484	1410	625	1111	1111	1159	2191	

Appendix 2. (continued-1)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
TA2638	I	0	17	19	18	44	28	38	50	25	40	39	33	33	20	
		22	25	24	32	40	24	35	35	35	30	36	33	28	25	
		29	26	19	44	36	28	34	29	34	29	38	43	41	26	
		50	42 D	60 D	96 D	61 D	78 D	205 D	61 D	63 D	84 D	84 D	83 D	60 D	60 D	72
		50	50	89	69	86	58	168	89	49	77	77	93	75	75	72
		51	51	119	81	56	72	149	58	52	79	76	96	96	68	68
	II	100	60 D	85 D	119 D	122 D	119 D	119 D	244 D	157 D	87 D	100 D	121 D	143 D	114 D	118
		68	71	121	128	112	127	127	266	151	85	94	125	136	118	96
		77	82	113	121	104	135	247	120	79	121	136	118	118	96	72
		150	71 D	149 D	151 D	190 D	150 D	207 D	219 D	139 D	167 D	167 D	208 D	177 D	163 D	163 D
		74	89	154	200	143	200	265	234	149	163	242	242	97	159	159
		81	106	148	219	161	194	285	191	149	149	149	217	126	182	182
		200	93 D	169 D	160 D	290 D	167 D	396 D	409 D	301 D	204 D	247 D	247 D	255 D	249 D	249 D
118	213	176	293	167	376	409	350	318	221	246	246	277	218	218		
137	205	180	256	153	316	370	316	275	194	252	252	245	240	240		
II	I	0	29	57	25	34	35	25	49	44	32	36	43	32	20	
		31	58	35	38	30	27	41	35	31	42	48	48	48	28	
		32	49	36	42	24	34	41	44	25	41	40	38	38	27	
		50	43	81	100 D	74 D	82 D	80 D	195 D	65	67 D	79 D	85 D	135 D	55 D	55 D
		44	60	92	76	76	84	84	215	51	88	98	78	78	63	63
		48	77	89	79	92	66	173	91	57	72	83	62	62	44	44
	II	100	60 D	80 D	85 D	130 D	160 D	154 D	260 D	135 D	82 D	106 D	134 D	89 D	121 D	121 D
		65	108	90	119	160	140	319	114	78	104	146	100	100	122	122
		67	94	82	110	152	143	333	126	86	77	123	104	104	103	103
		150	79 D	141 D	110 D	217 D	243 D	261 D	241 D	127 D	116 D	187 D	193 D	193 D	174 D	174 D
		84	137	125	232	241	217	417	236	114	132	188	212	212	183	183
		91	118	138	231	235	212	366	197	113	124	214	218	218	176	176
		200	90 D	172 D	160 D	310 D	339 D	373 D	385 D	232 D	183 D	254 D	254 D	223 D	223 D	250 D
120	171	132	327	347	351	437	381	234	156	274	274	179	295	295		
121	168	130	326	355	388	386	288	235	142	254	254	184	246	246		

Appendix 2. (continued-2)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
WP2/pKM101	I	0	45	52	51	50	73	48	52	77	55	51	42	41	33	
		50	50	76	50	54	76	48	56	68	56	57	44	58	51	
		54	57	40	53	71	43	42	42	79	48	53	40	46	57	
		50	113 D	90 D	269 D	108 D	85	125 D	276 D	132 D	126 D	134 D	164 D	186 D	211 D	211 D
		119	117	244	107	107	80	132	301	127	144	147	154	137	171	171
		121	123	257	83	88	119	88	276	151	128	144	179	177	181	181
	II	100	230 D	167 D	405 D	251 D	119 D	272 D	549 D	389 D	281 D	309 D	372 D	297 D	352 D	352 D
		241	172	394	234	234	119	299	526	374	230	314	333	263	418	418
		247	170	365	247	247	124	250	473	366	241	285	394	219	396	396
		150	405 D	239 D	456 D	507 D	192 D	603 D	792 D	640 D	422 D	450 D	631 D	254 D	761 D	761 D
		405	286	511	498	498	208	605	837	723	430	499	562	251	759	759
		430	244	428	463	463	217	579	786	837	428	421	565	212	752	752
		200	578 D	590 D	380 D	719 D	312 D	766 D	984 D	1200 D	631 D	648 D	801 D	199 D	917 D	917 D
614	664	388	722	302	899	1094	1263	641	677	731	177	177	921	921		
620	670	367	816	269	946	967	1087	541	642	642	180	180	801	801		
II	I	0	37	39	50	55	71	80	54	64	52	53	43	64	64	
		56	44	48	58	67	82	82	55	55	59	52	42	49	59	
		58	55	57	60	64	75	63	63	76	54	56	44	57	71	
		50	107 D	101 D	215 D	159 D	118 D	217 D	295 D	132 D	130 D	123 D	160 D	103 D	234 D	234 D
		136	100	252	151	110	145	145	321	145	158	106	133	105	234	234
		157	106	219	173	113	176	176	295	164	122	105	131	104	250	250
	II	100	249 D	194 D	436 D	370 D	227 D	344 D	620 D	337 D	285 D	173 D	337 D	242 D	655 D	655 D
		288	205	390	387	387	241	390	649	340	252	177	339	217	587	587
		292	177	418	414	414	209	376	601	420	226	133	340	290	610	610
		150	416 D	304 D	502 D	768 D	340 D	656 D	988 D	828 D	435 D	274 D	560 D	692 D	787 D	787 D
		430	306	544	775	775	322	617	950	733	470	240	569	625	753	753
		432	318	503	763	763	397	611	898	761	432	263	549	698	767	767
		200	420 D	470 D	684 D	960 D	563 D	915 D	960 D	1044 D	683 D	442 D	811 D	614 D	1158 D	1158 D
456	550	638	1103	454	935	935	934	1161	618	356	822	695	975	975		
498	484	627	998	504	974	1026	1119	694	310	784	846	846	1098	1098		

Appendix 2. (continued-3)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu$ g/plate)	Number of revertants / plate													
		Lab. No.													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	I	0	52	59	135	96	142	105	84	99	72	84	73	111	49
		50	222 D	167 D	325 D	205 D	149	379 D	515 D	340 D	227 D	291 D	367 D	286 D	222 D
		100	326 D	426 D	533 D	488 D	333 D	779 D	875 D	739 D	482 D	479 D	654 D	497 D	558 D
		150	412 D	688 D	674 D	877 D	509 D	1039 D	1134 D	1287 D	671 D	663 D	614 D	430 D	1118 D
		200	482 D	922 D	521 D	1039 D	818 D	1233 D	1295 D	1438 D	717 D	707 D	718 D	136	1322 D
	II	0	53	106	60	96	108	114	99	87	61	84	81	84	72
		50	214 D	209 D	427 D	239 D	295 D	379 D	519 D	366 D	280 D	181 D	330 D	197 D	299 D
		100	381 D	359 D	573 D	506 D	489 D	761 D	943 D	852 D	489 D	322 D	639 D	390 D	715 D
		150	442 D	750 D	627 D	948 D	692 D	908 D	1203 D	1285 D	792 D	603 D	675	415	707
		200	326 D	884 D	858 D	1188 D	860 D	885 D	1336 D	972 D	752 D	764 D	847 D	691 D	1230 D
		50	223	220	341	239	264	348	583	312	288	198	287	180	295
		100	396	345	576	522	487	715	939	728	521	296	605	442	636
		150	430	389	570	505	526	705	1047	766	483	303	675	415	707
		200	474	738	730	920	676	928	1394	1168	761	623	738	728	759
		500	944	1364	811	1382	1226	1224	929	883	721	1096	1766	920	1844
500	962	1204	797	1441	1210	1329	838	807	812	996	1855	899	1624		

L and T are an experiment obtained a positive result by linear regression test and two-fold rule, respectively, and D is a dose obtained a positive result by Dunnett's test.

ND; no data submitted

Appendix 3. Individual data of glyoxal in *S. typhimurium* TA102 and TA2638 and *E. coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101.

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu$ g/plate)	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
TA102	I	0	420	356	472	491	474	466	391	412	319	444	480	431	686	
		100	512 D	544	404	525	485 D	573 D	656 D	365	344	397	490	446	731	
		200	694 D	692 D	477	640 D	685 D	696 D	843 D	439	415	360	602 D	681 D	538 D	1429 D
		500	808 D	758 D	584 D	1018 D	884 D	972 D	1477 D	591 D	476	389	648	775	541	1345
		1000	936 D	1576 D	774 D	1263 D	1208 D	1239 D	778 D	848 D	883	721	1096	1766	920	1844
	II	0	414	395	411	411	504	464	426	330	434	382	481	509	801	
		100	464	425	480	514	695 D	554 D	446	452 D	478	678 D	622 D	602	821	
		200	514 D	558 D	659 D	614 D	612 D	716 D	689 D	443 D	478 D	680 D	841 D	638	1190 D	
		500	626 D	730 D	865 D	760 D	903 D	1069 D	1109 D	588 D	732 D	1016 D	1340 D	775 D	1540 D	
		1000	830 D	1086 D	1012 D	1192 D	1228 D	1411 D	770 D	860 D	1083 D	1256 D	1651 D	986 D	2373 D	
		50	223	220	341	239	264	348	583	312	288	198	287	180	295	
		100	396	345	576	522	487	715	939	728	521	296	605	442	636	
		150	430	389	570	505	526	705	1047	766	483	303	675	415	707	
		200	474	738	730	920	676	928	1394	1168	761	623	738	728	759	
		500	944	1364	811	1382	1226	1224	929	883	721	1096	1766	920	1844	
500	962	1204	797	1441	1210	1329	838	807	812	996	1855	899	1624			

Appendix 3. (continued-1)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate													
		Lab. No.													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
TA2638	I	0	35	40	48	28	37	53	29	30	42	31	40	22	
			44	31	44	38	46	20	28	33	32	35	35	38	26
			53	36	40	31	43	28	28	34	32	41	34	34	29
		100	41	50	100 D	30	44	29	27	28	32	35	32	42	53 D
			41	43	80	27	49	33	47	28	32	51	32	47	53
			55	34	156	36	54	29	67	35	26	47	36	46	36
		200	47	65 D	136 D	37	74 D	34	95	40	39	49	49 D	45	57 D
			63	64	146	27	57	38	76	65	39	55	49	42	62
			63	61	119	36	72	50	75	41	43	44	61	49	38
		500	63 D	70 D	258 D	56 D	106 D	76 D	242 D	64 D	52 D	81 D	169 D	72 D	72 D
			67	91	225	56	83	74	244	70	54	84	208	98	75
		1000	99 D	145 D	236 D	148 D	102 D	156 D	173 D	118 D	77 D	130 D	163 D	153 D	141 D
			102	170	228	139	118	188	212	81	84	154	161	149	143
		106	164	249	145	136	175	212	84	98	120	165	168	149	
II	0	19	31	38	39	48	33	35	46	62	29	50	62	36	
		21	25	30	42	52	17	34	29	29	48	33	51	68	23
		29	27	39	33	51	29	34	36	53	53	37	34	50	22
		100	21	23	39	38	60	29	51	38	60	28	56	53	50 D
			22	25	47	18	77	35	45	32	63	41	54	48	47
			30	35	40	31	57	34	47	38	57	44	53	66	61
		200	31	37	86 D	43	49	39	98 D	53	57	41	74 D	71	62 D
			37	40	101	41	79	47	76	29	57	41	58	64	63
			42	40	91	46	60	46	73	39	49	45	68	54	68
		500	42 D	66 D	141 D	70 D	114	93 D	207 D	57 D	67	76 D	93 D	83	71 D
			49	68	110	89	62	90	257	63	61	80	100	93	82
			49	85	134	83	99	65	217	65	97	96	98	76	73
		1000	55 D	92 D	70 D	137 D	109 D	152 D	150 D	77 D	120 D	102 D	150 D	131 D	110 D
		65	107	85	134	142	187	209	70	122	117	145	167	108	
		83	99	77	137	114	172	155	81	115	86	143	190	130	

Appendix 3. (continued-2)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
WP2/pKM101	I	0	74	46	117	63	65	73	56	61	49	36	52	51	93	
			85	62	105	67	64	67	73	73	63	48	53	58	62	68
			89	71	120	51	75	76	56	56	60	57	56	63	63	89
		100	76	59	136	69	82	66	73	64	59	74	68	70	82	
			81	54	117	68	57	76	66	73	61	65	58	56	93	
			100	37	116	60	63	69	60	81	69	79	55	59	79	
			97	88	132	62	69	97	72	67	63	77 D	58	72	121	
			106	55	144	60	68	72	86	67	70	94	65	56	114	
			110	75	133	53	69	73	62	84	67	79	64	58	103	
		500	84	97	172 D	81 D	64	107 D	160 D	68	102 D	82 D	91 D	78	192 D	
			85	82	190	110	49	130	150	93	84	114	116	87	169	
			93	97	164	83	65	124	134	93	71	107	124	77	187	
		1000	102 D	139 D	207 D	153 D	86	143 D	114 D	116 D	109 D	125 D	239 D	109 D	271 D	
		121	165	217	128	90	136	129	117	143	141	206	103	320		
		141	171	223	142	70	149	104	103	121	133	221	68	316		
II	0	54	41	54	58	56	61	55	55	76	33	47	57	67	61	
		56	46	49	65	67	65	70	70	75	46	57	59	76	81	
		57	41	60	55	61	77	50	79	58	79	38	60	73	68	
		100	44	30	94 D	58	82	77	56	71	39	75 D	76	73	79	
			48	50	76	69	72	79	59	74	38	70	82	72	83	
			53	55	94	60	48	75	45	91	41	76	60	62	78	
		200	57	50	124 D	66	62	87	43	74	49	87 D	82 D	84	103 D	
			57	61	146	60	85	79	66	78	36	95	92	58	116	
			65	55	149	66	70	93	62	91	44	76	95	62	100	
		500	51	79 D	158 D	156 D	45	121 D	130 D	95	57 D	108 D	146 D	98	135 D	
			64	101	163	135	80	116	90	101	63	112	120	83	133	
			71	78	155	136	56	107	102	108	64	93	148	72	152	
		1000	81 D	112 D	84 D	148 D	90	141 D	192 D	100 D	101 D	147 D	161 D	105 D	255 D	
		84	104	90	150	115	158	187	126	119	137	181	104	215		
		95	105	70	125	103	136	154	134	89	146	175	98	238		

Appendix 3. (continued-3)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	I	0	65	77	135	97	105	121	80	90	71	104	109	89	135	
			84	110	94	92	99	124	76	89	89	72	105	107	99	125
		100	90	163	325 D	133	136	150	125	80	86	87	107	111	108	181
		90	148	311	107	130	154	124	84	126	143	139	139	118	305	
		99	135	310	123	148	179	126	117	117	96	147	131	120	238	
		200	129 D	276 D	533 D	163 D	120	254 D	321 D	149	130 D	212 D	250 D	166 D	750 D	
		138	267	521	173	177	257	360	148	128	128	201	216	160	702	
		147	266	493	162	166	313	300	124	124	119	187	251	163	729	
		500	248 D	728 D	674 D	667 D	235 D	762 D	1123 D	212 D	303 D	396 D	795 D	322 D	2260 D	
		290	884	668	750	234	697	1078	204	288	416	307	815	307	2127	
		296	708	637	707	237	613	1095	242	298	388	1030	1030	340	1990	
		1000	606 D	1396 D	521 D	1276 D	541 D	1304 D	1131 D	441 D	713 D	980 D	1794 D	931 D	2821 D	
		624	1664	530	1475	577	1231	927	562	847	988	1806	1806	969	2900	
	652	1244	556	1500	548	1271	1107	479	741	928	1936	1936	931	3147		
II	0	69	76	60	102	102	90	98	85	85	81	100	92	145	132	
		80	91	66	98	79	111	107	107	89	89	86	95	91	124	132
		86	65	65	90	72	105	66	66	100	84	96	88	98	119	119
		100	98 D	68	427 D	144	125	160	164	89	108	136 D	114	128	158 D	
		107	101	341	129	112	184	128	97	100	100	116	150	143	240	
		114	91	386	111	195	158	129	83	91	129	124	124	132	249	
		200	94 D	117	573 D	215 D	182 D	393 D	329 D	117	122	172 D	235 D	136	510 D	
		109	153	576	201	207	334	396	109	100	100	196	253	120	503	
		122	148	570	175	175	298	317	129	121	194	328	131	131	409	
		500	223 D	794 D	627 D	752 D	410 D	1055 D	1055 D	165 D	282 D	426 D	1055 D	369 D	1450 D	
		228	696	730	939	350	993	1136	232	300	300	446	1075	322	1415	
		242	684	682	801	295	749	1108	210	342	450	1217	327	327	1534	
		1000	592 D	1152 D	858 D	1570 D	936 D	843 D	1132 D	347 D	825 D	1112 D	1820 D	1048 D	1790 D	
	604	1568	729	1539	949	1009	1182	413	797	797	1116	1755	1011	1876		
	624	1240	781	1450	807	1402	1164	443	854	854	1164	1664	812	1924		

L and T are an experiment obtained a positive result by linear regression test and two-fold rule, respectively, and D is a dose obtained a positive result by Dunnett's test.

Appendix 4. Individual data of bleomycin in *S. typhimurium* TA102 and TA2638 and *E. coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101.

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
TA102	I	0	420	386	378	491	474	466	432	412	337	311	480	431	653	
			428	394	410	460	455	451	466	461	309	344	393	493	488	636
		0.2	430	397	456	501	611 D	572 D	557 D	407	417	325	438	490	446	658
		442	452	390	488	642	553	650	650	389	537	508	591 D	479	811 D	
		536	437	390	477	618	566	623	388	542	542	530	665	476	787	
		0.5	590 D	578	438	571 D	812 D	702 D	717 D	494 D	739 D	642 D	759 D	544 D	1117 D	
		612	486	426	654	809	685	839	522	827	827	620	759	594	1005	
		676	524	426	597	789	655	831	497	791	791	630	799	570	1113	
		1	680 D	608 D	456	785 D	1064 D	866 D	821 D	681 D	1018 D	912 D	908 D	704 D	1579 D	
		702	676	384	737	1019	860	985	701	1111	1111	964	916	740	1497	
		770	658	414	670	996	853	963	668	668	1046	896	963	728	1428	
		2	592 D	992 D	404	819 D	1108 D	748 D	692 D	730 D	1075 D	1180 D	1118 D	683 D	2011 D	
		698 a	752	412	774	1102	823	819 a	880	880	1185 a	1252	1093	782	2121	
	736	740	454	857	1017	832	809	860	860	1168	1008	1039	796	2062		
II	0	414	387	411	540	504	464	515	330	330	311	380	481	509	730	
		416	446	371	558	450	422	422	491	349	294	400	492	568	943	
		450	417	460	548	533	393	393	530	332	328	348	466	566	660	
		0.2	404	439	626 D	564	577	474	602 D	365	499 D	568 D	592 D	670 D	919	
		438	386	670	542	604	491	602	480	402	480	502	552	694	940	
		476	374	626	525	535	424	644	349	470	470	588	551	658	834	
		0.5	514 D	556	876 D	514	732 D	636 D	743 D	532 D	772 D	666 D	709 D	733 D	1320 D	
		518	554	751	555	691	589	805	446	446	716	678	735	706	1244	
		526	562	778	597	730	569	721	525	525	736	612	705	702	1352	
		1	620 D	750 D	906 D	755	976 D	821 D	791 D	666 D	1022 D	892 D	861 D	777 D	1710 D	
		694	710	883	676	967	799	805	805	605	954	880	875	794	1502	
		704	590	978	674	1018	821	785	604	604	923	992	846	827	1688	
		2	548 D	728 D	959 D	739	1165 D	932 D	781 D	735 D	1040 D	956 D	994 D	870 D	1562 D	
	560 a	810	945	732	1141	951	859 a	702	702	1015 a	984	988	855	1689		
	574	930	1017	555	1098	983	844	689	689	966	1112	914	843	1616		

Appendix 4. (continued-1)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
TA2638	I	0	35	34	39	28	37	36	29	29	29	30	31	40	41	
			44	38	45	38	46	27	33	37	33	33	35	38	28	
			53	45	37	31	43	31	34	34	34	34	40	34	34	44
		0.5	23	56 D	42	30	63	60 D	37	39	39	56	56	40	50	38
			29	60	34	36	44	49	32	52	33	42	42	37	42	45
	1		33	48	43	30	54	33	50	33	30	38	33	36	51	
			38	52	40	27	46	40 D	32	32	43	56 D	49 D	48	80 D	
			39	55	42	36	51	61	35	35	49	52	41	49	67	
		2	48	46	33	34	44	70	33	35	37	54	49	52	60	
			37	49	47	24	44	51 D	43 D	45 D	45 D	69 D	74 D	42	110 D	
	5		44	45	50	36	45	52	62 a	63	60 a	62	70	53	95	
			47	50	35	31	58	67	53	50	52	56	68	52	92	
			31 a.	46	55	37	50	49 D	38 a	61 D	21 a	81 D	54 D	55 D	115 D	
			33	47	40	45	62	42	30	54	28	90	48	56	91	
			48	51	35	26	66	49	32	61	25	70	62	60	104	
II	0	L														
		L,T	19	40	38	32	48	33	37	46	28	33	50	62	38	
			21	51	30	36	52	17	40	29	39	32	51	68	31	
		0.5	29	44	39	33	51	29	48	36	40	49	34	50	29	
			19	38	43	40	39	39	59	30	37	44	63	53	71 D	
	1		33	42	66	43	52	21	46	43	29	38	55	48	49	
			33	40	64	34	46	29	49	24	31	45	62	52	59	
			14	40	55	45 D	29	41	44	44	44	48	61 D	73	90 D	
		2	20	60	54	48	57	38	48	29	43	66	66	75	96	
			26	50	48	52	68	34	39	32	33	58	78	56	79	
	5		24	38	50 D	54 D	59	61 D	52 a	47	46 D	81 D	75 D	63	75 D	
			25	54	64	49	60	60	57	47	64 a	72	74	72	107	
			35	28	70	49	51	37	55	31	54	68	83	79	81	
			45 D	38	70 D	46	59	44 D	46 a	56	24 a	128 D	89 D	82	83 D	
			45 a	52	55	33	70	55	66	37	21	99	92	71	83	
	45	47	57	41	75	59	79	43	21	141	84	56	97			

Appendix 4. (continued-2)

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate														
		Lab. No.														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
WP2/pKM101	I	L														
		0	74	60	57	63	65	73	52	61	46	41	52	51	64	
			85	67	67	67	64	67	51	58	54	49	49	58	62	72
		0.5	89	69	58	51	75	76	56	83	44	33	56	63	72	
			76	53	73	68	90	83	71	68	60	40	68	57	79	
	1		87	67	50	67	99	94	65	77	53	50	68	46	75	
			96	63	56	66	85	78	52	86	46	31	60	69	79	
			88	62	63	67	61	87	59	79	38	44	61	61	86	
		2	94	65	76	60	82	79	72	68	56	51	60	50	85	
			97	60	65	74	64	78	71	83	64	59	62	68	88	
	5		102 D	71	49	65	103	96 D	66 D	98	64	41	73 D	61	82	
			106	86	62	68	74	92	73	79	46	48	81	67	93	
			107	65	63	57	79	106	77	78	51	38	91	64	104	
			102 D	78	75	71	71	83 D	81 D	66	70	46	84 D	76	115 D	
			105	75	67	69	84	95	83	81	64	47	76	60	90	
	111	65	60	60	69	64	101	80	80	75	70	74	125			
II	0	L														
		0	54	50	54	79	56	61	45	76	47	46	57	67	92	
			56	58	49	84	67	65	57	57	32	51	59	76	94	
		0.5	57	63	60	78	61	77	52	79	46	53	60	73	85	
			60	58	60	77	86	95	50	71	67 D	33	85 D	76	84	
	1		64	49	57	70	76	66	58	80	57	37	85	64	77	
			70	58	49	67	55	67	50	81	59	47	68	71	66	
			59	39	53	91	68	81	72	61	68 D	75	82 D	85	84	
		2	62	39	72	69	90	72	71	76	55	52	83	78	88	
			64	68	52	74	73	72	50	80	53	50	86	84	89	
	5		53	60	64	71	77	89	65	63	55	54	71	83	97	
			74	54	66	79	79	86	44	64	51	59	77	97	96	
			75	60	77	76	84	88	61	85	57	59	81	82	89	
			65	63	56	80	81 D	87	71	72	69 D	68	85 D	105 D	84	
			72	49	79	85	102	96	61	77	66	51	107	108	105	
	75	52	71	101	124	80	71	95	63	59	90	79	93			

Strain	Exp. Dose No. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants / plate															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
WP2 uvrA / pKM101	I	0	65	89	171	97	105	L	121	94	90	66	89	109	89	115	
		0.5	84	88	132	92	99	124	L	124	104	89	71	107	107	99	124
		1	109	76	130	83	104	115	138	110	110	93	70	108	93	108	126
	II	0	69	99	151	90	102	L	90	87	85	70	86	92	92	145	151
		0.5	80	116	121	90	79	111	111	93	89	72	108	91	88	124	134
		1	89	89	120	90	72	105	105	95	100	82	95	88	94	98	151
	L	0	75	89	99	94	101	126	126	103	91	86	99	94	108	145	126
		0.5	83	103	103	78	97	117	117	92	87	69	87	87	108	111	132
		1	86	100	101	84	77	90	90	97	90	71	92	97	97	126	132
	T	0	80	90	98	84	115	105	105	100	96	74	109	93	108	105	148
		0.5	89	115	98	84	95	111	111	92	106	72	86	86	108	103	133
		1	93	119	95	85	92	107	107	103	83	75	86	86	89	125	138
L	0	95 D	78	114	103	104	131	131	107	100	77	100	86	86	135	161	
	0.5	109	112	124	93	112	117	117	103	93	77	118	106	106	116	148	
	1	114	107	122	75	120	108	108	90	94	82	99	103	103	106	152	
L	0	99 D	77	115	101	127 D	153	153	87	91	71	101	77	77	118	143	
	0.5	111	91	108	104	134	117	117	101	98	77	99	99	113	105	155	
	1	113	113	107	81	130	101	101	100	78	82	82	86	99	96	161	

L and T are an experiment obtained a positive result by linear regression test and two-fold rule, respectively, and D is a dose obtained a positive result by Dunnett's test.  
a; toxic at a dose

## Induction of Sister Chromatid Exchanges by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin in Cultured Mammalian Cells

Takaji Ikushima<sup>1,†</sup>, Sinya Imai<sup>1</sup> and Yutaka Ishii<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology Division, Kyoto University of Education,  
1 Fukakusa-Fujinomori-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612, Japan

<sup>2</sup> Department of Radiation Biology, Osaka University School of Medicine,  
2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565, Japan

(受付: 1996年11月5日; 受理: 1996年12月27日)

### Summary

The induction of sister chromatid exchanges (SCEs) in cultured mammalian cells was studied to determine the genotoxic potency of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (dioxin). Chinese hamster V79 cells were treated with 3.1 to 310 pM of dioxin for two cell cycles, and 50 metaphases per point were scored for SCEs. The results indicated a significant concentration-dependent elevation of SCE frequency. At 155 pM of dioxin, the mean number of SCEs per cell was approximately twice that of the base line level. When compared at the same cell survival level, SCE induction by dioxin is very much weaker than by ultraviolet light (UV).

**Keywords:** dioxin, SCE, Chinese hamster cells, UV

### Introduction

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (dioxin; CAS registry number 1746-01-6) is one of those highly toxic environmental contaminants ubiquitous in the global environment. Large amounts of dioxin were used as a defoliant in South Vietnam during the Vietnam War. This polychlorinated aromatic hydrocarbon is now emitted into the environment mainly from municipal waste incinerators (Rappe *et al.*, 1987).

A wide spectrum of toxic response induced by dioxin has been shown in laboratory animals and in human beings. This includes developmental toxicity, teratogenicity, fetotoxicity, immunotoxicity and, also carcinogenicity (Couture *et al.*, 1990). It is considered that dioxin produces its biological effects through a common mechanism whereby dioxin binds to the aromatic hydrocarbon receptor (AhR) and this ligand-receptor complex is translocated to the nucleus where it binds to DNA, which in turn results in alterations in gene expression (Jones *et al.*, 1985; Lai *et al.*, 1996). Although widely studied, the genotoxicity of dioxin is still unclear. In this study we examined the effects of dioxin on SCE induction which provides a reliable test system for measuring chromosome endpoints of genotoxic effects. These effects were compared with those achieved using ultraviolet light, correlating their cell killing effects in cultured mammalian cells.

### Materials and Methods

Chinese hamster V79 cells were cultured in  $\alpha$ -modified Eagle's minimum essential medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Bio Whittaker), 100 units/ml of penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of streptomycin at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.

For each treatment with dioxin, two 50 ml plastic tissue culture flasks (Falcon) were seeded with  $4 \times 10^5$  cells each. After 24 h, cells were treated with different concentrations of dioxin in fresh medium for two cell cycles (24 hrs). Dioxin was used after dilution of the stock solution (310  $\mu\text{M}$  in dimethyl sulfoxide) with fresh medium. Cells cultured in 60-mm Petri dishes (Falcon) were exposed to different doses of UV from a germicidal lamp. Prior to UV irradiation, the cells were rinsed with one ml of phosphate-buffered saline.

For estimating frequency of SCEs, one hr after the start of dioxin treatment or immediately after UV irradiation, the cells were allowed to proliferate in medium containing 5-bromo-2'-deoxyuridine (final concentration, 10  $\mu\text{M}$ ). When the cells had passed two cell cycles, Colcemid (final concentration, 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Gibco) was added to the cultures for 2 h to accumulate cells in metaphase. The cells were detached from the surface of plastic flasks or dishes with 0.25% (w/v) trypsin and were then centrifuged. The pellet was resuspended in 0.075 M KCl for 3 min and then methanol was added for 3 min. After centrifugation, the cells were fixed in methanol-acetic acid (3:1). Cells were dropped onto wet slides and air dried. The slides were stained by a modified fluorescence-plus-Giemsa technique

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.

Table 1. SCEs induced by dioxin and UV in V79 cells.

Treatment	No. SCEs/cell ( $\pm$ S.D.)	Surviving fraction (%)
dioxin (pM)		
0	5.6 $\pm$ 0.5	100
3.1	6.9 $\pm$ 0.5	99.6 $\pm$ 3.0
15.5	8.5 $\pm$ 0.6	61.3 $\pm$ 5.2
31	9.2 $\pm$ 0.5	42.7 $\pm$ 7.0
62	10.8 $\pm$ 0.4	23.5 $\pm$ 4.4
155	11.0 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 1.4
310	12.2 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 1.3
UV (J/m <sup>2</sup> )		
0	5.1 $\pm$ 0.4	100
8	30.1 $\pm$ 1.7	78.2 $\pm$ 6.1
16	51.4 $\pm$ 2.2	30.9 $\pm$ 3.2
32	65.4 $\pm$ 3.1	3.8 $\pm$ 0.3

(Perry and Wolff, 1974; Ikushima, 1977). Briefly, the slides were immersed in Hoechst 33258 (5  $\mu$ g/ml) for 20 min, and then washed in distilled water. The slides were illuminated by black light for 30 min while mounted in 2 $\times$  SCC, and stained in 2% Giemsa in Sorresen's phosphate buffer (pH 6.8) for 15 min. For each point, 50 (for dioxin) and 25 (for UV) metaphases were evaluated for the SCE frequencies.

For cell survival assay, the control or treated cells were plated in three 60-mm Petri dishes for each treatment. After 7 days of culture, colonies with more than 20 cells were counted. The plating efficiency for untreated cells was higher than 95%.

### Results

The effects of acute *in vitro* exposure to dioxin on the induction of SCEs were examined in Chinese hamster V79 cells. As shown in Table 1, a dose-dependent increase in the SCE frequency was observed after dioxin treatments. In the cells treated with 155 pM of dioxin, the mean number of SCEs per cell was approximately twice as high as the base line level. On the other hand, the SCE frequency increased remarkably after UV irradiation (Table 1). The survival fractions after each treatments with dioxin and UV also are given in Table 1.

The distribution of the SCE frequency among cells treated with dioxin is depicted in Fig. 1. The distribution of SCEs in dioxin-treated cells shows a shift toward higher SCE values compared to that of non-treated control cells. Thus the effects of dioxin on SCE frequency is apparent not only as an increase of the individual means in the treated groups, but also as a shift of the SCE in single cells toward higher numbers. Furthermore, the distribution pattern indicates a random incidence of SCEs among cells.

To compare dioxin with UV, one of well-known SCE inducers, for the SCE-inducing capacity, the frequencies of SCEs induced by dioxin and UV are plotted against the cell surviving fraction in Fig. 2, using the data given in Table 1. The results indicate clearly that at the same cell survival level, the dioxin-induced SCE frequency is very much lower than the UV-induced one.

### Discussion

In order to assess the potential genotoxicity of dioxin, we

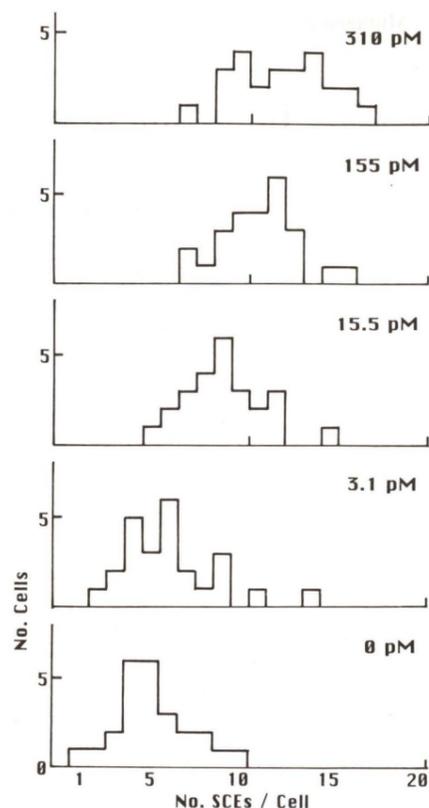


Fig. 1. Inter-cellular distribution of the frequency of dioxin-induced SCEs in Chinese hamster cells.

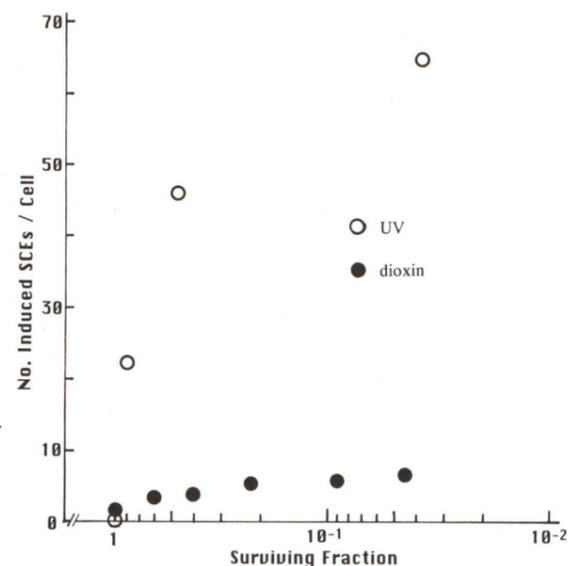


Fig. 2. Comparison of SCE inducibility of dioxin with that of UV. No. induced SCEs/cell was estimated by subtraction of the number of SCEs/cell in untreated controls from that in the treated groups.

examined the effect of relatively low concentrations of dioxin on the induction of SCEs in cultured Chinese hamster V79 cells, since SCE assay is well accepted to be a reliable short-term test system for measuring chromosome

endpoints of genotoxic effects. Our results show that dioxin induces SCEs in a dose-dependent manner. After the treatment with 155 pM (50 pg/ml) of dioxin, the SCE frequency is approximately only twice as high as the base line level, where the % survival is 9.0 (Table 1).

In human lymphocytes treated with the mixture of organochlorine compounds containing dioxin, the SCE frequency increased in a dose-dependent manner (Nagayama *et al.*, 1994). It has been also shown that an increase in the SCE frequency is observed in Chinese hamster cells *in vitro* but no increase in the mutation frequency in *Salmonella* by the compound 2,4,5-trichlorophenoxyethanol contaminated with dioxin, while pure dioxin in the concentration of 100 pg/ml is ineffective in induction of SCEs (Sugar *et al.*, 1988). Rhesus monkey orally exposed to dioxin showed no elevation in SCE and chromosomal aberration levels (Lim *et al.*, 1987). Previous studies have shown that dioxin enhanced transformation of mouse C3H10T1/2 cells by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and it was mutagenic to mouse lymphoma cells (Huff *et al.*, 1991). The negative results for SCE induction observed in animal studies may be due to the relatively long time interval between the cell sampling and the cessation of dioxin dosing. It seems that the SCE assay system used by Sugar *et al.* (1988) was inadequate, because their cell line had a long cell generation time (20 h) as compared with ours (12 h), and they tested only one dose of pure dioxin of which data were not shown. Differing from their studies, we assayed relatively low concentrations of dioxin which would result in preventing SCE detection from being concealed by the severe toxicity of high concentrations. Thus, it should be considered that dioxin has a positive but weak SCE-inducing capacity as described below.

When dioxin is compared with UV for the SCE-inducing capacity at the same cell survival level, the former is much lower than the latter (Fig. 2). SCE is an interchange between two strands of DNA in the course of DNA replication (Ishii and Bender, 1980; Painter, 1980). Many mutagens and carcinogens induce SCE through lesions produced by the direct interaction with DNA as seen typically in UV. Dioxin, on the other hand, is inferred to enhance SCE level by the mechanism whereby dioxin-AhR complex results in alterations in the expression of the genes closely involved in SCE formation by binding to their promoter sequences, as suggested in several steroid hormones (Kochhar, 1988). The improper resolution of specific DNA structure generated during DNA replication is probably involved in SCE formation (Ellis *et al.*, 1995).

Park *et al.* (1996) have recently shown that induction of cytochrome P4501A1 by dioxin is associated with oxidative DNA damage in the hepatoma cell line. Thus, further studies to analyse DNA damage and clastogenic effects induced by dioxin would be of great help for conclusive determination of genotoxicity of dioxin.

### Acknowledgments

We thank Dr. H. Miyata, Setsunan University, Osaka,

for supply of dioxin.

### References

- Couture, L. A., B. D. Abbott and L. S. Birnbaum (1990) A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism, *Teratology*, **42**, 619-627.
- Ellis, N. A., J. Groden, T. Z. Ye, J. Straughen, D. J. Lennon, S. Ciocci, M. Proycheva and J. German (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to Rec Q helicases, *Cell*, **83**, 655-666.
- Huff, J. E., A. G. Salmon, N. K. Hooper and L. Zeise (1991) Long-term carcinogenesis studies on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and hexachlorodibenzo-*p*-dioxins, *Cell Biol. Toxicol.*, **7**, 67-94.
- Ikushima, T. (1977) Role of sister chromatid exchanges in chromatid aberration formation, *Nature*, **268**, 235-236.
- Ikushima, T. (1980) Sister chromatid exchange and its significance, *Heredity* (Tokyo), **34**, 34-53. In Japanese.
- Ikushima, T. (1990) Bimodal induction of sister-chromatid exchanges by luminol, an inhibitor of poly(ADP-ribose) synthetase, during the S-phase of the cell cycle, *Chromosoma*, **99**, 360-364.
- Ishii, Y. and M. A. Bender (1980) Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, **79**, 19-32.
- Jones, P. B. C., D. R. Galeazzi, J. M. Fisher and J. P. Whitlock (1985) Control of cytochrome P<sub>1</sub>-450 gene expression by dioxin, *Science*, **227**, 1499-1502.
- Kochhar, T. S. (1988) Steroid hormones enhanced sister-chromatid exchange in cultured CHO cells, *Experientia*, **44**, 62-63.
- Lai, Z. W., T. Pineau and C. Esser (1996) Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' regions of putative dioxin-inducible genes, *Chem. Biol. Interact.*, **100**, 97-112.
- Lim, M., D. Jacobson-Kram, R. T. Bowman and J. R. Williams (1987) Effect of chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on sister chromatid exchange levels in peripheral lymphocytes of the rhesus monkey, *Cell Biol. Toxicology*, **3**, 279-284.
- Nagayama, J., M. Nagayama, T. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda and Y. Masuda (1994) Effects of highly toxic organochlorine compounds retained in human body on induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes, *Chemosphere*, **29**, 2349-2354.
- Painter, R. B. (1980) A replication model for sister-chromatid exchange, *Mutation Res.*, **70**, 337-341.
- Park, J. Y., M. K. Shigenaga and B. N. Ames (1996) Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or indolo(3,2-*b*)carbazole is associated with oxidative DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2322-2327.
- Perry, P. and S. Wolff (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, **252**, 156-158.
- Rappe, C., R. Anderson, P. A. Bergquist *et al.* (1987) Overview of environmental fate of chlorinated dioxins and dibenzofurans, sources, levels and isomeric pattern in various matrices, *Chemosphere*, **16**, 1603-1618.
- Sugar, J., K. Toth and E. Olah (1988) Carcinogenicity and genotoxicity of the herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyethanol (TCPE) contaminated with dioxin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **534**, 706-713.

アルキル化剤が誘発するショウジョウバエ体細胞 DNA 傷害

DNA damage induced by monofunctional alkylating agents in *Drosophila melanogaster*

後藤 友希, 早津 彦哉, 根岸 友恵

Yuki Goto, Hikoya Hayatsu and Tomoe Negishi

岡山大学薬学部 700 岡山県岡山市津島中 1-1-1

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University,  
Tsushima-naka, Okayama 700, Japan

(受付: 1996 年 12 月 22 日; 受理: 1996 年 12 月 26 日)

Summary

The DNA damaging activity of monofunctional alkylating agents, *N*-nitrosodialkylamines, *N*-alkyl-*N*-nitrosoureas and alkyl methanesulfonates, was examined using the *in vivo* DNA repair test, a short term genotoxicity test in *Drosophila melanogaster*. In this assay, the meiotic recombination deficient male flies, which are deficient either or in both excision repair and post-replication repair (*mei-9 mei-41*, excision repair and post-replication repair deficient; *mei-9*, excision repair deficient; *mei-41*, post-replication repair deficient), will die according to the extent of DNA damage at the larval period, while the repair-proficient female flies will survive. As a result, the DNA damage induced by a test compound can be estimated from the decrease in the male to female sex ratio. At non-lethal doses, all alkylating agents used induced DNA damage in a dose-dependent manner. In double mutant larvae, the DNA damaging activity is as follows; *N*-methyl-*N*-nitrosourea = *N*-ethyl-*N*-nitrosourea = methyl methanesulfonate  $\geq$  *N*-nitrosodimethylamine > *N*-nitrosodiethylamine > ethyl methanesulfonate. Generally methylating agents had stronger DNA damaging activity and cytotoxicity than the ethylating counterpart. The *mei-9* mutant showed higher sensitivity to all the agents than did the *mei-41* mutant. It was suggested that the DNA damages induced by these agents is repaired more effectively by excision repair than by postreplication repair.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, *in vivo* DNA repair test, monofunctional alkylating agents, DNA damage

緒 言

*N*-Nitrosodialkylamine は環境中に存在する強い発癌物質であり, 生体内において 2 級, 3 級アミンと亜硝酸との反応で生成する可能性 (Bartsch and Montesano, 1984) があることから, その発癌性, 変異原性, 毒性, 代謝などが広く研究されている。

これまでに, 我々はショウジョウバエの系を用いた研究において *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) が *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) と比較して, 強い変異原性及び DNA 傷害性を示すことを明らかにしている (Negishi *et al.*, 1991). NDMA 及び NDEA はその作用発現に代謝酵素による活性化を必要とする。ショウジョウバエは哺乳動物と同様の薬物代謝酵素活性を有している。これらのニトロサミンがショウジョウバエに誘発した突然変異や DNA 傷害の程度には, 代謝活性化の効率, 代謝

物の DNA との反応性, DNA 付加体自身の毒性, DNA 付加体の修復効率などの要因が関与すると考えられる。しかしながら未だその詳細は明かにされていない。

今回 *N*-nitrosodialkylamine に加えて, 生体内での代謝活性化を必要としないアルキル化剤である *N*-alkyl-*N*-nitrosourea 及び alkyl methanesulfonate の DNA 傷害性をショウジョウバエ *in vivo* DNA repair test によって調べ, アルキル化剤の反応性と DNA 傷害性について考察した。

実験材料及び方法

1. 変異原物質

*N*-Nitrosodimethylamine (NDMA)

[62-75-9] 東京化成

*N*-Nitrosodiethylamine (NDEA)

[55-18-5] 東京化成  
*N*-Methyl-*N*-nitrosourea (MNU)  
 [684-93-5] ナカライテスク  
*N*-Ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)  
 [759-73-9] シグマ  
 Methyl methanesulfonate (MMS)  
 [66-27-3] アルドリッチ  
 Ethyl methanesulfonate (EMS)  
 [62-50-0] シグマ  
 を用いた。

## 2. ショウジョウバエ

除去修復-複製後修復二重欠損株

*sc z<sup>1</sup> w<sup>+(TE)</sup> mei-9<sup>a</sup> mei-41<sup>DS</sup>/C(1) DX, y f*

除去修復欠損株

*sc z<sup>1</sup> w<sup>+(TE)</sup> mei-9<sup>a</sup>/C(1) DX, y f*

複製後修復欠損株

*sc z<sup>1</sup> w<sup>+(TE)</sup> mei-41<sup>DS</sup>/C(1) DX, y f*

藤川和男博士 (近畿大学原子力研究所), 梁 治子博士 (大阪大学) より分与された。

## 3. In vivo DNA repair test

*In vivo* DNA repair test は Nguyen ら (1979) 及び藤川 (1988) によって確立された方法で, DNA 傷害性を有する物質を簡便かつ感度よく検出できる。この系では, 雄は除去修復欠損, 複製後修復欠損となっているため, 修復能が正常な雌と比較して DNA に傷害を与える物質に対して致死感受性が高い。したがって DNA 傷害の増加を性比 (成虫の雄の数/成虫の雌の数) の減少で表わすことができる。

約 200 匹の 3 齢幼虫をプラスチックシャーレ (直径 5 cm) 中でアルキル化剤を含む 0.25 M sucrose 溶液 1.5 ml に浸し, 検体を 3 時間経口摂取させた。その後アルキル化剤を含まない培地で成虫になるまで飼育し, 羽化してきた雄と雌の数を数えて DNA 傷害性を調べた。また同一濃度につき少なくとも 2 回以上の実験を繰り返した。

### 結果及び考察

除去修復-複製後修復欠損株 (*mei-9 mei-41*), 除去修復欠損株 (*mei-9*), 複製後修復欠損株 (*mei-41*) を用いて行った *in vivo* DNA repair test の結果を Fig. 1 に示した。DNA damaging activity 及び toxicity を, それぞれ sex ratio, survival of female (%) として次式より算出した。

$$\text{Sex ratio} = \frac{\text{No. of adult male}}{\text{No. of adult female}}$$

$$\text{Survival of female (\%)} = \frac{\text{No. of adult female (+ Mutagen)}}{\text{No. of adult female (- Mutagen)}} \times 100$$

すべてのアルキル化剤は 3 種の株において, 致死作用を示さない濃度範囲で, 処理濃度依存的に DNA 傷害性

の増加を示した。Fig. 1 に示したデータから EC<sub>50</sub> 及び LD<sub>50</sub> を求めて, それぞれ各 mutagen の DNA 傷害性, 致死作用としてその強さを比較した (Table 1)。

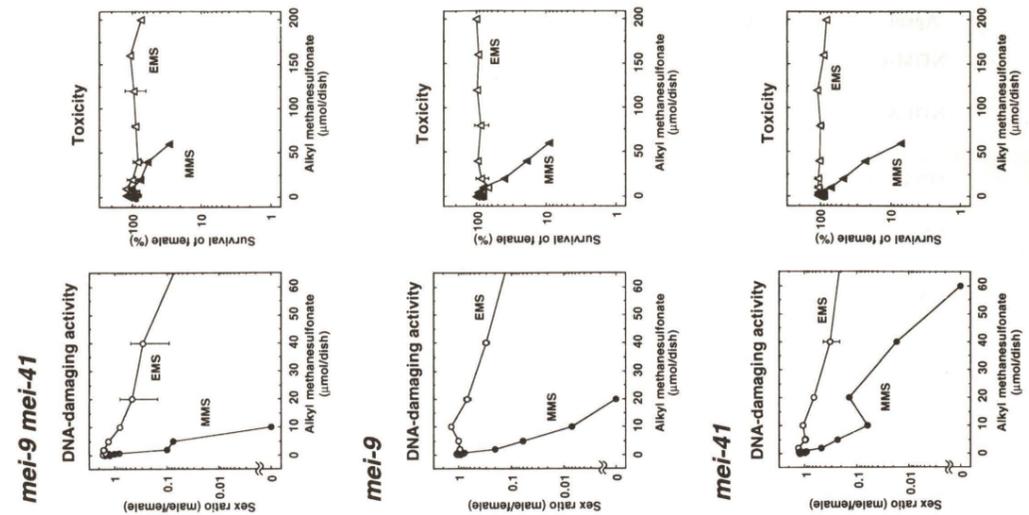
NDMA は NDEA よりも強い DNA 傷害性 (NDMA; *mei-9 mei-41* > *mei-9* > *mei-41*, NDEA; *mei-9 mei-41* > *mei-9* > *mei-41*), 及び毒性を示した。MNU は ENU と同程度の DNA 傷害性を示し, ENU よりも強い毒性を示した。MMS は EMS よりも強い DNA 傷害性 (MMS; *mei-9 mei-41* > *mei-9* > *mei-41*, EMS; *mei-9 mei-41* = *mei-9* = *mei-41*), 及び毒性を示した。EMS に関しては今回の処理濃度範囲で毒性はみられなかった。

今回用いた monofunctional なアルキル化剤が変異原性や発癌性を示すメカニズムとして, その求電子性の活性化体が細胞内の求核性部位をアルキル化することが考えられている。Vogel らは変異原物質や発癌物質の性質がターゲット部位との反応性によって決定するという仮定を基に monofunctional alkylating agents の *s* 値 (the nucleophilic selectivity; Swain-Scott *s* constant) がショウジョウバエにおける変異原性や齧歯類における発癌性と負の相関性があると考察している (Vogel *et al.*, 1990)。すなわち, 同じ *s* 値をもつアルキル化剤は同程度の遺伝毒性を引き起こし, *s* 値の減少に伴い遺伝毒性が高くなると考えられる。しかしながら今回我々が行なった DNA repair test の結果では *s* 値 (NDMA: 0.42, NDEA: 0.26, MNU: 0.42, ENU: 0.26, MMS: 0.83, EMS: 0.67 (Vogel *et al.*, 1990)) の減少に伴う DNA 傷害性の増加は観察されず, むしろアルキル化剤の種類によって差が見られた。また ENU の DNA 傷害性を除いて, 一般的にメチル化剤のほうがエチル化剤よりも強い DNA 傷害性と致死作用を示した。更に予想されるように, 3 種の株のうち *mei-9 mei-41* 株がすべてのアルキル化剤に感受性が高かった。

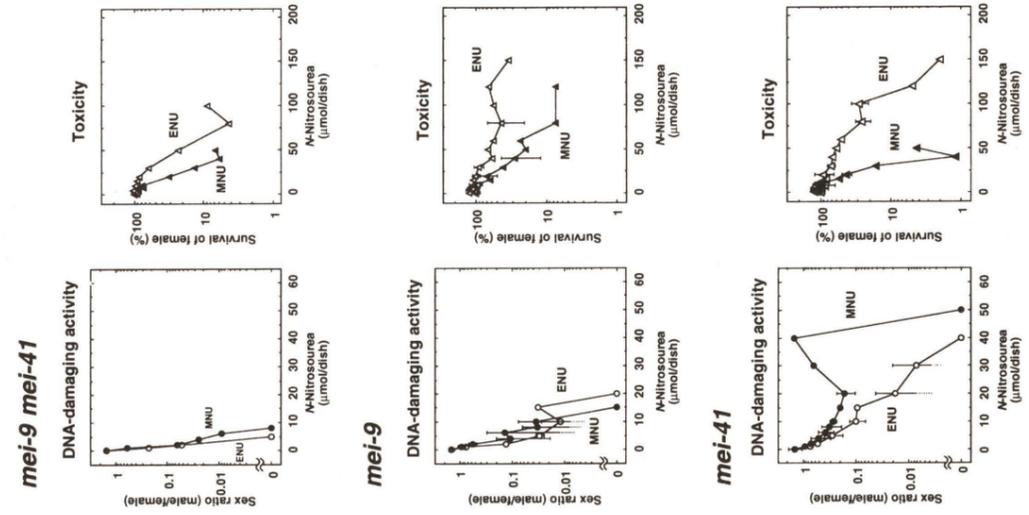
*N*-Nitrosodialkylamine と *N*-alkyl-*N*-nitrosourea は S<sub>N</sub>1 type のアルキル化剤で同様の反応性を示すと言われている。しかしながら NDMA が NDEA よりも強い DNA 傷害性を示したにもかかわらず, MNU と ENU の DNA 傷害性は同程度であった。我々はショウジョウバエの 3 齢幼虫のマイクロソーム分画が NDMA よりも NDEA を効率良く代謝活性化する結果を得ているため, この理由が NDEA が代謝活性化されにくいのではないと考えられる。従って, なぜ NDMA が NDEA よりも強い DNA 傷害性を示し, MNU と ENU が同程度の DNA 傷害性を示したのかは興味ある問題である。

今回使用した 3 種の株は *mei-9* 及び *mei-41* locus を除く遺伝的背景は同じものである。従って 3 種の株の DNA 傷害性の強さの違いから, これらのアルキル化剤によって生じた DNA の傷は, 複製後修復よりもむしろ除去修復によって修復されると考えられる。今回の実験によりショウジョウバエ個体に対するアルキル化剤のアルキル化剤の反応性, 代謝活性化の必要性などの面

## Alkyl Methanesulfonates



## N-Nitrosoureas



## N-Nitrosamines

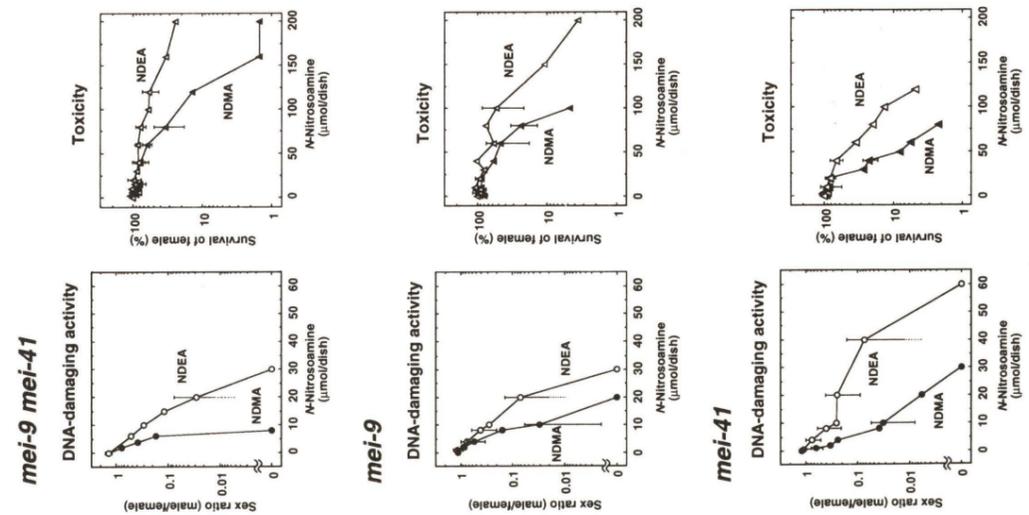


Fig. 1. The *in vivo* DNA repair test.

Table 1. EC<sub>90</sub> and LD<sub>90</sub> of monofunctional alkylating agents in *Drosophila*.

Agent	( $\mu$ mol/dish)	<i>mei-9</i> <i>mei-41</i>	<i>mei-9</i>	<i>mei-41</i>	s-value <sup>d</sup>
NDMA	EC <sub>90</sub> <sup>a</sup>	7	8	5.5	0.42
	LD <sub>90</sub> <sup>b</sup>	125	90	45	
NDEA	EC <sub>90</sub>	15	17	34	0.26
	LD <sub>90</sub>	>150	150	110	
MNU	EC <sub>90</sub>	2	5	N.D. <sup>c</sup>	0.42
	LD <sub>90</sub>	30	75	30	
ENU	EC <sub>90</sub>	2	2.5	10	0.26
	LD <sub>90</sub>	65	>150	115	
MMS	EC <sub>90</sub>	2	4	16	0.83
	LD <sub>90</sub>	>50	57	53	
EMS	EC <sub>90</sub>	60	>65	>70	0.67
	LD <sub>90</sub>	>200	>200	>200	

<sup>a</sup> Amount of alkylating agent required to decrease sex ratio to 0.1 ( $\mu$ mol/dish).

<sup>b</sup> Amount of alkylating agents required to lead repair-proficient female to 90% lethality relative to that of negative control ( $\mu$ mol/dish).

<sup>c</sup> Not determined.

<sup>d</sup> Data from the reference (Vogel et al., 1990)

で統一的な見解は得られなかった。これは各化合物の細胞内での挙動、すなわち DNA 塩基への反応性、反応部位、あるいは DNA 以外の場所での反応性などが微妙に違っているためではないかと思われる。

#### 参考文献

- Bartsch, H. and R. Montesano (1984) Relevance of nitrosamines to human cancer, *Carcinogenesis*, **5**, 1381-1393.  
 藤川和男 (1988) ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究, *環境変異原研究*, **10**, 15-25.  
 Negishi, T., T. Shiotani, K. Fujikawa and H. Hayatsu (1991) The

genotoxicities of *N*-nitrosamines in *Drosophila melanogaster* in vivo: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test, *Mutat. Res.*, **252**, 119-128.

Nguyen, T. D., J. B. Boyd and M. M. Green (1979) Sensitivity of *Drosophila* mutants to chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **63**, 67-77.

Vogel, E. W., A. Barbin, M. J. M. Nivard and H. Bartsch (1990) Nucleophilic selectivity of alkylating agents and their hypermutability in *Drosophila* as predictors of carcinogenic potency in rodent, *Carcinogenesis*, **11**, 2211-2217.

公開シンポジウム  
「突然変異誘発の調節機構」

## はじめに：環境変異原と生体によって誘発される突然変異

### Introduction: Mutations as a consequence of interaction between environmental mutagens and cellular functions

能美健彦

Takehiko Nohmi

国立衛生試験所, 変異遺伝部 158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences  
1-18-1 Kamiyoga Setagaya-ku Tokyo 158, Japan

(受付: 1996年10月21日; 受理 1996年11月5日)

#### Summary

There are great number of environmental chemicals that can potentially damage human DNA. To counteract such DNA damages, human cells possess a number of self-defense systems, such as DNA repair. Premutagenic DNA lesions are generated, however, when the cells are exposed to mutagens that overload the capacities of the cellular defense systems. These premutagenic lesions are fixed to mutations when DNA polymerases synthesize daughter DNA strands using damaged template DNA. This biochemical process to induce mutations is referred to as translesion DNA synthesis. In order to facilitate the discussions on a relation among DNA damage, DNA repair and DNA replication, the Environmental Mutagen Society of Japan held an open symposium entitled "Regulation mechanism of induction of mutations" in Tokyo on May 31, 1996. More than 200 people attended it and discussed the molecular aspect of environmental mutagenesis and carcinogenesis.

**Keywords:** environmental mutagens; DNA damage; DNA repair; DNA replication; The Environmental Mutagen Society of Japan

私たちの身の回りにはたくさんの化学物質が存在しており、その中には生物の遺伝情報を司る DNA に作用し、突然変異を誘発するものも少なくない。疫学的調査によればヒトの癌の発生に影響を与える第一の因子は食品であり、第二の因子は喫煙であるという。こうした食品やタバコの中に含まれる変異原物質が、ヒトの発癌において重要な役割を果たしていることは想像に難くない。環境変異原研究の中心的な課題の一つは、環境中に存在する変異原を如何に効率良く検出・同定し、そのヒトに対する遺伝的影響を科学的に推測するかにある。環境中の変異原の検出・同定・モニタリングは、エームテストをはじめとしたバイオアッセイ法の開発と機器分析法の改良により近年著しい進歩をとげた。しかし環境変異原のヒト遺伝子に対する危険性の推測(リスク評価)は、現在でも容易には行い得ない問題である。

環境変異原のリスク評価を難しくしている原因はいく

つかあるが、なかでもヒトの体内に生じた DNA 損傷がどのように修復され、また突然変異へと固定されて行くのかが十分に解明されていないことが大きな原因の一つとしてあげられる。周知のように変異原物質は DNA にいろいろな傷(DNA 鎖の切断, DNA 付加体の形成)をつけるが、DNA 上の傷が必ず突然変異に結びつくわけではない。生体は遺伝情報の連続性を守るためにいくつかの DNA 修復系(除去修復, 組み換え修復など)を備えており、この仕組みを通じて DNA 損傷による障害を巧みにくぐり抜けている(Fig. 1)。また哺乳類などには、DNA に損傷が起きた細胞を殺して組織全体の健全性を維持するメカニズムが存在する。突然変異は、こうした分子レベル、細胞レベルの修復の許容量を超えて細胞が変異原に暴露され、損傷を持った DNA を鋳型に DNA 複製が進む時に起こるのであり(トランススクリプション DNA 合成)、DNA 複製なしには、たとえ DNA に損傷

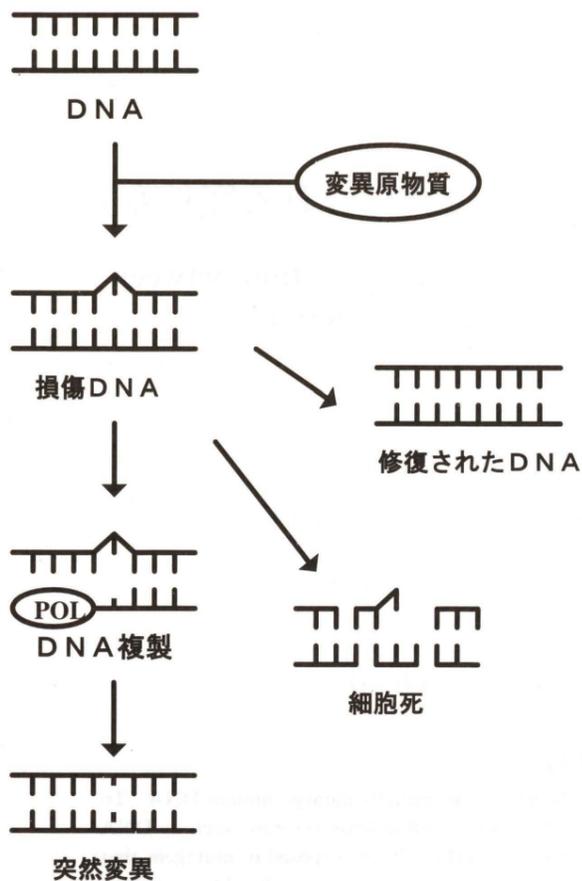


Fig. 1. Damaged DNA is reverted to intact DNA by DNA repair enzymes. The cells having damaged DNA are destroyed by apoptosis. Mutations are fixed through replication of damaged DNA template by DNA polymerases. This process to induce mutations is referred to as translesion DNA synthesis.

があっても突然変異は起こらない。乱暴な例かもしれないが、突然変異を交通事故に例えるならば、高速道路の真ん中に落ちている大きな石や陥没によってできた大きな穴 (DNA 損傷) は、潜在的には危険であっても事故ではなく、自動車 (DNA ポリメラーゼ) がやってきて石や

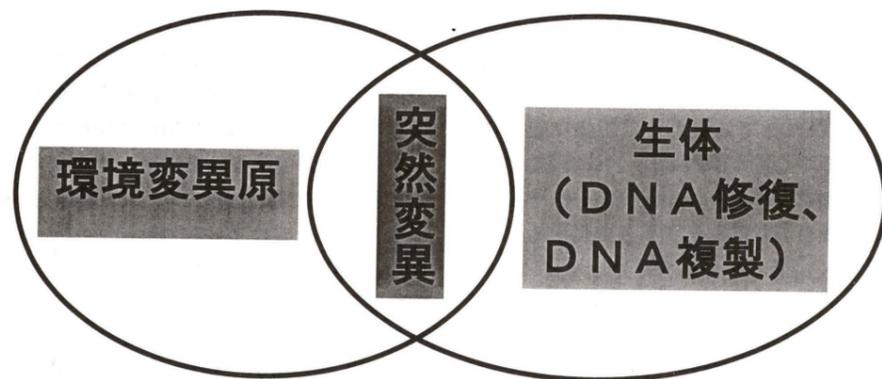


Fig. 2. Mutations are generated as a consequence of interaction between environmental mutagens and cellular functions such as DNA repair or DNA replication.

穴に乗り上げて初めて交通事故 (突然変異) になるのである。DNA 上の損傷は、外因性の変異原 (例えばヘテロサイクリックアミンやベンツピレン) による他、活性酸素やある種のアルキル化剤などの内因性変異原によっても生ずる。また、DNA 上に損傷がない場合でも DNA 複製酵素自身の複製エラーによって突然変異は生ずるし (自然突然変異)、自然突然変異を促進するような DNA 配列 (同じ塩基が繰り返している配列など) も存在する。

このように突然変異は、変異原物質と生体 (DNA, DNA 修復機構, DNA 複製酵素) の相互作用により生ずる現象であり (Fig. 2), ある化学物質によってヒトの遺伝子に突然変異が起こるか否かは、化学物質の種類や暴露量だけで決まるものではなく、暴露されるヒトの DNA 修復機能や DNA 複製能によって異なるものと考えられる。将来、DNA 修復や DNA 複製に関するヒトの個体差や臓器特異性、またヒトと実験動物との間の異同について詳細な知見が得られるようになれば、環境変異原のリスク評価に大きく貢献するであろうことは疑い得ない。

平成 8 年 5 月 31 日に、東京のヤクルトホールにおいて日本環境変異原学会主催の公開シンポジウム「突然変異誘発の調節機構」が開催された。このシンポジウムでは、生体の持つ DNA 修復機能や突然変異誘発機構に焦点をあて、国内外第一線の先生方にお集まりいただき、研究の現状を紹介いただいた (Fig. 3)。

シンポジウムの午前中は、主に大腸菌をモデルにした突然変異の機構や DNA 修復の仕組みについて講演があった。真木寿治博士 (奈良先端科学技術大学院大学) は、大腸菌の染色体 DNA の複製を行う DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素によって起こる複製エラーと、そのエラーの抑制に働く修復機能 (DNA 複製酵素の校正機能とミスマッチ修復) の役割について講演を行った。品川日出夫博士 (大阪大学微生物病研究所) は、DNA 相同組換えと組換え修復の分子機構について講演し、特に組換えの後期過程 (相同組換えによって生ずるホリデー構造の解消) に働く蛋白質 (Ruv, RecG) の役割について最

9:30-9:35	開会の挨拶 祖父尼俊雄 (環境変異原学会会長、国立衛生試験所変異遺伝部)
9:35-9:55	“はじめに：環境変異原と生体によって誘発される突然変異” 能美健彦 (国立衛生試験所変異遺伝部)
9:55-10:30	“DNA 複製エラーの発生と抑制の分子機構—複製エラーにおよぼす鋳型構造の影響” 真木寿治 (奈良先端科学技術大学院大学)
10:30-11:05	“DNA 相同組換えと組換え修復の分子機構” 品川日出夫 (大阪大学微生物病研究所)
招待講演	
11:05-11:50	“Adaptive Mutation in <i>Escherichia coli</i> ” Patricia L. Foster (ボストン大学)
昼食	
特別講演	
1:30-2:15	“哺乳類細胞の突然変異制御機構—遺伝子ターゲティングによる研究” 関口睦夫 (九州大学生体防御医学研究所)
2:15-2:50	“ヌクレオチド除去修復の分子機構” 花岡文雄 (大阪大学細胞生体工学センター、理研)
2:50-3:25	“活性酸素による DNA 損傷と突然変異” 葛西 宏 (産業医科大学、産業生態科学研究所)
3:25-4:00	“ヒトゲノム突然変異検出の方法と意義” 田平知子、林 健志 (九州大学遺伝情報実験施設)
4:00-4:05	閉会の挨拶 花岡文雄 (大阪大学細胞生体工学センター、理研)

Fig. 3. Program of the symposium entitled “Regulation Mechanism of Induction of Mutations” held by the Environmental Mutagen Society of Japan on May 31, 1996.

近の研究結果を紹介した。招待講演者である Patricia L. Foster 博士 (ボストン大学) は、定常期の大腸菌で起こる突然変異の機構と意義について講演した。定常期の細胞では染色体 DNA の複製は起きないが、核外因子である F プラスミドでは部分的な DNA 複製が起きており、これが F プラスミド上の遺伝子に起こる突然変異の原因となっていること、また定常期に F プラスミド上で起きた変異のうち、有用なものが組換えにより染色体 DNA に乗り移った時には、宿主細胞の環境への適用に貢献しうる可能性を示唆した。

シンポジウムの午後は、ヒトを含む哺乳類細胞における DNA 修復機構、DNA 損傷、そしてヒトゲノムにおける突然変異の検出法について講演があった。特別講演者である関口睦夫博士 (九州大学生体防御医学研究所、福岡歯科大学) は、ノックアウトマウス作製を通じた DNA 修復機構の研究について講演し、酸化型変異ヌクレオチドの除去に働く MutT の役割、アルキル化 DNA 損傷の修復に働く MGMT (O<sup>6</sup>-メチルグアニン DNA メチル転移酵素) の役割、組換えに働く RAD51 の役割について最近の研究結果を発表した。花岡文雄博士 (大阪大学細胞生体工学センター、理化学研究所) は、ヒトの

ヌクレオチド除去修復の機構について講演し、特に XPC 蛋白質および XPC と複合体を作る HHR23B 蛋白質について最近の研究結果を発表した。葛西宏博士 (産業医科大学、産業生態科学研究所) は、活性酸素によって生ずる DNA 損傷について講演し、特にグリオキサルと 2-ヒドロキシアデニンによる変異誘発機構について詳しい研究結果を紹介した。田平知子博士・林健志博士 (九州大学遺伝情報実験施設) は、ヒトゲノム中での突然変異を検出する方法について講演し、PCR-SSCP 法の改良に関する最近の成果を発表するとともに、遺伝病や癌関連の突然変異データベースについて講演した。

本シンポジウムには、日本環境変異原学会の会員以外に非会員が約 100 名参加し活発に討論を行った。このシンポジウムの開催が、環境変異原関連の研究者と、DNA 修復、突然変異機構関連の研究者の交流の端緒となれば幸いである。

最後になりましたが、忙しい時間を割いてご講演いただきました演者の先生方、座長の諸先生、協賛いただきました文部省重点領域研究「DNA 修復欠損の分子病態」総括班、協力いただきましたヤクルト本社に感謝いたします。

公開シンポジウム  
「突然変異誘発の調節機構」  
特別講演

## 哺乳動物細胞の突然変異制御機構 —遺伝子ターゲティングによる研究

Mechanisms for control of mutagenesis in mammalian  
cells: Studies with gene targeting

関 口 睦 夫

Mutsuo Sekiguchi

福岡歯科大学生物学教室 814-01 福岡市早良区田村 2-15-1

Fukuoka Dental College, Tamura 2-15-1, Fukuoka 814-01, Japan

(受付: 1996年11月25日; 受理: 1996年12月16日)

### Summary

8-Oxo-dGTP (8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine triphosphate) is produced by active oxygen species in the nucleotide pool of the cell and can be incorporated into cellular DNA. Human cells contain enzyme activity that hydrolyzes 8-oxo-dGTP to 8-oxo-dGMP, thereby preventing occurrence of mutations, caused by misincorporation. When the cDNA for human 8-oxo-dGTPase was expressed in *Escherichia coli mutT*<sup>-</sup> mutant cells devoid of self 8-oxo-dGTPase activity, the elevated level of spontaneous A:T to C:G mutation frequency reverted to normal. We isolated the genomic sequence encoding the enzyme and named the gene *MTH1* (for *mutT* human homologue). This gene is composed of at least 5 exons, spans approximately 9 kb, and is located on human chromosome 7p22. To establish roles of the enzyme in carcinogenesis, mice defective in the gene is being constructed.

Alkylation of DNA at the O<sup>6</sup>-position of guanine is one of the most critical events leading to induction of mutation as well as cancer. The enzyme O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase repairs this and related lesions in DNA. By means of gene targeting, we established mouse lines deficient in the methyltransferase gene, and tissues from these mice contained no methyltransferase activity. Administration of methylnitrosourea to these gene-targeted mice led to early death, and normal mice treated in the same manner showed no untoward effects. In mice given methylnitrosourea treatment, the bone marrow became hypocellular and there was a drastic decrease in the number of leukocytes and platelets, thereby indicating an impaired reproductive capacity of hematopoietic stem cells.

The mouse *Rad51* gene is a mammalian homologue of the *Escherichia coli rec A* and yeast *RAD51* genes, both of which are involved in homologous recombination and DNA repair. To elucidate the physiological role of *RAD51* protein, the gene was targeted in embryonic stem (ES) cells. Mice heterozygous for the *Rad51* null mutation were intercrossed and their offspring were genotyped. There were no homozygous (*Rad51*<sup>-/-</sup>) pups among 148 neonates examined but a few *Rad51*<sup>-/-</sup> embryos were identified when examined during the early stages of embryonic development. Doubly knocked-out ES cells were not detected under conditions of selective growth. These results are interpreted to mean that *RAD51* protein plays an essential role in the proliferation of cell.

**Keywords:** gene targeting; DNA repair methyltransferase; *mutT* mutator; mutagenesis; recombination

### 1. はじめに

突然変異は生物にとって大きな意義をもっている。地球上に生じた始原生命体から現在の多様な生物種の出現

に至るまでには、無数の突然変異の蓄積があったに違いない。その意味で突然変異は生物進化の原動力と見なすことができる。

しかし現存の生物にとっては突然変異はむしろ有害なことが多い。癌は主として体細胞に生じた突然変異に基づくものであり、生殖細胞に生じた突然変異の中には重篤な遺伝病の原因となるものが含まれている。

このように突然変異はプラスとマイナスの面を併せ持つが、生物は突然変異率を一定の低い値に保つことによってこの問題に対処しているように思われる。自然突然変異の頻度は一般に  $10^{-9}$ ~ $10^{-10}$ /塩基対/複製という低い値であり、これによって生物集団と個体における利害のバランスがとられていると考えることができる。

突然変異の頻度がこのように低いことは、その背後にある機構を解くことを困難なものとしている。もし突然変異の機構に異常があったとしても、通常の物理的あるいは化学的手段ではそれを検出するのは不可能に近い。我々はこの問題を遺伝学的手法を用いて解くことを考え、突然変異をコントロールしている機構にある程度迫ることができた。

ここではそのような視点から進めてきた研究の現状について簡単に紹介したい。現在進行形の研究であるので、未発表の内容については割愛させていただくことを了解して欲しい。

## 2. MutT ミューテーター

自然突然変異率が正常よりも上昇した突然変異体はミューテーター (mutator) とよばれる。これは突然変異率を低い一定の値に保つために働いている装置の一部に欠損があるために起こるものであって、これこそ突然変異の制御機構を解析する上で有用な変異株である。

ミューテーター変異はすべての生物に生じ得るものであるが、その研究はまず比較的解析の容易な大腸菌を用いて始められた。多数のミューテーター変異株が分離され、遺伝学的解析の結果、約 10 個の異なる遺伝子に生じたものであることが明らかにされた (Horiuchi *et al.*, 1989)。それぞれの遺伝子の産物が同定され、その中には

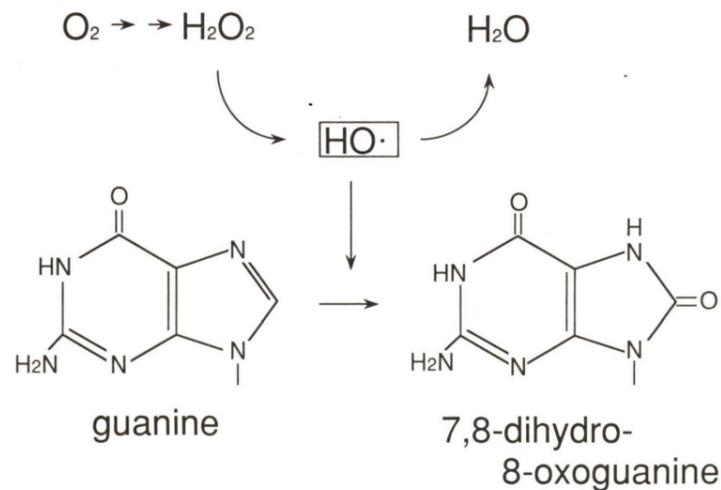


Fig. 1. Oxidation of guanine by active oxygen species in cell.

DNA ポリメラーゼの遺伝子 (*dnaE*) や校正機能をもつ 3'→5'エキソヌクレアーゼの遺伝子 (*dnaQ*) が含まれていることが明らかになった。さらに複製が終わった後の DNA 鎖に残っているエラーを除去するミスマッチ修復にかかわる遺伝子として *mutS*, *mutL*, *mutH* などが同定された。

ミューテーターの解析から、突然変異の制御には複製前に働く別の機構があることも明らかになった。大腸菌の *mutT* は今から 40 年以上も前に分離されたミューテーター変異株であるが (Treffers *et al.*, 1954)、長らくその実体が明らかでなかった。私達はその遺伝子をクローニングし (Akiyama *et al.*, 1987)、その産物が 8-オキソ dGTP (酸化グアニンをもつヌクレオシド三リン酸) を分解する活性をもつことを明らかにした (Maki and Sekiguchi, 1992)。dGTP は DNA 合成の基質の一つであるが、そのグアニン部分は細胞の代謝活動の過程で生じる活性酸素によって酸化されて 8-オキソグアニンとなる (Fig. 1)。8-オキソグアニンはシトシンとも対合するが、それとほぼ同じ効率でアデニンとも対合するので、8-オキソ dGTP が DNA 中にとり込まれると、結果的に AT→CG と CG→AT の 2 つの型のトランスポージョン型の変異がひき起こされることになる。実際には細胞内には後者の変異の生起を抑制する MutM と MutY の 2 種のタンパクが存在するので、*mutT* 変異株では前者の型の突然変異が特異的に起こることになる (Tajiri *et al.*, 1995)。*mutT* 変異株では AT→CG の変異が野生型大腸菌よりも約 1,000 倍高い頻度で起こり、その結果染色体 DNA の GC 含量が上昇するというきわだった性質を示すことが、*mutT* のクローニングに先立ってすでに示されていた (Yanofsky *et al.*, 1966; Cox and Yanofsky, 1967)。いずれにせよ MutT タンパクは 8-オキソ dGTP を分解することによってその DNA への転入を防ぎ、それによってこの種の突然変異の生起を抑えているのである (Sekiguchi, 1996)。

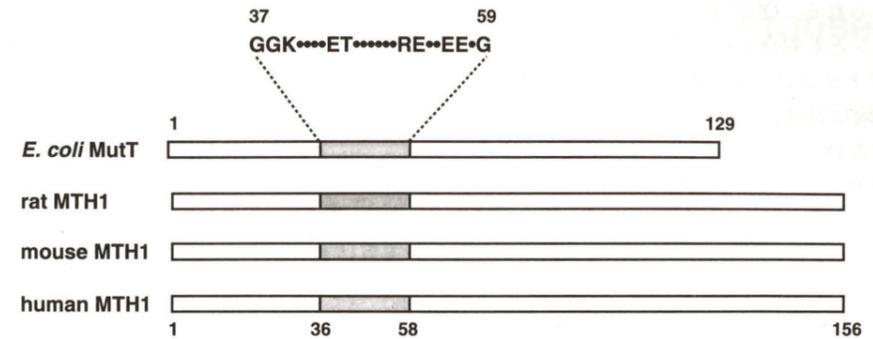


Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of *E. coli* and mammalian MutT/MTH1 proteins.

*mutT* に対応する遺伝子はヒトにも存在する。8-オキソ dGTP を分解する活性を指標としてヒトの酵素が分離され (Mo *et al.*, 1992)、その部分的アミノ酸配列を決定することによって cDNA がクローニングされた (Sakumi *et al.*, 1993)。ヒトの酵素は大腸菌の MutT タンパクより若干大きいのが、ほぼ同じ領域によく保存されたアミノ酸配列が存在する (Fig. 2)。最近さらにマウスやラットからも cDNA がクローニングされたが、それらの構造もよく似ている (Kakuma *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1995)。

ミューテーターの活性を測定するには大腸菌の糖発酵能が指標としてよく用いられる。糖発酵能を支配する遺伝子のある部位の CG 塩基対が AT に変異していた場合、その株に *mutT* ミューテーターを導入すると白いコロニー上に青い斑点が現れるが、これは AT→CG 変異の結果、正常型に復帰したことを示している。このような株にヒトの cDNA を移入して発現させると、AT→CG 変異の生起がほとんど完全に抑えられた (Furuichi *et al.*, 1994)。このことはヒトの酵素が大腸菌の *mutT* 遺伝子産物と同じ働きをすることを示している。同様な結果は他の哺乳動物由来の cDNA でも示されている。Fig. 3 はラットの cDNA を大腸菌の *mutT*<sup>-</sup> 欠損細胞で発現させると、この株で見られる高い自然突然変異率が野生

株のレベルまで下がることを示している (Cai *et al.*, 1995)。

cDNA をプローブとしてヒトの遺伝子が分離され、MTH1 (MutT Homolog) と名づけられた。遺伝子の大きさはほぼ 10 kb で 4 つのエキソンから成る (Furuichi *et al.*, 1994)。最近さらにその上流にもエキソン領域があることが明らかになり、複雑な発現調節をうけていることがわかってきた (Oda *et al.*, 投稿準備中)。この遺伝子はヒトの第 7 染色体の先端部に位置している。今後の課題はこの遺伝子の異常と病気 (癌や遺伝性疾患) との関連がないか探ることである。すでにヒトの癌細胞でこの遺伝子にアミノ酸置換を起こす変異がみついている (Wu *et al.*, 1995)。この問題を実験的に追求するためには、遺伝子ターゲティングの手法を用いて欠損マウスをつくる必要がある。そのようなマウスの解析も目下進行中である。

## 3. MGMT 欠損マウス

アルキル化剤は強い突然変異誘起能をもち、また動物に癌を起こすことが知られている。細胞をアルキル化剤で処理すると DNA の種々の塩基が修飾をうけるが、その中で特にグアニン塩基の 6 位の酸素のメチル (アルキル) 化が突然変異や癌、あるいは細胞死を引き起こす原

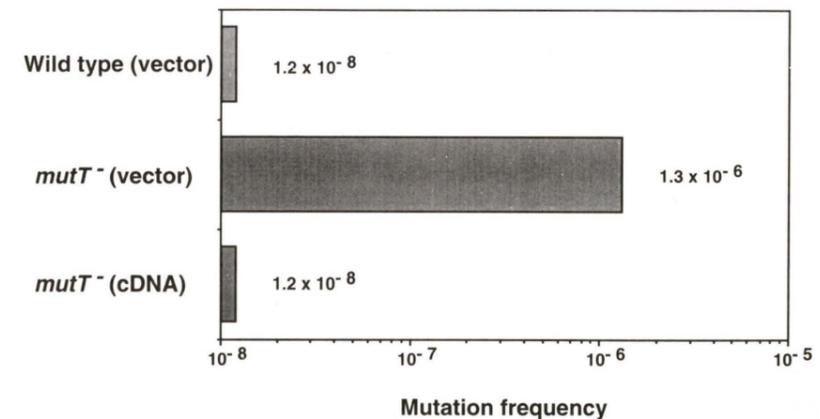


Fig. 3. Suppression of spontaneous mutation (rifampicin-resistant mutation) in *E. coli mutT*<sup>-</sup> cells by expression of cDNA for rat MTH1.

因になると考えられる。O<sup>6</sup>-メチルグアニンはシトシンのみならずチミンとも対合し得るので、2回のDNA複製後にGC→ATトランジション変異として固定される。

このような危険に対処しているのが細胞のDNA修復酵素の1つであるO<sup>6</sup>-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼである。この酵素はDNA中のO<sup>6</sup>-メチルグアニンとO<sup>4</sup>-メチルチミンからメチル基を酵素タンパク自体のシステイン残基に移し、その結果一段階の反応でDNAを修復する(Sekiguchi *et al.*, 1996)。O<sup>4</sup>-メチルチミンはO<sup>6</sup>-メチルグアニンに比べてはるかに少量しか生じないが、この塩基修飾によってAT→GC変異が引き起こされる(Kawate *et al.*, 1995)。メチル基をうけとった酵素はそのまま失活するので、この修復には多数の酵素分子を必要とする(Ishibashi *et al.*, 1994)。

メチルトランスフェラーゼ活性は動物種間、臓器間で差があり、一般にヒトの臓器あるいは細胞株の活性はげっ歯類のものに比べて高い。臓器間で比較すると、肝臓、脾臓などで活性が高く、神経系、骨髄、乳腺組織などでは活性が低い(Gerson *et al.*, 1986)。ヒトのメチルトランスフェラーゼ遺伝子は当研究室でクローニングされ、その全構造や酵素の基質特異性などが明らかにされた(Hayakawa *et al.*, 1990; Koike *et al.*, 1990; Nakatsu *et al.*, 1993)。遺伝子は5つのエキソンから成り、その全長は200 kb近い。それに対しmRNAは約1 kbと小さく、タンパク質は207 アミノ酸から成っている。

アルキル化剤によって引き起こされる突然変異あるいは発癌を防ぐ上でのメチルトランスフェラーゼの役割を明らかにするため、この酵素の活性を変化させた動物モデルが作製されている。大腸菌のメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 *ada* を *SRα* プロモーターの下流に配置してマウス胚に導入することによってトランスジェニックマウスがつくられているが、これは非常に高いメチルトランスフェラーゼ活性を持ち、アルキル化剤による肝臓の発癌を有意に抑制した(Nakatsuru *et al.*, 1993)。またヒトのメチルトランスフェラーゼを胸腺で過剰発現させたマウスでは、アルキル化剤投与後の胸腺腫の発生が抑えられたという報告もある(Dumenco *et al.*, 1993)。これらの実験は、O<sup>6</sup>-メチルグアニンの発癌作用とメチルトランスフェラーゼによるその抑制効果を直接示した点で意義がある。

大腸菌や酵母ではメチルトランスフェラーゼの欠損によって自然突然変異の頻度が野生株よりも若干上昇することが示されている(Xiao and Samson, 1993)。これは正常の代謝産物であるS-アデノシルメチオニンなどが内因性のアルキル化物質としてDNA損傷を引き起こすことが突然変異の原因ではないかという考えを示唆する。メチルトランスフェラーゼ遺伝子が欠損したマウスでは自然発癌の頻度も増大するかどうか興味あるところである。

そのような立場から遺伝子ターゲティングによって

MGMT 遺伝子を破壊したマウスが作製された(Tsuzuki *et al.*, 1996)。Fig. 4はそのプロセスを示したものである。メチルトランスフェラーゼ欠損(MGMT<sup>-/-</sup>)マウスは若干体重が少ないが(MGMT<sup>+/+</sup>の約85%)、正常に生育する。アルキル化剤に対してきわめて感受性が高く、正常マウスの生存に影響を与えない量のメチルニトロソウレア(MNU)の投与によって死亡する。Fig. 5は生後6週目にMNUを50 mg/kg腹腔内注射した時の生存率を示したものである。野生型マウスは観察期間中1匹も死亡しなかったが、MGMT<sup>-/-</sup>マウスは投与17日以内にその全部が死亡した。

メチルトランスフェラーゼ欠損マウスのアルキル化剤に対する高い感受性は、骨髄細胞など増殖の盛んな細胞が死滅することによって考えられる。実際白血球や血小板の数はアルキル化剤投与後数日のうちに著減するし、骨髄の幹細胞はほとんど消失する。胸腺や脾臓の退縮も著しい。

MGMT<sup>-/-</sup>マウスでは、アルキル化剤の投与によって野生型よりも容易に癌が発生する可能性が高い。致死量以下の低濃度のアルキル化剤の投与によって癌がどの程度生じるか、また自然状態で飼育した時にも正常マウスに比べて高い発癌率を示すかどうか、現在実験が続けられている。

MGMT欠損マウスでアルキル化剤による細胞死がよく起こるのは何故だろうか。もしO<sup>6</sup>-メチルグアニンの形成が突然変異の誘起だけを引き起こすものであるならば、そのように高い率の細胞死は期待できない。これに関しては培養細胞の研究から一つの仮説が提唱されている(Branch *et al.*, 1993; Kat *et al.*, 1993)。O<sup>6</sup>-メチルグアニンはチミンとミスペアを形成するが、ミスマッチ修復系はこのミスマッチを認識してO<sup>6</sup>-メチルグアニン(アルキル化塩基)の反対側の新生鎖を除去しようとする。しかしO<sup>6</sup>-メチルグアニンは鋳型鎖にそのまま残っているのでこの反応がくり返して起こり、結果的にDNA鎖は切断されて細胞は死に至るという筋書きである(Fig. 6)。このような細胞が生き残るためにはミスマッチ修復を持たない方が都合がよいことになる。果たしてそうであるかどうかは、メチルトランスフェラーゼ欠損に加えてミスマッチ修復の遺伝子を欠くマウスを作出すれば直接確かめることができる。もし期待通りの結果が出れば、そのようなマウスは化学物質の発癌性を検討する上で貴重な実験系を提供することになる。このラインの研究も当研究室で現在進められている。

#### 4. 組換え能の欠損

DNAの組換えは多様な性質をもつ子孫の生成のみならず、遺伝情報の保存の面でも重要な役割を果たしている。最近DNA組換え能に異常をもつ遺伝病の原因遺伝子が相ついでクローニングされ、組換え機構との関連を探る道が開けてきた。

## Production of the MGMT knock out mouse

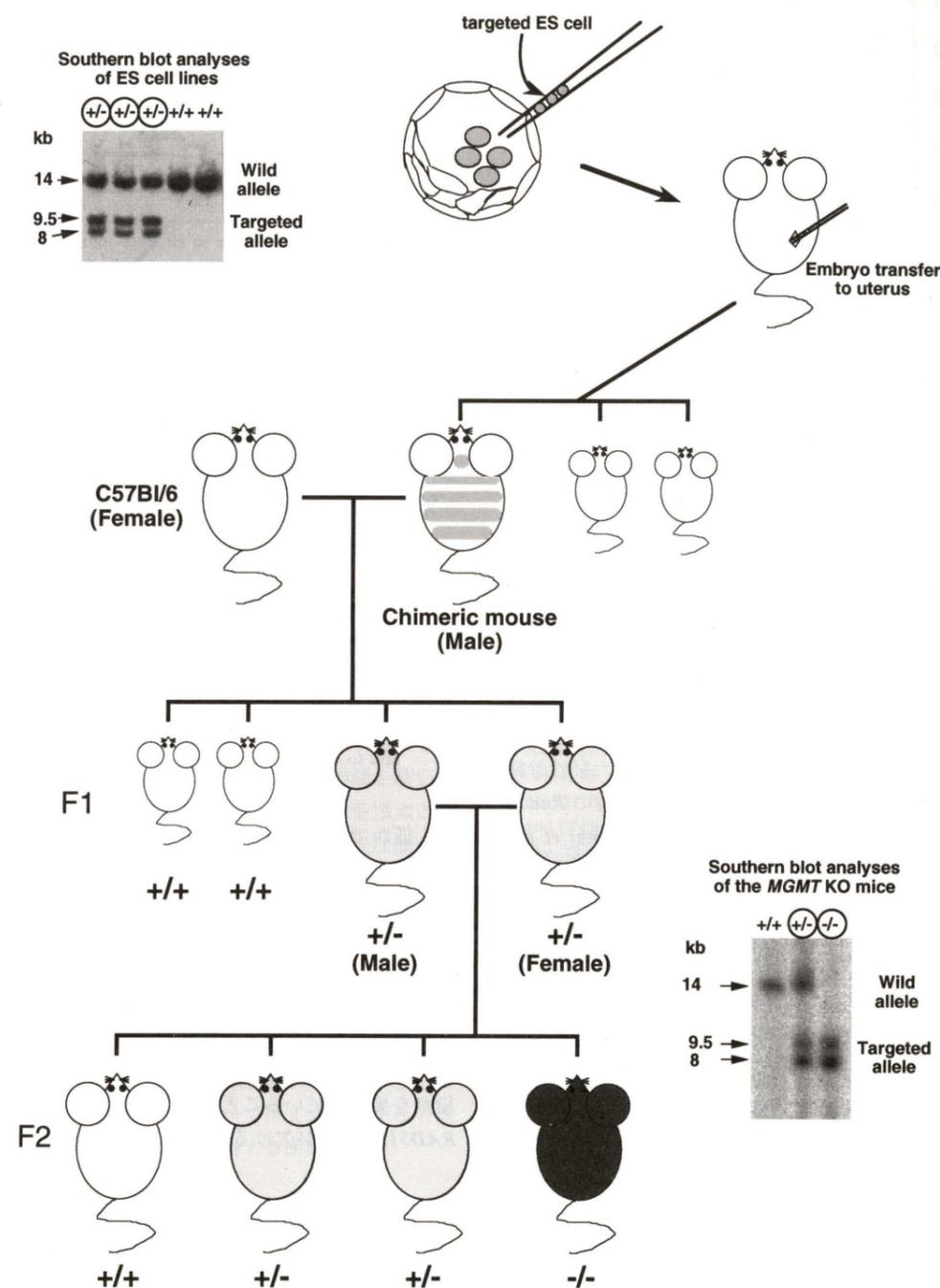


Fig. 4. Construction of MGMT-knockout mice. The results of Southern blot analyses are shown in insets.

ブルーム症候群のヒトの体細胞では染色体組換えが異常に亢進しているが、その原因遺伝子は塩基配列上RecQヘリカーゼの特徴をもっている(Ellis *et al.*, 1995)。大腸菌の *recQ* 遺伝子はDNAの組換えに必要で、その遺伝子産物はDNAヘリカーゼ活性を持つことが示されていた(Umezumi *et al.*, 1990)。さらに最近ウエルナー症候群をおこすヒトの遺伝子がクローニングされ、これも

RecQヘリカーゼと共通の配列をもっていることがわかった(Yu *et al.*, 1996)。この病は若年性老化をおこすという顕著な病像を示すが、その背景にDNA組換えの欠損が関わっていることは興味深い。

遺伝的組換えの機構は大腸菌を用いてよく研究されているが、その過程で最も中心的な役割を演じているのはRecAタンパクである。RecAタンパクは相同な塩基配

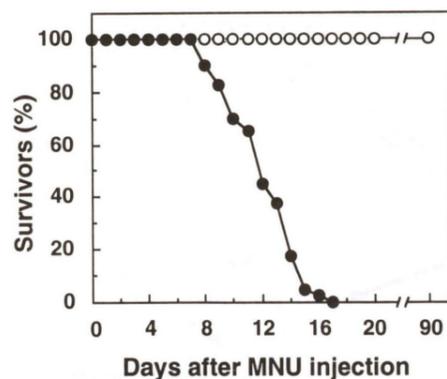


Fig. 5. Survivals of mice after MNU administration. Forty-nine of *MGMT*<sup>+/+</sup> (○) and 39 of *MGMT*<sup>-/-</sup> (●) mice were given MNU (50 mg/kg of body weight) intraperitoneally at the 6th postnatal week.

列をもつ二本鎖 DNA の対合と鎖交換を ATP 存在下に触媒する。 *recA* のホモログとして酵母の *RAD51* 遺伝子が同定されているが、それに対応するマウスの遺伝子が分離されている (Morita *et al.*, 1993; Shinohara *et al.*, 1993).

マウスの *Rad51* 遺伝子は 10 ヶのエキソンから成るが、その第 5 エキシソンの部分をネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲティングベクターで置き換えた (Fig. 7)。この部分は *RecA* 関連の遺伝子でよく保存されている領域で、DNA の修復や組換えに必要な ATP 結合部位に相当する。常法にしたがってその部分を欠失した胚性幹細胞をマウスの胚に移入し、相同染色体の一方の *Rad51* 遺伝子に欠失をもつマウスを作製した。 (Tsuzuki *et al.*, 1996)。そのようなマウスを交配することによってその子に 1/4 の確率で *Rad51*<sup>-/-</sup> マウスが生まれることが期待されるが、実際にはそのようなマウスは 1 匹も得られなかった。生まれたマウスは +/+ か +/- で、その比は 1:2 であった (Table 1)。このことはメンデルの法則にしたがって +/+, +/-, -/- が 1:2:1 の割合で分離するが、そのうち -/- のマウスは生まれてこないことを示している。胎児について調べてみたが同じような結果が得られ、さらに初期胚について解析したところ、

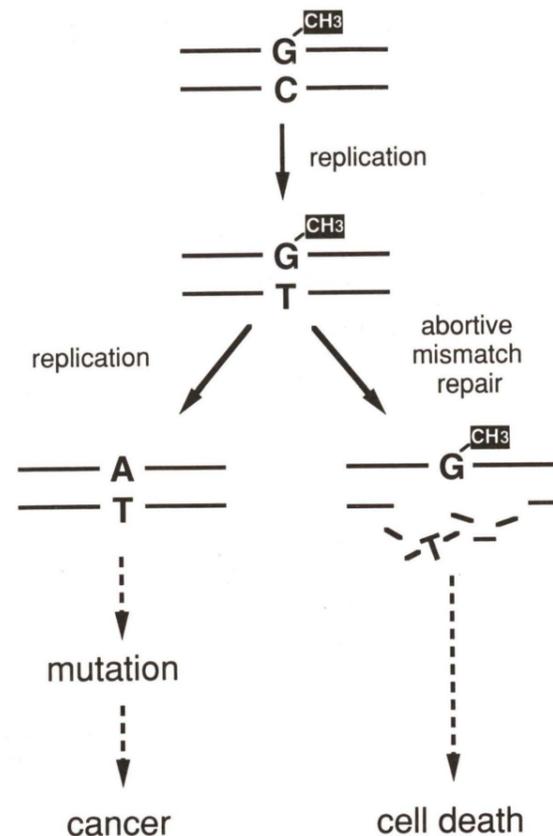


Fig. 6. A model for pathways leading to tumor formation and to apoptotic cell death.

ごく僅かではあるが -/- の遺伝子型をもつものが検出された。このことは -/- の胚は発生のごく初期に死滅することを意味している。

上の結果は *RAD51* タンパクがマウスの初期発生において必須であることを示している。さらに胚性幹細胞を用いてその相同染色体上の遺伝子とともに欠損させることを試みたが、そのような細胞は得られなかった。このことは *RAD51* タンパクが細胞の増殖そのものに必須の役割を果たしていることを示唆する。酵母や大腸菌では *RAD51/RecA* が欠けると組換え能は失くなるが細胞は

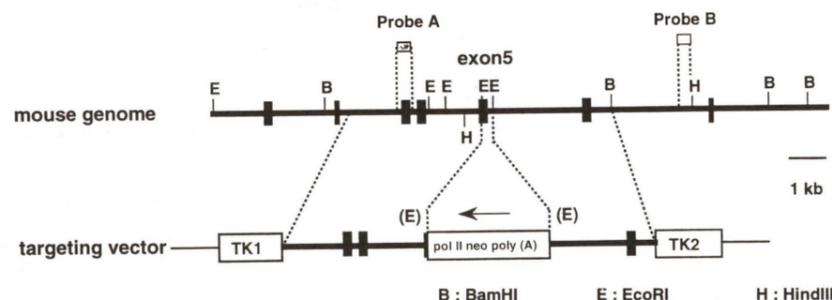


Fig. 7. The targeting vector for disrupting the mouse *Rad51* gene. The upper thick line shows part of the gene with appropriate restriction enzyme sites. The direction of *Rad51* gene transcription is left to right, and the arrow indicates the direction of transcription of the *polIII/neo/poly (A)* cassette. TK1 and TK2 are the Herpes simplex virus type 1 and type 2 thymidine kinase genes, respectively.

Table 1. Genotypes of progenies from intercrosses of *Rad51*<sup>+/-</sup> mice.

Age of progenies examined	Line no.	Genotype		
		+/+	+/-	-/-
4-week-old (tail)	1	20	43	0
	6	29	56	0
13.5 dpc (fetal body)		1	8	0
8.5 dpc (fetal body)		1	9	0
100 h (morula/blastocyst)		15	48	2
50 h (4- to 8-cell)		27	81	1

DNAs isolated from animals or embryos were analyzed by Southern blotting. The data were taken from Tsuzuki *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6236-6240, 1996)

増殖し得るという事実からは全く予想されなかったことである。哺乳動物の細胞では組換え機能が細胞の増殖に必須であるのか、あるいは *RAD51* タンパクが組換え以外の過程 (たとえば DNA 複製など) においても働いているのか現段階では明らかでないが、重要な問題提起である。

## 5. おわりに

最初に述べた通り突然変異の制御は生物にとってきわめて重要な機能であり、それには DNA の複製、修復、組換えの過程が深く関わっている。このような基本的な機能は細菌からヒトまですべての生物に存在するので、解析の容易な微生物などの系を用いてその機構を解いていくという方法論は有用である。しかしヒトを頂点とする多細胞系には微生物からは予想されない様々な側面が存在する。それを明らかにするためにはどうしても当該の生物系について研究を行う必要があり、その意味でマウスを用いた遺伝子ターゲティングの研究は哺乳動物での機構を理解するために不可欠の手段といえよう。

ここで紹介した研究のほとんど大部分は九州大学生体防御医学研究所の生化学部門の研究室で行われたものである。研究に関わった人達の名前をあげることをしなかったが、その人達の寄与については文献の項をみて欲しい。それらの人達に心から感謝する次第である。

## 参考文献

- Akiyama, M., T. Horiuchi and M. Sekiguchi (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of the *mutT* mutator of *Escherichia coli* that causes A:T to C:G transversion. *Mol. Gen. Genet.*, 206, 9-16.
- Branch, P., G. Aquilina, M. Bignami and P. Karren (1993) Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature*, 362, 652-654.
- Cai, J.-P., T. Kakuma, T. Tsuzuki and M. Sekiguchi (1995) cDNA and genomic sequences for rat 8-oxo-dGTPase that prevents occurrence of spontaneous mutations due to oxidation of guanine nucleotides. *Carcinogenesis*, 16, 2343-2350.
- Cox, E. C. and C. Yanofsky (1967) Altered base ratios in the DNA of an *Escherichia coli* mutator strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 1895-1902.

Dumenco, L. L., E. Allay, K. Norton and S. L. Gerson (1993) The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science*, 259, 219-222.

Ellis, N. A., J. Groden, T.-Z. Ye, J. Strauglen, D. J. Lennon, S. Ciocci, M. Proytcheva and J. German (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*, 83, 655-666.

Furuichi, M., M. C. Yoshida, H. Oda, T. Tajiri, Y. Nakabeppu, T. Tsuzuki and M. Sekiguchi (1994) Genomic structure and chromosome location of the human *mutT* homologue gene MTH1 encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion. *Genomics*, 24, 485-490.

Gerson, S. L., J. E. Trey, K. Miller and N. A. Berger (1986) Comparison of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*, 7, 745-749.

Hayakawa, H., G. Koike and M. Sekiguchi (1990) Expression and cloning of complementary DNA for a human enzyme that repairs O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA. *J. Mol. Biol.*, 213, 739-747.

Horiuchi, T., H. Maki and M. Sekiguchi (1989) Mutators and fidelity of DNA replication. *Bull. Inst. Pasteur*, 87, 309-336.

Ishibashi, T., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1994) Artificial control of nuclear translocation of DNA repair methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 269, 7645-7650.

Kakuma, T., J. Nishida, T. Tsuzuki and M. Sekiguchi (1995) Mouse MTH1 protein with 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphatase activity that prevents transversion mutation. *J. Biol. Chem.*, 270, 25942-25948.

Kat, A., W. G. Thilly, W.-H. Fang, M. J. Logley, G.-M. Li and P. Modrich (1993) An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6424-6428.

Kawate, H., K. Ihara, K. Kohda, K. Sakumi and M. Sekiguchi (1995) Mouse methyltransferase for repair of O<sup>6</sup>-methylguanine and O<sup>6</sup>-methylthymine in DNA. *Carcinogenesis*, 16, 1595-1602.

Koike, G., H. Maki, H. Takeya, H. Hayakawa and M. Sekiguchi (1990) Purification, structure and biochemical properties of human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 265, 14754-14762.

Maki, H. and M. Sekiguchi (1992) MutT protein specifically hydrolyzes a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*, 355, 273-275.

Mo, J.-Y., H. Maki and M. Sekiguchi (1992) Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxo-dGTP, by human 18-kilodalton protein: Sanitization of nucleotide pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11021-11025.

Morita, T., Y. Yoshimura, A. Yamamoto, K. Murata, M. Mori, H. Yamamoto and A. Matsushiro (1993) A mouse homolog of the *Escherichia coli recA* and *Saccharomyces cerevisiae Rad51* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6577-6580.

Nakatu, Y., K. Hattori, H. Hayakawa, K. Shimizu and M. Sekiguchi (1993) Organization and expression of the human gene for O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *Mutat. Res.*, 293, 119-132.

Nakatsuru, Y., S. Matsukuma, N. Nemoto, H. Sugano, M. Sekiguchi and T. Ishikawa (1993) O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase protects against nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6468-6472.

Sakumi, K., M. Furuichi, T. Tsuzuki, T. Kakuma, S. Kawabata, H. Maki and M. Sekiguchi (1993) Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 268, 23524-23530.

Sekiguchi, M. (1996) MutT-related error avoidance mechanism for DNA synthesis. *Genes to Cells*, 1, 139-145.

Sekiguchi, M., Y. Nakabeppu, K. Sakumi and T. Tsuzuki (1996) DNA-repair methyltransferase as a molecular device for preventing mutation and cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **122**, 199-206.

Shinohara, A., H. Ogawa, Y. Matsuda, N. Ushio, K. Ieko and T. Ogawa (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. *Nature Genet.*, **4**, 239-243.

Tajiri, T., H. Maki and M. Sekiguchi (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, **336**, 257-267.

Treffers, H. P., V. Spinelli and N. O. Belser (1954) A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **40**, 1064-1071.

Tsuzuki, T., Y. Fujii, K. Sakumi, Y. Tominaga, K. Nakao, M. Sekiguchi, A. Matsushiro, Y. Yoshimura and T. Morita (1996) Targeted disruption of the *Rad51* gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6236-6240.

Tsuzuki, T., K. Sakumi, A. Shiraishi, H. Kawate, H. Igarashi, T. Iwakuma, Y. Tominaga, S. Zhang, S. Shimizu, T. Ishikawa, K. Nakamura, K. Nakao, M. Katsuki and M. Sekiguchi (1996)

Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis*, **17**, 1215-1220.

Umezumi, K., K. Nakayama and H. Nakayama (1996) *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5363-5367.

Wu, C., H. Nagasaki, K. Maruyama, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi and Y. Yuasa (1995) Polymorphisms and probable lack of mutation in a human *mutT* homolog, *hMTH1*, in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 1239-1245.

Xiao, W. and L. Samson (1993) *In vivo* evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2117-2121.

Yanofsky, C., E. C. Cox and V. Horn (1966) The unusual mutagenic specificity of an *E. coli* mutator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 274-281.

Yu, C.-E., J. Oshima, Y.-H. Fu, E. M. Wijsman, F. Hisama, R. Alisch, S. Mathews, J. Nakura, T. Miki, S. Ouais, G. M. Martin, J. Mulligan and G. D. Schellenberg (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, **272**, 258-262.

公開シンポジウム  
「突然変異誘発の調節機構」

## 活性酸素による DNA 損傷と突然変異

### Oxidative DNA lesions and mutagenesis

紙谷 浩之, 葛西 宏

Hiroyuki Kamiya and Hiroshi Kasai

産業医科大学産業生態科学研究所職業性腫瘍学 807 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1

Department of Environmental Oncology, Institute of Industrial Ecological Sciences,  
University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka,  
Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807, Japan

(受付: 1996年10月21日; 受理: 1996年11月5日)

#### Summary

DNA lesions produced by reactive oxygen appear to be one of the causes of mutation that either occurs spontaneously or is induced by environmental mutagens. 8-Hydroxyguanine has been studied extensively and it has been shown that the base induces G→T transversion. Recent studies indicate that another oxidative DNA lesion, 2-hydroxyadenine, also induces mutation. In this paper, we review the mutational properties of oxidative DNA lesions, particularly, those of 8-hydroxyguanine and 2-hydroxyadenine.

**Keywords:** reactive oxygen species, 8-hydroxyguanine, 2-hydroxyadenine, mutation

#### 1. はじめに

近年、活性酸素の生体への影響が注目を集め、様々な方面からのアプローチにより、その理解が深まりつつある。活性酸素は細胞内で自然に生ずるのみならず、ある種の環境変異原(種々の化学物質・放射線等)によっても生成する。活性酸素によって生じたDNAの損傷(修飾)は、塩基対形成の誤りを誘発することにより、変異や発癌を引き起こすと考えられる(Ames, 1983)。

本稿では、活性酸素によって生ずるDNA損傷と変異との関連を述べることにする。最初に、8-hydroxyguanineについて、次に、最近、我々の教室で研究を進めている、2-hydroxyadenineについて述べる。さらに、他の酸化的DNA損傷について述べた後、活性酸素による変異についての考察を行う。

#### 2. 8-Hydroxyguanineの誘発する変異

##### 2.1. 8-Hydroxyguanineの生成

8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine, 8-OH-Gua, Fig. 1) は、活性酸素を産生する環境変異原によって生ずることが報告されているDNA損傷である

(Kasai and Nishimura, 1984a, 1984b, 1984c; Kasai *et al.*, 1984, 1986). Table 1 に活性酸素産生系である、Fe<sup>2+</sup>-EDTA-O<sub>2</sub> 処理によって生ずる 8-OH-Gua の生成量を示した。DNA, モノマー (dG, dGTP) のいずれを処理しても生成が確認された。現在までに、種々の処理による 8-OH-Gua の試験管内、培養細胞、動物臓器中の生成についての実験が多数報告されているが、詳細については他の総説を参照されたい(紙谷・葛西, 1995)。

Table 1 から明らかなように、8-OH-Gua は DNA の前駆体である、dGTP の塩基部にも生じ、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-OH-dGTP) が生成する。この酸化的損傷ヌクレオチドは DNA ポリメラー

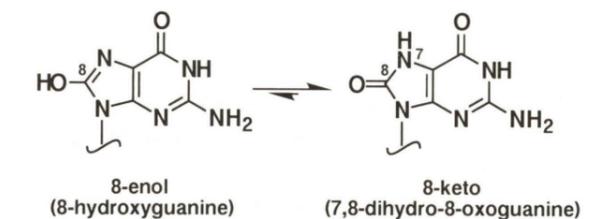


Fig. 1. Structure of 8-hydroxyguanine.

Table 1. Formation of 8-hydroxyguanine and 2-hydroxyadenine by treatment with Fe<sup>2+</sup>-EDTA-O<sub>2</sub><sup>a)</sup>.

	Materials treated			
	dG/dA	dGTP/dATP	ds DNA <sup>b)</sup>	ss DNA
8-hydroxyguanine	2900	3700	420	700
2-hydroxyadenine	800	650	9.7	18

<sup>a)</sup> Amounts shown are 8-hydroxydeoxyguanosine/10<sup>5</sup> dG and 2-hydroxydeoxyadenosine/10<sup>5</sup> dA.

<sup>b)</sup> ds DNA and ss DNA are double- and single-stranded DNA, respectively.

Table 2. Mutations by 8-hydroxyguanine in various experimental systems.

System	Sequence (5'→3') <sup>a)</sup>	Mutation	Reference
<i>in vitro</i>	CG*G	G*→T <sup>b)</sup>	Kamiya <i>et al.</i> , 1995b
	GG*C	G*→T <sup>b)</sup>	Kamiya <i>et al.</i> , 1992c, 1995b
	CG*G	G*→T <sup>c)</sup>	Shibutani <i>et al.</i> , 1991
<i>E. coli</i>	AG*C	G*→T	Wood <i>et al.</i> , 1990
	GG*G	G*→T	Cheng <i>et al.</i> , 1992
NIH3T3 cells	CG*G	G*→T	Kamiya <i>et al.</i> , 1995c
	GG*C	G*→T, G*→A 5'-flanking mutation	Kamiya <i>et al.</i> , 1992b, 1995c
	TG*C	G*→T, 5'-flanking mutation	Kamiya <i>et al.</i> , 1995c
COS-7 cells	CG*T	G*→T, 5'-flanking mutation	Moriya, 1993

<sup>a)</sup> G\* represents 8-hydroxyguanine.

<sup>b)</sup> Primer-strand of full-length product was amplified and analyzed.

<sup>c)</sup> Insertion of dAMP opposite 8-hydroxyguanine was detected.

ゼの基質となり、DNA鎖中に取り込まれる (Cheng *et al.*, 1992; Maki and Sekiguchi, 1992). すなわち、DNA中のグアニン塩基の直接的な酸化によって生ずる (Fig. 2, ルート1) のみならず、8-OH-dGTPがポリメラーゼによって取り込まれると言うメカニズムでも、8-OH-GuaはDNA中に生成する (Fig. 2, ルート2). 実際に、8-OH-dGTPを分解する酵素であるMutT活性を欠く大腸菌変異株等の解析により、DNA中における8-OH-Guaの蓄積には両方の経路が同程度の寄与をしていると推察されている (Tajiri *et al.*, 1995).

## 2.2. 8-Hydroxyguanineの試験管内における対形成

8-OH-Guaを導入した合成オリゴヌクレオチドを用いて、試験管内における塩基対形成が調べられている。滋谷らは、種々のDNAポリメラーゼがどのヌクレオチドを挿入するかを調べた。その結果、8-OH-Guaに対し、dCMP以外にdAMPが取り込まれることを明らかにしている (Table 2) (Shibutani *et al.*, 1991). また、8-OH-Guaをヒトc-Ha-ras遺伝子のコドン12の1番目と2番目の位置に含む鎖長65のDNA断片を用いて同様の実験を行ったところ、ほぼ同じ結果が得られた (Table 2) (Kamiya *et al.*, 1992c, 1995b). この両者の結果を比較すると、ポリメラーゼの種類と配列 (特に隣接塩基) の違いによって、取り込まれるdCMPとdAMPの比が異なることがわかった (紙谷・葛西, 1995).

以上の研究とは逆に、8-OH-dGTPのDNAポリメラーゼによる取り込みが調べられ、鋳型DNA中のC及びAに対してほぼ同程度に取り込まれることが明らかにされている (Maki and Sekiguchi, 1992; Purmal *et al.*, 1994b).

二本鎖オリゴヌクレオチド中の8-OH-Guaを含む塩基対の構造が、NMRを用いた研究によって、明らかにされている。Cとの対形成では、通常のG・C塩基対と同様にワトソン-クリック型の水素結合をしている (Oda *et al.*, 1991). 8-OH-Guaは実際には7,8-dihydro-8-oxo型を取り (Fig. 1), また、8-OH-Guaを含むヌクレオシドはsyn型コンフォメーションを優先していることが明らかとなっている (Culp *et al.*, 1989; Kasai *et al.*, 1987; Uesugi and Ikehara, 1977) が、アデニンとの対形成では8-OH-Guaはsyn型コンフォメーションを取り、O<sup>6</sup>位とN<sup>7</sup>位を利用したフーグスティーン型の水素結合をしていることが明らかにされた (Kouchakdjian *et al.*, 1991).

8-OH-Guaの対形成の物理化学的側面を調べるために、8-OH-Guaを導入した二本鎖オリゴヌクレオチドの熱力学的安定性が算出されている。その結果、8-OH-Gua:C, 8-OH-Gua:A対以外にも安定性が比較的高い塩基対があることが示された (Koizume *et al.*, 1994).

## 2.3. 細胞内で8-Hydroxyguanineの誘発する変異

大腸菌を用いた系では、8-OH-Guaを導入したファージDNAによって実験が行われ、G→T変異が誘発されることが明らかにされている (Wood *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1992) (Table 2). 8-OH-Guaによる変異率は、0.5~1%であった。

コドン12又はコドン61に8-OH-Guaを含むc-Ha-ras遺伝子ベクターをNIH3T3細胞にトランスフェクションし、塩基置換によってコードするアミノ酸が変換されると、遺伝子産物の活性化によりNIH3T3細胞のトランスフォーメーション (フォーカス形成) を引き起こす

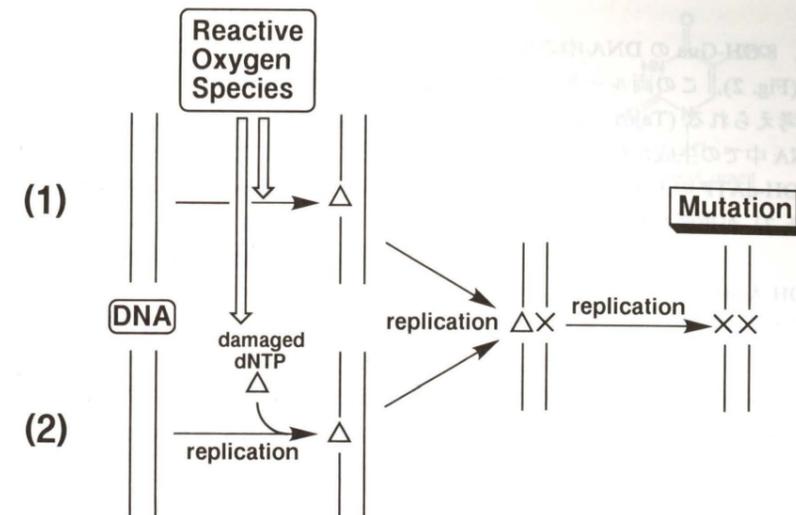


Fig. 2. Formation of oxidatively damaged residue in DNA and fixation of mutation. Reactive oxygen species modify DNA (route 1) or dNTP (route 2). The damaged dNTP may be incorporated by a DNA polymerase (route 2).  $\Delta$ , damaged residue or nucleotide; X, "incorrect" residue in DNA.

ことを利用して変異体が単離された (Kamiya *et al.*, 1992b, 1995c). 生じたフォーカス数は、対照として用いた変異型 (活性型) のc-Ha-ras遺伝子と比較すると、1~2%であり、これは誘発された変異の割合を反映していると考えられる。また、生じた変異を解析したところ、主として見出されたのはG→T変異であったが、G→A変異や、8-OH-Guaの5'-隣接部位における変異なども見出ししており、*in vitro*や大腸菌を用いた系とは異なる結果も見出されている (Kamiya *et al.*, 1992b, 1995c) (Table 2).

森谷は8-OH-Guaを含む一本鎖ベクターを構築し、サル由来のCOS-7細胞にトランスフェクションした (Moriya, 1993). 変異率は3.5%と他の報告と比較して高いが、これは一本鎖を用いていることも一因と思われる。生じていた変異はG→T変異と5'-隣接部位における置換変異であった (Table 2) (Moriya, 1993).

## 2.4. ヌクレオチドプールに生じた8-OH-Guaが誘発する変異

Chengらは、8-OH-dGTPを用いて試験管内でDNAポリメラーゼ反応 (gap filling) を行い、大腸菌にトランスフェクションした。その結果、A・T→C・G変異 (97%)とG・C→T・A変異 (3%)が誘発されていた (Cheng *et al.*, 1992). この結果は、8-OH-dGTPがDNA中に取り込まれる際には、AとCに対してほぼ同程度に取り込まれるが、DNA中の8-OH-Guaはその約99%がCと対形成し、1%程度しかAと対形成しないと考えるとほぼ説明できる。

Pavlovらは*in vitro*における、ヒト細胞抽出液を用いた複製実験を行い、8-OH-dGTPによって同様にA・T→C・G変異が誘発されることを報告している (Pavlov *et al.*, 1994).

## 2.5. 8-OH-Gua修復酵素欠損変異株中において見出される変異

8-OH-Guaの修復酵素として大腸菌中で同定されているものに、MutM (FPG蛋白, 8-OH-Guaエンドヌクレアーゼ)及びMutYがあげられる (紙谷・葛西, 1995). また、ヌクレオチドプール中に生じた8-OH-dGTPの除去 (浄化) に、MutT蛋白が関与していることが明らかとなっている (Maki and Sekiguchi, 1992).

MutMまたはMutY活性のいずれかを欠損している変異株は、G・C→T・A変異が野生株に比較して上昇していることが報告されており (Cabrera *et al.*, 1988; Nghiem *et al.*, 1988), DNA中の8-OH-GuaがG・C→T・A変異を誘発する点と一致している。また、mutT株はA・T→C・G変異が上昇していると報告されており (Yanofsky *et al.*, 1966), 8-OH-dGTPの誘発する変異スペクトルと一致している。

## 3. 2-Hydroxyadenineの誘発する変異

最近、我々は、dA誘導体をFe<sup>2+</sup>-EDTA-O<sub>2</sub>で処理すると、主な生成物として2-hydroxyadenine (1,2-dihydro-2-oxoadenine, 2-OH-Ade, guanineの異性体であることから、isoguanineとも呼ばれる) (Fig. 3)が得られることを見出した (Kamiya and Kasai, 1995). 2-OH-Adeの性質を研究した結果、この損傷塩基が酸化的DNA損傷の中で重要なものの一つである可能性が明らかになりつつある。

### 3.1. 2-Hydroxyadenineの生成

DNA, dA, dATPをFe<sup>2+</sup>-EDTA-O<sub>2</sub>処理により生成した2-OH-Ade及び8-OH-Gua量をTable 1に示した。モノマーを処理した場合、2-OH-Adeの生成量は8-OH-Guaとほぼ同程度であったが、DNAを処理した場合は、2-OH-Adeは8-OH-Guaの1/40程度しか生成しな

かった。

既に述べたように、8-OH-Gua の DNA 中の生成には2つのルートがあり (Fig. 2), この両ルートがほぼ同程度に寄与していると考えられる (Tajiri *et al.*, 1995). 2-OH-Ade の場合, DNA 中での生成が相対的に少ないことから, 生成した 2-OH-dATP の DNA ポリメラーゼによる取り込み (ルート 2) が重要な経路であると考えられる。

我々は, また, 2-OH-Ade が Fe<sup>2+</sup>-EDTA-O<sub>2</sub> 処理だけでなく, 腎発癌物質であるニトリロ三酢酸 (NTA) と Fe<sup>2+</sup> との錯体の系 (Fe<sup>2+</sup>-NTA-O<sub>2</sub>) でも生成することを見出している (Murata-Kamiya *et al.*, 未発表データ)。

### 3.2. 2-OH-dATP の DNA ポリメラーゼによる取り込み

2-OH-Ade が DNA 中に生成する重要なルートであると考えられる, 2-hydroxy-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate (2-OH-dATP) の DNA ポリメラーゼによる取り込みを検討した。鎖長 10 のプライマーと鎖長 15 の鋳型 DNA を用い, 2-OH-dATP を基質として与えてプライマー鎖の伸長を行い, 2-OH-dATP が取り込まれるかどうかを検討したところ, 鋳型 DNA 中の T または C 残基に対しての取り込みが観察された (Fig. 4)。すなわち, 活性酸素により生ずる 2-OH-dATP は, DNA ポリメラーゼの基質となり, DNA 中に取り込まれることが明らかになった。

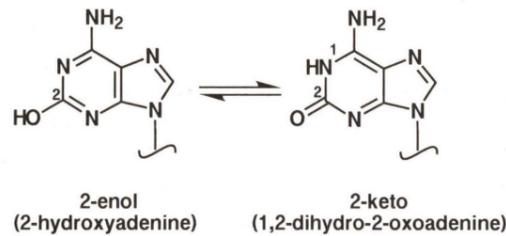


Fig. 3. Structure of 2-hydroxyadenine.

Table 3. Nucleotides incorporated opposite 2-hydroxyadenine *in vitro*.

Template	Sequence <sup>a)</sup>	DNA polymerase <sup>b)</sup>		
		pol $\alpha$	pol $\beta$	KF <sup>exo</sup>
1	5'GCTA*ATATCCGTCAT	T>A	A>T	T>A>G
2	5'GCGA*ATATCCGTCAT	T>C>A~G	T>C	T>A>G>C
3	5'GCCA*ATATCCGTCAT	T>G>C>A	T>G>C	T>G>A>C
4	5'GCAA*ATATCCGTCAT	T>C~A~G	T>C	T>G~A>C
5	5'GCGA*CTATCCGTCAT	T>C>A	T>C	T>G>A~C
6	5'GCTA*CTATCCGTCAT	T>A~C	T>C	T>G>A>C
7	5'GCGA*GTATCCGTCAT	T>C	T>C>A~G	T>G>A>C
8	5'GCTA*GTATCCGTCAT	T>C	T>C>A	T>G>A>C
9	5'GCGA*TTATCCGTCAT	T>C~G~A	T>C>G	T>G>A~C
10	5'GCTA*TTATCCGTCAT	T>C>G	T>C>G	T>G>C>A
11	5'CGTGA*CAATCTGAT	T>C>A	C>T	T>C
12	5'CGTTA*AATCTGAT	T>A	A>T	T>A>G

<sup>a)</sup> A\* represents 2-hydroxyadenine.

<sup>b)</sup> pol $\alpha$ , DNA polymerase  $\alpha$ ; pol $\beta$ , DNA polymerase  $\beta$ ; KF<sup>exo</sup>, exonuclease-deficient Klenow fragment of DNA polymerase I.

2-OH-dATP の T 及び C に対する DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  による取り込みの kinetic parameter を算出したところ, その比は T:C=4.5:1 となった (Kamiya and Kasai, 1995). すなわち, 2-OH-dATP は DNA 中に取り込まれる段階で, 変異を誘発する可能性が示唆された。

### 3.3 2-Hydroxyadenine の誘発するヌクレオチドのミスインコーポレーション

次に, 我々は, 2-OH-Ade が *in vitro* の系でヌクレオチドのミスインコーポレーションを誘発するかどうかを調べた。

鋳型 DNA として, 2-OH-Ade を含む 12 種類のオリゴヌクレオチドを合成した (Table 3). そのうちの 10 種は 2-OH-Ade の 5' 及び 3'-隣接塩基以外は同じである。各鋳型 DNA にプライマーをアニールさせ, 1 種類の基質 (dNTP, N=A, G, C, T) を加えた緩衝液中での DNA ポリメラーゼ (ポリメラーゼ  $\alpha$  及び  $\beta$ , クレノー

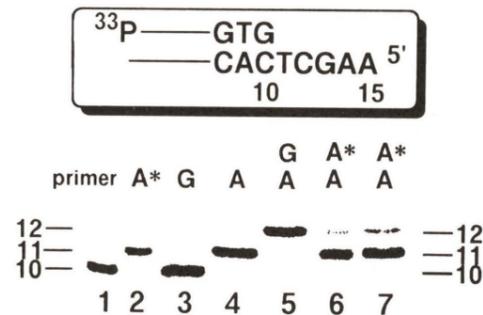


Fig. 4. Incorporation of 2-hydroxy-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate (2-OH-dATP) into DNA fragment. A primer (10 mer) was annealed with a template, and dNTP(s) and DNA polymerase  $\alpha$  were added. Reactions were carried out at 25°C for 60 min. Lane 1, untreated primer; lane 2, 50  $\mu$ M 2-OH-dATP; lane 3, 5  $\mu$ M dGTP; lane 4, 5  $\mu$ M dATP; lane 5, 5  $\mu$ M dATP plus 5  $\mu$ M dGTP; lane 6, 5  $\mu$ M dATP plus 50  $\mu$ M 2-OH-dATP; lane 7, 5  $\mu$ M dATP plus 100  $\mu$ M 2-OH-dATP.

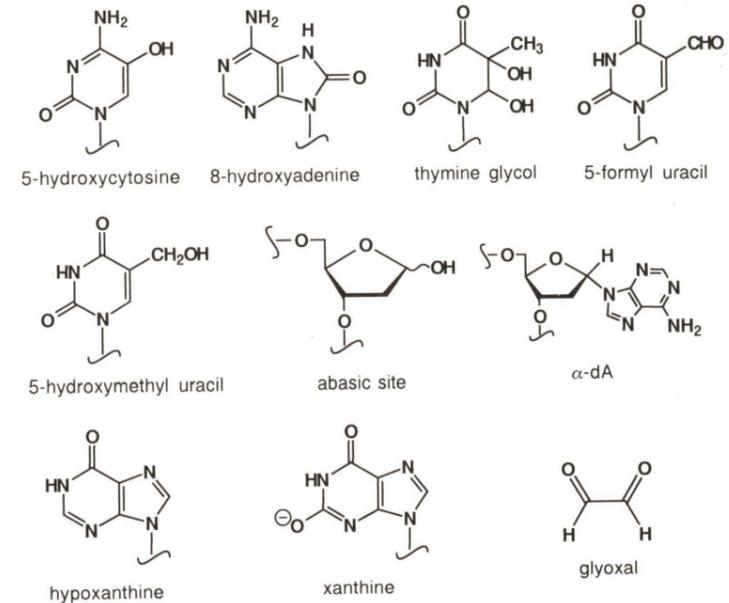


Fig. 5. Products obtained by treatment of DNA and nucleotides with reactive oxygen species or nitric oxide.

断片) によるプライマー伸長を観察した。dTMP 以外に取り込まれるヌクレオチドは用いた配列によって若干の違いがみられたが, 全体的には (1) ポリメラーゼ  $\alpha$  と  $\beta$  では dTMP と dCMP が, (2) クレノー断片では dTMP と dGMP が取り込まれる傾向にあった (Table 3)。配列 1 と 12 の場合, すなわち, (3) 5' TA\*A 3' (A\* = 2-OH-Ade) 配列中の 2-OH-Ade に対しては dAMP が取り込まれることが明らかになった (Kamiya *et al.*, 1995d; Kamiya and Kasai, 1996)。

また, 配列 1 と 11 を鋳型 DNA とし, 4 種類の dNTP を用いたポリメラーゼ反応で得られた完全鎖長産物を解析したところ, 配列 1 (TA\*A 配列) では dAMP の取り込みが, 配列 11 では dCMP の取り込みが観察された (Kamiya *et al.*, 1995d; Kamiya and Kasai, 1996)。

以上の結果から, 2-OH-Ade はヌクレオチドのミスインコーポレーションを誘発することが明らかになった。我々は, この結果を踏まえて, 2-OH-Ade の大腸菌及び培養細胞における誘発変異を解析しているが, その結果, 2-OH-Ade は 8-OH-Gua と同程度 (約 0.5%) に変異を誘発することがわかった (Kamiya and Kasai, 未発表データ)。また, その変異スペクトルは, おおむね *in vitro* の結果と一致するものであった。

### 3.4 予想される 2-OH-Ade の生成による G·C→A·T 変異

既に述べたように, 2-OH-Ade の場合は, dATP の酸化とその酸化ヌクレオチドの DNA への取り込みが重要であると思われる。3.2 で述べたように, 2-OH-dATP の取り込みの際に “誤った” 位置に挿入されるのは, 数分の一程度の確率で生ずると推定している (kinetic parameter の比が T:C=4.5:1)。一方, DNA 中の 2-OH-Ade が “誤った” ヌクレオチドを取り込む確率は, 百分

の一〜数百分の一であった。2-OH-dATP の取り込みの際の “誤り” と鋳型 DNA 中の 2-OH-Ade の引き起こす “誤り” を比較すると, 2-OH-dATP によって変異が誘発されるには, 鋳型 DNA の C に対して取り込まれた 2-OH-Ade が T (dTMP) と塩基対を形成するルートの方がその逆よりも確率が高いと推定できる。すなわち, 2-OH-dATP が引き起こす変異としては, G·C→A·T 変異が主要なものであると考えている。

### 4. 他の酸化的 DNA 損傷の誘発する変異

活性酸素によって生ずる DNA 損傷には, 上記の他に様々なものが報告されている。その例を Fig. 5 に示した。また, 活性酸素関連化合物に一酸化窒素 (NO) があるが, NO は核酸塩基に対して作用し, 脱アミノ反応を促進する (Nguyen *et al.*, 1992)。つまり, C から U (5-methylC から T) が, G から xanthine が, A から hypoxanthine が生ずる。Fig. 5 に, xanthine 及び hypoxanthine の構造もあわせて示した。Table 4 には, それらの DNA 損傷の変異誘発能について現在までに得られている結果を示した。

最近, 我々は, DNA やヌクレオシドを活性酸素 (Fe<sup>2+</sup>-EDTA-O<sub>2</sub>) で処理すると, 糖部からジアルデヒド化合物である glyoxal (Fig. 5) が生ずることを見出した (Murata-Kamiya *et al.*, 1995)。その生成量は, 8-OH-Gua の約 20 倍であり, glyoxal が活性酸素による変異の誘発に大きく関与している可能性を示唆するものである。事実, glyoxal は変異原性があり (Murata-Kamiya *et al.*, 1995), その誘発変異は G·C 対を標的にしたものである (Murata-Kamiya *et al.*, 未発表データ)。

Table 4. Mutations by DNA lesions produced by reactive oxygen species and nitric oxide.

DNA lesions	System	Mutation	Reference
5-hydroxycytosine	<i>in vitro</i>	C→T, C→G	Purmal <i>et al.</i> , 1994a
	<i>E. coli</i>	C→T	Feig <i>et al.</i> , 1994
8-hydroxyadenine	<i>in vitro</i>	A→C, A→T	Kamiya <i>et al.</i> , 1995a
	<i>in vitro</i>	ND <sup>a)</sup>	Shibutani <i>et al.</i> , 1993
	<i>E. coli</i>	ND	Wood <i>et al.</i> , 1992
	NIH3T3 cells	A→G, A→T, (A→C)	Kamiya <i>et al.</i> , 1995a
thymine glycol	<i>E. coli</i>	T→C	Basu <i>et al.</i> , 1989
	<i>in vitro</i>	T→C (?) <sup>b)</sup>	Ono <i>et al.</i> , 1994
5-formyluracil	<i>E. coli</i>	ND	Levy <i>et al.</i> , 1991
5-hydroxymethyluracil abasic site	<i>E. coli</i>	abasic site→T	Lawrence <i>et al.</i> , 1990
	yeast	abasic site→G	Gibbs <i>et al.</i> , 1995
	NIH3T3 cells	G→A, flanking mutation	Kamiya <i>et al.</i> , 1993
	<i>in vitro</i>	A→T, A→G <sup>b)</sup>	Ide <i>et al.</i> , 1994
α-dA	<i>in vitro</i>	A→G	Ohtsuka <i>et al.</i> , 1985
	<i>in vitro</i>	A→G	Kamiya <i>et al.</i> , 1992c
hypoxanthine	<i>E. coli</i>	A→G	Hill-Perkins <i>et al.</i> , 1986
	NIH3T3 cells	A→G	Kamiya <i>et al.</i> , 1992a
	<i>in vitro</i>	G→A <sup>b)</sup>	Eritja <i>et al.</i> , 1986
	<i>in vitro</i>	G→A	Kamiya <i>et al.</i> , 1992c
xanthine	NIH3T3 cells	G→A	Kamiya <i>et al.</i> , 1992d

<sup>a)</sup> Not detected.

<sup>b)</sup> Insertion of a single nucleotide was observed.

## 5. 活性酸素の変異スペクトル

### 5.1. 自然突然変異

自然突然変異の原因の一つとして、活性酸素の関与が考えられている。大腸菌 *lacI* 遺伝子における塩基置換突然変異は G·C→A·T が約 50% を占め、次いで、G·C→T·A が多い (約 10%) (Schaaper and Dunn, 1991; Halliday and Glickman, 1991; Sargentini and Smith, 1994)。一方、*rpsL* 遺伝子においては、A·T→G·C (45%) と G·C→A·T (23%) が多く、*supF* 遺伝子においては、G·C→T·A (45%) と G·C→C·G (27%) が主要なものとなっている (Mo *et al.*, 1991; Akasaka *et al.*, 1992)。酵母 *SUP4-o* 遺伝子における自然突然変異としては、G·C→T·A (32%), G·C→A·T (24%), G·C→C·G (20%) の順となっている (Giroux *et al.*, 1988)。サル CV-1 細胞中の自然突然変異としては、シャトルベクターを用いて研究が行われ、G·C→A·T が約 50%, G·C→T·A が約 35% と報告されている (Hauser *et al.*, 1986; Keyse *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 1990)。また、チャイニーズハムスター CHO 細胞の染色体 DNA 中の *aprt* 遺伝子における自然突然変異は、G·C→A·T が約 80% であった (de Jong *et al.*, 1988)。さらに、トランスジェニックラットの肝臓から抽出された DNA 中の *lacI* 遺伝子の場合、G·C→A·T が 63%, G·C→T·A が 15% と報告されている (de Boer *et al.*, 1996)。

自然突然変異の原因としては活性酸素のみならず、アルキル化等の修飾も考えられる。従って、上記の結果は、生体内で自然に生じた活性酸素によるものとは断言できないが、少なくとも部分的には活性酸素の変異スペクトルが反映されているものと思われる。

### 5.2. 活性酸素によって生ずる変異

Loeb のグループは、*lacZα* 遺伝子を有するファージ DNA を種々の活性酸素発生系で処理し、その誘発する変異を調べている。その結果、G→C, C→T, CC→TT, G→T などが誘発されることを見出している (McBride *et al.* 1991, 1992; Tkeshelashvili *et al.*, 1991; Reid and Loeb, 1992, 1993)。また、赤坂・山本は *supF* 遺伝子を有するプラスミド DNA を Fe<sup>2+</sup>-EDTA-O<sub>2</sub> 等の処理を行い、G·C→C·G, G·C→T·A, G·C→A·T の誘発を検出している (Akasaka and Yamamoto, 1994a, 1994b, 1995)。これらの研究では、DNA 中の残基の直接的な酸化 (Fig. 2 のルート 1) を観察している。

細胞を処理した例としては、スーパーオキシドを産生するメナジオンで大腸菌を処理したものがあげられる (Ono *et al.*, 1995)。例数は少ないが、G·C→A·T, G·C→T·A 等が検出されている。また、シャトルベクターを導入した CV-1 細胞を過酸化水素で処理し、誘発された変異が報告されている (Moraes *et al.*, 1990)。G·C→A·T (58%), G·C→C·G (20%), G·C→T·A (19%) と報告されている。これらの場合は、DNA とヌクレオチドの酸化の両方を観察している (Fig. 2 のルート 1, 2)。

ミトコンドリアは、細胞内における活性酸素の源として知られている。ミトコンドリア DNA 及びミトコンドリア中のヌクレオチドは、活性酸素により絶えず攻撃されており、その変異スペクトルのほとんどすべてが、活性酸素由来のもと考えられる。ヒトのミトコンドリア DNA の変異スペクトルを正確に調べることは困難であるが、11 人のヒトのミトコンドリア DNA の全塩基配列の比較から、“ミトコンドリア・イブ” と呼ばれる仮想の女性 (ヒトの唯一の祖先?) から、どういふ変異が生

じたかが推定できる (Ozawa, 1995)。生じたと思われる変異の回数を推定すると、A·T→G·C (48%), G·C→A·T (34%) のトランジションが圧倒的である。ミトコンドリア DNA と核 DNA に生ずる変異は、様々な理由で同じではない可能性があるが、このことは大いに注目されるべきである。

G·C→A·T 変異が、ミトコンドリア DNA における変異、自然突然変異、活性酸素による変異 (細胞を処理した場合) のいずれにおいても主要なものとしてあげられていることは大いに注目に値する。

## 6. おわりに

以上、8-OH-Gua と 2-OH-Ade を中心として、酸化的 DNA 損傷と誘発する変異の関連について簡単に述べてきた。活性酸素によって誘発される変異に関わる“役者”はかなり出そろってきたかの感があるが、まだまだ“黒子”もいそうな気配である。たとえば、4.2 で述べた、G→C, CC→TT の原因となる DNA 損傷は未だ同定されていない。また、その他の変異についても、既知の損傷でどこまで説明できるのか等、詳細については未だ不明な点が多い。今後も、さらなる研究によって、変異の実体の解明が必要である。

## 参考文献

- Akasaka, S. and K. Yamamoto (1994a) Hydrogen peroxide induces G : C to T : A and G : C to C : G transversions in the *supF* gene of *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 500-505.
- Akasaka, S. and K. Yamamoto (1994b) Mutagenesis resulting from DNA damage by lipid peroxidation in the *supF* gene of *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **315**, 105-112.
- Akasaka, S. and K. Yamamoto (1995) Mutational specificity of the ferrous ion in a *supF* gene of *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **213**, 74-80.
- Akasaka, S., K. Takimoto and K. Yamamoto (1992) G : C→T : A and G : C→C : G transversions are the predominant spontaneous mutations in the *Escherichia coli supF* gene: an improved *lacZ (am)* *E. coli* host designed for assaying pZ189 *supF* mutational specificity, *Mol. Gen. Genet.*, **235**, 173-178.
- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens, *Science*, **221**, 1256-1264.
- Basu, A. K., E. L. Loecherer, S. A. Leadon and J. M. Essigmann (1989) Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7677-7681.
- Cabrera, M., Y. Nghiem and J. H. Miller (1988) *mutM*, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G·C→T·A transversions, *J. Bacteriol.*, **170**, 5405-5407.
- 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.
- Culp, S. J., B. P. Cho, F. F. Kadlubar and F. E. Evans (1989) Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**, 416-422.
- de Boer, J. G., H. Erfle, J. Holcroft, D. Walsh, M. Dyaico, S. Provost, J. Short, and B. W. Glickman (1996) Spontaneous mutants recovered from liver and germ cell tissue of low copy number *lacI* transgenic rats, *Mutation Res.*, **352**, 73-78.
- de Jong, P. J., A. J. Grososky and B. W. Glickman (1988) Spectrum of spontaneous mutation at the *APRT* locus of Chinese hamster ovary cells: an analysis at the DNA sequence level, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3499-3503.
- Eritja, R., D. M. Horowitz, P. A. Walker, J. P. Ziehler-Martin, M. S. Boosalis, M. F. Goodman, K. Itakura and B. E. Kaplan (1986) Synthesis and properties of oligonucleotides containing 2'-deoxynebularine and 2'-deoxyxanthosine, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 8135-8153.
- Feig, D. I., L. C. Sowers and L. A. Loeb (1994) Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6609-6613.
- Gibbs, P. E. M. and C. W. Lawrence (1995) Novel mutagenic properties of abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Biol.*, **251**, 229-236.
- Giroux, C. N., J. R. A. Mis, M. K. Pierce, S. E. Kohalmi and B. A. Kunz (1988) DNA sequence analysis of spontaneous mutations in the *SUP4-o* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 978-981.
- Halliday, J. A. and B. W. Glickman (1991) Mechanism of spontaneous mutation in DNA repair-proficient *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **250**, 55-71.
- Hauser, J., M. M. Seidman, K. Sidur, K. and K. Dixon (1986) Sequence specificity of point mutations induced during passage of a UV-irradiated shuttle vector plasmid in monkey cells, *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 277-285.
- Hill-Perkins, M., M. D. Jones and P. Karran (1986) Site-specific mutagenesis *in vivo* by single methylated or deaminated purine bases, *Mutat. Res.*, **162**, 153-163.
- Ide, H., T. Yamaoka and Y. Kimura (1994) Replication of DNA templates containing the α-anomer of deoxyadenosine, a major adenine lesion produced by hydroxyl radicals, *Biochemistry*, **33**, 7127-7133.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1995) Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases, *J. Biol. Chem.*, **270**, 19446-19450.
- 紙谷浩之, 葛西 宏 (1995) 活性酸素による 8-ヒドロキシグアニンの生成と生体との関わり: 変異誘発・発がん・修復, *衛生化学*, **41**, 307-319.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1996) Effects of sequence contexts on misincorporation of nucleotides opposite 2-hydroxyadenine, *FEBS Lett.*, **391**, 113-116.
- Kamiya, H., H. Miura, H. Kato, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1992a) Induction of mutation of a synthetic c-Ha-ras gene containing hypoxanthine, *Cancer Res.*, **52**, 1836-1839.
- Kamiya, H., K. Miura, H. Ishikawa, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1992b) c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions, *Cancer Res.*, **52**, 3483-3485.
- Kamiya, H., T. Sakaguchi, N. Murata, M. Fujimuro, H. Miura, H. Ishikawa, M. Shimizu, H. Inoue, S. Nishimura, A. Matsukage, C. Masutani, F. Hanaoka and E. Ohtsuka (1992c) *In vitro* replication study of modified bases in ras sequences, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2792-2795.
- Kamiya, H., M. Shimizu, M. Suzuki, H. Inoue and E. Ohtsuka (1992d) Mutation induced by deoxyxanthosine in codon 12 of a synthetic c-Ha-ras gene, *Nucleosides and Nucleotides*, **11**, 247-260.
- Kamiya, H., M. Suzuki and E. Ohtsuka (1993) Mutation spectrum of a true abasic site in codon 12 of a c-Ha-ras gene in mammalian cells, *FEBS Lett.*, **328**, 125-129.
- Kamiya, H., H. Miura, N. Murata-Kamiya, H. Ishikawa, T. Sakaguchi, H. Inoue, T. Sasaki, C. Masutani, F. Hanaoka, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1995a) 8-Hydroxyadenine (7,8-

- dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation *in vitro* DNA synthesis and mutations in NIH3T3 cells, *Nucl. Acids Res.*, **23**, 2893-2899.
- Kamiya, H., N. Murata-Kamiya, M. Fujimuro, K. Kido, H. Inoue, S. Nishimura, C. Masutani, F. Hanaoka and E. Ohtsuka (1995b) Comparison of incorporation and extension of nucleotides *in vitro* opposite 8-hydroxyguanine(7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene, *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 270-276.
- Kamiya, H., N. Murata-Kamiya, S. Koizume, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka, E. (1995c) 8-Hydroxyguanine(7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. Effects of sequence contexts on mutation spectra, *Carcinogenesis*, **16**, 883-889.
- Kamiya, H., T. Ueda, T. Ohgi, A. Matsukage and H. Kasai (1995d) Misincorporation of dAMP opposite 2-hydroxyadenine, an oxidative form of adenine, *Nucl. Acids Res.*, **23**, 761-766.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984a) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucl. Acids Res.*, **12**, 2137-2145.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984b) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion, *Gann*, **75**, 565-566.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984c) DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide, *Gann*, **75**, 841-844.
- Kasai, H., H. Tanooka and S. Nishimura (1984) Formation of 8-hydroxyguanine residue in DNA by X-irradiation, *Gann*, **75**, 1037-1039.
- Kasai, H., P. F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair, *Carcinogenesis*, **7**, 1849-1851.
- Kasai, H., S. Nishimura, Y. Toriumi, T. Itai and Y. Iitaka (1987) The crystal structure of 9-ethyl-8-hydroxyguanine, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 3799-3800.
- Keyse, S. M., F. Amaudruz and R. M. Tyrrell (1988) Determination of the spectrum of mutations induced by defined-wavelength solar UVB (313-nm) radiation in mammalian cells by use of a shuttle vector, *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5425-5431.
- Koizume, S., H. Kamiya, H. Inoue and E. Ohtsuka (1994) Synthesis and thermodynamic stabilities of damaged DNA involving 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in a ras-gene fragment, *Nucleosides and Nucleotides*, **13**, 1517-1534.
- Kouchakdjian, M., V. Bodepudi, S. Shibutani, M. Eisenberg, F. Johnson, A. P. Grollman and D. J. Patel (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxo-deoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn)·dA(anti) alignment at lesion site, *Biochemistry*, **30**, 1403-1412.
- Lawrence, C. W., A. Borden, S. K. Banerjee and J. E. LeClerc (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2153-2157.
- Levy, D. D. and G. W. Teebor (1991) Site directed substitution of 5-hydroxymethyluracil for thymine in replicating  $\phi$ X-174am3 DNA via synthesis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3337-3343.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature*, **355**, 273-275.
- McBride, T. J., B. D. Preston and L. A. Loeb (1991) Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals, *Biochemistry*, **30**, 207-213.
- McBride, T. J., J. E. Schneider, R. A. Floyd and L. A. Loeb (1992) Mutations induced by methylene blue plus light in single-stranded M13 mp2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6866-6870.
- Mo, J.-Y., H. Maki and M. Sekiguchi (1991) Mutational specificity of the dnaE173 mutator associated with a defect in the catalytic subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **222**, 925-936.
- Moraes, E. C., S. M. Keyse and R. M. Tyrrell (1990) Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis, *Carcinogenesis*, **11**, 283-293.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G·C→T·A transversions in simian kidney cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1122-1126.
- Murata-Kamiya, N., H. Kamiya, N. Iwamoto and H. Kasai (1995) Formation of a mutagen, glyoxal, from DNA treated with oxygen-free radicals, *Carcinogenesis*, **16**, 2251-2253.
- Nghiem, Y., M. Cabrera, C. G. Cupples and J. H. Miller (1988) The mutY gene: A mutator locus in *Escherichia coli* that generates G·C→T·A transversions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2709-2713.
- Nguyen, T., D. Brunson, C. L. Crespi, B. W. Penman, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3030-3034.
- Oda, Y., S. Uesugi, M. Ikehara, S. Nishimura, Y. Kawase, H. Ishikawa, H. Inoue and E. Ohtsuka (1991) NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1407-1412.
- Ohtsuka, E., S. Matsuki, M. Ikehara, Y. Takahashi and K. Matsubara (1985) An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions, *J. Biol. Chem.*, **260**, 2605-2608.
- Ono, A., T. Okamoto, M. Inada, H. Nara and A. Matsuda (1994) Nucleosides and nucleotides. 131. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxyuridine, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2231-2237.
- Ono, T., K. Negishi and H. Hayatsu (1995) Spectra of superoxide-induced mutations in the lacI gene of a wild-type and a mutM strain of *Escherichia coli* K-12, *Mutat. Res.*, **326**, 175-183.
- Ozawa, T. (1995) Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1271**, 177-189.
- Pavlov, Y. I., D. T. Minnick, S. Izuta and T. A. Kunkel (1994) DNA replication fidelity with 8-oxodeoxyguanosine triphosphate, *Biochemistry*, **33**, 4695-4701.
- Purmal, A. A., Y. W. Kow and S. S. Wallace (1994a) Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 72-78.
- Purmal, A. A., Y. W. Kow and S. S. Wallace (1994b) 5-Hydroxypyrimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3930-3935.
- Reid, T. M. and L. A. Loeb (1992). Mutagenic specificity of oxygen radicals produced by human leukemia cells, *Cancer Res.*, **52**, 1082-1086.
- Reid, T. M. and L. A. Loeb (1993) Tandem double CC→TT mutations are produced by reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3904-3907.
- Sargentini, N. J. and K. C. Smith (1994) DNA sequence analysis of  $\gamma$ -radiation (anoxic)-induced and spontaneous lacI<sup>d</sup> mutations in *Escherichia coli* K-12, *Mutat. Res.*, **309**, 147-163.
- Schaaper, R. M. and R. L. Dunn (1991) Spontaneous mutation in the *Escherichia coli* lacI gene, *Genomics*, **129**, 317-326.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1991) DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431-434.
- Shibutani, S., V. Bodepudi, F. Johnson and A. P. Grollman (1993) Translesional synthesis on DNA template containing 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyadenosine, *Biochemistry*, **32**, 4615-4621.
- Tajiri, T., H. Maki and M. Sekiguchi (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **336**, 257-267.
- Tkeshelashvili, L. K., T. McBride, K. Spence and L. A. Loeb (1991) Mutation spectrum of copper-induced DNA damage, *J. Biol. Chem.*, **266**, 6401-6404.
- Uesugi, S. and M. Ikehara (1977) Carbon-13 magnetic resonance spectra of 8-substituted purine nucleosides. Characteristic shifts for the syn conformation, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3250-3253.
- Wood, M. L., M. Dizdaroglu, E. Gajewski and J. M. Essigmann (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine(7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome, *Biochemistry*, **29**, 7024-7032.
- Wood, M. L., A. Esteve, M. L. Morningstar, G. M. Kuziemko and J. M. Essigmann (1992) Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids, Res.*, **20**, 6023-6032.
- Yanofsky, C., E. C. Cox and V. Horn (1966) The unusual mutagenic specificity of an *E. coli* mutator gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 274-281.

公開シンポジウム  
「突然変異誘発の調節機構」

## ヒトゲノム突然変異検出の方法と意義

### Mutation detection in human genome: methods and their applications

田平知子, 久木田洋児, 稲塚雅一, 林 健志

Tomoko Tahira, Yoji Kukita, Masakazu Inazuka  
and Kenshi Hayashi

九州大学遺伝情報実験施設ゲノム解析分野 812-82 福岡市東区馬出 3-1-1

Division of Genome Analysis, Institute of Genetic Information, Kyushu University  
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-82, Japan

(受付: 1996年11月15日; 受理: 1996年11月18日)

#### Summary

Mutation detection in the human genome will become increasingly important as the Human Genome Project progresses. The application of sequence data obtained by the Project to the prevention or treatment of disease requires genome information from individuals. We have been developing a sensitive mutation detection method, single strand conformation polymorphism analysis of PCR products (PCR-SSCP analysis). The sensitivity of PCR-SSCP is improved by adding glycerol to the gel containing the Tris-borate buffer. We found that the effect of glycerol is through the reduction of pH of the buffer. Based on this finding, we developed new buffer systems with a low pH (pH 6.8) that could allow discrimination of the mutation at a higher sensitivity. We also developed fluorescence-based PCR-SSCP using capillary electrophoresis by automated DNA sequencer. Samples were prepared by one-tube post-PCR fluorescent labeling of PCR products. The method uses the Klenow fragment of DNA polymerase I that exchanges the 3'-terminal residue of PCR-amplified DNA fragment for fluorescent nucleotides. This system is suitable for screening for mutation in many samples.

**Keywords:** PCR, SSCP, mutation

#### 1. はじめに

ヒトゲノム計画の進展はめざましく、21世紀初頭にはヒトゲノムの全塩基配列がおおよそ決定されると予測されている。全塩基配列は複数のヒトの遺伝情報をつなぎあわせたものであるが、それをもとにして個人の配列の多様性や変異の有無を調べていくことがゲノム計画の次の段階となる。すでに種々の遺伝病について、ゲノム中で変異があるということを指標にして原因遺伝子が同定されてきた。また癌の発生に関与すると考えられる多数の癌遺伝子・癌抑制遺伝子について、突然変異のパターンが癌の病態とどのように関連しているかが精力的に研究されている。これらの研究は、ヒトの遺伝病や癌を診断し治療に役立つ、あるいは予防することを目指している。この目標を実現するためには多数試料の多くの領

域について遺伝子解析をおこない、しかも得られたデータを統合的に解釈する必要がある。ここでは、配列変化を検出するための解析技術について筆者らの研究を中心に述べ、さらに現在世界的に **Mutation Database** を構築して変異解析を有効に利用しようということが提唱されているので、その状況について述べる。

#### 2. 配列変化の検出法

今日のDNA解析技術を飛躍的に向上させたのはPCR法の開発である (Saiki *et al.*, 1988)。点突然変異のような微小な配列変化を検出する方法はすでに多数考えだされていたが、それにPCRを組み合わせることで、微量のサンプルで、簡便にしかも迅速に変異を検出できるようになった (Hayashi *et al.*, 1994)。

Table 1. PCR-based methods of mutation detection.

Mutation	Principle	Method
Known	Oligonucleotide hybridization <sup>a)</sup>	
	liquid phase	Allele-specific PCR
	solid phase	ASO (allele-specific oligonucleotide) hybridization
	Enzyme-based recognition	
	restriction enzyme	RFLP (restriction fragment length polymorphism)
Unknown, Known	Detection of heteroduplex	
	Electrophoretic mobility	Heteroduplex analysis
	Thermal stability	DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)
	Modification of mismatch	Chemical mismatch cleavage Enzymatic mismatch cleavage
	Detection of change in ssDNA	
	Conformation	SSCP (single strand conformation polymorphism)
	Sequence	Direct sequencing
	Protein-level assay	
	Interruption of ORF	PTT (protein truncation test)

<sup>a)</sup> Sequencing by hybridization using chip technology can detect unknown mutations.

変異検出法は既知の変異のみを検出する方法と、既知および未知の変異を検出する方法とに大別される。変異検出の原理も多様である (林, 1996)。その主なものを Table 1 に示した。

既知の変異を検出する方法の代表的なものとしては oligonucleotide hybridization 法がある。この方法は oligonucleotide probe とサンプル (PCR 産物) との特異的結合を検出するもので、hybridization の条件を厳密に調整することにより、ミスマッチを含む配列を区別する。この方法は電気泳動を必要としないというメリットがあり自動化に適している。近年、半導体のチップ生産技術を応用して可能性のあるすべての配列の oligonucleotide をチップ上に合成し、蛍光標識した PCR 産物と hybridization させることによりすべての変異を検出する方法も開発されている (Chee *et al.*, 1996)。

未知の mutation を検出する方法も多数開発されている。その主なものを原理によって分類すると次のようになる。

ミスマッチをもつ 2 本鎖核酸である heteroduplex は完全に塩基対を形成した 2 本鎖核酸と物理化学的性質が異なる。この heteroduplex を検出する方法としては、高次構造の差をゲル電気泳動で検出する heteroduplex analysis、熱安定性の差を変性密度勾配ゲル電気泳動で検出する DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法がある。またミスマッチ部位に特異的に反応する化学試薬や酵素を利用して heteroduplex を切断し、ゲル電気泳動で短くなった断片を検出するのがミスマッチ切断法である。

1 本鎖 DNA について、折り畳まれ方による高次構造の差を電気泳動により検出するのが SSCP (single strand conformation polymorphism) 法であり、これについてはあとで詳しく述べる。

巨大な蛋白質をコードする遺伝子については変異を検索するのが容易でないで、その ORF をいくつかの部

分に分けて、T7 プロモーターを付加したプライマーで増幅したあと、*in vitro* での転写、翻訳によりタンパク質として発現させ SDS-PAGE によりサイズを調べる方法もよく使われる。これは protein truncation test と呼ばれ、大きな遺伝子におけるナンセンス変異やフレームシフト変異を検出するのに有効な方法である。

### 3. PCR-SSCP 法

#### 3.1. 原理

SSCP 法は未知の配列変化を検出する方法のなかで最も操作が簡便であり、多数サンプルの解析にも向いており、種々の疾患や癌での突然変異の検出に役立ってきた (Orita *et al.*, 1989; Hayashi *et al.*, 1993)。PCR-SSCP 法では、標識した PCR 産物を変性剤である formamide 溶液で希釈したあと加熱変性して 1 本鎖にし、これを変性剤を含まない polyacrylamide ゲル中での電気泳動によって分離する。1 本鎖 DNA は非変性ゲル内で分子内相互作用によって折り畳まれた高次構造をとって移動する。変異配列は多くの場合正常配列と異なる高次構造をとるので電気泳動で異なった移動度を示すようになる。したがってオートラジオグラフィで現われたバンドの移動度が正常コントロールのバンドと比べてシフトした場合に、そのバンドは変異配列であると判定できる。これらのバンド (正常および変異配列) のそれぞれを切り出して再び PCR で増幅し、直接塩基配列決定を行うことにより、配列がどこで変わっているかを調べることも可能である (Suzuki *et al.*, 1991)。

#### 3.2. 配列変化の検出感度

1 本鎖 DNA を非変性条件下で電気泳動した場合の折り畳まれ方、及びその移動度はいまのところ理論的には予想できない。したがって SSCP 法での変異検出感度は経験的にのみ推定される。検出感度は、電気泳動条件および PCR 産物の配列に大きく影響される。我々は通常、<sup>32</sup>P で標識した PCR 産物をシーケンスゲルと同じサイ

ズ (40×30×0.03 cm) のスラブゲルにより分離している。我々の経験では調べようとする PCR 産物のサイズが 300 bp 以下の場合の検出感度は約 80% であり、さらに大きい断片を解析する場合には感度が低下する (Hayashi *et al.*, 1993)。このように SSCP 法での変異検出感度は 100% ではないので、未知の変異を検索する場合 false-negative がある可能性を考慮する必要がある。

### 4. SSCP 解析の高感度化

#### 4.1. glycerol 添加効果の解析

通常 SSCP 解析は 0.5×TBE buffer (Tris/boric acid/EDTA) でおこなうが、このときにゲルに glycerol を加えると分離が良くなる (Hayashi *et al.*, 1993)。しかし、glycerol が効果的である理由は不明であった。0.5×TBE buffer に含まれる boric acid は glycerol と反応してより酸性の complex を形成することが知られている。我々は boric acid を含まない buffer 系、TAE (Tris/acetic acid/EDTA)、0.5×TTE (Tris/taurine/EDTA) を用いた場合、5% glycerol をゲルに添加することにより 1 本鎖 DNA の泳動パターンに影響をうけるかどうかを検討した。PCR 産物は腫瘍細胞 DNA から p53 遺伝子の exon 5, 7, 8 領域を増幅したものをを用いた。0.5×TBE buffer を用いた場合は glycerol を加えることにより分離が顕著に良くなった。TAE, 0.5×TTE buffer を用いた場合には、glycerol の添加によってパターンはほとんど変化しなかった。TAE で泳動した場合のパターンは glycerol を添加した 0.5×TBE (以下、0.5×TBE + glycerol と表記) でのパ

Table 2. Effect of glycerol on pH of electrophoresis buffer.

Glycerol (%)	pH of buffer		
	0.5×TBE	1×TAE	0.5×TTE
0	8.4	8.1	8.8
5	7.7	7.9	8.7

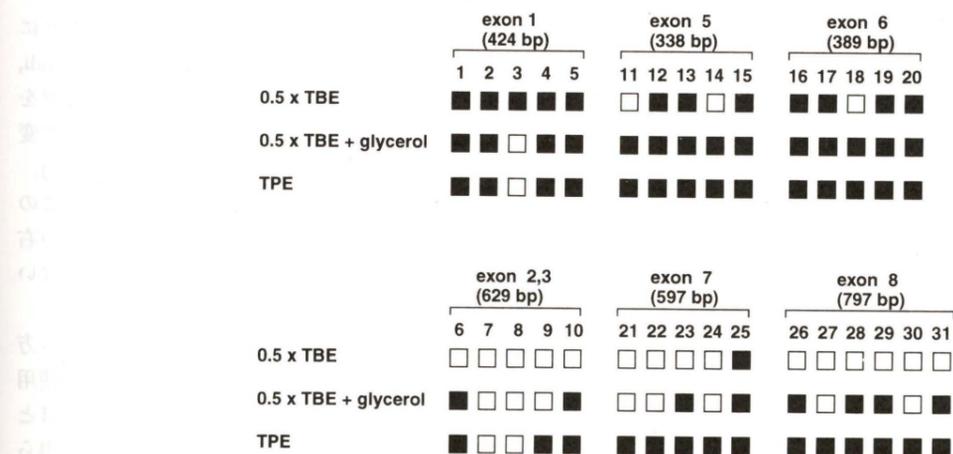


Fig. 1. PCR-SSCP analysis of factor IX gene.

Each exon was amplified from DNA obtained from hemophilia B patients, which were numbered from 1 to 31. Electrophoretic conditions were as indicated on the left. The filled box indicates significant mobility shift, and open box indicates subtle or no mobility shift.

ターンと、また 0.5×TTE でのパターンは 0.5×TBE でのパターンと類似していた。使用した buffer の pH を測定し、Table 2 に示した。glycerol 添加により 0.5×TBE buffer では pH が低下したが、0.5×TTE, TAE buffer では pH は変わらなかった。これは、acetic acid, taurine は glycerol と反応しないためであろう。興味深いことに、分離が良かった 0.5×TBE + glycerol, TAE の buffer 系はその他の buffer 系に比べて pH が低かった (Table 2)。以上の結果より、glycerol は 0.5×TBE buffer 中の boric acid と反応することにより buffer の pH を下げる効果によって SSCP 解析での 1 本鎖 DNA の分離を向上させると考えた。

#### 4.2. low pH buffer を用いた高感度 SSCP

0.5×TBE + glycerol よりさらに pH の低い buffer を用いて、SSCP 解析の高感度化を試みた。モデル系として、血液凝固因子 factor IX 遺伝子のそれぞれ異なる位置に点突然変異があることがわかっている 31 人の血友病患者 DNA の PCR-SSCP 解析を行った (Kukita *et al.*, in preparation)。0.5×TBE, 0.5×TBE + glycerol のほかに、より pH の低い新しい buffer 系として Tris/PIPES/EDTA, pH 6.8 (以下 TPE と略す) を作製した。これら 3 つの buffer 条件で泳動を行い、各サンプルについて正常コントロールに比べて移動度が変わっているかどうかを判定した。その結果を Fig. 1 で模式的に示す。変異を検出できたサンプルを黒塗りして示してある。上段に示した 338-424 bp の PCR 産物では 0.5×TBE でも比較的効率よく変異が検出されたが、多くの場合移動度の変化は微妙であり判別しにくかった。0.5×TBE + glycerol, TPE を用いた場合には 90% 以上の変異が検出されしかも分離も良かった。一方下段に示した 597-797 bp の PCR 産物については 0.5×TBE を用いた場合には 1/16 しか変異を検出できなかったが、0.5×TBE + glycerol では 8/16, TPE では 15/16 の変異が検出された。これまでの 0.5

×TBE+glycerolの条件では300 bp以上のPCR産物のSSCP解析は感度が低いため実用的でなかった。今回TPEのようにpHの低いbufferを用いる、このlow pH SSCPにより500 bp以上のPCR産物における変異を調べることが可能となった。遺伝子の広範囲にわたって変異を検索する場合には通常オーバーラップのある複数の増幅単位(amplicon)を設定しPCR-SSCP解析を行うが、low pH SSCPによりampliconのサイズを大きくすればampliconの数は減らすことができるのでより効率的に変異を検索できる。

#### 4.3. 末端平滑化による高感度化

ゲノムDNAから増幅したPCR産物をSSCP解析した場合にはバンドの数は多くても4本になるはずである。しかし実際には4本以上のバンドがでることも多い。この原因としては1) 1本鎖DNAが複数のconformationをとる。2) PCR産物の末端構造が均一でない。すなわちTaq DNA polymeraseにより3'末端に鋳型非依存的に1塩基が付加された産物が混在している、3) 過剰に存在するプライマーが1本鎖DNAと再会合したバンドが現われる、の3つの可能性が考えられる。このような余分なバンドが出現することは解析結果の解釈を困難にする場合もある。DNA polymerase IのKlenow fragmentでPCR反応後の産物を処理することにより、1塩基付加産物から突出塩基を除去することと過剰に存在するプライマーを分解することが同時に行える。我々はPCR反応後にKlenow fragmentを加えて15分間反応させる処理により、余分なバンドが消えて解釈がしやすくなることを見出した。

### 5. 蛍光自動シーケンサーを用いたSSCP法

#### 5.1. 蛍光PCR-SSCP法の利点

SSCPの高感度化のための別のアプローチとしてわれわれは蛍光自動シーケンサーを用いたSSCP法を開発している。蛍光自動シーケンサーを用いたフラグメント解析は、1) ラジオアイソトープを用いない、2) 泳動およびデータの取り込みが自動化されており大量のサンプルを解析することが可能となる、3) 検出感度がよく、しかも定量的である、等の長所がある。

#### 5.2. 蛍光ポストラベル法

今まで開発された蛍光SSCP法では蛍光プライマーが用いられたが、そのために新たにプライマーを合成しなくてはならず、また蛍光プライマーは合成コストがかかるという問題があった。そこで我々は、one-tubeでできる簡便なポストラベル法を開発した(Inazuka *et al.*, 1996)。

この方法は、通常のプライマーを用いてPCRを行なった反応液に蛍光標識ヌクレオチドおよびKlenow fragmentを加えることにより、3'末端の交換反応により蛍光標識を行なう。過剰の蛍光標識ヌクレオチドはalkaline phosphataseを添加して分解する。以上のすべて

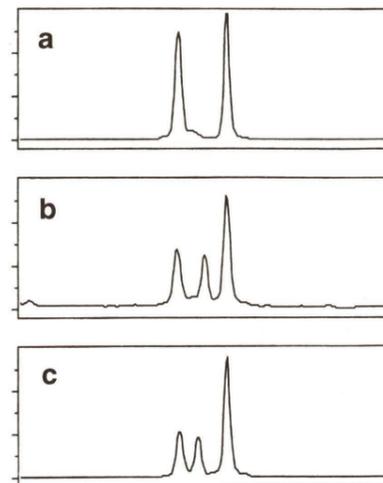


Fig. 2. SSCP analysis of postlabeled PCR products of *p53* exon 8 in capillary electrophoresis.

Exon 8 of *p53* was amplified by PCR from genomic DNA of THP-1 (a), Namalwa (b), and Daudi (c) cells, post-labeled with R6G-dUTP, treated with phosphatase, and analyzed by capillary electrophoresis under SSCP conditions at 30°C.

の反応はone-tubeでできるので、多数のサンプルでも処理しやすく、人為的誤りも起きにくい。また標識された配列は1塩基突出がなく均一なのでピークの解釈が容易になる。

#### 5.3. キャピラリー電気泳動によるSSCP解析

PCR産物を蛍光ポストラベルし、キャピラリー式の蛍光自動シーケンサーでSSCP解析を行った例をFig. 2に示す。これは*p53*遺伝子のエクソン8領域を、Aを5'末端にもつプライマーで増幅したあと、rhodamine系色素で標識されたR6G-dUTPによりポストラベルし、phosphatase処理後にSSCP条件でキャピラリー電気泳動を行ったものである。鋳型としてはTHP-1, Daudi, Namalwa細胞のDNAを用いた。THP-1細胞ではこの領域に変異がないので、正常配列の2本鎖のそれぞれに由来するピークが検出されている(Fig. 2a)。Daudi, Namalwa細胞は片側のalleleにexon 8の点突然変異をもつ。これらを解析した結果、正常型と異なる位置に変異allele由来の第3のピークが検出された(Fig. 2b, c)。DaudiとNamalwaでは異なる変異をもつので、このピークの位置は異なっていた。いちばん移動度の遅い右側のピークは正常配列と変異配列の両方が分離されないで1本になったものと考えられる。

このキャピラリー電気泳動装置は従来のスラブゲル方式とはまったく異なるlinear polymerを担体として使用しておりSSCP解析の検出感度も良い。また操作のほとんどが自動化されているため再現性のよいデータが得られる。したがって多くの検体について配列変化をSSCP解析で検出するのに有用であると思われる。

### 6. Mutation Database

膨大な配列変化の情報が蓄積してくるにつれ、その情報をいかにして研究や医学の進歩に役立てやすい形にして公開するかということが重要になってくる。遺伝病やがんでのmutationはこれまでOMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)に登録されてきた。これはJohns Hopkins大学のMcKusick博士が遺伝病とヒト遺伝子についてまとめてきたデータをオンライン化したものであり、現在はアメリカのNCBIよりインターネットに公開されている。しかし、最近是非常に多くのmutationが検出されているため、登録が追いついていない状況である。特定の遺伝子、例えば*p53*遺伝子等については研究しているグループがmutation databaseを作り公開している(Hollstein, *et al.*, 1996)。しかしその他の膨大なmutationデータの受け皿がないため、最新の情報をとりやすい使いやすいdatabaseの構築が必要となっている。現在Cotton博士らが提唱しているシステムは、それぞれの遺伝子についてcuratorという担当者が責任をもってデータを取りまとめ、locus-specific databaseをつくり、それぞれのデータベースを物理的地図や塩基配列データを集めたcentral databaseにリンクさせるというものである。mutationデータをどのような統一された形式で入力するかなど解決すべき問題点も多く、協議がおこなわれている。

### 7. おわりに

ヒト遺伝子の多様性の解析はその情報量が膨大であるために技術的にも、また情報処理の面でも非常に多くの解決すべき問題がある。またここでは述べなかったが、

たとえば遺伝情報が差別につながりかねないという倫理面での問題もある。遺伝子解析は全世界的に行われているプロジェクトであり、それが有意義なものとして発展するために何が必要であるか今後も考えていきたい。

### 参考文献

- Chee, M., R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris and S. P. A. Fodor (1996) Accessing genetic information with high-density DNA arrays, *Science*, **274**, 610-614.
- Inazuka, M., T. Tahira and K. Hayashi (1996) One-tube post-PCR fluorescent labeling of DNA fragments, *Genome Res.*, **6**, 551-557.
- Hayashi, K. (1994) Manipulation of DNA by PCR, In: K. B. Mullis *et al.* (Eds.) *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser, Boston, pp. 3-13.
- Hayashi, K. and Yandell, D. W. (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Human Mutation*, **2**, 338-346.
- 林 健志 (1996) DNA診断の基礎, 蛋白質核酸酵素, **41**, 2478-2483.
- Hollstein, M., B. Shomer, M. Greenblatt, T. Soussi, E. Hovig, R. Montesano and C. C. Harris (1996) Somatic point mutations in the *p53* gene of human tumors and cell lines: updated compilation, *Nucl. Acids Res.*, **24**, 141-146.
- Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya and K. Hayashi (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction, *Genomics*, **5**, 874-879.
- Saiki, R., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. Mullis and H. A. Ehrlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, *Science*, **239**, 487-491.
- Suzuki, Y., T. Sekiya and K. Hayashi (1991) Allele-specific polymerase chain reaction: A method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants, *Anal. Biochem.*, **192**, 82-84.

## 米国 NTP 化学物質安全性データ

米国では、1980 年来、既知化学物質の安全性を評価するため、国内外の公立あるいは民間の研究所の協力によって、いわゆる国家毒性計画事業 (NTP) を推進してきた。各種の変異原性試験の結果の詳細については、既に Mutation Research あるいは米国の EMS 学会誌 Environmental and Molecular Mutagenesis などに報告されてきた。これらの結果は、発がん性の有無と相関を議論するよき材料であるのみならず、種々の短期試験法を評価する上で極めて貴重なデータである。

この度、社団法人・日本化学物質安全・情報センター (JETOC) では、機関誌「情報 B」(10月号) に上記 NTP に基づいて 1993 年度および 1994 年度に行われた約 340 種類の変異原性試験結果の一覧表並びに発がん性試験結果 (インターネットより) との比較に関する記事を掲載した。これらの情報は、本学会の会員にとっても誠に貴重な情報であると判断し、JETOC の了承を得てここに紹介する。

編集委員会 (文責 石館 基)

### 1. 遺伝子毒性・短期試験 (NTP ANNUAL PLAN—FY 1994, 1995)

(JETOC 註: 上記出典から 1993 年度、1994 年度に行われた約 340 物質の遺伝子毒性試験結果を、また ANNUAL PLAN—FY 1995 に掲載されていた遺伝子毒性短期試験の簡単な案内文を下記に紹介します。)

NTP (米国々家毒性試験プログラム) の短期試験はその物質のヒト発がん性または遺伝子有害性を特定するために、また発がん性、変異原性、遺伝子毒性に関する基礎的研究のために行なわれている。

#### サルモネラ復帰突然変異試験 (Salmonella Reversion Assays)

当該化学物質は標準プロトコルに基づき 2 つの試験所において *Salmonella typhimurium* 変異原性試験が行なわれる。試験される化学物質は、NTP 省庁間委員会から候補として選ばれた物質または、構造等で毒性が疑われた物質である。8 つのサルモネラ株 (TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537, TA1538) がエームス試験のプレインキュベーション法で使われる。揮発性物質およびガス状物質はデシケータ中で試験される。外来性代謝活性化は Sprague-Dawley ラットおよび Syrian ハムスターへの Aroclor 1254 ばく露後の肝臓調整物により得られる。試験はその化学物質が TA98 または TA100 に対して変異原性であればそれ以上の菌株による試験は行なわれない。

#### In vitro 細胞遺伝学的試験 (In Vitro Cytogenetics Testing)

培養チャイニーズ・ハムスター由来卵巣細胞株を用いて化学物質の染色体異常誘発を調べる。同細胞株による姉妹染色分体交換誘発試験は、膨大な化学物質の遺伝子毒性を調べるうえで、資源有効利用の点で適当ではない、ということから研究の初期の段階で短縮することが結論された。試験は S9 による代謝活性化した場合としない場合に分けて行なわれる。試験実施は 1 つの研究所に依頼している。染色体異常試験は *in vivo* に譲り日常的な試

験からは外されている。しかし、*in vitro* による染色体異常試験が必要である物質については試験が行なわれる。

#### In vivo 細胞遺伝学的試験 (In Vivo Cytogenetics Testing)

化学物質は投与したラット、マウスの骨髓細胞でその染色体異常、小核形成を調べる。通常、骨髓染色体異常試験は省略され、小核試験に力を入れている。小核試験は当該化学物質の発がん性、生殖毒性、胚細胞変異原性等々の評価に使われる。しかし可能であれば、マウスの小核形成の評価は短期試験 (90 日以内) 雌雄マウスの末梢血で行なわれる。使う動物数を減らすことにも、実験の有効な利用にもなる。

#### 肝細胞/DNA 修復機能試験 (Primary Hepatocyte/DNA Repair System)

肝細胞/DNA 修復機能研究は化学物質の毒性、変異原性の評価、および *in vitro* 代謝経路の研究ツールとして用いられる。この手法により得られるデータは発がん性を予測する上で、適当な確実性と感受性が認められている。

- 表-1 サルモネラによる変異原性試験 (1993 年度)
- 表-2 サルモネラによる変異原性試験 (1994 年度)
- 表-3 小核試験: 骨髓細胞, 末梢血液中 (*in vivo*) (1993 年度)
- 表-4 小核試験及び染色体異常試験: 骨髓細胞中 (*in vivo*) (1994 年度)
- 表-5 小核試験: 末梢血赤血球中 (*in vivo*) (1994 年度)

### 2. NTP: 変異原性試験結果と発がん性試験結果の比較—インターネットから—

NTP はその目的のために、化学物質の遺伝子毒性試験とげっ歯類による 2 年間発がん性試験を実施しています。発がん性を予測する手段としての変異原性試験と発がん性試験結果の比較は興味深いものです。

NTP は遺伝子毒性の短期試験を、サルモネラ菌、チャ

イニーズ・ハムスター卵巣細胞, マウスリンパ腫細胞を用いて行なっていますが, サルモネラによる変異原性試験と発がん性試験の結果を比較分類した情報を入手しましたので紹介します。

Genotoxicity Carcinogenicity  
in vitro (Salmonella) Carcinogenesis Study 2-year

表-1 Negative Negative

表-2 Negative Positive in at least one sex of the rodent species in the carcinogenesis study

表-3 Positive Negative in both rodent species in the carcinogenesis study

表-4 Positive Positive in only one rodent species in the carcinogenesis study

表-5 Positive Positive in at least one sex of both rodent species in the carcinogenesis study

表-6 Positive Positive in both sexes of all rodent species tested in the carcinogenesis study

表-1 サルモネラによる遺伝子毒性試験 (in vitro) 及び2年間発がん性試験のいずれも陰性であった物質のリスト  
Negative in both genotoxicity in vitro (Salmonella) tests and the 2-year carcinogenesis study

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
1	394	Acetaminophen	103-90-2	-	Dosed-Feed	NE	EE	NE	NE
2	050	Acetohexamide	968-81-0	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
3	447	Acetonitrile	75-05-8	-, -	Inhalation	EE	NE	NE	NE
4	136	Aldicarb	116-06-3	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
5	318	Ampicillin trihydrate	7177-48-2	-	Gavage	EE	NE	NE	NE
6	104	Anilazine	101-05-3	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
7	036	o-Anthranilic acid	118-92-3	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
8	038	Aroclor 1254	27323-18-8	-	Dosed-Feed	E	E		
9	247	l-Ascorbic acid	50-81-7	+W, -	Dosed-Feed	N	N	N	N
10	432	Barium chloride dihydrate	10326-27-9	-	Dosed-Water	NE	NE	NE	NE
11	438	Benzethonium chloride	121-54-0	-	Topical	NE	NE	NE	NE
12	204	Benzoin	119-53-9	-, -, +W	Dosed-Feed	N	N	N	N
13	431	Benzyl acetate	140-11-4	-	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
14	343	Benzyl alcohol	100-51-6	-	Gavage	NE	NE	NE	NE
15	215	Bisphenol a	80-05-7	-, -, -	Dosed-Feed	E	N	N	N
16	324	Boric acid	10043-35-3	?, -	Dosed-Feed		NE	NE	NE
17	406	gamma-Butyrolactone	96-48-0	-	Gavage	NE	NE	EE	NE
18	312	n-Butyl chloride	109-69-3	-, -	Gavage	NE	NE	NE	NE
19	150	Butylated hydroxytoluene	128-37-0	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
20	459	t-Butylhydroquinone	1948-33-0	?, -	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
21	211	C. I. acid orange 10	1936-15-8	-, ?	Dosed-Feed	N	N	N	N
22	220	C. I. acid red 14	3567-69-9	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
23	214	Caprolactam	105-60-2	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
24	173	Carbromal	77-65-6	-, -	Dosed-Feed	N	N	N	N
25	381	d-Carvone	2244-16-8	-	Gavage			NE	NE
26	379	2-Chloroacetophenone	532-27-4	-	Inhalation	NE	EE	NE	NE
27	261	Chlorobenzene	108-90-7	-, -	Gavage	E	N	N	N
28	158	2-Chloroethyltrimethylammoniumchloride	999-81-5	-, -	Dosed-Feed	N	N	N	N
29	145	3-Chloro-p-toluidine	95-74-9	-, +W	Dosed-Feed	N	N	N	N
30	317	Chlorpheniramine maleate	113-92-8	-	Gavage	NE	NE	NE	NE
31	045	Chlorpropamide	94-20-2	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
32	096	Coumaphos	56-72-4	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
33	242	Diallyl phthalate	131-17-9	-, -	Gavage			E	E
34	284	Diallyl phthalate	131-17-9	-, -	Gavage	NE	EE		
35	030	Diarylanilide yellow	6358-85-6	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
36	137	Diazinon	333-41-5	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
37	183	Dibutyltin diacetate	1067-33-0	-	Dosed-Feed	N	IS	N	N
38	255	1,2-Dichlorobenzene	95-50-1	-	Gavage	N	N	N	N
39	123	2,6-Dichlorodibenzo-p-dioxin	33857-26-0	-	Dosed-Feed	N	N	E	N
40	131	Dichlorodiphenyltrichloroethane	50-29-3	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
41	066	1,1-Dichloroethane	75-34-3	-	Gavage	N	E	N	E
42	353	2,4-Dichlorophenol	120-83-2	-	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
43	056	N,N'-Dicyclohexylthiourea	1212-29-9	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
44	021	Dieldrin	60-57-1	-	Dosed-Feed	N	N	E	N
45	022	Dieldrin	60-57-1	-	Dosed-Feed	N	N		

表-1 (つづき)

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
46	310	Diesel fuel marine		-	Topical			EE	EE
47	429	Diethyl phthalate	84-66-2	-, -	Topical	NE	NE	EE	EE
48	121	Dimethyl terephthalate	120-61-6	-	Dosed-Feed	N	N	E	N
49	355	Diphenhydramine hydrochloride	147-24-0	-	Dosed-Feed	EE	EE	NE	NE
50	132	2,5-Dithiobiurea	142-46-1	-	Dosed-Feed	N	N	N	E
51	043	Emetine hydrochloride	483-18-1	-	Intraperito	IS	IS	IS	IS
52	062	Endosulfan	115-29-7	-	Dosed-Feed	IS	N	IS	N
53	012	Endrin	72-20-8	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
54	307	Ephedrine sulfate	134-72-5	-	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
55	338	Erythromycin stearate	643-22-1	-	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
56	046	Ethionamide	536-33-4	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
57	152	Ethyl tellurac	20941-65-5	-, -	Dosed-Feed	E	N	E	E
58	413	Ethylene glycol	107-21-1	-	Dosed-Feed			NE	NE
59	011	Ethylenediaminetetraacetate trihydrate	150-38-9	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
60	223	Eugenol	97-53-0	-	Dosed-Feed	N	N	E	E
61	208	FD & c yellow no. 6	2783-94-0	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
62	103	Fenthion	55-38-9	-, +W	Dosed-Feed	N	N	E	N
63	195	Fluometuron	2164-17-2	-	Dosed-Feed	N	N	E	N
64	252	Geranyl acetate	105-87-3	-	Gavage	N	N	N	N
65	229	Guar gum	9000-30-0	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
66	227	Gum arabic	9000-01-5	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
67	437	Hexachlorocyclopentadiene	77-47-4	-, -	Inhalation	NE	NE	NE	NE
68	040	Hexachlorophene	70-30-4	-	Dosed-Feed	N	N		
69	330	4-Hexylresorcinol	136-77-6	-, -	Gavage	NE	NE	EE	NE
70	357	Hydrochlorothiazide	58-93-5	-	Dosed-Feed	NE	NE	EE	NE
71	014	Lindane	58-89-9	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
72	175	Lithocholic acid	434-13-9	-	Gavage	N	N	N	N
73	221	Locust bean gum	9000-40-2	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
74	135	Malaoxon	1634-78-2	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
75	024	Malathion	121-75-5	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
76	192	Malathion	121-75-5	-	Dosed-Feed	N	N		
77	428	Manganese sulfate monohydrate	10034-96-5	-, -	Dosed-Feed	NE	NE	EE	EE
78	236	d-Mannitol	69-65-8	-, -, -, -	Dosed-Feed	N	N	N	N
79	098	dl-Menthol	89-78-1	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
80	035	Methoxychlor	72-43-5	-, -	Dosed-Feed	N	N	N	N
81	314	Methyl methacrylate	80-62-6	+W, -, -	Inhalation	NE	NE	NE	NE
82	396	Monochloroacetic acid	79-11-8	-	Gavage	NE	NE	NE	NE
83	310	Navy fuels jp-5		-	Topical			NE	NE
84	454	Nickel sulfate hexahydrate	10101-97-0	-	Inhalation	NE	NE	NE	NE
85	417	p-Nitrophenol	100-02-7	-	Topical			NE	NE
86	170	beta-Nitrostyrene	102-96-5	+W, -	Gavage	N	N	N	N
87	315	Oxytetracycline hydrochloride	2058-46-0	-	Dosed-Feed	EE	EE	NE	NE
88	070	Parathion	56-38-2	+W, -	Dosed-Feed	E	E	N	N
89	336	Penicillin vk	132-98-9	-	Gavage	NE	NE	NE	NE
90	061	Pentachloronitrobenzene	82-68-8	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
91	325	Pentachloronitrobenzene	82-68-8	-	Dosed-Feed			NE	NE
92	365	Pentaerythritol tetranitrate	78-11-5	-	Dosed-Feed	EE	EE	NE	NE
93	007	Phenformin hydrochloride	114-86-3	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
94	203	Phenol	108-95-2	-, -	Dosed-Water	N	N	N	N
95	333	N-Phenyl-2-naphthylamine	135-88-6	-	Dosed-Feed	NE	NE	NE	EE
96	082	N-Phenyl-p-phenylenediamine	101-54-2	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
97	322	Phenylephrine hydrochloride	61-76-7	-	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
98	141	1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone	89-25-8	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
99	301	o-Phenylphenol	90-43-7	+W, -	Topical			NE	NE
100	148	1-Phenyl-2-thiourea	103-85-5	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
101	161	Phthalamide	88-96-0	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
102	159	Phthalic anhydride	85-44-9	-, -	Dosed-Feed	N	N	N	N
103	023	Picloram	1918-02-1	-	Dosed-Feed	N	E	N	N
104	120	Piperonyl butoxide	51-03-6	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
105	415	Polysorbate 80 (glycol)	9005-65-6	-	Dosed-Feed	EE	NE	NE	NE

表-1 (つづき)

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
106	425	Promethazine hydrochloride	58-33-3	-, -	Gavage	NE	NE	NE	NE
107	240	Propyl gallate	121-79-9	-	Dosed-Feed	E	N	E	N
108	048	Pyrazinamide	98-96-4	-	Dosed-Feed	N	N	N	IS
109	077	Pyrimethamine	58-14-0	-	Dosed-Feed	N	N	IS	N
110	403	Resorcinol	108-46-3	-	Gavage	NE	NE	NE	NE
111	364	Rhodamine 6 g	989-38-8	-	Dosed-Feed	EE	EE	NE	NE
112	320	Rotenone	83-79-4	-	Dosed-Feed	EE	NE	NE	NE
113	345	Roxarsone	121-19-7	-	Dosed-Feed	EE	NE	NE	NE
114	445	Scopolamine hydrobromide trihydrate	6533-68-2	-	Gavage	NE	NE	NE	NE
115	199	Selsun		-	Topical	N	N		
116	172	Sodium diethyldithiocarbamate	148-18-5	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
117	393	Sodium fluoride	7681-49-4	-	Dosed-Water	EE	NE	NE	NE
118	464	Sodium xylenesulfonate	1300-72-7	-	Topical	NE	NE	NE	NE
119	231	Stannous chloride	7772-99-8	-	Dosed-Feed	E	N	N	N
120	185	Styrene	100-42-5	-	Gavage	N	N	E	N
121	373	Succinic anhydride	108-30-5	-, -	Gavage	NE	NE	NE	NE
122	138	Sulfisoxazole	127-69-5	-	Gavage	N	N	N	N
123	102	3-Sulfolene	77-79-2	-	Gavage	N	N	N	N
124	224	Tara gum	39300-88-4	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
125	131	Tetrachlorodiphenylethane	72-54-8	-	Dosed-Feed	E	N	N	N
126	114	2,3,5,6-Tetrachloro-4-nitroanisole	2438-88-2	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
127	344	Tetracycline hydrochloride	64-75-5	-	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
128	166	Tetraethylthiuram disulfide	97-77-8	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
129	446	1-trans-delta-9-Tetrahydrocannabinol	1972-08-3	-	Gavage	NE	NE	EE	EE
130	296	Tetrakis(hydroxymethyl)-phosphonium chloride	124-64-1	-	Gavage	NE	NE	NE	NE
131	296	Tetrakis(hydroxymethyl)-phosphonium sulfate	55566-30-8	-	Gavage	NE	NE	NE	NE
132	435	4,4-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)	96-69-5	-	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
133	097	Titanium dioxide	13463-67-7	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
134	031	Tolbutamide	64-77-7	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
135	371	Toluene	108-88-3	-	Inhalation	NE	NE	NE	NE
136	003	1,1,1-Trichloroethane	71-55-6	-, -, -	Gavage	IS	IS	IS	IS
137	273	Trichloroethylene	79-01-6	-, -	Gavage	IS	IS		
138	106	Trichlorofluoromethane	75-69-4	-	Gavage	IS	IS	N	N
139	433	Tricresyl phosphate	1330-78-5	-, -	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
140	139	Triphenyltin hydroxide	76-87-9	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
141	071	l-Tryptophan	73-22-3	-	Dosed-Feed	N	N	N	N
142	427	Turmeric, oleoresin	8024-37-1	-	Dosed-Feed	NE	EE	EE	EE
143	375	Vinyl toluene	25013-15-4	-	Inhalation	NE	NE	NE	NE
144	228	Vinylidene chloride	75-35-4	-	Gavage	N	N	N	N
145	327	Xylenes (mixed)	1330-20-7	-	Gavage	NE	NE	NE	NE

表-2 サルモネラによる遺伝子毒性試験 (in vitro) 及び2年間発がん性試験で何れかの系統の一方の性で陽性であった物質のリスト

Negative in both genotoxicity *in vitro* (*Salmonella*) tests and positive in at least one sex of the rodent species in the 2-year carcinogenesis study

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
146	021	Aldrin	309-00-2	-	Dosed-Feed	E	E	P	N
147	234	Allyl isothiocyanate	57-06-7	+W, -	Gavage	P	E	N	N
148	253	Allyl isovalerate	2835-39-4	-	Gavage	P	N	N	P
149	216	11-Aminoundecanoic acid	2432-99-7	-	Dosed-Feed	P	N	E	N
150	378	Benzaldehyde	100-52-7	-, -	Gavage	NE	NE	SE	SE
151	289	Benzene	71-43-2	-	Gavage	CE	CE	CE	CE
152	370	Benzofuran	271-89-6	-	Gavage	NE	SE	CE	CE

表-2 (つづき)

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
153	250	Benzyl acetate	140-11-4	-	Gavage	EE	NE	SE	SE
154	424	<i>o</i> -Benzyl-p-chlorophenol	120-32-1	-, -	Gavage	NE	EE	SE	NE
155	321	Bromodichloromethane	75-27-4	-	Gavage	CE	CE	CE	CE
156	436	<i>tert</i> -Butyl alcohol	75-65-0	-	Dosed-Water	SE	NE	EE	SE
157	213	Butyl benzyl phthalate	85-68-7	-, -	Dosed-Feed	IS	P	N	N
158	458	Butyl benzyl phthalate	85-68-7	-, -	Dosed-Feed	SE	EE		
159	108	C. I. direct blue 6	1937-37-7	-, -	Dosed-Feed	P	P		
160	397	C. I. direct blue 15	2429-74-5	-	Dosed-Water	CE	CE		
161	430	C. I. direct blue 218	28407-37-6	-	Dosed-Feed	SE	NE	CE	CE
162	108	C. I. direct brown 95	2602-46-2	+W, -	Dosed-Feed	N	P		
163	134	C. I. vat yellow 4	128-66-5	-, -	Dosed-Feed	N	N	P	N
164	008	Chlordane (analytical grade)	57-74-9	-	Dosed-Feed	N	N	P	P
165	000	Chlordecone	143-50-0	-, -	Dosed-Feed	P	P	P	P
166	304	Chlorendic acid	115-28-6	-	Dosed-Feed	CE	CE	CE	NE
167	308	Chlorinated paraffins: C <sub>12</sub> , 60% chlorine	108171-26-2	-	Gavage	CE	CE	CE	CE
168	305	Chlorinated paraffins: C <sub>23</sub> , 43% chlorine	108171-27-3	-	Gavage	NE	EE	CE	EE
169	075	Chlorobenzilate	510-15-6	-, -, -	Dosed-Feed	E	E	P	P
170	282	Chlorodibromomethane	124-48-1	-	Gavage	NE	NE	EE	SE
171	000	Chloroform	67-66-3	-	Gavage	P	N	P	P
172	300	3-Chloro-2-methylpropene	563-47-3	+W, -, -	Gavage	CE	CE	CE	CE
173	041	Chlorothalonil	1897-45-6	-	Dosed-Feed	P	P	N	N
174	187	5-Chloro- <i>o</i> -toluidine	95-79-4	-, -, -	Dosed-Feed	N	N	P	P
175	165	4-Chloro- <i>o</i> -toluidine hydrochloride	95-69-2	-, ?	Dosed-Feed	N	N	P	P
176	196	Cinnamyl anthranilate	87-29-6	-	Dosed-Feed	P	N	P	P
177	083	Daminozide	1596-84-5	-	Dosed-Feed	N	P	E	N
178	309	Decabromodiphenyl oxide	1163-19-5	-	Dosed-Feed	SE	SE	EE	NE
179	212	Di(2-ethylhexyl)adipate	103-23-1	-, -, -	Dosed-Feed	N	N	P	P
180	217	Di(2-ethylhexyl) phthalate	117-81-7	{-, -, -, -, -, -}	Dosed-Feed	P	P	P	P
181	131	<i>p,p'</i> -Dichlorodiphenoldichloroethylene	72-55-9	-, -	Dosed-Feed	N	N	P	P
182	319	1,4-Dichlorobenzene	106-46-7	-	Gavage	CE	NE	CE	CE
183	090	Dicofol	115-32-2	-	Dosed-Feed	N	N	P	N
184	149	<i>N,N'</i> -Diethylthiourea	105-55-5	-	Dosed-Feed	P	P	N	N
185	423	3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	-	Gavage	SE	NE	NE	SE
186	456	1,2-Dihydro-2,2,4-trimethylquinoline (monomer)	147-47-7	-	Topical	SE	NE	NE	NE
187	360	<i>N,N</i> -Dimethylaniline	121-69-7	-	Gavage	SE	NE	NE	EE
188	323	Dimethyl methylphosphonate	756-79-6	-	Gavage	SE	NE	IS	NE
189	298	Dimethylmorpholino phosphoramidate	597-25-1	-	Gavage	SE	SE	NE	NE
190	080	1,4-Dioxane	123-91-1	-, -, -	Dosed-Water	P	P	P	P
191	404	5,5-Diphenylhydantoin	57-41-0	-, -	Dosed-Feed	EE	NE	NE	CE
192	259	Ethyl acrylate	140-88-5	-W, -, -	Gavage	P	P	P	P
193	388	Ethylene thiourea	96-45-7	-, +W	Dosed-Feed	CE	CE	CE	CE
194	402	Furan	110-00-9	-, +W	Gavage	CE	CE	CE	CE
195	382	Furfural	98-01-1	?, -, ?	Gavage	SE	NE	CE	SE
196	356	Furosemide	54-31-9	-	Dosed-Feed	EE	NE	NE	SE
197	009	Heptachlor	76-44-8	-, -	Dosed-Feed	N	E	P	P
198	068	Hexachloroethane	67-72-1	-, -	Gavage	N	N	P	P
199	361	Hexachloroethane	67-72-1	-, -	Gavage	CE	NE		
200	366	Hydroquinone	123-31-9	-	Gavage	SE	SE	NE	SE
201	291	Isophorone	78-59-1	-	Gavage	SE	NE	EE	NE
202	347	<i>d</i> -Limonene	5989-27-5	-	Gavage	CE	NE	NE	NE
203	331	Malonaldehyde, sodium salt	24382-04-5	-	Gavage	CE	CE	NE	NE
204	245	Melamine	108-78-1	-	Dosed-Feed	P	N	N	N
205	332	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	?, -	Gavage	SE	SE	NE	EE
206	408	Mercuric chloride	7487-94-7	-	Gavage	SE	EE	EE	NE
207	328	Methyl carbamate	598-55-0	-	Gavage	CE	CE	NE	NE

表-2 (つづき)

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
208	369	alpha-Methylbenzyl alcohol	98-85-1	-	Gavage	SE	NE	NE	NE
209	352	N-Methylolacrylamide	924-42-5	-	Gavage	NE	NE	CE	CE
210	439	Methylphenidate hydrochloride	298-59-9	-, -	Dosed-Feed	NE	NE	SE	SE
211	313	Mirex	2385-85-5	-	Dosed-Feed	CE	CE		
212	462	Molybdenum trioxide	1313-27-5	-	Inhalation	EE	NE	SE	SE
213	266	Monuron	150-68-5	-	Dosed-Feed	CE	NE	NE	NE
214	368	Nalidixic acid	389-08-2	-	Dosed-Feed	CE	CE	EE	NE
215	410	Naphthalene	91-20-3	-	Inhalation			NE	SE
216	451	Nickel (ii) oxide	1313-99-1	-	Inhalation	SE	SE	NE	EE
217	006	Nitrilotriacetic acid (nta)	139-13-9	-	Dosed-Feed	P	P	P	P
218	006	Nitrilotriacetic acid trisodium monohydrate	18662-53-8	-	Dosed-Feed	P	P		
219	461	Nitromethane	75-52-5	-	Inhalation	NE	CE	CE	CE
220	164	N-Nitrosodiphenylamine	86-30-6	-	Dosed-Feed	P	P	N	N
221	358	Ochratoxin a	303-47-9	-	Gavage			CE	CE
222	443	Oxazepam	604-75-1	-	Dosed-Feed			CE	CE
223	232	Pentachloroethane	76-01-7	-	Gavage	E	N	P	P
224	349	Pentachlorophenol, technical	87-86-5	-	Dosed-Feed			CE	SE
225	060	Phenesterin	3546-10-9	-, -	Gavage	N	P	P	P
226	465	Phenolphthalein	77-09-8	?, -, -	Dosed-Feed	CE	SE	CE	CE
227	367	Phenylbutazone	50-33-9	-	Gavage	EE	SE	SE	NE
228	124	Piperonyl sulfoxide	120-62-7	-, -	Dosed-Feed	N	N	P	N
229	395	Probenecid	57-66-9	-	Gavage	NE	NE	NE	SE
230	019	Procarbazine hydrochloride injection	366-70-1	-	Intraperito	P	P	P	P
231	193	Reserpine	50-55-5	-	Dosed-Feed	P	N	P	P
232	457	Salicylazosulfapyridine	599-79-1	-	Gavage	SE	SE	CE	CE
233	020	4,4'-Sulfonyldianiline	80-08-0	-	Dosed-Feed	P	N	N	N
234	027	1,1,2,2-Tetrachloroethane	79-34-5	-, -	Gavage	E	N	P	P
235	209	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	1746-01-6	-	Gavage	P	P	P	P
236	201	"	1746-01-6	-	Topical			E	P
237	237	1,1,1,2-Tetrachloroethane	630-20-6	-, -	Gavage	E	N	P	P
238	013	Tetrachloroethylene	127-18-4	-	Gavage	IS	IS	P	P
239	311	"	127-18-4	-	Inhalation	CE	SE	CE	CE
240	033	Tetrachlorvinphos	961-11-5	-	Dosed-Feed	N	P	P	P
241	420	Triamterene	396-01-0	-, -	Dosed-Feed	EE	NE	SE	SE
242	074	1,1,2-Trichloroethane	79-00-5	{-, -, -}	Gavage	N	N	P	P
243	002	Trichloroethylene	79-01-6	-, -	Gavage	N	N	P	P
244	243	"	79-01-6	-, -	Gavage	IS	N	P	P
245	155	2,4,6-Trichlorophenol	88-06-2	-	Dosed-Feed	P	N	P	P
246	449	Triethanolamine	102-71-6	-	Topical	EE	NE	EE	SE
247	129	Trimethylthiourea	2489-77-2	-	Dosed-Feed	N	P	N	N
248	391	Tris(2-chloroethyl)phosphate	115-96-8	-	Gavage	CE	CE	EE	EE
249	274	Tris(2-ethylhexyl)phosphate	78-42-2	-	Gavage	EE	NE	NE	SE
250	303	4-Vinylcyclohexene	100-40-3	-, -	Gavage	IS	IS	IS	CE
251	278	2,6-Xylidine	87-62-7	-, +W, +	Dosed-Feed	P	P		
252	235	Zearalenone	17924-92-4	-	Dosed-Feed	N	N	P	P

表-3 サルモネラによる遺伝子毒性試験で陽性であり、2年間発がん性試験では何れの種においても陰性であった物質のリスト  
Positive in genotoxicity *in vitro* (*Salmonella*) tests and negative in both rodent species in the 2-year carcinogenesis study

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
253	073	Allyl chloride	107-05-1	+	Gavage	N	N	E	E
254	069	Azinphosmethyl	86-50-0	+W, +	Dosed-Feed	E	N	N	N
255	191	Bis(2-chloro-1-methylethyl)	108-60-1	{+, +, +, +W, +, +}	Gavage	N	N		

表-3 (つづき)

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
256	411	C. I. pigment red 23	6471-49-4	+	Dosed-Feed	EE	NE	NE	NE
257	177	4-(Chloroacetyl)acetanilide	140-49-8	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
258	189	p-Chloroaniline	106-47-8	-, +, +W	Dosed-Feed	E	N	E	E
259	275	2-Chloroethanol	107-07-3	+, +, +	Topical	NE	NE	NE	NE
260	178	2-Chloromethylpyridine hydrochloride	6959-47-3	+	Gavage	N	N	N	N
261	065	Chloropicrin	76-06-2	+, +	Gavage	IS	IS	N	N
262	113	2-Chloro-p-phenylenediamine sulfate	61702-44-1	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
263	156	Di(p-ethylphenyl)dichloroethane	72-56-0	+	Dosed-Feed	N	N	N	E
264	010	Dichlorvos	62-73-7	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
265	004	Dimethoate	60-51-5	+, +	Dosed-Feed	N	N	N	N
266	354	Dimethoxane	828-00-2	+	Gavage	NE	NE	EE	NE
267	171	2,4-Dimethoxyaniline hydrochloride	54150-69-5	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
268	125	Dioxathion	78-34-2	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
269	101	Formulated fenaminosulf	140-56-7	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
270	293	HC blue 2	33229-34-4	+	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
271	281	HC red 3	2871-01-4	+	Gavage	NE	NE	EE	IS
272	419	HC yellow 4	59820-43-8	+	Dosed-Feed	EE	NE	NE	NE
273	276	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	+	Dosed-Feed	NE	NE	NE	NE
274	110	Iodoform	75-47-8	+, +	Gavage	N	N	N	N
275	151	Lead dimethyldithiocarbamate	19010-66-3	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
276	385	Methyl bromide	74-83-9	+	Inhalation			NE	NE
277	157	Methyl parathion	298-00-0	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
278	168	N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride	1465-25-4	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
279	180	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	+, +, +	Dosed-Feed	N	N	N	N
280	418	p-Nitroaniline	100-01-6	+, +	Gavage			EE	NE
281	109	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	+, +	Dosed-Feed	N	N	N	N
282	064	1-Nitronaphthalene	86-57-7	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
283	052	3-Nitropropionic acid	504-88-1	+	Gavage	E	N	N	N
284	174	p-Phenylenediamine dihydrochloride	624-18-0	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
285	016	Phosphamidon	13171-21-6	+	Dosed-Feed	E	E	N	N
286	017	Photodieldrin	13366-73-9	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
287	272	Propylene	115-07-1	+	Inhalation	NE	NE	NE	NE
288	197	Selenium sulfide	7446-34-6	+	Topical			N	N
289	389	Sodium azide	26628-22-8	+	Gavage		NE		
290	399	Titanocene dichloride	1271-19-8	+	Gavage	EE	EE		
291	200	2,6-Toluenediamine dihydrochloride	15481-70-6	+	Dosed-Feed	N	N	N	N
292	126	2,5-Toluenediamine sulfate	6369-59-1	+	Dosed-Feed	N	N	N	N

表-4 サルモネラによる遺伝子毒性試験において陽性であり、2年間発がん性試験において何れか一方の種においてのみ陽性であった物質のリスト

Positive in genotoxicity *in vitro* (*Salmonella*) tests and positive in only rodent species in the 2-year carcinogenesis study

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
293	376	Allyl glycidyl ether	106-92-3	+	Inhalation	EE	NE	SE	EE
294	094	4-Amino-2-nitrophenol	119-34-6	+	Dosed-Feed	P	E	N	N
295	112	3-Amino-4-ethoxyacetanilide	17026-81-2	+	Dosed-Feed	N	N	P	N
296	339	2-Amino-4-nitrophenol	99-57-0	+, +	Gavage	SE	NE	NE	NE
297	334	2-Amino-5-nitrophenol	121-88-0	+	Gavage	SE	NE	NE	NE
298	053	2-Amino-5-nitrothiazole	121-66-4	+	Dosed-Feed	P	N	N	N
299	042	5-Azacytidine	320-67-2	+, +	Intraperito	IS	IS	IS	P
300	154	Azobenzene	103-33-3	+, +, +	Dosed-Feed	P	P	N	N
301	179	p-Benzoquinone dioxime	105-11-3	+, +	Dosed-Feed	N	P	N	N
302	233	2-Biphenylamine hydrochloride	2185-92-4	+, +	Dosed-Feed	N	N	E	P

表-4 (つづき)

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
303	239	Bis(2-chloro-1-methylethyl)ether	108-60-1	{+, +, +, +W, + +	Gavage			P	P
304	288	1,3-Butadiene	106-99-0	+	Inhalation			CE	CE
305	434	1,3-Butadiene	106-99-0	+	Inhalation			CE	CE
306	335	C. I. acid orange 3	6373-74-6	+	Gavage	NE	CE	NE	NE
307	405	C. I. acid red 114	6459-94-5	+	Dosed-Water	CE	CE		
308	108	C. I. direct black 38	16071-86-6	+, +	Dosed-Feed	P	P		
309	299	C. I. disperse blue 1	2475-45-8	+	Dosed-Feed	CE	CE	EE	NE
310	226	C. I. solvent yellow 14	842-07-9	+, +	Dosed-Feed	P	P	N	N
311	015	Captan	133-06-2	+	Dosed-Feed	N	N	P	P
312	025	Chloramben	133-90-4	+	Dosed-Feed	N	N	E	P
313	346	Chloroethane	75-00-3	+	Inhalation	EE	EE	IS	CE
314	105	m-Cresidine	102-50-1	+	Gavage	P	P	IS	N
315	207	Cytembena	21739-91-3	+	Intraperito	P	P	N	N
316	401	2,4-Diaminophenol dihydrochloride	137-09-7	+	Gavage	NE	NE	SE	NE
317	219	2,6-Dichloro-p-phenylenediamine	609-20-1	+, +	Dosed-Feed	N	N	P	P
318	128	3,3'-Dimethoxybenzidine-4,4'-diisocyanate	91-93-0	+	Dosed-Feed	P	P	N	N
319	390	3,3'-Dimethylbenzidine dihydrochloride	612-82-8	+	Dosed-Water	CE	CE		
320	054	2,4-Dinitrotoluene	121-14-2	+	Dosed-Feed	P	P	N	N
321	329	1,2-Epoxybutane	106-88-7	+	Inhalation	CE	EE	NE	NE
322	039	Lasiocarpine	303-34-4	+	Dosed-Feed	P	P		
323	359	8-Methoxypsoralen	298-81-7	+	Gavage	CE	NE		
324	107	5-Nitro-o-toluidine	99-55-8	+	Dosed-Feed	N	N	P	P
325	133	3-Nitro-p-acetophenetide	1777-84-0	+	Dosed-Feed	N	N	P	N
326	117	6-Nitrobenzimidazole	94-52-0	+	Dosed-Feed	N	N	P	P
327	442	p-Nitrobenzoic acid	62-23-7	+	Dosed-Feed	NE	SE	NE	NE
328	169	2-Nitro-p-phenylenediamine	5307-14-2	+	Dosed-Feed	N	N	N	P
329	440	Ozone	10028-15-6	+	Inhalation	NE	NE	EE	SE
330	409	Quercetin	117-39-5	+	Dosed-Feed	SE	NE		
331	037	Toxaphene	8001-35-2	+	Dosed-Feed	E	E	P	P
332	350	Tribromomethane	75-25-2	?, -, ?	Gavage	SE	CE	NE	NE
333	238	Ziram	137-30-4	+	Dosed-Feed	P	N	N	E

表-5 サルモネラによる遺伝子毒性試験で陽性であり、2年間発がん性試験でげっ歯類両種において少なくとも一方の性で陽性を示した物質のリスト  
Positive in genotoxicity *in vitro* (*Salmonella*) tests and positive in at least one sex of both rodent species in the 2-year carcinogenesis study

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
334	144	2-Aminoanthraquinone	117-79-3	+	Dosed-Feed	P	IS	P	P
335	111	1-Amino-2-methylanthraquinone	82-28-0	+	Dosed-Feed	P	P	N	P
336	363	Bromoethane	74-96-4	-, +	Inhalation	SE	EE	EE	CE
337	222	C. I. disperse yellow 3	2832-40-8	+, +	Dosed-Feed	P	N	N	P
338	407	C. I. pigment red 3	2425-85-6	+	Dosed-Feed	SE	SE	SE	NE
339	095	3-Chloromethylpyridine hydrochloride	6959-48-4	+	Gavage	P	E	P	P
340	085	4-Chloro-m-phenylenediamine	5131-60-2	+	Dosed-Feed	P	N	N	P
341	422	Coumarin	91-64-5	+	Gavage	SE	EE	SE	CE
342	162	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	+	Dosed-Feed	P	P	N	P
343	269	1,3-Dichloropropene	542-75-6	+	Gavage	CE	SE	IS	CE
344	342	Dichlorvos	62-73-7	+	Gavage	SE	EE	SE	CE
345	271	Gc blue 1	2784-94-3	+	Dosed-Feed	EE	SE	CE	CE
346	092	Hydrazobenzene	122-66-7	+	Dosed-Feed	P	P	N	P
347	340	Iodinated glycerol	5634-39-9	+	Gavage	SE	NE	NE	SE
348	186	4,4'-Methylenebis(N,N-dimethyl)benzenamine	101-61-1	+	Dosed-Feed	P	P	E	P

表-5 (つづき)

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
349	143	1,5-Naphthalenediamine	2243-62-1	+	Dosed-Feed	N	P	P	P
350	146	Nithiazide	139-94-6	+	Dosed-Feed	N	P	P	E
351	127	5-Nitro-o-anisidine	99-59-2	+	Dosed-Feed	P	P	E	P
352	118	5-Nitroacenaphthene	602-87-9	+	Dosed-Feed	P	P	N	P
353	341	Nitrofurantoin	67-20-9	{+, +, +, +, +, +,	Dosed-Feed	SE	NE	NE	CE
354	337	Nitrofurazone	59-87-0	+	Dosed-Feed	EE	CE	NE	CE
355	414	Pentachloroanisole	1825-21-4	+	Gavage	SE	EE	SE	NE
356	099	Phenazopyridine hydrochloride	136-40-3	?, +	Dosed-Feed	P	P	N	P
357	194	Selenium sulfide	7446-34-6	+	Gavage	P	P	N	P
358	251	2,4- & 2,6-Toluene diisocyanate	26471-62-5	+	Gavage	P	P	N	P
359	160	2,4,5-Trimethylaniline	137-17-7	+	Dosed-Feed	P	P	E	P
360	081	Trimethylphosphate	512-56-1	+	Gavage	P	N	N	P

表-6 サルモネラによる遺伝子毒性試験で陽性であり、2年間発がん性試験でげっ歯類両種両性で陽性を示した物質のリスト  
Positive in genotoxicity *in vitro* (*Salmonella*) tests and positive in both sexes of all rodent species tested in the 2-year carcinogenesis study

No	TR No	NAME	CAS No	MUTAT SAL	DOSE-ROUT	MALE RATS	FEMA RATS	MALE MICE	FEMA MICE
361	383	1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone	81-49-2	+	Dosed-Feed	CE	CE	CE	CE
362	093	3-Amino-9-ethylcarbazole hcl	132-32-1	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
363	452	2,2-Bis(bromomethyl)-1,3-propanediol	3296-90-0	-, +	Dosed-Feed	CE	CE	CE	CE
364	285	C. I. basic red 9 monohydrochloride	569-61-9	+	Dosed-Feed	CE	CE	CE	CE
365	063	4-Chloro-o-phenylenediamine	95-83-0	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
366	142	p-Cresidine	120-71-8	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
367	100	Cupferron	135-20-6	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
368	084	2,4-Diaminoanisole sulfate	615-05-4	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
369	086	1,2-Dibromoethane	106-93-4	+	Gavage	P	P	P	P
370	210	1,2-Dibromoethane	106-93-4	+	Inhalation	P	P	P	P
371	028	1,2-Dibromo-3-chloropropane	96-12-8	+	Gavage	P	P	P	P
372	206	1,2-Dibromo-3-chloropropane	96-12-8	+	Inhalation	P	P	P	P
373	400	2,3-Dibromo-1-propanol	96-13-9	+	Topical	CE	CE	CE	CE
374	055	1,2-Dichloroethane	107-06-2	+	Gavage	P	P	P	P
375	257	Diglycidyl resorcinol ether	101-90-6	+	Gavage	P	P	P	P
376	316	Dimethylvinyl chloride	513-37-1	-, +	Gavage	CE	CE	CE	CE
377	374	Glycidol	556-52-5	+, +	Gavage	CE	CE	CE	CE
378	448	Isobutyl nitrite	542-56-3	+, +, +	Inhalation	CE	CE	SE	SE
379	306	Methylene chloride	75-09-2	+, -, +	Inhalation	SE	CE	CE	CE
380	248	4,4'-Methylenedianiline dihydrochloride	13552-44-8	+, +	Dosed-Water	P	P	P	P
381	029	2-Methyl-1-nitroanthraquinone	129-15-7	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
382	181	Michler's ketone	90-94-8	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
383	416	o-Nitroanisole	91-23-6	+, +	Dosed-Feed	CE	CE	CE	SE
384	205	4,4'-Oxydianiline	101-80-4	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
385	072	Phenoxybenzamine hydrochloride	63-92-3	+	Intraperito	P	P	P	P
386	267	1,2-Propylene oxide	75-56-9	+, +, +	Inhalation	SE	SE	CE	CE
387	115	Sulfallate	95-06-7	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
388	386	Tetranitromethane	509-14-8	+	Inhalation	CE	CE	CE	CE
389	047	4,4'-Thiodianiline	139-65-1	+	Dosed-Feed	P	P	P	P
390	153	o-Toluidine hydrochloride	636-21-5	-, +	Dosed-Feed	P	P	P	P
391	384	1,2,3-Trichloropropane	96-18-4	+, +	Gavage	CE	CE	CE	CE
392	058	Tris(aziridinyl)-phosphine sulfide(thio-tepa)	52-24-4	+	Intraperito	P	P	P	P
393	362	4-Vinyl-1-cyclohexene diepoxide	106-87-6	+	Topical	CE	CE	CE	CE

CAS No と No の対照リスト

CAS No	No	CAS No	No	CAS No	No	CAS No	No	CAS No	No
50-29-3	40	77-65-6	24	99-57-0	296	120-61-6	48	333-41-5	36
50-33-9	227	77-79-2	123	99-59-2	351	120-62-7	228	366-70-1	230
50-55-5	231	78-11-5	92	100-01-6	280	120-71-8	366	389-08-2	214
50-81-7	9	78-34-2	268	100-02-7	85	120-83-2	42	396-01-0	241
51-03-6	104	78-42-2	249	100-40-3	250	121-14-2	320	434-13-9	72
52-24-4	392	78-59-1	201	100-42-5	120	121-19-7	113	483-18-1	51
54-31-9	196	79-00-5	242	100-51-6	14	121-54-0	11	504-88-1	283
55-38-9	62	79-01-6	137	100-52-7	150	121-66-4	298	509-14-8	388
56-38-2	88	79-01-6	243	101-54-2	96	121-69-7	187	510-15-6	169
56-72-4	32	79-01-6	244	101-61-1	348	121-75-5	75	512-56-1	360
57-06-7	147	79-11-8	82	101-80-4	384	121-75-5	76	513-37-1	376
57-41-0	191	79-34-5	234	101-90-6	375	121-79-9	107	532-27-4	26
57-66-9	229	80-05-7	15	101-05-3	6	121-88-0	297	536-33-4	56
57-74-9	164	80-08-0	233	102-50-1	314	122-66-7	346	542-56-3	378
58-14-0	109	80-62-6	81	102-71-6	246	123-31-9	200	542-75-6	343
58-33-3	106	81-49-2	361	102-96-5	86	123-91-1	190	556-52-5	377
58-89-9	71	82-28-0	335	103-23-1	179	124-48-1	170	563-47-3	172
58-93-5	70	82-68-8	90	103-33-3	300	124-64-1	130	569-61-9	364
59-87-0	354	82-68-8	91	103-85-5	100	127-18-4	238	597-25-1	189
60-51-5	265	83-79-4	112	103-90-2	1	127-18-4	239	598-55-0	207
60-57-1	44	84-66-2	47	105-11-3	301	127-69-5	122	599-79-1	232
60-57-1	45	85-44-9	102	105-55-5	184	128-37-0	19	602-87-9	352
61-76-7	97	85-68-7	157	105-60-2	23	128-66-5	163	604-75-1	222
62-23-7	327	85-68-7	158	105-87-3	64	129-15-7	381	609-20-1	317
62-73-7	264	86-30-6	220	106-46-7	182	131-17-9	33	612-82-8	319
62-73-7	344	86-50-0	254	106-47-8	258	131-17-9	34	615-05-4	368
63-92-3	385	86-57-7	282	106-87-6	393	132-32-1	362	619-17-0	281
64-75-5	127	87-29-6	176	106-88-7	321	132-98-9	89	624-18-0	284
64-77-7	134	87-62-7	251	106-92-3	293	133-06-2	311	630-20-6	237
67-20-9	353	87-86-5	224	106-93-4	369	133-90-4	312	636-21-5	390
67-66-3	171	88-06-2	245	106-93-4	370	134-72-5	54	643-22-1	55
67-72-1	198	88-96-0	101	106-99-0	304	135-20-6	367	756-79-6	188
67-72-1	199	89-25-8	98	106-99-0	305	135-88-6	95	828-00-2	266
69-65-8	78	89-78-1	79	107-05-1	253	136-40-3	356	842-07-9	310
70-30-4	68	90-43-7	99	107-06-2	374	136-77-6	69	924-42-5	209
71-43-2	151	90-94-8	382	107-07-3	259	137-09-7	316	961-11-5	240
71-55-6	136	91-20-3	215	107-21-1	58	137-17-7	359	968-81-0	2
72-20-8	53	91-23-6	383	108-30-5	121	137-30-4	333	989-38-8	111
72-43-5	80	91-64-5	341	108-46-3	110	139-13-9	217	999-81-5	28
72-54-8	125	91-93-0	318	108-60-1	255	139-65-1	389	1067-33-0	37
72-55-9	181	94-20-2	31	108-60-1	303	139-94-6	350	1163-19-5	178
72-56-0	263	94-52-0	326	108-78-1	204	140-11-4	13	1212-29-9	43
73-22-3	141	95-06-7	387	108-88-3	135	140-11-4	153	1271-19-8	290
74-83-9	276	95-50-1	38	108-90-7	27	140-49-8	257	1300-72-7	118
74-96-4	336	95-69-2	175	108-95-2	94	140-56-7	269	1313-27-5	212
75-00-3	313	95-74-9	29	109-69-3	18	140-88-5	192	1313-99-1	216
75-05-8	3	95-79-4	174	110-00-9	194	142-46-1	50	1330-20-7	145
75-09-2	379	95-80-7	342	113-92-8	30	143-50-0	165	1330-78-5	139
75-25-2	332	95-83-0	365	114-86-3	93	147-24-0	49	1465-25-4	278
75-27-4	155	96-12-8	371	115-07-1	287	147-47-7	186	1596-84-5	177
75-34-3	41	96-12-8	372	115-28-6	166	148-18-5	116	1634-78-2	74
75-35-4	144	96-13-9	373	115-29-7	52	148-24-3	273	1746-01-6	235
75-47-8	274	96-18-4	391	115-32-2	183	149-30-4	205	1746-01-6	236
75-52-5	219	96-45-7	193	115-96-8	248	150-38-9	59	1777-84-0	325
75-56-9	386	96-48-0	17	116-06-3	4	150-68-5	213	1825-21-4	355
75-65-0	156	96-69-5	132	117-39-5	330	271-89-6	152	1897-45-6	173
75-69-4	138	97-53-0	60	117-79-3	334	298-00-0	277	1918-02-1	103
76-01-7	223	97-77-8	128	117-81-7	180	298-59-9	210	1936-15-8	21
76-06-2	261	98-01-1	195	118-92-3	7	298-81-7	323	1937-37-7	159
76-44-8	197	98-85-1	208	119-34-6	294	303-34-4	322	1948-33-0	20
76-87-9	140	98-96-4	108	119-53-9	12	303-47-9	221	1972-08-3	129
77-09-8	226	99-55-8	324	119-84-6	185	309-00-2	146	2058-46-0	87
77-47-4	67	99-56-9	279	120-32-1	154	320-67-2	299	2164-17-2	63

CAS No と No の対照リスト (つづき)

CAS No	No	CAS No	No	CAS No	No	CAS No	No	CAS No	No
2185-92-4	302	2871-01-4	271	6959-48-4	339	10043-35-3	16	24382-04-5	203
2243-62-1	349	3296-90-0	363	7177-48-2	5	10101-97-0	84	25013-15-4	143
2244-16-8	25	3546-10-9	225	7446-34-6	288	10326-27-9	10	26471-62-5	358
2385-85-5	211	3567-69-9	22	7446-34-6	357	13171-21-6	285	26628-22-8	289
2425-85-6	338	5131-60-2	340	7487-94-7	206	13366-73-9	286	27323-18-8	8
2429-74-5	160	5307-14-2	328	7681-49-4	117	13463-67-7	133	28407-37-6	161
2432-99-7	149	5634-39-9	347	7772-99-8	119	13552-44-8	380	33229-34-4	270
2438-88-2	126	5989-27-5	202	8001-35-2	331	15481-70-6	291	33857-26-0	39
2475-45-8	309	6358-85-6	35	8024-37-1	142	16071-86-6	308	39300-88-4	124
2489-77-2	247	6369-59-1	292	9000-01-5	66	17026-81-2	295	54150-69-5	267
2602-46-2	162	6373-74-6	306	9000-30-0	65	17924-92-4	252	55566-30-8	131
2783-94-0	61	6459-94-5	307	9000-40-2	73	18662-53-8	218	59820-43-8	272
2784-94-3	345	6471-49-4	256	9005-65-6	105	19010-66-3	275	61702-44-1	262
2832-40-8	337	6533-68-2	114	10028-15-6	329	20941-65-5	57	108171-26-2	167
2835-39-4	148	6959-47-3	260	10034-96-5	77	21739-91-3	315	108171-27-3	168

## 日・米・EU 三極医薬品規制 ハーモナイゼーション国際会議 (ICH) 資料

近年ガイドラインの国際的調和が盛んに検討されており、その1つとして医薬品規制国際ハーモナイゼーション会議 (ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use) がある。ここでは、遺伝毒性の専門家会議が1992年より開かれ、継続的に論議が行われた結果、最終的に合意に達したのがICHガイドライン「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス」である。これは、ガイドラインの全ての項目を取り上げたのではなく、国際調和のために重要である特定項目をとりあげ、その中で合意に達したものが示されている。この全文は平成8年7月に都道府県に通達され、現在はこの特定項目ガイダンスに従った試験結果も従来の本邦ガイドラインに従った試験結果も共に受け入れられる状況にある。

合意に達しなかった重要な問題としては、標準的な試験の組合せの内容と *in vitro* 試験での再試験の必要性である。これらについても平成8年8月にICHの専門家会議で合意に達し、「医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ」としてまとめられ、現在日米欧において国内でコメントを収集している段階である。これが最終的に合意に達した時点で、本邦のガイドラインも全面的に改訂が行われる運びとなっている。

国立衛生試験所・変異遺伝部 祖父尼俊雄

### 医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関する ガイダンスについて

医薬品の製造（輸入）承認申請に際し添付すべき資料のうち、毒性に関する資料については、平成元年9月11日薬審1第24号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」及び平成6年7月7日薬審第470号通知別添「生殖毒性検索のための試験法ガイドライン」により取り扱っているところであるが、このうち、変異原性試験に関して、別添のとおり「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス」を定めたので、下記事項を御了知の上、貴管下医薬品製造（輸入販売）業者に対する周知方よろしく願いたい。

記

#### 1. 背景

近年、優れた医薬品の国際的な研究開発の促進及び患者への迅速な提供を図るため、承認審査資料の国際的なハーモナイゼーション推進の必要性が指摘されている。このような要請に応えるため、日・米・EU三極医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議 (ICH) が組織され、品質、安全性、有効性及び規制情報の4分野でハーモナイゼーションの促進を図るための活動が行われている。今回の「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス（以下「ICHガイダンス」という。）の制定は、三極の合意に基づき行われるものである。

#### 2. ICHガイダンスの要点

標記ガイダンスは、日・米・EUのそれぞれの遺伝毒性試験に関するガイドラインの主要な相違点を取り上げ、現在の科学技術水準を考慮して相互に受け入れ可能な基準として作成されたものである。従って、平成元年

9月11日薬審1第24号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」のうち「変異原性試験」（以下「現行ガイドライン」という。）については、ICHガイダンスに該当項目がある場合にはその指摘に基づいて試験を実施し、それ以外の項目については現行ガイドラインに従って実施すればよい。

ICHガイダンスと現行ガイドラインとの主な相違点は次のとおりである。

(1) 細菌を用いる復帰突然変異試験においては、用いる試験菌株をサルモネラ菌 TA98, TA100, TA1535 の3菌株に加えて、TA1537またはTA97またはTA97aのうち1菌株、およびTA102または大腸菌 WP2 *uvrA* または WP2 *uvrA* (pKM101) のうちの1菌株、の合計5菌株とした。

(2) *In vitro* 試験における最高用量は、現行ガイドライン及びその解説に示されている内容に従って設定された場合は、基本的にICHガイダンスに適合するものであるが、難溶性物質の場合で細胞毒性が全く観察されない場合には、最高用量は沈殿が析出する最低濃度としてよい。

(3) *In vivo* で染色体異常を検出するためには、現行ガイドラインに示されたげっ歯類による小核試験を実施することで問題はないが、マウスを用いる場合には末梢血を用いた試験も骨髓小核試験と同様に受け入れることができる。また、用いる動物の性は現行ガイドラインに示されているように特段性差に問題がない場合には雄のみでよい。

(4) げっ歯類を用いる小核試験の結果が陰性となった場合には、幼若赤血球の割合の減少、血中もしくは血漿中の被検物質の測定などによって、被検物質が標的臓

器に到達していることを確認する。

### 3. ガイダンスの取扱い

(1) この通知の施行の日より、ICH ガイダンスに該当項目がある場合にはその指摘に基づいて実施された試験による資料を医薬品の製造（輸入）承認申請に際し添付すべき毒性試験に関する資料とすることができる。

(2) 現行ガイドラインに基づいて実施された試験による資料は、当分の間、引き続き、医薬品の製造（輸入）承認申請に際し添付すべき毒性試験に関する資料とすることができる。

### 4. その他

今後、現行ガイドラインを改正し、ICH ガイダンスとの整合を図る予定である。

ICH INTERNATIONAL CONFERENCE ON  
HARMONISATION OF TECHNICAL  
REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION  
OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE  
STEP 4 FINAL DRAFT—JULY 18, 1995  
GENOTOXICITY:  
GUIDANCE ON SPECIFIC ASPECTS OF  
REGULATORY GENOTOXICITY TESTS  
医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に  
関するガイダンス

### 1. 緒言

医薬品のための遺伝毒性試験ガイドラインは、EC (EEC, 1987) および日本 (厚生省, 1989) では既に制定されている。FDA の Centers for Drug and Biologics Evaluation and Research (CDER and CBER) では、FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition が発表した遺伝毒性試験のガイダンス (Federal Register notice, 1993年3月29日付け) を医薬品に適用することを検討中である。

下記のガイダンスは、USA, EC および日本の現行ガイドラインに共通して適用されるべきものである。下記の勧告は、国際的製薬業界、日米欧の行政官庁ならびに科学論文などに蓄積された情報を考慮して作成されたものである。さらに、最新の OECD ガイドライン (OECD, 1994) や 1993 年に開催された「遺伝毒性試験法の標準化に関する国際ワークショップ」(Mutation Research, No. 312 (3), 1994) の勧告についても考慮している。

### 2. 特定項目に関するガイダンスおよび勧告

#### 2.1. *In vitro* 試験の特定項目に関するガイダンス

##### 2.1.1. 細菌による突然変異試験に用いる菌株の基本セット

最近のガイドラインでは、塩基対置換およびフレーム

シフト点突然変異を検出するための細菌による変異原性試験には、複数の菌株を用いることが要求されている。ガイドラインに記載されている *Salmonella typhimurium* の菌株 (通常は TA1535, TA1537, TA98 ならびに TA100) では、標的となっているヒスチジン遺伝子中の G-C (guanine-cytosine) 部位の変化が検出できる。ある種の変異原性を有する発がん物質は、A-T (adenine-thymine) 塩基対も修飾することが文献から明らかにされている。そのため、細菌を用いる変異原性試験に使用される菌株の標準的なセットには、A-T 部位で点突然変異を検出できる菌株を含むべきである。例えば、マルチコピープラスミドの *hisG* 遺伝子中の A-T 部位の変異が検出できる *Salmonella typhimurium* TA102 株や、*trpE* 遺伝子において A-T 部位の変異を検出できる *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 株あるいは誤りがち修復を増大させる *mucAB* 遺伝子をもつ pKM101 プラスミドを導入した *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101) 株がそれに該当する (注1参照)。結論として、次の菌株の基本セットをルーチンの試験で使用すべきである: なお、他に明記しない限り下記の菌株は全て *Salmonella typhimurium* である。

1. TA98; 2. TA100; 3. TA1535;
4. TA1537 または TA97 または TA97a (注2参照);
5. TA102 または *Escherichia coli* WP2 *uvrA* または *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101)。

DNA とクロスリンクする化合物を検出するためには、*Salmonella typhimurium* TA102 株を選択するか、あるいは DNA 修復能を有する *Escherichia coli* WP2 (pKM101) 株を追加することが望ましい。ただし、そのような化合物は染色体損傷を測定する試験でも検出可能であることを付け加えておく。

#### 2.1.2. *In vitro* 試験における最高用量の定義

##### 2.1.2.1. 毒性を示さない化合物の最高用量

溶解性が良くかつ毒性を示さない化合物の処理濃度の上限は、細菌では 5 mg/plate、哺乳類細胞では 5 mg/ml または 10 mM (いずれか低い方) とする。

##### 2.1.2.2. 必要な細胞毒性のレベル

遺伝毒性を有する発がん物質のいくつかは、ある程度細胞毒性を誘発するような濃度で試験しない限りは、*in vitro* 遺伝毒性試験では検出できない。一方、過剰な毒性により、該当する遺伝的指標の適切な評価がしばしばできなくなることも明かである。確かに、哺乳類細胞では生存率が極めて低い場合、遺伝毒性作用以外のメカニズムにより、遺伝毒性ではなく細胞毒性に関連した「陽性」結果が得られることがある (例えば、アポトーシスと関連した事象、ライソゾームからのエンドヌクレアーゼの放出など)。このような現象は、毒性物質のある特定濃度閾値に達したときに初めて現れる傾向にある。

このような矛盾を解決するため、最近では細菌および哺乳類細胞を用いる *in vitro* 試験には、細胞毒性のレベ

ルに関し次のような考え方が受け入れられている (2.1.2.1. で規定した濃度を越えない):

i) 細菌を用いる復帰突然変異試験では、試験物質の最高濃度は明かな毒性を示すことが望ましい。毒性は、復帰変異コロニー数の減少、background lawn の減少や透明化によって検出できる。

ii) 株細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学的試験のために必要な細胞毒性のレベルは、細胞数または単層培養密度の 50% 以上の抑制と定義される。培養リンパ球では 50% 以上の分裂指数の抑制があれば十分である。

iii) 哺乳類細胞を用いる突然変異試験では、理想的に最高濃度は少なくとも 80% の毒性 (20% 以下の生存率) を示すべきである。毒性は、処理直後のコロニー形成率 (cloning efficiency) からでも、相対増殖率 (relative total growth) からでも算出できる。相対増殖率は、発現期間中の相対浮遊細胞増殖率 (relative suspension growth) と突然変異を選抜する際の相対プレート効率 (relative plating efficiency) から算出される。10% 以下の生存率で得られた陽性結果には注意を払う必要がある。

#### 2.1.2.3. 難溶性化合物に対する試験

細菌および哺乳類細胞を用いる遺伝毒性試験では、用量相関性のある遺伝毒性作用が、化合物が不溶の濃度範囲で検出されることがある。これには用量に相関した毒性を伴っていることが多い (注3参照)。培養液中の血清もしくは S9 mix の成分により沈澱物の溶解性が増す可能性がある。また、脂溶性物質は細胞膜の脂質により細胞内への透過性が促進されることも考えられる。さらに、ある種の哺乳類細胞 (例えばチャイニーズ・ハムスターの V79, CHO ならびに CHL 細胞) は細胞膜の陥入による細胞外物質の取り込み機能を有し、固形粒子を摂取し、その後細胞質中に分散させる。不溶性の化合物のうちあるものは、遺伝毒性を示す可溶性の不純物を含んでいるかも知れない。また、いくつかの不溶性の医薬品は、懸濁液もしくは微粒子成分としてヒトに投与されることにも注意する必要がある。

一方、重い沈澱物ができる場合には、必要なパラメータの測定が妨げられたり、被験物質処理の調節が困難になったり (例えば、被験物質を添加した培養液より細胞を取り出すために遠心分離の操作が試験プロトコルに含まれている場合) (注4参照)、あるいは被験物質が細胞内に入り DNA に作用することが妨げられたりする。

下記の方法は、比較的難溶性化合物を試験するために提示されたものである。なお、下記の勧告は培養液中の被験物質を対象とする。

細胞毒性が全く観察されない場合には、最高用量は沈澱が析出する最低濃度とするが、細菌を用いる試験では 5 mg/plate、哺乳類細胞を用いる試験では 5 mg/ml もしくは 10 mM を上限として良い。用量相関性のある細胞毒性あるいは突然変異が認められる場合には、溶解性に

関係なく、最高濃度は上記の細胞毒性を基準として決定する。この場合通常、沈澱の見られる濃度が2用量以上 (上記の用量を越えない) あることが望ましい。沈澱物が試験の測定を妨げる場合には、要求されている細胞毒性のレベルが得られなくても良い。全ての場合において、沈澱物は処理の開始と終了時に、肉眼で観察すべきである。

### 2.2. *In vivo* 試験の特定項目に関するガイダンス

#### 2.2.1. *In vivo* で染色体異常を検出するために受け入れられる骨髄を用いる試験系

げっ歯類骨髄の有核細胞で染色体異常を観察する試験では、さまざまな染色体の変化を検出することができる。これらの変化のほぼ全ては、まず最初の事象として生じた1~数ヶ所の染色分体の切断に起因する。染色分体あるいは染色体の切断により動原体を持たない染色体断片が生ずると、小核が生成される。従って、染色体異常または小核を検出する試験は、ともに染色体異常誘発物質の検出系として共に受け入れられる (注5参照)。小核は1本以上の染色体が分裂装置から離脱することによっても形成されるので、小核試験で異数性誘発物質を検出できる可能性がある (注6参照)。

結論として、*in vivo* での骨髄細胞における染色体異常または小核を有する多染性赤血球の解析は、染色体異常誘発物質の検出系として共に受け入れられる。マウスあるいは他の動物種でも、小核を持つ赤血球が脾臓で除去されないことが示されているか、または染色体異常/異数性誘発物質を検出できる十分な感度が認められる場合には、末梢血中の小核を持つ未成熟 (例: 多染性) 赤血球での測定が、骨髄でのそれと同等に受け入れられる (注7参照)。

#### 2.2.2. 骨髄小核試験における雌雄げっ歯類の使用

マウスの骨髄小核試験における既知染色体異常誘発物質の作用に関する広範な研究により、雄のほうが雌に比べて小核誘発作用の感受性が高いことが示されている (注8参照)。小核誘発作用においては、性により反応の量的相違はあるが、質的な相違のないことが確認されている。顕著な量的相違がある場合には、例外なく性による毒性の違いがある。雌雄間で代謝物の質的相違が明確にある場合には、小核試験には雌雄両方用いるべきである。同様の原則が、他の *in vivo* 試験にも適用される (注9参照)。骨髄小核試験には、ラットとマウスの両者が使用できると考えられる (注10参照)。

要約すると、げっ歯類の雌雄間において、毒性あるいは代謝に明らかな相違がない場合には、骨髄小核試験に使用するのは雄だけで十分である。特定の性のみ用いる薬剤を試験する場合には、該当する性を使用すべきである。

### 2.3. 試験結果の評価のためのガイダンス

*In vitro* 試験系では、げっ歯類の発がん性予測に対して偽陰性および偽陽性の両方の結果が生じることが、試

験結果の比較から明らかにされている。(In vitro および in vivo の) 遺伝毒性試験の組合せは、多くの既知ヒト発がん物質のように主に直接的に遺伝的傷害を惹起するような発がん物質を検出する。従って、これらの試験の組合せでは非遺伝毒性発がん物質は検出できない。In vitro での代謝活性化系には能力に限界があるように、試験条件によっても偽陰性の結果が導き出されることがある。遺伝毒性を示す化合物が偽陰性となる危険性を減少させるように試験の組み合わせがデザインされているが、ある遺伝毒性試験で陽性となったとしても、必ずしもその化合物がヒトに対して遺伝毒性/発がん性の危険性を持つことを意味するものではない

### 2.3.1. In vitro 試験結果の評価のためのガイダンス

#### 2.3.1.1. In vitro 試験での陽性結果

In vitro 試験での陽性結果の妥当性が疑われるような、いくつかの状況があることが文献により報告されている。そのため、全ての in vitro 試験での陽性結果について、以下の事項を考慮してその生物学的な妥当性を評価しなければならない。(以下の項目は全てを網羅したものではないが、判定を下すための一助となろう)

- 陰性あるいは溶媒対照の背景データ以上に増加し、意義のある遺伝毒性的な影響と考えられるか?
- 濃度依存性があるか?
- 弱い/不確定な反応については、その反応に再現性があるか?
- その陽性結果は、in vitro 特有の代謝経路/代謝物による結果ではないか? (注 12 参照)
- その作用は in vivo の状況では起こり得ない極端な培養条件に起因していないか? (例: 極端な pH, 浸透圧, 特に細胞懸濁液での重い沈殿) (注 4 参照)
- 哺乳類細胞において、その作用は生存率が極めて低い場合にのみ見られるか? (2.1.2.2. 項受け入れ可能な毒性レベルについてを参照)
- その陽性結果は不純物に起因していないか (化学構造的に危険性が考えられない、変異原性が弱い、あるいは非常に高用量でのみ変異原性を示す場合には、このようなケースの可能性はある)?
- その遺伝毒性の指標において得られた結果は、類縁化合物でも確認されているか?

#### 2.3.1.2. In vitro 試験での陰性結果

In vitro 試験で陰性の場合には、次のような特別な考慮をすべきであろう (ここに掲げた例は全てを網羅したものではないが、判断を下すための一助となろう): 被験物質の構造やその既知の代謝経路から考えて、標準的な in vitro 代謝活性化法 (例えばげっ歯類肝 S9) が不適切でないかどうか?あるいは、被験物質の構造や反応性から考えて、他の試験方法/他の試験系の方が適切であるかどうか?

### 2.3.2. In vivo 試験結果の評価のためのガイダンス

In vivo 試験には、その性質上、ヒトに使用した場合に関連する吸収、分布ならびに排泄という in vitro 試験にはない要素を持つ利点を有する。さらに、代謝系としては in vitro で通常使用されている系と比べると、in vivo の系の方がより適切である。妥当な遺伝毒性の評価系として受け入れられている in vivo 試験系は少ない。それらの中に、骨髄あるいは末梢血を用いる細胞遺伝学的試験がある。In vitro 試験の結果が陰性の場合には、1種類の in vivo 細胞遺伝学的試験を実施すれば (遺伝毒性の評価は) 通常十分である。

1つ以上の in vitro 試験で生物学的に意義のある陽性結果を示す物質 (2.3.1.1. 参照) においては、骨髄や末梢血を用いる細胞遺伝学的試験に加え、他の組織を用いた in vivo 試験により更に有用な情報の得られることがある。In vivo で暴露される標的細胞や、in vitro で検出される遺伝的指標により、追加する in vivo 試験の選択基準が判る。しかし、有効性が確認され、広く使われている in vivo 遺伝子突然変異試験系はない。ラットやマウスの各組織の内在性遺伝子や導入遺伝子を用いた in vivo 遺伝子突然変異試験は様々な開発段階にある。このような突然変異のための試験が受け入れ可能となるまでは、骨髄以外の組織を用いた in vivo 試験の結果を、重要な追加データとして提出してもよい。しかし、この場合の in vivo 試験は科学的に妥当なものを選択すべきである (注 11 参照)。

In vivo 及び in vitro 試験の結果が一致しない場合は、ケースバイケースで結果の違いに対する考察あるいは説明が必要である (2.3.1.1., 2.3.2.1. 及び注 12 参照)。

結論として、被験物質の遺伝毒性の評価には、得られた結果を総合的に判断し、in vitro および in vivo 試験両方の本質的な価値と限界を考慮しなければならない。

#### 2.3.2.1. In vivo 試験で陰性の場合の標的臓器での暴露証明の原則

In vivo 試験は遺伝毒性試験の考え方の上で重要な役割を持つ。遺伝毒性試験における in vivo 試験結果の意義は、被験物質による標的組織の適切な暴露証拠に直接関係する。In vitro 試験で確実に遺伝毒性が検出されているのに、in vivo 試験では陰性となる場合がある。たとえ問題の組織内で生物学的応答 (例: 毒性) を引き出すに十分な用量が望ましいとしても、標的組織以外の組織で毒性が観られて用量限界に達するため、標的組織でそのような用量に到達しえないことがある。このような場合にはトキシコキネティクスのデータを生体への取り込みの証拠とすることが出来る。例えば標的組織への取り込みが非常に低い場合や蛋白結合が非常に強い場合などのように、被験物質が適切に暴露されていない場合には、通常の in vivo 遺伝毒性試験はほとんど意味をなさないものと考えられる。

以下の勧告は、一例として骨髄細胞を用いる細胞遺伝

学的試験系に適用される。なお、他の標的組織を用いる場合にも、同様の考え方で対処する。

いずれかの in vitro 試験で陽性の結果を示した被験物質について、下記の方法のいずれかにより in vivo での暴露の証拠を示さねばならない。

- 小核試験においては、試験と同一用量および同一標本作製時期における、全赤血球に対する幼若赤血球の割合の有意な変化、染色体異常試験においては分裂指数の有意な減少。
  - 血中もしくは血漿中における被験物質またはその関連物質の測定による生体への取り込みの確認 (注 13 参照)。
  - 骨髄中での被験物質またはその関連物質の直接的測定。
  - オートラジオグラフィによる組織暴露の評価。
- ii)~iv) の方法においては、できうれば骨髄を用いる試験と同じ動物種、系統、および投与経路を用いて、最高用量あるいは適切な用量について行われるべきである。

In vitro 試験で遺伝毒性が認められなかった場合においても、やはり in vivo (全身) 暴露の証拠が必要であり、上記の方法を用いて証明することもできる。なお、げっ歯類における標準的な吸収、分布、代謝、排泄 (ADME) 試験の結果から推察してもよい。

#### 2.3.2.2. 生殖細胞に対する変異原物質の検出

生殖細胞に対する変異原物質の検出に関する比較研究の結果は、ほとんどの生殖細胞変異原物質は恐らく体細胞を用いた試験で定性的に検出できることを示している。したがって、in vivo 体細胞遺伝毒性試験で陰性の場合には、概して生殖細胞に対する作用もないことを示している (注 14 参照)。

### 3. 注

- 基本セットの菌株の中に A-T 部位を標的とする菌株を含めた場合に検出できる遺伝毒性発がん物質のあることが文献的に知られている (e.g. Levin et al., 1983; Wilcox et al., 1990). 日本の労働省の 5526 化合物についてのデータベース (および各種製薬企業の小規模なデータベースでも裏付けられている) の解析を行った結果、細菌で変異原性が認められている物質のうち、標準的なサルモネラ 4 菌株では検出できず、大腸菌 WP2 uvrA 株のみで検出されるものが約 7.5% であった。これらの化合物の動物の発がん性データは不明だが、標準的なサルモネラ菌株で変異原性を示す物質と同様に発がん性の可能性があると思われる。
- TA1537, TA97 および TA97a はいずれも、標的のヒスチジン遺伝子座のシトシン連続部分が変異検出部位であり、このフレームシフトのホットスポットに塩基の欠失を誘発するようなフレームシフト変異原に対して同様に感受性を示す。この 3 菌株はいずれ

を使用してもよいことが 1993 年にメルボルンで開催された「遺伝毒性試験法の標準化に関する国際ワークショップ」(Gatehouse et al., 1994) で合意され、ここでもその決定に賛成する。

- 遺伝毒性試験を実施している日本の施設は、沈澱状態での試験経験が豊富であり、沈澱する範囲の濃度でのみ明確な遺伝毒性を示す物質の例を確認している。これらの化合物には、ポリマーや混合物、polycyclic hydrocarbon 類、phenylene diamine 類、heptachlor などが含まれる。これらの化合物のいくつかを用いた共同研究から、これらの化合物は溶解濃度域で遺伝毒性を検出できる可能性もあるが、不溶濃度域においても遺伝毒性活性が明確に上昇することが明らかにされているようである。これらの事項の討議が、メルボルンでの会議の 'in vitro' サブグループの報告書 (Kirkland, 1994) に記載されている。
- 沈澱状態で化合物を試験する場合には、浮遊して増殖する細胞を用いる試験では、暴露時間を明確にするという点で問題がある。所定の暴露時間の後、通常遠心分離により細胞をペレットとして集め、その後、被験物質を含まない新鮮な培地に再浮遊させる。もし沈澱物が存在すれば、その化合物は試験の後半まで持ち込まれ、暴露時間の調節が不可能となる。このような細胞 (例: ヒト末梢リンパ球やマウスリンパ腫細胞) を用いる場合は、最高濃度として最低沈澱濃度を使用するのが妥当である。
- 小核誘発機構は染色体異常誘発機構と関連しているため (例えば, Hayashi et al., 1984 and 1994; Hayashi, 1994), 小核および染色体異常はいずれも化学物質の染色体異常誘発作用を検出する系として受け入れることができる。同じ化合物について行われた、マウス小核試験とラット骨髄細胞の分裂中期での染色体異常解析データを比較すると、質的 (染色体異常誘発性の検出率) および量的 (染色体異常を示す最低用量) により相関関係がみられる。同種動物のデータでは更によい相関関係が期待できる。
- 化合物が紡錘体に作用し染色体の移動に遅滞が生じたために小核が形成されることもあるが、小核試験ではすべての異数体誘発物質を検出する訳ではない。異数性の特異的検出系に近い将来利用できるようになるであろう。Fluorescence in situ hybridisation (FISH) 法のように、間期の核の個々の (哺乳類) 染色体を迅速にしかも高感度に識別できる方法が開発されている。
- アクリジンオレンジ超生体染色法を用いたマウス末梢血小核試験が Hayashi ら (1990) により開発された。この試験は、日本の小核試験共同研究グループの最近の共同研究テーマであった (Mutation Research (1992) 278, Nos. 2/3). 種々の作用を持つ 23 化合物について、CD-1 マウスを用いて共同研究が

実施された。同一個体から投与後 0, 24, 48, 72 時間目 (またはそれ以上) に末梢血を採取し観察した。原則として一つの化合物を異なる 2 施設で試験した (46 機関が参加した)。その結果、全ての化合物が小核誘発物質として検出された。施設間で、結果に量的な差はあったが質的な差はなかった。ほとんどの化合物は投与後 48 時間目に最大の反応を示した。これらの結果より、アクリジンオレンジ超生体染色法による末梢血小核試験は、再現性があり化合物の染色体異常誘発作用を評価できる信頼性のあるデータが得られる試験法であることが示唆された。これらのデータに基づいて、メルボルンでのワークショップでこの試験法は骨髓小核試験と全く同等であると結論された (Hayashi *et al.*, 1994)。ラットを用いる末梢血小核試験については、日本の小核試験共同研究グループにより有効性を確認中である。

- 8) この問題については詳細な共同研究が実施されており (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, 1986), この研究から、一般に小核の誘発は雄マウスの方が雌マウスより感受性が高いことが示されたが、その相違は質的なものではなく量的なものであった。この解析は、メルボルンでの国際ワークショップで小核試験検討グループに引き継がれ、53 の *in vivo* 染色体異常誘発物質 (および 48 の非染色体異常誘発物質) についてデータが分析され、同じ結論に達した (Hayashi *et al.*, 1994)。
- 9) 小核と染色体異常の誘発には関連性があるので、骨髓染色体異常試験における雄動物の使用について、同一条件を適用するのが適当といえる。末梢血小核試験は、*ex vivo* UDS 試験 (Kennely *et al.*, 1993; Madle *et al.*, 1994) と同様に、雄のげっ歯類でのみその有効性が確認されている (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, 1992)。
- 10) ラット、マウスはともに骨髓小核試験の使用に適した動物種である。しかし、いくつかの種特異的な発がん物質が、その種特有の遺伝毒性物質であるというデータが蓄積されつつある (例: Albanese *et al.*, 1988)。さらにデータが集まると、ラットとマウスの両方で小核試験を実施するケースが出てくる可能性がある。
- 11) *In vivo* 試験のデータベースとしては、骨髓細胞を用いる細胞遺伝学的試験以外では、肝細胞を用いる不定期 DNA 合成 (UDS) 試験が最大である (Madle *et al.*, 1994)。肝臓 UDS 試験と骨髓小核試験を組み合わせると偽陽性がほとんどなく、大部分の遺伝毒性発がん物質を検出できるという文献調査報告がある (Tweats, 1994)。この組合せによっても偽陰性となるような不安定な遺伝毒性物質およびある種の芳香族アミンは、既存の多くの *in vivo* 検出系にとって問題となる物質である (Tweats, 1994)。それ故、化合

物によっては他の試験 (例: 32P ポストラベリング法、DNA 鎖切断試験など) の方がより適切な場合があるので、2 次選択試験として UDS 試験に限定すべきではない。これらの *in vivo* 試験の指標と突然変異との相関は明確にわかっている訳ではないことを認識することが大切である。

- 12) *In vitro* 試験と *in vivo* 試験の結果の相違に関する考え方の例は文献に記載されている。それらは、(i) *in vitro* 系で生成した活性代謝物は *in vivo* では生成しない可能性、(ii) 活性代謝物が *in vivo* 系では速やかに解毒されてしまうが、*in vitro* では解毒されない可能性、(iii) *in vivo* では素早く排泄される可能性など。これらの具体例については既に記載されている (e.g. Ashby, 1983)。
- 13) 骨髓は血液がよく灌流する組織であり、そのため血液もしくは血漿中の薬剤関連物質の濃度は、骨髓中濃度と類似するものと推察される。このことは、多くの異なる医薬品について、これら 2 つの組織における薬剤濃度を直接比較することにより実証されている (Probst, 1994)。両組織の薬剤濃度は常に同じであるというわけではないが、血液と血漿中の薬剤濃度には、骨髓が暴露されていることを実証するのに十分な相関関係がある。
- 14) 減数分裂による配偶子形成過程に選択的に作用する異数体誘発剤のような特別な型の変異原物質がある可能性がある。しかし、そのような物質が存在するという明白な実験的証拠はない。

#### 4. 用語解説

異数性 aneuploidy: 細胞または生物種に固有な染色体基本数からずれていること。

塩基対置換 base substitution: 塩基配列において 1 つ以上の塩基が他の塩基と置き換わっていること。これにより元のとは異なる蛋白質が合成される可能性がある。

細胞増殖 cell proliferation: 細胞分裂して娘細胞をつくる能力。

染色体異常誘発物質 clastogen: 染色体の構造変化を引き起こす物質で、通常光学顕微鏡で検出可能。

コロニー形成率 cloning efficiency: 1 個の細胞がクローンを形成する割合。通常少量の細胞を適切な培養条件下で播種した後に測定する。

培養飽和密度 culture confluency: 培養における細胞密度の飽和状態 (一般的に細胞増殖は培養密度が最高になると抑制される)。

フレームシフト突然変異 frameshift mutation: 遺伝子の塩基配列に 1 個または 2 個の塩基が付加 (挿入) または欠失した突然変異 (遺伝コードの変化)。これにより、元のとは異なる、あるいは短い蛋白質が合成される可能性がある。

遺伝子突然変異 gene mutation: 単一の遺伝子またはその調節遺伝子の配列内に生じた恒久的な変化。変化としては点突然変異、挿入、欠失などがある。

遺伝的指標 genetic endpoint: 対象とする遺伝的变化の型またはそのクラス (例えば、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA 修復、DNA 付加体の生成など)。

遺伝毒性 genetic toxicity, genotoxicity: 誘発のメカニズムに関係なく、遺伝物質に生じた有害な変化の総称。

小核 micronucleus: 顕微鏡下で検出できる細胞質中の核 DNA の粒子; 染色体あるいは染色体断片を含んでいる。小核の大きさは通常主核の 1/20 以上、1/5 以下と規定される。

分裂指数 mitotic index: 染色体標本 (スライド) において、細胞分裂をしていない (間期) 細胞を含む全細胞中に占める各段階の分裂細胞の割合。

プラスミド plasmid: バクテリアの通常の遺伝子とは別の微小遺伝子。プラスミドは宿主の遺伝子に挿入されるか染色体外の微小粒子として存在する。

点突然変異 point mutations: 遺伝コードの変化のことで、通常は単一の DNA 塩基対に限定される。

多染色性赤血球 polychromatic erythrocyte: 細胞分化の途中にあるリボソームをもつ未成熟な赤血球で、成熟した正染色性赤血球 (リボソームを欠く) とはリボソームの特異染色により容易に判別ができる。

生存 (率) survival (変異原性試験における): 死細胞を含む全細胞に占める生存細胞数の割合で、通常ある期間薬物処理した後に染色しコロニー数を測定することにより判定する。

不定期 DNA 合成 (UDS) unscheduled DNA synthesis (UDS): DNA 損傷によって誘発される S 期以外の DNA 合成。通常 DNA の除去修復と関連している。

#### 参考文献

- Albanese, R., Mirkova, E., Gatehouse, D. and Ashby, J. (1988). Species-specific response to the rodent carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and 1,2-dibromochloropropane in rodent bone marrow micronucleus assays. *Mutagenesis*, **3**, 35-38.
- Ashby, J. (1983). The unique role of rodents in the detection of possible human carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.*, **115**, 177-213.
- EEC (1987). Notes for Guidance for the Testing of Medical Products for their Mutagenic Potential, Official Journal Eur. Comm., L73.
- Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Ohta, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Report from the working group on bacterial mutation assay: International workshop on standardisation of genotoxicity test procedures. *Mutat. Res.*, **312**, 217-233.
- Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1984). Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberration in mouse bone marrow. *Mutat. Res.*, **127**, 129-137.
- Hyashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, **245**, 245-249.

Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, F. B. Jr., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.* (in press.).

Hayashi, M. (1994). Acceptability of *in vivo* MN and CA tests. In: P. F. D'Arcy and D. W. G. Harron (eds.) Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH2), Greystoke Books Ltd., Ireland, pp. 232-237.

Japanese Ministry of Health and Welfare (1989). Guidelines for toxicity studies of drugs.

Kenely, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I deG. (1993). *In vivo* rat liver UDS assay. In: Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, ed Kirkland, D. J. and Fox, M., Cambridge University Press, pp. 52-77.

Kirkland, D. (1994). Report of the *in vitro* sub-group. International workshop on standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutat. Res.*, **312**, 211-215.

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

Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1994). Recommendations for the performance of UDS tests *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.*, **312**, 263-285.

OECD Guidelines for Genetic Toxicology (1983, 1984, 1986) Published by OECD, Paris; latest revisions discussed at ad hoc committee meeting, Rome, September 1994.

Probst, G. (1994). Validation of target tissue exposure for *in vivo* tests. In: P. F. D'Arcy and D. W. G. Harron (eds.) Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH 2), Greystoke Books Ltd., Ireland, pp. 249-252.

The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, CSGMT (1986). Sex difference in the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **172**, 151-163.

The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS: MMS. *Mutat. Res.*, **278**, 83-98.

Tweats, D. J. (1994). Follow-up of *in vitro* positive results. In: P. F. D'Arcy and D. W. G. Harron (eds.) Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH2), Greystoke books Ltd., N. Ireland, pp 240-244.

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

(Nov. 12, 1996)

#### GENOTOXICITY: A STANDARD BATTERY FOR GENOTOXICITY TESTING OF PHARMACEUTICALS

遺伝毒性試験: 医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ

#### 1. 緒言

本ガイドラインは、医薬品の遺伝毒性試験において調和が必要と考えられる次の 2 つの基本領域: (1) 申請に必要な試験の標準的組合せ、(2) 標準的組合せにおける

*in vitro* 遺伝毒性試験の確認試験、について適用するものである。これ以外に調和が必要と考えられる項目については、ICH ガイドライン「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス」で示している。遺伝毒性に関するこれら2つのICH ガイドラインは互いに補い合うものであり、医薬品の遺伝毒性試験のためのICH ガイダンスの基本原則として両方一緒に用いるべきものである。

## 2. 遺伝毒性試験の一般的な目的

遺伝毒性試験は、種々のメカニズムで直接あるいは間接的に遺伝的な傷害を引き起こす物質を検出するために考案された *in vitro* および *in vivo* の試験と定義することができる。これらの試験は、DNA の損傷とその固定に基づく傷害を検出することができる。遺伝子突然変異、染色体の広範囲な損傷、組換えおよび染色体の数的変化といったDNA 損傷の固定は、一般的に遺伝性の影響の発現にとって不可欠なものであると考えられており、また、癌化の多段階過程では、遺伝的变化がその複雑な過程の一部を担っている可能性がある。このような傷害を検出する試験で陽性となった物質は、ヒトに対する発癌性物質や変異原性物質である可能性がある。すなわち癌や遺伝性疾患を引き起こす可能性がある。特定の化合物がヒトで発癌性を示すことが証明されているが、同様な関係を遺伝性疾患について証明するのは困難であるため、遺伝毒性試験は主に発癌性を予測するために用いられている。また、これらの試験結果は発癌性試験結果の解釈に有用である。しかしながら、ある物質が遺伝性の影響を引き起こすことが疑われた場合には、ある物質が癌を引き起こすことが疑われたのと同様に重大であると考えられる。

## 3. 遺伝毒性試験の標準的組合せ

医薬品の申請のためには遺伝毒性の総合的な評価が要求される。ただ1つの試験だけで全ての種類の遺伝毒性物質を検出できないことは明らかである。そのため、*in vitro* および *in vivo* の遺伝毒性試験を組合わせて実施するというのが通常の方法であろう。これらの試験は異なるレベルの階層的なものというよりむしろ相補的なものである。

試験の標準的組合せの一般的な特徴は以下の様に要約することができる：

i) 最初に細菌を用いる復帰突然変異試験で遺伝毒性を評価するのが適切である。この試験は意義のある遺伝的变化を検出し、遺伝毒性を示す齧歯類発癌性物質の大部分を検出できることが示されている。

ii) 哺乳類細胞においては適切であるが細菌で試験することが適切でないと考えられるDNA 損傷は、哺乳類細胞で評価しなければならない。いくつかの哺乳類細胞を用いる試験系が用いられている：広範囲な染色体損傷

を検出する系 (*in vitro* 染色体損傷試験)、遺伝子突然変異および染色体異常誘発性を検出する系 (マウスリンフォーマ tk 試験) および基本的に遺伝子突然変異を検出する系 (注1および2参照)。

*In vitro* 染色体損傷試験とマウスリンフォーマ tk 試験が染色体異常誘発物質の検出において同等であるか否かが議論されてきた。多くの研究結果が、報告された相違のほとんどは用いたプロトコルの違いによるものであることを示している。注3および4に述べている科学的な情報は、適切な試験プロトコルに従えば(第5章参照) 種々の *in vitro* 染色体損傷試験とマウスリンフォーマ tk 試験の結果は高い一致性があることを示している。このことより、これらの試験系は同等の感受性を持つものとして扱われ、上記の試験プロトコルが用いられていれば、規制を目的とする場合には両試験は互換できるものであると考えられている。それ故、規制を目的とする場合には、染色体損傷を評価する *in vitro* 細胞遺伝学的試験\* あるいはマウスリンフォーマ tk 試験での陰性の結果は、標準的組合せの他の試験で当該物質が遺伝的傷害を誘発しないことを更に保証するものである。いずれの場合においても、*in vitro* の遺伝毒性を評価するために用いる哺乳類細胞は、細胞種、試験プロトコルおよび被験物質の特性を考慮し、慎重に選択しなければならない。

iii) *In vivo* の遺伝毒性試験は、通常、試験の組合せの一部であり、ある物質の遺伝毒性活性に影響を与えるかもしれない付加的な要素(吸収、分布、代謝、排泄)が含まれてる試験系でなければならない。その結果、*in vivo* 試験で更にいくつかの遺伝毒性物質を検出することが可能になる(注5参照)。齧歯類の造血細胞を用いる染色体損傷のための *in vivo* 試験はこの要求を十分に満たしている。この齧歯類での *in vivo* 染色体損傷試験としては、骨髓細胞での染色体異常の解析でも、骨髓または末梢血赤血球での小核の解析でも良い。

上記の考察から、次のような標準的試験の組合せが導きだされる。

- i) 細菌を用いる遺伝子突然変異試験
- ii) 哺乳類細胞を用いる「*in vitro* 染色体異常試験」あるいは *in vitro* マウスリンフォーマ tk 試験
- iii) 齧歯類造血細胞を用いる染色体損傷のための *in vivo* 試験

最新の勧告に従って実施・評価したこの3試験の組合せにおいて陰性の結果を示す化合物は、通常、遺伝毒性活性を持たないという点では十分なレベルにあると考えられる。標準的試験組合せで陽性の化合物は、その臨床

\* 原文の "an *in vitro* test with cytogenetic evaluation of chromosomal damage" の直訳であるが、以降は「*in vitro* 染色体異常試験」と意識する

での使用形態にもよるが、より広範な検討をする必要があろう(ICH「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス」参照)。

ここでは、試験の標準的組合せを提示したが、これは他の遺伝毒性試験(たとえば、DNA 付加体、DNA 鎖切断、DNA 修復あるいは組換えを検出する試験)が一般に不十分であると不相当であると考えられているということの意味していない。これらの試験は、標準的組合せで得られた遺伝毒性試験結果をより詳細に検討するために、標準的組合せに加えてオプションとして利用することができる。標準的組合せを構成する1つあるいはそれ以上の試験において、技術的な理由から極端な条件下でしか試験が実施できないような場合には、有効性が確認された代替試験をその代わりとして利用できる。その場合には、標準的組合せの試験が妥当でないことを、十分に科学的な根拠により説明しなければならない。

標準的組合せは、染色体の数的変化、たとえば異数性や倍数性を検出するために特別に計画された試験を含んではない。しかしながら、この種の損傷に関する情報は、*in vitro* および *in vivo* の染色体損傷の細胞遺伝学的評価から得ることができる。

## 4. 3 試験組合せの変更

以下のセクションは標準的な3試験の組合せに変更が必要となる可能性のある状況を示している。

### 4.1 細菌を用いる試験系の利用の限界

細菌を用いる復帰突然変異試験を実施しても、遺伝毒性の評価において適切あるいは十分な情報が得られない場合がある。これには細菌に対し強い毒性を示す化合物(たとえば、ある種の抗生物質)や、哺乳類細胞の複製系を阻害することが知られている、あるいはそれが考えられている化合物(たとえば、トポイソメラーゼ阻害剤、核酸アナログ、あるいはDNA 代謝阻害剤)が該当する可能性がある。このような場合には、通常2つの異なった細胞種を用い、2つの異なった指標(遺伝子突然変異(注1参照)と染色体損傷)を検出する哺乳類細胞を用いる *in vitro* 試験の実施が必要である。一方、細菌を用いる復帰突然変異試験は、それが完全な試験であれ限定された試験(用量設定)であれ(第5章参照)、依然として実施することが重要である。

### 4.2 構造的に遺伝毒性が予想される化合物

構造的に有害性が予想される化合物(注6参照)は、通常は標準的3試験組合せで検出できる。しかしながら、*in vitro* 試験で標準的なラット肝S9による代謝活性化法を用い、かつ *in vivo* 試験で標準的なマウス赤芽球系細胞を用いるような標準的3試験組合せにおいて陰性結果を示すが、構造的に遺伝毒性が予想されるものについては、限定されたものであっても追加試験が要求される可能性がある。追加試験の選択やプロトコルの変更は、問題となる構造的に遺伝毒性が予想される化合物の

化学的性質、既知の反応性や代謝データに依存する(注7参照)。

### 4.3 新規/ユニークな化学構造/化合物グループ

比較的まれではあるが、全く斬新なあるいはユニークな化学構造あるいは機能(すなわちDNA 反応性)を有する化合物が医薬品として開発されることがある。そのような化合物は、たとえば構造的な遺伝毒性の予測、代謝活性化の必要性、あるいは細胞複製系の阻害という点で簡単には分類できない可能性がある。このような化合物の遺伝毒性作用を検出するためには、標準的3試験組合せ以外のもっと広範な試験、例えば哺乳類細胞を用いる *in vitro* 試験での詳細な検討、が必要となる可能性がある。

### 4.4 *In vitro* 試験のみを用いる医薬品の遺伝毒性試験

一般に行われている *in vivo* 試験を実施しても特別に有用な情報が得られない化合物がある。これには、全身的な吸収がなく、したがって *in vivo* 遺伝毒性試験の標的臓器(すなわち骨髄または肝臓)に到達できない化合物が含まれる。このような化合物の例として、ある種の造影剤、アルミニウムを主成分とする制酸剤およびいくつかの皮膚用の医薬品があげられる。このような場合には、*in vitro* 試験系のみで構成される試験の組合せが有用であり、細菌を用いる遺伝子突然変異試験、哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験(注1参照)および哺乳類細胞を用いる染色体損傷試験で構成されていなければならない。

### 4.5 癌原性試験との関連で考慮される追加の遺伝毒性試験

標準的3試験組合せでは陰性だが、癌原性試験において影響が認められ、それが非遺伝毒性的機構によるという明確な証拠がないような化合物に対しては、適切なモデルによる追加の遺伝毒性試験が必要となる可能性がある。作用機構の理解を助けるための追加試験には、*in vitro* 試験における代謝活性化の条件を変更することや、腫瘍誘発の標的臓器における遺伝毒性的傷害を検出する *in vivo* 試験(例えば、肝UDS試験、32P ポストラベル、導入遺伝子での突然変異誘発など)が含まれる。

## 5. 標準的組合せにおける *in vitro* 試験の標準的方法

実験結果の再現性は、斬新な方法による研究や予期しない知見が得られた研究にとって必須の要素である；しかしながら、標準化され広く用いられている遺伝毒性試験による化学物質のための定型的な試験では、完全な繰り返しを常には必要としない。これらの試験はその特性が十分に明らかにされており、また十分な内部コントロールを持っているので、プロトコル中に以下に示すような確認要素が組み込まれているならば、繰り返しは通常避けることができる。

遺伝子突然変異試験においては、報告された結果が正しいことを確認するのに十分なデータを提供する用量設

定試験がプロトコールに含まれていれば、完全な繰り返し試験は通常必要ではない。たとえば、細菌を用いる変異原性試験においては、すべての菌株を用い、代謝活性化の存在下と非存在下で、適切な陽性および陰性対照を設け、かつ変異体コロニーの計数が行われている予備的な用量設定試験は、引き続いて実施する本試験の十分な反復とみなして良い。同様に、マウスリンフォーマ tk 試験以外の哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験では、用量設定試験において、代謝活性化の存在下と非存在下で、適切な陽性および陰性対照を用い、かつ変異体の計数を行ってれば、その予備試験は完全な繰り返し試験の代替と十分に十分である(注8参照)。細菌および哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験においては、用量設定試験の結果を基に最終的な突然変異試験での用量を選択しなければならない。

染色体損傷を *in vitro* で細胞遺伝学的に評価する場合には、代謝活性化の存在下および非存在下で実施し、適切な陽性および陰性対照を用い、3~6時間処理し被験物質処理開始から1.5細胞周期後に標本作製することが試験プロトコールに含まれる。代謝活性化非存在下の短時間処理で陰性の場合には、代謝活性化非存在下で約1.5細胞周期の連続処理が必要である。もし細胞周期の遅延が甚だしい場合には処理時間あるいは標本作製時期の延長が必要である。代謝活性化存在下で陰性の場合には、ケースバイケースで確認試験を行う必要がある(注9参照)。どのような場合にも、分裂中期像に対する倍数性細胞の割合を記録して、倍数体誘発に関する情報をとるべきである。

マウスリンフォーマ tk 試験においては、代謝活性化の存在下および非存在下で実施し、適切な陽性及び陰性対照を用い、3~4時間被験物質で処理することが試験プロトコールに含まれる。代謝活性化非存在下の短時間処理で陰性の場合には、代謝活性化非存在下での24時間連続処理を行うことが勧告されている(注4参照)。代謝活性化存在下で陰性の場合の確認試験は、ケースバイケースである(注9参照)。どのような場合にも、マウスリンフォーマ tk 試験では、陽性および陰性対照、ならびに陽性が得られた場合には少なくとも最大突然変異頻度を得られた一用量で、コロニーサイズのデータが必要である。

上記の条件での試験で、明らかに陰性や陽性の結果が得られた場合には、通常はそれ以上の確認試験は不要である。

理想的には、試験結果が明らかな陰性あるいは明らかな陽性と確定できることである。しかし、時には試験結果が陰性や陽性の判定基準に合わないことがあり、その場合には「不確か(equivocal)」とせざるを得ない。このような状況下では、統計学的手法の適用が結果の解釈に役に立つ。しかし、ある種の標準的な遺伝毒性試験においては統計学的手法を利用して常に満足できるもので

はないので、適切な生物学的解釈が重要となる。試験結果を陽性あるいは陰性と判断する基準は、ある程度試験を実施する施設の経験と基準に基づかねばならない。「不確か」という判定基準とは、例えば適切な用量範囲にかかわらず用量依存性のないもの、試験結果が同時に実施した陰性対照値を越えているにもかかわらず、陰性対照の背景データの範囲内にある場合などである。

たとえ上記のようなプロトコールで得られた試験結果であったとしても、「不確か」と判断される場合には、通常確認試験を実施すべきことが指摘されている。

## 6. 注

- (1) 現在哺乳類細胞における遺伝子突然変異を評価するのに適切だと見なされている試験系には、L5178Y tk<sup>+</sup>/→tk<sup>-</sup>/マウスリンフォーマ試験(マウスリンフォーマ tk 試験)、CHO, V79 あるいは L5178Y 細胞を用いる HPRT 試験、AS52 細胞を用いる GPT-(XPRT) 試験およびヒトリンパ芽球様細胞 TK6 を用いる試験がある。
- (2) tk 遺伝子に生じた変異の遺伝子解析からは、点突然変異、欠失、転座、組換え等を含む広範囲な遺伝的変化が生じていることが示されている(例 Applegate ら, 1990)。小さなコロニーとなる変異体は、主として染色体の構造異常や数的異常、あるいは組換え等の遺伝的変異によ tk<sub>6</sub> 対立遺伝子が欠失していることが多いことが示されている(Blazak ら, 1989; El-Tarras ら, 1995)。もちろん hpert や gpt のような他の遺伝子にも広範囲な欠失に対して感受性を示すという証拠もある(Glatt, 1994; Kinashi ら, 1995)。しかしながら、hpert 遺伝子は X 染色体上にあり、恐らくその近傍には必須遺伝子が存在することから、広範囲な染色体損傷(欠失)や数的変化からはしばしば変異コロニーが発現せず、この試験の感受性の限界となる。それ故、マウスリンフォーマ tk 試験は、他の遺伝子突然変異試験に比べて有用性が高く、遺伝子突然変異試験としてはマウスリンフォーマ tk 試験が推奨される。マウスリンフォーマ tk 試験で陽性の場合には、生じた遺伝的傷害の種類あるいはメカニズムについて詳細な検討を要する場合もあるであろう。
- (3) 染色体損傷の細胞遺伝学的評価に関しては、最近用いられている試験系、すなわち哺乳類の樹立培養細胞株や全血あるいは単離したヒトリンパ球を用いた試験系では、同じ化合物で異なる結果が得られることは珍しいことではない。しかしながら、最近多くの試験機関で比較した「*in vitro* 染色体異常試験」では、異なる結果はしばしばプロトコールの違いによるものであることを明らかにしている(Galloway ら, 1996)。

細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性であるが、遺伝

毒性物質と推定された化合物の大部分は、*in vitro* 染色体損傷のデータとマウスリンフォーマ tk 試験の結果は一致している。最近のマウスリンフォーマ tk 試験の共同研究により、この関係がさらに確実なものとなった。厚生省と日本製薬工業協会のマウスリンフォーマ tk 試験 (MLA) に関する共同研究は、45 の日本の研究機関と7の海外研究機関が参加して実施された。その目的は、MLA が *in vitro* 構造異常および倍数性(異数性)誘発物質をどれくらい検出できるか、また MLA のみで陽性の化合物を「*in vitro* 染色体異常試験」でどの程度検出できるかを明らかにするためであった。公表されたデータを基に、細菌を用いる復帰突然変異試験では陰性だが、「*in vitro* 染色体異常試験」では陽性(30化合物)あるいは MLA では陽性(9化合物)の40化合物が選択された。これらの化合物について、L5178Y tk<sup>+</sup>/→3.7.2C 細胞を用いるマイクロプレート法により MLA が実施され、また、染色体異常誘発性については CHL/IU 細胞を用いて再試験が行われた。この共同研究結果の内容については、現在投稿中である(Matsuoka ら, 1996; Sofuni ら, 1996)。

以下の表には、種々の細胞(ヒトリンパ球、CHO, V79, CHL 細胞)を用いた「*in vitro* 染色体異常試験」とマウスリンフォーマ tk 試験とを比較した結果を示している。

34 の染色体異常陽性物質のうち、MLA では3化合物(9%)が陰性であった。これらの結果は、MLA で大部分の構造異常や倍数体誘発物質を検出できるが、検出できない化合物(bromodichloroethane, isophorone, tetrachloroethane)もあることを示唆している。Tetrachloroethane は倍数体のみを誘発し、一方 bromodichloromethane および isophorone では弱い構造異常誘発作用を示した。

NTP で報告された MLA のみで陽性になる10化合物(Zeiger ら, 1990)のうち9化合物を CHL/IU 細胞を用い、第5章で概説したようなプロトコールにより再検討したところ、3化合物のみが陰性であった。同じ9化合物について MLA 共同研究で再試験したところ、染色体異常が陰性の3化合物のうち2化合物(trichloroethylene および cinnamyl anthranilate)は陽性であった。これらの結果から、MLA に特異的な陽性物質というのは極めて限定されており、NTP 報告でのマウスリンフォーマ tk 試験に特異的に陽性を示す化合物の再試験が行われていない現時点では、trichloroethylene および cinnamyl ant-

hranilate のみが知られているだけである。

既存の文献データおよび規制当局のファイルデータを比較すると、MLA および染色体異常陽性物質の多くは、DNA の広範囲な再配列を検出できない HPRT 試験では陰性であった。

構造異常誘発物質のうちのほんの少数が、通常の3~4時間処理による MLA で陰性になることが報告されている(Garriott ら, 1995)。結論としては、医薬品の安全性試験という観点からは、マウスリンフォーマ tk 試験は *in vitro* での染色体の直接的な解析の代替として受け入れることができる。マウスリンフォーマ tk 試験において、変異体のコロニーサイズの解析を行っても、損傷のタイプに関しては限られた情報しか得られない(注2参照)。それ故、マウスリンフォーマ tk 試験で陽性の結果が得られた場合には、遺伝的損傷のタイプを明らかにするための追加検討が必要である。

- (4) 種々の化合物について検討された最近の研究結果では、マウスリンフォーマ tk 試験の構造異常/異数性誘発物質の検出力は、代謝活性化非存在下の24時間処理により増加することが報告されている。Colchicine, vincristine, diethylstilbestrol, caffeine, 2'-deoxycoformycin, dideoxycytidine, thiabendazole, theophylline, phenacetin, p-tert butylphenol および azidothymidine は、通常の3~4時間の処理(S9 mix 非存在下)のマウスリンフォーマ tk 試験では陰性もしくは極めて弱い陽性であるが、24時間処理では明らかな陽性となる(azidothymidine および caffeine は寒天法、他の化合物はマイクロプレート法の24時間処理の結果である)。
- (5) 標準的組合せの *in vitro* 試験、例えば細菌を用いる遺伝子突然変異試験と「染色体異常試験」、あるいは細菌を用いる遺伝子突然変異試験とマウスリンフォーマ tk 試験では陰性または弱い陽性あるいは矛盾した結果しか得られないが、骨髄の染色体損傷試験では明らかに陽性となる遺伝毒性を示す癌原性物質が少数ながら存在する。Procarbazine, hydroquinone, urethane ならびに benzene などの癌原性物質がこのカテゴリーに入る。
- (6) 化学構造的に有害性が予想される化合物の中には、発癌性や変異原性と関係すると考えられるものがある(Ashby と Tennant, 1988; Ashby と Tennant,

		染色体損傷 (主に構造異常)	染色体損傷 (主に倍数体)	染色体損傷
		陽性	陽性	陰性
マウス	陽性	21*	5*	2
リンフォーマ	Inconcl./equiv.	3	2	1
tk 試験	陰性	2	1	3

\* 7化合物(colchicine, 2'-deoxycoformycin, dideoxycytidine, phenacetin, p-tert butylphenol, theophylline, thiabendazole)はS9 mix 非存在化で、4時間処理ではなく24時間処理をした場合に MLA で明らかな陽性を示した。

1991; Ashby と Paton, 1993). そのような構造活性を有する例としては以下の様なものがある: alkylating electrophilic centers, unstable epoxides, aromatic amines, azo-structures, N-nitroso-groups, aromatic nitro-groups.

(7) ある種の特別な構造を有する化合物では, 遺伝毒性の検出に特別なプロトコールの変更や追加が必要である (例として, azo-group を含むもの, glycosides, 活性化に nitroreduction が必要な nitroimidazole のような化合物, 代謝活性化に他の哺乳類の S9 が必要な phencetin など). 構造活性を有する化合物が選択した 3 試験組合せで陰性となった場合には, このようなプロトコールの変更をした追加試験が必要となる.

(8) 用量設定試験では, (i) 当該化合物に細胞毒性がある場合には毒性作用の用量反応曲線の情報を得ること, (ii) 十分に毒性が認められる高い用量を含めること, (iii) 毒性のみられる用量範囲で変異体の計数を行うこと, が必要である. 当該化合物に細胞毒性がない場合においても, 変異体の計数は必要である.

(9) 通常, 同一の種類および濃度の代謝活性化系を用いて試験を繰り返す必要はない. しかし, 特別な代謝が必要な化合物については, 代謝活性化系の条件を変更する必要がある. この場合には, 通常, 当該物質の代謝活性化に適切であると認められている外来の代謝活性化系を使用する.

## Author Index (Vol. 18)

Araki, A.	18 ; 5	Katada, M.	18 ; 117	Sasaki, M.	18 ; 113
Clements, J.	18 ; 97	Kato, T.	18 ; 47	Sasaki, T.	18 ; 137
Fujimori, A.	18 ; 113	Kawanishi, S.	18 ; 63	Sasaki, Y.	18 ; 21
Futakuchi, M.	18 ; 67	Kikuchi, M.	18 ; 21	Sasaki, Y. F.	18 ; 125
Goto, Y.	18 ; 165	Kikugawa, K.	18 ; 47	Sato, S.	18 ; 79
Hakura, A.	18 ; 35	Kise, H.	18 ; 21	Sekiguchi, M.	18 ; 173
Hayashi, K.	18 ; 191	Koide, A.	18 ; 117	Shimada, H.	18 ; 103
Hayashi, M.	18 ; 107	Konishi, Y.	18 ; 117	Shimoi, K.	18 ; 15
Hayatsu, H.	18 ; 165	Kukita, Y.	18 ; 191	Shirai, T.	18 ; 67
Hiramoto, K.	18 ; 47	Maeda, H.	18 ; 53	Sofuni, T.	18 ; 107
Hirose, M.	18 ; 67	Makita, H.	18 ; 73	Sugie, S.	18 ; 73
Honma, M.	18 ; 107	Makita, H.	18 ; 73	Sugihara, Y.	18 ; 35
Horikawa, T.	18 ; 91	Matuzawa, M.	18 ; 41	Suzuki, H.	18 ; 29
Ichihashi, M.	18 ; 91	Mikami, T.	18 ; 35	Suzuki, N.	18 ; 29
Iimura, K.	18 ; 117	Mikamo, K.	18 ; 83	Tachibana, A.	18 ; 113
Ikushima, T.	18 ; 161	Miyasaka, R.	18 ; 41	Tahira, T.	18 ; 191
Imai, S.	18 ; 161	Miyoshi, K.	18 ; 41	Takahashi, M.	18 ; 117
Inazuka, M.	18 ; 191	Mochida, H.	18 ; 35	Takeshita, T.	18 ; 87
Inoue, J.	18 ; 63	Mori, H.	18 ; 73	Tanaka, T.	18 ; 73
Ishii, Y.	18 ; 161	Mori, Y.	18 ; 117	Tateno, H.	18 ; 83
Ishizuka, T.	18 ; 29	Morimoto, K.	18 ; 87	Tatsumi, K.	18 ; 113
Izumiyama, F.	18 ; 125	Negishi, T.	18 ; 165	Tsutsui, Y.	18 ; 35
Kamiguchi, Y.	18 ; 83	Nishidate, E.	18 ; 125	Wada, O.	18 ; 1
Kamiya, H.	18 ; 181	Nishino, H.	18 ; 63	Watanabe, K.	18 ; 137
Kasai, H.	18 ; 181	Nishioka, H.	18 ; 41	Watanabe, S.	18 ; 83
Kashima, S.	18 ; 41	Nohmi, T.	18 ; 169	Yamamori, H.	18 ; 29
		Ohsugi, R.	18 ; 79	Yamamoto, T.	18 ; 41
		Sagami, F.	18 ; 35	Yoshimi, N.	18 ; 73
		Sakamoto, K.	18 ; 137	Yoshimura, I.	18 ; 137

Keyword Index (Vol. 18)

acetaldehyde	18 ; 87	edible vegetable oils	18 ; 53
activated oxygen species (AOS)	18 ; 35	enviromental mutagens	18 ; 169
alcohol-drinking	18 ; 87	ESR	18 ; 63
aldehyde dehydrogenase	18 ; 87		
alkaline SCG assay	18 ; 125	flavonoid	18 ; 15
Ames assay	18 ; 21	flavonoids	18 ; 63
antimutagen	18 ; 15	fungi	18 ; 91
anti-oxidation	18 ; 73		
antioxydant	18 ; 67	gas exposure method	18 ; 5
anti-oxydants	18 ; 41	gas sampling bag	18 ; 5
antioxidation	18 ; 73	gaseous chemical	18 ; 5
antioxidative activity catechine	18 ; 15	gene mutations	18 ; 107
		gene targeting	18 ; 173
bacterial mutagenicity test	18 ; 137	genetic polymorphism	18 ; 87
bile acid	18 ; 117	green vegetables	18 ; 53
biologically-based pharmacodynamic model (BBPD)	18 ; 1		
		hamster liver S9-mix	18 ; 117
cancer risk	18 ; 79	hepatocarcinogenesis	18 ; 67
carbon-centered radical	18 ; 47	heterocyclic amines	18 ; 21
carcinogenesis	18 ; 53	high fat diet	18 ; 53
carotenoids	18 ; 73	house dust mite	18 ; 91
chemical agents	18 ; 83	HPLC/ <sup>32</sup> P-postlabeling method	18 ; 79
chemo-prevention	18 ; 67	human oocytes	18 ; 83
chemoprevention	18 ; 73	human RSa cells	18 ; 29
Chinese hamster cells	18 ; 161	human spermatozoa	18 ; 83
chromosome aberrations	18 ; 83	2-hydroxyadenine	18 ; 181
clastogen	18 ; 103	8-hydroxyguanine	18 ; 181
co-mutagen	18 ; 15	hydroxyl radical	18 ; 47
collaborative study	18 ; 137		
comet assay	18 ; 125	<i>in vivo</i> DNA repair test	18 ; 165
comutagenicity	18 ; 117	<i>in vivo</i> genotoxicity	18 ; 125
data analysis	18 ; 137	K- <i>ras</i>	18 ; 29
deletions	18 ; 113		
dioxin	18 ; 161	lipid radical	18 ; 53
DNA cleavage	18 ; 53	LOH	18 ; 113
DNA damage	18 ; 165, 169	loss of heterozygosity (LOH)	18 ; 107
DNA excision repair	18 ; 15	luteolin	18 ; 63
DNA repair	18 ; 169		
DNA repair methyltransferase	18 ; 173	Maillard reaction	18 ; 47
DNA replication	18 ; 169	mammary carcinogenesis	18 ; 67
domestic waste water	18 ; 21	metabolic activation	18 ; 117
<i>Drosophila melanogaster</i>	18 ; 165	metals	18 ; 91
		microbial mutagenicity test	18 ; 5
		microsatellite	18 ; 113

Keyword Index (Vol. 18)

molecular epidemiology	18 ; 1	radiation	18 ; 83
monitoring	18 ; 79	reactive oxygen species	18 ; 181
monofunctional alkylating agents	18 ; 165	recombination	18 ; 173
mouse lymphoma assay	18 ; 103	risk assessment	18 ; 1
multi-step carcinogenesis	18 ; 107	risk communication	18 ; 1
multiple organs	18 ; 125	river water	18 ; 21
mutagenesis	18 ; 173		
mutagenicity	18 ; 35	<i>Salmonella typhimurium</i> TA102	18 ; 35
mutation	18 ; 29, 181, 191	<i>Salmonella typhimurium</i> TA104	18 ; 35
<i>mutT</i>	18 ; 41	SCE	18 ; 161
<i>mutT</i> mutator	18 ; 173	sister chromatid exchange	18 ; 87
		small colony	18 ; 103
N <sup>7</sup> -methyldeoxyguanosine 3' mono-phosphate (7-MedGp)	18 ; 79	somatic recombination	18 ; 113
non-disjunction	18 ; 113	spontaneous mutation	18 ; 41
4NQO	18 ; 29	SSCP	18 ; 191
		statistical analysis	18 ; 137
organosulfur compounds	18 ; 73		
oxygen radicals	18 ; 63	The Mutagen Society of Japan	18 ; 169
		thymidine kinase ( <i>tk</i> ) locus	18 ; 107
pancreatic carcinogen	18 ; 117	TK6 cells	18 ; 107
PCR	18 ; 191	Trp-P-1	18 ; 15
pesticide	18 ; 21	tumorigenesis	18 ; 63
phenol	18 ; 47	two-fold rule	18 ; 137
phenolic anti-oxidant	18 ; 47		
phenols	18 ; 73	UV	18 ; 29, 161
physiologically-based pharmacokinetic model (PBPK)	18 ; 1	volatile chemical	18 ; 5



日本環境変異原学会学生会員申込書

[1年間(翌年の3月31日まで)のみ有効です]

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に学生会員として入会いたしたく貴学会員である指導教官の署名および在学証名書(裏面に添付)を添えて申し込みます。

フリガナ:	
氏 名:	㊦
Name (ローマ字つづり)	
生年月日(性別)	19 年 月 日 (男・女)
校名/学部:	
住 所:	
TEL:	FAX:
電子メール:	
Affiliation Address	
自宅住所:	
電 話:	
Home address	
学会誌送付先:	①大 学      ②自 宅
研究領域(複数可)	
指導教官名:	
連 絡 先:	

\_\_\_\_\_の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。

指導教官

(署名)

日付

印

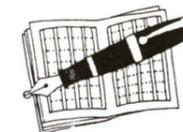
入会申込書の送付先: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

国立衛生試験所変異遺伝部 日本環境変異原学会事務局  
TEL 03-3700-9872 FAX 03-3700-2348

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」、「短期」、および「特別企画(受賞講演)」、「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。この制度頁の超過分や多額の経費を要する図表の実費を著者負担とする。
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:
5. 著作権  
本誌に掲載された記事、論文などの著作権は日本環境変異原学会に帰属するものとする。従って、本会が必要と認めた場合は転載し、また外部から引用の申請の許可があった場合には、編集委員会において検討の上許可することがある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部の複製、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もある。  
2) カラー印刷発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) 別刷りは別待寄稿の場合も含め、すべて著者負担とする。別刷り尾望者は著者校正時に添付する申し込み書に50部単位で申し込むこと。

〒192 八王子市久保山町2-3  
オリンパス光学工業株式会社  
染色体研究センター(CRC)  
日本環境変異原学会編集委員長  
石 館 基  
TEL 0426-91-7115  
FAX 0426-91-7209



### 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。  
日本語の場合：原稿はA4版用紙に1行22字、1頁20行で印字する（刷り上がりの1/4頁に相当する）。ただし、要約は英文（300語以内）とする。また、別に英文の題名、著者名（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。原稿の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)（または「結果および考察」）、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体で書く。
- 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、輪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(・)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ピ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。脚注を要するときに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。
- 参考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-trincrosome 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.

# KIKKOMAN S-9

このS-9は、キッコマン研究本部で調製されたものです。

## 変異原性試験用 凍結S-9

**S-9調製法** 家田貿易のS-9は7週令のSDラットの雄に誘導剤としてフェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボン  
を腹腔内投与した肝臓から調整したものを標準としていますが、その他の動物種及び誘導剤についても御  
相談に応じております。

**保 存** S-9は活性の高い酵素系よりなっておりますので、-80℃で保存して下さい。まれに解凍後分離すること  
がありますが活性には異常がありませんので、よく攪拌して御使用下さい。

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

### ●活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

分 画	測 定 デ ー タ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
マイクロソーム (105,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

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

\* Salmonella typhimurium

## エームス試験用凍結S-9MIX

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

●包装単位：10ml×8本、5ml×4本

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

## 染色体異常試験用凍結S-9MIX

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

●包装単位：3.5ml×3本

カタログNo.	品 名	包 装	価 格
S-9	変異原性試験用凍結S-9	1.5ml×12本	¥36,000
S-9 MIX	エームス試験用凍結S-9 MIX	10ml×8本	¥43,200
S-9 MIXTS	染色体異常試験用凍結S-9 MIX	3.5ml×3本	¥12,000



-S-9 Mix



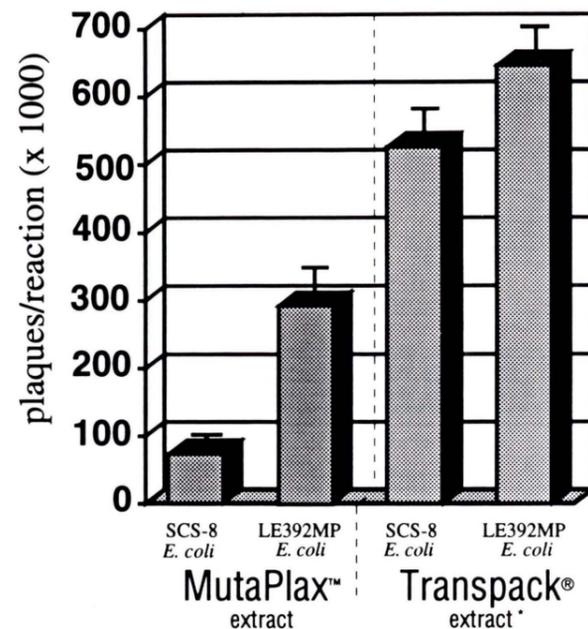
+S-9 Mix

KIKKOMAN 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

# Make No Mistake!

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



**Legend**  
Method - manufacturers recommended packaging protocol  
DNA Source - Big Blue® homozygous C57BL/6 mouse liver with 80 copies of transgene per cell  
DNA Amount - 4 µg per reaction

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 HRP Inc.  
MutaPlax™ is a trademark of Epicentre Technologies Corp.

**STRATAGENE®**  
pioneering the future of in vivo mutation research

お問合せ先:

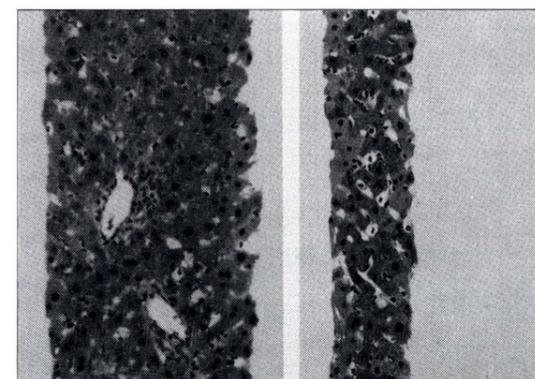
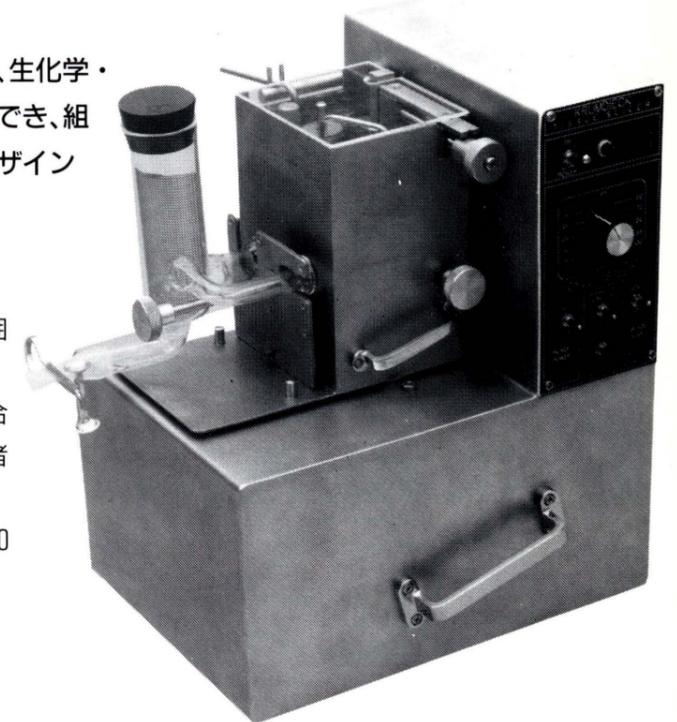
**加商株式会社** 〒103 東京都中央区日本橋2丁目14番9号 電話 03-3276-7676 FAX.03-3276-7626  
ライフサイエンスグループ

# THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

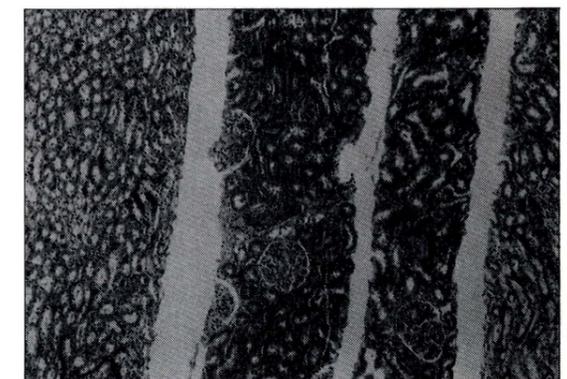
生きた組織の無菌スライスができます。

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

新製品

# オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクターセット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

## より便利に！ より手頃な価格に！

特  
徴

- エームテスト用と染色体異常試験用の2種類の試薬セットです。
- コファクターが無菌凍結品になり、解凍後S-9と混合するだけで使用できます。
- S-9とコファクターは実用的な分注量比ですから、混合が容易です。
- S-9とコファクターは未混合ですから、混合条件を変更しての試験が可能です。また、保存中にS-9とコファクターの未知の反応が起こりません。
- セット販売ですから、購入と在庫管理が便利です。
- 包装単位を少量化し、より手頃な価格に致しました。

製品名	包装単位	備考
エームテスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml×10本 コファクターA 9ml×10本	エームテストでのデータを添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 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℃でお願い致します)

- エームテスト用コファクターA(注分量100ml以上)および染色体異常試験用コファクターC(注分量30ml以上)の単品注文もお受け致します。
- 従来品は引き続き取扱いしております。

変異原性試験用 S-9 (無菌凍結品)	2ml×10本
エームテスト用 コファクターI (凍結乾燥品)	9ml用粉末×10本

誘導法の変更や、サル、イヌなどラット以外のS-9またはマイクロソームの調製、その他、技術的なお問合わせは、弊社バイオ部までお願い致します。

製造元

 **オリエンタル酵母工業株式会社**  
飼料・バイオ事業本部  
〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目8番3号  
(日本橋東硝ビル)  
Tel.(03)3663-8210 Fax.(03)3663-8230

販売元

 **和光純薬工業株式会社**  
本 社 〒541 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
電話 (06)203-3741(代表)  
東京支店 〒103 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号  
電話 (03)3270-8571(代表)

Wako

凍結コファクター誕生！S-9とセット販売  
溶解いらず、ろ過いらず

# S-9/コファクターセット

特長

- 解凍後、すぐ使用可
- 混合が容易
- エームテスト用、染色体異常試験用  
2種類用意

組成

(1バイアル中)

エームス試験用コファクター		染色体異常試験用コファクター	
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	16.3mg	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.8mg
KCl	24.6mg	KCl	11.6mg
G-6-P	17.0mg	G-6-P	8.0mg
NADPH	36.2mg	NADP	15.7mg
NADH	30.5mg	HEPES	4.5mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	119.6mg		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	24.7mg		

308-51301	-80℃	S-9/コファクターAセット(エームテスト用)	S-9 1ml×10 コファクターA 9ml×10
305-51311	-80℃	S-9/コファクターCセット(染色体異常試験用)	S-9 2ml×3 コファクターC 4.7ml×3

【関連試薬・器材】

636-00221	-70℃	S-9(無菌凍結品)	2ml×10
309-50611	④	コファクターI(凍結乾燥品)	10ml用粉末×10
301-02681		テスメディア® AN	10枚×10
297-03251		ペトリ皿(γ線照射滅菌済) 内径86mm 高さ15mm	10枚×20
291-03651		" 内径86mm 高さ20mm	10枚×20

ポジティブコントロール、変異原性化合物各種取り揃えております。

\*資料をご請求下さい。

## 和光純薬工業株式会社

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

## 全自動培地作成システム

FULLY AUTOMATED MEDIA PREPARATION SYSTEM



全自動培地作成システムは、自動培地分注装置APS450と新型培地滅菌保温器S9000で構成され、いかなる要求にも充分に適用できるシステムを初めて市場に出しました。

種火のいらぬ電子着火式ブンゼンバーナー

## ガスプロフィー



- 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(シリンジ、ポンプ、ペリスタ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ずらわさず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

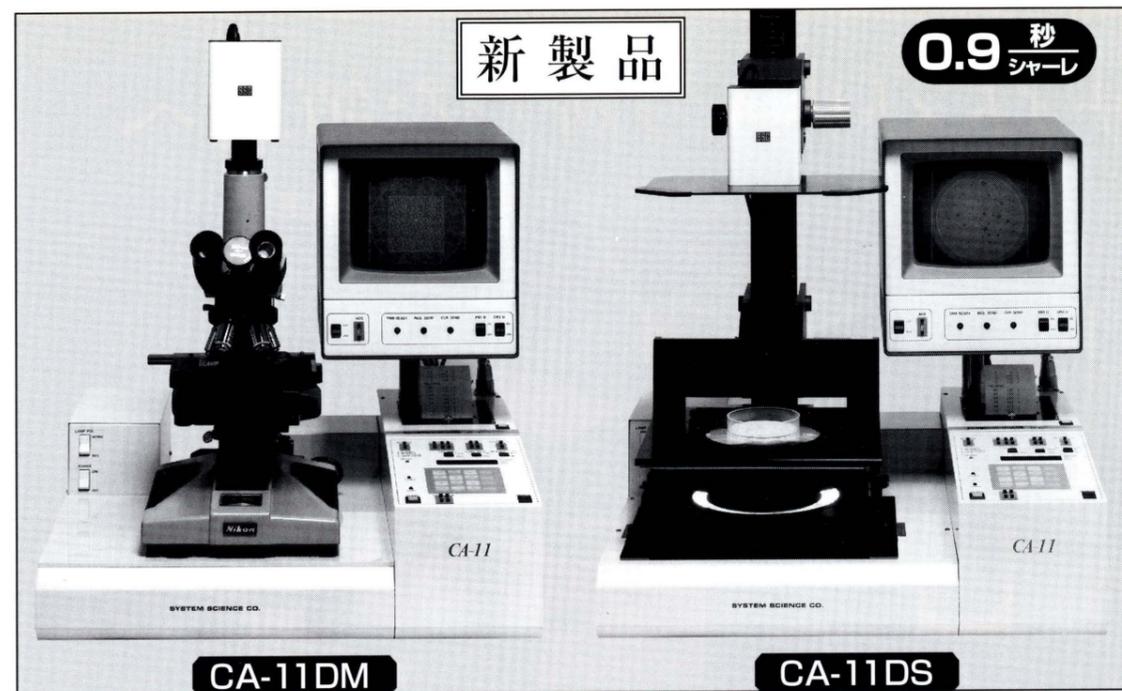
〒104 東京都中央区新川2-7-1

TEL (03) 3551-7873

FAX (03) 3551-7318

新製品

0.9 秒  
シャープレ



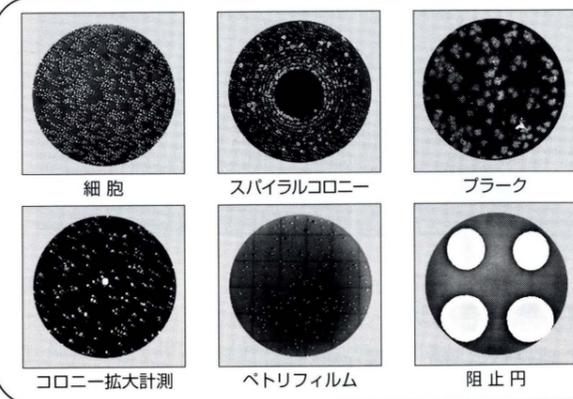
CA-11DM

CA-11DS

コロニーアナライザーシリーズが、通常の2倍速の高分解能高速画像積算機能を持ち、Dシリーズとして、さらに高感度、低価格、コンパクトになりました。

本装置は、混釈コロニー、淡く小さいコロニーはもとより、食品コロニー、エームテストから阻止円、細胞コロニーの分野まで広く利用されています。又、選択培地、ペトリフィルム、フィルター上、フードスタンプ等あらゆるコロニーの計測ができます。さらに自由に倍率を変えての拡大計測、顕微鏡・マクロと2台のカメラがスイッチでの切替計測と豊富な機能を備えたシステムです。尚、パソコン接続によりデータの管理用に種々標準プログラムが取揃えられています。

※依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。



製造発売元

SSD システムサイエンス株式会社

阻止円計測

コロニー  
分離計測

自動エリア  
スパイラルコロニー

検出感度強化  
画像積算機能

試料の均一化  
シェーディング補正



CA-11DSF

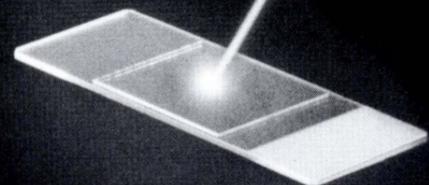
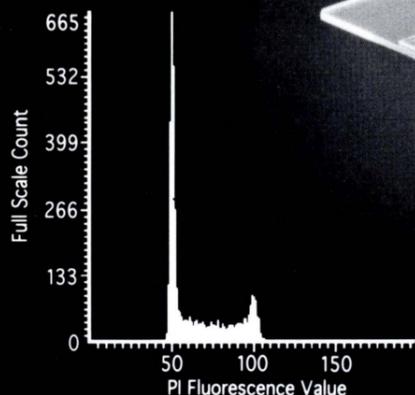
高速画像積算機能を持ったDシリーズ

コロニーアナライザー

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

# サイトメリーの新たな領域へ

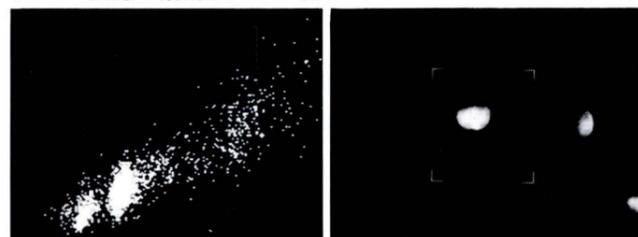
スライドガラス上の細胞集団を高速で計測し、形態観察も実現。



## レーザスキャニングサイトメータ LSC101

スライドガラス上の数千~1万個に及ぶ細胞集団を、5~10分で高速に計測し、データを表示。リコール機能により、異常と思われる細胞像を素早く観察することができます。統計データとしてのヒストグラムと細胞像を同一画面上で対比しながら検討でき、臨床や癌診断の研究に新たな知見を提供できるものと確信いたします。

リコール細胞の指定とリコール像



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) TEL03-3251-8971

# Jems News

No. 51

1997年1月31日

日本環境変異原学会

## 第25回記念大会を顧みて

大会組織委員長 清水英佑

日本環境変異原学会第25回記念大会は平成8年11月20日(水)から22日(金)までの3日間にわたり、東京都港区芝のメルパルク東京・ホールで約550名の参加のもとに開催された。

今大会は、本学会が1972年(昭和47)に研究会として創設されて以来25周年にあたることから記念大会と位置づけ、記念事業として(1)記念誌の発行:「過去を振り返ることは、将来に対して責任を担うものである」というコンセプトのもとに、学会創設に至るまでの社会的背景や経済的ご苦労について、創設にいたる経緯をよくご存知の田島弥太郎、近藤宗平、黒田行昭の3先生を囲んで松島泰次郎先生の司会で座談会を開き記録に残した。また、国際学会に参加した経緯については、杉村隆第2代会長にご執筆いただいた。さらに、25年間の全発表演題名、学会賞受賞者一覧、各研究会の設立経緯等をまとめ、環境変異原研究第8巻2号として発刊した。(2)オランダ・ライデン大学のLohman教授の記念講演、(3)25年間の全抄録、特別講演、シンポジウム等のCD-ROM化、(4)「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」を記念大会のメインテーマとして掲げ、4シンポジウムを開催した。一般演題148題の全ては示説とした。

大会第1日目の午前は、シンポジウム1「環境汚染物質のモニタリングに変異原性試験はどこまで有効か」(座長:若林敬二氏、木苗直秀氏)のテーマのもとに、各汚染物質の検出について7名のシンポジストから報告がなされた。渡辺雅彦氏は食品中について、渡辺徹志氏らは大気汚染物質、宗像信生氏は放射線・紫外線、鈴木勇司氏らは磁場、荒木明宏氏は農薬・医薬品、小野芳朗氏は水中の汚染物質、木苗直秀氏は水中変異原の生物影響についてそれぞれ現状の分析と今後の課題を報告した。午後は示説の後、シンポジウム2「ヒトと動物の発癌を変異原性試験はどこまで予測できるか」(座長:吉川邦衛氏、降旗千恵氏)のテーマで4人の報告があった。まづ森田健氏は「変異原性試験による癌原性物質の検出状況」と題して、各種変異原性試験の特徴を把握し、それらの組み合わせ・トキシコカインテイクス・構造活性理論を導入し評価することを提唱した。立松正衛氏は

「中期ならびに長期動物発癌性試験と変異原性試験」と題して、中期発癌性試験を提唱し、特に胎盤型GST-P陽性巣を指標とした試験を紹介した。横田淳氏は「ヒトがんにおけるがん抑制遺伝子変異の多様性と特異性」と題して、ヒトがんで見られるがん抑制遺伝子変異の特異性を整理し概説した。最後に黒木登志夫氏は「発癌における動物種間、実験系間のギャップ」の中で動物試験データのヒトへの外挿の問題点について述べられた。

大会第2日目の午前中は示説、午後から総会に続いて、「環境中の変異原の検出とその抑制因子に関する研究」分野で顕著な業績を挙げた早津彦哉氏(岡山大・薬学部)に学術賞が授与された。また、根本友恵氏(岡山大・薬学部)が「ショウジョウバエを用いた変異原性修飾因子の研究」で、森田健氏(日本グラクソ(株)・筑波研究所)が「染色体異常試験における培養環境の研究」で、それぞれ研究奨励賞を受賞した後、受賞講演が行われた。

次いで、オランダ・ライデン大学のP. H. M. Lohman教授により「One million plus one carcinogens」(座長:杉村隆氏)と題する記念講演が行われた。スライドとビデオを用いて行われたが、我々日常生活中で曝露する100万種類の求電子物質に対して、発癌に関する遺伝子毒性物質のリスク評価をするには、遺伝毒性物質の作用機構を理解する必要があるが、その機構は一様ではない。そこでもっと有用なモデルを検討し提案したものであった。

夕刻から東京プリンスホテル・プロビデンスホールにて懇親会が開催され約300人が出席した。

大会3日目の午前は、シンポジウム3「変異原研究の新展開に向けて」(座長:須藤鎮世氏、太田敏博氏)のテーマで5人のシンポジストの発表が行われた。勝木元也氏は「HITECマウスによる体細胞突然変異の検出」と題して、HITECマウスのモニター遺伝子(rps)の塩基配列の決定を報告した。坂本優氏は「Comparative Genomic Hybridization (CGH)法による婦人科癌の分子細胞遺伝学的解析」と題して、卵巣癌の遺伝学的悪性度診断や子宮頸癌の遺伝学的解析にCGH法が有用で、他の腫

瘍にも応用可能であると報告した。関谷剛男氏は「SSCP法：一塩基置換の簡便な検出法」と題して、1本鎖DNA高次構造解析法について紹介した。大隅智也氏らは「Genome-Wide Detection of Chromosomal Variation (Amplification, Deletion and Methylation)」と題して、ゲノム上の変異の種類とその部位を知るため、ゲノム上の制限酵素の認識部位をランドマークとしたRLGS法を開発し変異検出に応用したことを報告した。堀井明氏は「DNAミスマッチ修復(MMR)異常と発癌」と題して、MMR異常の有無をマイクロサテライトマーカーを用いてPCR法で簡便に検出できることを紹介した。

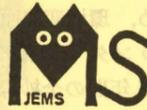
午後はシンポジウム4「レギュラトリアサイエンスにおける変異原性試験」(座長: 渡部烈氏, 林真氏)のテーマで5人のシンポジストにより発表が行われた。レギュラトリアサイエンスに関して学会で取り上げたのは今回が初めてであり、まだ馴染みのない用語であり、その概念も十分理解されていない。そこでまづ内山充氏から「レギュラトリアサイエンスとは」と題して概念をご紹介頂いた後、津田重城氏が行政の立場から「行政が学会に求めるもの」と題して、また早津彦哉氏には「基礎科学と行政」と題して大学や研究者の立場から、さらに島田弘康氏には「企業における変異原性試験に関する考察」と題して企業の立場から、最後に学会長の立場から祖父尼俊雄氏が「21世紀における安全性評価のための変

異原性試験」と題して意見が述べられた。保健・衛生の分野において研究者、企業、行政の責任ある連携が必要であることを強く感じた。

大会期間中に微生物変異原性試験研究会第18回定例会(世話人: 坂本豊氏)、非変異・がん原性物質への対策研究会(世話人: 吉川邦衛氏)が、また23日に東京大学医科学研究所にてJEMS・MMS研究会第30回記念大会(世話人: 降旗千恵氏)が開催された。

今大会は、学会創設25周年という記念すべき大会でもあったため、シンポジウム4題を組んだが、企画・運営された座長の先生方にはたいへんお世話になった。また、どのシンポジウムも熱心な討論を頂き、ほぼ時間内に上手にまとめていただき、主催者としてお礼を申し上げます。一方、一般口演発表を全て示説とし、示説会場もできるだけスペースに余裕を取ったつもりであったが、会場はいつでも討議の熱気に包まれ、狭さを感じた。この熱気が、これからの日本環境変異原学会の発展につながることを、そして次の25周年、50周年に受け継がれることを祈りつつ、今回の企画・運営に関係した祖父尼俊雄会長を初めとして、組織委員、編集委員、ご協賛いただいた企業の方々に、そしてこの大会を盛り上げて下さった会員の諸氏に感謝いたします。本学会のたゆみない発展と神奈川県秦野市での第26回大会(澁谷徹大会長)の盛会をお祈り申し上げます。

## 日本環境変異原学会・MMS研究会 第30回記念大会報告



第30回記念大会として、Mammalian mutagenicity studyとヒトゲノムの接点を求めて下記の記念公開講演会を開いた。

日時: 11月23日(土) 9~16時  
場所: 東京大学・医科学研究所・講堂  
プログラム:

- 1) 総会 9時  
会計 1997年度予算 事務連絡 他
- 2) 共同研究発表会 (第10, 11, 12回)
- 3) 記念講演会 10~16時

記念講演会: ヒトゲノムと遺伝病

榎佳之先生(東大医科研): 世界のヒトゲノム研究、日本のヒトゲノム研究、アルツハイマーのゲノム解析

後藤真先生(都立大塚病院): Werner症候群と老化遺伝子

川尻要先生(埼玉がんせ): CYP1A1多型と肺癌

伊藤隆司先生(東大医科研): 蛍光 differential display法による遺伝子発現動態のスクリーニング

Prof. P. H. M. Lohman (Netherlands): Molecular aspects of DNA repair and DNA repair syndromes

始めに榎先生にこの分野の入門的な概説を1時間講義していただいた後4人の先生方にご専門の最先端を分かり易くご講演いただいた。活発な質疑応答があり100人の参加者はこの分野の進展に興味を尽きなかった。昼食は講師の先生方にも加わっていただいて参加者全員で和やかなサンドイッチ・パーティーの一時を過ごした。ご協力頂いた賛助会員および幹事の皆様に感謝いたします。

(文責 世話人 東大医科研 降旗千恵)

## 微生物変異原性試験研究会 (JEMS・BMS) 定例会報告

主 題: 1996年度秋期定例会 (第18回)

日時・場所: 11月20日(水) 18時~21時, メルパルク東京・ホール, 総司会 中嶋 圓

1. 総会・庶務報告 庶務幹事 坂本 豊(武田薬品工業・薬剤安全性研究所)  
現在会員72機関(引き続き増加中)、半年ごとの定例会の活動状況、論文投稿や大会での発表を含む共同研究の活動状況を報告。次に前庶務幹事・坂本京子氏(食品薬品安全センター・秦野研)が退職され、有機農業と販売などの新しい道に進まれたので、これまでの労をねぎらい、やはり設立時からの幹事の一人・西富 保氏から参加者の署名した色紙とお餞別を贈呈。  
・会計報告 会計幹事 中嶋 圓(食品農医薬品安全性評価センター)  
年会費1機関2000円という少ない収入で(但し1995年秋に松島泰次郎先生から学会賞受賞時に10万円の寄付をいただいた)、未納機関も結構ある状況での決算報告を行い、会計監査の西富 保氏が適正であることを確認。
2. 共同研究報告  
・Dグループ(OECDガイドライン対応菌株の検討。世話人代表 渡辺佳津子氏(残留農薬研究所)の実験3-3について世話人 佐々木俊明氏(日本バイオアッセイ研究センター)が non mutagenic carcinogens 11種についての実験を報告した。  
・Eグループ(至適前培養条件の検討。世話人代表 加藤雅之氏(日本生物化学センター)については、再開を検討中であることを坂本が代理で報告。  
・Fグループ(プレインキュベーション法の実施条件の検討。世話人代表 荒木明宏氏)について、佐々木俊明氏がグループ員のアンケート結果と今後の計画を報告。  
イ. プレインキュベーションにより感度のある物質の探索,  
ロ. 至適条件の再検討(毒性による生菌数の変化と被験物質の分解検討を含む)。
3. 実験の基礎的再検討 (Oxoid Nutrient Broth ロット差問題の検討)  
・アンケート(会員以外も含む124機関へ発送し83通回収)(本大会発表)  
1996年2月実施。自社で試験を行っている82機関中74機関がOxoidのNBを使用し、予備を持たない1~2本の少数購入が65機関と多く、19機関が生育不良、復帰変異コロニー数の減少、プラスミドの脱落などの影響があったと回答し、影響を受けた菌株はTA100, TA1537, TA1535が多く、TA98, WP2 uvrAなどが続き、それらの入手先は8施設以上にわたり、特定の配布施設からではなかった。ただし、A機関でよくないロットがB機関ではよい、というケースもあり、悪いロットの定義が必要であった。

使用菌株の変化と、それにとまうNBとの相性も考えられる。武田知恵子氏が報告。

・NB小委員会の設置(6機関)と良好ロット選択共同研究の実施(本大会で発表)

狂牛病のため英国製の原料が使えなくなったことが発端であるが、代理店の関東化学により先行輸入された3ロットについて検討し、次善ではあるが推奨ロット(016 57211)を決め、十分量を確保した。また、良好ロット選択の判断基準(明確な生育曲線と十分な生菌数、培養終了後pHが8を越えている、など)についても報告した。なお、非常に良いと思われるNBで培養し保存した菌株に見られた適応現象により、それらの菌株はよくないNBで極端に生えなくなること、さらに、菌とNBの両方がよくないとき、生菌数計測には底部に最小寒天平板、上部にはHis, Bio添加ではなく良好なNBを含む軟寒天がよいこと(異なる組み合わせでは1/10程度に減少する可能性がある)、平板の寒天のロットも復帰変異コロニー数に影響すること、等を坂本が報告した。  
インターネット (Mutaplanet) <http://ux01.so-net.or.jp/~akiaraki/index.html> に随時掲載中。

NB検討小委員会メンバー(アイウエオ順)  
荒木明宏(日本バイオアッセイ研究センター)、川口泰史(コニカ 環境安全推進室)、坂本 豊(武田薬品 薬剤安全性研究所)、関島 勝(三菱化学ビーシーエル)、武田知恵子(オリンパス光学 染色体研究センター)、西富 保(三菱化学安全科学研)

4. 会員からの発表  
・関島 勝(三菱化学ビーシーエル)よくないNBを用いて、繰り返し選択培養し適応させ、そのNBで生育が良好な菌株をとることができた。  
・片桐幹之(リコー) 前培養後、菌液を氷冷すると復帰変異コロニー数が減少した。実験開始まで室温保管がよい。また、最小寒天平板の寒天の違いによって、ケルセチンの復帰変異コロニー数が変動(多くは減少)したと報告。
5. 次回定例会(第19回)  
(日程・演題・演者未定。交渉中)  
予定 6月上旬 於 お茶の水スクエア(東京)  
総会 庶務及び会計報告(選挙結果と新幹事の紹介、共同研究報告 など)  
講演 ①代謝活性化についての最近の話題  
②改訂後のガイドラインとGLP  
会員の皆様からの要望等をお持ちしております。以上

事務局 武田薬品工業 薬剤安全性研究所 坂本 豊  
FAX 06-300-6916

## 非変異・がん原性物質への対策研究会活動報告

本研究会は現在、TF-MC (トランスフォーメーション試験-代謝協同阻害試験) ワーキンググループと *in vivo* RDS/UDS 試験法検討グループとによる共同研究を中心に活動している。昨年、TF-MC ワーキンググループは MC の陽性検出力を検討するための第 1 回共同研究 (参加機関: 14) と TF の共通プロトコルの検討 (世話人中心) を実施した。 *In vivo* RDS/UDS 試験法検討グループは第 2 回共同研究 (参加機関: 15) として被験物質の 3 または 7 日間投与によるラット肝 RDS 試験を実施した。

研究会の定例会は、平成 8 年 11 月 22 日に慈恵医大高木 2 号館南講堂において日本環境変異原学会第 25 回大会の終了後に開催された。参加者は約 80 名であった。内容は前記共同研究の中間報告が中心であり、TF-MC ワーキンググループからは昭和電工の土屋敏行氏が代表

して、*in vivo* RDS/UDS 試験法検討グループからは各被験物質担当の代表者 (三共の萩原利行氏、ゼリア新薬の柴田桂三氏、帝国臓器製薬の谷藤久人氏、安科研の宮川誠氏、キッコーマンの松浦克子氏、三菱化学の高沢博修氏) が、進捗状況や結果概要などを報告した。各報告に対して技術面や結果の解釈などにつき活発な質疑・応答がなされ、定例会の終了予定時刻になっても討論が続いた。この際、会場を提供して下さった慈恵医大の清水英佑先生をはじめ、関係者の皆様にご協力をいただきました。この場をかりてお礼申し上げます。

一昨年から開始された共同研究により、非変異・がん原性物質に関する具体的な取り組みは着実に進んできている。現在、来年度の共同研究テーマなどについて世話人を中心に調整中である。(文責: 三菱化学 宇野芳文)

## 国際抗変異・抗発がん会議学会報告

### 1. 会議の名称

5th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (第 5 回国際抗変異・抗発がん機構会議)

### 2. 代表者

組織委員長: 早津彦哉 (岡山大学薬学部 教授)

### 3. 集会の開催期間および場所

平成 8 年 12 月 2 日 (月) ~ 平成 8 年 12 月 6 日 (金)  
岡山大学大学院自然科学研究科棟 (岡山市津島中 3-1-1)

### 4. 会議の成果、および感想

本会議は、参加者 167 人 (海外から 62 人) を迎え、盛会裡に終了した。参加国は日本を含め 25 カ国 (スウェーデン、イギリス、アメリカ合衆国、ドイツ、イタリア、台湾、韓国、フランス、ポルトガル、カナダ、スイス、メキシコ、香港、ポーランド、ギリシア、オーストリア、タイ、オーストラリア、フィンランド、ロシア、ブラジル、ユーゴスラビア、チェコ、中国) にのぼった。

第 1 日目に、国立がんセンター名誉総長 杉村 隆博士による「がん予防の過去、現在、未来」と題した基調講演から始まった。博士は、がんは予防することが可能であると力説した。なぜなら、過去に存在した職業がんやウイルス感染によるがんのうちいくつかは、適切な予防措置により今では消滅しているからである。しかし、一般の人々のがんは千差万別であり、これを予防することは簡単ではない。この問題についてさまざまな観点から、考察が加えられた。この基調講演に続き、DNA の損傷、変異、修復についての基礎的な研究が報告された。

第 2 日目午前の部では、抗変異作用の因子とマーカーについての発表と討議が行なわれた。同日午後には、変異原の作用とその阻害のテーマで発表が行なわれた。

第 3 日目には、一般大衆のがん予防を目指した研究についての講演がなされた。米国 Johns Hopkins 大学の T. W. Kensler 教授が抗寄生虫薬 Oltipraz を用いて、中国で

多数の人間を対象に行った実験を報告した発表は特に注目を浴び、山陽新聞と産経新聞で詳しく紹介された。この研究では、Oltipraz の投与により血液中のアフラトキシン付加物が減少したことが示された。この日の最後に、特別講演として米国 NCI の C. W. Boone 博士が発がん防止物質 (chemopreventive agents) のヒトへの応用の現状について概説した。また、同日は午後 7 時から会場を変え、抗変異原、抗発がん剤をどのような手段で検出すればいいか、さまざまな手法の特長が討議されるワークショップが開かれた。

第 4 日目には、レモングラス、フラボノイド、クロロフィリン、また魚油の成分である DHA、キウイフルーツなど、世界各国から食品中の成分を中心に新たな抗変異、抗発がん成分を見いだす試みが報告された。このセッションの講演者が韓国から 3 人、タイから 2 人、フランス、ドイツ、日本、ギリシア、イタリア、中国から 1 人ずつと特に国際色豊かであったことは意義深い。同日午後には、ポスター発表のための時間が 2 時間設けられ、それぞれのポスターの前で活発な議論が繰り広げられた。この日の夜は参加者ほぼ全員によるバンケットが開かれ、研究者間の親睦がはかられ、今後の研究協力体制作りにとって有意義な時間が持たれた。

第 5 日目には、抗発がんのメカニズムを探るセッションが開かれた。この会議の最後は抗発がん、抗変異原研究の世界的長老である、アメリカ健康財団の J.H. Weisburger 博士による講演で締めくくられた。彼は日本人が日本食から欧米型の食事になろうとしていることを憂い、塩分さえ控えれば日本食の方がはるかに優れていることを力説した。

突然変異の基礎から抗発がんへの応用まで、広い範囲を網羅した本会議の充実した内容は、参加者一同に深い感銘を与え、今後の研究のさらなる進展を予感させるものであった。

## International Symposium on "Basic Studies Aimed at Cancer Prevention" 報告

徳島大学医学部細菌学講座 大西 克成

岡山で行われた 5th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (会長: 早津彦哉教授) のサテライトシンポジウムを平成 8 年 12 月 7 日に徳島で開催いたしましたところ、66 名の参加があり、地方の小さな国際シンポジウムとしては成功裏に終わることができました。

早津教授から、The British Council が援助するので英国からの講演者を主としたサテライトシンポジウムを徳島で開催しませんかというお申し出があり、このシンポジウムを開催することになりました。5 日間の岡山での国際会議の後のシンポジウムですから、岡山から引き続いて参加される日本人は少ないだろうと考え、徳島の方々の参加をお願いしました。また、タイから 5 名、韓国から 4 名の参加者がありました。The British Council はシンポジウムだけでなく、英国からの講演者と若い日本人との交流を要求されましたので、シンポジウムは半日で終わり、その後はバスツアーをすることにしました。

シンポジウムは 4 名の英国人と 2 名の日本人による癌予防に関するもので、講演順に紹介しますと、①若林敬二博士 (国立がんセンター研究所) "Food-derived mutagens and carcinogens, and their DNA modification", ② Prof. R. C. Garner (The University of York) "Measurement of DNA adducts in man as a biomarker for cancer chemoprotection studies", ③ Dr. J. K. Chipman (The University of Birmingham) "Potential mechanisms of chemoprevention by isoflavones and sulphoraphane",

④ Dr. P. Ryden and J. A. Robertson (Institute of Food Research, Norwich Laboratory) "The significance of the hydrophobic binding properties of dietary fibre residues in cancer prevention", ⑤ 木内武美博士 (徳島大学) "Protective effects of Thai plants on formation of aberrant crypt foci and DNA adducts in rats", ⑥ Prof. M. H. L. Green (University of Sussex) "Hprt mutation and bcl2 translocation in human populations: possible links to sun exposure" でした。座長は Prof. J. M. Gentile (Hope College, Holland, MI, USA), Dr. M. D. Waters (Chapel Hill, NC, USA), 布柴達男博士 (東北大学) にお願ひし、最後に早津教授に閉会の辞を述べていただきました。

午後 2 時からはバスツアーで、まず藍染の記念館 (藍の館) を見学し、実際に各自ハンカチを藍染し、水洗後、アイロンをかけて自分で染めたハンカチを記念にもらいました。この体験は大変好評でした。その後、四国 88 ヶ所の霊場の第一番札所である霊山寺 (りょうぜんじ) にお参りし、全員で記念写真を撮りました。最後に大谷焼を見学し、バスでそのままピアホールに直行して Farewell Party を行いました。ツアーの間、早津先生にはガイドさんの通訳をしていただき、外国からの参加者にも徳島や藍染の歴史を理解していただきました。また、若い人たちの国際交流もうまく行ったようでした。

今回のシンポジウムのために The British Council、大阪医薬品協会、東京医薬品工業協会を始め、多くの会社に御協力をいただきました。心からお礼申し上げます。

### インターネットに JEMS のホームページを作ってみませんか。

日本環境変異原学会ではインターネット上にホームページを作る予定です。ホームページのメンテナンスをしていただけるボランティアを募集しております。庶務幹事 (jems@nihs.go.jp) まで。

# 日本環境変異原学会

## 1996年第2回(通算第58回) 評議員会議事録

日 時: 平成8年11月19日(火) 13:00~17:00

場 所: 東京慈恵会医科大学高木会館5階E会議室

東京都港区西新橋3-25-8 (Tel. 03-3433-1111 内線2270)

出席者(五十音順): 荒木, 石館, 太田, 大西, 葛西, 菊川, 木苗, 黒田, 坂本, 澁谷, 島田, 清水, 須藤, 祖父尼, 田中, 長尾, 西富, 能美, 松島, 山添, 吉川, 若林, 渡部, 小川(25回大会庶務), 坂本(BMS代表), 千明(欠席: 林, 早津)

1. 前回議事録は書面にて承認されており, すでに *Jems News* に掲載済みであるので省略された。また, 今回の評議員会では議事進行の効率化を図るために討議資料の事前配布がなされた。
2. 幹事会の報告が会長よりなされた。ほとんどの議題に関しては本評議員会の議題となっているので, それぞれの議題において詳細に検討することとした。ただし, 本日の議題として取り上げられていない問題として, 学会発表論文の英文抄録の取り扱いに関して議論がなされた。来年より *Mutation Research* 誌に英文抄録が掲載されなくなるのに伴って, 第25回大会に関しては発表論文の表題, キーワード, 著者名, 連絡先のファックス番号および電子メールアドレスを環境変異原研究に掲載することとした。また, このような情報発信基地として日本環境変異原学会のホームページを作ることについて議論がなされ, 作成する方向で検討し, 総会において会長より構築, 維持のためのボランティアを募ることとした。
3. 第25回大会について清水組織委員長より, 明日からの大会の準備はほぼ完了したこと, 25周年記念として記念座談会を開催し, その記録を環境変異原研究の記念号に掲載したこと, これまでの25回におよぶ大会のプログラム, 抄録等を集大成して記念号に掲載するとともにCD-ROMを作成したこと, 記念講演に *Mutation Research* 誌の主幹である P. Lohman 教授を招待したこと等が報告された。
4. 平成8年度会計の中間報告が田中会計幹事より説明され, 議論がなされた。平成9年度予算案には1997年に開催される7th ICEMに参加する若手の研究者を補助するため100万円の予算, 評議員選挙のための予算を含むことが説明され, 議論の後承認された。また, *Mutation Research* 誌購読会計の平成8年度中間報告および平成9年度予算案の説明があり, 議論の後承認された。
5. 石館編集委員長より環境変異原研究, *JEMS News* の編集状況の説明がなされた。投稿論文の査読は現

6. 状態はボランティアとしてお願いしているが, 今後はテレホンカードでお礼をしたいとの提案があり, 承認された。
6. 松島賞等選考委員長より, 研究奨励賞の英名を The JEMS Achievement Award とすることが提案され承認された。なお, 学術賞は The JEMS Award, 従来この奨励賞は The JEMS Annual Award とすることはすでに決定済みである。
7. 会員状況報告が祖父尼会長より報告がなされた。1996年11月7日現在で会員数は960名(内学生会員80名), 賛助会員29社(29口), 購読会員14社および名誉会員7名である。
8. 研究集会等について  
5th Int. Conf. Mech. Antimut. Anticar. について早津評議員が欠席のため代わりに祖父尼会長より, 現在登録者数が160名であること, 会場は200名まで収容可能であるので, 当日参加も可能であるので, 多くの会員の参加を希望するとの, 報告がなされた。また, 翌12月7日(土)には徳島でサテライトシンポジウムを開催するので, そちらへも多くの方の参加を希望する旨, 大西評議員より案内がなされた。  
第26回大会について澁谷組織委員長より, 第26回大会は, 1997年12月3,4,5日に秦野市文化会館にて開催するので, 評議員の協力をお願いしたいとの要請があった。  
1996年の公開シンポジウムについて能美企画委員より, 200名の参加者があり盛会であったとの報告がなされた。また, 1997年の公開シンポジウムは岐阜大学の森会員のお世話により, 岐阜長良川国際会議場において5月30日に開催の予定であることが, 祖父尼会長より紹介された。  
7th ICEM について大西国際幹事より, 大会組織委員と交渉の結果, 祖父尼, 寺田会員以外に, 武部, 早津, 葛西会員がシンポジストとして追加された旨の報告がなされた。これら3名の方の学会登録費は主催者側で負担するが, そのほかに JEMS から3万円程度の援助金を支給することとした。また, この

ほかに若手会員には渡航費用の一部を JEMS より補助することとし, 選考は賞等選考委員会において行う。

来年の ICEM に引き続いてエジプトのカイロで開催される 4th Alexander Hollaender Training Course について祖父尼会長より, 当学会からの財政的な援助は出来ないが, 講師として自主的な参加の要請がなされた。

タイ変異原学会への寄付について会長より, 松島評議員より寄付の申し出であったので, 本学会を通じてタイ環境変異原学会に寄付をしたとの報告がなされた。なお, これについては平成8年度の収支決算に入れることが確認された。

第27回大会についてはまだ組織委員長を決定していないので早急に決定したい旨, 祖父尼会長より

発言があった。

9. 研究会の活動状況について, 島田 MMS 代表と坂本 BMS 代表より報告がなされた。
10. 新しい入会申込用紙が紹介され, 一部字句を修正した後, 今後この新しい申込書を用いることとなった。また, 学生会員の申込書も新しくなり, 今後は指導教官の推薦と在学証明書で入会が可能となる。ただし, 会員の資格は1年間。なお, 賞を受ける権利は正会員も学生会員も同じであり, 会員の経歴として含める。
11. 学会事務局について議論がなされ, 国立衛試に専任の事務員をアルバイトで雇い, 学会事務一般を一括する方式も含め, 幹事会でさらに検討することとした。

## 関連学会情報

**7th International Conference of Environmental Mutagens**  
会期: September 7-12, 1997  
会場: Toulouse, France  
問い合わせ: ICEM 97, Europa Organization

5, rue Saint-Pantaleon B. P. 844, 31961 Toulouse cedex-FRANCE  
Fax: 61 21 28 54/57; E-mail: europa@dialup.francenet.fr

**Satellite Symposium for the 7th ICEM 97**  
Gene-Environment Interactions in Occupational and Environmental Health  
会期: September 2-5, 1997  
会場: Hanasaari, Espoo, Finland  
問い合わせ: Anneli Vartio, Topeliukenkatu 41 a A, FIN

¥00250 Helsinki, Finland  
Tel: Int. +358-9-4747 345  
Fax: +358-9-4747 548  
E-mail: avar@occuphealth.fi  
Internet: http://www.occuphealth.fi/nordems/

**CANCER AND GENETIC RISK ASSESSMENT: LOW DOSE-EFFECT STUDIES**  
会期: September 4-6, 1997  
会場: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg, Germany

問い合わせ: Dr. Peter Schmezer, DKFZ, Abteilung 0235 69120 Heidelberg, Germany  
Tel: 06221-423309  
FAX: 06221-423359;  
E-mail: p.schmezer@dkfz-heidelberg.de

**NEW IN VIVO MODELS FOR GENETIC AND TARGET ORGAN TOXICITY**  
会期: September 14-16, 1997  
会場: University of Kent, Cantetbury, U. K.

問い合わせ: Dr. J. K. Chipman, School of Biochemistry, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, UK,  
Tel & Fax: +44 121 414 6865

**4th Alexander Hollaender Training Course in Genetic Toxicology: "Practical Training in Contemporary Genetic Toxicology"**  
会期: September 15-18, 1997  
会場: Cairo, Egypt  
問い合わせ: Prof. Dr. Wagida Anwar, Director, Epidemiology Unit, Dept. of Community, Environmental and Occupational Medicine, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Rames St. Abassia, Cairo, Egypt.

Tel: 202-2837862; Fax: 202-837888;  
E-mail: PAEMS MD@FRCU.EUN.EG.

**Workshop for the 7th ICEM 97**  
Quantitative Modeling Approaches for Understanding and Predicting Mutagenicity and Carcinogenicity  
会期: September 3-5, 1997  
会場: Istituto Superiore di Sanita, Viale Regina Elena, 299 Roma

問い合わせ: SATELLITE '97, c/o Dr. Romualdo Benigni, ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA', Viale Regina Elena 299, 00161 Rome-Italy  
Fax: +39 6 49387139, E-mail: MUT@ISS.IT

平成7年度決算報告書

収入		(平成7年12月31日)	
項 目	予算額 (円)	決算額 (円)	
1. 学会費	5,490,000	6,413,000	
平成7年度正会員年会費 (7,000×727名)	(4,550,000)	(5,089,000)	
平成7年度学生会員年会費 (5,000×35名)	(225,000)	(175,000)	
平成7年度購読会員年会費 (10,000×5件)	(120,000)	(50,000)	
前年度未納分 (7,000×157名)	(595,000)	(1,099,000)	
2. 賛助会員 (28社、未納分等含む)	1,500,000	1,581,000	
3. 広告料	800,000	1,196,860	
4. 別刷代および投稿料	0	709,410	
5. Mutation Res. 誌購読料会計より	2,500,000	2,500,000	
6. 学会誌、会員名簿売上	0	12,000	
7. 寄付	0	90,417	
8. 前年度繰越金	0	452,673	
9. 利息	0	4,601	
合 計	10,290,000	12,959,961	

支出

項 目	予算額 (円)	決算額 (円)	
1. 事業費	7,360,000	8,744,222	
平成7年度IAEMS納付金	(60,000)	(51,692)	
第24回大会補助金	(600,000)	(600,000)	
シンポジウム開催費	(1,000,000)	(1,000,000)	
学会誌印刷費 (Vol.16 No.3, Vol.17 No.1)	(4,600,000)	(5,711,762)	
学会誌英文校正料	(0)	(30,435)	
ニュース印刷費 (No.45, No.46, No.47)	(650,000)	(725,429)	
学会賞等 (副賞および賞金)	(450,000)	(487,035)	
Mutation Res. 抄録別刷代	(0)	(137,869)	
2. 評議員、幹事会等会議費 (含旅費)	1,300,000	724,533	
3. 事務費	1,130,000	2,249,604	
通信費 (郵便代、銀行手数料など)	(450,000)	(1,635,127)	
印刷費 (印刷代、複写費)	(600,000)	(603,188)	
消耗品費	(80,000)	(11,289)	
4. ブラハ国際学会寄付	0	279,855	
5. ICEM名簿印刷代分担金	0	337,740	
6. 学会事務委託費	500,000	495,512	
7. 繰越金	0	128,495	
合 計	10,290,000	12,959,961	

日本環境変異原学会平成7年度収支会計に関して会計監査を実施したところ、適正に執行、記録されていることを認めましたので、ここに報告いたします。

会計監査委員 佐藤 茂秋  
白須 泰彦

平成9年度予算書

収入		平成9年度予算額 (円) 平成8年度予算額 (円)	
摘 要			
1. 学会費	5,675,000	5,620,000	
平成9年度正会員年会費 (7,000×700名)	(4,900,000)	(4,900,000)	
平成9年度学生会員年会費 (5,000×35名)	(175,000)	(130,000)	
平成9年度購読会員年会費 (10,000×10件)	(100,000)	(100,000)	
前年度未納分 (7,000×70名)	(500,000)	(490,000)	
2. 賛助会員 (28社)	1,400,000	1,500,000	
3. 広告料	1,200,000	1,200,000	
4. 別刷代および投稿料	600,000	650,000	
5. Mutation Res. 誌購読料会計より	3,000,000	3,000,000	
6. 学会誌、会員名簿売上	20,000	0	
7. その他 (著作権)	200,000	0	
8. 前年度繰越金	500,000	0	
9. 利息	0	0	
合 計	12,595,000	11,970,000	

支出

摘 要	平成9年度予算額 (円)	平成8年度予算額 (円)	
1. 事業費	8,730,000	8,060,000	
平成9年度IAEMS納付金	(60,000)	(60,000)	
第26回大会補助金	(600,000)	(600,000)	
シンポジウム開催費	(1,000,000)	(1,000,000)	
学会誌印刷費 (3号)	(5,000,000)	(5,400,000)	
ニュース印刷費 (3号)	(600,000)	(650,000)	
学会賞等 (副賞および賞金)	(470,000)	(350,000)	
ICEM 若手研究者助成金	(1,000,000)	(0)	
2. 評議員、幹事会等旅費会議費	800,000	800,000	
3. 事務費	1,960,000	1,560,000	
通信費 (郵便代、銀行手数料など)	(1,300,000)	(1,300,000)	
印刷費 (印刷代、複写費)	(600,000)	(200,000)	
消耗品費	(60,000)	(60,000)	
4. 学会事務委託費	500,000	500,000	
5. 予備費	605,000	1,050,000	
合 計	12,595,000	11,970,000	

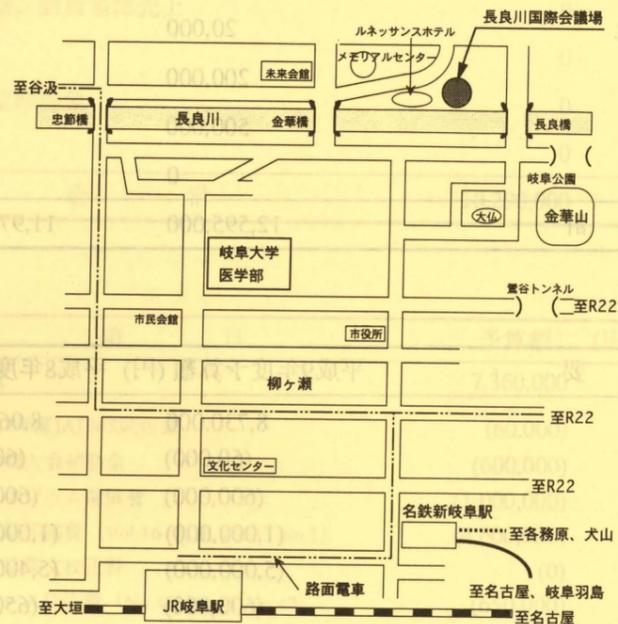
## 平成9年度日本環境変異原学会公開シンポジウムの御案内

平成9年度の日本環境変異原学会公開シンポジウムを私共で御世話させて頂くことを喜んでおります。同シンポジウムを5月30日(金曜日9:00~16:00)岐阜市の長良川国際会議場(岐阜市福光2695-2, Tel. (058) 296-1200)にて「発がん抑制因子の作用機構」のテーマで開催させていただきます。シンポジストとして岡山大学, 早津彦哉先生, 国立がんセンター, 若林敬二先生, 京都府立医科大学, 西野輔翼先生, 名古屋大学, 大沢俊彦先生, 岐阜薬科大学, 森 幸雄先生, 静岡県立大学, 下位香代子先生, 埼玉がんセンター, 菅沼雅美先生, 当教室の杉江茂幸を予定しております。この方面の最新の研究情報の

公開が期待され、環境変異原学会の多数の会員による活発な討論をお願いしたいと存じます。会場は風光明媚な長良川河畔に位置し、近くで長良川の鶺鴒が行なわれております。同シンポジウムの前後に春の岐阜周辺の観光も楽しんで頂けたら幸いです。

### 第9回日本環境変異原学会公開シンポジウム

世話人 森 秀樹  
500 岐阜市司町40  
岐阜大学医学部第1病理学講座  
Phone (058) 267-2235  
Fax (058) 265-9005



交通の御案内  
JR岐阜駅または名鉄新岐阜駅よりバスで約20分、タクシーで約15分。  
岐阜市営バス：三田洞線13番、長良川国際会議場行で長良川国際会議場前下車。  
長良線11番、長良鷺山まわり、または長良線1番、忠節鷺山まわりで岐阜女子短大前下車。  
岐阜バス：忠節長良線、または岐阜メモリアル循環線で岐阜女子短大前下車。

## 日本環境変異原学会 第26回大会の予告

標記大会の日程が下記のように「神奈川県秦野」で開催が決まりました。多数の会員の皆様のご参加と活発な討論を期待しております。

日時：平成9年12月3日(水)~5日(金)  
会場：秦野市文化会館ほか  
組織委員会  
257 神奈川県秦野市落合729-5  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所 瀬谷 徹  
TEL 0463-82-4751, FAX 0463-82-9627

特別講演/シンポジウム/ワークショップなどについてのご希望がございましたら組織委員会までお寄せください。

## 7th ICEM (Toulouse) 若手参加者への助成のお知らせ

日本環境変異原学会

日本環境変異原学会として、参加発表者(原則として発表者本人としますが、共著者も考慮の対象とします)の中の若手会員に対して参加登録費の援助を行います。希望者は、下記の要領でご応募下さい。賞等選考委員会の審査により援助対象者を決定いたします。

### 申し込み要領

1. 氏名, 生年月日, 所属機関と職名, 住所(機関の), 電話番号, Fax番号, e-mail address.
2. ICEM発表申し込み用に用いたabstractのコピー.
3. 申込締切日と申込先

平成9年4月4日(金)必着  
送付先:  
158 東京都世田谷区上用賀1-18-1  
国立衛生試験所 変異遺伝部内  
日本環境変異原学会事務局  
祖父尼 俊雄  
Fax, 電子メールでも受け付けます。  
Fax: 03-3700-2348  
E-mail: jems@nihs.go.jp  
受領者の義務として、Jems Newsに参加報告を寄稿していただきます。

## 公益信託『土川記念哺乳動物研究助成基金』 助成対象者の決定と公募のお知らせ

1. 平成9年度(第3回)助成対象者は、多数の応募者のなかから厳正な選考の結果、次の二名の方々に決定いたしました。  
実験哺乳動物による染色体異常の成立機序と不均衡胚の初期発生に関する研究  
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所  
遺伝学部長 孫田信一氏  
継代遺伝性先天異常の発生機構の解明と環境遺伝毒物のリスク評価  
財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所  
生殖生物学研究室室長 長尾哲二氏
2. 平成10年度(第4回)の助成対象者を下記の要領で募集します。

- (1) 応募資格  
哺乳動物を用いて環境変異原の研究を行う研究者個人で、次の研究機関に所属しているもの。  
① 国・公・私立の大学院、大学等の研究機関  
② 国・地方公共団体等の研究機関  
③ 公益法人等の研究機関  
④ ①②及び③に準ずる公的研究機関
- (2) 助成金額並びに件数  
助成金の総額は、150万円以内とし、助成件数は、2件程度とします。
- (3) 助成金の使途  
研究の遂行及び成果の発表に必要な費用。
- (4) 応募方法  
所定の申請書に必要事項を記入・捺印のうえ、当基金宛お送りください。
- (5) 応募締切日  
平成9年12月26日(金)(必着)
- (6) 助成金の交付  
平成10年4月以降
- (7) 申請書の請求  
申請書及び募集要項は、郵送料(130円切手)を添えて、平成9年12月10日(水)迄に下記宛に請求すること。
- (8) 申請書請求先  
〒103 東京都中央区日本橋3-1-8  
日本信託銀行本店営業第四部  
『公益信託 土川記念哺乳動物研究助成基金』宛  
TEL 03-3245-8140  
FAX 03-3271-2843

## 平成9年学会賞受賞候補者推薦募集要領

日本環境変異原学会は平成9年の学会賞の受賞候補者の推薦を以下の要領で募集する。

### 1. 資格

- 1) 推薦者: 本学会正会員であること。
- 2) 被推薦者:
  - (1) 学術賞: 会員歴5年以上の本学会員であること。なお、旧会則に基づく奨励賞受賞者は推薦され得る。
  - (2) 研究奨励賞: 3年以上の本学会員歴をもち、かつ募集締切日において満45歳以下であること。

### 2. 授賞の対象

- 1) 学術賞は、環境変異原に関する研究成果のうち、独創性、高度性ならびに普遍性(引用度など)を有するものに対して授賞される。なお選考に際しては、受賞候補者の本学会の進歩発展に対する貢献度も併せて考慮される。
- 2) 研究奨励賞は、環境変異原に関する研究成果のうち、独創性、高度性ならびに将来の発展性を有するものに対して授賞される。なお、選考に際しては、受賞候補者の本学会における活動状況も併せて考慮される。

### 3. 推薦申請書の請求

推薦申請書、募集要項および申請書作成要領は、郵送料(190円切手)を添えて、平成9年3月24日(月)までに学会事務局宛に請求する。封筒表には「学会賞推薦申請書請求」と朱書すること。

請求先: 〒105 東京都港区新橋 5-23-7

三造写真工業株式会社内 日本環境変異原学会事務局

Tel. 03-3433-8581 Fax. 03-3433-4070

### 4. 推薦方法

下記の申請書等一式を書留便にて送付する。なお、推薦申請書の作成にあたっては、別紙「学会賞受賞候補者推薦申請書作成要領」を必ず参照すること。

- 1) 本学会所定の用紙(学術賞・研究奨励賞共通)に記入した推薦書(様式1)、推薦理由書(様式2)ならびに研究業績書(様式3)とそのコピー各9部。
- 2) 推薦研究業績に関する代表的な報文(学術賞では5報以内、研究奨励賞では3報以内)の別刷各2部(コピーも可)。但し、いずれも当該研究に直接関係があるものに限る(総説を含めてもよい)。別刷は返却されない。
- 3) 受領通知返信封筒(宛名明記、返信用切手貼付)。

### 5. 推薦申請書の締切と送付先

締切: 平成9年4月14日(月)(当日消印有効)

送付先: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

国立衛生試験所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部

日本環境変異原学会会長 祖谷尼俊雄

Tel. 03-3700-1141 (ex. 433)

Fax. 03-3700-2348

### 6. 授賞件数

学術賞は1件以内、研究奨励賞は2件程度とする。受賞者に対しては、賞状ならびに副賞が贈呈される。

### 7. 受賞者の決定と授賞の通知

賞等選考委員会において受賞予定者を選出し、平成9年5月の評議員会において承認を得て決定される。授賞の決定は、学会長より平成9年6月30日までに推薦者ならびに受賞者宛に書面にて通知される。

### 8. 授賞式と受賞講演

第26回大会(平成9年12月、神奈川)において行う。

## 第31回日本環境変異原学会・MMS研究会

1. 会期: 平成9年6月20日(金)~21日(土)
2. 会場: 呉羽ハイッ(富山市吉作4103-1)
3. 連絡先: 〒939-03 富山県射水郡小杉町中太閤山17-1

富山県衛生研究所がん研究部  
TEL 0766-66-6606 内321  
FAX 0766-56-7321

## 会員移動

### 新入会員 (平成8年4月24日~平成8年12月13日)

氏名	所属	氏名	所属
芦原由佳	神戸薬科大学放射薬品学研究室	佐伯憲一	名古屋市立大学薬学部薬品化学教室
石沢実	(株)UBE科学分析センター	鈴木俊也	東京都立衛生研究所多摩支所
西館絵美	国立八戸工業高等専門学校	中沢真理子	国立がんセンター研究所生化学部
王雪	国立衛生試験所変異遺伝部	福嶋得忍	千葉県衛生研究所生活環境研究室
小川徹一	(株)UBE科学分析センター	加藤千晴	名古屋市立大学薬学部薬化学教室
増村健一	国立衛生試験所変異遺伝部	佐久間勉	富山医科大学薬学部
米田久仁	シャープ(株)技術本部	山杉真理	アサマコーポレーション(株)化粧品研究所
西田壯司	東レ(株)基礎研究所	栗木清典	名城大学薬学部生物科学研究室
伊藤禎彦	京都大学大学院工学研究科	須田元裕	(株)環境技術研究所
千葉アキ	(有)しらかば農園	沼田栄美子	名城大学薬学部生物科学研究室
伴野富美子	昭和電工(株)総合研究所	宮内芳輝	帝人(株)医薬開発研究所
森幸宏	京都大学工学部環境室制御研究センター	扇牧生	(株)ニッソー総合研究所
浅見崇比呂	東京都立短期大学生物学研究室	柏田恵理子	大阪市立大学医学部
泉山房子	国立八戸工業高等専門学校	河上美也子	同志社大学工学部
駒木有希子	(有)しらかば農園	里見嘉英	帝人(株)医薬開発研究所
高橋みどり	岐阜薬科大学放射化学研究室	松井直也	同志社大学工学部
江尻貴明	名城大学薬学部	山口忠行	同志社大学工学部
太田絵律奈	(株)三菱化学安全科学研究所	米沢雄介	同志社大学工学部
佐野修志	(株)ニッソー総合研究所	井上和幸	東北大学薬学部衛生化学講座
中川宗洋	(株)三菱化学安全科学研究所	村田真理子	三重大学医学部衛生学教室
中村昭夫	金沢大学薬学部衛生科学教室	山下成人	三重大学医学部衛生学教室
小幡史子	東北大学大学院理学研究科生物学	高木広憲	大正製薬(株)開発研究所
秦祥寛	岡山大学薬学部薬品化学教室	川上久美子	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
森山圭	岡山大学遺伝子実験施設	奥野祥治	近畿大学理工学部応用化学科
武内美由紀	岡山大学薬学部	片桐幹之	(株)リコー沼津営業所北プラント
田中裕司	岡山大学薬学部	小柴朋代	(株)リコー沼津営業所北プラント
鄭然孫	九州大学薬学部薬品物理化学教室	坂田武	(株)富士バイオメディックス
町田利加	麻布大学獣医学部獣医学科	宮本恵美	山陽学園短期大学食物栄養学科
木村由希	名城大学薬学部生物科学研究室	小野宏	(財)食品薬品安全センター
三戸英津子	岡山大学薬学部薬品化学教室	山田正人	国立公衆衛生院廃棄物工学部
谷所達幸	静岡県立大学生生活健康科学研究科	小川宏	北海道立衛生研究所生活科学部
安藤福久枝	キャノン(株)化学安全部	田辺智嗣	日本火薬(株)
小林麗	京都大学大学院工学研究科		

## 賛助会員入会

団体名	
三共(株)安全性研究所	オリンパス光学工業(株)

## 編集後記

JEMS News は、会員の皆様に必要な記録、案内、資料などの情報をお知らせする機関紙です。今回も経費節減のための紙面を目指しましたが、大会直後のため予定をオーバーしてしまいました。

尚、環境変異原研究の投稿規定・執筆規定が一部改訂になりましたので次号 Vol. 18 No. 3 1996 の巻末に新に誌上致しましたので活用下さい。

本ニュースに関するご意見およびお問い合わせは、下記編集委員までお知らせ下さい。(TN)

編集委員長 石館 基	Tel: 0426-91-7115 (直通)	Fax: 0426-91-7209
編集委員 太田 敏博	Tel: 0426-76-7093 (直通)	Fax: 0426-76-7081
澁谷 徹	Tel: 0463-82-4751 (Ex324)	Fax: 0463-82-9627
下位香代子	Tel: 054-264-5528	Fax: 054-264-5528
鈴木 潤三	Tel: 03-3260-6725 (Ex5064)	Fax: 03-3268-3045
西富 保	Tel: 03-3454-7571	Fax: 03-3454-7573
降旗 千恵	Tel: 03-5449-5623	Fax: 03-5449-5423

### 事務局だより

◎この度、学会への正会員及び学生会員の申込書のホームが変りました。

環境変異原研究 Vol. 18 No. 3 1996 の巻末に掲載されておりますのでご活用下さい。

## 編集後記

Vol. 18, No. 3 をお届けします。本号は公開シンポジウム「突然変異誘発の調節機構」の特集号ですが、その原稿集めに手間取り発刊が遅れてしまいました。また、一般論文の集まりも悪く、編集作業は捗りませんでした。会員の皆様からの一般論文の御投稿を切に願います次第です。

編集委員会の手違いから、前号の No. 2 (25 周年記念特集号) の頁が通し番号ではありませんでしたが、この号の頁は、No. 1 からの頁を引き継いでおります。ご了承下さい。次号は 25 回大会特集号 (降旗委員担当) で 5 月発行を予定しておりますが、一般論文も受付けますので、御投稿をお待ちしています。

編集委員・担当 澁谷 徹

## 編集委員

委員長 石館 基

委員 鈴木 潤三  
澁谷 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巻 第3号 1996年

平成9年2月26日 印刷  
平成9年2月28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

一般論文

- 2-Aminoanthracene, 1,2-dimethylhydrazine 及び膀胱発癌性 *N*-ニトロソ化合物に対する胆汁酸の  
 助変異原性 ..... 森 幸雄, 高橋みどり, 飯村和徳, 堅田充宏, 小出彰宏, 小西陽一 117
- 新しい *in vivo* 遺伝毒性試験としてのマウス多臓器 SCG 試験 ..... 佐々木 有, 泉山房子, 西舘絵美 125
- 細菌を用いる復帰変異試験のデータ解析における判定方法の検討: ネズミチフス菌 TA102,  
 TA2638 および大腸菌 WP2/pKM101, WP2 *uvrA*/pKM101 株を用いた共同研究の  
 データに基づく評価 ..... 渡辺佳津子, 坂本京子, 佐々木俊明, 吉村 功 137

短 報

- Induction of Sister Chromatid Exchanges by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin in Cultured  
 Mammalian Cells ..... Takaji Ikushima, Sinya Imai and Yutaka Ishii 161
- アルキル化剤が誘発するショウジョウバエ体細胞 DNA 傷害 ..... 後藤友希, 早津彦哉, 根岸友恵 165

公開シンポジウム

「突然変異誘発の調節機構」

- はじめに: 環境変異原と生体によって誘発される突然変異 ..... 能美健彦 169
- 特別講演: 哺乳動物細胞の突然変異制御機構—遺伝子ターゲティングによる研究 ..... 関口睦夫 173
- 活性酸素による DNA 損傷と突然変異 ..... 紙谷浩之, 葛西 宏 181
- ヒトゲノム突然変異検出の方法と意義 ..... 田平知子, 久木田洋児, 稲塚雅一, 林 健志 191

資料・情報

- 米国 NTP 化学物質安全性データ ..... 197
- 日・米・EU 三極医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議 (ICH) 資料 ..... 209

AUTHOR INDEX ..... 221

KEYWORD INDEX ..... 222

付 記

- 日本環境変異原学会 入会申込書  
 学生会員申込書  
 環境変異原研究 投稿規定 (改訂版)  
 執筆規定 (改訂版)