

環境変異原研究

**Environmental
Mutagen
Research**

Vol.19 No.1 · 2 1997

KIKKOMAN S-9

このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

変異原性試験用凍結S-9

S-9調製法

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

保存

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

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

活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

分画	測定データ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
ミクロソーム (105,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

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

* Salmonella typhimurium

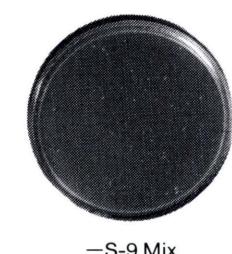
エームス試験用凍結S-9MIX

特長

- エームス試験がより手軽になりました。
- S-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。
- 解凍後、直ちにエームス試験にご使用いただけます。
- S-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

- 染色体異常試験がより簡単になりました。
- S-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。
- 解凍後、直ちに染色体異常試験にご使用いただけます。
- S-9が1.05mlとコファクターミックスが2.45ml入っており、7プレート分の試験が可能です。

●包装単位：3.5ml×3本

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

 家田貿易株式会社

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

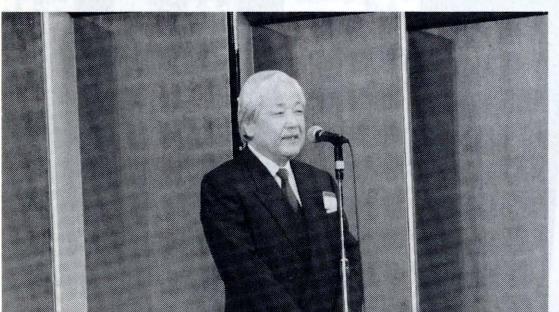
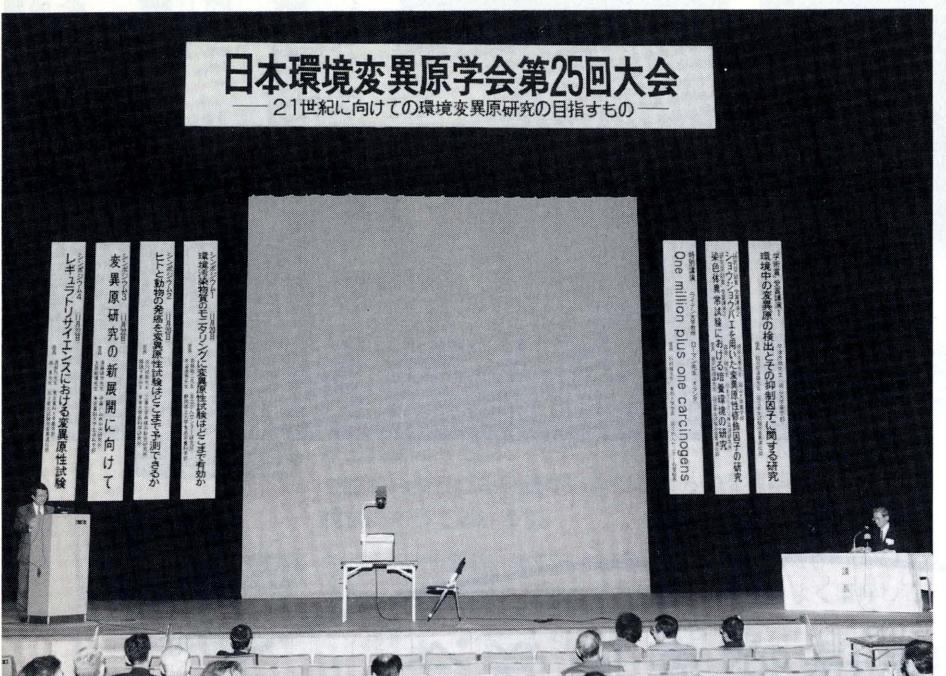


日本環境変異原学会

25周年記念大会

1996年 東京
会場風景





Environ. Mutagen Res., 19: 1-6 (1997)

一般論文

マウスの体温降下による小核の誘発

Hypothermia induces micronuclei in mice

朝波省吾, 下野和之

Shougo Asanami and Kazuyuki Shimono

(株)大塚製薬工場 鳴門研究所 772 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115

Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Naruto Research Institute, 115 Tateiwa, Muya-cho, Naruto, Tokushima 772, Japan

(受付: 1997年1月23日; 受理 1997年2月20日)

Summary

The effects of hypothermia on micronucleus induction were examined using the mouse micronucleus test. Groups of mice were treated with reserpine, chlorpromazine, pentobarbital sodium or lipopolysaccharide, cooled (1.0°C-8 h) and fasted to induce hypothermia. Those mice treated with reserpine, chlorpromazine or lipopolysaccharide, and fasted showed micronuclei induction in bone marrow cells. When mice administered reserpine or chlorpromazine were warmed, keeping body temperature within the normal range, the frequency of micronucleated erythrocytes did not increase. In the absence of such warming, the frequency of micronucleated erythrocytes did increase. In addition, approximately 50% of the induced micronuclei were relatively large (diameter of micronucleus $\geq 1/4$ diameter of cytoplasm). These results suggest that hypothermia induces micronuclei in bone marrow, and that one possible mechanism is the disturbance of the mitotic apparatus.

Keywords: mouse, micronucleus test, hypothermia, body temperature

緒 言

マウス小核試験は、1973年に Schmid と Heddle によって同時に開発された *in vivo* 染色体異常検出系である (Heddle, 1973; Schmid, 1973)。この試験は、化学物質等の染色体切断作用および紡錘体機能阻害作用によって赤芽球中に生じた染色体断片もしくは染色体そのものを、脱核後の幼若赤血球中に残存する小核として観察し、その出現頻度を陰性対照と比べることによってその染色体異常誘発性を評価するものである。その結果は、化学物質の生体に対する遺伝毒性の評価、さらにその発癌性の予測に大きく影響する (Morita *et al.*, 1997)。したがって、その試験結果に影響を与える要因を把握することが重要である。

一般に、実験動物の飼育環境、特に温度などの物理化学的要因の変化が動物の反応に影響を及ぼすことは、すでに報告されている (山内, 1983, 1995)。小核の誘発に関しては、環境温度を上昇させてマウスの体温を上げると骨髄中の小核を有する多染性赤血球の出現頻度が上昇することが報告されている (Chrisman and Baumgartner, 1980; King and Wild, 1983; Asanami and Shimono, 1997)。これらの報告は、体温上昇が小核を誘発することを示す

と同時に、体温の変化が小核の誘発に影響を及ぼすことを示唆するものである。しかしながら、体温降下に関しては報告されていない。これは、哺乳動物の有する恒常性によるもので、単に環境温度を下げただけでは、一時的かつ軽度の体温降下しか観察されず、長時間動物に低体温状態を維持させるのは無理である。ところが、一部の抗精神薬の投与により体温降下が生じることが報告されており (Boschi *et al.*, 1987; Masuo *et al.*, 1995)、また少なくとも数十時間はマウスに低体温状態を維持させることが可能である。このことを利用して、体温降下の小核誘発性への影響を検討することが可能となった。

本試験においては、抗精神薬も含め体温降下させる要因を用いて、その小核誘発性を検討した。さらに、小核の大きさから体温降下による小核誘発の機構についても推論した。

実験材料および方法

1. 試験物質

マウスの体温を降下させるための化学物質として、reserpine (RES, CANRN.50-55-5, 半井化学薬品), chlorpromazine hydrochloride (CPH, CANRN.69-09-0, 和光

純薬工業), pentobarbital sodium (PEN, nembutal[®] injection, 大日本製薬) および lipopolysaccharide *E. coli* 0127 : B8 (LPS, DIFCO Laboratories) を使用した。また、小核の大きさを比較する際の比較対照として、紡錘体機能の阻害が知られている colchicine (COL, 和光純薬工業) を用いた。

2. 使用動物

4 週齢の ddY 系雄性マウス (Slc : ddY, SPF) を購入し、検疫を含む予備飼育後、異常の認められなかった 8-12 週齢の動物を使用した。

3. 体温降下の要因と小核誘発性

マウスの体温を降下させるために、RES (1, 5, 10, 100, 1000 mg/kg), CPH (3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/kg), PEN (100 mg/kg) および LPS (40 mg/kg) を、マウスの腹腔内に単回投与した。また、化学物質を使わずに体温降下させる系として、9 日以上の完全絶食および動物を 1 匹ずつ環境温度 1.0°C の中に 8 時間寒冷暴露させた。以上の処置を施した動物を所定の時間に屠殺し、骨髄細胞を採取した。ただし、完全絶食させた系では、瀕死状態（自発運動の消失、腹臥位もしくは側臥位、反射の消失および喘ぎ呼吸の観察される状態）の動物から骨髄細胞を採取した。骨髄標本は、メタノールで固定後 40 μg/ml のアクリジン・オレンジ水溶液で染色した (Hayashi *et al.*, 1983)。個体当たり 1000 もしくは 2000 個の多染性赤血球 (PCE) を計測し、小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) の出現頻度を算出した。統計処理は、Kastenbaum と Bowman の表 (Kastenbaum and Bowman, 1970) を用いて、陰性対照との間で有意差検定を実施した。また、体温測定は、各動物の直腸温をデジタル式マイクロプローブサーモメータ (BAT-12 Physitemp Instrument Inc., USA) を用いて測定した。

4. 体温降下による小核誘発性の確認

RES (50, 100, 200 mg/kg) および CPH (25, 50, 100 mg/kg) をマウスの腹腔内に単回投与し、温熱暴露して体温を正常域に保つ群と室温に放置して体温を降下させる群を設置した。温熱暴露は、RES の場合、投与 8 時間後から乾熱滅菌器 (LSC-120, タバイエスペック株式会社) を用いて、30°C で 40 時間実施した。CPH は、投与 2 時間後から 30°C で 46 時間、同様に温熱暴露させた。骨髄標本は、投与 48 時間に採取し、前述と同様に染色し、観察した。また、投与 1 日後の骨髄中の小核誘発を評価するために、骨髄標本採取と同時に末梢血も採取し、末梢血標本を作製した。末梢血標本は、50 μg/ml のアクリジン・オレンジ水溶液で超生体染色した。個体当たり 2000 個の網赤血球 (RET) を計測し、小核を有する網赤血球 (MNRET) の出現頻度を算出した。統計処理は、小核誘発性に関しては、前述同様に Kastenbaum と Bowman の表を用いて有意差検定を実施した。また、骨髄増殖抑制の指標として、全赤血球中の PCE 比の割合も求め、陰性対照との間で Dunnett の多重比較を用いて有意差検定を実施した。

有意差検定を実施した。

5. 体温降下による紡錘体機能の阻害

小核誘発機序を考察するために、山本らの基準に準じて小核の大きさを肉眼的に比較した (Yamamoto and Kikuchi, 1980)。すなわち、上記試験で室温に放置した動物の骨髄標本を用いて、誘発された小核 20 個のうち正常赤血球の細胞質の直径の 1/4 以上の中核を大きな小核として、その出現頻度を算出した。有意差検定は、それぞれの陰性対照との間でカイ二乗法を用いて実施した。

結果

1. 体温降下の要因と小核誘発性

それぞれの処置を施したマウスの体温変化を Fig. 1 および 2 に、そのときの小核試験の結果を Table 1-3 に示す。RES の 10, 100 および 1000 mg/kg を投与した動物の体温は、投与約 8 時間後より明らかな体温の降下が観察され、24 時間後には平均体温 30°C 以下になった。その後、10 mg/kg 投与群では、回復傾向にあったが、100 および 1000 mg/kg 投与群では低体温の状態が継続した (Fig. 1)。CPH の 12.5 mg/kg 以上の投与群で顕著な体温降下 (投与 8 時間後で約 28°C) が観察されたが、100 mg/kg 投与群を除いて 24 時間後にはほぼ正常範囲まで回復した (Fig. 1)。40 mg/kg の LPS を投与した動物の体温も投与後降下し、低体温 (約 30°C) の状態が継続した (Fig. 2)。100 mg/kg の PEN を投与した動物も一時的な

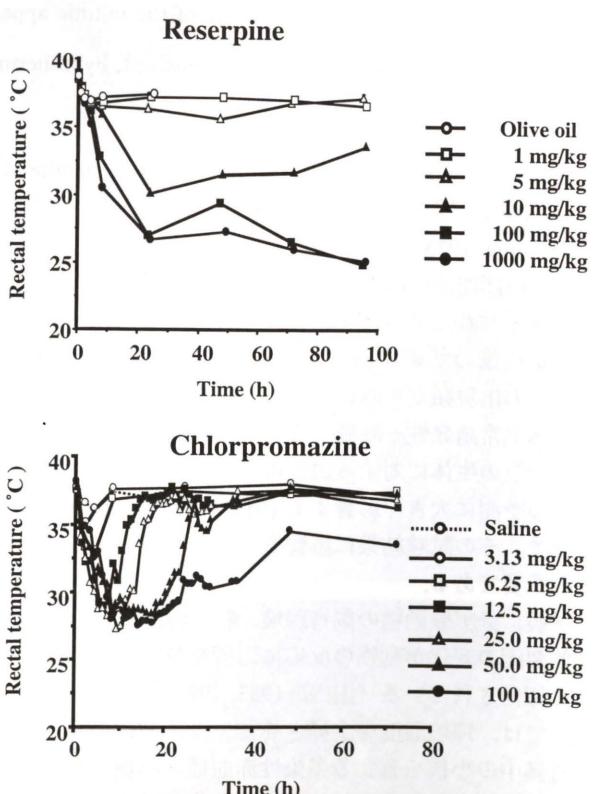


Fig. 1. The time course of rectal temperature in mice following i.p. administration of reserpine or chlorpromazine.

Table 1. The mouse bone marrow micronucleus test of reserpine.

Chemical	Dose (mg/kg)	Sampling time			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Olive oil (Control)	0	2, 3, 4 ^a	N.T.	N.T.	N.T.
		1.5±0.5 ^b (51.3) ^c			
Reserpine	1	1, 5, 4	2, 4, 2	1, 2, 3	1, 1, 1
		1.7±1.0 (50.0)	1.3±0.6 (56.1)	1.0±0.5 (53.0)	0.5±0 (50.0)
	5	5, 2, 3	1, 3, 6	3, 3, 1	4, 4, 2
		1.7±0.8 (56.5)	1.7±1.3 (54.6)	1.2±0.6 (53.6)	1.7±0.6 (52.0)
	10	3, 7, 8	12, 8, 8	14, 18, 4	13, 3, ^d
		3.0±1.3 (53.9)	4.7±1.2** (56.4)	6.0±3.6** (53.5)	4.0±3.5** (50.0)
	100	2, 2, 1	8, 6, 10	-, 9, 10	19, 6, 9
		0.8±0.3 (54.6)	4.0±1.0** (53.7)	4.8±0.4** (52.7)	5.7±3.4** (50.1)
	1000	5, 2, 5	13, 14, 7	13, 11, 15	-, 36, 13
		2.0±0.9 (52.9)	5.6±1.9** (53.4)	6.5±1.0** (48.7)	12.3±8.1** (52.3)

*p<0.01 vs control by table of Kastenbaum and Bowman (1970); N.T., not tested

^aIndividual data for MNPCE / 2000 PCE; ^bMean±SD of MNPCE (%); ^cMean of PCE (%); ^danimal died

Table 2. The mouse bone marrow micronucleus test of chlorpromazine.

Chemical	Dose (mg/kg)	Sampling time				
		24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Saline (Control)	0	4, 3, 2 ^a	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		1.5±0.5 ^b (55.8) ^c				
Chlorpromazine	3.13	1, 1, 3	N.T.	N.T.	4, 3, 3	5, 6, 3
		0.8±0.6 (50.4)			1.7±0.3 (54.3)	2.3±0.8 (53.6)
	6.25	1, 7, 1	N.T.	N.T.	3, 3, 4	4, 3, 2
		1.5±1.7 (56.5)			1.7±0.3 (60.0)	1.5±0.5 (50.2)
	12.5	2, 9, 3	8, 1, 4	5, 5, 5	4, 5, 7	2, 5, 1
		2.3±1.9 (52.3)	2.2±1.8 (46.5)	2.5±0 (54.2)	2.7±0.8 (51.5)	1.3±1.0 (57.3)
	25	1, 2, 10	6, 5, 3	6, 10, 3	11, 7, 11	2, 1, 4
		2.2±2.5 (49.5)	2.4±1.8 (52.9)	3.2±1.8* (46.1)	4.8±1.2** (54.6)	1.2±0.8 (54.9)
	50	3, 7, 5	4, 5, 6	4, 7, 6	18, 18, 13	5, 7, 5
		2.5±1.0 (54.7)	2.5±0.5 (52.9)	2.9±0.8 (52.6)	8.2±1.4** (54.2)	2.8±0.6 (51.9)
	100	7, 3, 6	10, 8, ^d	9, 6, 7	11, 11, 7	9, 11, 10
		2.6±1.0 (55.5)	4.5±0.7** (57.0)	3.7±0.8* (46.7)	4.8±1.2** (54.2)	5.0±0.5** (44.3)

*p<0.05 and **, p<0.01 vs control by table of Kastenbaum and Bowman (1970); N.T., not tested

^aIndividual data of MNPCE / 2000 PCE; ^bMean±SD of MNPCE (%); ^cMean of PCE (%); ^danimal died

Table 3. The bone marrow micronucleus test using mice treated with cooled, fasted, LPS or PEN.

Treatment	Sampling time	Dose (mg/kg)	N	% PCEs Mean±S.D.	MNPCE / 1000PCE Individual data Mean±S.D.	
					Individual data	Mean±S.D.
Non-treatment (Control)	-		10	54.6±6.9	2, 1, 0, 2, 0, 4, 2, 0, 0	1.1±1.4
1.0°C-8 h	24 h	-	10	56.0±5.9	1, 0, 2, 1, 1, 3, 4, 2, 1	1.8±1.2
1.0°C-8 h	48 h	-	10	50.7±5.9	2, 2, 3, 2, 1, 2, 0, 1	1.6±0.8
Fasted ^a	day 9 or 10	-	3	20.5±6.2	10, 9, 10	4.8±1.3**
LPS ^a	48 h	40	3	34.1±9.2	7, 4, 4	5.0±1.7**
PEN	48 h	100	2	54.9±9.2	2, 1	1.5±0.7

* *p<0.01 vs control by table of Kastenbaum and Bowman (1970); ^aMNPCE / 2000 PCE

体温降下 (投与 2 時間後 32.1°C) が観察されたが、4 時間後には回復した (Fig. 2)。完全絶食した動物も絶食開始 8 日後までは一定の低体温状態 (約 34.0°C) が観察されたが、動物が瀕死状態になるとほぼ 30°C ぐらいまでさらに体温が降下した (Fig. 2)。寒冷暴露 (1.0°C, 8 時間)においては、体温は平均 34.4°C まで降下したが、寒冷暴露終了 1 時間後には、正常体温まで回復した (Fig. 2)。

小核誘発性に関しては、RES, CPH, LPS 投与群および完全絶食による瀕死動物に有意な小核の誘発が認められた (Table 1-3)。特に、RES と CPH に関しては、投与 48 もしくは 30 時間以降にそれぞれ用量依存性を伴わない有意な小核の誘発が観察された (Table 1 および 2)。

2. 体温降下による小核誘発の確認

RES もしくは CPH を投与し、かつ室温に放置した群では、すべて有意な小核の誘発が認められた。これに対

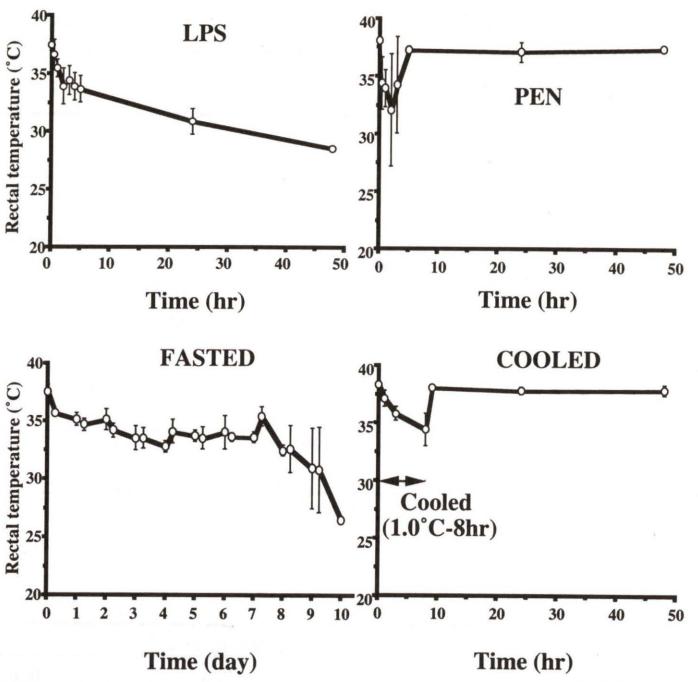


Fig. 2. The time course of rectal temperature in mice treated with LPS, PEN, fasted, or cooled.

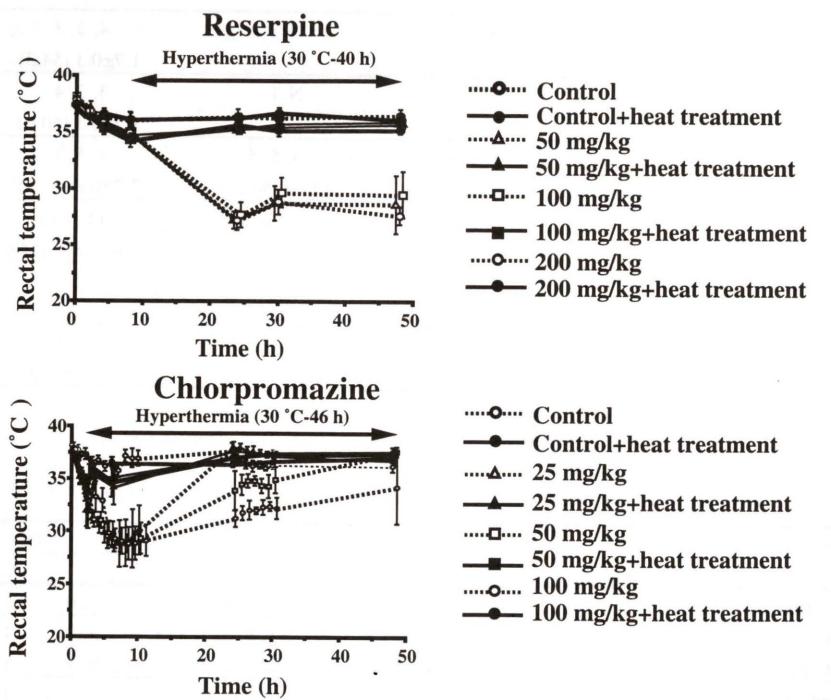


Fig. 3. The time course of rectal temperature in mice following i.p. administration of reserpine or chlorpromazine with or without hyperthermia.

し、温熱暴露した群においては、体温がほぼ正常域に保たれ (Fig. 3)，しかも有意な小核の誘発は骨髓および末梢血のいずれにおいても認められなかった (Table 4)。

3. 体温降下による紡錘体機能の阻害

有意に小核の誘発が認められた群においては、細胞質の直径の 1/4 以上の大きな小核が約 50% 以上観察され、COL と同様に、大きな小核の有意な出現頻度の上昇が観察された (Table 5)。

考 察

すでに、体温上昇による小核の誘発は報告されている (Chrisman and Baumgartner, 1980; King and Wild, 1983; Asanami and Shimono, 1997) が、体温降下による影響は報告されていない。これは、哺乳動物の有する恒常性によるものであり、環境温度を下げただけでは、長時間低体温状態を保つことはできないからである (Fig. 2)。しかし、一部の抗精神薬を投与することによって、マウスを低体温状態に維持することが可能になり、その影響を

Table 4. The effect of hyperthermia on micronucleus induction in reserpine or chlorpromazine-treated mice.

Chemical	Heat-treatment	Dose (mg/kg)	N	% PCEs Mean±S.D.	MNPCEs / 2000 PCEs		MNRETs / 2000 RETs	
					Individual data	Mean±S.D.	Individual data	Mean±S.D.
Reserpine	Room temperature (23±2°C)	Control ^a	5	54.6±3.2	3, 4, 3, 6, 3	1.9±0.7	3, 4, 3, 3, 2	1.5±0.4
		50	5	52.1±6.3	20, 13, 7, 11, 13	6.4±2.4**	3, 3, 1, 3, 3	1.3±0.4
		100	5	50.5±5.2	14, 12, 14, 12, 8	6.0±1.2**	1, 2, 3, 2, 2	1.0±0.4
		200	5	53.0±1.9	8, 18, 6, 10, 7	4.9±2.4**	2, 4, 2, 3, 1	1.2±0.6
	30°C-40 h ^b	Control ^a	5	52.4±5.5	3, 2, 2, 0, 1	0.8±0.6	3, 5, 3, 3, 0	1.4±0.9
		50	5	55.7±2.5	3, 3, 3, 3, 1	1.3±0.4	2, 2, 2, 0, 1	0.7±0.4
		100	5	54.4±4.7	1, 1, 3, 3, 0	1.0±0.5	2, 2, 1, 0, 1	0.6±0.4
		200	5	52.6±5.3	2, 4, 4, 2, 1	1.3±0.7	2, 2, 2, 1, 2	0.9±0.2
Chlorpromazine	Room temperature (23±2°C)	Control ^c	5	56.2±2.1	4, 3, 3, 3, 2	1.5±0.4	4, 3, 2, 2, 2	1.3±0.5
		25	5	53.1±2.4	18, 8, 3, 7, 8	4.4±2.8**	2, 2, 3, 2, 3	1.2±0.3
		50	5	52.3±2.7	15, 6, 10, 5, 8	4.4±2.0**	3, 3, 2, 1, 4	1.3±0.6
		100	5	46.2±6.8	8, 12, 13, 7, 11	5.4±1.3**	3, 2, 3, 2, 5	1.5±0.7
	30°C-46 h ^b	Control ^c	5	53.8±3.0	5, 4, 2, 3, 3	1.7±0.6	4, 2, 3, 3, 3	1.5±0.4
		25	5	52.2±3.1	3, 2, 4, 3, 2	1.4±0.4	1, 0, 2, 1, 2	0.6±0.4
		50	5	52.5±3.6	3, 3, 5, 2, 3	1.6±0.6	0, 4, 4, 2, 2	1.2±0.9
		100	3	46.2±4.2	- ^d , 6, 2, -, 3	1.9±1.1	-, 4, 4, -, 1	1.5±0.9

* *p<0.01 vs control by table of Kastenbaum and Bowman (1970).

^aOlive oil; ^bExposure temperature and treatment time; ^cSaline; ^danimal died.

Table 5. Frequency of micronucleated erythrocytes containing relatively large micronuclei ($d \geq D/4$) in mice without hyperthermia.

Chemical	Dose (mg/kg)	N	MNPCE (%)	Large MNPCE / 20 MNPCE	
				Individual data	Mean±S.D. (%)
Olive oil (control) ^a	5	1.9±0.7	3, 3, 1, 3, 5	15.0±7.1	
Reserpine	50 mg/kg	5	6.4±2.4	10, 11, 11, 8, 9	49.0±6.5**
	100 mg/kg	5	6.0±1.2	10, 11, 7, 11, 11	50.0±8.7**
	200 mg/kg	5	4.9±2.4	8, 10, 9, 11, 10	48.0±5.7**
Saline (control)	5	1.5±0.4	2, 2, 1, 1, 0	6.0±4.2	
Chlorpromazine	25 mg/kg	5	4.4±4.8	11, 7, 11, 15, 12	56.0±14.3**
	50 mg/kg	5	4.4±2.0	14, 11, 12, 11, 10	58.0±7.6**
	100 mg/kg	5	5.4±1.3	13, 10, 11, 11, 8	56.0±14.7**
Colchicine ^b	1.0 mg/kg	5	22.2±11.1	12, 12, 10, 12, 12	58.0±4.5**

* *p<0.01 vs control by χ^2 test; D, d, The diameters of cytoplasm (D) and micronuclei (d)

^aLarge MNPCE / 10 PCE; ^bSingle i.p. dosing of 1.0 mg/kg and 24-h sampling

検討できるようになった。当然、本試験で用いた抗精神薬は、現在のところ明らかな変異原性の報告されていない RES と CPH を用いた (石館, 1987; Gocke, 1996)。その結果、RES と CPH は、投与 48 および 30 時間以降に、明らかな体温降下に伴った小核の有意な誘発が観察された。通常、化学物質による小核誘発の経時変化は、投与 24 から 48 時間目にピークが現われ、72 あるいは 96 時間目には見られない (Hayashi *et al.*, 1984) が、RES と CPH は、どちらも投与 24 時間後に小核誘発は認められず、RES では投与 96 時間後、CPH では 72 時間後まで有意な小核誘発が観察された群があり、通常の化学物質とは異なった小核誘発の経時変化を示した (Table 1 および 2)。また、小核誘発の認められる用量においても、用量と小核出現頻度との間に明らかな相関性は観察されず、かつ体温降下に伴って小核の誘発が観察されているので、本試験における小核の誘発は、化学物質によるものではなく、体温降下によるものと推測された。さらに、このことを確認する目的で、RES もしくは CPH を投与した動物を温熱暴露し、正常体温域に戻したときの小核

誘発の有無を検討した。その結果、小核を誘発する用量を投与した動物でも、正常体温にすると骨髓においても末梢血においても小核の誘発は認められなくなった (Table 4)。このことから、RES および CPH による小核の誘発は、直接的な遺伝毒性ではなく、体温降下による二次的な作用と考えられた。

COL 等の分裂阻害剤によって誘発される小核は、1 本または数本の染色体によって形成されるので、その大きさは染色体切断作用によって生じた小核よりも一般的に大きいことが報告されている (Yamamoto and Kikuchi, 1980; Tinwill and Ashby, 1991)。本試験では、体温降下によって誘発された小核において、陰性対照に比し、大きな小核の割合が COL と同様に有意に高かったので ($p < 0.01$)、体温降下による小核の形成には、紡錘体機能の阻害が関与している可能性が考えられた。

本試験では、上記の抗精神薬に加えて、他の体温降下を示す要因も併せて検討した。その結果、すべての要因はマウスに対し体温を降下させたが (Fig. 2), LPS および完全絶食処理した動物だけに有意な小核誘発が認めら

れた(Table 3)。一般に、絶食による体温降下については知られており(Hart *et al.*, 1996), また完全絶食による瀕死動物の小核誘発については、すでに我々が報告している(Asanami *et al.*, 1995)。この結果は、小核誘発が、絶食開始5日後では観察されず、7日以降の瀕死動物に観察されたことから、栄養不良の状態よりも瀕死状態という特別な状態が小核誘発に関与することを示唆した。しかし、その小核誘発機構は不明であった。本試験結果より、絶食によって低体温状態が続き、さらに瀕死状態になるとより体温が降下することから、瀕死状態のマウスに観察された小核の誘発は、体温降下の影響も関与すると思われた。しかし、体温降下が生じると、必ず小核が誘発されるわけではなく、その体温降下の程度がまず問題となる。すなわち、寒冷暴露では、軽度な体温降下しか生じないので、小核誘発の可能性は低いと思われる。ただし、本試験における寒冷暴露の条件は、予備試験(結果は示していない)で死亡例が観察された条件であり、寒冷暴露による影響を評価するには十分な条件である。また、体温変化の生体への影響には、その暴露時間も関与する(Asanami and Shimono, 1997)。すなわち、明らかな体温降下が生じても短時間であれば、その影響は少ないと考えられる。本試験において、PENの100 mg/kgおよびCPHの12.5 mg/kg投与群で、明らかな体温降下が観察されたにもかかわらず、小核誘発は認められなかった。これは、低体温状態の時間が短かったためと思われ、体温降下による小核誘発は、体温降下の程度と時間が影響するものと思われる。

以上、体温降下による小核誘発性を示し、その誘発機構として紡錘体機能の阻害を考えた。これより、体温上昇による小核の誘発も考えあわせると、もし、*in vitro*染色体異常試験陰性の物質が、*in vivo*小核試験で陽性結果を示す場合には、その物質による体温への影響を考慮することも必要と思われる。

謝 辞

マウスの低体温における小核誘発を示唆して頂きました林 真博士(国立衛生試験所、変異遺伝部)および瀧谷 徹博士(食品薬品安全センター、秦野研究所)に深謝いたします。

参考文献

Asanami, S., K. Shimono and K. Kurisu (1995) A significant

- increase of micronucleated erythrocytes was observed in mice made moribund by fasting, *MMS Commun.*, **3**, 77-80.
- Asanami, S. and K. Shimono (1997) High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutat. Res.*, in press.
- Boshi, G., N. Launay and R. Rips (1987) Neuroleptic-induced hypothermia in mice; lack of evidence for a central mechanism, *Br. J. Pharmac.*, **90**, 745-751.
- Chrisman, C. L. and A. P. Baumgartner (1980) Micronuclei in bone-marrow cells of mice subjected to hyperthermia, *Mutat. Res.*, **77**, 95-97.
- Gocke, E. (1996) Review of the genotoxic properties of chlorpromazine and related phenothiazines, *Mutat. Res.*, **366**, 9-21.
- Hart, R. W., J. Leakey, P. H. Duffy, R. J. Feuers and A. Turturro (1996) The effects of dietary restriction on drug testing and toxicity, *Exp. Toxic. Pathol.*, **48**, 121-127.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **120**, 241-247.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1984) Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, *Mutat. Res.*, **127**, 129-137.
- Heddle, J. A. (1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutat. Res.*, **18**, 187-190.
- 石館 基(監) (1987) 改訂 染色体異常試験データ集, エル・アイ・シー.
- Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, **9**, 527-549.
- King, M. T. and D. Wild (1983) The mutagenic potential of hyperthermia and fever in mice, *Mutat. Res.*, **111**, 219-226.
- Masuo, Y., J. Noguchi, S. Morita and Y. Matsumoto (1995) Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the motor activity and reserpine-induced hypothermia in murines, *Brain Res.*, **700**, 219-226.
- Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y. F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, T. Sofuni and M. Hayashi (1997) 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.
- Schmid, W. (1973) Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells, *Agents and Actions*, **3**, 77-85.
- Tinwell, H. and J. Ashby (1991) Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay, *Mutagenesis*, **6**, 193-198.
- Yamamoto, K. and Y. Kikuchi (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, *Mutat. Res.*, **71**, 127-131.
- 山内忠平(1983) 環境と実験動物の反応, トキシコロジーフォーラム, **6**, 391-398.
- Yamauchi, C. (1995) Studies on the environmental control of laboratory animals, *Exp. Anim.*, **44**, 9-21.

Environ. Mutagen Res., **19**: 7-15 (1997)

In vitro DNA synthesis error specificity: A single amino-acid replacement in rat DNA polymerase β

Magdy Mahmoud Mohamed^{1,†}, Akio Matsukage², Takayasu Date³, Fumio Hanaoka¹ and Fumio Yatagai^{1, 4, *}

¹Cellular Physiology Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research, Wako, Saitama 351-01, Japan

²Laboratory of Cell Biology, Aichi Cancer Center Research Institute, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan

³Department of Biochemistry, Kanazawa Medical University, Uchinada, Ishikawa 920-02, Japan

⁴Division of Radioisotope Technology, The Institute of Physical and Chemical Research, Wako, Saitama 351-01, Japan

(受付: 1997年2月5日; 受理: 1997年3月3日)

Summary

We studied the influence of a single amino-acid replacement in rat DNA polymerase β , on the specificity of *in vitro* DNA synthesis error. Arg183, considered an important residue for primer recognition, was replaced by Gln (RQ183), and neighboring Arg182 by Gln (RQ182). Both *E. coli* MutS⁺ and MutS⁻ hosts were transfected with the M13mp2 RF molecule, synthesized *in vitro* by wild-type β . The proportions of lacZ α ⁻ mutant transfectants were 1.7×10^{-3} and 8.2×10^{-3} for MutS⁺ and MutS⁻ hosts, respectively. Such a five-fold difference suggests that ~80% of *in vitro* errors can be corrected by the MutS mismatch repair system. Although the lacZ α ⁻ proportion was not altered by using RQ182 or RQ183, characteristic changes in the error spectrum were observed with the MutS⁺ host. Addition of C-base in the run of 5C (position 132-136) and 3C (166-168) was found in the spectrum for only mutant β , RQ182 (3/41) and RQ183 (7/46). Such frequent addition of C was observed even with wild-type β when RF was synthesized at a reduced speed in a 10°C reaction. This unique enhancement of C addition seems to be not specific to the single amino-acid replacement of β , but rather due to the reduced speed of DNA synthesis.

Keywords: mismatch repair, DNA synthesis error, lacZ α ⁻ mutation, DNA polymerase β , single amino-acid replacement

Introduction

Base mispairing due to a misreplication or a misrepair of DNA damage may result in mutation, and is thought to be closely related to cancer induction and aging (Parsons *et al.*, 1993). MutH, S, L mismatch repair is a key function to prevent the fixation of mainly transition type errors, AT to GC and GC to AT (Schaaper and Dunn, 1987). Similarly, MutM and MutY act in the prevention of transversion type GC to TA (Michaels *et al.*, 1991; Au *et al.*, 1989). Crude extracts from mammalian cells have also been shown to be capable of mismatch repair activity (Griffin *et al.*, 1994) and recently human mismatch repair genes have been cloned (Fishel *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1993).

DNA polymerase β is suggested to play an important role in the filling of small gaps during mismatch repair at, for example, apyrimidinic sites generated by the removal of a thymine in a G-T mispair through glycosylase activity in

nuclear extracts from HeLa cells (Wiebauer and Jiricny, 1990). Recently, release of 5'-terminal deoxyribose phosphate residues from incised apurinic-apyrimidinic site was shown to be catalyzed by eukaryotic DNA polymerase β (Matsumoto and Kim, 1995), and this requirement of β in base-excision repair was also reported in an *in vivo* study using an embryonic fibroblast cell line defective in β activity (Sobol *et al.*, 1996). The gap filling function of polymerase β is similar to that of DNA polymerase I in *Escherichia coli*, and, moreover, polymerase β is not believed to possess a 3' to 5' exonuclease, and consequently no proof-reading activity (Linn, 1991). Therefore, we suggest that *in vitro* DNA synthesis by DNA polymerase β might be a useful system to obtain insight into the error specificity of nucleotide selection during the DNA repair.

The active form of rat DNA polymerase β consists of 335 amino acid residues (Matsukage *et al.*, 1987) and a recombinant enzymatically active form of β has been produced in *E. coli* and purified to homogeneity in large quantities (Date *et al.*, 1988; Abbotts *et al.*, 1988). The purified enzyme allows the study of *in vitro* DNA synthesis errors as well as other protein characterizations. The region between

* To whom correspondence should be addressed.
Tel. 81-48-462-1111 (ext 5201); Fax. 81-48-462-4636;
E-Mail yatagai@postman.riken.go.jp

† The present address is Department of Biochemistry, Ain Shams University, Cairo, Egypt

amino acids 179 and 184 of DNA polymerase β , which contains the two Arg residues replaced here, is the most conserved with respect to human terminal deoxynucleotidyl transferase (Matsukage *et al.*, 1987), suggesting that this region in β is important for DNA polymerizing activity. Indeed, the replacement of the Arg residue at position 182 or 183 of the recombinant DNA polymerase β dramatically decreased enzyme activity, indicating that Arg-183 is involved in recognition of the primer (Date *et al.*, 1990). Arg-182 is thought to be involved in modulating the template binding activity because a substitution here results in a much higher affinity for single-stranded DNA than that exhibited by the wild-type enzyme but retains almost identical K_m values for primer and dTTP compared to the wild-type.

The two β mutants, RQ182 and RQ183, are used here to elucidate the influence of single amino-acid replacements on the specificity of *in vitro* DNA synthesis errors. The observed changes in the error spectrum are described as well as the influence of a reduced speed of DNA synthesis on the error spectrum.

Materials and Methods

Preparation of Rat DNA Polymerase β

The recombinant expression plasmid for rat DNA polymerase β (wild-type) has been previously described (Date *et al.*, 1988). Polymerase β mutants RQ182 and RQ183 are shown in Fig. 1. Independently, Arg-182 and Arg-183 of wild-type β were replaced by Glu residues using antisite-directed mutagenesis. Extraction and purification of the desired DNA polymerase β from recombinant *E. coli* has also been previously described (Date *et al.*, 1990).

Pol. β Replacement	DNA Sequences
Wild-Type	181 182 183 5' AGT TTC CGA AGA GGC 3' Phe Arg Arg
RQ182 Arg->Gln	CAG
RQ183 Arg->Gln	CAA

Fig. 1. Single amino-acid replacements in rat DNA polymerase β .

The site-directed mutagenesis method to prepare these β mutants has been described (Date *et al.*, 1990).

Selection of Primer Oligonucleotide for DNA Synthesis

The single-stranded DNA of hybrid bacteriophage M13 mp2 (Messing *et al.*, 1977) was used as a template for *in vitro* DNA synthesis. The 17-mer oligonucleotides, 5'-CCATTCGCCATTCAAGGC-3', complementary to nucleotides 199-215 of *lacZ* gene, was selected as a primer to copy the target region from *lacO* to nucleotide 163 of *lacZ* gene (α region).

In vitro DNA Synthesis

The 5'-end of the primer was phosphorylated by T4 polynucleotide kinase (TAKARA) in the presence of 1 mM ATP at 37°C in a 60 min incubation. Following a Sephadex G-25 column chromatography purification, the phosphory-

lated primer was annealed to the ssDNA at 5 : 1 ratio in SSC buffer at 60°C for 20 min. Using this primed M13 ssDNA at concentration of 4.0 μ g/ml except when otherwise noted (8.0 μ g/ml), the polymerase reaction was carried out at 37°C in the following buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 2 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂, 500 μ M each of dNTP, 0.1 Ci/mmol [α -³²P]dCTP (Amersham, 3,000 Ci/mmol), and DNA polymerase β at a final concentration, 1.9, 4.8, and 12.0 μ g/ml of wild-type, RQ182 and RQ183, respectively. The relative concentration of polymerase to substrate ssDNA was confirmed to be in the linear range of so called 1/v vs. 1/s plot (data not shown).

To reduce the speed of DNA synthesis by wild-type β , the polymerase reaction was carried out at 10°C for 1 h. To complete replication of the molecules partially copied by mutant β or by wild-type β at 10°C, they were first purified by phenol extraction and then subjected to a second DNA-synthesis reaction with wild-type β for 2 h at 37°C.

Analysis of DNA Synthesized Molecules

To assess the completeness of DNA replication, the *in vitro* synthesized DNA molecules were subjected to agarose-gel electrophoresis (0.8% of Seakem GTG). After an overnight run at 30 V in TAE buffer, the gel was stained with ethidium bromide (1 μ g/ml), and then dried and exposed to X-ray Film (Fuji, RX). For the analysis of chain elongation, the 5' end of primer was labelled with [γ -³²P]ATP (Amersham, 5000 Ci/mmol) and purified by the method used for phosphorylated primer. The reaction condition for chain elongation was the same as that for *in vitro* DNA synthesis. An aliquot of reaction mixture was purified by phenol extraction and loaded onto an 8% polyacrylamide sequencing gel. The gel was run at 50 V/cm in TBE buffer for ~1 h.

Transfection of *E. coli* and Selection of *lacZ_a* Mutation

The fully replicated molecules were ligated by T4 DNA ligase (Takara) and introduced into competent cells of *E. coli* strains S90C [Δ (*pro-lac*), *recA56*, *ara*, *thi*, *strA*] or BMH71-18 [Δ (*pro-lac*), *thi*, *supE*, *mutS215*; Tn 10 [*tet*^r/F'*traD36*, *proAB*, *laqI^rZ Δ M15>]] at an approximate ratio of 10 : 1. The procedure followed to make competent cells and to introduce the replicated DNA into the cells is essentially that described by Kunkel (1985a). Together with indicator cells of *E. coli* CSH50 [Δ (*pro-lac*), *ara*, *thi*/F'*traD36*, *proAB*, *laqI^rZ Δ M15>]], the above transfected cells were resuspended in a 0.6% of M9G top agar containing 40 μ g/ml of X-gal and 20 μ g/ml of IPTG and then poured onto an M9G bottom plate. M13 phage carrying a *lacZ_a*⁻ mutation were selected as colorless or faint-blue plaques on the plate after an overnight incubation at 37°C. As a reference for DNA synthesis errors, viral M13mp2 DNA and the parental RF were also monitored in similar transfections.**

Identification of *lacZ_a* Mutation

Mutant phage were purified by single-plaque isolation using *E. coli* 9099 [Δ (*pro-lac*), *recA*, *ara*, *thi*/F'*proAB*, *laqI^rZ Δ M15>]] as an indicator, and the DNA from amplified phage was isolated by the alkaline-SDS method. Dideoxy sequencing was mainly performed with the previously*

mentioned 17-mer as a primer and, if necessary, 17-mer primer (M4, Takara), 5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3', complementary to position 79 to 95, was used for reading the upstream sequence.

RESULTS

In Vitro DNA Synthesis

Fig. 2 shows the incorporation of [α -³²P]dCMP by DNA polymerase β during the DNA synthesis reaction using primed M13 ssDNA as a template DNA. The incorporation of dCMP by wild-type β was found to be almost saturated after a 2 h incubation at 37°C. Compared to wild-type β , both RQ182 and RQ183 exhibited much lower rates of incorporation, with the rate of latter mutant very much reduced.

After the initial 2 h DNA synthesis reaction, DNA molecules replicated by wild-type β was recovered at the position of Replicative Form II migration (RF II) on the agarose-gel electrophoresis pattern (Fig. 3), while the molecules copied by RQ182 or RQ183 mutant β were located between RF II and the primed ssDNA, representing a partial replication. Consistent with these results of nucleotide incorporation and gel migration patterns, the polynucleotides generated by elongation with mutant β in the initial 2 hours were much shorter than the full-length polynucleotides obtained with wild-type β (Fig. 4). The polynucleotides generated by RQ182 and RQ183 were, however, longer than 603 and 310 nucleotides, respectively, indicating that the target region for the error spectrum had been copied in the reactions.

These partially replicated molecules were purified by phenol extraction and subjected to further *in vitro* DNA synthesis by wild-type β . As can be seen in Fig. 3(b), this second reaction (2 h at 37°C) resulted in complete replication of these molecules.

Error Rate in the DNA Synthesis

Table 1 presents the results of transfection of the *in vitro*

replicated molecules into *E. coli* strains, S90C (MutS⁺) and BMH71-18 (MutS⁻). The transfection efficiency was expressed as plaque forming units (pfu) per ng of introduced

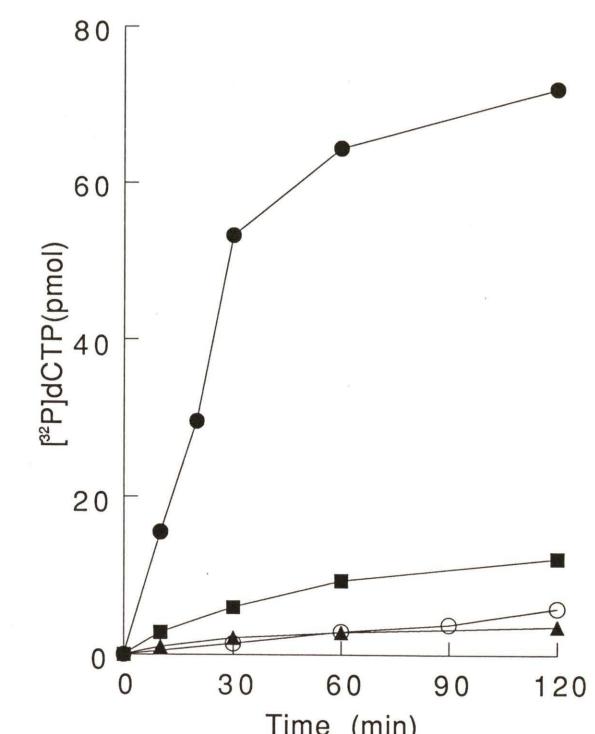


Fig. 2. Incorporation of dCMP during the *in vitro* DNA synthesis.

The *in vitro* DNA synthesis reaction was carried out at 37°C with wild-type β . (●), RQ182 (■) or RQ183 (▲), or at 10°C with wild-type β (○). The incorporation of dCMP nucleotides was determined at the indicated time-interval. The saturation level for the wild-type (37°C), 72 pmol, was calculated based on the assumption that all of the available template molecules were fully copied.

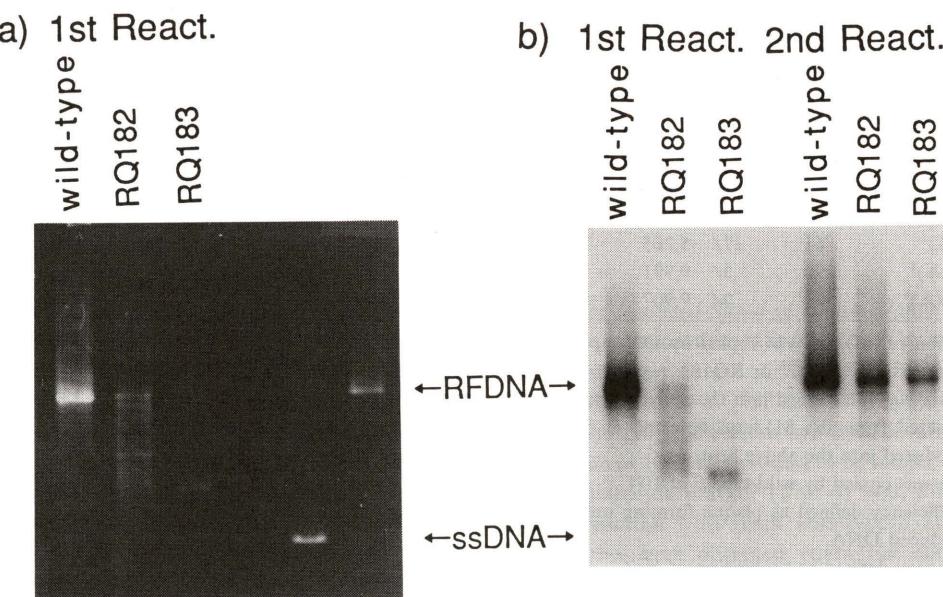


Fig. 3. Analysis of *in vitro* synthesized DNA molecules by agarose-gel electrophoresis.

The *in vitro* synthesized DNA molecules were run on a 0.8% agarose gel and analyzed by ethidium-bromide staining (a) and by autoradiography (b) (see text).

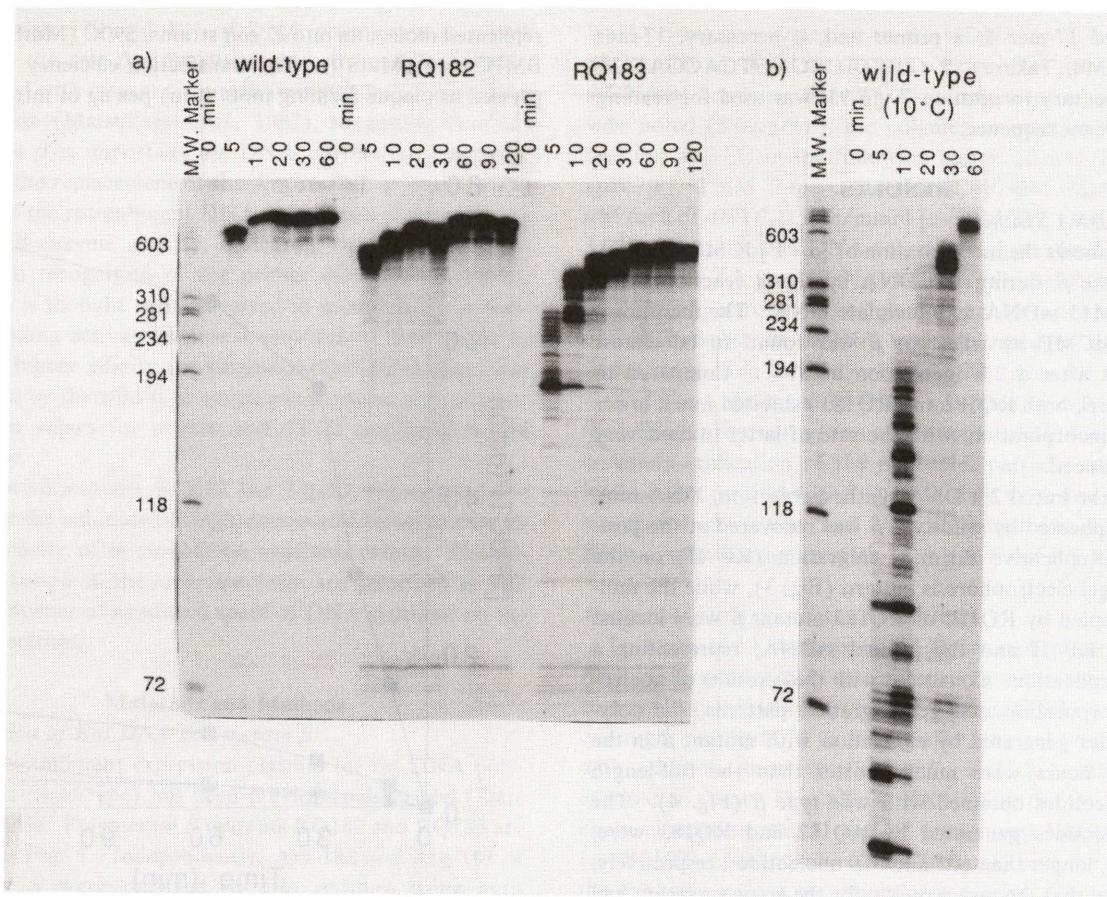


Fig. 4. Reaction products of primer extension.

An aliquot of the reaction mixture was taken out at the indicated time-interval and the reaction products were analyzed by the migration pattern on an 8% polyacrylamide sequencing gel (see text). Labelled X174 HaeIII fragments ($[\gamma-32\text{P}]$ ATP) were used as molecular size markers.

Table 1. Comparison of mutation frequency (MF) among copied molecules.

Host	Copied Molecule	TE ^c (pfu/ng)	Mutants/Transflectants	MF ^f ($\times 10^{-4}$)
MutS ⁺	W. T. β^a	950	208/122,061	17
	RQ182 ^a	680	41/ 29,365	14
	RQ183 ^a	610	46/ 30,642	15
	(ssDNA) ^b	1,200	8/ 24,185	3.3
	(RFDNA) ^c	8,200	0/165,580	<0.06
	(W. T. 10°C) ^d	340	100/ 60,320	17
MutS ⁻	W. T. β^a	108	81/ 9,901	82
	RQ182 ^a	88	48/ 5,009	96
	RQ183 ^a	61	37/ 5,265	70
	(ssDNA) ^b	290	5/ 9,991	5
	(RFDNA) ^c	340	0/ 9,907	<1

^a The target region of ssDNA was copied by DNA polymerase β , wild-type (W. T.), RQ182, or RQ183, respectively.

^b ssDNA substrate was introduced into the above host.

^c RFDNA, extracted from the M13mp2 infected *E. coli* NR 9099, was introduced into the above host.

^d DNA molecule was copied by wild-type β at 10°C.

^e Transfection efficiency defined as plaque forming unit (pfu) per ng of introduced DNA

^f Mutation frequency defined as proportion of *lacZ_a*⁻ mutants

DNA. Transfection efficiency was similar among the molecules copied *in vitro* initially by the three different polymerases. The mismatch repair status of the strain did not influence transfection efficiency: the MutS⁺ host exhibited approximately a 10-fold higher efficiency compared to the MutS⁻ host. The mutation frequency was defined as the proportion of colorless or light-blue plaques (*lacZ_a*⁻ mutants) among the total transflectants.

Interestingly, the mutation frequencies for molecules copied initially by mutant β polymerase were not significantly different from those copied by wild-type β which was found to be 17×10^{-4} and 82×10^{-4} for the MutS⁺ and MutS⁻ hosts, respectively (Table 1). This approximately 5-fold difference in the mutation frequency between MutS⁺ and MutS⁻ hosts suggests that most (~80%) of the errors produced during *in vitro* DNA synthesis are correctable by the MutS mismatch repair system of *E. coli*.

After introducing the template M13 single-stranded (ss) DNA into MutS⁺ and MutS⁻ bacteria, the mutation frequencies were found to be 3.3×10^{-4} and 5×10^{-4} , respectively. Similarly, the parental RF molecules extracted and purified from infected cells resulted in mutation frequencies of $<0.06 \times 10^{-4}$ and $<1.0 \times 10^{-4}$, for MutS⁺ and MutS⁻ host, respectively. As a consequence, the mutations recovered following *in vitro* DNA synthesis should reflect mostly the errors introduced at this *in vitro* step. Additional errors that occurred in the *E. coli* host during the replication of

Table 2. Distribution of mutational class.

(a) MutS ⁺ Host		Occurrence (MF ^c ($\times 10^{-4}$))		
Class	W. T. β	RQ182	RQ183	W. T. β (10°C)
Base-subst.	30(9.1)	22(7.5)	23(7.5)	21(7.6)
Transition	16(4.9)	15(5.1)	14(4.6)	15(5.4)
Transversion	14(4.3)	7(2.4)	9(2.9)	6(2.2)
Frameshift	10(3.0)	12(4.1)	16(5.2)	7(2.5)
Deletion ^a	12(3.6)	5(1.7)	4(1.3)	16(5.8)
Unknown ^b	4(1.2)	2(0.7)	3(1.0)	3(1.1)
Total ^a	56(17)	41(14)	46(15)	47(17)

(b) MutS ⁻ Host		Occurrence (MF ^c ($\times 10^{-4}$))		
Class	W. T. β	RQ182	RQ183	
Base-subst.	10(15)	10(20)	9(17)	
Transition	6(9.1)	5(10.0)	4(7.6)	
Transversion	4(6.1)	5(10.0)	5(9.5)	
Frameshift	29(44)	26(52)	18(34)	
Deletion ^a	10(15)	7(14)	6(11)	
Unknown ^b	5(8)	5(10)	4(8)	
Total	54(82)	48(96)	37(70)	

^a The type deleting the primer sequence is involved.

^b This type was phenotypically detected but not identified by DNA sequencing.

^c Mutation Frequency defined as proportion of *lacZ_a*⁻ mutants (see Table 1)

the *in vitro* synthesized molecule are not likely to be reflected in the observed mutations.

The *lacZ_a* region of mutant transfectants was analyzed by dideoxy sequencing methodology. Since the size of the wild-type β mutant collection was 2- to 4-fold larger than the mutant polymerase collections, a random selection of the mutants was made only for the sequence analysis of wild-type β generated errors. The identified mutations include base-substitution, frameshift, deletion, and unknown mutational classes (Table 2). In the MutS⁺ host, base-substitutions accounted for approximately half of the total mutations. Transitions were recovered more frequently than transversions in the mutant β collections, while transition and transversion were almost equally distributed in the wild-type β collection (37°C synthesis). Frameshift induction by mutant polymerase was estimated to be 40–70% higher than the level found for wild-type β . The occurrence of deletion events by the mutant β was approximately two-fold lower than the observed wild-type β level.

Comparison of mutational classes between wild-type and mutant β observed in the MutS⁻ host did not reveal any particular differences (Table 2). Frameshifts dominated the mutational classes and reached approximately 50% for all three polymerase collections. Comparison with the MutS⁺ collections suggests that frameshift occurrence can be reduced by the mismatch repair by a factor of 15-, 13-, and 7-fold for wild-type, RQ182 and RQ183 generated errors, respectively.

Mutation Spectrum in the Target Region

Figure 5 and Table 3 show the mutation-distribution profiles for wild-type and mutant β polymerases. As sum-

marized in Table 4, the characteristic differences between wild-type and mutant β were observed in the MutS⁺ collections. The C to T transition at position 75 was a base-substitution hotspot in all the three different β profiles and accounted for 15–18% of the total mutations in each profile. The G to T transversion at positions 82 and 149 was produced by wild-type β at relatively high rate, 3/56 and 4/56 occurrences, respectively. However, the G to T event at position 82 was recovered only once out of 46 mutations in the RQ183 collection and not at all in the RQ182 collection, and no events were observed at position 149 with either mutant β .

No occurrences of the C-base addition at C runs (positions 132–136 and 166–168) were observed in the wild-type β profile, while the RQ182 profile revealed 2 events at position 132–136 and 1 event at 166–168. Intriguingly, seven +C events were recovered at position 132–136 following *in vitro* DNA synthesis by RQ183. Such a characteristic difference was not detected in single-base deletion recovery in spite of the relatively high number of occurrences at runs of identical bases throughout the whole target *lacZ_a* region.

Wild-type and mutant β polymerases all produced very similar base-substitution and frameshift profiles in the MutS⁻ background (Fig. 5). For example, the single-base deletion –T at position 70 to 73 was identified as a hotspot event in all these three profiles and an approximately 20% of the total mutations was accounted for by this specific mutation. The -C frameshift at position 95 to 97 was recovered three times in each profile although the total number of events involved in each profile is slightly different.

One deletion event, the loss of 317 bp from position (–) 147 to (+) 170, predominated and was multiply recovered in all collections except in the case of RQ182 in MutS⁺ background in which it was only recovered once (Table 3). Other deletion events that were common to more than a single profile include deletions of 56 bp from (–)33 to (+)23, and of 78 bp from 106 to 183. For all these events direct repeats of 5–7 bases are found at deletion endpoints. This finding supports other studies that direct repeats are a characteristic of frequently occurring deletion-endpoints. For some mutants, deletion endpoints could not be determined by sequencing (classified as 'Others' in Table 3) and included 1/3 and 1/2 of the deletion events in the wild-type β profiles in the MutS⁺ and MutS⁻ background, respectively.

Effect of Reduced-Speed of Chain Elongation

The incorporation rate of dCMP by wild-type β during the synthesis reaction at 10°C was at a similar low level as that exhibited by RQ183 in a 37°C synthesis reaction (Fig. 2). The polynucleotides synthesized after a one-hour incubation at 10°C were found to be longer than the reference 310 nucleotide marker (Fig. 4) and, after a further two-hour reaction with fresh wild-type β at 37°C, full-length molecules were obtained (data not shown). From the primer extension experiments shown in Fig. 4, the speed of chain elongation by wild-type β in 10°C reaction was estimated to be less than that by RQ183 in a 37°C reaction. The start of elongation in the 10°C reaction also appears to

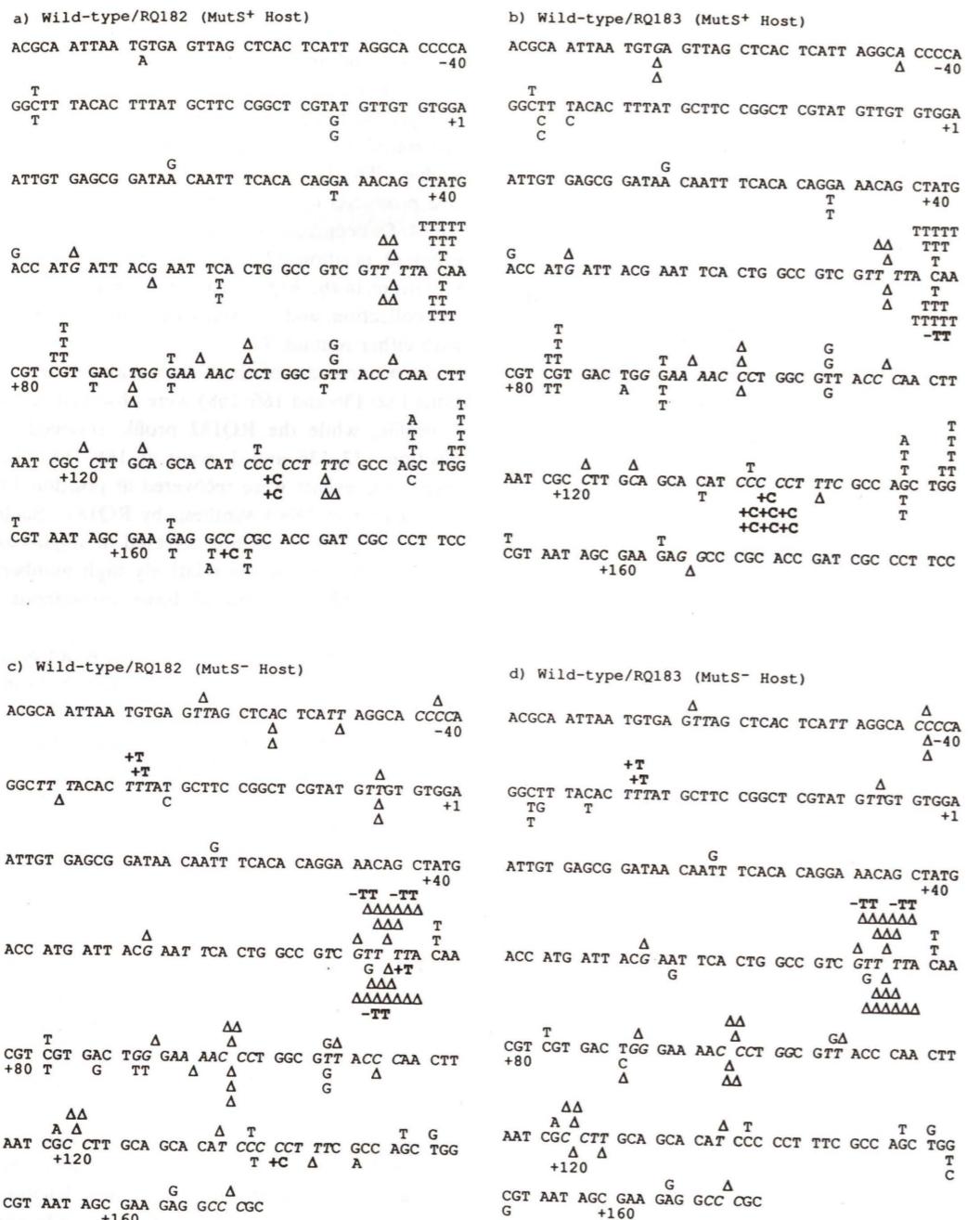


Fig. 5. The comparison of *lacZ_α*⁻ mutation distributions between Wild-type and mutant DNA polymerase β . The base sequences shown in this figure are those of promoter and α -region of *lacZ*. The base substitutions and frameshifts produced during *in vitro* DNA synthesis by wild-type or mutant β , are shown above and below the gene sequence, respectively. The comparison after transfection into the MutS⁺ host is between wild-type and RQ182 distributions (a) and between wild-type and RQ183 distributions (b). The corresponding comparisons after transfection into the MutS⁻ are shown in (c) and (d). Symbol Δ represents a single-base deletion.

be slower than that in the 37°C reaction with RQ183. This reduced speed and slower start of chain elongation are consistent with the above results concerning both the rate of nucleotide incorporation and the size of the synthesized molecules.

The full-length molecules were introduced into the MutS⁺ host to determine the error specificity of polymerase β during synthesis at 10°C. The observed frequency of lacZ _{α} mutation at 10°C, 17×10^{-4} was the same as that by wild-type β at 37°C (Table 1) and the distribution by mutational class was also similar to that seen at 37°C (Table

2). The mutation distribution are shown in Fig. 6 and Table 3. As can be seen in Table 4, two features, recovery of the C base addition at 132-136 (2/47) and low-frequency occurrences of G to T transversions at positions 82 and 149, were similar to that observed with mutant β . The induction of the deletion hotspot, from (-)147 to (+)170, was about two-fold higher than that observed with synthesis at 37°C and contrasted with the relatively low frequency for this event in the mutant β profiles.

Table 3. Deletions.

Size (bp)	Position	Occurrence						
		MutS ⁺			MutS ⁻			
		WT β (37°C)	182	183	WT β (10°C)	WT β (37°C)	182	183
338	(-302 \geq 36)		1					
317	(-147 \geq 170)	6	1	3	12	4	4	3
	[CCCGC]							
83	(-134 \geq -53)				1			
78	(-106 \geq 183)	1			1	1	1	
	[CCCAAC]							
67	(-122 \geq -56)		1					
56	(-33 \geq 23)		1	1				
	[TTTCACAA]							
49	(-23 \geq 26)					1		
38	(-14 \geq 24)	1						
27	(-5 \geq 22)						2	
Others		4	1	0	2	5	1	1
Total		12	5	4	16	10	7	6

[] represents direct-repeat sequence at deletion end.

WT β , 182, and 183 represents DNA polymerase β wild-type, RQ182, and RQ183, respectively. (10°C) and (37°C) means the temperature at the 1st reaction with DNA polymerase β wild-type.

Table 4. Characteristic differences in transfection of MutS⁺ host.

Mutation	Occurrences			
	W. T. β (37°C)	RQ182	RQ183	W. T. β (10°C)
Δ 317 bp (-147-170)	6	1	3	12
C \geq T (75)	10	11	10	7
+C (132-136)	0	2	7	2
+C (166-168)	0	1	0	0
G \geq T (82)	3	0	1	1
G \geq T (149)	4	0	0	1
Collection size	56	41	46	47

viewpoint of reconstituting an *in vitro* system to reflect the *in vivo* repair process, a small gapped molecule may seem to be a better substrate compared to the primed M13 ssDNA approach used in this study. However, one advantage of the large target over the small gap approach is that various types of errors can be identified as *lacZ_a*⁻ mutations and the resulting errors can be compared with similar data on polymerase fidelity, especially that reported by Kunkel and coworkers (Kunkel, 1985a, b).

Fig. 6. The influence of reduced speed of DNA synthesis on the observed *lacZ_a*⁻ mutation spectrum. The base-substitutions and frameshifts observed after transfection into the MutS⁺ host are shown above and below the gene sequence for *in vitro* DNA synthesis by wild-type β at 37°C and 10°C, respectively. The base sequences and symbols are same as Fig. 5.

Discussion

To get some insight into the specificity of DNA synthesis errors, the nature of the mutations generated when DNA polymerase β was used to elongate a primed M13 ssDNA in an *in vitro* reaction was studied. The observed errors may be thought to reflect the primary distribution of those produced during DNA synthesis due to the lack of an associated 3' to 5' exonuclease activity of polymerase β , the so called proof-reading function (Linn, 1991). From the

synthesis reaction by the three polymerases (wild-type, RQ182 and RQ183), since the observed *lacZ_α*⁻ mutation frequencies were on the order of $14\text{--}17 \times 10^{-4}$ and therefore much higher than the frequencies produced by the introduction of ssDNA and RF DNA into the same MutS⁺ host, which were 3.3×10^{-4} and $< 0.06 \times 10^{-4}$, respectively.

It is important to determine whether such observed specificity differences are unique to the RG182 and RG183 single amino-acid replacements. A lower rate of nucleotide-incorporation was observed with mutant β (Fig. 2), and therefore it was of interest to determine the chain elongation speed. As expected, the speed of chain elongation by mutant β was much slower than that by wild-type β (Fig. 4). To realize such a reduced speed of chain elongation for wild-type β , the polymerase reaction step was carried out at 10°C instead of at 37°C. By this method the speed for wild-type β at 10°C was now reduced to a level less than that of mutant β RQ183 (Fig. 4).

As summarized in Table 4, an enhancement of the +C addition event and a reduction of G to T transversion, similar to those observed with mutant β , were also seen in the profile of mutations recovered from the wild-type β 10°C reduced-speed DNA synthesis reaction. The 317 bp deletion ((−)147 to (+)170) was found in 10°C profile at about a two-fold higher frequency compared to that in the 37°C profile. This feature seems to be the only difference from the mutant β profiles (Table 4). These results suggest that the common error characteristics concerning the +C frameshift and the G to T transversion are not unique to the single amino-acid replaced polymerases but are instead an effect of the reduced speed of chain elongation, which is a common characteristic of the RQ182 and RQ183 polymerases and the wild-type polymerase at 10°C. One model to account for this +C event at C runs would be for the strand undergoing elongation to slip back by a single base with respect to the template and then to continue the incorporation of nucleotides. The reduced speed of chain elongation in the RQ182 and RQ183 polymerases and the wild-type polymerase at 10°C might be related to the enhancement of such strand misalignments.

The C to T hotspot transition at position 75 was observed in the MutS⁺ background with all the different β polymerases studied here. The frequency of occurrence for this transition event was ~5-fold or less reduced in the corresponding MutS⁻ background, representing little change in error rate since the overall mutation frequencies in the MutS⁻ background were about 5-fold increased over those observed in the MutS⁺ background. This type of error might not be subject to MutS mismatch repair. One explanation for this hotspot may be if the targeted C-base is frequently methylated (5-meC) in the prepared substrate-molecules, but we have not yet directly addressed this possibility. The observed hotspot in the MutS⁻ background was a −T frameshift at position 70–73. Including this hotspot, our error distribution spectrum observed in the mismatch-repair deficient condition is not essentially different from Kunkel's results using DNA polymerase β in a gapped molecule substrate of M13mp2 (Kunkel, 1985a). In contrast to the C to T hotspot at 75, the frequency of occurrence for this frameshift event was reduced in MutS⁺ spectrum, an indication that this type of error is subject to

MutS mismatch repair.

The G to T transversion at position 149 was frequently observed in Kunkel's experiments that studied not only rat DNA polymerase β associated synthesis-errors (Kunkel, 1985a) but also the fidelity of DNA polymerase α , γ , and ϵ (Kunkel, 1985b, Thomas *et al.*, 1991). In our MutS⁺ spectra, this transversion event was also frequently recovered by wild-type β synthesis (4/56), but was not observed after mutant β synthesis and was observed only once after wild-type β synthesis at 10°C. In our MutS⁻ spectra, this transversion event was found only once, after wild-type β synthesis at 10°C and after RQ183 synthesis, and was not found after wild-type β synthesis at 37°C nor after RQ182 synthesis. Interestingly, after transfection of *E. coli* with a depurinated M13mp2 ssDNA molecule, this G-base at position 149 was not a hotspot for such transversion events (Kunkel, 1985a). Therefore, this G to T event appears not to be induced through depurination of G-base but instead possibly by a misincorporation of an A-base opposite the G-base at position 149, producing the G : A mismatch that may not be subject to efficient correction by MutS mismatch repair.

It is important to point out random priming may occur during *in vitro* DNA synthesis by DNA polymerase β . Even if we exclude the primer from the DNA synthesis reaction with wild-type β at 37°C, nucleotide incorporation still reached to about 60–100% of the level observed in the complete reaction that included the primed molecule. For mutant β and wild-type β at 10°C, the relative incorporation in the no-primer reaction were about 20–30% of the normal incorporation level in the complete reaction. The actual influence of random priming on chain elongation from the desired primer can not be exactly estimated from these measurements. However, the relatively lower incorporation of nucleotide by random priming with mutant β suggests that the differences in the MutS⁺ background between wild-type and mutant β are not largely influenced by such random priming.

The sequence Gly-Asp-Met-Asp, spanning positions 189–192 of rat DNA polymerase β , is similar to the sequence motif Gly-Asp-Thr-Asp that is highly conserved in a number of replicative DNA polymerases from eukaryotic cells, viruses, and phages. Both Asp190 and Asp192 have been suggested to be located in the active site of polymerase β and to be involved in the interaction of the polymerase with primer (Date *et al.* 1991). However, when mutant β polymerases were generated with single amino-acid replacements at these two Asp positions, DE190 (Asp→Glu) and DE192 (Asp→Glu), it was found that neither altered polymerase could provide enough polymerizing activity for this kind of *in vitro* DNA synthesis assay (data not shown). Since RQ182 (Arg→Gln) and RQ183 (Arg→Gln) replacements are thought to interfere with positions related to template binding and primer recognition, respectively, it requires further study to show that the error specificity of DNA polymerase β can be directly influenced by alteration of any of the above functions.

Acknowledgements

We thank Dr. Thomas A. Kunkel of National Institute of Environmental Health and Sciences for sending us M13mp

2 phage. M.M.M. is a researcher under the scientific communication agreement between Egypt and Japan. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Science and Culture, and in part by the research grant from Japanese Ministry of Science and Technology.

References

- Abbotts, J., D. N. SenGupta, B. Zumdzuka, S. Widen, V. Nataro and S. H. Wilson, (1988) *Biochemistry*, **27**, 901–909.
- Au, K. G., S. Clark, J. H. Miller and P. Modrich (1989) *Escherichia coli mutY* gene encodes an adenine glycosylase active on G–A mispairs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 8877–8881.
- Date, T., M. Yamaguchi, F. Hirose, Y. Nishimoto, K. Tanihara and A. Matsukage (1988) Expression of active rat DNA polymerase β in *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **27**, 2983–2990.
- Date, T., S. Yamamoto, K. Tanihara, Y. Nishimoto, N. Liu and A. Matsukage (1990) Site-directed mutagenesis of recombinant rat DNA polymerase β : Involvement of arginine-183 in primer recognition, *Biochemistry*, **29**, 5027–5034.
- Date, T., S. Yamamoto, K. Tanihara, Y. Nishimoto and A. Matsukage (1991) Aspartic acid residues at positions 190 and 192 of rat DNA polymerase β are involved in primer binding, *Biochemistry*, **30**, 5286–5292.
- Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. S. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner (1993) The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer, *Cell*, **75**, 1027–1038.
- Griffin, S., P. Branch, Y.-Z. Xu and P. Karran (1994) DNA mismatch binding and incision at modified bases by extracts of mammalian cells: Implications for tolerance to DNA methylation damage, *Biochemistry*, **33**, 4787–4793.
- Kunkel, T. A. (1984) Mutational specificity of depurination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1494–1498.
- Kunkel, T. A. (1985a) The mutational specificity of DNA polymerase β during *in vitro* DNA synthesis, *J. Biol. Chem.*, **260**, 5787–5796.
- Kunkel, T. A. (1985b) The mutational specificity of DNA polymerase- α and - γ during *in vitro* DNA synthesis, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12866–12874.
- Leach, F. S., N. C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. Liu, J. Jen, R. Parsons, P. Peltomaki, P. Sistonen, L. A. Aaltonen, M. Nystrom-Lahti, X.-Y. Guan, J. Zhang, P. S. Meltzer, J.-W. Yu, F.-T. Kao, D. J. Chen, K. M. Cerosaletti, R. E. K. Fournier, S. Schaaper, R. M. and R. I. Dunn (1987) Spectra of spontaneous mutations in *Escherichia coli* strains defective in mismatch correction: The nature of *in vivo* replication errors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 6220–6224.
- Sobol, R. W., J. K. Horton, R. Kuhn, H. Gu, R. K. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky and S. H. Wilson (1996) Requirement of DNA polymerase- β in base-excision repair, *Nature*, **379**, 183–186.
- Thomas, D. C., J. d. Roberts, R. d. Sabatino, T. w. Myers, C.-K. Tan, K. M. Downey, A. G. So, R. A. Bambara and T. A. Kunkel (1991) Fidelity of Mammalian DNA Replication and Replicative DNA polymerases, *Biochemistry*, **30**, 11751–11759.
- Wiebauer, K. and J. Jiricny (1990) Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase β mediate the correction of G-T mispairs in nuclear extracts from human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5842–5845.
- Todd, T. Lewis, R. J. Leach, S. L. Naylo Weissenbach, J.-P. Mecklin, H. Jarvinen, G. M. Petersen, S. R. Hamilton, J. Green, J. Jass, P. Watson, H. L. Lynch, J. M. Trent, A. de la Chapelle, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993) Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *Cell*, **75**, 1215–1225.
- Linn, S. (1991) How many pols does it take to replicate nuclear DNA, *Cell*, **66**, 185–187.
- Matsukage, A., K. Nishikawa, T. Ooi, Y. Seto and M. Yamaguchi (1987) Homology between mammalian DNA polymerase β and terminal deoxynucleotidyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8960–8962.
- Matsumoto, Y. and K. Kim (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase β during DNA repair, *Science*, **269**, 699–702.
- Messing, J., B. Gronenborn and P. H. Horschneider (1977) Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a HindII fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3642–3646.
- Michaels, M. L., L. Pham, C. Cruz and J. H. Miller (1991) MutM, a protein that prevents G-C→T·A transversions, is formamido-pyrimidine-DNA glycosylase, *Nucleic. Acids Res.*, **19**, 3629–3632.
- Parsons, R., G.-M. Li, M. J. Longley, W. Fang, N. Papadopoulos, J. Jen, A. de la Chapelle, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and P. Modrich (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER⁺ tumor cells, *Cell*, **75**, 1227–1236.

One million + one carcinogens

Paul H. M. Lohman

Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis Medical
Genetic Centre South-West The Netherlands, Leiden University
Wassenaarseweg 72, 2333 AL Leiden, The Netherlands

(受理: 1997年4月10日)

On the basis of test results in the past decennia it would appear that genotoxicity is almost an universal property of environmental agents. Since exposure of human populations to genotoxic agents usually occurs only at relatively low levels (except in case of accidents), it is crucial to learn about the causes underlying the differential sensitivity of cells and tissues to genotoxic agents and to identify those action principles that lead to adverse biological effects such as tumor formation and induced genetic diseases.

Essential approaches to understand the mechanism of action of genotoxic agents are (i) studies on the induction and repair of DNA damage, (ii) studies on the relationship between chemical structure and biological activity and between biological endpoints and target dose in cells and organs of interest, (iii) the development of biological monitoring of exposed human populations, and (iv) the development of conceptual frame works and models for genetic and carcinogenic risk assessment for both radiation and chemical mutagens of concern.

In recent years we have demonstrated that DNA repair is heterogeneous in cells of different organs and organisms and a function of the chromosome structure and nuclear organization. Furthermore, it has been shown that the process of transcription of active genes is closely associated with nucleotide excision repair and evidence is obtained that differences in the organization of DNA repair may have a profound influence on mutation induction and transformation of cells from various species, organs and tissues. Evidence of the involvement of DNA repair in the etiology of cancer is obtained via the isolation of defected human repair genes from patients with genetic disorders such as xeroderma pigmentosum, ataxia telangiectasia and cockayne's syndrome. Detailed information about the relation between repair functions and tumor formation is expected to be obtained from the recent generation of "knockout" transgenic mice lacking the rodent homologues of known human repair genes.

The large number of genotoxic substances with potential

effects for human health and the environment necessitates the development of concepts which would enable hazard evaluation and risk assessment not only for individual substances but, even more important, for classes of structurally-related chemicals (Structure-Activity Relationships—SAR). For example, for alkylating carcinogens we found that a high carcinogenic potency (low TD₅₀ in rodents) is correlated either with the capability of agents to alkylate oxygens in the pyrimidine bases or with the formation of crosslinks in DNA.

Once the interaction of agents with DNA or its mutagenic potential is recognized, the technology to measure biological endpoints in man allows its application for biomonitoring purposes. We have tested various endpoints such as chromosomal aberrations, SCE's, micronuclei and the induction of *hprt* mutations in blood cells in humans exposed to chemicals and ionizing radiation. In decreasing order the sensitivity of these biomarkers for practical use turned out to be: chromosomal aberrations > SCE's > micronuclei > *hprt* mutations. Cytogenetic techniques have been very successfully applied in victims accidentally exposed to ionizing radiation. In these studies we have been able to estimate absorbed radiation dose in different situations such as, for instance, partial body exposure and acute vs chronic exposures.

Finally, the concept that, in principle, all electrophilic agents can react with DNA in cells assigns those agents to potential carcinogens and make current strategies for hazard and risk assessment an extremely difficult task. It is estimated that humans in average daily life are challenged with at least a million different electrophiles, be it in vast different exposure levels. So far regulatory measures are primarily based on ad hoc risk assessment of individual genotoxic agents without taken into account the prevalence of carcinogens in our environment. An attempt will be made to suggest new models that will allow the prioritizing and ranking of potentially genotoxic agents for practical purposes.

学術賞授賞講演

環境中の変異原の検出とその抑制因子に関する研究

Detection of environmental mutagens and suppression of their activities

早津彦哉

Hikoya Hayatsu

岡山大学薬学部 700 岡山市津島中1-1-1

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

(受理: 1997年3月21日)

Summary

On the basis of an observation that hemin can make complexes with mutagens having polycyclic planar structures, we invented in 1983 an adsorbent selective for such polycyclics: copper phthalocyanine trisulfonate linked covalently to cellulose. This material, blue cotton, and its improved version, blue rayon, have since been used extensively for isolating heterocyclic amines and other polycyclic mutagens from mixtures such as food and urine. The most recent version of this adsorbent is blue chitin in columnar form. In relation to this finding, we have shown that chlorophyllin and chlorophyll are effective antimutagens that can trap these polycyclic mutagens through the complex-forming ability of their porphyrin-like structures.

Keywords: blue cotton, blue rayon, blue chitin, Trp-P-2, chlorophyllin, chlorophyll

1. ヘミン、クロロフィルによる変異原性抑制

変異原物質の多くは発がん物質であることがわかつた1970年代後半に、私は生理的小分子のうちで変異原抑制性のものを見つけようと計画した。これは将来発がん抑制因子となりうることを期待したアプローチであった。そして血色素ヘミンがTrp-P-1のAmes testでの活性を強く阻害することを見いだした。さらに種々のヘテロサイクリックアミンやベンゾ(a)ピレン等の多環芳香族に対してヘミンが有効なこと、MNNGなどの非環状の物質には無効であることを見いだし、推定メカニズムとしてポルフィリン環と多環性変異原分子との複合体形成を考えた。緑色素クロロフィリンについてもヘミンと同時にその変異原性作用を報告した。これは現在世界的に活発に研究されているクロロフィリンの抗変異原性、抗がん性の研究へつながっている。われわれはクロロフィルをほうれん草から抽出して調製し、その抗変異原活性について、ショウジョウバエを用いて明らかにすることにも成功した。さらに、クロロフィリンをセファロースに共有結合させたものを作成し、それを用いて

多環性変異原との複合体形成を定性的ならびに定量的に証明した。最近ではキトサンにクロロフィリンを付けて不溶性複合体を作り利用している。

2. ブルーコットン、ブルーレーヨン、ブルーキチン

私は日頃教壇でチョークの粉に接しているので、チョークの変異原性を調べようと思い立った。そこでチョーク粉のメタノール抽出液についてAmes testしたところ、陽性であった。次に各色のチョークについて調べた。その結果、青チョークに変異原性があり青色素中の不純物にその原因があることがわかつた。この研究にあたって、青色素、銅フタロシアニンの化学構造がヘミンと類似している上、さらに大きな平面構造を持つことに気付き、銅フタロシアニンを共有結合で結びつけた「ブルーコットン」を作成したところ、それは期待した通り多環性変異原物質を強く、かつ選択的に吸着する性質を持つことがわかつた。さらに、いったん吸着した変異原物質を回収するのはメタノール-アンモニア水(50:1)で溶出し、溶出液を蒸発乾固すればよいことを見出

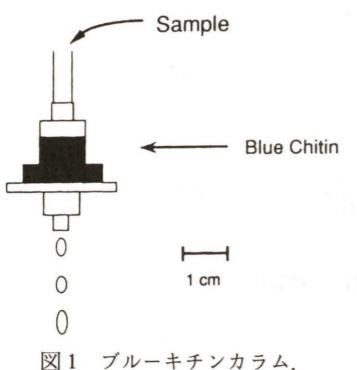


図1 ブルーキチンカラム。

表1 作製した各種担体中の銅フタロシアニントリスルホン酸含量。

担体	形状	銅フタロシアニントリスルホン酸含量 ($\mu\text{mol/g}$)
キチント	粉末	44
キチント	フレーク	24
レーヨン	せんい	24
セルロース	粉末	12

し、かくしてブルーコットンの使用法を確立した。この手法によって変異原物質が、焼いた牛挽肉や、河川水から容易に濃縮分離することができる事を示し、焼いた牛肉中の IQ, MeIQx の定量を発表することができた。さらに、かつおぶし中に MeIQx を検出、定量した。食品以外についてもブルーコットンの利用が可能で、人間の尿の変異原性が喫煙やハンバーグ食で上昇することや、人間の糞便の変異原性もハンバーグ食で上昇することを明らかにした。また、河川水や海水の変異原性も、ブルーコットンを袋に詰めて懸垂するという簡単な方法

表2 ブルーキチンカラム法による化合物の吸着と回収。

化合物名	濃度 ($\times 10^{-5} \text{ M}$)	環の数	吸着率 (%)	総回収率 (%)	ブルーレーションへの吸着率 (%)
変異原物質					
Aflatoxin B ₁	0.1	5	85	85	82
Glu-P-2	2.5	3	95	93	45
IQ	1.5	3	98	86	79
MeIQx	2.5	3	100	85	83
8-Methoxysoralen	0.1	3	94	84	60
N-Nitrosomorpholine	10	1	0	—	—
4-Nitroquinoline-1-oxide	8	2	7	7	6
PhIP	5	3	100	100	69
Trp-P-2	1	3	100	100	93
非変異原物質					
2-Deoxyribonucleoside (dAdo/dGuo/dThd/dCyd)	5	2/1	0	—	—
L-Histidine	10	1	0	—	0
Norharman	2	3	100	100	88
p-Nitrophenol	2	1	0	—	2
Riboflavin	7	3	98	—	67

で、半定量的に測定できることを示した。大気中の浮遊粉塵の変異原性測定にもブルーコットンが有用であることも報告した。次に青色素の担体を工夫し、ブルーコットンの性能をさらに上昇させたブルーレーションを作ることができた。さらに最近、キチン粉末からブルーキチンを作成し、これを小さなカラムとして用いると、定量的、かつ迅速に河川水などの変異原物質を濃縮できることがわかった(図1)。表1にブルーレーション、ブルーキチンなどの色素含量を示した。キチンにはブルーレーションの約2倍の吸着能力がある。表2に種々の化合物の吸着実験を示してある。銅フタロシアニンにこのような吸着能があることは、ひるがえってポルフィリン全般に多環性変異原との親和性があることを示唆している。

3. その他の変異原抑制因子

食物や糞便のような脂肪含有粗材料の変異原性を調べるとき、その活性がマスクされてしまう場合があることに気付き、その原因物質を追求した結果、意外にもオレイン酸やリノール酸のような不飽和脂肪酸であることを見出した。これらの物質は、変異原をミセルでくるんでしまい、その活性を抑えることもわかった。また、緑茶成分のタンニン類が各種変異原を抑制することを1984年に見出したが、これは今日の緑茶ポリフェノールの抗変異、抗がんの研究のいとぐち的な成果であった。

4. おわりに

これらすべての研究には、岡山大学の研究協力者の人達が多数かかわっている。私の受賞も、これら協力者のおかげであると思い深く感謝する。

研究奨励賞授賞講演 (1)

ショウジョウバエを用いた変異原性修飾因子の研究

Modulators of environmental mutagen action in *Drosophila melanogaster*

根岸友恵

Tomoe Negishi

岡山大学 薬学部 700 岡山市津島中1-1-1

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

(受理: 1997年3月27日)

Summary

Epidemiological studies have shown that the ingestion of vegetables is a preventative against the incidence of cancer in humans. Plant cells contain green and yellow pigments, the former being chlorophylls and the latter carotenoids and xanthophylls. The level of chlorophylls in green vegetables is high: spinach contains as much as 1% chlorophylls on a dry-weight basis. Chlorophyllin is a man-made green pigment produced by the hydrolysis of chlorophyll. Many polyphenolic compounds are also present in plants. (-)Epigallocatechin gallate is the main polyphenolic compound found in green tea. We have investigated the suppressive effect of these foodstuffs on the mutagenic activity of various compounds. Two *Drosophila* systems have been used to examine the effects. As *Drosophila* larvae ingest selected compounds, they offer a suitable model system to study the effects of foodstuffs. In this paper, the results obtained in our studies of the past 10 years are summarized. Chlorophylls and chlorophyllin inhibit the genotoxicities of many heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons. Also, chlorophyllin suppressed the MeIQx-DNA adduct formation in the larvae. (-)Epigallocatechin gallate (EGCG) suppressed the genotoxic activities of *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosomorpholine, 4NQO and Trp-P-1 in *Drosophila*. On the other hand, EGCG enhanced the mutagenicities of DMBA and aflatoxin B₁. In this paper, mechanisms of these inhibitions are discussed.

Keywords: *Drosophila*, somatic mutation, mutagen, chlorophyll, EGCG

緒言

環境物質による変異原性の修飾は、生体に誘発される突然変異の頻度を左右する重要な問題である。特に抑制作用は発がんや遺伝病といった突然変異の蓄積により発症するといわれている疾患を防御する意味からも、その作用機構の研究は、抑制因子の検索と合わせて、意義深いと考える。

我々の研究室では1979年にAmes試験を用いて、焼け焦げ変異原Trp-P-2の変異原性のSH化合物による増強効果を(Negishi and Hayatsu, 1979), 1980年にポルフィリン関連色素による抑制を発表(Arimoto *et al.*, 1980)して以来、食品成分・生体成分を中心に関異原性の修飾因子の検索とその作用機構について研究を進めてきた(Hayatsu *et al.*, 1988, 1993)。

1983年スイスのWürglerらによりショウジョウバエを用いた体細胞突然変異の検出法(Graf *et al.*, 1984)が発表され、細菌よりヒトに近く、簡便に取り扱える多細胞真核生物による変異原性検出系としてこれを導入し、突然変異修飾因子の研究及び突然変異誘発機構の研究に用いることとした。さらにNguyenら(1979)の開発したショウジョウバエのrec-assayと言われる *in vivo* DNA repair testが、現在近畿大学原子力研究所の藤川によって改良され(Fujikawa, 1988), 簡単に体細胞DNA傷害が検出できるようになった。これによりgenotoxicityの検出スペクトルが広がり、変異原研究におけるショウジョウバエの有用性が増した。とくにショウジョウバエ幼虫は環境物質を経口的に摂取することから、食品中の変異原物質および、変異原性修飾物質の研

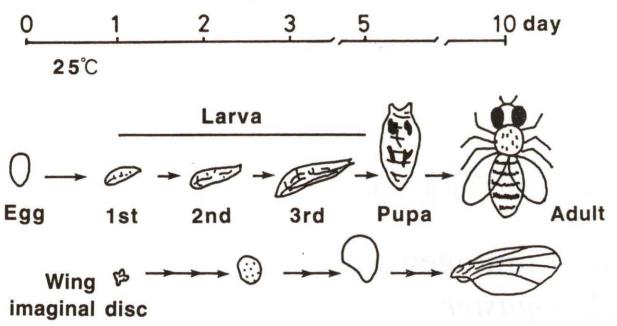


Fig. 1. Growth of *Drosophila melanogaster*.

究に適した実験系と言える。

本稿ではこの2種の実験系を用いて行った変異原性修飾因子の研究についてまとめた。

1. ショウジョウバエ体細胞突然変異検出系（翅毛スポットテスト）

Fig. 1にショウジョウバエの生活史を簡単に示した。ショウジョウバエは卵、幼虫、蛹、成虫と約10日間で完全変態する昆虫である。細胞分裂は幼虫期の4日間、成虫原基 (imarginal disc) でしか行われない。したがって突然変異を検出できるのはこの時期に幼虫を変異原物質で処理したときに限られる。翅毛スポットテスト (wing spot test) の概略を Fig. 2に示した。雄 (*flr³* / *TM3, Ser*) と処女雌 (*mwh jv spa^{pol}*) を交配させて得た、3齢幼虫を被験体として用い、成虫になったときの羽翅毛に現れる形態の変化を指標として調べる方法である。この系では遺伝子突然変異のみでなく、組換え、端部消失、不分離など、真核生物特有な染色体レベルでの変化も翅毛の形態変化という突然変異として検出することができる。

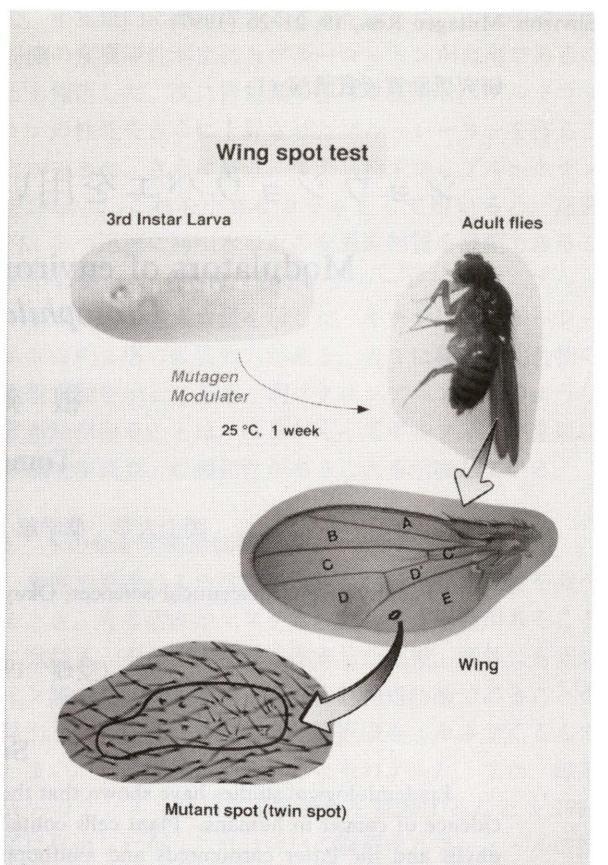


Fig. 2. The wing spot test.

2. ショウジョウバエDNA傷害修復試験

この試験系に用いる株 (*sc z¹ w^(+TE) mei-9^a mei-41^{D5} / C(1)DX, y f*) は、Fig. 3に示したように、常に雄は除去修復欠損 (*mei-9*)、複製後修復欠損 (*mei-41*: 最近, cell cycle arrest deficient) であることが示された (Hari et al., 1995) となるように工夫されている。したがって、雄がその体細胞DNAに何らかの損傷を受けた場合、修復

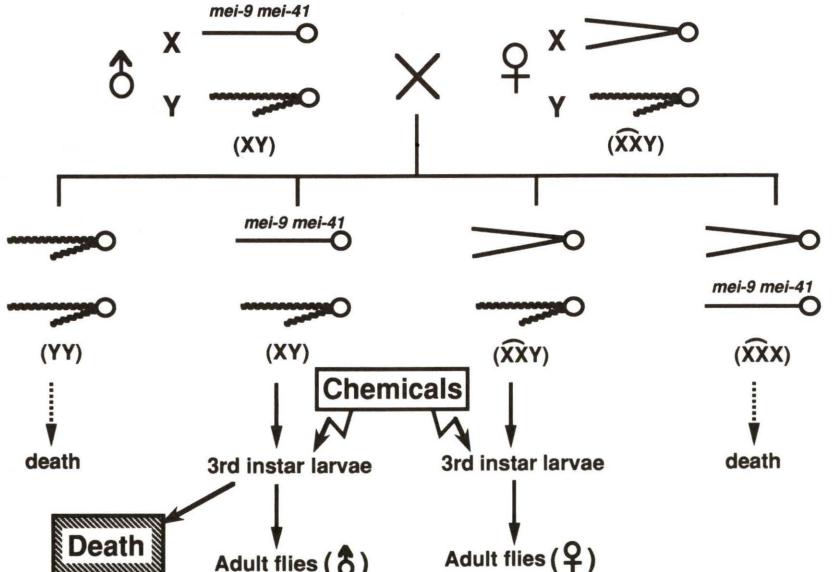


Fig. 3. The *in vivo* DNA repair test.

ができない生存率が減少する。それに反して雌は正常に損傷を修復できるので生存数に変化は見られない。そこで成虫になったときの雌雄の性比を求めるこよって、DNA損傷の程度を測ることができる。以後、本稿ではこの雄の致死性で見た genotoxicity をDNA傷害性と表わす。この実験系に使用する個体は体色と眼色によって容易に雌雄を識別することができるよう工夫されている。翅毛スポットテストによる変異原性の計数に比べて、迅速・簡便に結果が得られること、翅毛スポットテストにおいて変異原性の弱いヘテロサイクリックアミン類の活性も強く検出されること、などから各種変異原物質に対する抑制効果を検索するのに有用である。

3. クロロフィル、クロロフィリンによる抑制効果

1) クロロフィル、クロロフィリンの各種変異原物質の活性に対する作用

ポルフィリン関連化合物のうち、緑黄色野菜の中に含まれるクロロフィルは、水に不溶性の色素である。これをショウジョウバエの培地に混合することにより、変異原物質の活性に対する影響を調べた。Fig. 4に示したようにヘテロサイクリックアミンのTrp-P-2の体細胞突然変異誘発を強く阻害した (Negishi et al., 1989a, 1990)。この活性は、加水分解により水溶性にしたクロロフィリ

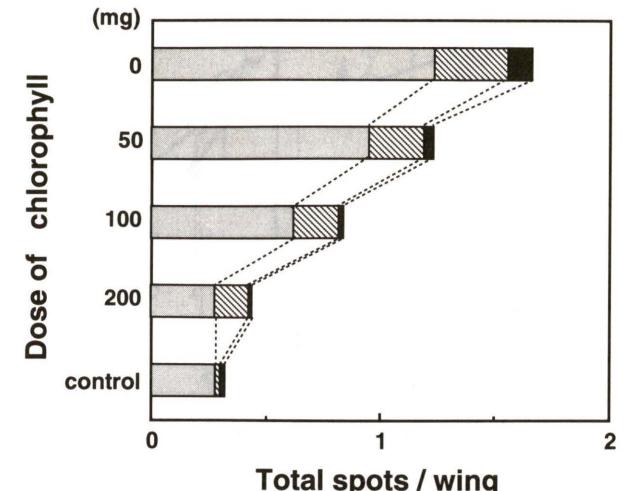


Fig. 4. Inhibition of Trp-P-2 mutagenicity by chlorophyll. The doses of reagents were, 2.5 mg Trp-P-2 (10 μ mol), and 0, 50, 100, 200 mg chlorophylls per bottle, respectively.

Drosophila larvae were kept on the medium containing Trp-P-2 and chlorophylls, until adult flies came out. Mutant colonies (spots) observed on their wings were classified to the small single spots (▨), the large single spots (▨) and the twin spots (▨).

ンにおいても同様に見られた。さらに、変異原性の検出されにくい物質については *in vivo* DNA repair test を用

Table 1. Effect of Cu-chlorophyllin on the DNA-damaging activities of various carcinogens.

Mutagen	Amount of mutagen (μ mol/bottle)	Sex ratios (male/female)	
		- chlorophyllin	+ chlorophyllin
Solvent (Tween/ethanol)		1.12 \pm 0.24	1.02 \pm 0.27
Water		1.27 \pm 0.16	1.21 \pm 0.29
Trp-P-1	5	0.07 \pm 0.05	0.62 \pm 0.15
MeIQx	0.3	0.04 \pm 0.03	0.64 \pm 0.30
Glu-P-1	5	0.01	0.14
2-Aminofluorene	0.5	0.12 \pm 0.09	0.88 \pm 0.22
2-Aminoanthracene	0.1	0.04 \pm 0.05	1.05 \pm 0.04
9-Aminoacridine	5	0.35 \pm 0.11	1.10 \pm 0.06
1-Aminopyrene	20	0.06	0.41
Dimethylbenz[a]anthracene	5	0.08 \pm 0.03	0.67 \pm 0.25
Benzo[a]pyrene	5	0.17 \pm 0.07	0.82 \pm 0.13
4-Nitroquinoline N-oxide	3	0.04 \pm 0.02	0.59 \pm 0.07
Trp-P-2	10	0.14 \pm 0.13	0.45
Glu-P-2	2	0.18 \pm 0.12	0.51 \pm 0.29
Aflatoxin B ₁	0.008	0.04 \pm 0.01	0.11 \pm 0.08
2-Nitrofluorene	5	0.32 \pm 0.23	0.46
AαC	10	0.45	0.26
MeAαC	5	0.43	0.24
IQ	0.3	0.03 \pm 0.04	0.06 \pm 0.05
<i>N</i> -nitrosodimethylamine	0.8	0.06 \pm 0.04	0.18 \pm 0.09
<i>N</i> -nitrosodiethylamine	5	0.05 \pm 0.04	0.14 \pm 0.06
<i>N</i> -nitrosomorpholine	3	0.09 \pm 0.04	0.30 \pm 0.16
<i>N</i> -nitrosopiperidine	3	0.03 \pm 0.004	0.11 \pm 0.01

The S.D. values were obtained from results from three- to five experiments. A value without S.D. represents a mean value of two experiments. Cu-chlorophyllin was added at 200 mg per bottle for every experiment.

Abbreviations: Trp-P-1: 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, Trp-P-2: 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, Glu-P-1: 2-amino-6-methylpyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole, Glu-P-2: 2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole, AαC: 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole, MeAαC: 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole, IQ: 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, MeIQx: 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline.

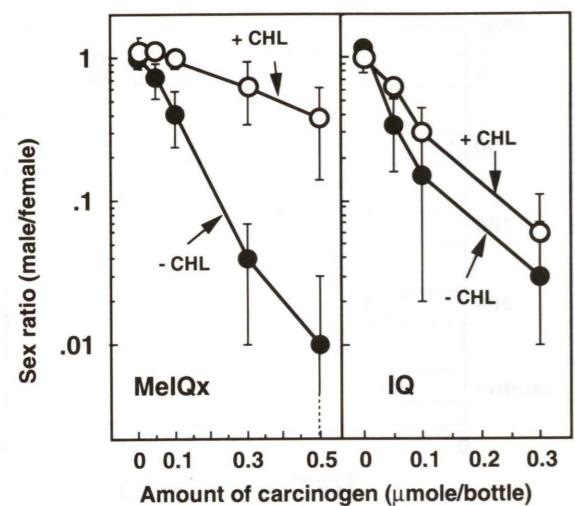


Fig. 5. Effects of Cu-chlorophyllin on the genotoxicities of MeIQx and IQ. The chlorophyllin dose was 200 mg in the medium.

The mean values and S.D. were calculated from 3 to 5 independent experiments.

いて種々の変異原物質に対する効果を観察したところ Table 1 のような結果を得た (根岸 *et al.*, 1989b; T. Negishi *et al.*, 1994)。ここでクロロフィリンの抑制効果の強かったものをゴシック体で、効果の見られたものを太字で表わしてある。これらの結果の多くは、クロロフィリン類と変異原物質との複合体形成による活性阻害で説明できるものであった。我々の研究室においてはすでに *in vitro* の実験でポルフィリン化合物と 3 環以上の平面構造を有する化合物との間で複合体を形成することを明らかにしている (Arimoto *et al.*, 1993)。興味深い結果として、Fig. 5 に見られるように非常に構造の類似した MeIQx と IQ で全く違う結果を示したことである。また、クロロフィリンに対して吸着活性のほとんど見られない、4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) に対してクロロフィル及びクロロフィリンは強い抑制効果を示し、複合体形成だけでは説明できない阻害作用の存在も示唆している (Negishi *et al.*, 1997a, b)。

Table 2. Inhibition of Trp-P-2 mutagenicity by chlorophyllin-Sepharose^a.

Reagent	Number of wings	Spots/wing		
		Small single	Large single	Twin
Trp-P-2 + Chlorophyllin-Sepharose	114	0.54**	0.05**	0.03
Trp-P-2 + AH-Sepharose	103	1.20	0.16	0.05
Trp-P-2 + Chlorophyllin	170	0.45	0.17	0.02
Trp-P-2	162	1.20	0.30	0.07
Chlorophyllin-Sepharose	96	0.29	0.03	0.01
AH-Sepharose	109	0.33	0.01	0.01

^a The Sepharose-containing medium was prepared as follows. 2 g of chlorophyllin-Sepharose (equivalent to 14 mmol of chlorophyllin) or aminoethyl (AH)-Sepharose was mixed with 1.5 g Drosophila instant powder medium by use of an agate mortar. This mixture was made into a slurry by addition of a 2 ml Trp-P-2 (5 mM) solution, and the resulting mixture was placed in a single vial as the feed.

** $P < 0.01$: significant difference from the mutation frequency induced by 'Trp-P-2 + AH-Sepharose'.

2) クロロフィリン・セファロースの効果

クロロフィルは生体内で吸収されず、消化管を素通りして排泄されると言われているので、ショウジョウバエの体内でもクロロフィルは消化管内で作用していると予想される。そこで水溶性のクロロフィリンをセファロースと共有結合させ、消化管内での吸収を抑えたクロロフィリン・セファロースを作成し、ショウジョウバエの飼料に混合してその変異原性阻害活性を調べた。その結果は Trp-P-2 の変異原性に対してクロロフィリン単独の場合と同様の阻害活性を示した (Table 2, Negishi *et al.*, 1994)。したがってクロロフィル類はバエの消化管内でも変異原物質を捕捉し、それらの変異原活性の発現を抑えているものと考えられる。

3) DNA 付加体形成に対する作用

細胞内でヘテロサイクリックアミンなどの変異原物質が変異原性を発現するための第一歩と考えられる DNA 付加体形成に対するクロロフィリンの効果を調べた。ショウジョウバエ幼虫をクロロフィリン存在あるいは非存在下に MeIQx で処理し、一部は成虫まで飼育し DNA 傷害性を観察し、残りの幼虫から DNA を抽出して 32 P-ポストラベル法により、付加体の生成量を測定した。その結果 Fig. 6, A のように、付加体量の減少とともに、DNA 傷害量の回復が見られた (Sugiyama *et al.*, 1995)。一方 Fig. 6, B のように IQ の付加体形成に対してはクロロフィリンの添加効果が顕著に見られず、この結果はさきの変異原性あるいは DNA 傷害性に対する結果と一致するものであった。したがってクロロフィリン類は MeIQx が DNA に対して傷害を示す前の段階で作用していることが明らかになった。またその段階で阻害の見られない IQ に対しては抑制効果を示さないと考えられる。

4. エピガロカテキンガレート (EGCG) による変異原性修飾作用

緑茶にはポリフェノールがたくさん含まれている。そのなかでも多いのがエピガロテテキンガレート

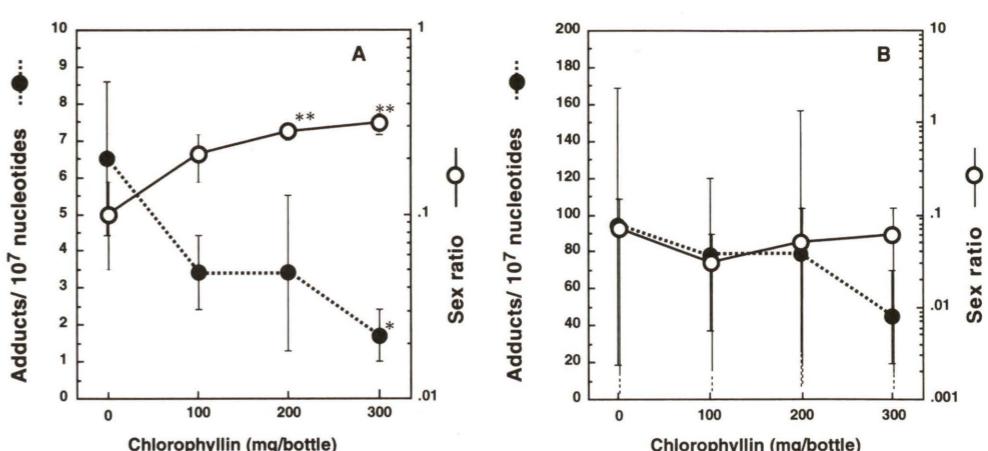


Fig. 6. Effects of chlorophyllin on the genotoxicity and adduct formation by MeIQx (A) or IQ (B).

Drosophila larvae were treated for 6 hours with 1 mg MeIQx or IQ, in the presence or absence of chlorophyllin. The mean values and SD were calculated from 3 independent experiments. The significance of differences was evaluated with Student's *t* test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Table 3. Inhibitory effect of Chlorophyllin and EGCG on the genotoxicity of various carcinogens.

Carcinogen	Chlorophyllin		EGCG	
	Mutagenicity	DNA damage	Mutagenicity	DNA damage
Trp-P-1	+	+	+	+
Trp-P-2	+	+	+	+
MeIQx		+		+
IQ	-	-		-
Glu-P-1	+	+		
Glu-P-2	+	+		
B(a)P	+	+	-	-
DMBA	+	+	-	-
Aflatoxin B ₁	+	+		+
2-Aminofluorene	+	+		
2-Aminoanthracene	+	+		
9-Aminoacridine	+	+		
1-Aminopyrene	+	+		
4-NQO	+	+	+	+
NDMA	±	±	+	+
NDEA	±	±		
NMOR	-	+	+	
NPIP	±	+		
MMS	+	±	-	+

+, inhibition; ±, inconclusive results; -, no effect or enhancement.

(EGCG) である。これは抗腫瘍性、抗変異原性、抗ウイルス活性などを有することが明らかにされている物質である。ショウジョウバエ細胞突然変異においてその抑制作用が見られるか検討した (Negishi *et al.*, 1992; Hayatsu *et al.*, 1992) ところ、変異原物質によってその効果に違いがみられた。ここで注目されるのはクロロフィル類によって抑制効果の見られなかった直鎖状ニトロソアミン類にたいしても抑制効果が見られたことである。一方、多環性平面構造物質である芳香族炭化水素類の中でも、dimethylbenz[a]anthracene はむしろその変異原性を増強されるという結果を得た。また IQ に対してはほとんど効果を示さなかったが、4NQO に対してはクロロフィル類と同様に強い抑制効果を示した。

最近、MeIQx の DNA 付加体形成に対する効果を調

べ、クロロフィリン同様に付加体形成を抑えていることを明らかにしている (unpublished data)。

結語

食品成分であるクロロフィル類、およびエピガロカテキンガレートの変異原物質に対する修飾効果についてショウジョウバエを用いて検索した。その結果を合わせたものを Table 3 に示す。変異原物質と修飾物質の組み合わせにより、その効果は異なっていることが明らかである。クロロフィル類についてはその阻害効果が変異原物質との複合体形成によって一部は説明されるが、作用機構が不明の物質も多い。多細胞生物の生体内では変異原物質も修飾物質も複雑な代謝経路を取ると考えられる。すなわち、消化管からの吸収、細胞内取り込み、代

謝、高分子との反応、解毒反応、排泄など両者の相互作用すべき場面も多くある。したがって作用機構を明らかにすることは非常に困難なことである。しかしながら、簡便な多細胞生物系によって、毒性の見られない突然変異抑制因子を検索することは、がんの化学予防の研究の基礎となるデータを提供する重要な意義を持っていると考える。さらに先に述べたように、突然変異誘発の各段階（ここではまずDNA付加体形成を見ること）において修飾因子の作用を調べていくことにより作用機構が少しずつ解明されていくと期待される。

厚生省から提案されている「がんを防ぐための12カ条」において“バランスのとれた食事”をとることが指摘されている。Table 3の結果からも、ある一種の食品成分に万能な効果を期待することは不可能であろう。各種の変異原性抑制因子が共同作用することによって全体として突然変異の頻度を下げることができると考える。反対に相乗効果により突然変異頻度の上昇を誘発する可能性もある。したがって今後、変異原物質同志の相互作用を調べると同時に、修飾因子が複数混在している場合の効果についても検討していくことが重要である。

謝 辞

本研究は多くの先生方の御指導、学生諸氏の努力と協力によって成り立ったものです。ショウジョウバエの研究のきっかけを与えて下さいました、近藤宗平先生、早津彦哉先生、ならびに一からショウジョウバエを教えていただいた、藤川和男、梁治子博士をはじめとしてショウジョウバエ変異原研究会の方々に本稿の末尾をかりて御礼を申し上げます。また、ショウジョウバエの研究を始めて13年間、研究を支えてくれた卒業生、在学生諸氏に感謝の意を表します。

参考文献

- Arimoto, S., Y. Ohara, T. Namba, T. Negishi and H. Hayatsu (1980) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 662-668.
- Arimoto, S., S. Fukuoka, C. Itome, H. Nakano, H. Rai and H. Hayatsu (1993) Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in the inhibition of the mutagenic activity, *Mutation Res.*, **287**, 293-305.
- Fujikawa, K. (1988) A novel methodology of chemical mutagenicity assays in *Drosophila melanogaster*, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **29**, 115-124.
- Graf, U., F. E. Würgler, A. J. Katz, H. J. Frei, H. Juon, C. B. Hall and P. G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, **6**, 153-188.
- Hayatsu, H., S. Arimoto and T. Negishi (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Res.*, **202**, 429-446.
- Hayatsu, H., T. Negishi and S. Arimoto (1993) Dietary inhibitors against mutagenesis and carcinogenesis, In: "Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III", G. Bronzetti, H. Hayatsu, S. De Flora, M. D. Waters and D. M. Shankel (Eds.), Plenum, New York, pp. 387-418.
- Hayatsu, H., N. Inada, T. Kakutani, S. Arimoto, T. Negishi, K. Mori, T. Okuda and I. Sakata (1992) Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)epigallocatechin gallate, *Preventive Med.*, **21**, 370-376.
- Hari, K. L., A. Santerre, J. J. Sekelsky, K. S. McKim, J. B. Boyd and R. S. Hawley (1995) The *mei-41* gene of *D. melanogaster* is a structural and functional homolog of the human ataxia telangiectasia gene, *Cell*, **82**, 815-821.
- Negishi, T. and H. Hayatsu (1979) The enhancing effect of cysteine and its derivatives on the mutagenic activities of the tryptophan-pyrolysis products, Trp-P-1 and Trp-P-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 97-102.
- Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki and H. Hayatsu (1989a) Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2), *Carcinogenesis*, **10**, 145-149.
- 根岸友恵、糸目千穂、早津彦哉（1989b）ヘテロサイクリックアミンのDNA傷害作用に対するクロロフィリンの効果—ショウジョウバエ修復能欠損株を用いて—、環境変異原研究, **11**, 53-58.
- Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki and H. Hayatsu (1990) Inhibition of the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) in *Drosophila* by chlorophyll, In "Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II", Y. Kuroda, D. M. Shankel and M. D. Waters (Eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 343-346.
- Negishi, T., I. Sakata and H. Hayatsu (1992) Inhibitory effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on genotoxicities of various carcinogens in *Drosophila*, *Mutation Res.*, **272**, 275-276.
- Negishi, T., H. Nakano, A. Kitamura, C. Itome, T. Shiotani and H. Hayatsu (1994) Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*, *Cancer Lett.*, **83**, 157-164.
- Negishi, T., H. Rai and H. Hayatsu (1997a) Antigenotoxic activity of natural chlorophylls, *Mutation Res.*, in press.
- Negishi, T., H. Nakano, S. Arimoto, H. Rai and H. Hayatsu (1997b) Inhibitory activity of natural chlorophylls on the mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole in *Drosophila*, in "Proceedings of the International Conference on food Factors: Chemistry and Cancer Prevention", in press.
- Nguyen, T. D., J. B. Boyd and M. M. Green (1979) Sensitivity of *Drosophila* mutants to chemical carcinogens, *Mutation Res.*, **63**, 67-77.
- Sugiyama, C., A. Shinoda, H. Hayatsu and T. Negishi (1996) Inhibition of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-mediated DNA-adduct formation by chlorophyllin in *Drosophila*, *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 325-328.

研究奨励賞授賞講演(2)

染色体異常試験における培養環境の研究 (非生理的pH環境における染色体異常の誘発)

Studies on effects of culture environment in chromosomal aberration test
(Induction of aberrations under non-physiological pH conditions)

森 田 健

Takeshi Morita

日本グラクソ株式会社 筑波研究所 300-42 茨城県つくば市和台43

Tsukuba Research Laboratories, Nippon Glaxo Ltd., 43 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-42, Japan

(受理 1997年2月25日)

Summary

Cytogenetic examination of somatic cells has been widely used to investigate the induction of chromosomal damage *in vitro*. This technique is internationally recognized as a valid system for detecting clastogens or possible carcinogens. However, the use of high concentrations of agents may lead to non-physiological treatment conditions in this assay procedure. The effects of the pH of the medium were investigated using several extreme culture conditions. The following findings were obtained: (1) non-physiological pH produced chromosomal aberrations in several types of cultured cells (CHO, CHL, lymphocytes, etc.); (2) neutralisation of the medium or enhancement of the buffering capacity reduced the clastogenic activity induced by non-physiological pH; (3) the clastogenic activity of compounds depended on its stability in the medium; (4) low pH led also to sister-chromatid exchanges; (5) clastogenicity of low pH was S-dependent; and (6) a severe delay in the cell cycle was observed in the S phase. These results indicate that a non-physiological pH might give false-positive responses, the pH of the medium must be carefully monitored when selecting the maximum concentration of test material, and the induction of chromosomal aberrations by low pH might result from interference with S phase activities, such as DNA synthesis or repair. In genotoxicity tests using cultured mammalian cells, especially the chromosomal aberration test, it is important to maintain the physiological condition of the culture (e.g., pH, osmolarity, etc.).

Keywords: chromosomal aberration, non-physiological condition, pH, false-positive, mechanisms

緒 言

In vitro 遺伝毒性試験は新規化学物質の遺伝毒性的特徴を評価する方法として重要な位置を占めている。その理由には実験操作が簡便であること、再現性の高いデータが得られること、作用機構の解明に適していることなどが挙げられる。しかしながら、特に哺乳動物培養細胞を用いる *in vitro* 試験では癌原性物質を陽性とする感受性は高いが、非癌原性物質を陰性とする特異性は低い、すなわち偽陽性の多い点が問題となっている (Ashby

and Tennant, 1991; 森田・矢嶋, 1993; Zeiger *et al.*, 1990)。この原因の1つに、*in vivo* では起こり得ない培養環境下で *in vitro* の培養細胞を用いる試験が実施されたことが考えられる。非生理的な培養環境に起因する陽性反応は、化学物質が本来もつ性質に基づくものではないために、遺伝毒性の正しい評価の妨げとなっている。化学物質の安全性評価は常にヒトを対象としたものでなければならず、そのため *in vitro* 試験系においても培養環境を制御し、生体内の環境に類似させることが必要であ

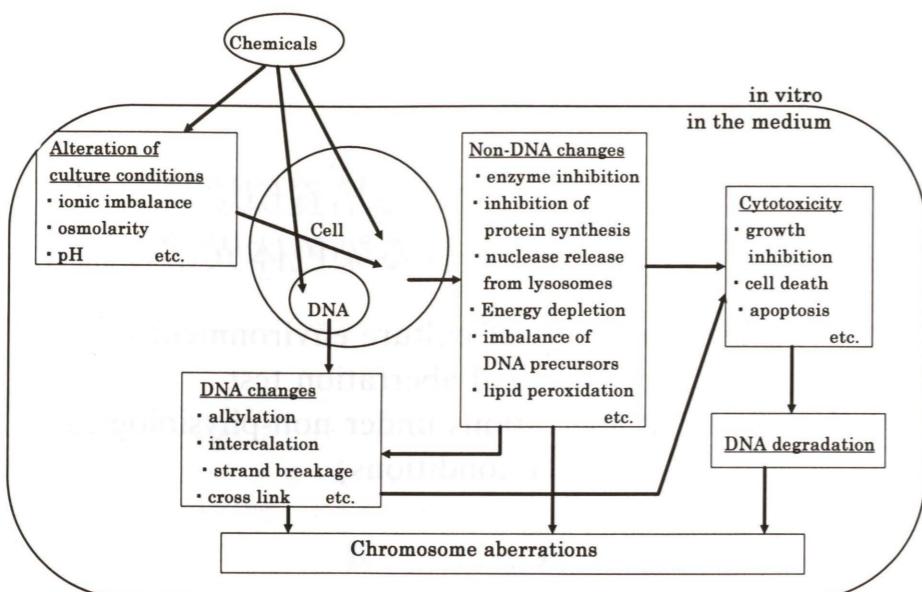


Fig. 1. Putative mechanisms of the induction of chromosomal aberrations by chemicals.

る。In vitro 染色体異常試験もその例外ではない。化学物質は種々の作用メカニズムにより培養細胞に染色体異常を誘発させる (Fig. 1)。化学物質が直接 DNA に作用して DNA 変化が生じた結果染色体異常が誘発される。これには、DNA 塩基のアルキル化、インターラーチン、クロスリンク、鎖切断などがある。また、DNA 以外の部分に作用して間接的に DNA 変化が生じた結果染色体異常が誘発することが知られている (Scott *et al.*, 1991)。作用箇所として、DNA 合成あるいは修復酵素、核タンパク、リソゾーム、エネルギー代謝、DNA 前駆体や膜などが挙げられる。DNA 変化あるいは非 DNA 変化は細胞毒性を誘発し、DNA 分解に至ることが推察される。この過程においても染色体異常を誘発する可能性がある。これら化学物質のもつ直接あるいは間接的な染色体異常誘発性に加え、近年、化学物質の添加により細胞の培養環境が変化した結果、染色体異常が誘発する可能性が明らかとなってきた。例えば培養液の浸透圧の変化について検討がなされ、非生理的な低浸透圧 (Kalweit *et al.*, 1990; Nowak, 1989) や高浸透圧 (Ishidate *et al.*, 1984; Galloway *et al.*, 1987; Nowak, 1990) は、染色体異常を誘発することが報告された。化学物質を高濃度に添加して生じる高浸透圧に起因する陽性結果 (偽陽性) を防ぐため、現在では 10 mM 以上の濃度での実験結果は評価しないこととなっている (Galloway *et al.*, 1994)。また、イオンバランスの変化 (Ashby and Ishidate, 1986) や著しい細胞毒性状況 (Kirkland, 1992; Seeburg *et al.*, 1988) も染色体異常を誘発し得る。本稿では培養環境要因として培養液の pH に着目し、非生理的な培養液 pH の染色体異常誘発作用およびその作用機作について述べる。

1. 非生理的な培養液 pH による染色体異常の誘発

以下に記すように、非生理的 pH 環境は染色体異常を

誘発することを明らかとし、非生理的 pH に起因する陽性反応、すなわち偽陽性を生ずる危険性があることを指摘した (Morita *et al.*, 1989)。

1) 低 pH 環境の影響

低 pH 培養液の影響を検討するために、チャイニーズハムスター培養細胞 (CHO-K1 細胞) を用いて無機強酸の塩酸および硫酸の染色体異常試験を実施した (Fig. 2)。S9 非存在下では塩酸は 14 mM による pH 5.5 で、硫酸は 8 mM による pH 4.5 で、S9 存在下では塩酸は 8 mM による pH 6.0 で、硫酸は 4 mM による pH 6.2 で染色体異常の誘発が認められた。これらの結果から、塩酸および硫酸は in vitro において培養細胞に染色体異常を誘発し、しかも S9 存在下でより強く異常が発現することが明らかとなった。この染色体異常の誘発は、低 pH のため培養液成分や血清の変化によって生成した活性物質に起因する可能性があるため、培養液に変え血清を含

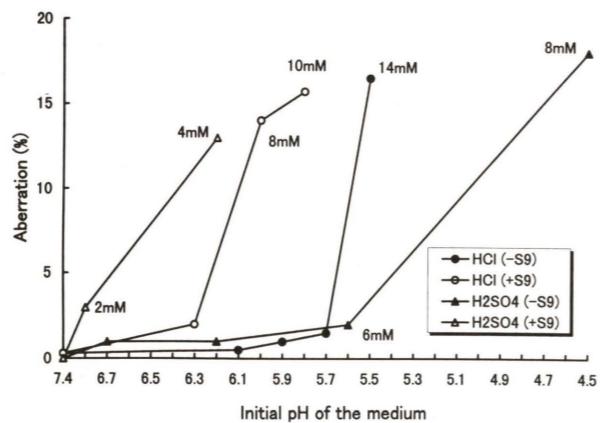


Fig. 2. Induction of chromosomal aberrations by HCl or H_2SO_4 in CHO-K1 cells.

Cells were treated with HCl or H_2SO_4 for 24 h in the absence of S9 mix, and for 6 h in the presence of S9 mix.

まない酸性 PBS (phosphate buffered saline) を用いた 3 時間処理により染色体異常誘発性を検討した (Table 1)。

pH 5.2 あるいは pH 4.8 の PBS への曝露で染色体異常が認められ、低 pH 環境で観察された染色体異常は低 pH 自身に起因していることが示唆された。また、通常の細胞培養で用いる炭酸ガス-炭酸水素ナトリウム緩衝系では、塩酸や硫酸を添加した培養液の pH は時間とともに

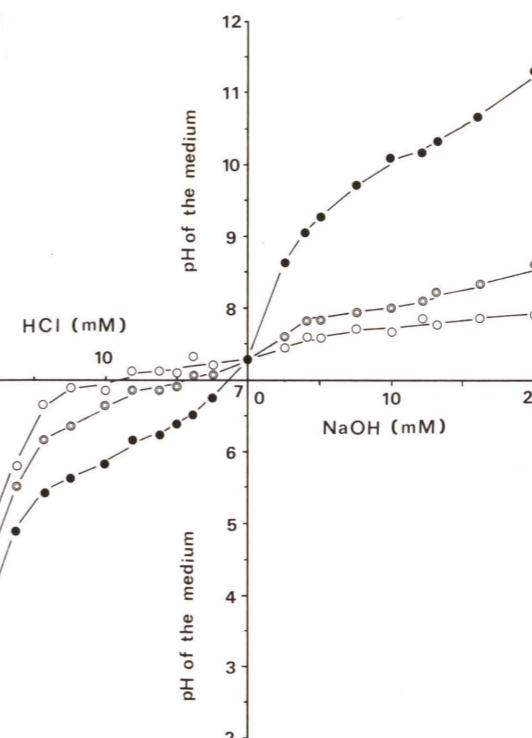


Fig. 3. pH changes of F12 medium during incubation in 5% CO_2 atmosphere.

The pH was measured 0 h (closed circle), 1 h (double open circle) and 24 h (open circle) after the addition of HCl or NaOH in the absence of S9 mix.

Table 1. Induction of chromosomal aberrations in CHO-K1 cells treated with acidic PBS or F12 medium.

Treatment medium (pH adjuster)	pH of the medium		Aberrant cells (%)
	initial	after 3/24 h	
PBS (HCl)	6.0	6.0 *	1.0
	5.6	5.7 *	1.5
	5.2	5.4 *	13.0
	4.8	5.2 *	23.0
F12 containing 15 mM Bis-Tris (HCl)	7.0	6.7	0
	6.6	6.5	1.0
	6.4	6.3	6.0
	6.2	6.1	22.5
F12 containing 15 mM MES (NaOH)	6.0	5.9	22.5
	6.6	6.5	1.0
	6.4	6.3	2.5
	6.2	6.1	16.0

*: after 3 h

中性域に近づくため (Fig. 3)、異常を誘発する pH を特定することが困難であった。そこで、培養液 pH を安定に保つために有機緩衝剤の Bis-Tris および MES を用いた。前者は塩酸で、後者は水酸化ナトリウムで pH を調整する。培養液 pH は 24 時間後においてもほぼ安定に保たれ、いずれの緩衝剤を用いた場合でも pH 6.4 でわずかながら異常の誘発傾向が見られ、pH 6.2 以下では明らかに染色体異常を誘発した (Table 1)。これらの結果から CHO-K1 細胞を pH 6.4 以下の培養液に 24 時間暴露することは、染色体異常を誘発することが明らかとなった。

2) 高 pH 環境の影響

高 pH 培養液の影響を検討するため、水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウムの染色体異常試験を実施した (Fig. 4)。S9 非存在下では、水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウムとも 16 mM による約 pH 11 まで異常の誘発は認められなかった。一方、S9 存在下では、水酸化ナ

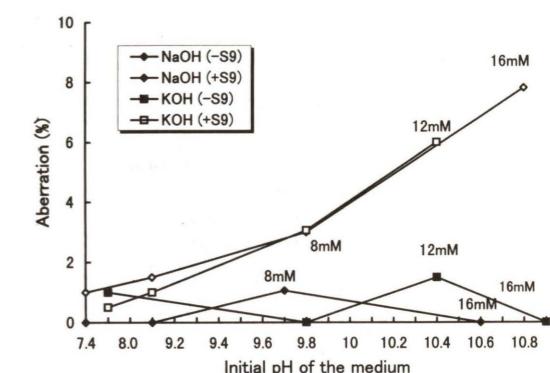


Fig. 4. Induction of chromosomal aberrations by NaOH or KOH in CHO-K1 cells.

Cells were treated with NaOH or KOH for 24 h in the absence of S9 mix, and for 6 h in the presence of S9 mix.

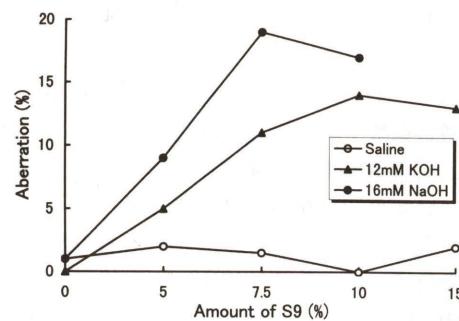


Fig. 5. Clastogenicity of the combination of high pH medium and S9 fraction after incubation of CHO-K1 cells for 6 h.

トリウムは16 mMによるpH 10.8で、水酸化カリウムは12 mMによるpH 10.4において染色体異常が認められた。高pHの場合はS9存在下においてのみ異常が見られたため、S9存在下において12 mMの水酸化カリウムおよび16 mMの水酸化ナトリウムを処理した場合のS9量と異常頻度の関連を検討した(Fig. 5)。いずれのアルカリを用いた場合もS9濃度が増すにつれ異常頻度が上昇し、高pHで処理したS9は染色体異常誘発活性を有する可能性が明らかとなった。

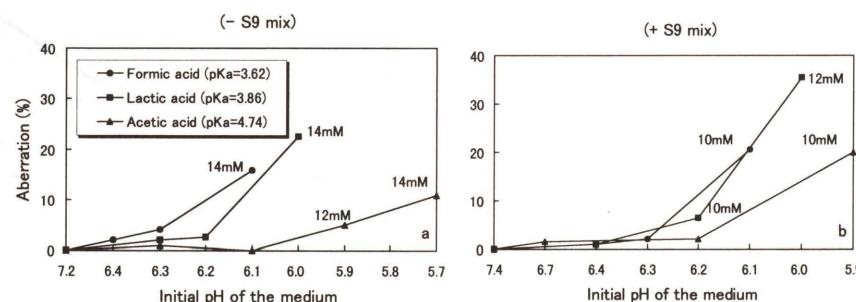


Fig. 6. Chromosomal aberrations in CHO-K1 cells induced by organic acids.
Cells were exposed for 24 h in the absence of S9 mix (a), and for 6 h in the presence of S9 mix (b).

Table 2. Effects of neutralization and enhancement of the buffering ability of the medium on chromosomal aberrations in CHO-K1 cells induced by organic acids in the presence of S9 mix.

Organic acids	Neutralization of the medium			Enhancement of the buffering ability (x2 NaHCO ₃)			
	initial pH	pH after 24 h	Aberrant cells (%)	Concentration (mM)	initial pH	pH after 24 h	Aberrant cells (%)
Formic acid	6.0	6.8	11.0	20	6.1	7.3	0.5
	6.4	7.2	4.0	25	5.8	7.1	0.5
	7.2	7.3	0	27.5	5.7	6.7	10.5
Lactic acid	5.8	6.8	13.0	25	6.0	7.4	0
	6.4	7.3	0	30	5.8	7.2	0.3
	7.2	7.4	0	32.5	5.7	6.7	8.5
Acetic acid	6.0	6.9	31.0	20	6.1	7.4	0.5
	6.4	7.4	0	25	5.9	7.2	1.0
	7.2	7.4	2.0	30	5.6	6.8	9.0

In neutralization study, media were first acidified (pH 5.8 or 6.0) with each organic acid and then neutralized to pH 6.4 or 7.2 with 1M NaOH in the absence of S9 mix.

In enhancement study, cells were treated for 24 h in F12 medium containing 34 mM NaHCO₃ in the absence of S9 mix.

2. 有機酸による染色体異常の誘発とその対策

一般に、染色体異常試験に供する医薬品候補化合物は有機化合物である。無機強酸は10 mM以下の処理濃度で染色体異常を誘発したが、有機酸も同様であろうか。そこで動物体内で認められ変異原性をもたないとされる有機酸の蟻酸、酢酸、乳酸の染色体異常誘発性を検討した(Morita *et al.*, 1990)。いずれの有機酸においてもS9非存在下では14 mM以上で、S9存在下では10 mM以上の濃度で染色体異常の誘発が認められた(Fig. 6)。S9非存在下において異常を誘発した培養液の初期pHは蟻酸で6.1、乳酸で6.0、酢酸で5.9とpKa値が小さいほど異常誘発の初期pHはより中性に近い値を示した。また、いずれの有機酸も無機酸(塩酸および硫酸)の場合と同様、S9存在下でより強く異常が発現した。これらの結果は、酸性有機化合物は10 mM以下の濃度においても染色体異常を誘発する可能性があることを示唆している。このような非生理的低pHに起因する染色体異常を回避あるいはその異常誘発性を正しく評価する方法を検討した(Table 2)。各有機酸で培養液pHを5.8あるいは6.0に調整し、これを水酸化ナトリウムでpH 6.4およびpH 7.2に中和したところ、pH 6.4へのわずかな中和で異

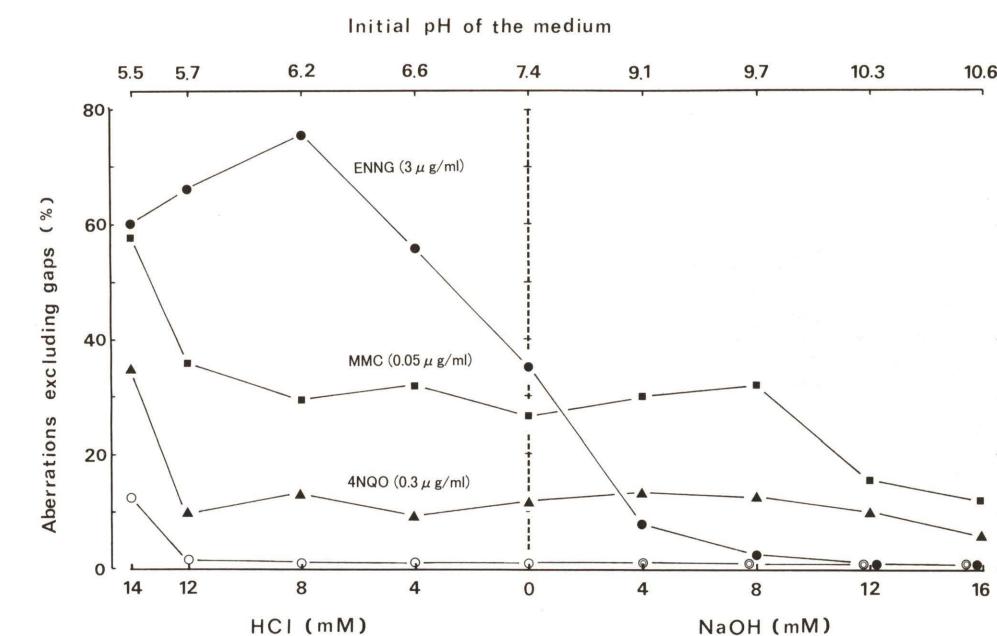


Fig. 7. Effects of pH of the medium on the clastogenicity of various clastogens in CHO-K1 cells in the absence of S9 mix. HCl and NaOH were used as pH-adjusting agents.

常の発現が押さえられた。しかし、中和は化学物質の安定性や溶解性に影響を与え、その結果、本来持つ性質をマスクしてしまう可能性がある。そこで、緩衝系の増強について検討した。通常濃度(17 mM)の2倍の炭酸水素ナトリウムを含む培養液をpH 7.4に調整して用いたところ、有機酸添加による培養液pHの低下が押さえられ、各有機酸は25 mMまで異常の誘発を認めなかった。この濃度は、通常の処理で異常を誘発した濃度の約2倍である。緩衝能を超える30 mM前後の濃度では、異常の誘発は避けられなかった。この結果は、誘発された染色体異常が濃度依存的なものではなく、pH依存的であることを示唆している。緩衝系の増強は、非生理的pHに起因する陽性反応を回避あるいは考察する有効な手段といえる。

3. 染色体異常誘発物質の異常誘発率と安定性に及ぼす培養液pHの影響

直接作用型染色体異常誘発物質のN-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(ENNG), mitomycin C(MMC), 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO)の示す染色体異常誘発率が、培養液のpH変化によってどのような影響を受けるか検討した(Morita *et al.*, 1991)。培養液pHは、塩酸あるいは水酸化ナトリウムを添加して調整した。Fig. 7に示すようにENNGによる異常頻度は高pHでは極端な低下を示し、逆に低pHでは上昇した。また、MMCおよび4NQOによる異常頻度は、pH 10.6でわずかながら低下し、pH 5.5では塩酸による低pH自身による異常頻度を上乗せされたものとなった。そこで種々のpHの培養液における各物質の安定性をHPLCを用いて測定した。ここではENNGの場合を示すが、ENNGの安定

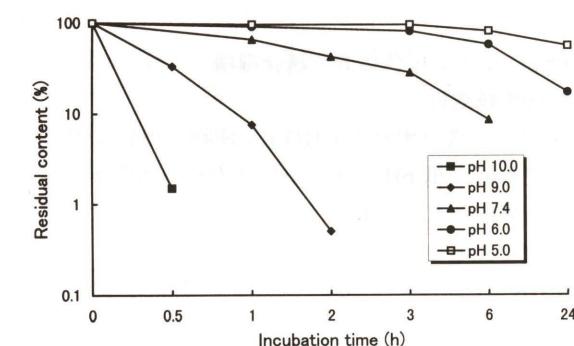


Fig. 8. Stability of ENNG (50 μg/ml) in F12 medium at various pH values at 37°C in the absence of S9 mix.

性は低pHで高く、高pHで低いことが判明し、染色体異常の発現と一致していた(Fig. 8)。MMCおよび4NQOによる異常頻度の高pHにおける低下もpH 11での安定性の低下を反映したものであった。一方、間接型染色体異常誘発物質のbenzo[a]pyrene, dimethylbenz[a]anthraceneおよびdimethylnitrosamineの安定性は培養液pHの影響を受けなかったが、異常誘発率はpH 10.8およびpH 5.8では、対照の塩酸あるいは水酸化ナトリウムによる異常頻度と同程度まで低下した(Morita *et al.*, 1991)。これは、培養液pHがS9の代謝活性化能に影響を与えたものと推察された。化学物質の培養液中の安定性と染色体異常誘発頻度の間には高い相関性のあることが明らかとなり、染色体異常誘発性の評価においては、培養液pHとそのpHにおける化学物質の安定性を充分考慮する必要がある。

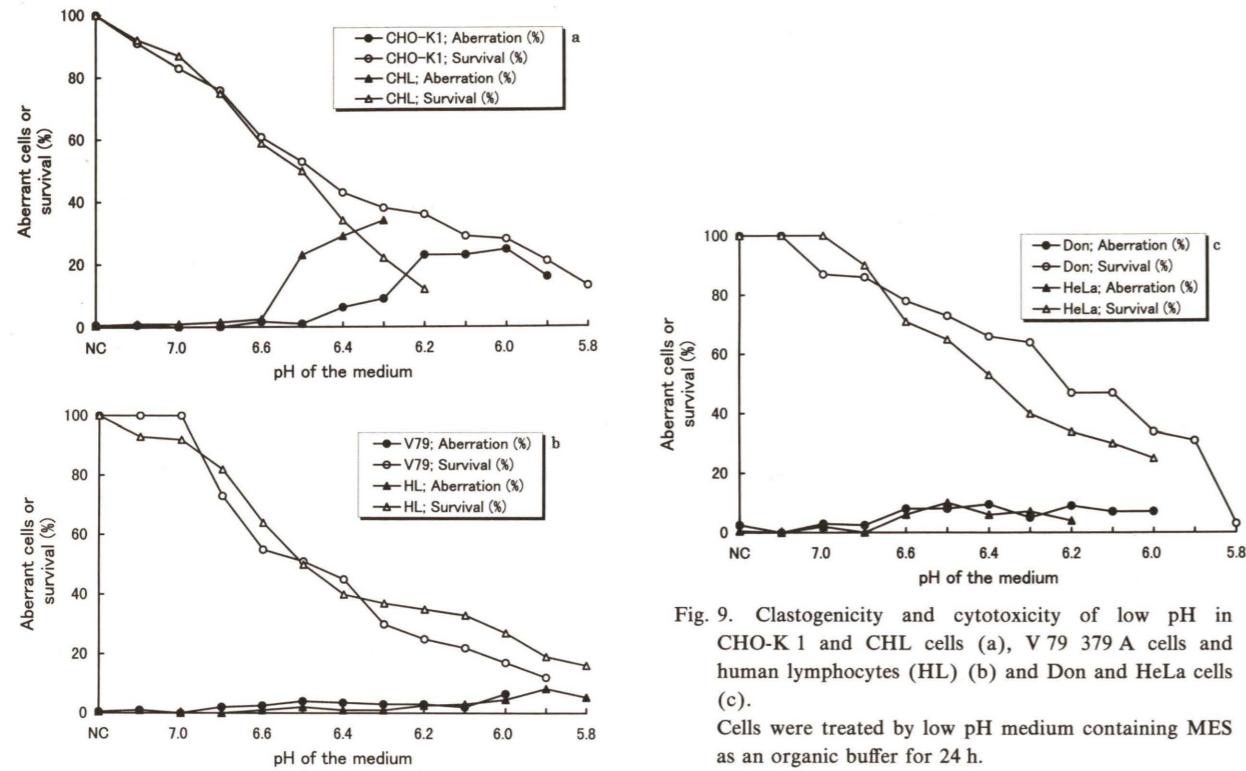


Fig. 9. Clastogenicity and cytotoxicity of low pH in CHO-K1 and CHL cells (a), V79 379A cells and human lymphocytes (HL) (b) and Don and HeLa cells (c).

Cells were treated by low pH medium containing MES as an organic buffer for 24 h.

4. 低pHによる染色体異常誘発機構

1) 細胞特異性

上記データはいずれも CHO-K1 細胞を用いて得られたものである。低pHによる染色体異常の誘発が用いた細胞に特異的なものであれば、染色体異常試験におけるその細胞の使用を制限する必要がある。そこで、数種の培養細胞（チャイニーズハムスター由来培養細胞: CHO-K1, CHL, Don, V79 379A およびヒト由来培養細胞: HeLa, 末梢血リンパ球）を用いて低pHによる染色体異常誘発の普遍性を検討した (Morita *et al.*, 1992)。pHの影響を明確なものとするために、低pH処理は有機緩衝剤のMESを用いてpHを調整した培養液に各細胞を24時間暴露させた。CHLはpH 6.5以下で異常の誘発が認められ、CHO-K1に比べ若干低pHに対する感受性が高いことが判明した (Fig. 9a)。V79 379Aとヒトリンパ球(HL)は低pHに対しCHO-K1やCHLほど明確な染色体異常を示さず、生存率が20%以下の細胞毒性状況においてわずかな異常頻度の上昇が認められた (Fig. 9b)。また、DonとHeLaは、明らかなpH依存性は認められなかったが、CHO-K1・CHLとV79・ヒトリンパ球の中間の反応を示し、低pHによる異常の誘発が認められた (Fig. 9c)。ここで注目すべきは、観察された異常のタイプはいずれの細胞においても連続処理では染色分体切断のみで、パルス処理ではこれに染色分体交換が加わったことである。これらの結果から、低pHによる染色体異常誘発の普遍性が確認され、その頻度および異常を誘発するpHには細胞特異性があること、また誘発される異常の種類には共通性があることが明らかとなった。染色体異常試験で汎用されているCHOとCHL

がともに低pHに対し感受性が高いことは注意を要する。染色体異常試験データベースのほとんどがこれらの細胞種を用いて得られたものであるため、そこで試験された酸性物質の染色体異常誘発性評価は慎重に行う必要がある。

2) 染色体異常と細胞毒性

低pHによる異常頻度と細胞毒性との関係を、CHO-K1とCHLについて示す (Fig. 10)。明らかに50%以下の生存率で異常の誘発が顕著となっている。低pH環境において細胞毒性が50%以下の陽性反応は、慎重な評価が必要なことが示唆された。

3) 姉妹染色分体交換の誘発

染色体を観察対照としながら、姉妹染色分体交換(SCE)については、pHの影響が検討されていない。そこで低pHに対し感度よく染色体異常を誘発するCHO-K1と異常誘発頻度が低いV79 379Aを用いて、SCE誘発性に及ぼす低pHの影響を検討した (Morita, 1995)。Fig. 11aにCHO-K1を低pH培養液で3時間処

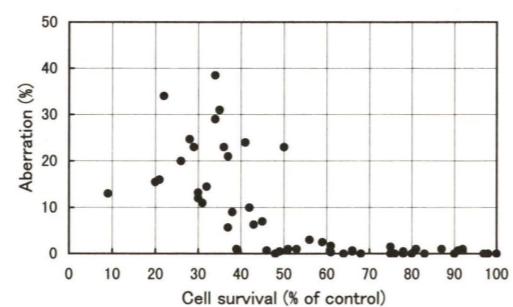


Fig. 10. Correlation between clastogenicity and cytotoxicity of low pH in CHO-K1 and CHL cells.

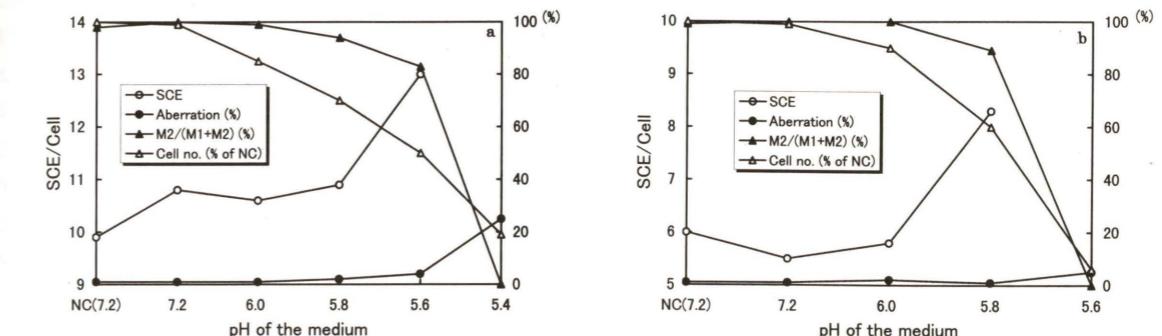


Fig. 11. SCE induction by low pH in CHO-K1 cells (a) and V79 379A cells (b). Cells were exposed for 3 h to the low pH medium. NC is the negative control.

理した場合の結果を示す。pH 5.6でSCE頻度の上昇を示し、低pHはSCEをも誘発することが明らかとなった。SCEの誘発を認めたpHでは染色体異常の誘発は見られず、また、染色体異常を誘発したpHでは、2回目の分裂中期細胞(M2)がなくSCEの観察は不可能であった。このことから、低pHによる染色体異常は最初の分裂中期細胞(M1)で発現していることが明らかとなった。V79 379AにおいてもCHO-K1と同様のパターンが見られ、pH 5.8でSCE頻度が上昇した (Fig. 11b)。染色体異常試験のみならずSCE試験においても低pHによる偽陽性の可能性が示唆された。

4) 細胞周期に及ぼす影響

低pHによる染色体異常誘発機構を明らかにするため

に、CHO-K1の細胞周期に及ぼす低pHの影響をフローサイトメトリーを用いて検討した (Morita, 1995)。有機緩衝剤のMESを含む培養液をpH 6.0~7.2に調整し処理前、24時間後および48時間後の相対DNA量を測定した。低pHになるにつれ、S期にある細胞の割合が増し、また分裂指数も低下した (Fig. 12)。生細胞数の計数の結果pH 6.4以下では細胞数の増加も見られず、低pHは細胞周期をS期において遅延させていることが明らかとなった。

5) 細胞周期と染色体異常誘発性

細胞周期のどこで低pHに暴露された細胞が染色体異常を誘発するかを明らかにするために、pH 5.4の培養液で3時間処理したあと、異常頻度の経時的変化を検討し

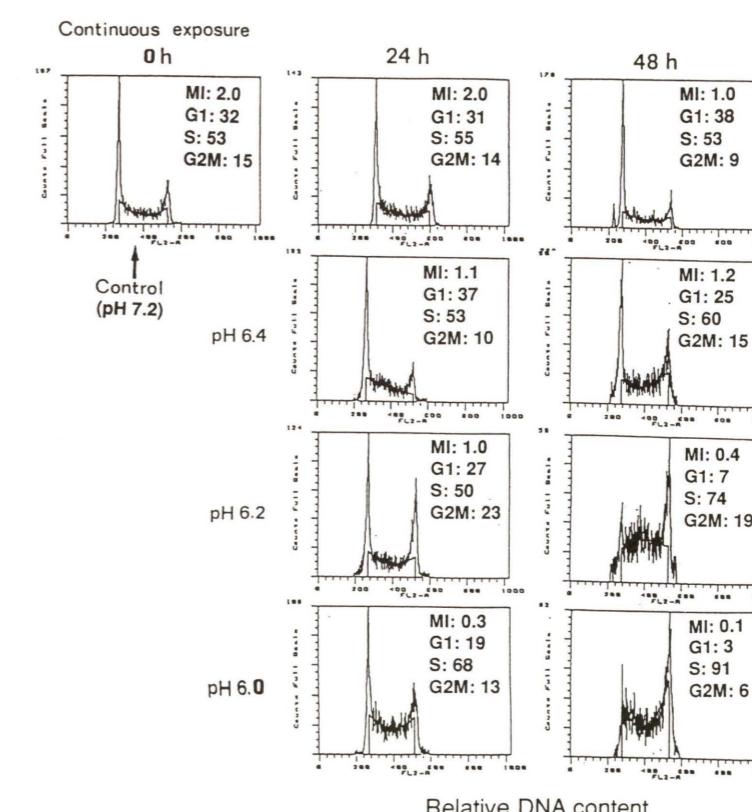


Fig. 12. Cell cycle phase distribution and mitotic index (MI) in CHO-K1 cells after low pH treatment. Cells were exposed for 24 or 48 h to the low pH medium. Cell cycle analysis was performed with a flow cytometry. Numbers are percentages.

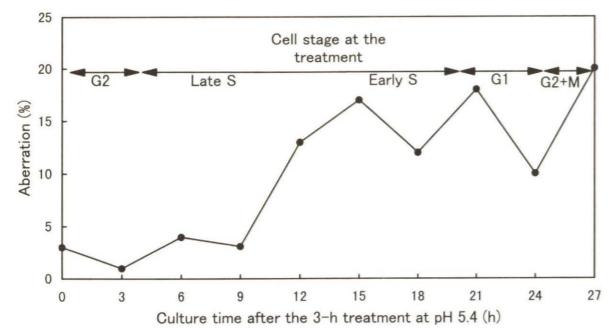


Fig. 13. Effect of cell cycle stages on clastogenicity induced by low pH.

CHO-K1 cells were exposed for 3 h to the treatment medium at pH 5.4 and recultured with fresh medium.

た (Morita, 1995)。その結果、直前のG2期およびS期後期にあったと推察される細胞では異常は認められず、S期前期、G1期および1つ前のG2M期にあった細胞で異常の誘発が認められた (Fig. 13)。低pHによる染色体異常の誘発にはS期を通過することが必要で、S期依存的であることが示唆された。このように、低pHは細胞周期をS期において遅延させ、S期依存的に染色体異常を誘発すること、パルス処理では交換型の異常が発現することから、低pHによる染色体異常誘発の機構は、S期におけるDNA合成あるいは修復系への干渉によることが推察された。また、高pHではS9存在下でのみ異常が認められること、低pHにおいてもS9存在下では異常が強く発現することから、S9の変性などによる新たな活性物質の生成も考えられた。

5. In vitro 染色体異常試験における許容pH範囲

非生理的pH環境は染色体異常を誘発し、偽陽性の結果をもたらす可能性がある。では、どれくらいのpH範囲で試験を実施するのが妥当であろうか。通常、生理的pHは6.8から7.4ぐらいといえる。しかしながら、常にこのpH範囲を維持するのは、化学物質の種類によって

は困難であろう。そこで、pH 6.6以上ではいずれの細胞種においても染色体異常の誘発がみられず、また生存率も50%以上あること、さらに高pH処理によっても24時間後のpHが7.8以下の場合には異常の誘発が認められなかったことから、実際の処理においてはpH 6.6から7.8は問題ないであろう。培養液pHは通常7.2程度に調整される。試験物質の添加により培養液pHが0.6単位以上変化する場合、すなわちこの実験的推奨pHをはずれる場合には処理を避けるのが賢明である。場合によっては、中和や緩衝系の増強を行い、pHの影響を抑えることも必要であろう。また、非生理的pHで安定な物質を試験する場合は、培養液pHを化学物質の安定性に基づき設定するのではなく、細胞の生理的環境下に設定することが重要である。染色体異常試験の最高用量の決定要因には、細胞毒性や浸透圧に基づく10mMがあるが、これに加え培養液pHも最高用量を規定する要因の1つとする必要がある。

6. 非生理的培養環境による染色体異常誘発機構

種々の非生理的培養環境による染色体異常誘発機構をTable 3にまとめる。低浸透圧ならびに高細胞毒性はリソゾームからのヌクレアーゼ放出、高浸透圧はイオン不均衡、S9 mixは活性酸素によるものと推察されているが、いずれも明確な証明はなされていない。さらに、本研究から低pHは酵素阻害、高pHとS9の組合せは新たな染色体異常誘発物質の生成による可能性が示唆された。

結語

本研究が契機となり、染色体異常試験に関する各ガイドラインは、培養液のpHに注意を払うよう記載するようになつた (Table 4)。医薬品を始めとする新規化学物質の開発において、偽陽性による開発の遅れや中止は、開発企業のみならず人類にとっても損失となることがある。

Table 3. Indirect mechanisms of chromosome aberration induced by non-physiological culture environment.

Possible mechanisms	Cellular target	Non-physiological environment
Nuclease release from lysosomes	Lysosomes	Hypotonicity High level of cytotoxicity
Ionic imbalance	Chromatin? Enzymes	Hypertonicity
Production of active oxygen species	Oxygen and superoxide radicals	S9 mix
Production of new clastogens	DNA	High/low pH and S9 mix
Enzyme inhibition	Enzymes of DNA synthesis or repair	Low pH

Kirkland *et al.*, 1989; Morita, 1995; Scott *et al.*, 1991

Table 4. Guidelines on non-physiological culture conditions in vitro chromosomal aberrations test.

Recommendation	Source	Reference
In recent years, attention has also become focused on changes in pH or the ionic balance of culture medium. Conducting the test under conditions unphysiological to indicator cells should be avoided.	Guideline manual	MHW, 1990
It is also important to determine the effect of the material on the pH of the culture medium, since extremes of pH can be clastogenic (Morita <i>et al.</i> , 1989).	UK EMS recommended procedures	Scott <i>et al.</i> , 1990
Since extremes of pH are known to induce chromosome breakage (e.g., Morita <i>et al.</i> , 1992), the pH of the culture medium should also be kept in the physiological range.	Melbourne workshop recommendation	Galloway <i>et al.</i> , 1994
Can the effect be attributed to extreme culture conditions that do not occur in <i>in vivo</i> situations, e.g., extremes of pH; osmolality;	ICH guidance	ICH, 1995
Care should be taken to avoid conditions which would lead to positive results which do not reflect intrinsic mutagenicity and may arise from changes in pH, osmolality or high levels of cytotoxicity.	OECD guideline	OECD, 1996
changes and DNA strand breaks, and relation to toxicity, <i>Mutation Res.</i> , 189, 15-25.		
ICH (1995) Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals.		
Ishidate, M., Jr., T. Sofuni, K. Yoshikawa, M. Hayashi, T. Nohmi, M. Sawada and A. Matsuoka (1984) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, <i>Food Chem. Toxicol.</i> , 22, 623-636.		
Kalweit, S., C. Nowak and G. Obe (1990) Hypotonic treatment leads to chromosomal aberrations but not sister-chromatid exchanges in human lymphocytes, <i>Mutation Res.</i> , 245, 5-9.		
Kirkland, D. J. (1992) Chromosomal aberration test <i>in vitro</i> : problems with protocol design and interpretation of results, <i>Mutagenesis</i> , 7, 95-106.		
Kirkland, D. J., R. R. Marshall, S. McEnaney, J. Bidgood, A. Rutter and S. Mullineux (1989) Aroclor-1254-induced rat-liver S9 causes chromosomal aberrations in CHO cells but not human lymphocytes: a role for active oxygen ?, <i>Mutation Res.</i> , 214, 115-122.		
MHW (1990) Guidelines for toxicity studies of drugs manual, Chapter 5, Mutagenicity study, Yakuji Nippo Ltd., Tokyo, pp. 44-59.		
Morita, T. (1995) Low pH leads to sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations, and its clastogenicity is S-dependent, <i>Mutation Res.</i> , 334, 301-308.		
Morita, T., T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura (1991) Effect of pH on the activity and stability of clastogens in the <i>in vitro</i> chromosomal aberration test with Chinese hamster ovary K1 cells, <i>Mutation Res.</i> , 262, 159-166.		
Morita, T., T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura (1992) Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, <i>Mutation Res.</i> , 268, 297-305.		
Morita, T., K. Takeda and K. Okumura (1990) Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells, <i>Mutation Res.</i> , 240, 195-202.		
Morita, T., Y. Watanabe, K. Takeda and K. Okumura (1989) Effects of pH in the <i>in vitro</i> chromosomal aberration test, <i>Mutation Res.</i> , 225, 55-60.		
森田 健, 矢嶋信浩 (1993) 染色体異常試験の問題点, 環境変		

- 異原研究, **15**, 89-96.
- Nowak, C. (1989) Induction of chromosomal aberrations by hypotonic culture conditions is independent of S-phase in V79 hamster cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 44-49.
- Nowak, C. (1990) Chromosomal aberrations in V79 hamster cells induced by hyperosmotic solutions of NaCl, *Mutation Res.*, **230**, 227-234.
- OECD (1996) OECD guideline for the testing of chemicals, proposal for updating guideline 473, *In vitro* metaphase chromosome aberrations test, September 1996.
- Scott, D., B. J. Bean, N. D. Danford and D. J. Kirkland (1990) Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*, In: Basic mutagenicity tests, UKEMS recommended procedures, D. J. Kirkland (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.
- Scott, D., S. M. Galloway, R. R. Marshall, M. Ishidate Jr., D. Brusick, J. Ashby and B. C. Myhr (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions, A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, **257**, 147-204.
- Seeberg, A. H., P. Mosenso and R. Foster (1988) High-dose-level effects in mutagenicity assays utilizing mammalian cells in culture, *Mutagenesis*, **3**, 213-218.
- Zeiger, E., J. K. Haseman, M. D. Shelby, B. H. Margoline and R. W. Tennant (1990) Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **16**(Supple. 18), 1-14.

Environ. Mutagen Res., **19**: 37-41 (1997)

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「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」(S1-2)

大気中の変異原・がん原物質

Mutagens and carcinogens in atmospheric environment

渡辺徹志, 平山晃久

Tetsushi Watanabe and Teruhisa Hirayama

京都薬科大学 607 京都市山科区御陵中内町 5

Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchicho Misasagi, Yamashina-ku,
Kyoto 607, Japan

(受理: 1997年3月12日)

Summary

Mutagens and carcinogens in the atmosphere are classified as gas-phase or particulate-phase compounds. The extracts of ambient air particles collected for 18 years (1974-1992) in Sapporo were significantly mutagenic in *S. typhimurium* TA100 and TA98 with and without S9 mix. This indicates that the potential health risks from the particles have not decreased during the 18 year period. The mutagenicity of ambient air particles has been more thoroughly investigated in Japan, there being fewer reports on the mutagenicity of gas-phase samples. However the contribution of gas-phase samples to the total mutagenicity of ambient air was not negligible, and was especially high in summer. Therefore we should pay more attention to the mutagenicity of gas-phase compounds in the ambient air. Combining air sampling using polyurethane foam cartridges equipped with filter cartridge assembly drawn by a mini pump and using the microsuspension assay technique with *S. typhimurium* YG1021 and YG1024 was a promising method for monitoring the mutagenicity of indoor air. The particle-phase samples collected in smoking rooms and the gas-phase samples from ambient air collected in summer were clearly mutagenic in both strains without the S9 mix. Recently, several new nitroarenes, which are extremely mutagenic in the TA98 strain in the Ames assay and/or the microsuspension assay, were detected and quantified in ambient air samples. 2- and 4-nitro-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-ones were identified from the gas-phase OH radical-initiated reaction of phenanthrene. The 2-nitro isomer accounted for ~20% of the mutagenicity of the ambient particle extract. 1- and 3-nitro-6-azabenz[a]pyrenes and their oxides were detected in the semi-volatile phase originating from the airborne particulate matter in diesel and gasoline vehicle exhausts. 3-Nitrobenzanthrone was also detected in ambient air particle extracts and was not only mutagenic in bacteria, but was also clastogenic in mouse peripheral blood reticulocytes *in vivo*.

Keywords: atmospheric environment, nitrodibenzopyranone, nitro-azabenz[a]pyrene, nitrobenzanthrone

緒言

我々を取り巻く大気環境中には工場, 燃焼炉, 自動車などから多種多様な化学物質が排出されており, その排出量は年々増加している。また, 室内空気環境も都市ガス, 灯油の不完全燃焼, 喫煙などにより汚染される可能性がある。それら空気環境を汚染する物質の中には数多くの変異原・がん原物質が含まれており, 我々は日常生活を送るうえでそれらに暴露することを避けることがで

きない。このため, 空気中の変異原物質への暴露評価はリスクアセスメントの一環として極めて重要であると考えられる。従来, 我が国では空気環境中の変異原・がん原物質に関する研究は主に大気浮遊粒子状物質あるいは発生源として自動車排ガス中の粒子状物質を対象として, それらの中に存在する新しい変異原・がん原物質の検索, 既知変異原・がん原物質の検出・定量, 及びAmes試験を用いた汚染実態の把握等を目的として行わ

れてきた。その結果、多種多様な変異原物質が検出・定量され、それによる汚染の実態も明らかになりつつある。

本稿では、これまでに大気中より検出された変異原・がん原物質とサンプリング法について述べたのち、大気浮遊粒子状物質の変異原性を指標とした長期汚染実態調査の結果並びに大気環境中のガス・蒸気状物質及び室内空気の変異原性をスクリーニングする試みを紹介する。また近年、空気環境中から新しい強変異原性ニトロ多環芳香族炭化水素類が検出されていることから、それらの変異原性等についても報告する。

1. 大気中の変異原・がん原物質

これまでに大気中から多種多様な変異原・がん原物質が見いだされており（松下, 1989），それらの多くは社会経済活動の発展に伴って人為的に生産、排出された物質である。大気中の変異原・がん原物質は大気中での存在形態によりガス・蒸気状物質と粒子状物質に分類される。Table 1 に代表的な大気中の変異原・がん原物質を示す。ガス・蒸気状物質中には近年、特に有害大気汚染物質として注目されている formaldehyde, benzene, trichloroethylene, tetrachloroethylene, vinyl chloride などが含まれている。ガス・蒸気状物質の捕集法としては溶液吸収法、真空ピン法、常温吸着法などがあるが Ames 試験等バクテリアを用いた変異原性試験用試料の捕集には主にポリウレタンフォームや XAD 樹脂などを用いた常温吸着法が用いられている。

粒子状物質として、重金属類など無機物から多環芳香

族炭化水素類など有機化合物まで様々な物質が検出されており、それらの中には大気中の変異原・がん原物質としてモニタリングされている benzo[a]pyrene やサルモネラ菌 TA98 株に対して極めて強い変異原性を示す dinitropyrene 類などが含まれている。これら浮遊粒子中の変異原・がん原物質は主に燃焼や産業活動を起源とするものと大気中での反応により二次的に生成するものであり、大気中に存在するニトロ芳香族炭化水素類は主に二次的生成物であるという報告もある (Arey *et al.*, 1989)。粒子状物質はハイボリウムエーサンプラー等により石英あるいはガラス纖維製ろ紙上に捕集される。また粒径別の捕集にはアンダーセンサンプラーが用いられる。粒子状物質の捕集の際にはろ紙上での二次的な変異原物質の生成を抑えるため捕集時間等捕集条件に注意を払う必要性がある。一方、大気中にはガス・蒸気状と粒子状の両方の存在形態をとりうる 4-nitrobiphenyl や 2-nitrofluorene などのような物質も存在し、それらがどちらの物質として捕集されるかは気温等の自然条件と捕集方法に依存する。

捕集された変異原・がん原物質の分析には蛍光検出あるいは化学発光検出高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー/質量分析法あるいは電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィーやフレームサーミオニックディテクタ付ガスクロマトグラフィーなどが用いられる。また変異原性試験法として Ames 試験 (Maron and Ames, 1986) や microsuspension 法 (Kado *et al.*, 1983; DeMarini *et al.*, 1989) あるいは micro forward-mutation 法 (Lewtas *et al.*, 1987) や ultramicro forward-mutation

法 (高木ら, 1989) などが行われている。

2. 大気浮遊粒子状物質並びにガス・蒸気状物質の変異原性

Matsumoto *et al.* (1997) は札幌市内の住居地域において 1974 年から 1992 年の 18 年間に渡って捕集された大気浮遊粉じんから得た抽出物の変異原性を Ames 試験により調べた。S9mix 添加時の TA98 株及び TA100 株に対する変異原活性は 1974 年から 1992 年にかけて穏やかな減少傾向を示したが、S9 mix 非添加時では両菌株ともにほぼ横這いの状態であった。我が国の大気汚染の状況は二酸化硫黄については 1970 年前後と比較して現在までにかなり改善され、その大気中における濃度は約 1/4 程度にまで低下している。しかしながら、変異原活性の面から見ると大気浮遊粉じんの健康に対する潜在的な危険性は減少しているとは言えない。また浮遊粉じん抽出物の TA98 株及び TA100 株に対する変異原活性は S9 mix 添加の有無にかかわらず夏（6～8 月）に低く、秋（9～11 月）から冬（12～2 月、ただし 12 月は前年）にかけて気温が低下するにつれて上昇し、春（3～5 月）から夏にかけて再び減弱するという季節的変動を繰り返していた (Matsumoto *et al.*, 1997)。

一方、神谷 (1994) は名古屋市内で夏期（7 月）と冬期（2～3 月）に石英纖維製ろ紙の後部にポリウレタンフォームを装着したハイボリウムエーサンプラーを用いて浮遊粒子状物質とガス状物質を捕集し、それらの TA98 株に対する変異原性を Ames 試験により調べた。その結果、ガス状物質の変異原性は冬期より夏期において強く、大気の全変異原性に対するガス状変異原の割合は夏期ではいずれの試験日においても、S9mix 添加の有無にかかわらず約 20～60% と高かった。このことは大気の変異原性をモニタリングする場合、粒子状物質ばかり

りでなくガス状物質についても注目すべきであり、特に夏期にはガス状物質の変異原性を無視することができないということを示唆している。

3. パーソナルサンプラーによる大気及び室内空気の捕集と変異原性試験

我々は平均一日のうち 80% 以上の時間を室内で過ごしていると言われており、室内空気汚染に対する社会的関心は年々高まりつつある。一方、室内空気試料を捕集する際には大気試料の場合より捕集時の騒音防止など多くの制約が伴う。このため、採集可能な試料が極めて微量となり、より高感度な変異原性試験法が必要とされる。Fig. 1 にパーソナルサンプラーを用いて捕集した粒子状物質とガス・蒸気状物質について microsuspension 法で試験した際の変異原性試験の結果を示した。室内空気試料は喫煙者のいる部屋といない部屋において 1996 年 8 月 30～31 日（24 時間）に捕集した。喫煙者のいる部屋の空気は石英纖維製ろ紙に捕集される粒子状の変異原物質によって汚染されており、それらの変異原性はサルモネラ菌 YG1021 株及び YG1024 株によって感度良く検出された。大気試料も両 YG 株に対して変異原性を示し、8 月に捕集した試料ではガス状物質、11 月の試料では粒子状物質の変異原活性が高かった。今回用いたサンプラーは騒音のほとんど無い、携帯可能なミニポンプ (1～5 l/min) で吸引することから、変異原物質に対する個人暴露量のモニタリングにも応用可能であると考えられる。

4. 大気中より検出された新しい変異原物質

近年、大気浮遊粒子状物質あるいはガス・蒸気状物質として Ames 試験あるいは microsuspension 法により極めて強い変異原性を示すニトロ多環芳香族炭化水素類が

Table 1. Representative mutagens and carcinogens in atmospheric environment.

Phase	Category	Compound
gas	aldehyde	formaldehyde
	aromatic hydrocarbon	benzene
	halogenated organic compound	carbon tetrachloride, trichloroethylene, tetrachloroethylene, vinyl chloride
	nitro compound	2-nitropropane, 4-nitrobiphenyl, 2-nitrofluorene
	nitroso compound	N-nitrosodiethylamine, N-nitrosodimethylamine
particle	heavy metal	arsenic, cadmium, chromium, nickel
	mineral	asbestos
	aromatic epoxide	benzo[a]pyrene 4,5-epoxide
	aza-heterocyclic aromatic hydrocarbon	benz[c]acridine, carbazole, dibenz[a, h]acridine, dibenz[a, j]acridine
	halogenated organic compound	chlorinated dibenzofuran, DDT, PCB, 2,3,7,8-tetrachlorodioxin
	heterocyclic amine	Trp-P-1, Trp-P-2
	nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon	2,7-dinitrofluorene, 1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrene, 4-nitrobiphenyl, 2-nitrofluorene, 1-nitropyrene
	nitrosamine	N-nitrosomorpholine, N-nitrosopiperidine
	polycyclic aromatic hydrocarbon	benz[a]anthracene, benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene, chrysene, methylchrysene

Matsushita (1989).

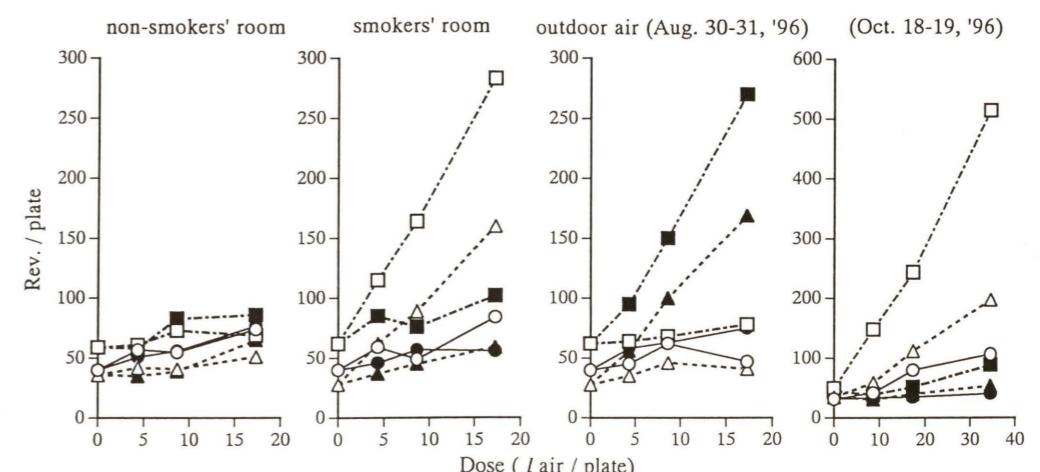


Fig. 1. Mutagenicity of air samples collected by filter and polyurethane foam (PUF) plug in *S. typhimurium* TA98, YG1021 and YG1024 without S9 mix.
—○—, Filter TA98; —△—, Filter YG1024; —□—, PUF plug TA98; —■—, PUF plug YG1024.

新たに検出・定量された。

1) Nitrodibenzopyranone 類

大気浮遊粒子状物質の S9 mix 非存在下での変異原性に対する nitrofluoranthene 類, mononitropyrene 類及び dinitropyrene 類の寄与率はそれぞれ 0.1~5% 程度であり, それらでは大気浮遊粒子状物質の変異原性の 10~15% 程度しか説明されない (Arey *et al.*, 1988; Hayakawa *et al.*, 1995). また大気浮遊粒子状物質の変異原性の大部分は mononitropyrene 類や dinitropyrene 類よりやや極性の高い微極性画分に存在すると報告されている (Lewtas *et al.*, 1990; Arey *et al.*, 1992). 2- 及び 4-nitrodibenzopyranone (nitro-6 H-dibenzo [b, d] pyran-6-one; NDBP) (Fig. 2) はこの微極性画分より検出された化合物である (Arey *et al.*, 1992). 2- 及び 4-NDBP の変異原活性は microsuspension 法で試験した場合, TA98 株に対してそれぞれ 104000 rev./ μ g 及び 15300 rev./ μ g であった (Watanabe *et al.*, 1995). 2- 及び 4-NDBP は主に大気浮遊粒子状物質として捕集され大気中の濃度は 240~410 pg/m³ 及び 180~240 pg/m³ であり (Helmig *et al.*, 1992a), 大気浮遊粒子状物質の変異原性のおよそ 20% が 2-NDBP により説明されると報告されている (Helmig *et al.*, 1992b). ニトロ多環芳香族炭化水素類は

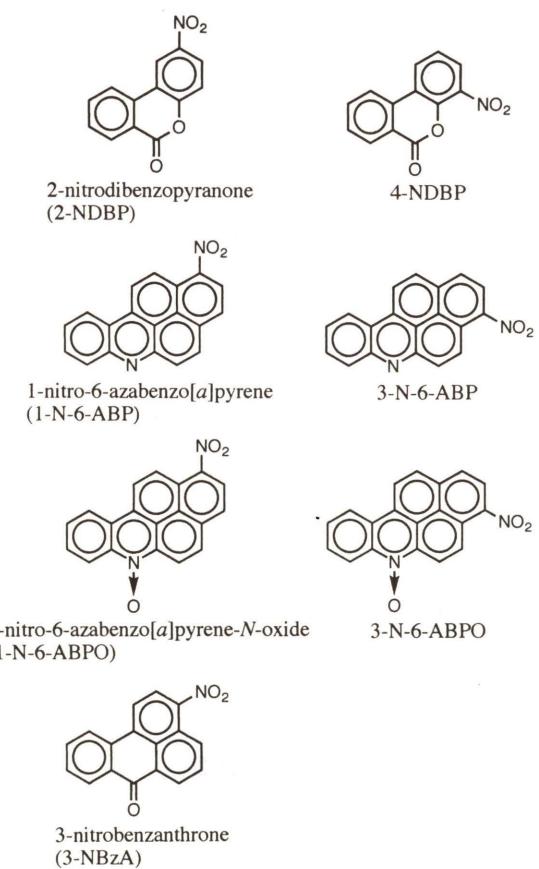


Fig. 2. Structure of nitrodibenzopyranone (NDBP), nitro-6-azabenz[a]pyrene (N-6-ABP), nitro-6-azabenz[a]pyrene-N-oxide (N-6-ABPO) and nitrobenzanthrone (NBzA).

燃焼炉やディーゼルエンジンなどの燃焼機関から大気中に排出されるばかりではなく, 大気中において多環芳香族炭化水素類と窒素酸化物との反応により生成することが示唆されている (Arey *et al.*, 1989). 大気中の NDBP 類は自動車排ガスとして排出される (Lewtas *et al.*, 1997) とともに気相反応系において phenanthrene, OH ラジカル及び窒素酸化物との反応により主生成物として生成すると報告されている (Arey *et al.*, 1992).

2) Nitroazabenz[a]pyrene 類

1- 及び 3-nitro-6-azabenz[a]pyrene (N-6-ABP) とそのオキシド類 (N-6-ABPO) (Fig. 2) はテフロンコートしたろ紙の後部に XAD 樹脂カラムを装着したハイボリュームエアーサンプラーで捕集することにより, 主に XAD 樹脂に捕捉される半揮発性変異原物質である (Sera *et al.*, 1994). それらの変異原性は極めて強く, TA98 株に対して S9 mix 非存在下で 1-N-6-ABP は 352 rev./ng, 3-N-6-ABP は 348 rev./ng, 1-N-6-ABPO は 115 rev./ng, 3-N-6-ABPO は 1260 rev./ng であった (Sera *et al.*, 1992). N-6-ABP 類及び N-6-ABPO 類の XAD 樹脂抽出物 1 g 当たりの濃度は 0.3~1.2 ng であり, XAD 樹脂抽出物の変異原性の約 35% がこれらの化合物で説明されうる. また, これらのニトロ化合物はディーゼル車やガソリン車の排ガス中からも検出されており, 主な発生源はディーゼルエンジンであろうと報告されている (Sera *et al.*, 1994).

3) 3-Nitrobenzanthrone

3-Nitrobenzanthrone (3-nitro-7H-benz[d,e]anthracene-7-one; 3-NBzA) (Fig. 2) は 1994 年に初めて大気浮遊粒子状物質中並びにディーゼル排気微粒子中より検出・定量された新しい変異原物質である (Hisamatsu *et al.*, 1996). 3-NBzA の TA98 株に対する変異原活性は Ames 試験において約 208000 rev./nmol であり, 既知化合物中最強の変異原物質である 1,8-dinitropyrene の変異原活性とほぼ同程度であった. さらに 3-NBzA は 25 mg/kg 以上の腹腔内投与によりマウス末梢血に対して小核を用量依存的に誘発した. このように 3-NBzA は微生物に対して強い変異原性を示すばかりでなく *in vivo* においても染色体異常誘発性を示すことから発がん性を有するのではないかと疑われる.

5. 今後の課題

これまでに大気浮遊粒子状物質あるいは自動車排出ガス中の粒子状物質から多種多様な変異原・がん原物質が検出・定量され, それらによる汚染実態も明らかにされつつある. しかし, 大気中のガス・蒸気状変異原・がん原物質あるいはそれらによる汚染状況に関する報告は極めて少ない. また, 変異原・がん原物質による室内空気の汚染と日常生活あるいは生活習慣との関係については喫煙による影響を除きほとんど明らかにされていない. これらは試料の捕集法に関する基礎的なデータが少なく

捕集法が確立されていないこと, また採集可能な試料が極めて微量であるため高感度な変異原性試験法が必要であることなどに起因している. 今後, 大気中のガス・蒸気状物質及び室内空気汚染物質の捕集法並びに変異原性試験法を確立し, それらによる汚染状況を把握する必要性がある. また新たに検出された変異原物質の迅速かつ簡便な定量法を開発し, 汚染状況を調査するとともに発生源を究明し対策を講じなければならない. 一方, 従来より研究されている浮遊粒子状物質の変異原性に関するものその原因物質が不明である部分が大きい. このことから大気・室内空気中に存在する新しい変異原物質の検索も必要である. また近年, ディーゼル排気微粒子と発がん物質を全く含まないカーボンブラックや二酸化チタンに対する長期暴露で肺がん発生率に殆ど差がないという結果が発表された (Gallagher *et al.*, 1994). これまでのところ発がん物質を含まない微粒子による肺がん発生のメカニズムは解明されていないが大気浮遊粒子状物質の吸入に伴う肺胞でのマクロファージによる活性酸素種等の生成が予想されることから, それらによる DNA 損傷の発生についても究明する必要性がある.

謝 辞

本発表を行うにあたり貴重なデータを提供して下さった北海道環境科学センターの松本 寛先生に深謝します.

参考文献

- Arey, J., B. Zielinska, W. P. Harger, R. Atkinson and A. M. Winer (1988) The contribution of nitrofluoranthenes and nitropyrenes to the mutagenic activity of ambient particulate organic matter collected in southern California, *Mutat. Res.*, **207**, 45~51.
- Arey, J., B. Zielinska, R. Atkinson and S. M. Aschmann (1989) Nitroarene products from the gas-phase reactions of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons with the OH radical and N₂O₅, *Int. J. Chem. Kinet.*, **21**, 775~799.
- Arey, J., W. P. Harger, D. Helmig and R. Atkinson (1992) Bioassay-directed fractionation of mutagenic PAH atmospheric photooxidation products and ambient particulate extracts, *Mutat. Res.*, **281**, 67~76.
- DeMarini, D. M., M. M. Dallas and J. Lewtas (1989) Cytotoxicity and effect on mutagenicity of buffers in a microsuspension assay, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **9**, 287~295.
- Gallagher, J., U. Heinrich, M. George, L. Hendee, D. H. Phillips and J. Lewtas (1994) Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles, *Carcinogenesis*, **15**, 1291~1299.
- Hayakawa, K., Y. Kawaguchi, T. Murahashi and M. Miyazaki (1995) Distributions of nitropyrenes and mutagenicity in airborne particulates collected with an Andersen sampler, *Mutat. Res.*, **348**, 57~61.
- Helmig, D., J. Lopez-Cancio, J. Arey, W. P. Harger and R. Atkinson (1992a) Quantification of ambient nitrodibenzopyranones: Further evidence for atmospheric mutagen formation, *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 2207~2213.
- Helmig, D., J. Arey, W. P. Harger, R. Atkinson and J. Lopez-Cancio (1992b) Formation of mutagenic nitrodibenzopyranones and their occurrence in ambient air, *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 622~624.
- Hisamatsu, Y., T. Enya, H. Suzuki, T. Watanabe and T. Hiyama (1996) 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates, *Environ. Sci. Technol.*, Submitted.
- Kado, N. Y., G. N. Guirguis, C. P. Flessel, R. C. Chan, K. I. Chang and J. J. Wesolowski (1986) Mutagenicity of fine (< 2.5 μ m) airborne particles: Diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micro preincubation (Microsuspension) procedure, *Environ. Mutagen.*, **8**, 53~66.
- 神谷明 (1994) 都市大気中の変異原性 (第2法), 名古屋市環境科学研究所報, **24**, 27~30.
- Lewtas, J., S. Goto, K. Williams, J. C. Chuang, B. A. Peterson and N. K. Wilson (1987) The mutagenicity of indoor air particles in a residential pilotfield study: Application and evaluation of new methodologies, *Atmospheric Environment*, **21**, 443~449.
- Lewtas, J., J. Chuang, M. Nishioka and B. Petersen (1990) Bioassay-directed fractionation of the organic extract of SRM 1649 urban air particulate matter, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **39**, 245~256.
- Lewtas, J., T. Watanabe and M. Nishioka (1997) Contribution of nitrodibenzopyranones to the genotoxicity of ambient air and combustion source emissions, *Atmospheric Environment*, in press.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173~215.
- Matsumoto, Y., S. Sakai and T. Nakajima (1997) Long-term trends of mutagenic activity in the Sapporo atmosphere, based on the results of an 18-year study, *Environ. Sci. Technol.*, submitted.
- 松下秀鶴 (1989) 4.7 空気中のがん・変異原物質とその暴露評価手法の進歩, 大気汚染学会誌, **24**, 418~429.
- Sera, N., K. Fukuhara, N. Miyata, K. Horikawa and H. Tokiwa (1992) Mutagenicity of nitro-azabenz[a]pyrene and its related compounds, *Mutat. Res.*, **280**, 81~85.
- Sera, N., K. Fukuhara, N. Miyata and H. Tokiwa (1994) Detection of nitro-azabenz[a]pyrene derivatives in the semivolatile phase originating from airborne particulate matter, diesel and gasoline vehicles, *Mutagenesis*, **9**, 47~52.
- 高木敬彦, 後藤純雄, 郭 錦堂, 杉田佐和子, 村田元秀, J. Lewtas, 松下秀鶴 (1989) Ultramicro forward-mutation 法を用いた微量室内空気浮遊粒子の変異原性, 大気汚染学会誌, **24**, 244~251.
- Watanabe, T., M. J. Kohan, D. Walsh, L. M. Ball, D. M. DeMarini and J. Lewtas (1995) Mutagenicity of nitrobenzopyranones in the *Salmonella* plate-incorporation and microsuspension assays, *Mutat. Res.*, **345**, 1~9.

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「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」(SI-3)

放射線・紫外線の変異原性、発癌性： 太陽光紫外線のバイオドシメトリー

Mutagenic and carcinogenic activity of environmental radiations:
biodosimetry of solar UV radiation

宗像信生

Nobuo Munakata

国立がんセンター研究所 放射線研究部 104 東京都中央区築地 5-1-1

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

(受理 1997年3月7日)

Summary

Various kinds of radiation are detected and measured by physical, chemical and biological methods, dependent primarily on the nature of the detectors. In the case of solar UV radiation, the most ubiquitous mutagen on earth, physical spectroscopy and biological dosimetry seem relevant and informative in monitoring biologically-effective doses. The concept of effectiveness spectra derived from multiplication of irradiance and action spectra is crucial for relating these two methods, but the experimental validation was lacking. The spore dosimetry developed and employed since 1980 is a convenient and accurate biodosimeter, and a detailed inactivation action spectrum was obtained. The irradiance spectra at four Japanese sites routinely measured by Brewer spectrophotometers have been available since 1990. Comparative side-by-side experiments have been carried out at Tsukuba, Naha and Sapporo observatories. The results indicate that biologically-effective doses, calculated from the effectiveness spectrum, were in close agreement with the observed doses, the mean ratios of the observed and calculated values being 1.2-1.5. Comparative experiments were also performed at Bukk National Park in Hungary and agreement with the spectrophotometry in Europe has been reported. The application of spore dosimetry for monitoring personal exposure to solar UV is discussed.

Keywords: solar UV radiation, *Bacillus subtilis*, spore dosimeter, personal exposure monitoring

緒言

本学会の研究は、おもに環境中の化学物質について、生物を用いて検出、定量することで、物理的な変異原の研究は主柱ではないかもしれないが、21世紀にむけての地球環境、バイオスフェアの問題として、太陽光紫外線は喫緊であるとともに根源的な要素である。太陽光紫外線は現存する多くの生物にとって強力なストレスであると同時に、進化史上の重要な事件、DNA修復能、組換え機構、染色体の倍数化、減数分裂、多細胞化、陸上への生態系の拡大などは、生物と太陽光紫外線との危険で切り離せない関係から生じたと見ることができる。過去の生物がどれだけ紫外線に浴びてきたかを調べることは困

難だが、少なくとも現存する生物がどれだけ太陽光紫外線に曝されているかを測ることは可能であると考えられる。各種放射線の測定には、検出系の種類によって、物理的、化学的、生物的な方法がありうるが、環境中の太陽光紫外線の場合には、特に生物的方法（バイオドシメトリー）が、スペクトル強度の測定とともに必要かつ不可欠であることを述べたい。

1. 太陽光紫外線強度スペクトルと生物効果

地上の水平面で受ける日射には、約0.3-3 μmの入射スペクトル成分が含まれている。波長400 nm以下の紫外線は全天日射量の最短波長部であって、われわれの問

題とする突然変異誘発や細胞致死効果はすべてこれに起因する。このうち短波長側に急激に減衰していく 320 nm 以下の成分は UVB 領域といわれているが、この波長域で波長が短くなるにしたがって、DNA 損傷性の強さは急激に増加していく。ある特定の波長帯域で受光されたエネルギー量による紫外線量（例えば、UVB 量など）の表現は、生物効果の観点からはあまり意味がないこと、物理的測定として有用なのは、紫外線全域にわたる高い精度の絶対スペクトルであることがわかる。

一方、生物効果の測定系としては、いくつかの微生物の有用性が主張されてきたが、野外実験での便宜や、曝露量モニタリングで身に付けうることなどを考慮すると、乾燥した試料が実用的である。長期間の乾燥に耐える微生物としては、細菌胞子が代表である。筆者は、枯草菌胞子の紫外線高感受性突然変異株を分離し、胞子光生成物の修復機構を追究しているうちに、この突然変異株胞子が太陽光紫外線の生物効果線量測定にもっとも適しているのではないか、という考えが浮かび、胞子ドシメトリーの開発と応用に努力してきた（Munakata, 1981, 1989, 1993, 1995）。この二種類の太陽光紫外線量測定、すなわち強度スペクトルと胞子ドシメトリーがどのような関係を切り結んでいるのかが本稿の主題である。

フレオンによるオゾン層破壊の可能性が指摘された 1974 年（Molina and Rowland, 1974）に、R. Setlow によって、太陽光紫外線の生物効果の定式化がなされた（Setlow, 1974）。紫外線の波長全域について、太陽光紫外線スペクトル強度と生物効果の作用スペクトルとの積を求め、これを実効スペクトル（Effectiveness Spectrum）と呼ぶ。この実効スペクトルの積分が生物効果の理論的予測値となる。この前提是、問題にしている生物効果について、波長間の相互作用（synergism, antagonism, protection, adaptation etc.）が存在しないか、無視できることである。オゾン層の減少による皮膚発癌予測などのモデル計算は、ほとんどがこの定式にしたがって進められてきた。しかし、十分な精度の絶対線量に基づく強度スペクトルと作用スペクトルが得られなかったことから、実験的検証は不可能であった。

2. 太陽光紫外線スペクトル強度の測定

気象庁は、1990 年からブリュワー分光器による国内 4 箇所の気象台（札幌、筑波、鹿児島、那覇）での定期的なスペクトル強度の観測を開始した（Ito et al., 1991）。その後、1994 年からは南極での定常観測もおこなわれている。この観測は、毎日、日の出から日没まで、各正時に 290–325 nm の波長範囲を 0.5 nm 間隔で走査して、各波長における絶対強度の測定をおこなうもので、大量のきわめて貴重なデータが蓄積されている。内部光源での較正のほか、定期的に標準光源での補正をおこなってデータの信頼性を高めているほか、最近では米国、カナダの測定器との野外比較実験に参加したものを準備として、

Spectral Irradiance of Solar-UV Radiation

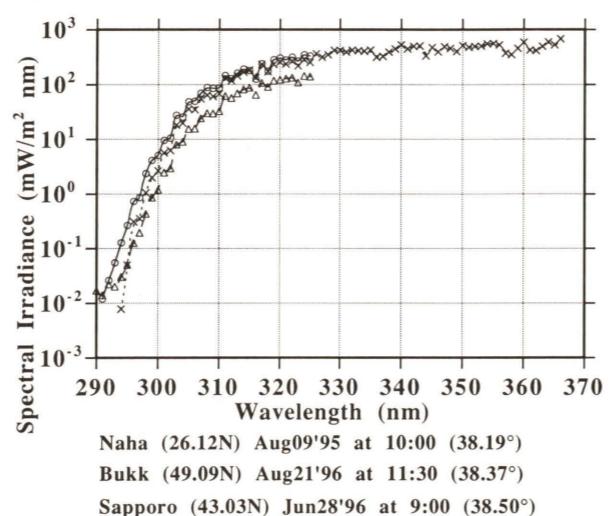


Fig. 1. Spectral irradiance of solar-UV radiation.

Data of Brewer spectrophotometers obtained at Naha (circle), Sapporo (triangle), and Bukk National Park in Hungary (×) at similar solar elevations as shown below.

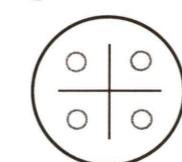
これを巡回させて測器ごとの偏差をなくす努力もなされている。しかし、生物効果を議論する見地からは、いくつかの問題点が残されている。一つは、長波長側の測定範囲で、325 nm までは生物効果を完全にカバーしきれない点である。もう一つは、短波長側の問題で、300 nm 以下において測定器内部での迷光の寄与が大きく、経験的な補正が必要になることである。

これらの欠陥を克服した新型のブリュワー分光器がでており、ヨーロッパ共同体の環境プロジェクトで活躍している。Fig. 1 に胞子ドシメトリーとの同時比較実験時にえられたブリュワー分光器による強度スペクトルを示す。那覇、札幌およびハンガリー北部のビュック国立公園（obtained by Dr. A. Bais, Aristotle University of Thessaloniki）においてほぼ天頂角が等しい時のデータをえらんだ。札幌が低めなのは曇天の為と考えられるが、大局的には似たようなスペクトルがえられていることがわかる。よくみるとかなり鋸歯状の凹凸のあるスペクトルであるが、日本とハンガリーでのプロファイルが似ていることは、このギザギザがグローバルな大気中の吸収物質を反映していることを示唆する。

3. 胞子ドシメトリーの致死効果作用スペクトル

胞子ドシメトリーの試料は、枯草菌紫外線高感受性株（TKJ6312）の精製した胞子をメンプランフィルター上に滴下して、乾燥させたものである。近年、大量の試料をとり扱う必要に迫られ、再懸濁のプロセスを簡便にするため、低融点アガロースを用い、メンプランフィルター上に薄いフィルム状にスポットする方法を開発した（Fig. 2）。この方法で作られた試料（スポット当たり約 10^6 個の胞子をふくむ）は、紫外線曝露後、試料部分を切

Sample and Badge of Spore Dosimetry



Four spots on a membrane filter
(d = 25 mm, pore size = 0.1 μm; Advantec A010A025A)
Each spot carries 10^6 spores of strain TKJ6312
in 0.4% SeaPlaque agarose and 0.4 mg/ml blue dextran.

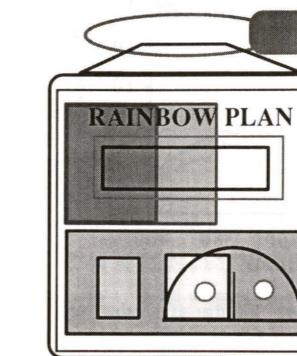
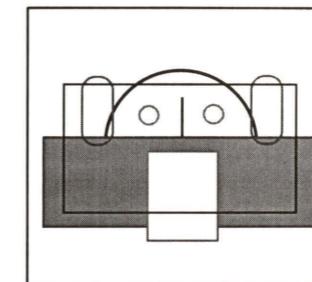


Fig. 2. Sample and badge of spore dosimetry. Upper left: four spots of spores on a membrane filter.

Lower left: a membrane filter carrying four spore spots fitted into a slide mount with a UV-coloring label. Lower right: a monitoring badge incorporating two spore spots and UV-coloring labels covered with filters and cardboard in a plastic case to be worn on an upper arm or on a bosom.

り取って小試験管にとり、1 ml の水を加えたのち、75 度、20 分の熱処理のみで水溶液中に完全に回収される。1 枚のフィルター上に 4 個の試料を滴下できるので、このうち 2 個を黒い紙で覆って、対照とする。フィルターは 35 ミリスライドにマウントされるので、スライド用のホルダーおよびケースが利用でき、照射、輸送、保存に便利である。試料は、光に当たない限り、1 年以上変化せず安定である。また曝露後も遮光すれば長期（少なくとも数カ月）にわたって保存可能である。もっとも重要な点は、この胞子の紫外線感受性が、どのような状況においても一定であり、その死がある絶対値を表現することである。紫外線量の基準となる物理的測定系が存在しないため、この絶対的な証明は困難であるが、すくなくとも過去十数年の経験から、これを否定する事実はえらばれていない。例えば、十年前に調製され、その後 4 度に保存されていた胞子と、新たに調製された胞子の紫外線感受性はまったく同一である。

照射後、それぞれの試料スポットを水に懸濁させて、その一部をカザミノ酸添加した最小寒天培地に撒く。37 度一晩培養後に集落数を数える。照射されたものと、対照の比から生残率がでるが、この生残率の自然対数の絶対値（標的理論のヒット数に当たる）を失活線量（Inactivation Dose=ID）と呼ぶ。この胞子の紫外線生残曲線は、対数的で肩は無く、ほとんどの場合縦軸と 1 で交わるので、生残率が 37% のとき ID=1.0 となる。すなわち、この ID 値が、絶対線量の尺度となる。このように、唯一の尺度で線量を表現できるところが、スペクトルと比べてバイオドシメトリーが有利な点の一つである。

さて、実効スペクトルをえるためには、この試料についての正確な作用スペクトルが必要である。基礎生物学研究所（岡崎市）大型スペクトログラフは、生物効果の作用スペクトルをえるためには、現在世界中でもっとも

Inactivation Action Spectra of *B. subtilis* Spores

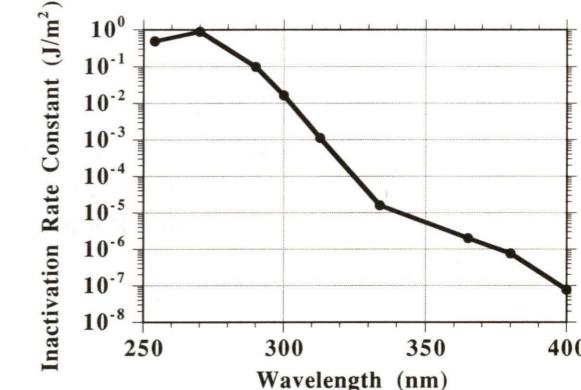


Fig. 3. Inactivation action spectra of *B. subtilis* spores. Samples of TKJ 6312 spores spotted on a membrane filter were used for the exposure to monochromatic radiations with Okazaki Large Spectrograph. From the survival curves, the inactivation rate constants are obtained.

強力で充実した施設である。この施設の数年度にわたる共同利用により、おそらく今までえられた生物効果の作用スペクトルとして、もっとも広範囲で詳細にわたるスペクトルをえることができた。254–400 nm の範囲の 9 波長において、それぞれ生残曲線を求め、対数回帰をおこなって、この失活定数（1 ヒット与える線量の逆数）をえた（Fig. 3）。270 nm のピークから、400 nm まで、実際に 7 衍におよぶ。すなわち、短波長域においては、シャッターを使って数分の一秒の照射であるが、長波長域では集光レンズを使って丸一日の照射でやっと測定可能な失活が見られる。特に問題となる 290–330 nm の領域は、10 nm 波長が短くなるごとに 1 衍ずつ致死効果が強まり、もっとも変動の大きい波長域である。

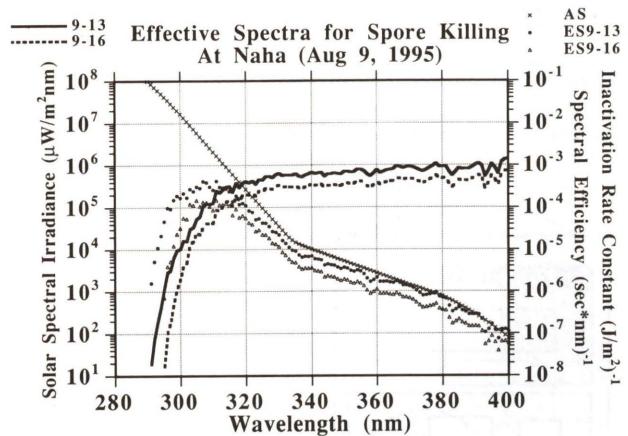


Fig. 4. Effective spectra for spore killing at Naha on August 9, 1995. Solar spectral irradiance at 13:00 (line) and 16:00 (dotted line), the inactivation action spectrum (X), and the effectiveness spectra at 13:00 (circle) and 16:00 (triangle).

4. 強度スペクトルと胞子ドシメトリーの同時測定

太陽光紫外線強度と胞子致死作用の二つのスペクトルを、絶対線量に依拠して求めることができたことから、上にのべた実効スペクトルを手にすることができる。この実効スペクトルを太陽光紫外線の全波長範囲について積分することによって、胞子致死効果の予測値を計算できる。強度スペクトルの測定と同時に胞子ドシメトリーを行うことによって、ついに、この予測値と実測値を比較することができる。

気象庁オゾン層解析室および高層気象台の協力をえて、1993年度より、数回にわたって、筑波高層気象台、沖縄気象台、および札幌気象台においてバイオドシメトリーとスペクトログラフィーの同時比較実験を実施することができた (Munakata *et al.*, 1996)。ブリュワー分光器による測定は正時を中心として前後数分かけて往復波長走査がおこなわれているので、これに合わせるために、正時を中心にして10-30分間づつ胞子試料への照射をおこなった。時間が一定でないのは、胞子ドシメトリーの感受性の範囲内に収める必要からで、30分かけても十分な失活がえられない場合(曇天時や、朝、夕の太陽高度が低い時など)は除外した。

国内ではもっとも強烈な太陽光紫外線のスペクトルとして、1995年夏に那覇でおこなわれた実験時(8月9日13時と16時)のスペクトルをFig. 4にしめす。スペクトル強度はFig. 1と同じく、1 nm幅での照射エネルギー量(W/m²)であるが、前述したように325 nmまでしかデータがとられていないので、それより長波長域については、New ZealandのMcKenzieらのデータ(Seckmeyer and McKenzie, 1992)によって参考スペクトルを作成して延長させた。胞子致死効果の作用スペクトルは、1ヒットを与える線量の逆数(m²/J)であるから、それぞれ1 nm幅毎にこの二つのスペクトルを掛け合わせると

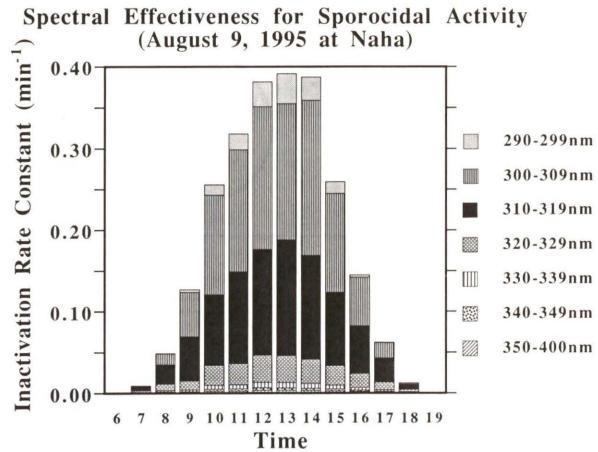


Fig. 5. Spectral effectiveness for sporocidal activity on August 9, 1995 at Naha. The effectiveness spectra are integrated for each 10-nm wavelength band.

実効スペクトル(1/s)となりこれは各波長幅での失活の速度(1ヒットを与える曝露時間の逆数)を表わすことがわかる。すなわち、実効スペクトルは、ある場所、ある時刻において、太陽光紫外線を構成するそれぞれの波長成分が、どれだけの生物効果を生じうるかという予測値である。

実効スペクトルは、ほぼSetlowの予想と一致して、310 nm付近にピークをもち、短波長側には急激に、長波長側にはやや緩やかに下がっていく。16時には、長波長側に向かってピークがつぶれていくことがわかる。この実効スペクトルを、10 nmの波長幅毎にスライスして積算すると各波長帯の致死効果への寄与を予測できる。これを、同じ日について示したのが、Fig. 5である。一見して、300-309 nmが最も大きな寄与を示し、310-319 nmがこれについておりこの二者でほぼ80%を占める。300 nm以下と320 nm以上はそれぞれほぼ10%づつ寄与している。朝早くと夕方遅くには、長波長成分の相対的な寄与が大きくなる。この図の棒の全長は、実効スペクトルの全波長域についての積分値であり、すなわち胞子致死効果の予測値である。この日の12, 13, 14時の実測値は、それぞれ、0.53, 0.70, 0.58(ID/min)であり、おおまかに一致しているが、予測値よりかなり大きい。この予測値と実測値の比較について国内3地点でえられたデータをまとめたのが、Fig. 6である。この図で、もし両者が完全に一致すれば、原点から45度の線上に乗るべきであり、実際のデータはかなりバラツキが大きいが、実測値がやや大きい傾向は共通している。この両者の比の平均値は、札幌、筑波、那覇でそれぞれ、1.25, 1.23, 1.41となつた。さらに1996年夏にハンガリーで行われたバイオドシメトリーの国際比較実験においても、この両者の比の平均値は、1.28であり、日本国内での結果と良く一致した。

これらの結果、両者の比がほぼ1であることは、スペクトル強度と作用スペクトルの依拠する絶対線量にそれ

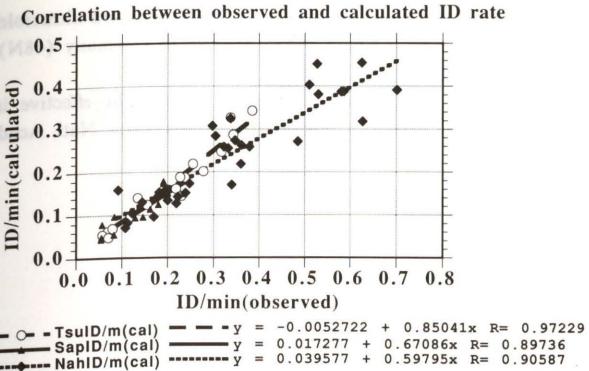


Fig. 6. Correlation between observed and calculated ID rate.

The results of side-by-side comparisons between Brewer spectroscopy and spore dosimetry performed at Tsukuba (circle), Sapporo (triangle), and Naha (diamond) observatories.

5. 胞子ドシメトリーの応用と今後の展望

分光スペクトルと胞子ドシメトリーは、実効スペクトルの概念を通じて相互に関連づけられ、定量的にも良く一致することを述べた。この二つのドシメトリーは、多くの状況において補いあうものである。胞子ドシメトリーは、太陽光紫外線のDNA損傷作用を良く反映するが、いわば裸のDNAに対する効果をみている。ヒト皮膚の紅斑形成などの場合は、皮膚の表層による吸収のために、実際に効果をもたらす波長は長波長側にずれる。さらにヒト皮膚発癌の場合にどのような波長が効果的であるかは正確にはわからない。このような効果の解析と予測には、分光スペクトルが必要である。

一方、胞子ドシメトリーは、極めて簡便であるので、ヒトの曝露量のモニタリングなどへの応用が可能である。筆者らは、胞子ドシメトリーを組み込んだバッジを作成し、札幌から那覇までの5地点での学童の紫外線曝露量のモニタリングを行い、さらに各種職業人の調査を進行中である。

オゾン層破壊は、人類が20世紀に犯した多くの愚行、蛮行、無知のうちでも特筆されるべきものであり、21世紀に持ち越されるこの難題に取り組むため、環境生物研究の果たすべき役割は大きい。

謝 辞

国内での比較実験は文部省科学研究費総合A(07308043)、およびハンガリーでの比較実験はヨーロッパ共同体環境プロジェクト(BIODOS ENV4-CT95-0044)の援助をうけた。班員および気象台の方々のご助力に感謝します。

参考文献

- Ito, T., T. Ueno, R. Kajihara, M. Shitamichi, T. Uekubo, M. Ito and M. Kobayashi (1991) Development of monitoring techniques of ultraviolet irradiance on the ground, *J. Meteorol. Res.*, **43**, 213-273.
- Molina, M. J. and F. S. Rowland (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone, *Nature*, **249**, 810-812.
- Munakata, N. (1981) Killing and mutagenic action of sunlight upon *Bacillus subtilis* spores: a dosimetric system, *Mutat. Res.*, **82**, 263-268.
- Munakata, N. (1989) Genotoxic action of sunlight upon *Bacillus subtilis* spores: monitoring studies at Tokyo, Japan, *J. Radiat. Res.*, **30**, 338-351.
- Munakata, N. (1993) Biologically effective dose of solar ultraviolet radiation estimated by spore dosimetry in Tokyo since 1980, *Photochem. Photobiol.*, **58**, 386-392.

Fig. 7にしめすのは、これらの比較実験でえられた、

Munakata, N. (1995) Continual increase in biologically effective dose of solar UV radiation determined by spore dosimetry from 1980 to 1993 in Tokyo, *J. Photochem. Photobiol. B*, **31**, 63–68.

Munakata, N., F. Morohoshi, K. Hieda, K. Suzuki, Y. Furusawa, H. Shimura and T. Ito (1996) Experimental correspondence between spore dosimetry and spectral photometry of solar ultraviolet radiation, *Photochem. Photobiol.*, **63**, 74–78.

Seckmeyer, G. and R. L. McKenzie (1992) Increased ultraviolet radiation in New Zealand (45S) relative to Germany (48N), *Nature*, **359**, 135–137.

Setlow, R. B. (1974) The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3363–3366.

Environ. Mutagen Res., **19**: 49–53 (1997)

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「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」(S1-4)

磁場の変異原性・癌原性

Mutagenicity and carcinogenicity of magnetic field

鈴木勇司, 清水英佑

Yuji Suzuki and Hidesuke Shimizu

東京慈恵会医科大学環境保健医学教室 105 港区西新橋 3-25-8

Department of Public Health and Environmental Medicine, The Jikei University School of Medicine, 3-25-8
Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

(受理: 1997年3月24日)

Summary

Several epidemiological studies support a weak to moderate association between exposure to magnetic fields in residential or occupational environments and the incidence of cancer. Recently, public concern about magnetic fields has been increasing, but it is impossible to imagine life today without electricity. We reviewed some studies on the mutagenic and carcinogenic effects of magnetic fields. The studies can be summarized as follows:

- 1) It is possible to estimate the mutagenic activity of magnetic fields by using some short-term assays such as the Ames test, the micronucleus test, etc.
- 2) No studies clearly demonstrated the mutagenic activity of magnetic fields. Some reports showed positive effects, but others, negative.
- 3) Several reports showed that magnetic fields modified the mutagenic activity of the chemicals themselves.
- 4) The reported evidence did not demonstrate that magnetic fields act as a cancer initiator. However, they might act as a promotor or in tumor progression.

Further laboratory experiments and epidemiological studies are needed to assess the mutagenicity and cancer risk from magnetic fields.

Keywords: magnetic fields, mutagenicity, carcinogenicity

緒 言

磁場の生体影響を論じる場合には、磁場の種類を考慮する必要がある。一つは、静磁場、定常磁場または直流磁場と呼ばれるもので、NMR, ESR, リニアモーターカーなど超伝導磁石、直流発電器から発生する。もう一つは、電磁場、変動磁場または交流磁場とよばれるもので、発電器、高圧送電線、家庭用電気製品から発生する。

疫学調査によれば、静磁場のヒトへの影響を Table 1 (WHO, 1987; 清水, 1992) に、電磁場のヒトへの影響を Table 2 (Wertheimer and Leeper, 1979; WHO, 1987; 清水, 1992; Verkasalo *et al.*, 1996) に示した。これらの報告によると、電磁場曝露作業者（アルミニウムプラント従事者、電気設備組立工、電信・ラジオ・レーダー従事者、電線・電話線保線夫、水力発電従事者）に白血病、悪性

黒色腫、アストロサイトーマが有意に発生することが疑われている。また、高電流送電用低圧線や変電所近くの居住者にも白血病罹患率が高いという報告もある。一方、直流磁場の発癌に関する報告として、アルミニウム工場で白血病の発症率が高いという。

最近リニアモーターカーや医療用のMRIの開発にともない、ヒトが高静磁場に曝露する機会が増加している。一般家庭や職場においてもテレビ、パソコンコンピューター、自動車など電磁場を発生する機器が増加している。このような状況で、磁場の染色体に与える影響を検討することは重要であると考えられる。そこで磁場が遺伝子や染色体に異常を誘起したこと検出するため、変異原性試験はどこまで有効か、さらに発癌性への関与について考えてみたい。

Table 1. Studies of workers exposed to static magnetic fields

Work environments	Intensity of magnetic fields	Reported effects	Reference
Workers in magnet production	2~5 mT (hands) 0.3~0.5 mT (chest and head)	Subjective and minor physiological effects (645 exposure - 138 control)	Vyalov (1974)
Contact welders	0.1~0.2-s pulsed magnetic fields of 25~125 mT, 8 h/day	Increased nervous system, cardiac, and blood disorders (211 exposure - 113 control)	Abramovich-Poliakov et al. (1979)
Workers in aluminium plants	No fields reported	Increase risk of leukemia (death records of 438,000 males, but few cases)	Milham (1979, 1982, 1985)
Industries using electrolytic cells	Average, 7.6 mT Maximum 14.6 mT	Minor haematological alterations, but no major health effects (320 exposure - 186 control)	Marsh (1987)
Workers in aluminium plant	No fields reported	Small excess of leukemia mortality; non-significant risk of other cancer	Rockette et al. (1983)
High energy accelerator laboratory	Fields up to 2 T	No increased prevalence of 19 common diseases including cancer (792 exposure - 792 control)	Budinger et al. (1984)
Electrolytic production of chlorine	Fields 4-29 mT	No increased incidence of cancer over 25-year period	Barregars et al. (1985)

WHO (1987), Shimizu (1992).

Table 2. Cancer incidence and occupational exposure to power frequency electromagnetic fields.

Subject	Cancer risk	References
Telecommunication workers	No cancer risk	Wiklund (1981)
Electrical occupations	Increased leukemia	Milham (1982, 1985)
"	"	Wright et al. (1982)
"	"	McDowell (1983)
"	"	Coleman et al. (1983)
"	No leukemia risk	Vogerö & Olim (1983)
"	Increased eye melanoma	Swerdlow (1983)
"	Increased leukemia	Pearce et al. (1985)
"	Increased brain tumors	Lin et al. (1985)
"	Increased leukemia	Milham (1985)
"	"	Gilman et al. (1985)
"	"	Vagerö et al. (1985)
Amateur radio operators	No leukemia risk; increased urinary cancer; increased malignant melanoma	Calle & Savitz (1985)
Males in underground mines	No leukemia risk	Olin et al. (1985)
Electrical occupations	Increased malignant melanoma	Stern et al. (1986)
"	Increased leukemia	Tornqvist et al. (1986)
"	No leukemia risk; no brain tumor risk	Mack et al. (1991)
Electrician and welders	Increased astrocytoma	Wertheimer & Leeper (1979)
Electric power industry	Increased leukemia; increased lymphoma	Verkasalo et al. (1996)
Electrical occupation	No cancer risk	
Persons living near high voltage line		
"		

WHO (1987), Shimizu (1992).

1. 我々の研究室で得られた結果

磁場の変異原性作用を変異原性試験で評価するため、我々の研究室で得られた変異原性試験の結果の一部を紹介する。実験に用いた磁場は、すべて静磁場である。

1). Ames test の結果

サルモネラ菌株 TA98 および TA100 に 0.15 T (テスラ, 1T=10,000 ガウス) から 11.75 T の磁場を曝露した

が、磁場そのものに変異原性は認められなかった (廣田ら, 1987; 清水ら, 1988)。

次に、変異原物質と磁場曝露を併用した時に変異原物質単独で示す変異原性の強さに磁場が与える影響を検討した。

5-Nitroacenaphthene (5NA) を用いた場合、TA98 菌株では 5NA 単独曝露時と比べて 5NA と磁場を複合曝露

Table 3. Types of genotoxicity experiments, by exposure category.

Assay type	ELF electric	ELF magnetic	Static electric	Static magnetic
Microbial system	0	4	2	6
Plants	0	1	0	2
Drosophila	1	3	3	7
In vitro chromosome	6	12	0	7
In vivo chromosome	6	3	4	1
In vitro DNA repair	3	3	0	0
In vivo DNA repair	0	1	0	0
Dominant lethal assay	2	2	0	0
Total	18	29	9	23

ELF: extremely low frequency.

McCann (1993) に追加。

した場合のコロニー数の比が高かった。磁場強度を上げると変異原性が強くなる傾向も認められた (清水ら, 1988)。

7,12-Dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) については、TA98 菌株で磁場曝露により変異原性は抑制された (関ら, 1989)。

2). CHL 細胞を用いた in vitro 小核試験の結果

CHL 細胞に 4.7 から 11.75 T の磁場を曝露したが、磁場単独曝露では小核の誘発は認められなかった。

次に、変異原物質の変異原性の強さに磁場が与える影響を検討した。

1-Ethyl-1-nitrosourea (ENU), 1-methyl-1-nitrosourea (MNU), 1-butyl-1-nitrosourea (BNU), 3-methylcholanthrene (MC), urethane, DMBA は、動物に白血病を誘発することが知られている。ENU, BNU, MC, urethane は、磁場を複合曝露 (11.75 T) してもそれぞれの化学物質単独曝露時と比較して、小核誘発頻度は変わらなかった。MNU は、磁場との複合曝露により、MNU 単独曝露時より小核誘発頻度が上昇した。また DMBA は、磁場を複合曝露することにより小核誘発頻度は抑制された (清水ら, 1990)。

3). In vivo 小核試験

BALB/c マウスに 4.7 T の磁場を 6 時間から 3 日間曝露したところ、曝露 1 日以降は、磁場単独曝露で有意 ($P < 0.05$) に小核が誘発された (鈴木ら, 1992)。

次に、変異原物質の変異原性の強さに磁場が与える影響を検討した。

アルミニウムプラントの精鍛過程で電磁場が発生していると共にフッ素化合物が副産物としてできる。最近、磁場やフッ素の発癌性および変異原性が論議されていることから、sodium fluoride (NaF) と静磁場を複合曝露したときの小核誘発頻度への影響を検討した。NaF 自身にも弱いながら小核が誘発されたが、さらに磁場を曝露すると、小核誘発頻度が高くなかった (鈴木ら, 1992)。動物

に白血病を引き起こすことが知られている 1-diethyl-1-nitrosourea は、磁場曝露によりその小核誘発頻度が高くなった (鈴木ら, 1992)。また、DMBA は、磁場曝露により、DMBA 自身の小核誘発は抑制された (鈴木ら, 1992, 1993)。

我々の実験から、in vitro の実験系では磁場の変異原性は認められなかったが、in vivo 小核試験では磁場単独曝露により変異原性が認められた。また磁場と変異原物質を複合曝露すると変異原性修飾作用があることが in vitro および in vivo の実験で明らかとなった。今後は、得られた結果のメカニズムを解明していくことが重要であると考えている。

2. 磁場と変異原性に関する文献レビュー

1997 年 1 月までの文献検索により磁場の変異原性について調べたところ、全数で 80 件ほどで、試験系も in vitro から in vivo まで多種多様であった (Table 3) (鈴木ら, 1992; McCann et al., 1993; Zwingelberg et al., 1993; Nordersson et al., 1994; Kowalcuk et al., 1995; Koana et al., 1995; Ikehata et al., 1995; Okonogi et al., 1996; Morandi et al., 1996)。実験には電磁場や静磁場を用いたものまで様々あり、磁場強度も μ T から T までかなりの幅で報告がなされていた。

Table 4 に電磁場および静磁場の変異原性試験結果を示したが、陽性結果を得たものと陰性結果を得たものがそれぞれ半数ずつに分かれている。これは実験設備 (発熱を考慮した培養装置を作製しなければならず、通常の変異原性試験プロトコールに準じて実験を行えないなどの制約がある) や実験条件 (磁場強度、曝露時の温度、曝露時間、対照群の設定方法など) が報告者により異なる) の差異によるところが大きいと考えられる。

磁場の種類別に各種変異原性試験で得られた結果を Table 5 にまとめた。細菌を用いた変異原性試験、培養細胞による染色体異常試験などの in vitro 試験では、磁場

Table 4. Experiments reported by authors as positive or negative, by exposure category.

	Reported positive	Reported negative
ELF electric	7	11
ELF magnetic	8	22
Static electric	6	3
Static magnetic	8	15

ELF: extremely low frequency.

McCann (1993) に追加.

Table 5. Distribution of test results.

	ELF electric	ELF magnetic	Static electric	Static magnetic
Microbial	NA	—	?	?
Drosophila SLRL	?	?	?	?
In vitro chromosome	?	—	NA	—
In vitro repair	—	—	NA	NA
In vivo chromosome	?	?	?	?

ELF: extremely low frequency.

NA: No genotoxicity testresults were identified.

?: Test results were mixed.

—: Test results were negative.

McCann (1993) に追加.

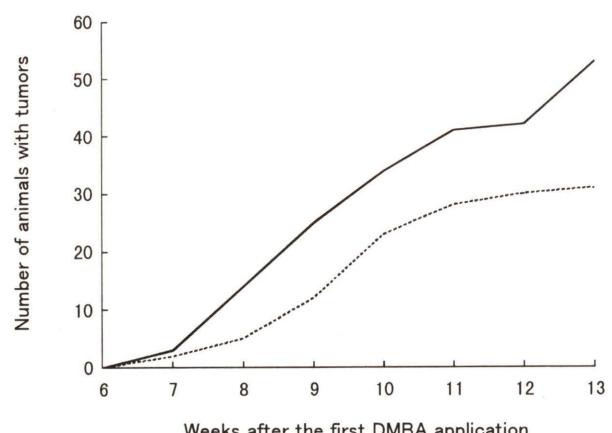


Fig. 1. Number of rats with tumors as a function of time after first 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) application. Per group, 99 animals were used.

自身の変異原性が陰性となる場合が多いが、ショウジョウバエを用いた試験系、*in vivo* 染色体異常試験などの*in vivo* 試験では陰性と陽性の両方の結果がある。現在得られている知見からは、磁場自身に変異原性があるかどうかの結論を得ることは難しい。今後の研究成果が待たれる。

我々は、日常および労働環境で種々の物質や要因に曝露している。例えば、医薬品、農薬、食品添加物、化粧品、工業化学物質、喫煙、大気汚染、水質汚染、加熱調理品、紫外線、磁場などである。これらの中には、ヒトに発癌させる物質も存在することが知られている。一般に、職業性曝露や医薬品の摂取などを除けば、ヒトへ

の曝露は個々の物質についてみると微量であることが多い。それにもかかわらず、大気汚染や喫煙と肺癌の発生との因果関係が疫学調査により証明されていることは、発癌物質への曝露とそれ以外の種々の要因が絡み合って初めて発癌に至るものと考えられる。そこで、磁場と変異原物質の複合曝露時の変異原性の強さへの影響も検討し、磁場の変異原性修飾作用を明らかにしていくことも今後の課題となる。

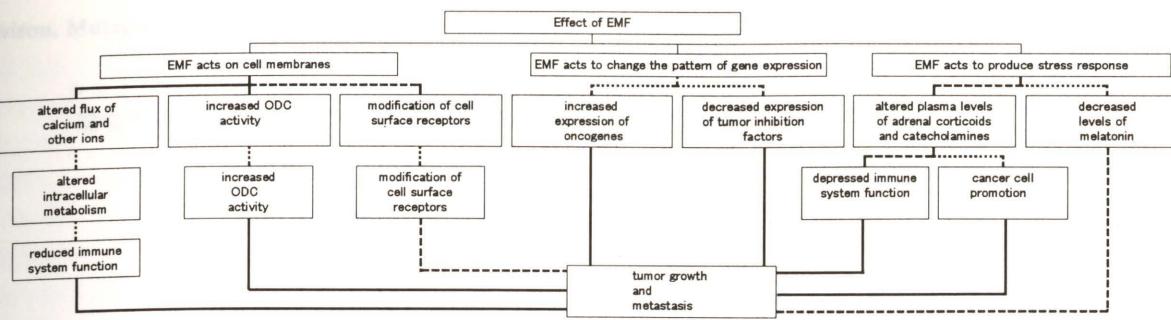
3. 磁場の発癌修飾作用について

発癌物質を投与してさらに磁場を曝露したとき、腫瘍発生数が多くなるかどうかを調べた実験を紹介する (Löschner *et al.*, 1993)。DMBA を 5 mg/kg 投与したラットに 50 Hz, 100 μT の電磁場を曝露したときの腫瘍発生数を示した。電磁場を曝露した群の方が明らかに発生数が多い (Fig. 1)。

現在考えられている超低周波電磁場の発癌メカニズムを示す (Fig. 2) (Goldberg and Creasy, 1991)。DMBA に電磁場を曝露した場合には、電磁場は主にプロモーターの役割を演じていると考えられている (清水ら, 1995)。

4. アメリカ科学アカデミーによる磁場の発癌性に関する見解

1996年10月にアメリカ科学アカデミーは、17年間の疫学調査として、電磁場が癌など健康障害に結びつく因果関係は確認できなかったことを報告した。この報告に対して、もっと慎重に結論をだすべきであるという意見



; Relatively strong experimental evidence at least in a limited number of experimental cases.

; Some experimental evidence: relevance to human physiology may be questioned.

; Weak experimental evidence, lack of experimental information, or contradictory results.

(Goldberg & Creasy, 1991)

Fig. 2. Three hypothetical mechanisms to explanation an association between extremely low frequency (ELF) electromagnetic fields (EMF) exposure and increased cancer incidence. The strength of experimental evidence supporting the links between each step is the thickness of the connecting lines.

が示されている。我が国においても、国家の支援の基に磁場の生体影響に関する研究が開始されている。

5. 要 約

1) 磁場自身の変異原性を、Ames test や小核試験などの変異原性試験法で明らかにすることができる可能性がある。

2) これまでの報告からは、磁場自身の変異原性の有無を評価するためには、さらに検討を要する。

3) 磁場は、変異原性物質の変異原性の強さに影響を与えることが示唆された。

4) 磁場が発癌に関係があるという疫学報告があるが、その因果関係は、未だ明らかでない。

参考文献

- Goldberg, R. B. and W. A. Creasy (1991) A review of cancer induction by extremely low frequency electromagnetic fields, *Med. Hypotheses*, **35**, 265-247.
- 廣田秀美、鈴木勇司、清水英佑 (1987) 磁場の変異原性に与える影響、環境変異原研究、**9**, 113.
- Ikehata, M., T. Koana and M. Nakagawa (1995) Detection of the effect of extremely low frequency magnetic field on mutagenicity of chemicals using bacterial mutation assay, 17th Annual Meeting of Bioelectromagnetics Society, Boston, p. 101
- Koana, K., M. Ikehata, and M. Nakagawa (1995) Estimation of genetic effects of static magnetic field by somatic cell test using mutagen sensitive mutants of *Drosophila melanogaster*, *Biochem. Bioenerg.*, **36**, 95-100.
- Kowalcuk, C. I., L. Robbins, J. M. Thomas and R. D. Saunders (1995) Dominant lethal studies in male mice after exposure to a 50 Hz magnetic field, *Mutat. Res.*, **328**, 229-237.
- Löschner, W., M. Mevissen, W. Lehmlacher and Stanmm A. (1993) Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field, *Cancer Lett.*, **71**, 75-81.
- McCann, J., F. Dietrich, C. Rafferty and A. O. Martin (1993) A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields, *Mutat. Res.*, **297**, 61-95.
- Morandi, M.A., M. C. Pak, R. P. Caren and L. D. Caren LD. (1996) Lack of an EMF-induced genotoxic effect in the Ames assay, *Life Sci.*, **59**, 263-271.
- Nordersson, G., K. H. Mild, G. Andersson and M. Sandstrom (1994) Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermittent exposure to fifty hertz magnetic fields, *Bioelectromagnetics*, **15**, 293-301.
- Okonogi, H., M. Nakagawa and Y. Tsuji (1996) The effects of a 4.7 tesla static magnetic field on the frequency of micronucleated cells induced by mitomycin C, *Tohoku J. Exp. Med.*, **180**, 209-215, 1996.
- 清水英佑、鴨山雅子、鈴木勇司、林 和夫 (1988) 磁場の変異原性に与える影響 (第2報), 環境変異原研究, **10**, 68.
- 清水英佑、鈴木勇司、閔 良子、李 傑 (1990) 高磁場の白血病誘発物質に及ぼす影響, 環境変異原研究, **12**, 199.
- 清水英佑 (1992) 磁場の生物学的効果と生体影響, 産業医学レビュー, **4**, 1-8.
- 清水英佑、鈴木勇司、小此木英男 (1995) 磁場への曝露と生体影響, 日衛誌, **50**, 919-931.
- 鈴木勇司、福本正勝、小此木英男、清水恵一郎、清水英佑 (1992) 高磁場の染色体誘発能、マウス小核試験による白血病誘発物質の検討, 産業医学, **34**, 796.
- 鈴木勇司、清水英佑、小此木英男、福本正勝、清水恵一郎 (1993) 高磁場の染色体異常誘発能 (3) マウス全身曝露による検討, 産業医学, **35**, 376.
- 閔 良子、鈴木勇司、李 傑、林 和夫、清水英佑 (1989) 磁場の変異原性に与える影響 (第4報) サルモネラ菌による場合, 環境変異原研究, **11**, 153.
- Verkasalo, P. K., E. Pukkala, J. Kaprio, K. W. Heikkila and M. Koskenvuo (1996) Magnetic fields of high voltage power line and risk of cancer in Finnish adults-nationwide cohort study, *Brit. Med. J.*, **313**, 1047-1051.
- Wertheimer, N. and E. Leeper (1979) Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Amer. J. Epidemiol.*, **109**, 273-284.
- WHO (1987) Magnetic fields, *Environmental Health Criteria* 69. WHO, Geneva.
- Zwingelberg, R., G. Obe, M. Rosenthal, M. Mevissen, S. Buntenkotter and W. Loscher (1993) Exposure of rat to a 50-Hz, 30 mT magnetic field influences neither the frequencies of sisterchromatid exchanges nor proliferation characteristics of cultured peripheral lymphocytes, *Mutat. Res.*, **302**, 39-44.

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「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」(S1-5)

農薬、医薬品の変異・がん原性

Mutagenicity and carcinogenicity of agricultural and medicinal chemicals

荒木明宏

Akihiro Araki

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

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

(受理 1997年2月3日)

Summary

Only half of the potential human carcinogens in medicinal and agricultural chemicals (IARC group 1, 2A, 2B) were detected as mutagens when using the microbial mutagenicity test. For detect well known medicinal and agricultural chemicals in the environment, chemical analysis methods such as GC/MS are more sensitive than the mutagenicity test. However, the microbial mutagenicity test is useful for the detection and identification of the unknown mutagens in the environment, and also for quantitative monitoring of the total mutagenic burden of environmental pollution. It is essential when monitoring environmental pollution using microbial mutagenicity test that consideration be given to test procedures such as metabolic activation, treating method (plate, preincubation or gas exposure), tester strains, and inter- and intra-variation of test data.

The detectability of carcinogenic chemicals using microbial mutagenicity tests are demonstrated and then the availability of mutagenicity testing for the monitoring of agricultural and medicinal chemicals as environmental pollution is discussed.

Keywords: *Salmonella* mutagenicity test, monitoring, medicinal chemical, agricultural chemical, test method

緒 言

環境中の変異原性物質を検索するのに変異原性試験は有効な方法として用いられ、加熱食品中からヘテロサイクリックアミン (Sugimura, 1986; Wakabayashi *et al.*, 1992) 大気中から芳香族ニトロ化合物など (Tokiwa and Ohnishi, 1986) 多くの変異原性物質が分離同定されている。また変異原性試験は大気 (Tokiwa *et al.*, 1983) や河川水 (Sakamoto and Hayatsu, 1990) の環境汚染物質をモニタリングする方法として用いられている。ここでは、癌原性のある農薬や医薬品による環境汚染をモニタリングするのに変異原性試験が手法として有効であるかを、現在モニタリングに汎用されている微生物を用いる復帰

突然変異原性試験を例に試験実施上の問題点から考えてみたい。

1. 農薬や医薬品の癌原性と変異原性試験

癌原性のある農薬、医薬品のうちどれくらいの数の物質を変異原性試験でモニタリングできるのだろうか。International Agency for Research on Cancer (IARC) で癌原性と変異原性が評価された化学物質 (IARC, 1987, 1989-1994) のうち農薬としての使用記述のある 39 物質 (グループ 1; 2 物質, 2A; 8 物質, 2B; 29 物質) と、医薬品として使用記述のある 102 物質 (グループ 1; 37 物質, 2A; 15 物質, 2B; 50 物質) のほ乳動物を用いる骨髓小核

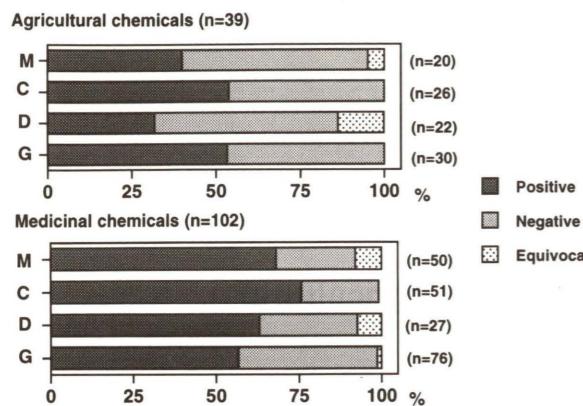


Fig. 1. Proportion of positive, negative and equivocal results of various mutagenicity test in IARC evaluated group 1, 2A and 2B chemicals.

Thirty nine agricultural and 102 medicinal chemicals were classified with the test results of *in vivo* micronucleus test (M), *in vitro* chromosomal aberration test (C), DNA repair test (D) and reverse mutagenicity test in bacteria (G).

試験 (M), 培養細胞を用いる染色体異常試験 (C), 微生物を用いるDNA損傷性試験 (D) と突然変異原性試験 (G) の結果をそれぞれ比較した (Fig. 1)。農薬におけるそれぞれの試験系での陽性率は M で 20 物質のうち 8 物質で 40%, C で 26 物質のうち 14 物質で 54%, D で 22 物質のうち 7 物質で 32%, G で 30 物質のうち 16 物質で 53% であった。医薬品におけるそれぞれの試験系での陽性率は M で 68%, C で 77%, D で 63%, G で 57% であった。農薬として区分された化学物質においては、染色体異常試験と突然変異原性試験が比較的検出率が良く、ほ乳動物を用いる骨髄小核試験と DNA 損傷性試験はあまり良くなかった。医薬品として区分された化学物質においては、染色体異常試験が最も検出率が良く、ほ乳動物を用いる骨髄小核試験、DNA 損傷性試験、突然変異原性試験の順であった。微生物を用いる突然変異原性試験は、医薬品では、核酸の誘導体、ホルモン剤、抗腫瘍剤に対して感受性が悪く、農薬では、ハロゲン化芳香族化合物に対して感受性が悪い。この様に試験系によって検出しにくい化学構造グループが知られている (Zeiger, 1987; Ashby *et al.*, 1991)。ほ乳動物を用いる骨髄小核試験では農薬、医薬品で検出率に大きな差が認められたが微生物を用いる突然変異原性試験は農薬、医薬品で差がなくほぼ 50% の検出率であった。医薬品と農薬での検出率の差は、農薬、医薬品のグループにどの様な化学構造の物質が多く分類されたかに依存している。いずれにしても変異原性試験を癌原性のある農薬や医薬品のモニタリングに用いる場合は、限られた農薬や医薬品にしか適用することができない。

2. 変異原性試験の定量下限濃度

医療現場において抗腫瘍剤を取り扱う薬剤師、看護婦等の医療従事者への曝露が化学分析や変異原性試験によ

り明らかとされた。抗腫瘍剤による作業環境空気の汚染 (Kleinberg and Quinn, 1981; Neal *et al.*, 1983), 作業従事者の尿からの抗腫瘍剤の検出 (Falk *et al.*, 1979; Anderson *et al.*, 1982), 作業従事者のリンパ細胞の変異 (Norppa *et al.*, 1980; Waksvik *et al.*, 1981) が明らかとされ、医療従事者への曝露を防止するために抗腫瘍剤の取り扱いガイドラインが制定された (OSHA, 1986)。これは、変異原性試験を用いた作業環境のモニタリングと作業者に実施されたバイオモニタリングの成果としてとらえることができるが、変異原性物質を扱っているながら事前に作業手順と保護具の着用等、適切な取り扱い基準を定めていなかったために変異原性試験でバイオモニタリングできるほど作業者に対して高濃度の曝露が生じてしまったという教訓でもある。ガイドライン制定後の cyclophosphamide 取り扱い医療現場の化学分析を用いた環境調査 (Sessink *et al.*, 1994) によると、調剤室の気中濃度は定点測定で約 0.003–0.03 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、個人サンプラーによる作業者口元の気中濃度は約 0.04–0.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、作業手袋の汚染は約 0.08–9.6 $\mu\text{g}/\text{手袋}$ 、作業者の尿中量は 0.2–19.4 $\mu\text{g}/\text{日}$ であったと報告している。Cyclophosphamide の変異原性試験での検出下限濃度を論文の上から推定すると、*S. typhimurium* TA100 (+S9) 突然変異試験での検出下限濃度は 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (Nagao and Takahashi, 1981), L5178 Y (+S9) 突然変異試験での検出下限濃度は 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Myhr and Caspary, 1988), CHO (+S9) 染色体異常試験での検出下限濃度は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Allen *et al.*, 1983) となる。GC/MS による機器分析は定量限界が 0.1–0.5 μg (Sessink *et al.*, 1993) と報告されているので、変異原性試験の検出感度を GC/MS による機器分析と比較すると、微生物を用いる場合 1000 倍以上、染色体異常試験を用いる場合 100 倍以上、L5178Y 突然変異試験を用いる場合で 2 倍以上感度が悪い。前述した cyclophosphamide による低濃度の汚染を微生物変異原性試験でモニタリングする為には、調剤室の場合 10000 m^3 以上、個人サンプラーの場合 1000 m^3 以上の空気を捕集する必要があり、実際のサンプリングは不可能である。この様に生活環境に比べて比較的高濃度の汚染が生ずると考えられる作業環境でも変異原性試験の定量限界を考慮するとサンプリング方法と濃縮方法が問題となる。変異原性試験は GC/MS 分析のように特定の物質だけを定量することができず、機器分析の手法が確立している癌原性のある農薬や医薬品のモニタリングには、変異原性試験よりも機器分析のほうが一般的に優れている。

3. 変異原性試験の役割

変異原性試験は農薬、医薬品のうち限られた物質しかモニタリングできず、物質の定量感度は機器分析のほうが変異原性試験よりも優れている事を述べた。では、変異原性試験は環境モニタリングを含めた化学物質の管理にどのように位置付けられ、どの様に用いられているの

だろうか。

化学物質のヒトへの健康障害を防止する管理手順として (1) 変異原性試験を実施する事により変異原性物質を特定する (農薬、医薬品は安全性評価の為の一連の試験の一部として変異原性試験、発癌性試験により変異原性、発癌性が特定されている)、(2) 変異原性、癌原性のある化学物質は製造、使用、廃棄方法を管理し、環境中に放出される量を制限する、(3) 大気、水、土壤中の残留量を化学分析により定量的にモニタリングし変異原性、癌原性のある化学物質の製造、使用、廃棄方法の管理手法が適切に機能しているかを確認する、(4) バイオモニタリングをヒトで行い、変異原性のある化学物質の保護具の有効性を含めた取り扱い方法が適切であるかを確認するといった手順が考えられる (変異原性試験によるヒトでのバイオモニタリングについてはここで述べない)。この手順において変異原性試験は多くの化学物質の中から遺伝子損傷性物質をスクリーニングするという重要な役割を担っている。前項でのべた cyclophosphamide での問題解決手法をこの手順にかさねあわせると、抗腫瘍剤の取り扱いガイドラインは (2) に、化学分析による環境測定は (3) に、バイオモニタリングは (4) に相当する。これらの管理手順の一部は法令化された農薬、医薬品の規制事項となっている。これは、癌原性のある農薬、医薬品を高濃度で生活環境中に放出しないという基本概念である。

これとは別に、生活環境と密接に関連する大気、河川水に工場等からどの様な変異原物質がどのくらい放出されているかを変異原性試験を用いて第三者的に検証しヒトへの健康障害を防止する管理手順として (1) 変異原性試験により大気、水、土壤中の変異原性物質を経時的に定量的に検出する、(2) 機器分析との併用により変異原物質を分離同定する、(3) 汚染源を特定する、(4) 汚染を引き起こした物質の製造、使用、廃棄方法を制限する、もしくは見直しをするといった手順が考えられる。この手順において変異原性試験は大気、水、土壤中の変異原性物質の経時的、定量的な検出と分離同定における分離物質のスクリーニングという重要な役割を担っている。変異原性試験の結果から河川水、土壤、大気を汚染している変異原物質の総量を規制し管理する方法は現在のところ我が国では法令化されていない。

環境モニタリングを含めた化学物質の管理で (1) 変異原性の有無の確認と (2) 大気、水、土壤中の変異原物質の経時的、定量的な検出が重要である事を述べた。では微生物変異原性試験を用いて環境モニタリングを含めた化学物質の管理を実施するのに、どの様な問題点があるのだろうか。

4. 変異原性試験を実施する上の問題点

4-1) 代謝活性化

解熱沈痛剤である phenacetin の変異原性はラットの

肝 S9 を用いる代謝活性化法では検出できないが、ハムスターの肝 S9 を用いる事により検出できる事が報告されている (Nohmi *et al.*, 1983)。Phenacetin の変異原性をラットの肝 S9 とハムスターの肝 S9 を用いて調べた結果を示した (Fig. 2)。ハムスターの肝 S9 はニトロソアミン等の変異原性を検出するのにラットの肝 S9 よりも優れている事が知られ (Prival and Michell, 1981; Araki *et al.*, 1984), National Toxicology Program (NTP) における微生物変異原性試験は代謝活性化にラットの肝 S9 とハムスターの肝 S9 を用いて実施されている (Haworth *et al.*, 1983; Mortelmans *et al.*, 1986; Zeiger *et al.*, 1987, 1988, 1992)。NTP で試験された 1386 物質のうち 467 物質が陽性であり、247 物質が代謝活性化を必要とする変異原性物質であった。この代謝活性化で陽性を示した物質についてラットの肝 S9 とハムスターの肝 S9 の結果を比

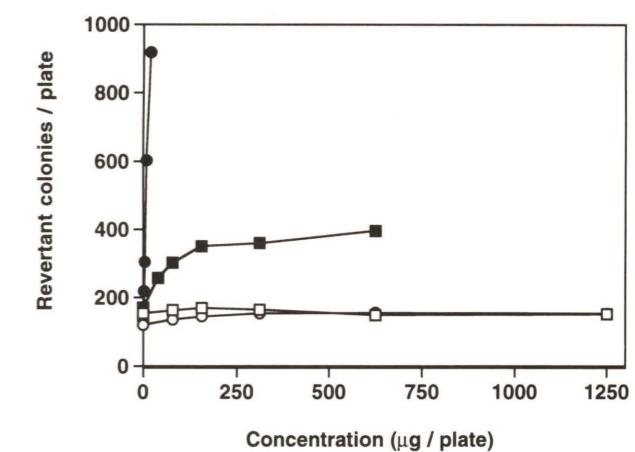


Fig. 2. Mutagenicity of phenacetin with rat S9 on *S. typhimurium* YG 1042 (○) and TA 100 (□) in the preincubation assay, and with hamster S9 on *S. typhimurium* YG 1042 (●) and TA 100 (■) in the preincubation assay.

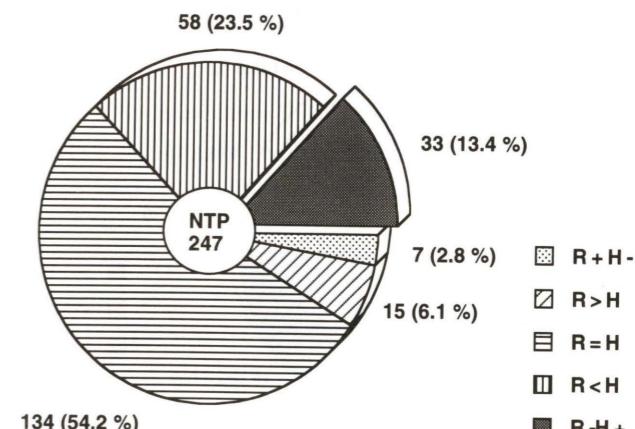


Fig. 3. Comparison of metabolic activation of rat and hamster S9 for NTP tested 247 chemicals. Chemical was only mutagenic with rat S9 (R+H-), more strongly mutagenic with rat S9 (R>H), equally mutagenic with both S9 (R=H), more strongly mutagenic with hamster S9 (R<H) and only mutagenic with hamster S9 (R+H+).

較した (Fig. 3). 247 物質のうち 7 物質 (2.8%) がラットの肝 S9 を用いた場合にのみ陽性であり, 33 物質 (13.4%) がハムスターの肝 S9 を用いた場合にのみ陽性を示した。代謝活性化にラットの肝 S9 のみを用いている場合は変異原性のある物質を見逃している事になる。また, Ponceau 3R などのアゾ化合物の変異原性は S9 Mix にリボフラビン等を加えてアゾ還元酵素の活性を上げ, アゾ結合を切る事により変異原性を検出する事ができる (Matsushima *et al.*, 1980; Prival *et al.*, 1984)。化学物質の変異原性をきちんと調べるには代謝活性化を充分に考慮する必要がある。

4-2) 試験手法

N-Nitrosodimethylamine の変異原性は *S. typhimurium* TA100 を用いた場合, プレート法では検出できないがプレインキュベーション法を用いると検出できる事が知られている (Yahagi *et al.*, 1977; Araki *et al.*, 1984)。*N*-Nitrosodimethylamine の変異原性をプレート法とプレインキュベーション法で調べた結果を示した (Fig. 4)。プレインキュベーション法の検出感度を調べるために化学

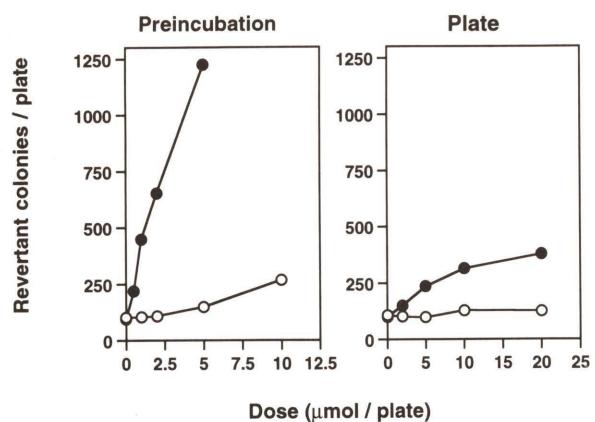


Fig. 4. Mutagenicity of *N*-nitrosodimethylamine with rat S9 on *S. typhimurium* TA100 (○) and *E. coli* WP2uvrA/pKM101 (●) in the preincubation and plate method.

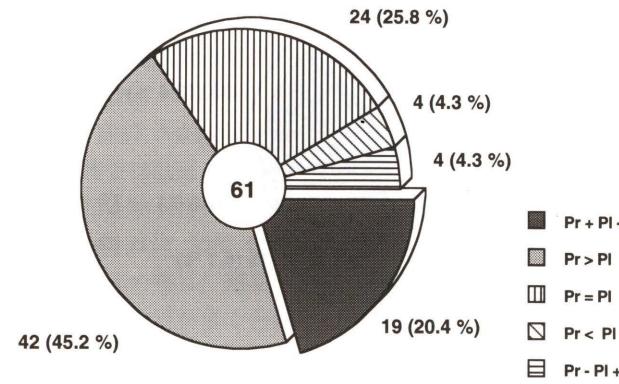


Fig. 5. Comparison of preincubation and plate method for mutagenicity test data of 61 chemicals. Chemical was only mutagenic in preincubation method (Pr+Pl-), more strongly mutagenic in preincubation method (Pr>Pl), equally mutagenic in both method (Pr=Pl), more strongly mutagenic in plate method (Pr<Pl) and only mutagenic in plate method (Pr-Pl+).

物質の変異原性をプレート法とプレインキュベーション法で同時に実施した報告を文献的に調査しその結果を比較した (Fig. 5)。検索できた 61 物質のうち 19 物質 (20.4%) がプレインキュベーション法のみで陽性を示し, プレート法のみで陽性を示した物質は 4 物質 (4.3%) であった。このプレート法のみで陽性を示した 4 物質はプレインキュベーション法で陽性の結果が別に報告されている。現在のところプレインキュベーション法がプレート法よりも変異原性物質の検出に優れていると言える。また, プレインキュベーションによる検出感度の向上は代謝活性化を必要とする物質のみならず代謝活性化を必要としない直接変異原物質においても認められている。

四塩化炭素の変異原性 (荒木, 1996) は通常のプレインキュベーション法では検出できないが, ガス曝露法を用いると *E. coli* WP2/pKM101 で変異原性を検出する事ができる (Fig. 6)。Dichloromethane の変異原性はプレインキュベーション法で調べた結果を示した (Fig. 4)。プレインキュベーション法の検出感度を調べるために化学

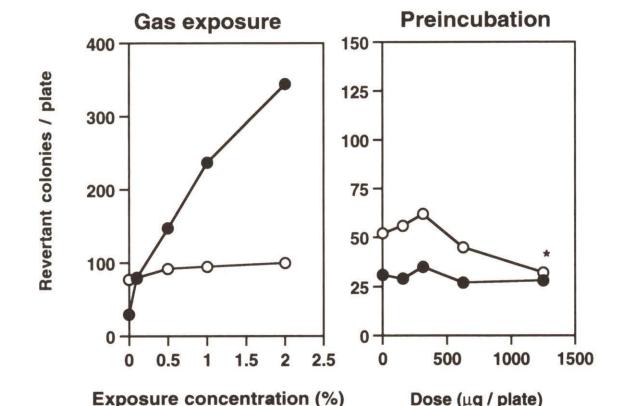


Fig. 6. Mutagenicity of carbontetrachloride without S9 on *E. coli* WP2uvrA/pKM101 (○) and *E. coli* WP2/pKM101 (●) in the gas exposure and preincubation method. Growth inhibition was observed (*).

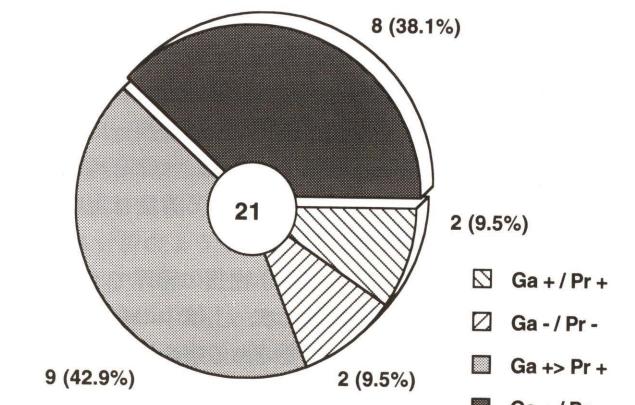


Fig. 7. Comparison of gas exposure and preincubation method for mutagenicity test data of 21 chemicals. Chemical was mutagenic (Ga+Pr+) or not mutagenic (Ga-Pr-) in both gas exposure and preincubation method, more clearly mutagenic in gas exposure method (Ga+Pr+), only mutagenic in gas exposure method (Ga+Pr-).

ト法, プレインキュベーション法では検出できないが, プレインキュベーションする試験管を密閉し, 培養時にプレートをシールして被験物質が飛散しないようにすると (改良プレインキュベーション法) 検出できる (佐々木, 1995)。揮発性の化学物質で水への溶解性の悪い物質は通常のプレート法, プレインキュベーション法では試験系からはじき出されてしまうのでガス曝露法を用いないと正確に変異原性を調べる事ができない (Araki *et al.*, 1994)。ガス曝露法の検出感度を調べるために, ガス曝露法とプレインキュベーション法で変異原性がしらべられている物質を文献的に調査しその結果を比較した (Fig. 7)。検索できた 21 物質のうち 8 物質 (38.1%) がガス曝露法でのみ陽性を示した。この事は, 化学物質の変異原性を調べるのに試験する物質の水への溶解性や沸点などの性質を考慮して試験方法を選択する必要がある事を示している。

4-3) 試験菌株

Phenacetin の変異原性は *S. typhimurium* TA100 よりも芳香族アミン, 芳香族ニトロ化合物に対して感度の良い *S. typhimurium* YG1042 (Hagiwara 1993) を用いる事で変異原性を数十倍も強く検出することができる (Fig. 2)。*N*-Nitrosodimethylamine の変異原性は *S. typhimurium* TA100 よりもニトロソ化合物に対して感度の良い *E. coli* WP2uvrA/pKM101 を用いることで強く検出することができる (Fig. 4)。また, 四塩化炭素の変異原性は *E. coli* WP2uvrA/pKM101 では検出できないが, DNA に架橋する変異原物質の検出に感度の良い *E. coli* WP2/pKM101 を用いる事で検出できる (Fig. 6)。この様に変異原性を調べる化学物質に応じて適切な菌株を選択しないと変異原性を見落とす事になる。

5. 変異原性を定量的に検出する上の問題点

5-1) 機関間変動

それぞれ独立した機関において同一の化学物質について同一の実験計画で試験を実施しても得られる結果がことなることが知られている。NTP で試験された化学物質のうち 186 物質は 3 機関のうちいずれか 2 機関で試験が実施されている (Haworth *et al.*, 1983; Montelmans *et al.*, 1986; Zeiger *et al.*, 1987, 1988, 1992)。これら 186 物質の試験の結果を比較した (Fig. 8)。2 機関, 共に陽性もしくは陰性を示した物質は 186 物質のうち 40 物質 (21.5%) と 97 物質 (52.2%) で合計 137 物質 (73.7%), 試験結果が評価できなかった物質は合計 28 物質 (15.1%), 2 機関の試験結果が異なる物質は 21 物質 (11.3%) であった。NTP の結果を見る限り 10 物質のうち 1 物質は試験結果が試験を実施した機関で異り, 場合によっては変異原性を正しく評価していない事になる。

試験機関が異なる結果が異なる事は不可避なことなのであろうか, また日本国内においてもこのような差はあるのだろうか。労働省は精度管理を目的として標準の

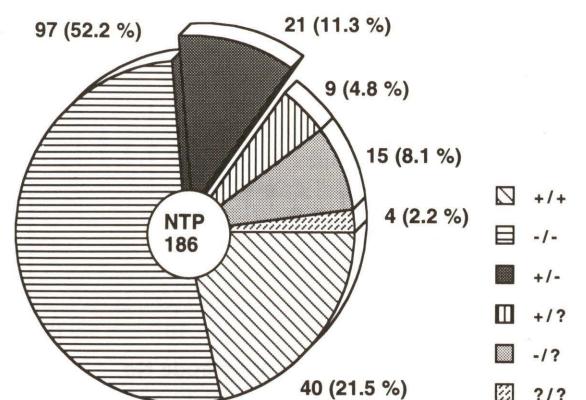


Fig. 8. Compatibility of test results from two laboratories in NTP test data. Chemical was positive (+/+) or negative (-/-) and equivocal (?/?). In both laboratory, positive in one laboratory but negative in other laboratory (+/-), positive or negative in one laboratory but equivocal in other laboratory (+?)(-?).

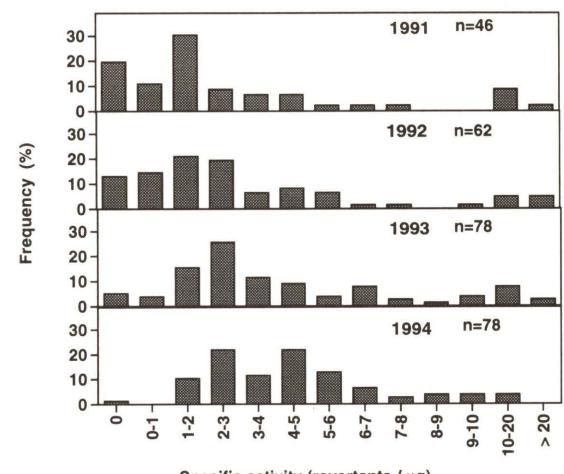


Fig. 9. Inter-laboratory variation for mutagenic potency of quercetin tested on *S. typhimurium* TA100 without S9 in the plate method.

サンプル (quercetin) を試験機関に配布して試験結果の変動を調査し, 報告した (労働省, 1992-1995)。1991 年から 1994 年に実施された試験結果を示した (Fig. 9)。調査を開始した 1991 年には quercetin の変異原性を強く検出できる機関は少なく 5 機関に 1 機関 (20%) が陰性の結果を報告した。その後, 年度をおおごとに強く検出できる機関が多くなり 1994 年には陰性の結果を報告した機関は新規に精度管理試験に参加した 1 機関だけであった。これは, 試験を実施した機関が毎年の試験結果をフィードバックして試験実施上の問題点を改良したことにより検出感度が上がり陰性の結果を出さなくなった為と考えられた。この事は, 微生物変異原性試験を定性的に変異原性が陽性か陰性かを判定する試験として使用する場合でも, 試験を実施する技術者の精度管理への取り組みは不可避である事を示している。また, 微生物変

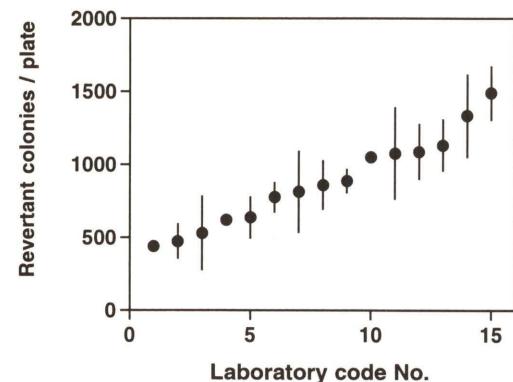


Fig. 10. Intra-laboratory variation for mutagenicity of benzo(a)pyrene tested on *S. typhimurium* TA100 with S9 in the preincubation method.
Data plotted average number of revertant colonies and their standard deviation of each laboratory.

異原性試験を定量的に用いて環境中の変異原性物質をモニタリングし、異なる機関ごとのデータを比較するには場所を越えた、再現性のある試験の実施が必要である。

5-2 機関内変動

労働省の精度管理事業で報告された（労働省、1996）それぞれの試験実施機関の陽性対照値の平均と標準偏差を示した（Fig. 10）。Benzo(a)pyrene 5 µg/plateあたりの復帰変異コロニー数の平均は低い機関で500程度、高い機関で1500程度で試験機関間の差は約3倍であった。試験機関内の変動はほとんど変動のない機関から大きく変動している機関まで様々で、試験の実施数とは関連していないかった。試験機関内での実験間の差は試験機関内の変動が小さい機関があることから少なくできる要因と考えられる。微生物変異原性試験を定量的に用いて環境中の変異原性物質をモニタリングし、経時にデータを比較するには時間を越えた、再現性のある試験の実施が必要である。

結 語

癌原性のある農薬や医薬品による環境汚染をモニタリングするのに変異原性試験が手法として有効であるかを考えた場合、変異原性試験は癌原性のある農薬や医薬品の一部しかモニタリングできず、また検出限界が機器分析よりも悪いので単独で用いても有効な手段とは考えにくい事を述べた。農薬や医薬品は生活環境で使用される前に変異原性を含めた安全性のデータがそろっているので有害なものは制限して取り扱い、環境の汚染を未然に防止するのが基本である。しかし、取り扱い方法を誤れば抗腫瘍剤で生じたような環境汚染を生じる事になる。生活環境の中には使用、廃棄などの取り扱い方法が適切でないために様々な変異原物質によって環境汚染が生じていると考えられる。これらを変異原性試験でモニタリングし環境汚染防止に役立てる事は重要である。微生物を

用いた復帰突然変異原性試験を用いて、環境汚染物質をモニタリングするにはモニタリングする物質に応じた適切な代謝活性化系、試験手法、試験菌株を用いて実施する必要がある。また、時間と場所を越えた再現性の良い精度の高い試験と、低濃度の汚染物質をサンプリングし濃縮できる簡便な手法の開発が今後の課題と考えられる。

謝 辞

S. typhimurium YG 菌株を御恵与下さいました国立衛生試験所、能美健彦博士に深く感謝申し上げます。

参考文献

- Allen, J. A., E. Jones, J.C. Richardson and M. Richold (1983) Absence of mutagenic activity of WHR-1142A, lidamidine hydrochloride, in 4 short-term tests for mutagenic/carcinogenic potential, *Mutation Res.*, **116**, 399-405.
- Anderson, R. W., W. H. Pukett, W. J. Dana, T. V. Nguyen, J. C. Theiss and T. S. Matney (1982) Risk of handling injectable antineoplastic agents, *Am. J. Hos. Pharmac.*, **39**, 1881-1887.
- Araki, A., M. Muramatsu and T. Matsushima (1984) Comparison of mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella typhimurium* TA100 and *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 using rat and hamster liver S9, *Gann*, **75**, 8-16.
- Araki, A., T. Noguchi, F. Kato and T. Matsushima (1994) Improved method for mutagenicity testing of gaseous compounds by using a gas sampling bag, *Mutation Res.*, **307**, 335-344.
- 荒木明宏 (1996) 気相暴露による微生物変異原性試験法の開発とその応用、環境変異原研究, **18**, 5-13.
- Ashby, J. and R. W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, *Mutation Res.*, **257**, 229-306.
- Falck, K., P. Grohn, M. Sorsa, H. Vainio, E. Heinonen and L. R. Hosti (1979) Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs, *Lancet*, **1**, 1250-1251.
- Hagiwara, Y., M. Watanabe, Y. Oda, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activities, *Mutation Res.*, **291**, 171-180.
- Haworth, S., T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck and E. Zeiger (1983) *Salmonella* mutagenicity results for 250 chemicals, *Environ. Mutagen.*, **5** (Suppl. 1), 3-142.
- IARC (1987) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Update of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Supplement 7, IARC, Lyon, France.
- IARC (1989) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Vol. 46-48, IARC, Lyon, France.
- IARC (1990) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Vol. 49-51, IARC, Lyon, France.
- IARC (1991) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Vol. 52-54, IARC, Lyon, France.
- IARC (1992) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Vol. 56, IARC, Lyon, France.
- IARC (1993) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Vol. 57 and 58, IARC, Lyon, France.
- IARC (1994) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Vol. 60, IARC, Lyon, France.
- Kleinberg, M. L. and M. J. Quinn (1981) Airborne drug levels in a laminar-flow hood, *Am. J. Hosp. Pharmac.*, **38**, 1301-1303.
- Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura (1980) Factors modulating mutagenicity microbial tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. K.H. Norpeth and R.C. Garner (Eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 273-285.
- Mortelmans, K., S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer and E. Zeiger (1986) *Salmonella* mutagenicity test: II. Results from the testing of 255 chemicals, *Environ. Mutagen.*, **8** (Suppl. 7), 1-119.
- Myhr, B. C. and W. J. Caspary (1988) Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: Intralaboratory results for sixty-three coded chemicals tested at Litton Bionetics, Inc., Environmental and Mutagenesis, **12** (Suppl. 13), 103-194.
- Nagao, M. and Y. Takahashi (1981) Mutagenic activity of 42 coded compounds in the *Salmonella*/microsome assay, In: F. J. de Serres and J. Ashby (Eds.), Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens, Elsevier, Amsterdam, pp. 302-322.
- Neal, A. W., R. A. Wadden and W. L. Chiou (1983) Exposure of hospital workers to airborne antineoplastic agents, *Am. J. Hosp. Pharmac.*, **40**, 597-601.
- Nohmi, T., K. Yoshikawa, M. Nakadate and M. Ishidate, Jr. (1983) Species difference in the metabolic activation of phenacetin by rat and hamster liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 746-752.
- OSHA (1986) Work Practice Guidelines for Personnel Dealing with Cytotoxic (Antineoplastic) Drugs, OSHA Instruction PUB 8-1, 1, Jan-29-1986.
- Prival, M. J. and V. D. Michell (1981) Influence of microsomal cytozolic fractions from rat, mouse and hamster liver on the mutagenicity of dimethylnitrosamine in the *Salmonella* plate incorporation assay, *Cancer Res.*, **41**, 4361-4367.
- Prival, M. J., S. J. Bell, V. D. Michell, M. D. Reipert and V. L. Vaughn (1984) Mutagenicity of benzidine and benzidine-congener dyes and selected monoazo dyes in a modified *Salmonella* assay, *Mutation Res.*, **136**, 33-47.
- 労働省 (1992) 変異原性試験実施機関に対する精度管理の実施結果(平成3年), 中央労働災害防止協会, 東京。
- 労働省 (1993) 変異原性試験実施機関に対する精度管理の実施結果(平成4年), 中央労働災害防止協会, 東京。
- 労働省 (1994) 変異原性試験実施機関に対する精度管理の実施結果(平成5年), 中央労働災害防止協会, 東京。
- 労働省 (1995) 変異原性試験実施機関に対する精度管理の実施結果(平成6年), 中央労働災害防止協会, 東京。
- 労働省 (1996) 変異原性試験実施機関に対する精度管理の実施結果(平成7年), 中央労働災害防止協会, 東京。印刷中。
- Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water. *Mutagens in Yodo River system, Kyoto-Osaka*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **44**, 521-528.
- 佐々木俊明, 石田理絵, 小田 大, 荒木明宏, 松島泰次郎 (1995) ガス暴露法による塩素化メタン類の微生物変異原性試験, 日本環境変異原学会, 24会大会要旨集, p. 117.
- Sessink, P. J. C., J. H. C. de Roos, F. H. Pierik, R. B. M. Anzion and R. P. Bos (1993) Occupational exposure of animal caretakers to cyclophosphamide, *JOM*, **35**, 47-52.
- Sessink, P. J. M., M. C. A. von de Kerkhof, R. B. N. Anzion, J. Noordhekk and R. P. Bos (1994) Environmental Contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: skin absorption an important exposure route?, *Archives of Environmental Health*, **49**, 165-169.
- Sugimura, T. (1986) Studies on environmental chemical carcinogens in Japan, *Science*, **223**, 312-318.
- Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60.
- Tokiwa, H., S. Kitamori, K. Horikawa and R. Nakagawa (1983) Some findings on mutagenicity in airborne particulate pollutants, *Environ. Mutagen.*, **5**, 87-100.
- Wakabayashi, K., M. Nagao, H. Esumi and T. Sugimura (1992) Food-derived mutagens and carcinogens, *Cancer Res.*, **52**, 2092-2098.
- Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicity of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, *Mutation Res.*, **48**, 121-130.
- Zeiger, E., B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans and W. Speck (1987) *Salmonella* mutagenicity test: III. Results from the testing of 255 chemicals, *Environ. Mutagen.*, **9** (Suppl. 9), 1-109.
- Zeiger, E., B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor and K. Mortelmans (1988) *Salmonella* mutagenicity test: IV. Results from the testing of 300 chemicals, *Environ. Mutagen.*, **11** (Suppl. 12), 1-157.
- Zeiger, E., B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor and K. Mortelmans (1989) *Salmonella* mutagenicity test: V. Results from the testing of 311 chemicals, *Environ. Mutagen.*, **19** (Suppl. 21), 2-142, 335-344.
- Zeiger, E. (1987) Carcinogenicity of Mutagens: Predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity, *Cancer Res.*, **47**, 1287-1296.

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「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」(S1-6)

水中の変異原・発がん物質

Mutagen and carcinogen in water environment

小野芳朗

Yoshiro Ono

岡山大学環境理工学部環境デザイン工学科 700 岡山市津島中2-1-1

Department of Environmental & Civil Engineering, University of
Okayama, 2-1-1, Tsushima-naka, Okayama 700, Japan

(受理: 1997年3月3日)

Summary

Treated municipal sewage water has been used recently in urban areas. Risk evaluation of chemicals in this water is studied. The evaluation of chemicals in the effluent water effluent depends on the method of concentration of the chemicals, because the level of them is usually very low not to be detected by the bioassay. The method of concentration decides the chemicals which can be screened. Bioassay, such as the Ames method (YG strain), can detect specific chemicals related to nitroarenes and amino compounds. Detection of these chemicals depends on the choice of resin and bioassay. This short report describes the determination of the compounds in the water environment.

Keywords: water environment, concentration, resin, bioassay, sewage

緒 言

日本の大都市近辺の流域では、飲料水源に都市下水処理場の放流水が流入していることは珍しくなってきた。飲料水源の汚染とともに、従来の総括的な水質指標から、最近の飲料水、排水、環境基準に見られるように微量化学物質の混入が問題視されてきている。

なかでも chloroform をはじめとする trihalomethane 類は 1970 年代にその塩素消毒による飲料水中の存在が知られてから、既に基準値が示されている。これは、chloroform が肝臓、腎臓、甲状腺にがんを発生させることが示されているためである。このように化学物質の同定・定量が為された物に関しては発がんの dose response により、リスクアセメントが実施されている。水中の化学物質で問題となるのは、スクリーニングとしての変異原性試験を実施しようとするとき、多くは希釈され、低濃度なるが故に濃縮・抽出という操作が必要であることである。塩素処理水に関しては、多くの研究者が、XAD カラムと、Ames 法をあわせて変異原性の検出を試みている。しかし、測定された変異原性がどの物質によるものかは分析を待たなければならない。

MX の存在も、変異原性の大きさに関与しているらしい。一方の trihalomethane 類は bromoform を除けば、変異原性が大きいというデータは少ない。塩素の代替消毒法として普及しつつある ozone は、その副生成物である carbonyl 化合物の発がん性、変異原性が指摘されることがある。事実、formaldehyde, methylglyoxal などは、その変異原性が調べられてきた。この物質群も、実際の処理の現場では、親水性であるが故に濃縮方法が塩素消毒の場合とは異なり、さらに生物分解性、抗変異原性を考えいく必要もあると考える。

また近年、下水を処理した後、再利用していくという観点から、処理水の安全性のために変異原性、発がん性が検討されている。また実際、雨水、生活雑排水、し尿さらに工場排水の流入する処理場の放流水域で変異原性を比較的高く示すことが報告してきた。以下、このような問題点をどのように考えていくか、例を処理水中の変異原性にとりながら考えていく。

1. 問題の提起

水中の変異原・発がん物質の検出に関する問題点として

Table 1. The review of mutagenesis of the concentrated samples of different water, the method of concentration, test assays.

著者	試験方法	対象試水	濃縮法	抽出溶媒
亀井・丹保ら (1985)	Ames テスト	泥炭池有機着色水の塩素、オゾン処理水	XAD2 減圧濃縮 逆浸透膜	メタノール アセトニトリル ジクロロメタン
奥山・丹保ら (1987)	Rec-assay	泥炭池底泥などの塩素処理水	減圧濃縮	アルカリ抽出
奥山・丹保ら (1987)	Ames テスト	泥炭池着色水、2次処理水の遊離塩素、クロラミン、二酸化塩素処理水	減圧濃縮	ジクロロメタン
浦野ら (1988)	Ames テスト	腐葉土抽出水の塩素処理水	CSP800 CHPA20	DMSO 4N NaNO ₃
富田・浜田ら (1980)	Ames テスト	河川水とその塩素処理水	減圧濃縮+凍結乾燥	—
内海・浜田ら (1990)	Ames テスト	河川水	ブルーコットン	0.5% アンモニア+メタノール
佐谷戸・中室ら (1992)	Ames テスト	河川水とその塩素・オゾン処理水	XAD2	ジクロロメタン メタノール
布柴・西岡ら (1983)	DNA 修復試験	水道水 (東京、名古屋、京都、大阪)	XAD2	ジエチルエーテル
松井ら (1985)	Rec-assay	都市下水 2次処理水	液液抽出 XAD2 ブルーコットン	ジクロロメタン エーテル メタノール
中室・佐谷戸ら (1992)	Ames テスト YG 株	芳香族アミノ酸の塩素化処理	—	—
上野・中室・佐谷戸ら (1992)	Ames テスト ラット肝 DNA 損傷	フミン酸オゾン処理	グリオキザール、メチルグリオキザールを試水に同定	—
近藤・石黒ら (1992)	Ames テスト YG 株	殺虫剤、殺菌剤、除草剤	—	—
染谷・鯉川ら (1992)	Ames テスト	廃棄物埋立地浸出水	液液抽出	ジクロロメタン
木苗・山下ら (1990)	海水ナマズ	パルプ工場廃水	直接接触	
Coleman et al. (1984)	Ames テスト	フミン酸の塩素処理	液液抽出	ジクロロメタン ジエチルエーテル
Kringstad et al. (1984)	Ames テスト	パルプ漂白水	モデルにベンゾフェノン、ナフタレン、アントラセン	—
Hopke et al. (1984)	Ames テスト	都市下水処理場汚泥	液液抽出	アセトン ヘキサン
Lippincott et al. (1990)	Ames テスト	水道水	連続液液抽出	ジクロロメタン
Langevin et al. (1992)	SOS クロモテスト	河川底泥	液液抽出	ジクロロメタン
中村・鶴川 (1992)	umu テスト	アミノ酸の塩素処理生成物	—	—
山吉ら (1989)	umu テスト	環境水	減圧濃縮 XAD2	ジクロロメタン メタノール
Hartemann et al. (1987)	Ames テスト V79/HGPRT	オゾンを導入した浄水場	XAD4/8	メタノール、アセトン DMSO
Kool et al. (1986)	Ames テスト	浄水場の塩素・オゾン処理水	XAD4/8	DMSO アセトン

Table 1. Continued.

著者	試験方法	対象試水	濃縮法	抽出溶媒
Dolara et al. (1987)	Ames テスト	浄水場の塩素・オゾン処理水	XAD2	ジクロロメタン クロロホルム
Cognet et al. (1986)	Ames テスト	浄水場の塩素・オゾン処理水	XAD2/8	ジクロロメタン メタノール
Boubigot et al. (1986)	V79/HGPRT SOS クロモテスト	浄水場の塩素・オゾン処理水	XAD2/7	メタノール
Vartiairen et al. (1987)	Ames テスト	塩素消毒した飲料水	XAD4/8	ジクロロメタン DMSO
Monarca et al. (1985)	Ames テスト	塩素消毒した飲料水	Sep-pak XAD2	DMSO
Fielding et al. (1987)	Ames テスト	塩素処理生成物 (MX)	XAD2	
Holmbom et al. (1984)	Ames テスト	MX	XAD4/8	
Kronberg et al. (1988)	Ames テスト	MX	XAD4/8	ジエチルエーテル
Huck et al. (1989)	Ames テスト酵母	塩素・オゾン処理水	XAD2	アセトン/ヘキサン
Coleman et al. (1984)	Ames テスト	フミン質の塩素処理水	液々抽出	ジクロロメタン ジエチルエーテル
Holmbom et al. (1987)	Ames テスト	バルブ漂白水	XAD4	メタノール
Ringbard et al. (1987)	Ames テスト	浄水場の塩素処理水	XAD2/8	メタノール アセトン
Meier et al. (1985)	Ames テスト	フミン質の塩素処理水	液々抽出	ジエチルエーテル エーテル
Meier et al. (1987)	Ames テスト	MX	XAD2/8	アセトン

以下の3点をあげたい。1) 変異原性を示す化学物質は、多くの場合環境中では微量な濃度であり、これを濃縮・抽出する必要がある。この濃縮法の選択でターゲットとする物質群がほぼ絞られてくる。たとえば、樹脂吸着法は、その担体と化学物質との結合度で吸着する物質を選択できる。岡山大学の早津教授等の開発したブルーコットン、ブルーレーヨン、ブルーキチンなどは3環以上の芳香族化合物を選択的に吸着できる。また、ミリポアのSep-pak C₁₈などは疎水性の物質を比較的選択的に吸着できる。しかしながら水環境の試料で求められることに、しばしばその水全体の毒性を評価できないか、という要求がある。このことは物質が微量であり、現行の感度でのバイオアッセイに適用する際、濃縮操作をしなければならない限り不可能に近い。この場合、対象とする水塊で水生生物を培養し、その反応を評価する生態毒性学的な手法が考えられる。この方法も、感度が高いことと、反応が早いことが評価する際の要件になってくる。

2) 適用したバイオアッセイの変異原発現のメカニズムがどのようなものであるのかを明確にしないと、混合試料である水環境の何を評価しているのか不明になる。変

異原性試験は食品添加物や薬品を評価するために開発されてきた。それは対象とする化学物質が分かっているから評価は単純であった。その変異原性を誘発する濃度、あるいは発癌性を示す濃度はそのままリスクアセスメントに使用できた。しかし水環境の試料を濃縮し、それをAmesで評価したとしても、そのデータを多く蓄積したところで、規制の値にはなり得るであろうか。その水試料に変異原性が認められたとしても、何を規制してよいのか、対象とする化学物質が分からぬのである。それは単にSomething Mutagenicでしかありえない。3) また、物質を同定・定量することは、その対応策を決めていく上で重要な情報となる。それが有機塩素化合物であるのか、含窒素芳香族であるのかによって、適用する水処理の方法が異なる。

Table 1 には様々な研究者による水環境試料の濃縮法と、バイオアッセイの一覧を筆者がまとめたものを転載して示した(小野, 1993)。対象が有機塩素化合物であるのか、また別のものかによってその濃縮方法が異なる。見方を変えていえば、濃縮法は1次スクリーニングといってよいのである。濃縮法に何を採用するか、と

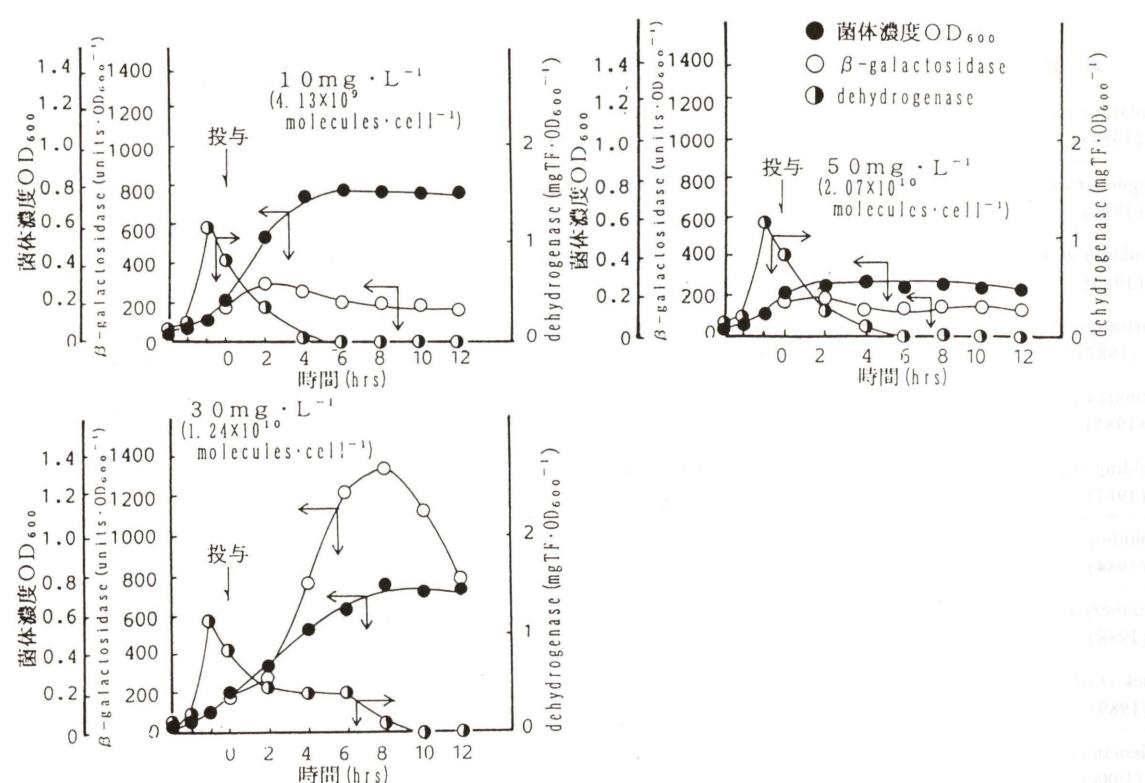


Fig. 1. Induction of *umuC* gene by formaldehyde. The chemical was introduced at the time 0. Then, growth of cells, OD_{600} was inhibited and *umuC* gene was induced to repair the damaging DNA. Dehydrogenase which shows the activity of respiration was also inhibited.

ということでその研究者は先駆的に対象とする物質を仮定しているのである。

たとえば、オゾン処理の副生成物とされる formaldehyde は、Fig. 1 のように *umu*-test で陽性を示し、反応時間とともにその *umuDC* 発現量を変化させる。しかしながら実際の水処理の試料からバイオアッセイに適用するために aldehyde のような親水性の物質を抽出することは困難なことである。また変異原やら発癌やらその物質の存在を指摘するのはよいが、一方でその物質の生物分解性も評価すべきである。あるいは紫外線などによる分解、粒子への吸着性をもあわせて評価しなければならない。それらの情報は、水環境の中での当該物質の運命予測のために必要であるからである。なぜなら変異原性試験や発癌試験が人間を対象としている試験ではあるが、水環境中の当該物質が人間の標的臓器に水環境から到達するには様々な経路が想定できるからである。

2. 水環境中の発癌物質の例

例として heterocyclic amines を考えてみる。その物質群はすでに加熱食品中に発癌物質として同定されている。一方、多くの研究者が都市の終末処理場の放流水中に何か変異原性物質のあることを報告してきた（たとえば Sakamoto *et al.*, 1990）。そこで、一つのシナリオを想定する。人間の食品中の発癌物質は一部、体内にそして大部分は体外へ排泄されている。それならば、この物

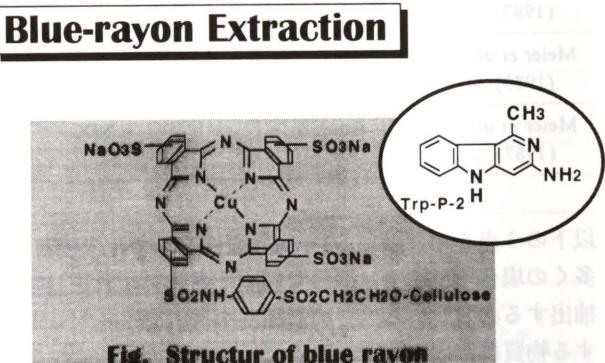


Fig. 2. The structure of resin of blue rayon. We used the resin to adsorb the poly aromatic hydrocarbons in the water. The resin was packed in a glass column, and the water sample is introduced into the column in 20 mL/min.

質群、つまり heterocyclic amines は、し尿と共に、終末処理場に流れ込み、そこで処理を受けるはずである。現行の処理方式である活性汚泥法は生物の好気的酸化を利用しているが、これで分解されない場合、処理水中に残存してくる可能性がある。このシナリオにしたがって、数多くあるであろう変異原性物質のうち、heterocyclic amines にターゲットを絞り、この同定に向かってスクリーニング方法を選別していった（Ono *et al.*, 1994-1996）。

水試料の吸着法には、ブルーレーヨンを適用した（Fig. 2）。これは heterocyclic amines を選別的に吸着する方法としては最適である。この物質の構造を利用して

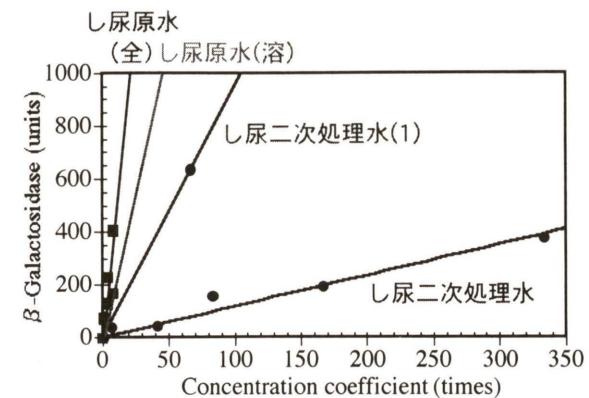


Fig. 3. The sample from the treatment plant of human waste was applied to the concentration method and bioassay, *umu*-test.

The filtered water by ultra filter after activated sludge treatment of human waste was introduced to the blue rayon resin. The genotoxicity by *umu*-test shows high positive activity which show the treated water has some kinds of genotoxic aromatic amines.

選択的な濃縮・吸着する方法が、環境試料の毒性研究に極めて有効となるのである。

さらにバイオアッセイとしては、近年開発された *O*-acetyl transferase を多量に産出できるアッセイを適用した（Oda, 1993）。この *umu*-test NM series や、Ames test の YG series (Watanabe, 1987, 1990) は、amines の他、nitroreductase 産出株により、nitroarenes の検出も可能となってきている。様々な物質が存在し、そこから目的の物質に選択的に高感度であることから、物質のスクリーニング法として使用できる。このようにブルーレーヨンのような濃縮法と、NM 株のようなアッセイを併用することで、シナリオに設定した物質に近づくことが可能となる。

さて、排水中の変異原性物質は冒頭で述べたように水環境と人間生活をつなぐ接点として管理されなければならぬ。

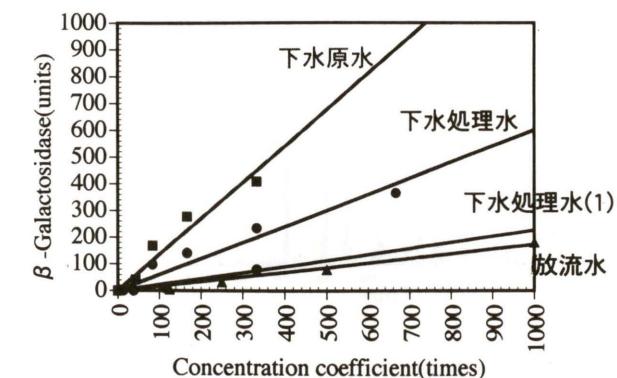


Fig. 4. The water sample was collected in a municipal sewage treatment plant. Influent, and effluent of the plant have high genotoxic potential related to the aromatic amines.

らない。その意味で、微量化学物質の生体影響のデータの蓄積が急がれるところである。まず、最初に我々はし尿処理場へ出かけ採水した。ここは基本的に人間の排泄物を処理しているところであるから、ここで同定できれば、終末処理場の変異原性の一部の原因も分かってくる。この処理場の生物処理した後の水から、3環以上の多環化合物で、アミン類による高い遺伝毒性が検出できた（Fig. 3）。

また同様に雨水、生活雑排水、屎尿、工場排水を受け入れている都市下水処理場でも処理水（塩素消毒前）中に同様に遺伝毒性が検出できた（Fig. 4）。そして、これらの物質は、3段階の HPLC による分画、分析を続け、最後に MS 分析により、heterocyclic amines のひとつである Trp-P-2 であることが確認できた（Fig. 5）。

さらに都市下水処理場の放流地先である河川水中にも、同様の Trp-P-2 が同定できた（Fig. 6）。こうした類似の方法により、佐々木や、大江等も河川水中に Trp-P-2 を同定しているが、いずれも濃縮法と、バイオアッセイの適用がこれら物質群のスクリーニングに適し

Identification of Trp-P-2 in secondary effluent

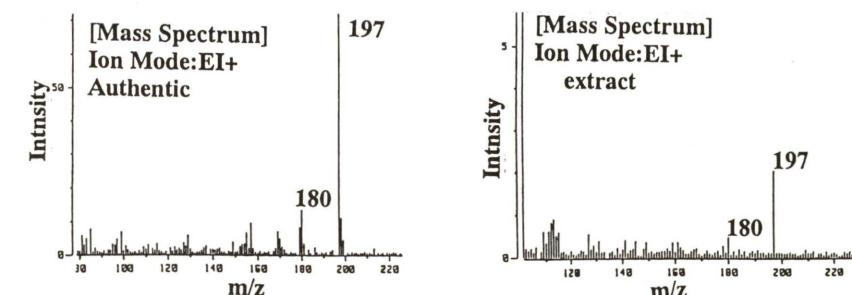


Fig. 5. Mass spectra of Trp-P-2.

The concentrated water sample by blue rayon resin was eluted by ammonia/methanol. And the elute was fractionated by HPLC by third times with different ODS columns, and finally injected to Mass analysis. The spec of Trp-P-2 (197 MW) can be obtained.

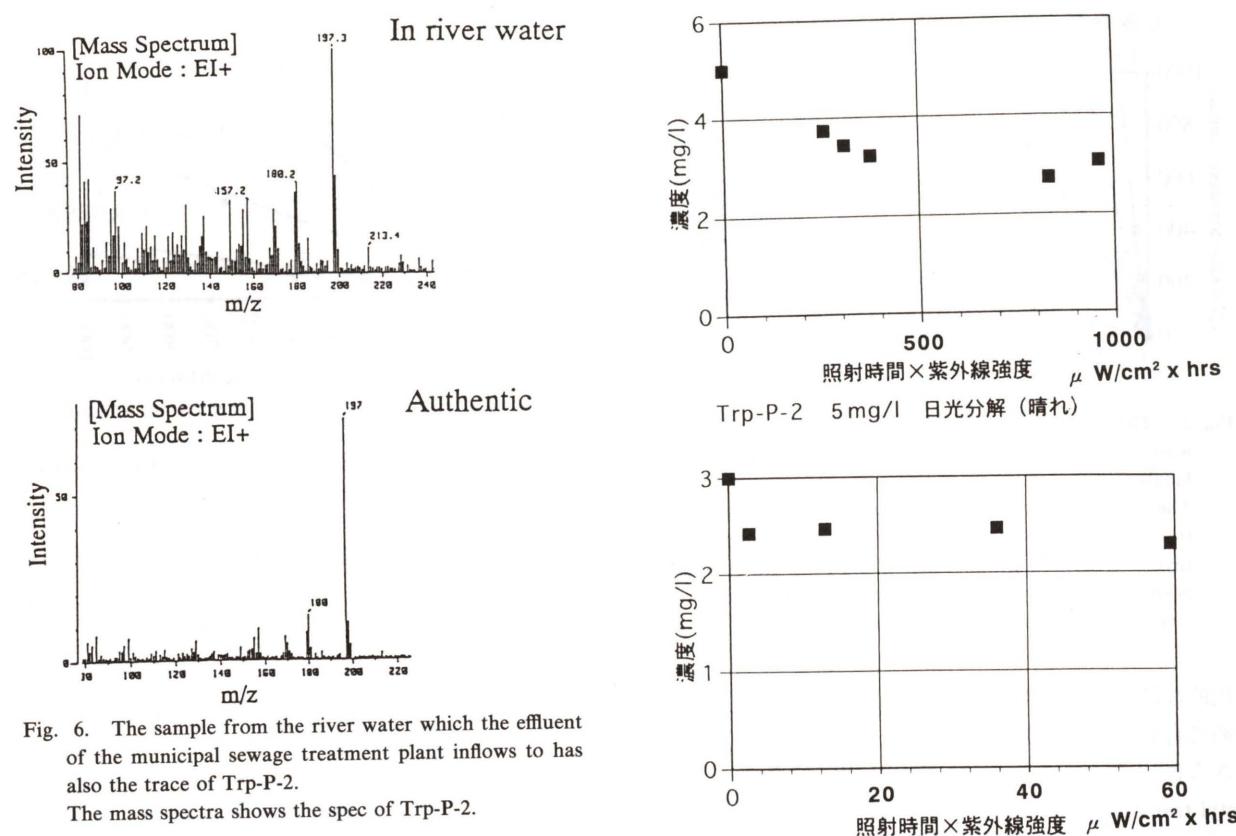


Fig. 6. The sample from the river water which the effluent of the municipal sewage treatment plant inflows to has also the trace of Trp-P-2. The mass spectra shows the spec of Trp-P-2.

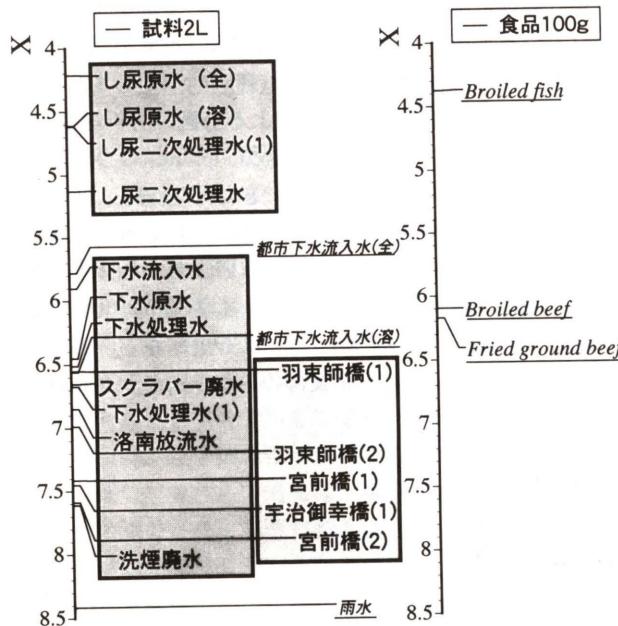


Fig. 7. Risk assessment on Trp-P-2 shows in this figure. The risk is almost same order in the human waste to human diet, because Trp-P-2 in the diet will be exhausted to the waste. The risk in the municipal sewage treatment plant is about 1% of the human waste. And the river water show more 10% risk of the effluent.

たものであったからである(大江, 1995; 佐々木ら, 1996)。彼らも指摘している河川水中のTrp-P-2は、筆者の調査により、人間の排泄物、さらにいえば食品由来であることが示唆された。

3. 展望

このリスクの評価により、ただちに人間の健康に問題になるとは考えにくいが水環境中のheterocyclic aminesは自然水系中で消えるだろうか。直射日光のもとでTrp-P-2は確かに減衰していく(Fig. 8)。しかし、曇って紫外線量が減ると、分解は止まるようだ。また実際の河川水のような懸濁性物質を含む混合試料では、紫外線は妨害され、分解は進まないようだ。オゾンや光酸化触

Detection of genotoxicity produced in sludge treatment process

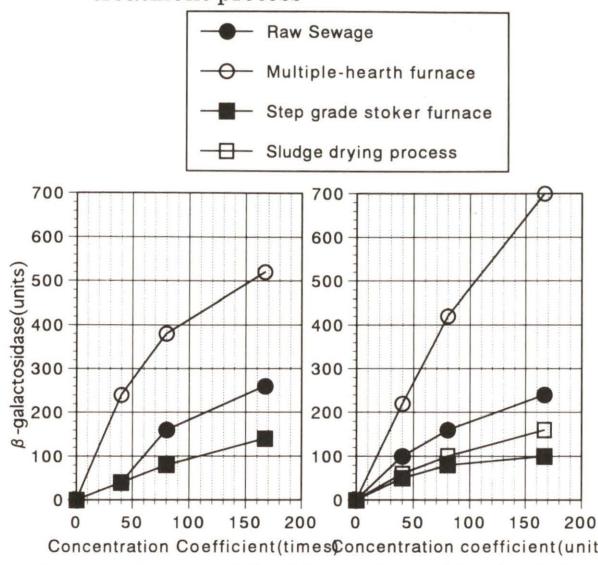


Fig. 9. The trace of Trp-P-2 was detected in the sludge treatment plant in the municipal sewage treatment plant.

There were two furnace plants in the treatment, where the dried excess activated sludge which is bacterial protein are burned in the multiple-hearth and step grade stoker furnace.

媒を用いると比較的簡単に処理水中のTrp-P-2は分解することが分かってきている。

その発生源を巡って、筆者は食品だけではないのではないか、という仮定をもっている。それというのも、処理場により処理水中に変異原性が高いところと低いところがあるからである。そこで、燃焼工程に着目した。処理場は汚泥を処理する工程を有する場合がある。汚泥は微生物蛋白である。そして、濃縮脱水後に、乾燥、焼却される。この焼却の過程で加熱タンパク質の生成物であるheterocyclic aminesが生成している可能性がある。事実焼却炉の煙の温度を下げるために吹き掛けられる洗浄水を同じような操作で調べてみると、芳香族アミンによる遺伝毒性の活性は認められた(Fig. 9)。

さらに一般廃棄物の焼却炉の洗浄水も同様に調べてみると、その痕跡が示唆された(未発表)。つまり、水環境には燃焼工程から出てくる含窒素有機物の副生成物

で、発癌性をもっていることが存在することがわかつてきた。筆者は現在ニトロ化合物の存在についても調査をすすめている。それは大気汚染の物質として知られているが、燃焼工程から水環境への接点がいくつかあり、そこから水環境中に漏出している可能性があるからである。

参考文献

- 小野芳朗, 宗宮 功, 川口達也 (1994) し尿由来遺伝毒性の処理場における挙動とその制御, 用水と排水, 36, 944-950.
 Ono, Y., I. Somiya and T. Kawaguchi (1995) Evaluation of genotoxic potency on substances contained in night soil and its reduction performance by ozonation, *Ozone Sci. Eng.*, 17, 195-203.
 小野芳朗, 毛利紫乃, 宗宮 功, 小田美光 (1995) ヒトし尿の生物処理水中に存在するTrp-P-2の同定と評価, 環境変異原研究, 17, 179-186.
 Ono, Y., I. Somiya and T. Kawaguchi (1996) Genotoxicity of substances in the nightsoil and its biologically treated water, *Water Res.*, 30, 569-577.
 Ono, Y., I. Somiya and T. Kawaguchi (1996) Evaluation of toxic substances in effluents from a wastewater treatment plant, *Desalination*, 106, 255-261.
 小野芳朗 (1993) 水環境化学物質の遺伝毒性評価に関する研究, 京都大学学位論文, 3-4.
 大江 武 (1995) O-アセチル転移酵素高産生株を用いた高感度umuテストによる河川水の遺伝毒性モニタリング, 環境変異原研究, 17, 237-246.
 佐々木裕子, 木瀬晴美, 菊池幹夫 (1996) 河川の変異原性とその原因物質の検索について, 環境変異原研究, 18, 21-27.
 Oda, Y., H. Yamazaki, M. Watanabe, T. Nohmi and T. Shimada (1993) Highly sensitive *umu* test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM 3009 having high *O*-acetyltransferase and nitroreductase activities, *Environ. Molecule Mutagenesis*, 21, 357-364.
 Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water. *Mutagens in Yodo river system, Kyoto-Osaka*, *Bull. Environmental Contamination Toxicol.*, 44, 521-528.
 毛利紫乃, 宗宮 功, 小野芳朗 (1996) 都市水環境中に存在するヒト食生活由来の遺伝毒性物質のリスク評価, 水環境学会誌, 19, 847-854.
 Watanabe, M., T. Nohmi and M. Ishidate, Jr. (1987) New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to nitroarenes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 974-979.
 Watanabe, M., M. Ishidate, Jr. and T. Nohmi (1990) Sensitive method for detection of nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase levels, *Mutat. Res.*, 234, 337-348.

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「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」(S1-7)

水中変異原と生物影響

Effects of environmental mutagens and carcinogens on aquatic animals

木苗直秀

Naohide Kinae

静岡県立大学食品栄養科学部 422 静岡市谷田 52-1

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

(受理: 1997年3月14日)

Summary

Many kinds of chemicals used on the land drain ultimately into aquatic environments such as rivers, lakes and the seashore. Among them, mutagenic and/or carcinogenic compounds have tumorigenic and teratogenic on aquatic organisms. Certain mutagenicity tests, including the Ames test, the micronucleus test and the comet assay, may be useful in examining the biological quality of water and in determining DNA damage in aquatic animals.

Therefore, we recommend the use of these mutagenicity tests in addition to physico-chemical analysis for evaluation of the aquatic environment.

Keywords: water environment, mutagen, carcinogen, Ames test, micronucleus test, comet assay, fish tumor, risk assessment

諸 言

わが国では第2次世界大戦以降、産業の高度成長に伴い、多くの化学物質が合成され、使用されたことにより物質的に豊かで、文化的な生活が営まれるようになつた。現在までに CAS ナンバーは 1100 万を超えて、さらに毎年数十万種の化学物質が追加されている。我々の生活環境中には、およそ 8 万種の化学物質が存在すると言われており、それらの多くが下水処理場で分解、除去されるが、一部は河川、湖沼、沿岸水域に移動する。その移動過程で化学物質が植物性プランクトン、動物性プランクトン、小型魚類、大型魚類へと食物連鎖を通して生体濃縮されることが明かにされている。また、いくつかの化学物質は直接的、間接的に大気、水、土壤、食品に混入すると考えられる。昭和 40 年以降、特に DDT, HCH (BHC), PCB, ダイオキシンなどの有機塩素系化合物とともにトリプチル錫化合物、有機ヒ素化合物などによる食品汚染が問題となつた。それ以前からの水俣病やイタタイ病の原因とされる水銀やカドミウムの人体汚染は余りにも大きな社会問題であった。

現在、水汚染のモニタリングに化学的酸素要求量 (COD), 生物化学的酸素要求量 (BOD), 全有機炭素量 (TOC) を測定する方法が一般的である。また、当該汚染物質を試験水より抽出し、定量する化学分析法も繁用されている。しかし、これらの手法は微量ながら混在している化学物質の毒性を総合的に評価するものではなく、分解性や総量、特定の化学物質による汚染を把握できるが、汚染を生物的に評価することは困難である。最近、細菌や培養細胞、生物個体を用いる各種バイオアッセイ法の利用が試みられている。特に 1980 年以降、わが国や米国の大淡水域と海水域で悪性腫瘍いわゆる“癌”的魚類が捕獲されており、原因となる発がん物質や変異原物質を検索することが極めて重要な作業になってきた。

そこで、筆者らは 10 数年前より、わが国の沿岸に棲息する魚類について、腫瘍に関する疫学調査とともに、同水域より変異原性、がん原性物質の分離を試みている。

本稿では、既に報告した変異原性試験を用いて魚類腫

瘍の発生原因を追究した研究事例と水中に存在する変異原物質を検索する手段として水生生物を利用する事例について筆者らの研究成果を含めて記述する。

1. 魚類腫瘍に関連する変異原物質の検索

魚類の腫瘍発生原因としては哺乳動物と同様に、化学的要因(変異原物質、発がん物質など)、生物学的要因(ウイルス、遺伝因子など)、物理的要因(浸透圧、機械的刺激、放射線など)が考えられる。化学物質と魚類腫瘍とのかかわりについて歴史的に見ると1941年、米国のLuckéらがナマズの可移植性口辺上皮種を報告したのが最初であり、その後主として多環芳香族炭化水素類(PAH)と有機塩素系化合物により誘発したと推定される事例がいくつか報告されている。それらの代表的なものをTable 1に示した(木村ら、1986;木苗、1988)。特にベンズ(a)ピレンを含むPAHや塩素処理工程で生

成する有機塩素化合物で汚染された水域に棲息する魚類の中で、欧米ではbrown bullheadやcatfish, English sole, white croakerなど、日本では、ハゼ、ゴンズイ、ニベなどの底棲魚に高率で皮膚がんや肝がんが見いだされている。最近、Baumanらはコーカスプラントを閉鎖した水域で底質と魚類中のPAH濃度が減少し、魚類の肝がん誘発頻度が低下することを見いだしている(Bauman and Harshbarger, 1995)。筆者らは木村らとの協同研究で疫学的調査と実験室での研究成果から、ニベの腫瘍発生に有機塩素系化合物が深い関わりをもつものと推定している(木苗、1993a)。すなわち、日本列島の太平洋岸に棲息するニベ(*Nibe a mitsukurii*)やゴンズイ(*Plotosus anguillaris*)が紀伊半島において局的に皮膚黒色腫瘍を多発することを疫学調査で見いだした(木村、1991)。科学技術庁支援のプロジェクトチームが編成され、ウイルス、遺伝因子、寄生虫、特定化学物質な

Table 1. Fish tumors which may correlate with environmental contaminants.

fish species	country	tumor (incidence %)	supposed chemicals	researcher
hagfish (<i>Myxine glutinosa</i>)	USA	hepatocellular carcinoma (5)	PCBs, DDT	Falker (1977)
Atlantic tomcod (<i>Micromesistius tomcod</i>)	USA	hepatocellular carcinoma (25)	PCBs	Sumith (1979)
nibe (<i>Nibe a mitsukurii</i>)	JPN	skin chromatophoroma (47)	waste water	Kimura&Kinae (1984)
English sole (<i>Parophrys vetulus</i>)	USA	hepatoma, cholangio carcinoma (32)	PAHs	Black (1983)
black bullhead (<i>Ictalurus melas</i>)	USA	lip papilloma (73)	chlorinated waste water	Grizzle (1984)
nibe (<i>Nibe a mitsukurii</i>)	JPN	skin chromatophoroma (27)	?	Kinae (1996)

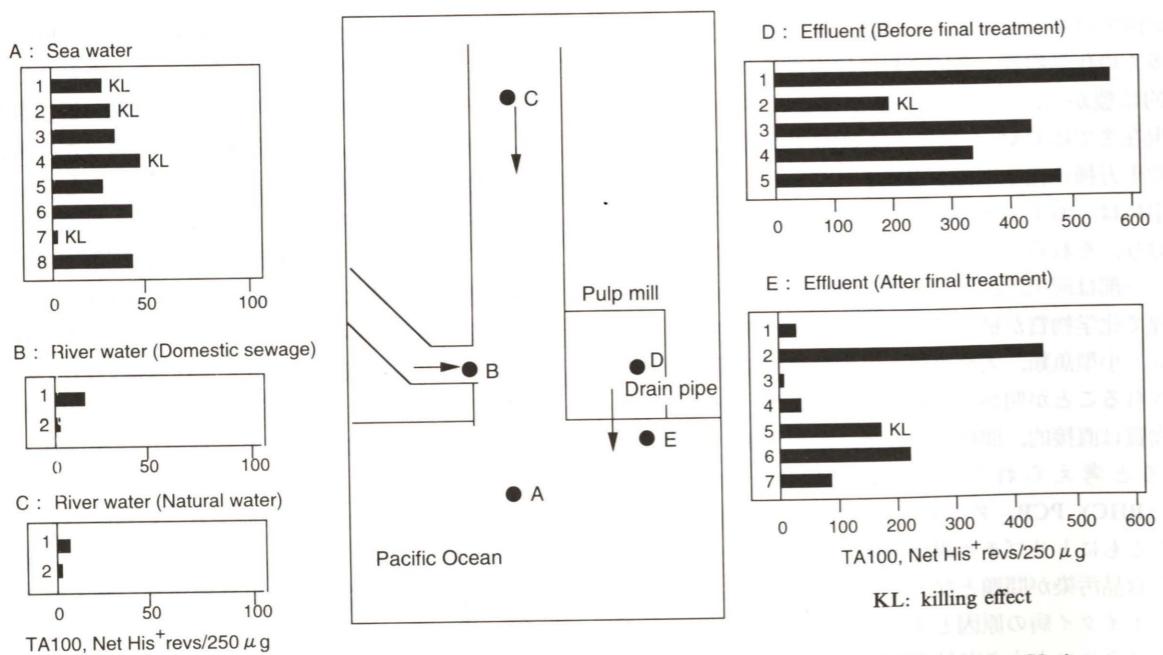


Fig. 1. Mutagenic activity of ether extracts from water samples on *S. typhimurium* TA100 without S9mix.

Table 2. Induction of tumors in fish by exposure of effluents.

Species	Effluent	Exposure (hr×time)	No. of fish examined	No. of fish with tumor*	Incidence (%)
<i>Plotosus anguillaris</i> (Gonzui)	D	12×7	7	7	100
	E	12×7	20	24	70
	NP (1ppm)	2×7	23	21	91
	control	—	10	1	10
<i>Nibe a mitsukurii</i> (Nibe)	D	48×1, 8×6	13	0	0
	E	48×1, 8×6	4	1	25
	NP (1ppm)	1×14	23	20	87
	control	—	39	0	0

NP : 6-hydroxymethyl-2-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]pyridine

* : melanosis (Gonzui), melanophoroma (Nibe)

Table 3. Contribution ratio of mutagenic activity of identified compounds to the total mutagenic activity of ether extract from each effluent.
C-stage means the effluent on bleaching stage with chlorine.

Compounds	Mutagenicity (net, rev/l)			Contribution ratio (%)		
	C-stage	D	E	C-stage	D	E
1,3-dichloroacetone	3240	87	0	0.49	2.14	0
1,1,3-trichloroacetone	18300	496	0	2.74	12.2	0
1,1,3,3-tetrachloroacetone	35100	215	0	5.27	5.28	0
pentachloroacetone	4320	4	0	0.65	0.1	0
methylglyoxal	1570	140	51	0.24	3.44	9.3
diacetyl	1	0	1	0	0	0.2
Sum of identified compounds	63300	943	55	9.5	23.2	9.5
Total activity of ether ext.	667000	4070	580	(100)	(100)	(100)

どとの関連が詳細に検討された(Kimura *et al.*, 1989)。しかし、いずれも明確な結論は得られなかった。そこで、筆者らは化学物質による腫瘍誘発を想定してさらに実験を進めた。両魚類が棲息する水域に流入していた2種の製紙工場排水(最終処理前のD排水、および最終処理後のE排水)について、それぞれエーテル抽出物を調製したのち、Ames法(Ames *et al.*, 1975)により変異原性試験を行った。その結果、特に最終処理前のD排水が *S. typhimurium* TA100, -S9mixで強い変異原性を示した(Fig. 1)。両排水をゴンズイに暴露して腫瘍誘発実験を試みたところ、D排水は100%、E排水は70%の個体に皮膚過形成(メラノーシス)を誘発した(Table 2)。なお、ニベに対しても低率ながら自然界と

同様な黒色腫瘍を誘発した。D、E排水のエーテル抽出物にGC-MS法を適用して変異原性物質を検索したところ、Table 3に示すように、1,3-dichloroacetoneを含む5種のクロロアセトン類、メチルグリオキサール、ジアセチルを分離同定した。しかし、これら有機化合物の各排水の総変異活性に対する寄与率はD排水が23.2%、E排水が9.5%と低値であった。1,3-dichloroacetoneをヒメダカ(*Orizias latipes*)に暴露すると消化管およびえらに上皮過形成が誘発されたこと、およびメチルグリオキサールやジアセチルがイニシエーター活性とプロモーター活性を有することから、同定したこれら化学物質がニベやゴンズイの腫瘍発生に関与しているものと考えている(Kinae and Yamashita, 1990)。1992年の同海域に

における腫瘍ニベの疫学調査においても 20% 程度の腫瘍誘発がみられた。なお、1996 年には数百キロ離れた静岡県太平洋沿岸でもニベに 27% の割合で皮膚黒色腫瘍が発生していることが判明した。先の腫瘍多発水域と地理的条件が異なることから、Table 3 に掲げた化学物質とは異なる変異・がん原物質が関与している可能性が考えられたので、現在、疫学調査と原因究明のための実験を開始したところである。

2. バイオアッセイ法を用いる水中変異原のモニタリング

染色体異常を間接的に検定するために小核試験が用いられるようになった (MacGregor, 1980)。本法は細胞分裂時に染色体が二つの染色分体に分かれて両極に移動する際、染色体異常誘発物質に暴露されると染色体の一部が切断され、それが小核となって赤道面上にとり残されたものをアクリジンオレンジで染色したのち、蛍光顕微鏡で測定するものである (林, 1991, 1996; 木苗ら, 1993b)。筆者らは、操作法が比較的簡単で、短時間で結果が得られる本法を水環境汚染のモニタリング法として活用出来るか否かを検討している。1994 年度に、静岡県の太平洋沿岸に位置する清水港、用宗港、大井川港を定点として海水を採取した。理化学試験を行ったの

ち、試験水の一部をアンバーライト XAD-2000 樹脂に通した。吸着物をエーテル抽出し、*Salmonella typhimurium* TA100 を用いて -S9mix で Ames 法 (Ames et al., 1975) により変異原性を検定した。また、各水域よりヒイラギ (*Leiognathus nuchalis*) を含む沿岸魚を釣りで捕獲し、末梢血およびえらを採取したのち、細胞 1000 個当たりの小核誘発頻度を調べた。その結果、3 地点の中、用宗港の海水が最も高い変異原性を示し、魚類の中では、ヒイラギのえらにおいて小核出現頻度が高いことが示された (木苗ら, 1995; Hayashi et al., in press)。そこで、1995 年から 1996 年にかけて、用宗港で海水とヒイラギを定期的にサンプリングし、年内変動を調べた。その結果、海水の変異原性は 10 月に 150 revs/100 ml 海水と最高値を示したが、冬季から春季は低値であった (Fig. 2)。しかし、COD 値には明確な季節変動がみられなかった。ヒイラギの小核出現頻度は 7-8 月に末梢血で 1.4-1.6%，えらで 8.0-8.2% と高値を示した (Fig. 3)。えらの小核誘発頻度は末梢血の小核誘発頻度および海水のエーテル抽出物量との間にそれぞれ $r = 0.821$, $r = 0.798$ と高い相関性を示した (Fig. 4)。しかし、海水の変異原性は COD やえらの小核誘発頻度との間に相関はみられなかった。化学物質による汚染が推測された淡水域および海水域の水生生物について小核試験が行われた

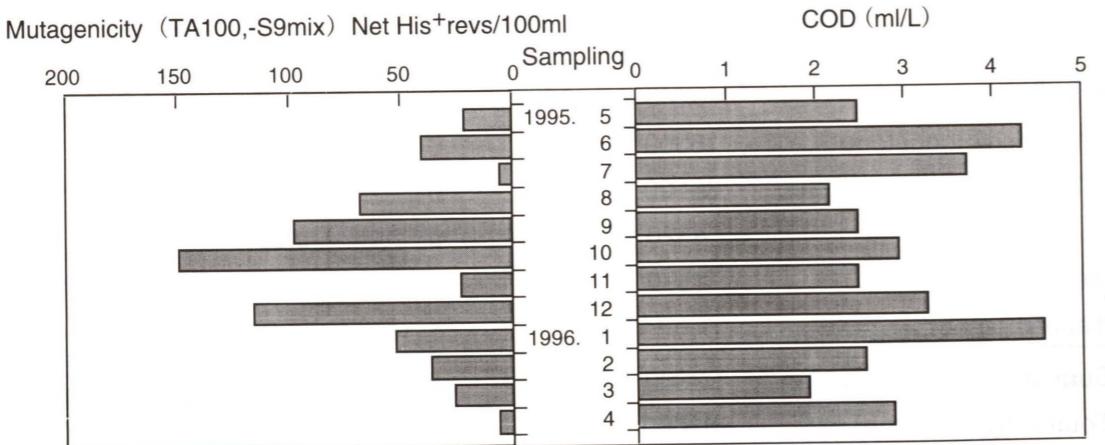


Fig. 2. Mutagenic activity and COD values of sea water (Mochimune).

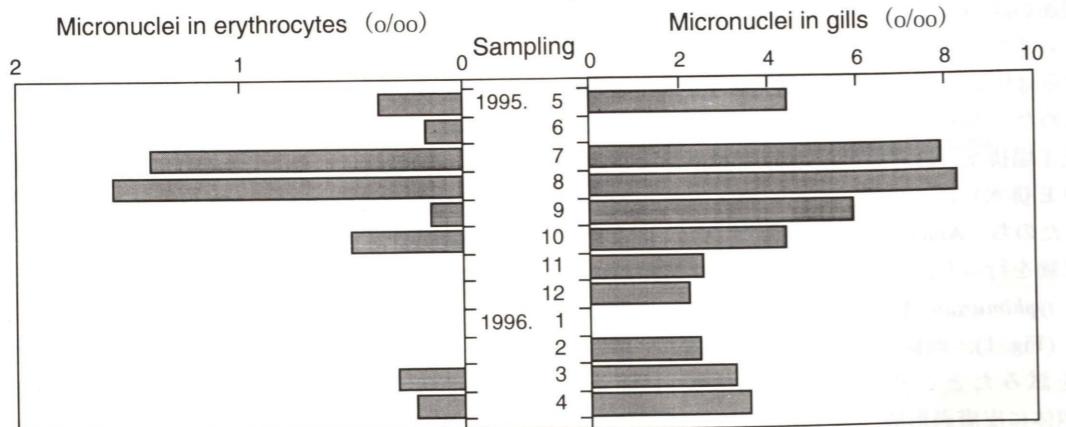


Fig. 3. Change of micronuclei frequencies in peripheral blood erythrocytes and gills of Huiragi (*Leiognathus nuchalis*).

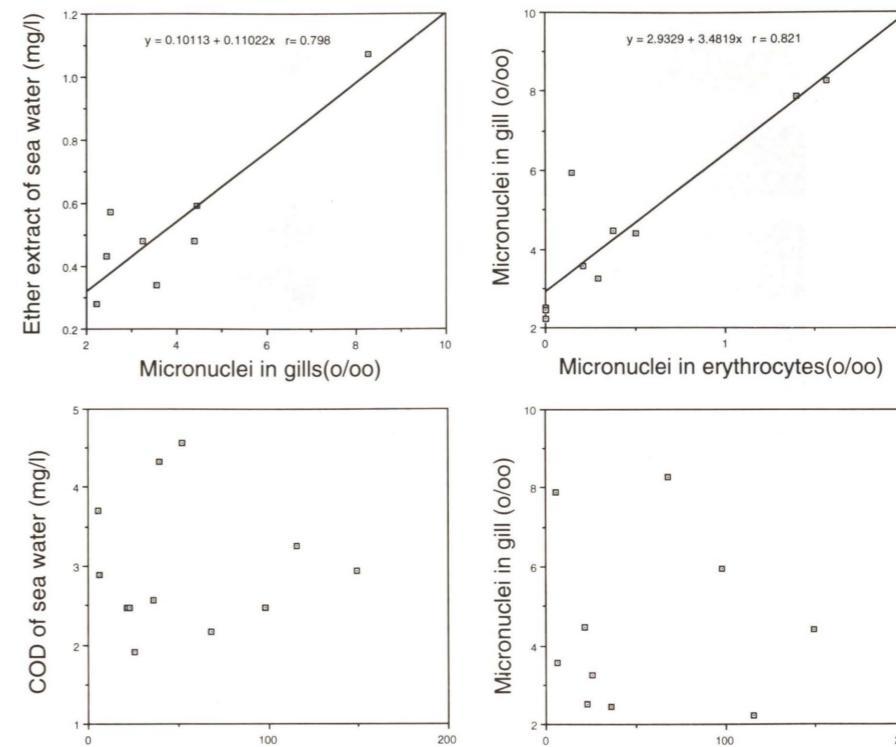


Fig. 4. Correlations between micronuclei frequencies of Huiragi and COD or ether yield of coastal water.

Table 4. Micronuclei frequencies of aquatic organisms.

aquatic organism	sampling point or exposed chemical	Micronuclei Frequency (o/oo)	researcher
fresh water			
<i>Ictalurus nebulosus</i> (brown bullhead)	The Great lakes	0.50~0.66	Smith et al., 1990
<i>Carassius auratus</i> (gold fish)	MX	2.0~3.0	Kinae et al., 1992
	D.R.Extract	5.0~12.0	"
sea water			
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (mussel)	MMC	2.2~10	Majone et al., 1987
<i>Mytilus edulis</i> (mussel)	Tuscan coast	2.2~9.5	Scarpato et al., 1990
	Coast of Jutland	1.35~2.87	Wrisberg et al., 1991
<i>Genyonemus lineatus</i> (white croaker)	Coast of S.California	0.8~3.4	Hose et al., 1987
<i>Paralabrax clathratus</i> (kelp bass)	"	0.6~6.8	"
<i>Leiognathus nuchalis</i> (hiragi)	Suruga bay	0.5~3.0	Kinae et al., 1996

MMC : mitomycin C MX : 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone

D.R.Extract : drinking water extract

事例を Table 4 に示した。魚類とともに貝類が試験生物として使用できるものと思われる。変異原性を示した用宗港海水の抽出物を金魚 (*Carassius auratus*) の腹腔内に投与したところ、72-96 時間後に末梢血とえらの小核が有意に上昇することを確認した (Hayashi et al., in press)。高井らは河川水の水質について上流域と中流域のオイカワ (*Zacco platypus*) を捕獲してえらの小核誘発頻度を比較し、中流域の魚類が高値を示すことを報告し

ている (Hayashi et al., in press)。近年、単一細胞を用いて DNA 損傷性（一本鎖切断およびアルカリ易溶出部位）を高感度に検出できる方法として Single cell gel electrophoresis (SCG) アッセイが注目されている (Singh et al., 1988)。本法は単離した細胞をアルカリで溶解し、DNA の巻戻し (unwinding) を行ったのち、電気泳動を行ない、染色後に蛍光顕微鏡で観察するもので、DNA 損傷があると流星状の挙動がみられるところからコメット

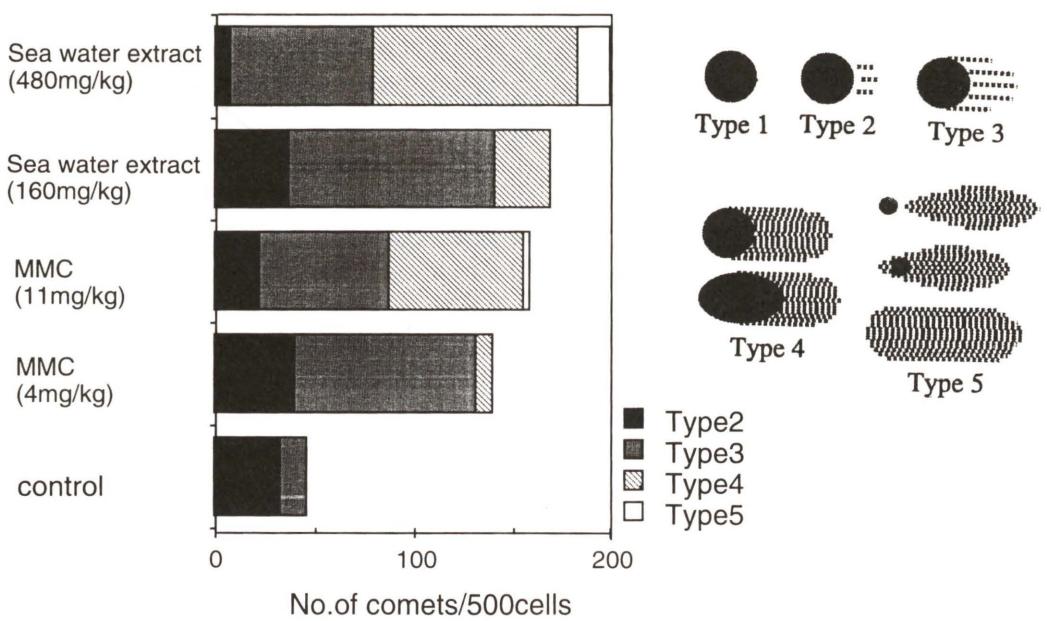


Fig. 5. Induction of DNA damage in goldfish erythrocytes by administration of ether extract of coastal water.
MMC: mitomycin C.

アッセイとも呼ばれる (McKelvey-Martin *et al.*, 1993)。本法は細胞数が少ない場合でも数時間で結果を得ることが出来るので、DNA 損傷を検定する変異原性試験として今後さらに用いられるものと思われる。先に分離した用宗港海水の抽出物を金魚の腹腔内に投与し、3 時間後にコメットアッセイを行ったところ、投与量に比例して、DNA 損傷が増大すること（タイプ 2-5 の比率が増加）を確認した (Fig. 5)。

最近、佐々木らはホタテ貝 (*Patunopecten yessoensis*) やアサリ (*Tapes japonica*) を用いて大阪湾や東京湾などの汚染海水に一定時間暴露したのち、コメットアッセイを適用したところ、対照水域の海水と比べてえらにおける DNA 損傷が有意に惹起されることを報告している (祖父尼ら, 1996; 西館ら, 1996)。

これらの実験より、沿岸海水や河川水中には染色体異常や DNA 損傷をもたらす物質が存在すること、また、実際に棲息する魚類がそれらの化学物質の影響を受けている可能性が強く示唆された。

結語

今後、指標となる水生生物を厳選し、えらや末梢血等を用いて小核試験やコメットアッセイを行い、従来から実施されている理化学的手法と併せて評価するならば、水環境汚染のモニタリングがより精度の高いものになるものと思う。

参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/Mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.
Bauman, P. C. and J. C. Harshbarger (1995) Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant
- McKelvey-Martin, V. T., M. H. L. Green, P. Schmezer, B. L. Pool-Zobel, H. P. De Meo and A. Collins (1993) The single cell gel electrophoresis assay (commet assay): A European review, *Mutat. Res.*, **188**, 47-63.
西館絵美、泉山房子、佐々木 有、林 真、祖父尼俊雄 (1996) ホタテ貝えら細胞の SCG 法による海水汚濁の検出、日本環境変異原学会第 25 回大会要旨集, p. 93.

Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, **175**, 184-191.
祖父尼俊雄、林 真、松岡厚子、本間正充、鈴木孝昌、上田高嘉、上野紘一、和田克彦、小嶋吉雄、木苗直秀、早乙女京

子、田中憲穂、高井明徳、佐々木 有 (1996) 水生生物の細胞遺伝毒性を指標とした水質汚染モニタリングの開発に関する研究、環境保全研究成果報告書 (平成 8 年度) p. 12-1-19.

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
 「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」(S2-1)

変異原性試験による癌原性物質の検出状況

Current status and prospects of the detection of carcinogens by genotoxicity tests

森 田 健

Takeshi Morita

日本グラクソ株式会社 筑波研究所 300-42 茨城県つくば市和台 43

Tsukuba Research Laboratories, Nippon Glaxo Ltd.,
 43 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-42, Japan

(受理: 1997年2月25日)

Summary

Genotoxicity tests, which can be performed *in vitro* and *in vivo*, are designed to detect compounds which induce genetic damage, directly or indirectly, by various mechanisms. Compounds positive in these tests have the potential to be both human carcinogens and/or mutagens. Over the last two decades, the tests have become well established in routine testing schemes for carcinogen identification. Analysis of the results from tests performed with rodent carcinogens and non-carcinogens have demonstrated the over-sensitivity of *in vitro* assays, the insensitivity of *in vivo* assays, and a concordance value of approximately 60% for each assay type in predicting carcinogenic activity. The advantages, limitations and possible improvements of genotoxicity tests are discussed in this review. The recent revolution in molecular biology and genetic analysis has contributed to the development of new assays and technologies for carcinogen identification. Such new approaches will be even more useful and effective for the detection of carcinogens and for risk assessment.

Keywords: genotoxicity tests, detection of carcinogens, prediction of carcinogenicity, new approaches

緒 言

遺伝毒性試験の目的は種々の遺伝子機能のメカニズムを利用して、化学物質により直接あるいは間接的に生じたDNA変異・損傷や遺伝的障害を検出することにある。この試験において陽性を示した化学物質は、ヒトに対して癌原性や遺伝的疾患を誘発する可能性があるとされる。これまでに主要な遺伝毒性試験については齧歯類における癌原性との相関性が検討されてきた (Tennant *et al.*, 1987; Zeiger *et al.*, 1990; Mavourin *et al.*, 1990)。そして癌原性物質の約2割は non-genotoxic carcinogen であること、また genotoxic non-carcinogen の存在も明らかとなった。一方で、発癌のメカニズムに関する分子レベルの研究は急速な進展をみせ、癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の不活性化に代表される複数の遺伝子変異や、細胞増殖制御に関わる機能の崩壊が発癌において重要な役割を担っていることが明らかとなってきた (Barrett,

1993)。さらに分子生物学や遺伝的解析の進展により、遺伝毒性関連分野においても種々の新しい技術や方法が次々と紹介されている。本稿では、癌原性物質の予測における現状と問題点を明らかにし、今後の歩むべき展望を述べたい。

1. 遺伝毒性と癌原性の相関性

遺伝毒性試験には多種多様な方法があるが、ここでは現在最も汎用され、かつデータベースの充実している試験として Ames 試験, *in vitro* 染色体異常試験 (以下、染色体異常試験), マウスリンフォーマ tk 試験 (以下, MLA) および骨髄・末梢血小核試験 (以下、小核試験)を取り上げる。Table 1 に各試験の癌原性物質を陽性と検出する感受性と非癌原性物質を陰性と検出する特異性、ならびに遺伝毒性と癌原性の一一致すなわち総合検出力を示す。これらの値は引用したデータベースにより

Table 1. Correlation of genotoxicity tests with carcinogenicity.

Correlation	in vitro assay 1)			in vivo assay 2)	
	Ames	CA	MLA	Total (in vitro)	MN
Sensitivity (%)	48	52	72	79	57
Specificity (%)	91	72	40	32	50
Concordance (%)	66	61	59	60	56

1) Zeiger *et al.*, 1990 (114 chemicals).2) Mavourin *et al.*, 1990 (103 chemicals).

Abbreviations: Ames: Ames test, CA: *in vitro* chromosomal aberration test, MLA: mouse lymphoma tk locus assay, MN: rodent bone marrow or peripheral blood micronucleus test.

Table 2. Sensitivity of genotoxicity tests to IARC human carcinogens.

Assays 1)	IARC Group	Number of chemicals			total (%)
		positive (%)	inconclusive (%)	negative (%)	
Ames	1	29 (72.5)	0 (0)	11 (27.5)	40 (100)
	2A	33 (84.6)	0 (0)	6 (15.4)	39 (100)
	2B	125 (74.4)	1 (0.6)	42 (25.0)	168 (100)
	1+2A+2B	187 (75.7)	1 (0.4)	59 (23.9)	247 (100)
CA	1	22 (91.7)	0 (0)	2 (8.3)	24 (100)
	2A	27 (84.4)	1 (3.1)	4 (12.5)	32 (100)
	2B	72 (68.6)	1 (0.9)	32 (30.5)	105 (100)
	1+2A+2B	121 (75.2)	1 (1.2)	38 (23.6)	161 (100)
MLA	1	10 (83.3)	1 (8.3)	1 (8.3)	12 (100)
	2A	22 (95.6)	0 (0)	1 (4.4)	23 (100)
	2B	50 (76.9)	3 (4.6)	12 (18.5)	65 (100)
	1+2A+2B	82 (82.0)	4 (4.0)	14 (14.0)	100 (100)
MN	1	24 (68.6)	3 (8.6)	8 (22.9)	35 (100)
	2A	18 (54.5)	3 (9.1)	12 (36.4)	33 (100)
	2B	47 (45.6)	16 (15.5)	40 (38.8)	103 (100)
	1+2A+2B	89 (52.0)	22 (12.9)	60 (35.1)	171 (100)

1) Abbreviations: See Table 1. Data from Morita *et al.*, 1997.

異なるが、ここではアメリカ NTP データベースを選択した (Mavourin *et al.*, 1990; Zeiger *et al.*, 1990). *In vitro* 試験の感受性は、Ames 試験で 48%、染色体異常試験で 52%、MLA で 72%、これら 3 試験の組合せでは 79% となる。この 79% の感受性から、癌原性物質の約 20% は、通常の遺伝毒性試験では検出できない non-genotoxic carcinogen であることが示唆されている。特異性は、Ames 試験で 91% と優れているが、*in vitro* の 3 試験の組合せでは極端に低くなり 32% である。*In vivo* 試験の小核試験では、感受性は 57% と MLA に次いで高い値を示すが、特異性は 50% と低くなっている。いずれの試験も感受性と特異性を加味した総合検出率は約 60% で、最も高い Ames 試験で 66% である。

2. 遺伝毒性試験のヒト癌原性物質に対する感受性

Table 1 において評価に用いた癌原性物質は主に齧歯

類癌原物質である。一方、ヒトにおける癌原性との関連はどうであろうか。IARC (International Agency for Research on Cancer) で評価されたヒト癌原性物質の遺伝毒性試験による検出性 (感受性) は、齧歯類癌原性物質に比べ高いことが報告されている (Kuroki and Matsushima, 1987; Shelby and Zeiger, 1990). JEMS·MMS 研究会では小核試験によるヒト癌原性物質の検出性を総合的に評価するための共同研究を実施した (Morita *et al.*, 1997)。ここで評価したヒト癌原性物質は、1995 年前半の時点において IARC が評価した化合物群から工業過程や職業暴露などを除いたもので、グループ 1 の human carcinogen で 43 種、グループ 2A の probable human carcinogen で 40 種およびグループ 2B の possible human carcinogen で 197 種の計 280 種類である。なお、共同研究ではグループ 1 から 13 種、2A から 23 種および 2B から 67 種の計 103 種類のヒト癌原性物質を選択し、小核

Table 3. Sensitive chemical classes in rodent micronucleus assays*.

Sensitive chemical classes	Positive ratio (No. of chemicals)
Aminobiphenyl and benzidine derivatives (<chem>H2N-C6H4-C6H4-NH2</chem>)	100% (7/7)
Bis(2-chloroethyl) compounds (-N(CH ₂ CH ₂ Cl) ₂)	100% (6/6)
Sulfonate and sulfates (SO ₃ , SO ₄)	100% (6/6)
N-nitroso compounds (acyl-type) (RCO-N-NO)	100% (5/5)
Hydrazines (-NH-N-CH ₃ CH ₃)	100% (4/4)
Aziridines (<chem>NC1=CC=C1</chem>)	100% (3/3)
Azo compounds (-N=N-)	88% (7/8)

Morita *et al.*, 1997

* Chromosomal aberration tests with bone marrow are also included.

Table 4. Insensitive chemical classes in rodent micronucleus assays*.

Insensitive chemical classes	Positive ratio (No. of chemicals)
Halogenated compounds (-CH ₂ -Cl)	27% (4/15)
Steroids and other hormones (Hexestrol, 17 β -Estradiol, Testosterone, etc.)	29% (2/7)
Silica and metals and their compounds (Be, Cd, Co, Si)	33% (3/9)
N-nitroso compounds (dialkyl type) (CH ₃ -N-NO/CH ₃)	36% (4/11)
Aromatic amines (<chem>C6H5-NH2</chem>)	36% (4/11)

Morita *et al.*, 1997

* Chromosomal aberration tests with bone marrow are also included.

1) 化学構造と小核誘発性

ヒト癌原性物質に対する感受性は *in vitro* 試験の 8 割前後に比べ小核試験は 5 割と低いが、その検出は極めて化学構造に依存していた。小核試験に感受性を示した化合物群には、アミノビフェニル類およびベンチジン誘導体、ビス(2-クロロエチル)化合物、サルフォネートおよびサルフェート類、アシルタイプの N-ニトロソ化合物、ヒドラジン類、アジリジン類およびアゾ化合物類が挙げられ、アゾ化合物を除き、いずれも 100% の陽性率を示した (Table 3)。一方、ハロゲン化合物類、合成ステロイド類およびホルモン類、金属化合物類、ジアルキルタイプの N-ニトロソ化合物および芳香族アミン類の陽性率は低く、約 30% であった (Table 4)。これら非感受性を示す化合物を除いてヒト癌原性物質の小核試験陽性率を評価するとグループ 1 で 69% から 91% に、2A で 55% から 65% に、2B で 46% から 60% に、1 から 2B の合計

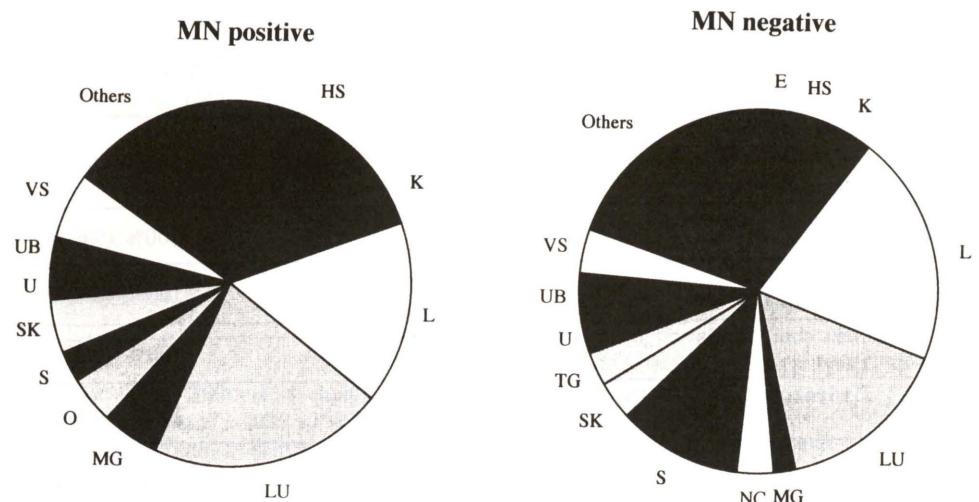


Fig. 1. Proportion of target tissues for micronucleus assay-positive and -negative chemicals (Morita *et al.*, 1997). Total numbers of target tissues are 143 or 91 in MN-positive or -negative chemicals, respectively. Abbreviations: E: esophagus, HS: hematopoietic system, K: kidney, L: liver, Lu: lung, MG: mammary gland, NC: nasal cavity, O: ovary, S: stomach, SK: skin, TG: thyroid gland, U: uterus, UB: urinary bladder, VS: vascular system.

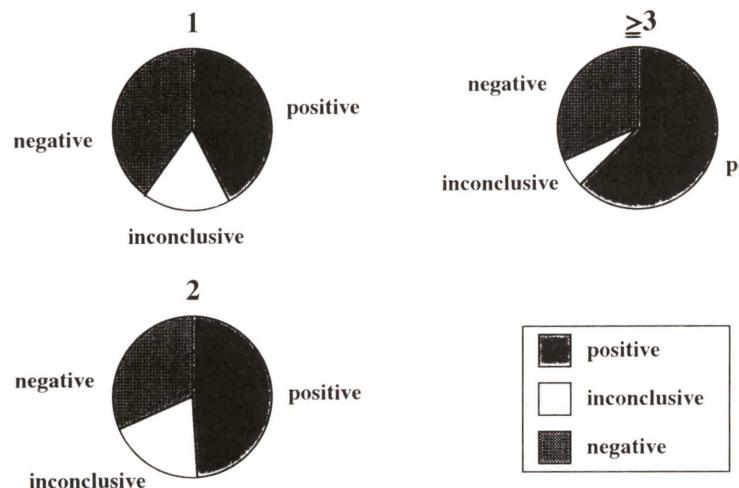


Fig. 2. Relationship between number of target tissues and response in the mouse micronucleus test (Morita *et al.*, 1997). Numbers of chemicals are 45, 41 and 35 in 1-, 2- and 3 or more-target tissues, respectively.

では52%から67%に上昇する。このことから、非感受性に分類される化合物は、小核試験が陰性であってもその安全性評価は慎重に行う必要があることが示唆される。

2) マウスにおける発癌部位と小核誘発性

先に示したヒト癌原性物質の小核誘発性は、そのほとんどがマウスを用いて評価されたものである。IARCヒト癌原性物質の小核誘発性とマウスに対する発癌部位の延べ数に占める各臓器の割合をFig. 1に示す。小核陽性化合物($n=89$)は肺、肝、造血系組織を標的臓器を持つものが多く、例えば、造血系組織では標的臓器総数143のうち21(約15%)を占めた。小核陰性化合物($n=60$)では肝、肺、胃を標的臓器を持つものが多く認められた。また、造血系組織を標的臓器にもちながら小核を誘発しないものはわずかしかなく、骨髄細胞あるいは末梢血を指標とする小核試験の特徴が現れている。小核誘発性に

かかわらず肝と肺の割合が高いのは、複数の標的臓器をもつ化合物の多くが肝や肺にも発癌性を示すことに起因している。

3) 発癌標的臓器数と小核誘発性

IARCヒト癌原性物質のマウスにおける発癌標的臓器数と小核試験の結果をFig. 2に示す。標的臓器数が1(化合物数 $n=45$)、2($n=41$)、3以上($n=35$)と増すにつれ、小核陽性となる化合物の割合もそれぞれ42%、49%、63%と増え、多数の臓器に癌原性を誘発する化合物ほど小核試験において陽性となる率が高いことが示された。

4) ヒトにおける癌原性と小核誘発強度

小核を誘発したヒト癌原性物質のうち、強い小核誘発性を認めた化合物の割合をFig. 3に示す。MMS研究会が試験して陽性となった化合物について便宜上、100mg/kg以下の用量で1%以上の小核誘発率を示したもので線引きを行った。グループ1、2A、2Bとヒトへの発

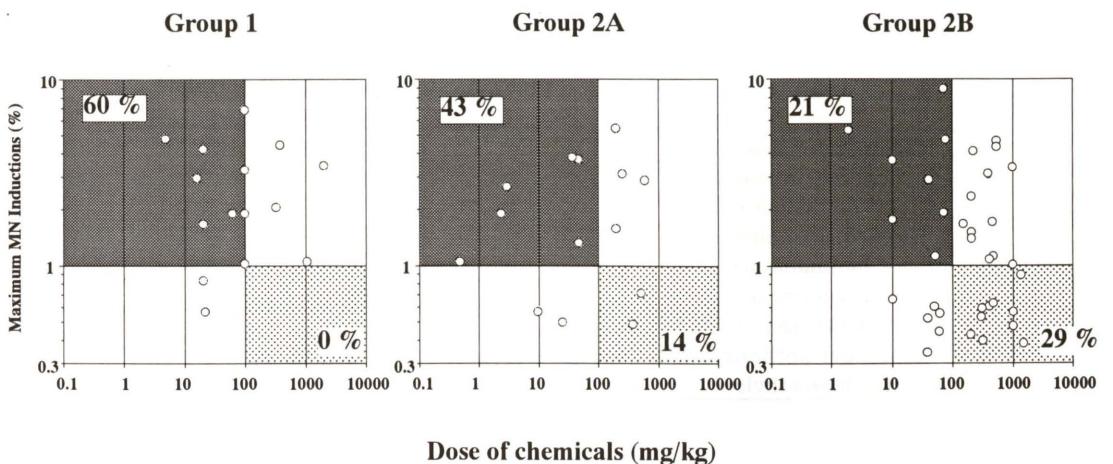


Fig. 3. Maximum frequency of micronucleated immature erythrocytes induced by IARC carcinogens (Morita *et al.*, 1997). The dose levels are given mg/kg body weight per treatment without respect to treatment times.

Table 5. Refinement of Ames test protocol: Combination use of plate and preincubation methods.

S9	Methods	No. of drug candidates		
		+	-	Total
Absence	Preincubation method	+	3	5
	Preincubation method	-	0	55
	Total	3	57	60
Presence	Preincubation method	+	26	35
	Preincubation method	-	22	200
	Total	48	209	257

Gatehouse *et al.*, 1994

癌の証拠が少なくなるにつれ、強い小核誘発性を示す化合物の割合もそれぞれ60%、43%、21%と減少し、逆に小核誘発性の弱い化合物の割合が0%、14%、29%と増えた。このことは、小核誘発能の強さとヒトにおける癌原性の証拠の強さには相関性のあることを示しており、100mg/kg以下の用量で1%を超える小核誘発率を示す化合物は、ヒトにおいても発癌性を示す危険性が高いといえる。従って化学物質の発癌性の予測においては、単に陽性か陰性かをもとに考察するだけでなく、その反応の強さをも考慮する必要があろう。

4. 遺伝毒性試験の癌原性物質予測における問題点と対応

遺伝毒性試験による癌原性物質の検出状況から明らかとなった癌原性の予測における問題点とその対応について事例を挙げながら考える。

1) 低い総合検出率

約60%という低い総合検出率を改善するためには、洗練したプロトコールによる試験の実施や新試験の導入を行って感受性を増加させるとともに、結果の評価に際しては統計学的評価のみならず生物学的意義を考慮して偽陽性を減少させる必要がある。特にプロトコールの洗練は、現在実施している試験において容易に感受性を改善させることができ、有効な方法といえる。Table 5に医

薬品候補化合物をプレート法とプレインキュベーション法を併用したAmes試験の結果を示す(Gatehouse *et al.*, 1994)。S9非存在下の試験において60の化合物のうち2つがプレインキュベーション法でのみ陽性となり、97%(58/60)の一貫性を示した。S9存在下においては257の化合物のうち13がプレート法でのみ陽性となり、88%(226/257)の一貫性であった。また、揮発性の物質は通常の処理方法に替え、テドラーーバックを用いる気相曝露がその変異原性検出に有効であることも報告されている(荒木, 1996)。染色体異常試験においては倍数体の観察が有効な方法である。特にアメリカNTPのプロトコールは、日本(厚生省および労働省)のプロトコールと異なり倍数体の計数が含まれていないため、構造異常のみの観察となる。Table 6にNTPデータベースでMLA unique positive(染色体異常試験ならびにAmes試験では陰性だがMLAのみ陽性)とされた化合物の厚生省プロトコールによる試験結果を示す(Matsuoka *et al.*, 1996)。NTPではchlorodibromomethane, pentachloroetheneやtetrachloroethaneを陰性と評価しているが、倍数体の観察を含めた厚生省プロトコールで試験をすると、これらはいずれも陽性となつた。Bromodichloromethane, chlordic acid, isophoroneは構造異常を示したが、これは処理時間や細胞の違いに起因しているものと考えられている。また、染色体異常試験など哺乳動物培養細胞を用い

Table 6. Refinement of chromosomal aberration test protocol: Observation of polyploid.

Carcinogens	NTP protocol	MHW protocol	
		structural aberration	polyploid
Chlorodibromomethane	—	—	+
Pentachloroethane	—	—	+
1,1,1,2-Tetrachloroethane	—	—	+
Bromodichloromethane	—	+	—
Chloreindic acid	—	+	—
Isophorone	—	+	—
Benzylacetate	—	—	—
Cinnamyl anthranilate	—	—	—
Trichloroethylene	—	—	—

Matsuoka *et al.*, 1996Table 7. Comparison of the responses of *in vitro* genotoxins in two *in vivo* genotoxicity tests.

<i>In vitro</i> genotoxin (Positive in Ames test or <i>in vitro</i> chromosomal aberration test)	Bone marrow micronucleus test	Liver UDS test	Carcinogenicity (Liver carcinogenicity)
Cyclophosphamide	+	—	+ (—)
Hexamethylphosphoramide	+	—	+ (—)
7,12-Dimethylbenzanthracene	+	—	+ (—)
2-Nitropropane	—	+	+ (+)
2,4-Dinitrotoluene	—	+	+ (+)
3-Methyl diaminobenzanthracene	—	+	+ (+)
2-Chloroethanol	—	—	—
8-Hydroxyquinoline	—	—	—
2,6-Toluene diamine	—	—	—
Epichlorohydrin	—	—	+ (—)
<i>o</i> -Anisidine	—	—	+ (—)

Tweats, 1994

た試験においては、非生理的な培養環境に起因する陽性反応（偽陽性）に注意することも重要である。

2) *In vitro* 活性と *in vivo* 活性の相違

一般に *in vitro* 遺伝毒性試験は *in vivo* 試験に比べ感度が高いため、前者では陽性だが後者では陰性という現象が起こり得る。特に *in vitro* 染色体異常試験と小核試験の間ではよく認められる。このような場合には、その物質の癌原性予測には注意を要する。化学物質の構造、血中濃度、移行性、代謝などを考慮して第 2 の *in vivo* 試験の実施が必要となる可能性がある。骨髄以外の組織や臓器を用いた試験、例えば肝 UDS 試験や肝小核試験などによる評価やトキシコカイネティクスの導入が有効と思われる。Table 7 に Ames 試験あるいは染色体異常試験で陽性を示した癌原性物質および非癌原性物質の小核試験および肝 UDS 試験の結果を示す (Tweats, 1994)。小核試験あるいは肝 UDS 試験のいずれかで陽性を示せば癌原性を有する可能性が高く、例外はあるものの両方で陰性を示せば癌原性を持たない可能性が高いといえる。特に 2-nitropropane, 2,4-dinitrotoluene や 3-methyl diaminobenzanthracene など肝に癌原性を示す化合物は、小核試験は陰性でも肝 UDS 試験で陽性となる可能性が高い。また、直接作用型の化合物は胃 UDS 試験も有効と考えられる (Furihata and Matsushima, 1995)。このよう

に UDS 試験は小核試験で検出できない癌原性物質を検出するため相補的に用いることができる。さらに小核試験とともに陰性を示すことで、*in vivo* での活性の欠如を推測することが可能である。

3) Non-genotoxic carcinogen

癌原性物質の約 2 割を占める non-genotoxic carcinogen の存在も癌原性予測における大きな問題である。Non-genotoxic carcinogen による発癌のメカニズムには、酸素ラジカルの細胞内産生、細胞増殖の誘発、細胞周期調節機能の崩壊などいくつかあると考えられている (Tennant, 1993; Tennant and Zeiger, 1993)。肝 RDS 試験は、発癌において重要な役割を占める細胞増殖作用を検出する系である。Ames 試験および染色体異常試験で陰性の non-genotoxic hepatocarcinogen の小核試験および肝 RDS 試験の結果を Table 8 に示す (Uno *et al.*, 1994; Miyagawa *et al.*, 1995)。Carbontetrachloride, benzyl acetate など通常の *in vitro* 遺伝毒性試験では検出されにくいこれらの化合物は、小核試験でも陰性だが、肝 RDS 試験では陽性を示す。11-Aminoundecanoic acid, tris(2-ethylhexyl)phosphate などいくつかの例外も認められるが、肝 RDS 試験はハロゲン化合物、ペルオキシゾーム増生剤、合成ステロイドホルモン類などレセプターを介して細胞の増殖関連シグナルに影響を与える non-

Table 8. Comparison of the responses of non-genotoxic hepatocarcinogens in two *in vivo* genotoxicity tests.

Non-genotoxic carcinogen (Negative in Ames test and <i>in vitro</i> chromosomal aberration test)	Micronucleus test 1)	Liver test 2)	Hepato- carcinogenicity
Carbontetrachloride	—	+	+
Benzyl acetate	—	+	+
Di(2-ethylhexyl)phthalate	—	+	+
α -Hexachlorocyclohexane	—	+	+
11-Aminoundecanoic acid	—	—	+
Tris(2-ethylhexyl)phosphate	—	—	+

1) Data from Morita *et al.*, 1997 and Shelby *et al.*, 1993.2) Data from Uno *et al.*, 1994 and Miyagawa *et al.*, 1995.

Table 9. Use of new cell lines with human metabolising potential.

Chemicals	<i>in vitro</i> micronucleus test		Carcinogenicity
	AHH-1 cells	MCL-5 cells	
1,2-Dichloroethane	+	+	+
Carbontetrachloride	—	+	+
Dichloromethane	—	+	+
Tetrachloroethylene	+	+	+

Doherty *et al.*, 1996Table 10. *In vivo* genotoxicity of *o*-anisidine: Detection of genotoxic activity by transgenic mouse system.

Carcinogenicity	<i>in vitro</i> genotoxicity 1)	<i>in vivo</i> genotoxicity
Mice + (bladder)	Ames +	Bone marrow micronucleus in mice
Rats + (bladder)	CA +	Liver UDS in rats
	MLA +	Liver micronucleus in rats
		DNA strand breaks in rats
		— (bladder, liver etc.)
		DNA binding with ¹⁴ C labeled material in mice
		— (bladder, liver)
		³² P-post labeling in mice
		—
		Big Blue lac I system
		— (liver)
		Big Blue lac I system
		+ (bladder)
		Ashby <i>et al.</i> , 1994

1) Abbreviations: See Table 1.

genotoxic hepatocarcinogen のみならず、Ames 試験あるいは小核試験陽性の non-genotoxic hepatocarcinogen の検出にも有効であるとの報告がある (Yoshikawa, 1996)。

4) ヒト薬物代謝酵素系

S9 に代表される *in vitro* 代謝系とヒトでの代謝の違いも癌原性予測の障壁となっている。ヒトにおける薬物代謝は、化学物質の遺伝毒性ならびに癌原性を評価する上で重要である。近年開発されたヒト薬物代謝酵素を導入した細胞を用いた遺伝毒性試験は、ラット肝 S9 による細胞外代謝と異なり、細胞内でヒト酵素による代謝を行

うことが可能となる利点がある。MCL-5 細胞は、CYP1-A1 を発現している human lymphoblastoid 細胞株 AHH-1 細胞に、ヒト CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2E1 および microsomal epoxide hydrolase の 5 種類の代謝酵素遺伝子 (cDNA) を組み込んだ細胞である。数種のハロゲン化合物について、この細胞を用いた *in vitro* 小核試験を実施したところ、*in vitro* 染色体異常試験で陰性を示す carbon tetrachloride, tetrachloroethylene は陽性の結果を示した (Doherty *et al.*, 1996, Table 9)。また MCL-5 細胞は染色体損傷の検出だけでなく、tk 遺伝子座における遺

Table 11. Carcinogenicity of methyl clophenapate by non-genotoxic mechanisms.

Carcinogenicity	<i>in vitro</i> genotoxicity 1)	<i>in vivo</i> genotoxicity
Mice + (liver)	Ames -	Bone marrow micronucleus in mice -
Rats + (liver)	CA (human lymphocytes) -	Liver UDS in rats -
	CA (CHO cells) -	Muta Mouse (<i>lac Z</i>) - (liver)
		Big Blue (<i>lac I</i>) - (liver)
		Ashby <i>et al.</i> , 1994

1) Abbreviations: See Table 1.

伝子突然変異も検出可能である (Busby *et al.*, 1994).

5) ランスジェニックマウスによる評価

従来は 2, 3 の *in vitro* 試験と齧歯類小核試験の結果から、癌原性を推測してきた。大部分の癌原性物質はこれらの試験で十分検出可能だが、その結果や化学物質の種類によってはより幅広く検討を加える必要があろう。ランスジェニックマウスは、その目的のためにも今後益々利用されるものと思われる。*o-Anisidine* はマウスおよびラットに膀胱癌を誘発する癌原性物質だが、*in vitro* 遺伝毒性試験の Ames 試験、染色体異常試験、MLA ではいずれも陽性を示すものの、通常の *in vivo* 試験すなわちマウス骨髓小核試験、ラット肝 UDS 試験ではその活性は検出されず、さらにラット肝臓小核試験、DNA 鎮切断や³²P ポストラベルによる検討においても陰性であった (Table 10)。しかしながら、Big Blue ランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験においてのみ膀胱で陽性を示し、初めて *in vivo* での活性が示された (Ashby *et al.*, 1994)。これは、*in vitro* での活性をランスジェニックモデルを用いて *in vivo* で確認した例である。また、Methyl clophenipate は、マウスおよびラットの肝癌原性物質で、ペルオキシゾーム増殖作用を有している。この化合物は、Ames 試験、ヒトリンパ球および CHO 細胞を用いた染色体異常試験では陰性を示し、また *in vivo* においてもマウス骨髓小核試験およびラット肝 UDS 試験で陰性であった (Table 11)。Muta Mouse と Big Blue の 2 種類のランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 遺伝子突然変異を検討したが、結果はいずれも陰性であった (Lefevre *et al.*, 1994)。このことから、methyl clophenipate の肝癌原性は genotoxic な作用ではなく、non-genotoxic な作用による可能性が示唆された。このようにランスジェニックモデルは、現在のところ癌原性物質の検出よりも評価に主眼をおいたものとなっている。

5. 遺伝毒性試験の展望

いかなる遺伝毒性試験の組合せも癌原性試験の完全な代替とはならない。従って遺伝毒性試験はすべての動物発癌物質を検出できないということは、これまでの膨大

な研究から明らかである。しかしながら、個々の化合物については遺伝毒性試験の結果等をもとにその癌原性を予測しなければならないことが多い。これは非常に複雑で困難な作業である。しかしながら、現代の科学技術の進歩ならびに知識の集積は、徐々にそれを可能にしつつある。ここでは、新たに提案された癌原性物質の検出あるいは癌原性の予測に関するいくつかの方法を紹介したい。

1) 構造活性相関

これまでに蓄積されたデータを基に、化学物質の分子構造などからその毒性あるいは癌原性を予測するシステムが開発されている。たとえば MULTI-CASE (Klopman and Rosenkranz, 1994), TOPKAT (Enslin *et al.*, 1994), COMPACT (Lewis *et al.*, 1994), DEREK (Sanderson and Earnshaw, 1991) などである。これらのシステムは化合物の開発初期におけるスクリーニングやその構造の修飾などに有効であろう。

2) Non-genotoxic carcinogen の検出

化学物質による発癌には、レセプターを介在した機構が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた (Purchase *et al.*, 1995)。Non-genotoxic carcinogen は genotoxic carcinogen に比べ、レセプター介在機構への依存度が高いのかもしれない。このような non-genotoxic carcinogen を検出するには、細胞トランスフォーメーション、ペルオキシゾーム増殖、細胞増殖、過形成、細胞間コミュニケーションの変化あるいは紡錘体機能崩壊などの現象を検出する短期試験の組合せを開発する必要がある (Combes, 1995)。

3) 新しい細胞遺伝学的試験

ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験はヒト細胞の利用という長所の反面、試験ごとの採血や血液提供者による反応性の違いなどの問題点を有している。この問題を解決するためにヒト T リンパ球の長期培養系の利用が提案されている (O'Donovan *et al.*, 1995)。また、FISH (fluorescent *in situ* hybridization) を用いた chromosome painting (Savage and Simpson, 1994) や間期細胞の分析 (Rupa *et al.*, 1995)、ならびにキネトコア染色を用いた *in vitro* 小核試験 (Natarajan, 1993) は、異数体誘発物質や

染色体構造異常誘発物質の検出に有効であろう。

4) 代謝能を有する細胞系

チトクローム P450 アイソザイムを発現する MCL-5 細胞 (Crespi *et al.*, 1991) や *E. coli* (Shimada *et al.*, 1994) などが開発され、遺伝毒性試験への適用が試みられている。

5) In vivo 試験の発展

従来の *in vivo* 試験は、骨髓小核試験や肝 UDS 試験に代表されるように、ある限られた臓器における作用の検出・評価であった。従って、化学物質の標的臓器への移行性や毒性発現 (例えは発癌) の臓器特異性などが常に問題とされた。これへの対応として最近では、例えは小核試験において皮膚、肝臓、腸管、精巣などの多臓器を用いた検出が試みられている (MMS 研究会共同研究など)。また single cell gel electrophoresis assay (comet assay) は、どの臓器における DNA 損傷の検出も可能とされ、その応用範囲は広い (McKelvey-Martin *et al.*, 1993)。

6) 齧歯類ランスジェニック動物

ランスジェニックモデルを用いた *in vivo* 遺伝子突然変異検出系は、組織特異的な発癌機構の解析 (CSG-TMMA, 1996; Suzuki *et al.*, 1996) のみならず、他の遺伝毒性試験で認められた作用のフォローアップとしても有用である (Gorelick and Mirsalis, 1996; Tennant *et al.*, 1994)。最近、アメリカ環境変異原学会誌においてランスジェニック動物の特集がなされたが (Environ. Mol. Mutagen., 28, 295-489, 1996), Muta Mouse や Big Blue のシステムの利用は、急速にその裾野を広げている。

7) 新しい遺伝毒性学的指標

DNA 損傷により誘導される遺伝子の発現を指標とする試験としては、SOS 反応を利用した *umu* test が知られているが、最近 chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子を用いた CAT assay が開発された (MacGregor *et al.*, 1995)。このような reporter gene を利用した DNA 損傷検出系の発展が期待される (Elespuru, 1996)。DNA 付加体、細胞内酸素ラジカルおよび組み換えの検出系も興味深い。また、ERCC (exision repair cross complementing) や XRCC (X-ray repair cross complementing) など DNA 修復関連遺伝子の発現を測定する方法も新たな展開であろう (Sullivan *et al.*, 1993)。近年、シトシンの C-5 位のメチル化が遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、発癌への関与が注目されている (Barrett, 1993; 大隅ら, 1996)。メチル化の不均衡を検出するシステムが開発されることを期待したい。発癌物質の検出やそのリスク評価について、新しい方法の特集が Mutation Research 誌にてなされたので参照されたい (Jacobson-Kram and Dellarco, 1996)。

8) 生殖細胞への影響

遺伝毒性試験はともすれば癌原性にのみ焦点を当てがちになるが、生殖細胞に対する変異も忘れてはならない

対象である。化学物質の生殖細胞に対する突然変異誘発性を予測・評価するためのフローチャートは参考になろう (Ashby *et al.*, 1996)。現在のところ、通常の遺伝毒性試験の組合せで検出されない生殖細胞変異原物質は報告されていない (Shelby, 1996)。しかしながら、acrylamide のように体細胞より生殖細胞に対する影響が強く発現することが疑われている化合物も存在し、注意を要する。

9) 遺伝毒性のリスク評価法

欧米では、遺伝毒性のリスク評価法の構築への積極的な取り組みが行われている (Brusick, 1994)。しかし、日本では癌原性のリスク評価に比べ、大きな動きとなるには至っていない。学会、大学、国公立の研究機関ならびに企業を含め、この分野への積極的な取り組みが望まれる。

結語

企業における遺伝毒性試験は転換期を迎えており、試験方法やガイドラインの国際的な調和が進み、1つの試験結果が世界的に利用できる状況になりつつある。このことは、一方で科学的に信頼性の高いデータが要求されていることを意味する。製薬企業においては場合により、発癌の作用機構の理解を助けるための追加試験も考慮される (ICH, 1996)。新しい方法が遺伝毒性試験の中で確立したものとなるには、まだまだデータの蓄積・評価が必要であろう。我々企業における遺伝毒性試験従事者は、試験の実施のみならず遺伝毒性に関する幅広い考察を求められている。既存の試験法にのみとらわれず、柔軟な思考で対応していきたいものである。

謝辞

本論文の発表の機会を与えて下さいました吉川邦衛博士 (三菱化学総合研究所) ならびに降旗千恵博士 (東京大学医科学研究所) に深謝いたします。また、小核試験のデータは、51 機関が参加した MMS 研究会の共同研究によるものです。この場を借りて共同研究参加機関の皆様に感謝いたします。

参考文献

- 荒木明宏 (1996) 気相暴露による微生物変異原性試験法の開発とその応用、環境変異原研究, 18, 5-13.
- Ashby, J., J. M. Short, N. J. Jones, P. A. Lefevre, G. S. Provost, B. J. Rogers, E. A. Martin, J. M. Parry, K. Burnette, B. W. Glickman and H. Tinwell (1994) Mutagenicity of *o*-anisidine to the bladder of *lacI*-transgenic B6C3F1 mice: absence of ¹⁴C or ³²P bladder DNA adduction, Carcinogenesis, 15, 2291-2296.
- Ashby, J., M. D. Waters, J. Preston, I.-D. Adler, G. R. Douglas, R. Fielder, M. D. Shelby, D. Anderson, T. Sofuni, H. N. B. Gopalan, G. Becking and C. Sonich-Mullin (1996) IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazard, and for indicating the probable mechanism of action of carcinogens, Mutation Res., 352, 153-157.
- Barrett, J. C. (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment, Environ. Health Perspect., 100, 9-

- 20.
- Brusick, D. (Ed.) (1994) Methods for genetic risk assessment, CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Busby, W. E. Jr., B. W. Penman and C. L. Crespi (1994) Human cell mutagenicity of mono- and dinitropyrenes in metabolically competent MCL-5 cells, *Mutation Res.*, **322**, 233-242.
- Combes, R. D. (1995) Regulatory genotoxicity testing: a critical appraisal, ATLA, **23**, 352-379.
- Crespi, C. L., F. J. Gonzalez, D. T. Steimel, T. R. Turner, H. V. Gelboin and B. W. Penman (1991) A metabolically competent human cell line expressing five cDNAs encoding procarcinogen-activating enzymes; application to mutagenicity testing, *Chemical Res. Toxicol.*, **4**, 566-571.
- CSGTMMA (The Collaborative Study Group for the Transgenic Mouse Mutation Assay) (1996) Organ variation in the mutagenicity of ethylnitrosourea in MutaTM Mouse: Results of the collaborative study on the transgenic mutation assay by JEMS/MMS, *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**, 363-375.
- Doherty, A. T., S. Ellard, E. M. Parry and J. M. Parry (1996) An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, **11**, 247-274.
- Elespuru, R. K. (1996) Future approach to genetic toxicology risk assessment, *Mutation Res.*, **365**, 191-204.
- Enslein, K., V. K. Gombar and B. W. Blake (1994) Use of SAR in computer-assisted prediction of carcinogenicity and mutagenicity of chemicals by TOPKAT program, *Mutation Res.*, **305**, 47-62.
- Furihata, C. and T. Matsushima (1995) *In vivo* short-term assays for tumor initiation and promotion in the glandular stomach of Fisher rats, *Mutation Res.*, **339**, 15-35.
- Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt and E. Zeiger (1994) Recommendation for the performance of bacterial mutation assays, *Mutation Res.*, **312**, 217-233.
- Gorelick, N. J. and J. C. Mirsalis (1996) A strategy for the application of transgenic rodent mutagenesis assays, *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**, 434-442.
- ICH (1996) Genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals, Draft consensus guideline, Step 2, 2 October 1996.
- Jacobson-Kram, D. and V. L. Dellarco (Eds.) (1996) New approaches for cancer identification and risk assessment, *Mutation Res.*, **365**, 1-206.
- Klopman, G. and H. S. Rosenkranz (1994) Approaches to SAR in carcinogenesis and mutagenesis, Prediction of carcinogenicity/mutagenicity using MULTI-CASE, *Mutation Res.*, **305**, 33-46.
- Kuroki, T. and T. Matsushima (1987) Performance of short-term tests for detection of human carcinogens, *Mutagenesis*, **2**, 33-37.
- Lefevre, P. A., H. Tinwell, S. M. Galloway, R. Hill, J. M. Mackay, C. R. Elcombe, J. Foster, V. Randall, R. D. Callander and J. Ashby (1994) Evaluation of the genetic toxicity of the peroxisome proliferator and carcinogen methyl clofenate, including assays using MutaTM Mouse and Big BlueTM transgenic mice, *Hum. Exp. Toxicol.*, **13**, 764-775.
- Lewis, D. F. V., H. Moereels, B. G. Lake, C. Ioannides and D. V. Parke (1994) Molecular modelling of enzymes and receptors involved in carcinogenesis, QSARs and COMPACT-3D, *Drug Metabolism Rev.*, **26**, 261-285.
- MacGregor, J. T., S. Farr, J. D. Tucker, J. A. Heddle, R. R. Tice and K. W. Turteltaub (1995) New molecular endpoints and methods for routine toxicity testing, *Fund. Appl. Toxicol.*, **26**, 156-173.
- Matsuoka, A., K. Yamakage, H. Kusakabe, S. Wakuri, M. Asakura, T. Noguchi, T. Sugiyama, H. Shimada, S. Nakayama, Y. Kasahara, Y. Takahashi, K. F. Miura, M. Hatanaka, M. Ishi- date, Jr., T. Morita, K. Watanabe, M. Hara, K. Odawara, N. Tanaka, M. Hayashi and T. Sofuni (1996) Re-evaluation of chromosomal aberration induction on nine mouse lymphoma assay 'unique positive' NTP carcinogens, *Mutation Res.*, **369**, 243-252.
- Mavourin, K. H., D. H. Blakey, M. C. Cimino, M. F. Salamone and J. Ashby (1990) The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **239**, 29-80.
- McKelvey-Martin, V. I., M. H. L. Green, P. Schmezer, B. L. Pool-Zobel, M. P. DeMeo and A. Collins (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European perspective, *Mutation Res.*, **288**, 47-63.
- Miyagawa, M., H. Takasawa, A. Sugiyama, Y. Inoue, T. Murata, Y. Uno and K. Yoshikawa (1995) The *in vivo*-*in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test with hepatocytes prepared from male B6C3F1 mice as an early prediction assay for putative non-genotoxic (Ames-negative) mouse hepatocarcinogens, *Mutation Res.*, **343**, 157-183.
- Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Yu. F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B), The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS, *Mutation Res.*, **389**, 3-122.
- Natarajan, A. T. (1993) An overview of testing of known or suspected aneugens using mammalian cells *in vitro*, *Mutation Res.*, **287**, 113-118.
- O'Donovan, M. R., M. R. Freemantle, G. Hull, D. A. Bell, C. F. Arlett and J. Cole (1995) Extended-term cultures of human T-lymphocytes: a practical alternative to primary human lymphocytes for use in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, **10**, 189-201.
- 大隅智也, 伊藤充輝, 村松正實, 林崎良英 (1996) DNA メチル化と癌化, In: DNA 複製・修復と発癌 (編者: 松影昭夫), 羊土社, 東京, pp. 105-115.
- Purchase, I. H. F., J. C. Barrett, H. C. Pitot and H. Yamasaki (Eds.) (1995) Receptor mediated mechanisms in chemical carcinogenesis, *Mutation Res.*, **333**, 1-226.
- Rupa, D. S., L. Hasegawa and D. A. Eastmond (1995) Detection of chromosomal breakage in the 1cen-1q12 region of interphase human lymphocytes using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with tandem DNA probes, *Cancer Res.*, **55**, 640-645.
- Sanderson, D. M. and C. G. Earnshaw (1991) Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: the DEREK system, *Human and Exp. Toxicol.*, **10**, 261-273.
- Savage, J. K. and P. J. Simpson (1994) FISH "painting" patterns resulting from complex exchanges, *Mutation Res.*, **312**, 51-60.
- Shelby, M. D. (1996) Selecting chemicals and assays for assessing mammalian germ cell mutagenicity, *Mutation Res.*, **352**, 159-167.
- Shelby, M. D., G. L. Exon, G. J. Hook and R. R. Tice (1993) Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: Results with 49 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **21**, 160-179.
- Shelby, M. D. and E. Zeiger (1990) Activity of human carcinogens in the *Salmonella* and rodent bone-marrow cytogenetics tests, *Mutation Res.*, **234**, 257-261.
- Shimada, T., E. M. J. Gillam, P. Sandhu, Z. Guo, R. H. Tukey and F. P. Guengerich (1994) Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes expressed in *Escherichia coli*: simplified bacterial systems for genotoxicity assays, *Carcinogenesis*, **15**, 2523-2529.
- Sullivan, N., D. Gatehouse and D. Tweats (1993) Mutation, cancer and transgenic models: relevance to the toxicology industry, *Mutagenesis*, **8**, 167-174.
- Suzuki, T., T. Itoh, M. Hayashi, Y. Nishikawa, S. Ikezaki, F. Furukawa, M. Takahashi and T. Sofuni (1996) Organ variation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue[®] mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**, 348-353.
- Tennent, R. W. (1993) A perspective on non-mutagenic mechanisms in carcinogenesis, *Environ. Health Perspect., Suppl.*, **101**, 231-236.
- Tennent, R. W., L. Hansen and J. Spalding (1994) Gene manipulation and genetic toxicology, *Mutagenesis*, **9**, 171-174.
- Tennant, R. W., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger, J. K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, B. Anderson and R. Minor (1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays, *Science*, **236**, 933-941.
- Tennant, R. W. and E. Zeiger (1993) Genetic toxicology: Current status of methods of carcinogen identification, *Environ. Health Perspect.*, **100**, 307-315.
- Yoshikawa, K. (1996) Anomalous nonidentity between *Salmonella* genotoxins and rodent carcinogens: Nongenotoxic carcinogens and genotoxic noncarcinogens, *Environ. Health Perspect.*, **104**, 40-46.
- Zeiger, E., J. K. Haseman, M. D. Shelby, B. H. Margoline and R. W. Tennant (1990) Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **16** (Suppl. 18), 1-14.

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「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」(S2-2)

中期ならびに長期動物発がん性試験と変異原性試験

Medium and long-term *in vivo* carcinogenesis bioassays and mutagenicity testing

立松正衛

Masae Tatematsu

愛知県がんセンター研究所 病理学第一部 464 名古屋市千種区鹿子殿 1-1

Laboratory of Pathology, Aichi Cancer Center Research Institute,
1-1 Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan

(受理: 1997年3月21日)

Summary

To bridge the gap between long-term carcinogenicity tests and short-term screening assays, medium-term bioassay systems based on generation of glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive liver cell foci in rats have been developed. There are two basic test systems, one for detection of promoting activities and the other for demonstration of initiating potential. In tests for promoting activity of chemicals, almost all mutagenic and non-mutagenic hepatocarcinogens and hepatopromoters can be detected. In contrast, tests for initiating activity allow almost all mutagenic carcinogens including non-hepatocarcinogens to be identified but not non-mutagenic carcinogens including those targeting the liver. By employing mutagenicity tests and medium term *in vivo* bioassays for initiating and promoting activities of chemicals in combination, chemicals have been classified into (1) genotoxic hepatocarcinogens, (2) genotoxic non-hepatocarcinogens, (3) genotoxic non-carcinogens, (4) non-genotoxic hepatocarcinogens and hepatopromoters, and (5) others.

Keywords: medium-term *in vivo* carcinogenesis bioassays, long-term *in vivo* carcinogenesis bioassays, mutagenicity testing, glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive liver cell foci, multi step carcinogenesis

緒 言

化学物質の発がん性の評価に最も重要な情報を提供しているのは、ラットやマウス等の小動物を用いた長期発がん性試験である。しかし、用量設定のための亜急性毒性試験、全臓器の標本作成、評価などを含めた準備期間を入れると約3年間の検索期間が必要とされ、これを実施できる施設は設備・費用ならびに人材の面より限られている。また微量でのみ入手可能な検索物質の場合は、自ずとその実施には制約がある。こうした問題に対応する目的で、変異原性試験を中心とした発がん性予知のための短期スクリーニング法が開発されてきた。短期間で経済的に多数の物質のスクリーニングが可能であることより、ひろく検索が実施され、変異原性非発がん物質と非変異原性発がん物質の存在が明らかとなった。その

結果、変異原性試験と長期発がん性試験のデータは、化学物質の発がん性の判定において、当初予想されたほどには一致しないことが明らかと成ってきた。

このため、長期と短期発がん性試験の欠点を補う目的で、動物を用い、検索期間の短縮と false positive や false negative を減少させるため、発がんの多段階(2段階)説を基礎とし、初期病変(前がん病変)をマーカーとした中期発がん性試験が開発してきた。全ての発がん性未知の物質に対し長期発がん性検索の実施の不可能なことは、明確な事実である。変異原性試験の情報を基礎として、中期発がん性試験を行えば、その前がん病変の出現程度により、明確に発癌性が指摘出来る場合がある。長期ならびに中期発がん性試験結果と変異原性試験結果を対比しながら、各検索法の持つ利点と限界につい

て検討する。

1. 突然変異原性と発がん性

肝臓のミクロソーム酵素による前駆発がん物質の活性化とサルモネラ菌の突然変異検出を組み合わせたエームス法 (Ames *et al.*, 1975) により、多くの発がん物質は同時に変異原性を示す事が明らかとなってきた。また、エームス法以外にも種々の優れた変異原性検索法が開発されてきた。しかし、検索が進行するに従い、種々の方法で変異原性が明らかとなつた物質が必ずしも発がん性を示さず、また変異原性が明らかとなつても発がん性試験のなされていない物質が、無限に蓄積されている。これらの物質の発がん性の検討は急務であるが、未だその良い解決策は無いのが現状である。

2. 中期発がん性試験

変異原性試験は、ブラックボックスではあるがシステムとしての動物個体における未知の促進・抑制要因が関与しておらず、また発がん過程のイニシエーション・プロモーション・プログレッションの各ステップの内、その成果はイニシエーションに関与している要因の検索に集中しているため、長期発がん性試験結果と一致しない場合があると考えられる。そこで、長期と短期発がん性試験の欠点を補う目的で、動物を用い、検索期間の短縮と false positive や false negative を減少させるため、発がんの多段階（2段階）説を基礎とし、初期病変（前がん病変）や腫瘍性病変をマーカーとした中期発がん性試験が開発してきた。二段階法の多くは、まず目的の臓器に発がん物質によりイニシエーションを行い、その後、検索化学物質をプロモーションの段階で投与する。多くの発がん物質は、イニシエーション作用とプロモーション作用を併せ持つており、このプロモーション作用を利用して、イニシエーション単独の対照と比較し、前癌または腫瘍性変化の出現の高率化より、検索物質の発がん性を検索する。現在、肝、肺、胃、大腸、腎臓、膀胱、皮膚等、多数の臓器で二段階法が、考案されている。プロモーションの段階で検索物質を投与する二段階法では、発がん物質のみならずプロモーターやインヒビターも検索可能である。プロモーション作用には強い臓器選択（標的）性があり、発がん性未知の物質の検索に際し、何種類の二段階法を用いるかが、問題となる。IARCより報告されているヒト発がんに関連する物質の50%以上が肝臓に標的性を示しており、肝の二段階法 (Ito *et al.*, 1988; Ito *et al.*, 1997) が最も重要と考えられる。

一方、検索物質を、最初に投与し、イニシエーション活性を検索する中期発がん性試験も、肝を中心検索が進められている。また、1個体1臓器検索の二段階法の限界を打破する目的で考案されたのが、多臓器発癌試験法 (Hirose *et al.*, 1993) で、複数の臓器にイニシエー

ション処置を施し、1個体で同時に複数臓器に対する発がん性を検定するもので、現在検索が進められている。

1) プロモーション作用に基づいた肝における中期発がん性試験（伊東法）

肝における8週間の中期発がん性試験（伊東モデル） (Ito *et al.*, 1988; Ito *et al.*, 1997) では、前癌病変である胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性巣を指標とし、260以上の化学物質が検索されている。方法は Fig. 1 に示してあるごとく、diethylnitrosamine (DEN) でイニシエーションの後、2週間おいて、検索物質を6週間投与し、さらに検索物質投与開始1週後に、細胞増殖を促進させ、GST-P 陽性巣の形成を促進させるため、肝の3分の2部分切除を行う。8週後に肝に形成された GST-P 陽性巣の単位面積あたりの数と面積を定量し、対照群と比較して有意差検定を行う。Fig. 2 には269の化合物の検索結果（名市大データ）である。肝発がん物質については変異原性陽性物質は97%、変異原性陰性物質でも84%の高率で陽性所が得られている。ただ肝発がん物質で変異原性陰性物質で本試験陰性の物質の殆どは peroxisome proliferator であり、GST-P 陰性の肝腫瘍を形成する物質群で、これらの特殊な物質を除けば、非変異原性肝発がん物質でも陽性率は95%以上になる。一方、非肝発がん物質では変異原性陽性ならびに陰性物質とも20~30%の検出率にとどまっている。これはプロモーション作用には明確な臓器特異性が存在するため、肝を標的としない検索物質の陽性率が低下したも

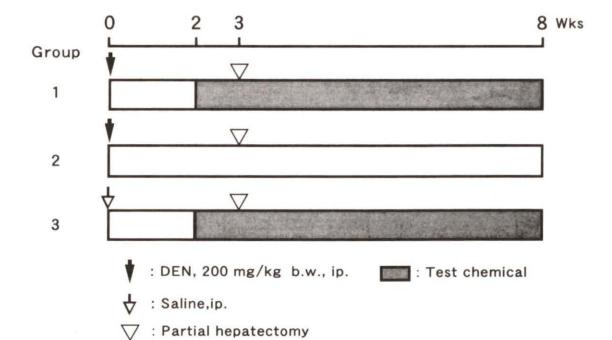


Fig. 1. Medium-term liver bioassay system for detection of liver carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis.

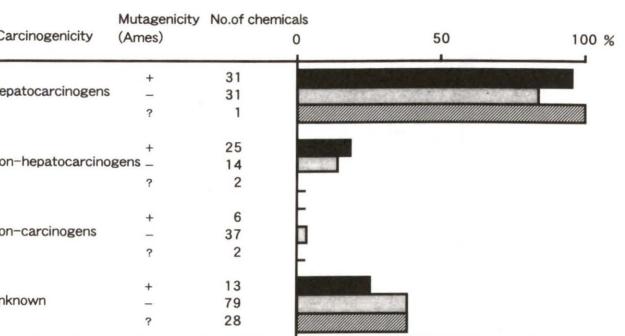


Fig. 2. Positive rates in the medium-term liver bioassay for 269 chemicals.

のと考えられる。一方、非発がん物質は変異原性、非変異原性含め、45物質のうち2例にのみ陽性所見が認められ、false positive が5%に抑えられていることは、特筆すべきと考えられる。おそらく Fig. 2 に表示してある伊東法で検索された100以上の発がん性未知物質の内、本検索法で陽性をしめた物質のなかから、多くの新たな肝発がん物質が見い出されると思われる。

2) イニシエーション作用に基づいた肝における中期発がん性試験

GST-P 陽性巣を指標とした *in vivo* イニシエーション活性中期検索法では、Fig. 3 で示す如く、肝部分切除後（12時間）の肝細胞増殖期にイニシエーターとして最初

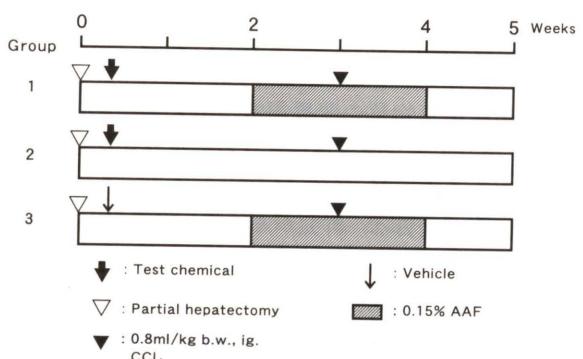


Fig. 3. Medium-term liver bioassay system for detection of initiating activities of carcinogens.

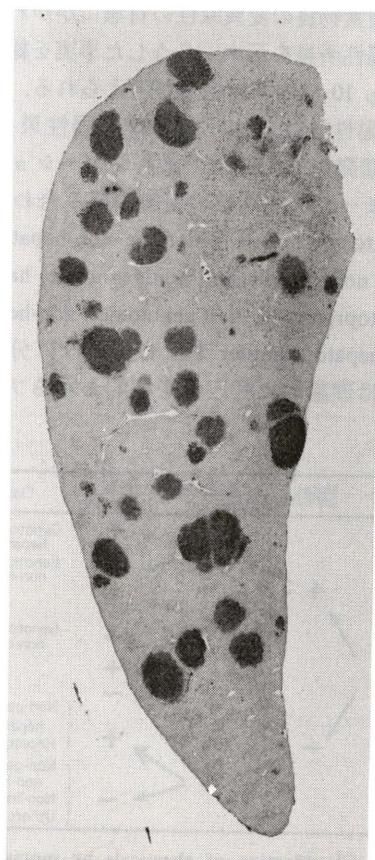


Fig. 4. Immunohistochemical demonstration of GST-P positive liver cell foci.

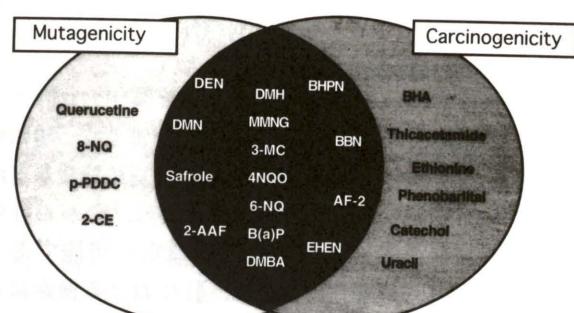


Fig. 5. Medium-term liver bioassay for detection of initiating activities of carcinogens.

8-NQ: 8-Nitroquinoline, p-PDDC: p-Phenylenediamine dihydrochloride, 2-CE: 2-Chloroethanol.

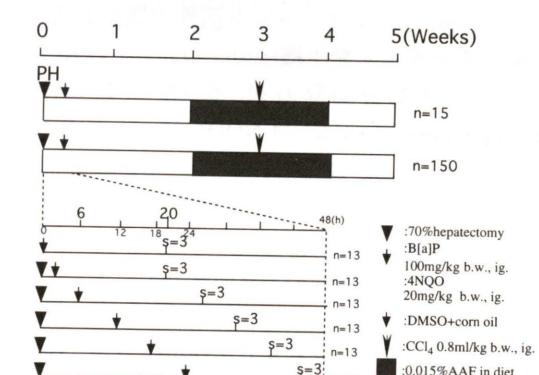


Fig. 6. Schematic representation of the experimental protocol for assessment of DNA Adduct formation and GST-P positive foci.

The magnified portion covers the first 2 days of the experiment.

に検索物質が一回投与される。2週後、強力な前癌病変形成促進として、acetylaminofluorene (AAF) の投与を2週間行いその間、細胞増殖を刺激する目的で四塩化炭素 (CCl₄) を投与する。イニシエーションが成立しておれば、5週間で驚くべき早さで GST-P 陽性巣が形成される (Fig. 4)。前癌病変の形成を促進させる機構として 1. differential inhibition と 2. differential stimulation が考えられている。本検索法における強力な GST-P 陽性巣の形成は differential inhibition による。AAF は強力な肝発がん物質で同時に強力な肝細胞増殖阻止作用を有している。正常肝細胞は CCl₄ 投与後、本来ならば肝部分切除後と同様、壊死した肝細胞の再生のため、高い肝細胞増殖が誘導されるが、AAF 投与中は正常肝細胞の増殖は殆どゼロに抑えられる。この間、AAF の細胞増殖抑制に抵抗性のある GST-P 陽性巣のみが増殖抑制されず発育を続ける。肝細胞増殖の選択的抑制が、GST-P 陽性巣の形成を促進するような機構を differential inhibition と呼んでいる (Tatematsu *et al.*, 1988)。Fig. 5 は、本検索法により検索した物質の一覧であり、しろぬきの物質が陽性所見を示した。すなわち、変異原性陽性物質のうち、肝に標的性を持つ持たないにかかわらず発がん性の認められた物質のみが、陽性所見を示した。また発

がん性のある物質でも、突然変異原性の無い物質では、たとえ肝発がん物質でも陰性を示した。

このことは、イニシエーション作用に基づいた肝における中期発がん性試験の場合は、発癌物質の持つ臓器標的性の壁が破られ、肝を標的としない物質の検索が可能である事を示し、変異原性物質であれば、発がん性変異物質と非発がん性変異物質との識別が可能である (Tatematsu *et al.*, 1983)。しかし、肝における検索にも関わらず非変異原性肝発がん物質はこの検索期間では検出できない。

3) DNA 付加体形成とイニシエーション

通常の単独投与法において肝に標的性を示さない化学物質が *in vivo* イニシエーション活性中期検索法において、陽性所見を示す発生機序の一つとして Fig. 6 に示すごとく、肝部分切除直後、6, 12, 18, 24 時間後に 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) と benzo[a]pyrene (B[a]P) を投与し、DNA 付加体形成の程度 (Figs. 7 and 8) と GST-P 陽性巣の形成 (Fig. 9) を検討した。その結果、肝部分切除後、両物質の付加体は肝より肺に多く形成され、付加体形成の多寡のみでイニシエーションが成立するわけではなく、付加体形成とそれに伴う細胞分裂の重要性が明らかとなった (Tezuka *et al.*, 1995)。

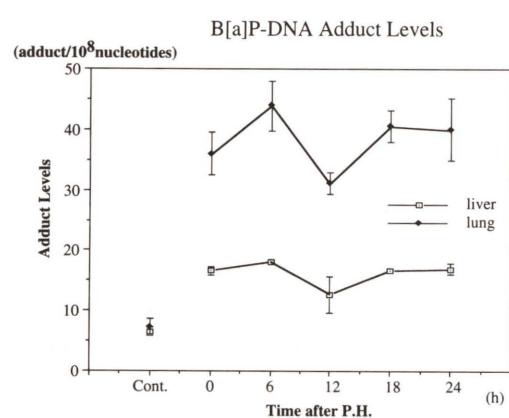


Fig. 7. B[a]P-DNA Adduct Levels in various organs.

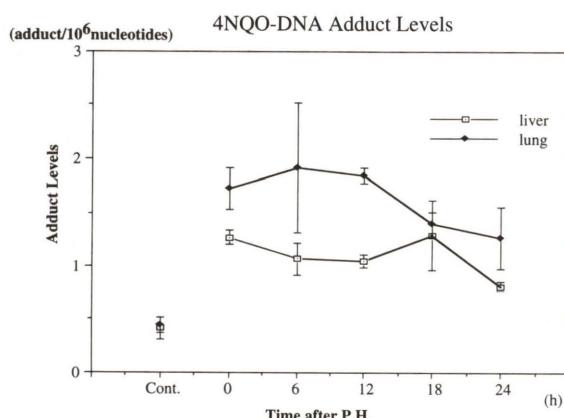


Fig. 8. 4NQO-DNA Adduct Levels in various organs.

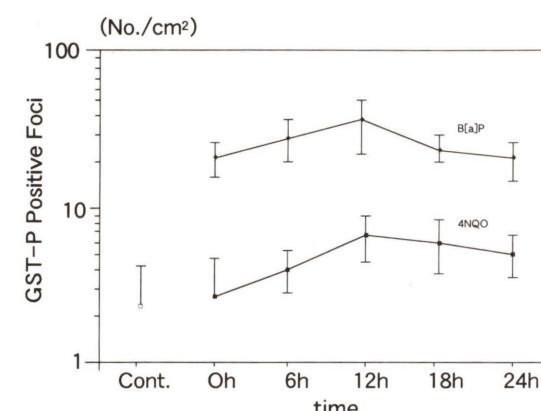


Fig. 9. Numbers of GST-P positive foci in rats given B[a]P or 4NQO at different times after partial hepatectomy.

3. 化学発がん物質の変異原性試験と発がん二段階法 (イニシエーション活性とプロモーション活性検索) のハーモナイゼーション

化学発がん物質は、肝発がん物質、腎発がん物質等、*in vivo* において臓器標的性が存在する。*in vivo* イニシエーション活性中期検索法においては、変異原性を有する化学発がん物質はそれ自身の持つ臓器特異性の枠を脱し、陽性所見を示す (Tatematsu *et al.*, 1983; Tezuka *et al.*, 1995)。一方、伊東モデルのデータ (Ito *et al.*, 1988; Ito *et al.*, 1997) を基にすると、プロモーション活性検索系では検索物質の変異原性の有無にかかわらず肝発がん物質が陽性所見を示す。こうした事実を総合的に解釈すると Fig. 10 の如くの相関が考えられる。化学物質を変異原性陽性と陰性、肝の GST-P 陽性巣を end point とした中期発がん性試験のイニシエーション活性の有無、プロモーション活性の有無の組み合わせで、genotoxic hepatocarcinogen, genotoxic non-hepatocarcinogen, genotoxic non-carcinogen, non-genotoxic hepatocarcinogen, hepatopromoter, non-genotoxic, non-hepatocarcinogen, non-hepatopromoter および others に分類される。Others には理論的に肝以外を標的とするプロモーター

すべてが含まれ今回の方法では検索不能である。ここに含まれる物質の検索には、中期多臓器発がん試験法が有効と考えられる。こうして、ある物質の特性が各々の検索法により、変異原性、発がんまたはプロモーター作用の臓器標的性が明らかとなれば、データの信頼性はますます向上する。しかし、変異原性試験ならびに中期発がん性試験は、あくまで発がん性検索において、短期間で経済的に可能な限り正確なデータを得ることを目的としており、多種類の検索法全てを行うことは、本来の趣旨から外れることになる。各検索法の長所を取り入れ、膨大に蓄積されつつある未検索の化学物質の、より効率化された検索系の確立が急務と思われる。

参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamazaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.
 Hirose, M., H. Tanaka, S. Takahashi, M. Futakuchi, S. Fukushima and N. Ito (1993) Effects of sodium nitrite and catechol, 3-methoxycatechol, or butylated hydroxyanisole in a rat multiorgan carcinogenesis model, *Cancer Res.*, **53**, 32-37.
 Ito, N., H. Tsuda, M. Tatematsu, T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki, S. Uwagawa, M. Kagawa, T. Ogiso, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima and M. Asamoto (1988) Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rat: An approach for a new medium-term bioassay system, *Carcinogenesis*, **9**, 387-394.
 Ito, N., R. Hasegawa, K. Imaida, M. Hirose and T. Shirai (1997) Medium-term liver bioassay in rats for rapid detection of carcinogenic agents, *J. Biol. Chem.*, in press.
 Tatematsu, M., R. Hasegawa, K. Imaida, H. Tsuda and N. Ito (1983) Survey of various chemicals for initiating and promoting activities in a short-term *in vivo* system based on generation of hyperplastic liver nodules in rats, *Carcinogenesis*, **4**, 381-386.
 Tatematsu, M., T. Aoki, M. Kagawa, Y. Mera and N. Ito (1988) Reciprocal relationship between development of glutathione S-transferase positive liver foci and proliferation of surrounding hepatocytes in rats, *Carcinogenesis*, **9**, 221-225.
 Tezuka, N., M. Tada, M. Kojima, H. Nakanishi, A. Mori and M. Tatematsu (1995) Effects of partial hepatectomy on initiation of liver cell foci by 4-nitroquinoline 1-oxide, a non-hepatocarcinogen, and generation of DNA adducts in rats, *Cancer Lett.*, **85**, 89-94.

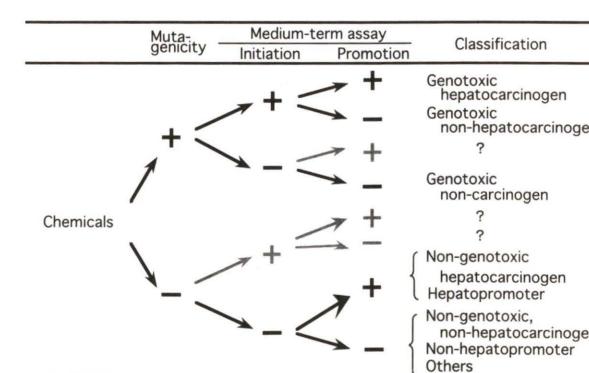


Fig. 10. Classification of chemicals by mutagenicity tests and medium term *in vivo* bioassays for initiating and promoting activities of chemicals.

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
 「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」(S2-4)

発がん研究における動物種間、実験系間のギャップ

Gaps between experimental systems and animal species used in carcinogenesis studies

黒木 登志夫

Toshio Kuroki

昭和大学腫瘍分子生物学研究所 142 品川区旗の台 1-5-8

Institute of Molecular Oncology, Showa University,
 1-5-8 Hatanodai Shinagawa-ku Tokyo 142, Japan

(受理: 1997年4月4日)

Summary

In studies of carcinogenesis, there are a number of gaps between experimental systems using various species of animals. These include gaps between prokaryotes and eukaryotes, between cell-free systems and intact cell systems, between mutation assays and assays of DNA-repair chromosome changes or transformation, between rodent cells and human cells, between short-term tests and animal experiments, between human carcinogenesis and experimental models, and between epidemiology and clinical research. These gaps are *a priori* associated with basic mechanisms of respective experimental systems. Considering involvement of multiple factors, multiple genes and multiple stages in carcinogenesis, these gaps are essentially unavoidable. Of practical importance is to accept these limitations rather than to pay vain efforts for filling out the gaps.

Keywords: carcinogenesis, mutagenesis, human cells, animal models, transformation

緒 言

正常細胞ががん細胞に変わっていくメカニズムはがん研究のメインテーマの一つである。古くは1915年の山極勝三郎、市川厚一によるタールがんの成功以来、今日のがん遺伝子、がん抑制遺伝子にいたるまで、広い範囲の研究材料と研究手段が用いられてきた。マウス、ラットが中心的な実験モデルであったが、必要に応じてサルモネラ菌のような原核細胞、さらにショウジョウバエ、動物の培養細胞にいたるまで広く用いられている。正常細胞からがん細胞にいたる全経過を見るのが本来の発がん研究であるが、その長いプロセスの一つ一つを解析するため、短期テストなど様々な実験系が開発された。これらのシステムとモデルは発がんのある一面を反映しているにしても、そこには実験系のもつ様々なレベルの制限が潜んでいる。発がんの研究におけるギャップとしては次のようなものが考えられる。

- 突然変異 vs. DNA 修復
- 突然変異 vs. 染色体変異
- 突然変異 vs. トランスフォーメーション
- 動物細胞 vs. ヒト細胞
- 短期テスト vs. 動物実験
- 短期テスト vs. ヒト発がん
- 動物実験 vs. ヒト発がん
- 個体下レベル vs. 個体レベル
- 個々の患者 vs. 疫学

著者はこの10年間、発がん研究に興味を持ち続けてはいたものの、実際には細胞分化のシグナル伝達を中心にして研究を進めてきた。このため特に短期テストをめぐる最近の情報が不足しているかもしれない。しかしあえて発がん研究における様々なギャップについてこの小論にまとめてみた。ご批判いただければ幸いである。

1. 原核細胞と真核細胞間のギャップ

細菌のような原核細胞は酵母など真核かつ単細胞生物

を経て、多細胞生物へと進化していった。この何億年という進化の過程でよく保存されていたシステムは、すべての生命に必須の重要なメカニズムであるにちがいない。例えばDNA複製と修復の基本メカニズムは大腸菌からヒトにいたるまでよく保存されている。そのような基本的なメカニズムの一つであるミスマッチ修復が、がんに関係していることが1994年から1995年にかけて明らかになった。突然変異のメカニズムは何億年も距てて原核細胞と真核細胞の間で共通しているのである。このような基本メカニズムを研究対象とし、あるいはマーカーとして用いている限り、真核細胞と原核細胞の間のギャップは少ない。サルモネラ菌を用いる突然変異検出系(Ames test)が広く用いられている理由の一つはここにある。

原核細胞から真核細胞、そして単細胞生物から多細胞生物に進化するに伴い、多くの形質が獲得された。そのようなメカニズムを対象とする研究では、原核細胞を研究に用いることはできない。例えば、細胞増殖と分化のシグナル伝達に働くがん遺伝子、細胞周期と細胞社会での機能を発揮するがん抑制遺伝子は、真核細胞を用いねばならない。この点に原核細胞の限界がある。

2. 無細胞系・無傷細胞系間のギャップ

細胞という小宇宙の中で、様々な化学反応は微妙なバランスとホメオスタシスのもとに進行している。リン酸化反応を例にとると、キナーゼ系とフォスファターゼ系のバランスで蛋白のリン酸化が制御されている。その上、リン酸化の基質は細胞内の局在部位が重要な因子となる。しかし、無傷細胞系を用いキナーゼと蛋白を試験管内で反応させると、細胞内のホメオスタシスやバランスに関係なく、基質となるべきアミノ酸配列があればすべてリン酸化されてしまう。同じことは薬物代謝についてもいえる。ラット肝のS9分画は変異原性テストの代謝活性化系として広く用いられているが、ホモジエネートの中では活性化のバランスはくずれているため、細胞内の薬物代謝を必ずしも正しく反映しているとはいえない。

突然変異率も試験内と細胞内では大きく異なる。鉄型となる配列とDNAポリメラーゼを加えた試験管内の反応系では、分裂あたり1塩基あたりの突然変異(ミスマッチ)は 10^{-4} である。ところが生きた細胞の中では、突然変異は 10^{-10} でしか起きない。細胞内は試験管内よりも100万倍も安全である。これはミスマッチ修復酵素などDNA複製を正確にコントロールする酵素が試験管内の反応系に含まれていないためである。

3. 癌と短期テスト間のギャップ

癌の短期テストには、突然変異性をみる方法、DNA傷害とその修復をみる方法、染色体の傷害をみる方法、試験管内のがん化すなわちトランスフォーメー

ションをみる方法、など様々な実験系がある。用いられる生物系にしても、細菌からヒト細胞までの広い範囲に及んでいる。これらの短期テストに共通しているのは癌のある一面のみをみていることである。その意味で短期テストはそれ自身では不十分であり、それぞれに特徴をもったテストの組み合わせ(battery)が必要ということになる。

サルモネラ菌のような原核細胞を用いた突然変異原性のテストは、突然変異という遺伝子の基本現象を対象とするが故に、制限はあるにせよ癌性にまで外挿できる。しかし、染色体レベルの変化をみるために動物細胞を用いなければならない。染色体の形態学的観察、姉妹染色質交換、小核テストなどは、いずれも突然変異原性テストを補完するものとして広く用いられている。

トランスフォーメーション系は癌性にもっとも近く、短期テストとしてはより適していると一般に考えられているようだ。そのなかでも、Balb3T3細胞のトランスフォーメーション系はアッセイ条件が標準化されている。しかし、トランスフォーメーション系はその評価のためのデータがまだ不足している。特に非癌性物質を用いたネガティブな面からの検討が不足しているように思われる。メカニズムから考えた場合、それぞれのトランスフォーメーションにおける遺伝子変異の検討、例えば癌性物質に特異的ながん遺伝子活性化、がん抑制遺伝子不活性化の分析がまだ必要である。

試験管内ではヒト細胞が利用できる。しかし、ヒト細胞を用いればそれだけヒトの癌に近づけるとは必ずしも限らない。それは培養ヒト細胞の多くが線維芽細胞など培養の容易な細胞であることによる。ヒト癌の最大の標的である上皮細胞系の利用はまだ一般的でない。表面的に考えればヒト細胞のトランスフォーメーションはもっともヒト癌に近いことになる。しかし、ヒト細胞はマウス、ハムスターなどの齧歯類動物と比べるとはるかにトランスフォーメーションを起こしにくい。その理由としてヒト細胞が不死化しにくいことがある。1960年代初めのHayflickらはヒト線維芽細胞が限られた期間しか培養できない(limited life span)ことを報告したが、培養技術の発達した今日でもヒト細胞の培養期間は依然として10ヶ月である。このような細胞寿命は、テロメア/テロメラーゼ系、がん抑制遺伝子などが関与しているのである。ヒト細胞のトランスフォーメーションの困難な理由の解明は癌性の短期テストへの応用という面からだけでなく、生命科学としても最も興味あるところである。

4. 動物実験とヒト間のギャップ

動物実験のデータがどこまでヒトにあてはまるかは、癌研究に限らず医学研究にとって永遠の問題といえよう。動物種間の差は様々な面で明らかにされつつあるにしても、動物とヒトの間のギャップを埋めるにはは

ど遠い。サルのような靈長類はマウス、ラットなど齧歯類とヒトの間と橋渡しすると一般的に考えられている。しかし、この考えには理論的に根拠がなく、表面的な理解にすぎない。高価な靈長類を用いたとしても、ヒトとマウスの間の橋渡しになるとは限らない。しかし、このような考えは癌性研究に限らず、広く行き渡っているようだ。例えば遺伝子治療用のベクター開発に際して、安全性テストにサルを用いねばならないとする考えが一般的であるが、もう一度考え直す必要があるのではなかろうか。

動物とヒトの間のギャップを考えると、動物実験で築かれた概念をヒトにあてはめるのも慎重にならざるを得ない。その一つの例として癌性プロモーションがある。1940年代に行われたマウス皮膚の2段階癌研究は、癌性にイニシエーションとプロモーションの二つのステージのあることを見事に証明した。それ以来イニシエーションとプロモーションの概念は広く受け入れられるようになった。二段階癌にはメカニズムに加えて、イニシエーター、プロモーターという物質の両面からのアプローチがある。

PCR法などにより、ヒト癌のプロセスが詳細に分析できるようになった今、ヒト癌に二段階癌の概念をあえて当てはめる必要はないであろう。物質面からの分析にしても、胃がんの食塩、大腸がんの胆汁酸などは実際のヒトのがんにおいて、プロモーターとして働いている可能性は高いが、そのメカニズムはマウス皮膚におけるホルボールエステルとは異なるであろう。今必要なのはイニシエーション、プロモーションという概念にとらわれることなく、多段階癌の立場でヒト癌を考え方直すことではなかろうか。

5. ヒト癌分析にみられるギャップ

PCRに代表されるような技術の進歩により、ヒトのがんを詳細に分析することが可能になった。今われわれはヒトのがんを直接研究できるようになったのである。ヒトのがんを分析できないときには、動物実験にはかなりの意義があったが、その相対的重要性が低くなりつつあるのは事実である。現在のところ多段階癌がんが遺伝子レベルで明らかになっているのは大腸がんなど一部のがんに過ぎないが、近い将来ほとんどすべてのがんについて遺伝子の変化が明らかになり、診断治療に応用されるであろう。

ヒトの癌要因の探索はまだ不十分である。IARCのヒト癌性評価、いわゆるIARCモノグラフシリーズは貴重な資料であるが、物質に関する情報を重視するが故に、その癌要因は職業がん、医療原性がんに片寄っている。「普通のおじさん、おばさん」のがんは単独物質に帰せられるものではなく、長い間の生活習慣のちく積の結果によると考えられる。しかし生活習慣の分析は喫煙、食生活などに常識的なものに限られている。今後の疫学分析によって、癌要因となるような明瞭な生活習慣の分析から一次予防につながることを期待したい。

以上癌研究をめぐる様々なギャップについて、私の個人的な感想を述べた。がんというmulti-factors, multi-genes, multi-stagesの疾病を対象とする限り、これらのギャップの存在は避けられないであろう。ギャップを無理に越えようとするのではなく、その存在で認め、実験系の長所を生かすことが大事であると思う。

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「変異原研究の新展開に向けて」(S3-2)

Comparative Genomic Hybridization (CGH) による 婦人科癌の分子細胞遺伝学的解析

Molecular cytogenetic analysis of gynecological cancers
using comparative genomic hybridization

坂本 優¹, 坂本宙子³, 岩渕浩之¹, 菊池義公⁴
石館 基³, 野田哲生², 杉下 匡¹, 天神美夫¹

¹ 佐々木研究所附属杏雲堂病院婦人科 101 東京都千代田区神田駿河台 1-8-12

² 癌研究会癌研究所細胞生物 170 東京都豊島区上池袋 1-37-1

³ オリンパス光学工業(株) 染色体研究センター (CRC) 192 八王子市久保山町 2-3

⁴ 防衛医科大学校産婦人科 359 所沢市並木 3-2

Masaru Sakamoto¹, Hiroko Sakamoto³, Hiroshi Iwabuchi¹, Yoshihiro Kikuchi⁴,
Motoi Ishidate³, Tetsuo Noda², Tadashi Sugishita¹ and Yoshio Tenjin¹

¹ Department of Gynecology, Sasaki Institute Kyoundo Hospital,
1-8-12 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

² Department of Cell Biology, Cancer Institute, 1-37-1 Kamiikebukuro,
Toshima-ku, Tokyo 170, Japan

³ Chromosome Research Center, Olympus Optical., Co., Ltd.,
2-3 Kuboyama-cho, Hachioji, Tokyo 192, Japan

⁴ Department of Obstetrics and Gynecology, National Defense University,
3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359, Japan

(受理: 1997年4月10日)

Summary

Comparative Genomic Hybridization (CGH) is a powerful new method which allows genome-wide mapping of regions with DNA sequence copy number changes, both increases and decreases, in a single hybridization without previous knowledge of the regions of abnormality. CGH is based on *in situ* hybridization of differentially labeled tumor DNA and normal DNA to normal human metaphase chromosomes. After hybridization, copy number variations among the sequences in the tumor DNA are detected by measuring the tumor/normal fluorescence intensity ratio for each locus on the target chromosomes. Many previously unknown chromosomal regions with relative copy number changes have been detected in various tumors by CGH. Some changes have been identified as genetic markers associated with biological and clinico-pathological characteristics (i.e., histopathological grade and clinical outcome). We report briefly on current progress in CGH analysis to ovarian and uterine cervical cancer in our laboratory.

Keywords: CGH; ovarian cancer; cervical cancer; genetic diagnosis; drug resistance

緒 言

悪性腫瘍は、種々の遺伝学的变化の蓄積により発生することが知られている。これらの変化には、染色体レベルの大きな変化（染色体の欠失や増加など）や遺伝子配

列レベルの小さな変化（遺伝子配列の欠失や増幅、点突然変異など）が含まれる。

染色体レベルの大きな変化の検出には、従来より培養後得た分裂中期染色体の核型分析が用いられているが、

固形腫瘍の場合、複雑な染色体異常を示すことが多く解析が非常に困難である。また、遺伝子配列レベルの小さな変化を検出する方法としては、Southern blotting, RFLP 法, PCR-SSCP 法などが知られているが、検索できる遺伝子あるいは染色体領域が限定されてしまい、それ以外の領域は検索不可能であるという弱点がある。

1992 年 Kallioniemi らによって開発された Comparative Genomic Hybridization (CGH) と呼ばれる分子細胞遺伝学的手法は、腫瘍 DNA 中の遺伝子コピー数の増加ないし減少を、1 回のハイブリダイゼーションで同時に検出し、しかもそれらの領域を正常染色体上にマッピングできる優れた方法である (Kallioniemi *et al.*, 1992)。著者らは、CGH 法を日本ではじめて導入し、婦人科癌の新しい遺伝子診断法の開発を試みている (坂本ら, 1994; 坂本ら; 1996)。

I. CGH 法の原理

CGH 法では、被検 DNA (腫瘍 DNA) を緑色蛍光 (FITC), 正常組織由来 DNA を赤色蛍光 (Texas Red) でそれぞれ標識し、これら 2 種類の DNA プローブを等量混合したものを blocking DNA (Cot-1 DNA) の存在下で、ヒト正常分裂中期染色体に対し競合的にハイブリダイゼーションする (Fig 1)。染色体の各部位における、被検 DNA プローブと正常 DNA プローブ間の競合的ハイブ

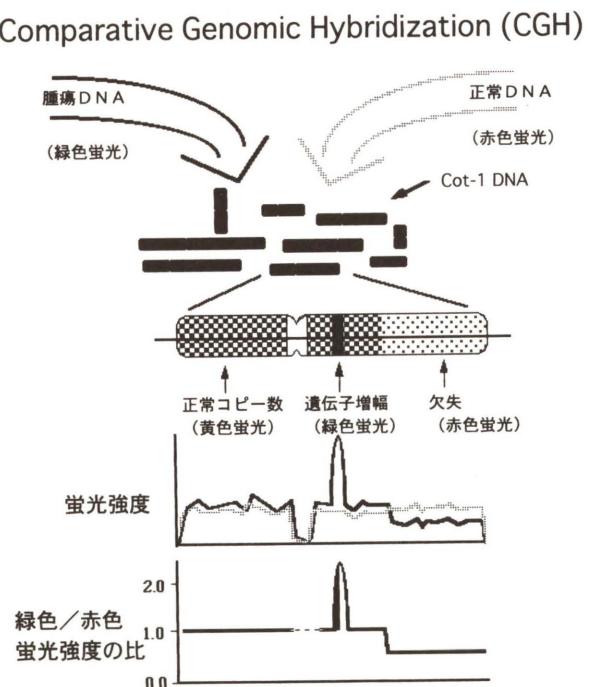


Fig. 1. Principle of CGH.

CGH is based on *in situ* hybridization of differentially labeled total genomic tumor DNA and normal DNA to normal human metaphase chromosomes. After hybridization, copy number variations among the sequences in the tumor DNA are detected by measuring the tumor/normal fluorescence intensity ratio for each locus on the target chromosomes.

リダイズにより、被検 DNA に遺伝子コピー数の増加が存在すれば、CGH を施行した正常染色体上で、その遺伝子座位に対応する染色体領域に緑色蛍光のバンドが観察される。一方、被検 DNA に遺伝子コピー数の減少が存在すれば、対応する領域に赤色蛍光のバンドが観察される。染色体の対比染色として DAPI (青色蛍光) を用いる。染色体由来のマルチカラーの蛍光は、デジタル蛍光顕微鏡システムならびに画像取り込みソフトにより取り込まれデジタル信号に変換される。蛍光強度解析ソフトにより、それぞれの染色体の長軸にそって、緑色ならびに赤色蛍光の蛍光強度曲線が作製され、引き続き、緑色の赤色蛍光に対する比が決定され、正常 DNA に対する被検 DNA 中の遺伝子コピー数の相対的な増減を、セントロメアおよびテロメア近傍を除く全ての染色体領域において検出することができる。

II. CGH 法の利点と欠点

CGH 法の利点としては、1) すべての染色体において、ユニークシーケンスのコピー数の増加ならびに減少を同時に検出できる。基本的に 1 回のハイブリダイゼーションですべての染色体の異常をスクリーニングできるので、1 回の実験で単一の座位をターゲットとする従来の遺伝子異常の検索法よりも明らかに有利である。2) コピー数の変化が正常染色体上にマッピングされるため、特別なプローブを必要とせずに、未知の塩基配列のコピー数の変化を検出できる。

CGH 法の欠点としては、1) 転座、逆位、真の倍数体が検出できない。ただし、unbalanced translocation のように、転座に伴い小さな欠失が観察され、その欠失領域に重要な腫瘍抑制遺伝子が存在している可能性もある。したがって、従来の細胞遺伝学的手法では、転座しか認められないような疾患でも、転座に伴う小さな欠失として、CGH により検出できる可能性がある。2) 感度に難点がある。CGH によるコピー数の増加の検出感度は、増幅単位 (amplicon) と増幅レベルという二つのパラメータにより規定される。増幅単位が 5 Mb 以上であれば、2 倍の増幅レベルでも検出可能であるが、増幅単位が約 300 kb の場合は、5~10 倍以上の増幅レベルで検出可能となる。一方、コピー数の減少の検出感度は、増加の検出感度よりも低く、5 Mb 以上の欠失がないと検出できない。ただし、腫瘍抑制遺伝子が不活化する際、一方の対立遺伝子は、点突然変異や微小欠失としてミクロの変化を示すことが多いが、もう一方の対立遺伝子は、染色体上で 5 Mb 以上のマクロの欠失を示すことが多く、このようなマクロの欠失を CGH によって検出できる可能性は高い。また、臨床材料では、正常細胞の混入により検出感度が低くなるが、精度の高い CGH 分析を施行すれば、正常細胞が 50% も混入しているような臨床材料でも十分評価可能であることが示唆されている。3) セントロメア近傍ならびにヘテロクロマチン

Invasive cancer of the uterine cervix (kyo-19)

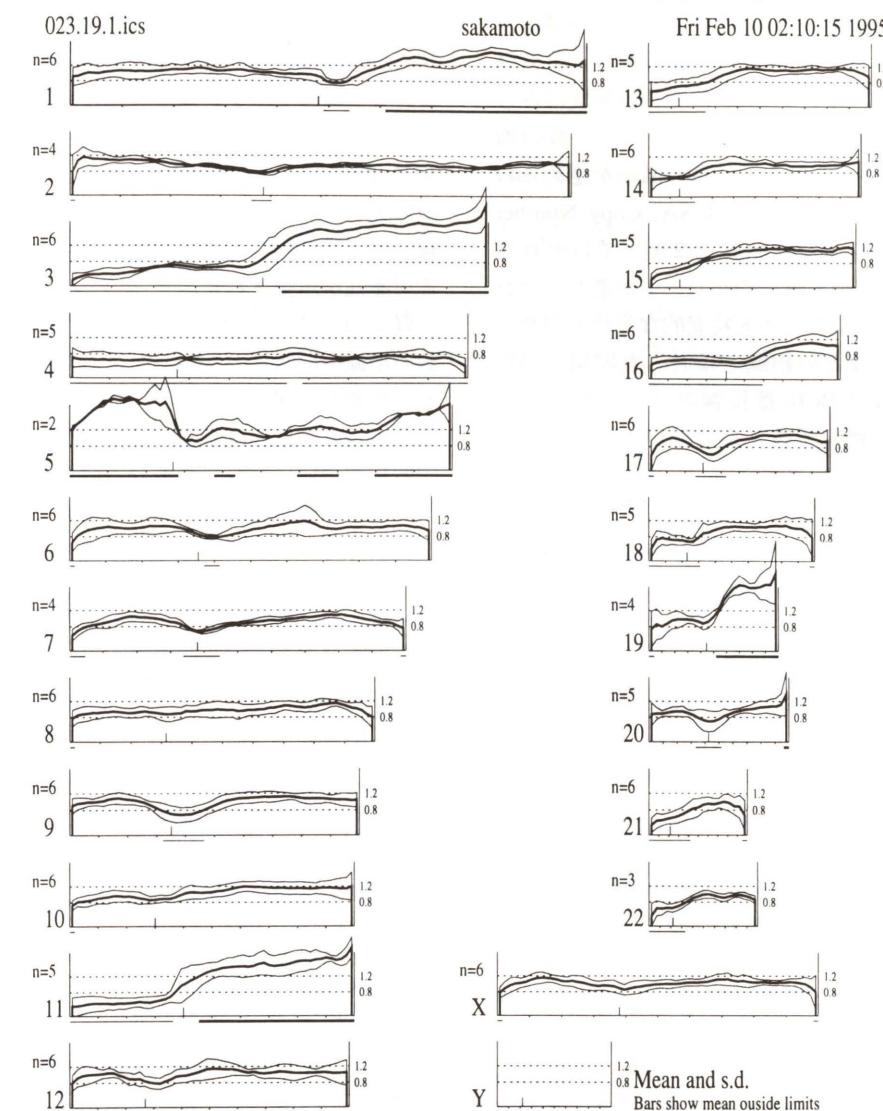


Fig. 2. An example of CGH profile of uterine cervical cancer.

The green/red fluorescence intensity ratio is displayed as mean (central trace) \pm S.D. (flanking traces) obtained from the analysis of chromosomes from several metaphase images of CGH. Chromosomal regions of relative DNA sequence copy number loss are depicted as thin lines, and regions with relative DNA sequence copy number gain are depicted as thick lines below tracing. The ratio profile was obtained from the CGH analysis to cancer cells derived from a case with invasive uterine cervical cancer, showing copy number loss on 3p, 4p, 4q, 11p, 16p and 18p; and copy number increase on 1q, 3q, 5p, 5q, 11q and 19q.

領域では、個体間の反復配列のコピー数の差異により緑色/赤色蛍光の比が不安定となり、CGH で評価ができない場合がある。また、テロメア近傍でも蛍光強度の減少によって、緑色/赤色蛍光の比が不安定となる場合があり、得られた結果を評価する場合には注意を要する。

4) Microsatellite instability (MIN) を有する癌では CGH で殆ど異常を認めない可能性がある。Schlegel らが、大腸癌において MIN を有する癌では殆ど CGH で異常を認めないが、MIN を有しない癌では、CGH で高頻度に異常を認め、7, 13, 20q の gain と 9p, 17, 18 の loss などがみられたと報告している (Schlegel *et al.*, 1995)。このことは、MIN の有無と CGH で検出される染色体コピー数の異常とが逆相関をすることを意味し、

発癌過程が異なることを示している。したがって、CGH 法により共通増幅領域ならびに共通欠失領域を同定するためには、MIN を有しない腫瘍を CGH 分析することが必要であると思われる。

III. CGH 法の応用

CGH 法により、1) 腫瘍 DNA の共通増幅領域ならびに共通欠失領域を同定し、その腫瘍の癌遺伝子および癌抑制遺伝子の染色体上の存在部位を推定できる。上記領域と病理組織学的グレードや臨床予後との相関を検討し、癌の遺伝学的悪性度を規定できる。2) 抗癌剤耐性に関与する遺伝学的变化も検索できる。3) 発癌過程における遺伝学的变化を明らかにできる。

1) CGH 法による卵巣癌の遺伝学的悪性度診断

我々は卵巣癌の共通増幅領域および共通欠失領域を同定した (Iwabuchi *et al.*, 1995; 岩渕ら, 1997)。卵巣癌の臨床検体 (44 例) において 30% 以上の高頻度にみられる変化として, 3q25-26 および 8q24 のコピー数の増加, 16q および 17pter-q21 のコピー数の減少が認められた。コピー数異常を示した領域 (CNA; Copy Number Abnormality) の総数は、良性腫瘍 (12 例) ではゼロであったが、卵巣癌の病理組織学的グレードが進むにつれて、有意に增加了。高グレード特異的な変化も認められた。また、臨床予後との相関を検討した結果、単独の変化としては、染色体 16 番長腕のコピー数の減少 (-16q) を示した症例が予後不良の傾向を示した。上記 4 つの共通変化領域のいずれか一つ以上の変化を有する卵巣癌 (Class I tumor) は、それ以外の卵巣癌 (Class II tumor) と比較し、予後不良の傾向を示した。

2) CGH 法による卵巣癌の抗癌剤耐性遺伝子マークの検索

さらに、卵巣癌の抗癌剤耐性に関与する遺伝子マークを見出するため、臨床的に CAP 療法に対する感受性が極めて異なる症例に対し CGH 分析を施行し、比較検討した (坂本ら, 1995; 坂本ら, 1996)。CAP 療法に抵抗性を示した症例のみに認められた CNA は、+1q21, -3p24-p22, +3q26-q27, +5q32-qter, +7q11.2, +10p, +14q31-qter, +15q22-qter, +20q13 であり、抵抗性症例でより高度にみられたものは +11q13 であった。基礎的検討として、シスプラチニン感受性培養細胞 KF とそれより誘導された耐性細胞 KFr に対して CGH 分析を施行したところ、耐性獲得後に出現した CNA は、-5p, +8q, -8q, -9q, +11q (+11q13), +14q, +Xq であった。上記の基礎的および臨床的検討により、11q13 および 14q を含むいくつかの染色体領域に、シスプラチニン耐性に関わる遺伝子が存在する可能性が示唆された。

3) CGH 法による子宮頸部発癌・浸潤過程の遺伝学的解析

また、子宮頸部発癌・浸潤過程における遺伝学的变化を解明するため、各段階に相当する細胞株 (16 例) および臨床検体 (40 例) に対して CGH 分析を施行した (坂本ら, 1995; 杉下・坂本, 1996; 杉下・坂本, 1997, 印刷中)。コピー数異常を示した領域の総数は、癌化過程ではコピー数減少領域が有意に増加し、浸潤過程ではコピー数増加領域が有意に増加した。35 例の子宮頸癌

において 25% 以上の頻度でみられる共通の遺伝子コピー数変化領域 (Common CNAs) を 25 箇所認めた。3p24-pter, 6q25-qter, 10p13-pter, Xq26-qter の 4 つの領域のコピー数減少は子宮頸部の発癌に関わる早期の遺伝学的变化である可能性が示唆された。1q41-qter, 5p14-pter, 5q31-qter, 8q24, 17q23-qter, 19q13, 20q13, 22q13 の 8 つの領域のコピー数の増加および 16q12-q22 のコピー数の減少は子宮頸癌の浸潤に関わる後期の遺伝学的变化である可能性が示唆された。

以上のように、CGH 法は、固体腫瘍の遺伝子コピー数の増減を同時に、かつ、ゲノム全体について検索できる大変優れた遺伝子解析法である。CGH 法により卵巣癌の遺伝学的悪性度診断や子宮頸癌の発癌過程の遺伝学的解析が可能になりつつあり、今後あらゆる腫瘍の遺伝子解析や診断に応用されることであろう。

参考文献

- Iwabuchi, H., Sakamoto, M. *et al.* (1995) Genetic analysis in benign, low grade and high grade ovarian tumors, *Cancer Res.*, **55**, 6172-6180.
 岩渕浩之, 坂本 優・他 (1997) CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法を用いた卵巣癌の遺伝学的診断, 産婦人科の実際, **46**(1), 89-95.
 Kallioniemi, A. *et al.* (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *Science*, **258**, 818-821.
 坂本 優, 高橋苗子 (1994) 遺伝子コピー数の増減をゲノム全体について検索できる新しい分子細胞遺伝学的手法 (CGH), 変異原性試験, **3**(4), 197-205.
 坂本 優・他 (1995) 新しい分子細胞遺伝学的方法 (Comparative Genomic Hybridization) を用いた卵巣癌の抗癌剤耐性関連遺伝子マーカーの検索に関する研究, *Oncology & Chemotherapy*, **11**(2), 124-132.
 坂本 優・他 (1995) 未来の遺伝子診断検査, クリニカ, **22**(4), 49-55.
 坂本 優・他 (1996) 分子消化器病学に有用な技術の進歩 CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法, 日本臨床, **54**(4), 43-53.
 Schlegel, J. *et al.* (1995) Comparative genomic *in situ* hybridization of colon carcinomas with replication error, *Cancer Res.*, **55**, 6002-6005.
 坂本 優・他 (1996) CGH および LSC 法を組み合わせた卵巣癌のシスプラチニン耐性機構解明に関する研究, *Cytometric Research*, **6**(2), 9-20.
 杉下 匡, 坂本 優・他 (1996) がんの遺伝子診断の臨床応用に関する研究, 平成 7 年度がん克服新 10 か年戦略プロジェクト研究報告書 (厚生省), pp. 207-216.
 杉下 匡, 坂本 優・他 (1997) がんの遺伝子診断の臨床応用に関する研究, 平成 8 年度がん克服新 10 か年戦略プロジェクト研究報告書 (厚生省), (印刷中).

Environ. Mutagen Res., **19**: 105-110 (1997)

シンポジウム「21 世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
 「変異原研究の新展開に向けて」(S3-4)

染色体変化の全ゲノム領域にわたる検索
(増幅、欠失およびメチル化の変化について)Genome-wide detection of chromosomal variation
(amplification, deletion and methylation)

大隅智也¹, 伊藤充輝¹, 岡崎康司¹, 村松正實¹
 William A. Held², 林崎良英¹

Tomoya Ohsumi¹, Mitsuteru Itoh¹, Yasushi Okazaki¹, Masami Muramatsu¹,
 William A. Held² and Yoshihide Hayashizaki¹

¹理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター ゲノム科学
 305 茨城県つくば市高野台 3-1-1
²ロスウェルパーク癌研究所 分子細胞生物学
 Elm and Carlton Streets, Buffalo, New York 14263 USA

¹Genome Science Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),
 3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

²Mol. Cell. Biol., Roswell Park Cancer Institute,
 Elm and Carlton Streets, Buffalo, New York 14263 USA

(受理: 1997 年 3 月 10 日)

Summary

Genome scanning is a technique which can rapidly identify the differences between genomic DNA samples. Several genome scanning methods have been developed to detect DNA alteration in cancer tissues. We have developed Restriction Landmark genome Scanning (RLGS) method for screening thousands of loci throughout the genome in a single two-dimensional gel electrophoretic pattern. Several cancer DNAs were analyzed with this method and DNA alteration including deletion, amplification and change of methylation status in cancer DNAs were found. Furthermore, using polymorphic spots, which were mapped to a certain chromosome, we could estimate the chromosomal location of loss of heterozygosity (LOH) and also methylation changes in the cancer tissue. Thus, RLGS provides us an important tool for the genomic analyses of cancer DNA alteration.

Keywords: RLGS (Restriction Landmark Genome Scanning), genetic map, polymorphism, loss of heterozygosity (LOH), DNA methylation

緒 言

癌は生体内において秩序だった分裂、分化の制御を受けており、正常細胞の DNA に変異が生じ、無秩序に増殖を起こすようになった状態といえる。この観点から、癌遺伝子、癌抑制遺伝子といった癌の発症、増殖、転移に関する遺伝子の探索には癌組織 DNA における変異の検出から染色体の増幅、欠失、転座部位の解析、更にはヘテロ接合性の欠失 (LOH) 等の解析により進められてきた。多数の癌組織および株化された癌細胞において頻

発するこれらのゲノム上の変化領域を同定し、その領域内に存在する転写単位の解析を進めることで、これまでに *c-abl* などの癌遺伝子や *Rb*, *Apc* といった癌抑制遺伝子など、多くの癌関連遺伝子が同定されてきた (Friend *et al.*, 1986; Nishisho *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1987)。また近年、遺伝子発現の制御の一つとして DNA のメチル化による制御について詳しく調べられており、染色体上の塩基配列自体には異常がなくても、そのメチル化が変化することによって遺伝子の発現に異常が生じている

例が報告されている (Greger *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1994; Merlo *et al.*, 1995; Rideout *et al.*, 1990)。

これらの癌における DNA の変異解析にはこれまで染色体の顕微鏡観察による欠失, 増幅, 転座領域の解析やサザン法あるいは PCR を用いた解析といった分子生物学的解析が行なわれてきた。このとき, 全染色体上に存在する DNA 変異を検出しようとした場合, いかに多くの染色体上の座位について解析できるかというスクリーニング能が非常に重要である。

我々は「制限酵素ランドマーク」という新しい概念を創出し, それに基づき, 制限酵素ランドマークを二次元電気泳動上のスポットとして視覚化する restriction landmark genome scanning (RLGS) 法を開発した (Hatada *et al.*, 1991; Hayashizaki *et al.*, 1993; Okazaki *et al.*, 1995)。本法は, ゲノム上の制限酵素ランドマークの有無とそのコピー数を決定するために考案された方法であり, 一試技において 2,000 点以上の制限酵素ランドマークを一度に解析することのできる, 高速スキャニング法である。今回この RLGS 法を各種癌組織における DNA 変化の検索に用いた例について述べる。

ゲノムスキャニング

「ゲノムスキャニング」とは, ゲノム上に散らばった各座位の有無とコピー数を高速に検索する方法の総称である。サザン法や PCR 法を用いたゲノムスキャニング法が開発されたことから, プローブやプライマーを用いてゲノム DNA 上の各ランドマーク (その各座位に一対一対応のシグナルとして視覚化され得るゲノム上の座標として定義される) を定量的及び定性的に視覚化できるようになった。これらのシステムでは, プローブやプライマーの DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる特異的認識を利用して各々の座位に特徴的なシグナルが検出される。

癌関連遺伝子探索においてゲノムスキャニングの功績は大きい。それまで癌ウィルスに取り込まれた癌遺伝子の探索から進められていた研究は癌細胞における染色体異常 (増幅, 欠失および転座など) の領域の解析へと変わっていった。この染色体異常領域の解析を DNA レベルで行なうことを可能にしたのがサザン法や PCR を用いたゲノムスキャニングである。特に最近では PCR 法を使ったマイクロサテライトマーカーを利用して癌組織のゲノムにおける欠失や増幅を解析し, 癌関連遺伝子を染色体上にマップするという方法がよく使われている (Dietrich *et al.*, 1994)。

我々が開発してきた RLGS 法はランドマークが二次元電気泳動上で 2,000 点ものスポットとして視覚化される方法である (Hatada *et al.*, 1991; Hayashizaki *et al.*, 1993)。つまり PCR 法などでは 2,000 反応を行なわなければならぬほどのランドマークを一試技にて検索できるのである。この高速ゲノムスキャニング法について

その特徴と癌解析に応用した例を挙げる。

RLGS 法の癌解析への応用

RLGS 法の概説と RLGS パターンの例を Fig. 1 に示す。

RLGS 法は組織 DNA を直接ランドマークとなる制限酵素で切断し, その末端に直接 ^{32}P にて標識しこれを検出する為, 最終的に得られる RLGS パターン上のスポットの強度は実際の DNA 量に比例する。そのため少量の正常組織 DNA の混入であれば多少スポット強度が強くなるが欠失等によるスポット強度の減少は検出可能である。これに対し, PCR を用いた解析法では反応過程における正常組織 DNA からの増幅により欠失等の検出が困難である。またランドマーク酵素を *NotI* 等のメチル化感受性酵素を用いることにより DNA メチル化の状態も解析可能である。この DNA メチル化と癌との関連は最近研究が進められてきており (Laird and Jaenisch, 1994; Holliday and Grigg, 1993), 癌抑制遺伝子のメチル化による発現の減少が癌組織で検出される例が報告されている (Herman *et al.*, 1994; Merlo *et al.*, 1995; Ohtani-Fujita *et al.*, 1993; Zhan *et al.*, 1995)。このメチル化の解析は PCR 法では解析できず, 一般的には既知の遺伝子のプローブを用いてサザン法によって調べられている。これに対し RLGS 解析ではゲノム全体にわたるランドマーク部位のメチル化を解析可能である為, メチル化の解析から未知遺伝子を単離同定する事も可能である。この RLGS 法による解析にはほかにも, 1) ランドマーク制限酵素やその後の DNA 切断に用いる制限酵素を変える事により, 多くの異なる座位を検出する事が可能である, 2) サザン法のようにハイブリッド形成を指標としていない為, これまで未知の塩基配列であった領域についても解析をする事ができる, ひいては異なる生物種についても同様の方法で解析を行なう事が可能である, 3) 種によって異なるスポット (polymorphic spot) を用いて遺伝解析によって polymorphic spot を遺伝地図上にマップすることができ, このマップされたスポットを解析することで癌 DNA において強度の変化したスポットの染色体上の位置情報を知ることができる, といった利点がある (Hayashizaki *et al.*, 1993)。

これまで RLGS 法を用いてマウスあるいはヒトの癌組織について解析を行なった例が報告されている。Hirotsume らはヒト乳癌組織, 繊維芽細胞種等の組織において RLGS 解析を行ない, 強度の増大が見られるスポットを確認した (Hirotsume *et al.*, 1992)。これはすなわち癌においてこの座位を含む DNA 断片が増幅していることを意味している。その後の解析でこの増幅している座位は癌遺伝子 *int-2* であることが証明された。また Miwa らは同様の方法でヒト肺臓癌を解析し, 増幅しているスポットを単離した。その後の解析の結果, この増幅している座位は卵巣癌に関与すると考えられている癌

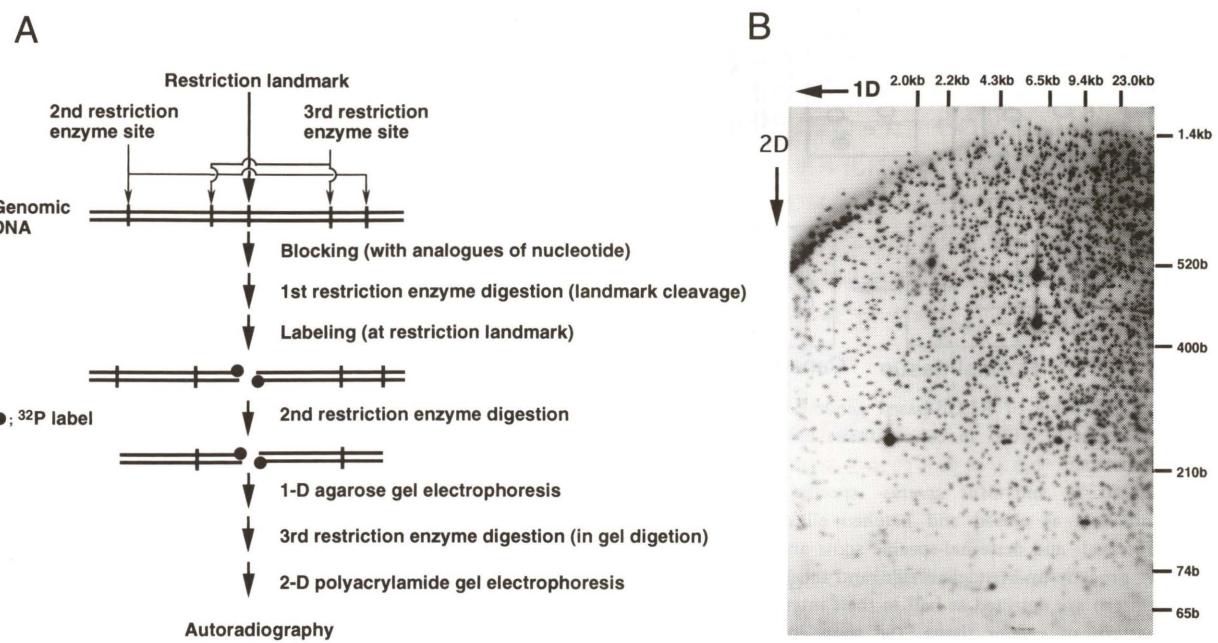


Fig. 1. Principle of RLGS and an example of RLGS profile

A, Flowchart of RLGS analysis. Genomic DNA is treated with DNA polymerase I in the presence of nucleotide analogues to prevent incorporation of radioisotope into nick site of sample DNA in the following step (blocking). After digestion with landmark enzyme such as *NotI* (1st restriction enzyme digestion), the sample DNA is labeled with radioisotope ^{32}P (labeling). To reduce the average length, the sample DNA is digested with another enzyme, which can cleave sample DNA more frequently than landmark enzyme, such as *EcoRV* (2nd enzyme digestion), then it is subjected to 1-D agarose tube gel electrophoresis (1-D electrophoresis). After electrophoresis, this agarose tube gel is soaked with enzyme mixture which contains the other restriction enzyme such as *MboI* (3rd enzyme digestion). Then the tube gel is subjected to 2-D polyacrylamide gel electrophoresis (2-D electrophoresis). Finally, the polyacrylamide gel is dried and subjected to autoradiography; B, An example of RLGS pattern. RLGS profile of mouse genomic DNA using enzyme combination of *NotI*, *EcoRV*, *MboI* is shown. Molecular size marker is shown on the periphery.

遺伝子 *AKT2* であることが明らかとなった (Miwa *et al.*, 1996)。Nagai らも同様の方法でヒト肝臓癌の解析を行ない, 強度の増大および減少の生じているスポットを確認した (Nagai *et al.*, 1995)。スポット強度の減少は恐らく片方のアレルが欠失している loss of heterozygosity (LOH) を意味するものと考えられ, 現在癌抑制遺伝子探索の際の指標として用いられている LOH が RLGS 法でも検出可能であることが示された。さらに Miwa らはヒト悪性黒色腫細胞株を対象として RLGS 解析を行なったところ強度が非常に増大しているスポットを確認した (Miwa *et al.*, 1995)。このスポットに相当する DNA 断片をクローニングしてサザン法にて解析したところこのスポットの増強は DNA の増幅によるものではなく反復配列上の *NotI* 部位のメチル化の解除によるものであることが判明した。すなわち正常細胞ではメチル化を受けている反復配列が癌細胞特異的に脱メチル化が生じ, そのため反復配列上の *NotI* 部位が酵素による切断を受けるようになったものと予想された。このことは RLGS 解析によって癌組織 DNA のメチル化の変化も解析できることを示している。

染色体の位置情報を用いた RLGS ゲノムスキャニング

我々もマウスの肝臓癌を試料として RLGS 解析による DNA 変化を検索した (Fig. 2)。但し, このとき解析の対象としてマウスの種間雑種に生じた癌を用い, 解析する RLGS スポットとして種間に存在する多型に起因するスポット (polymorphic spot) を調べた (Ohsumi *et al.*, 1995)。この解析法には次のような利点がある。まず第一に, polymorphic spot は一方のアレルからのみに起因するため, LOH の解析が容易である。つまり, LOH の場合一方のアレルのみが欠失するため, 双方のアレルから起因する non-polymorphic spot はそのスポット強度が半分に減少するだけであるが, polymorphic spot は一方のアレルのみから起因するためスポットは消失することになる。このとき, 試料となる癌組織 DNA に正常 DNA が混入すると non-polymorphic spot の場合スポット強度の変化は非常に困難となるが polymorphic spot の場合は強度の変化が大きいので影響を受けにくい。この点で polymorphic spot の解析は有利といえる。第二点として, どちらの親由来のアレルが変化したかを知ることが可能である。これは癌において変異を起こしやすいアレル (allelic imbalance) を解析できる

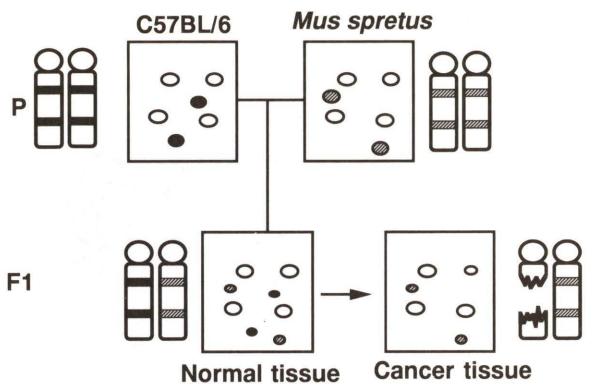


Fig. 2. Principle of RLGS-based genome-wide search for detection of LOH in cancer tissue using polymorphic spots/loci.

C57BL/6- and *Mus spretus*- specific spots/loci are indicated as closed and hatched ellipse, respectively. Paternal- and maternal-specific spots are transmitted to F₁ progeny by Mendelian rule, and those spots in the F₁ pattern are detected as half in their intensity. In RLGS pattern of cancer tissue, the spots located on LOH region are deleted or at least decreased in their spot intensity.

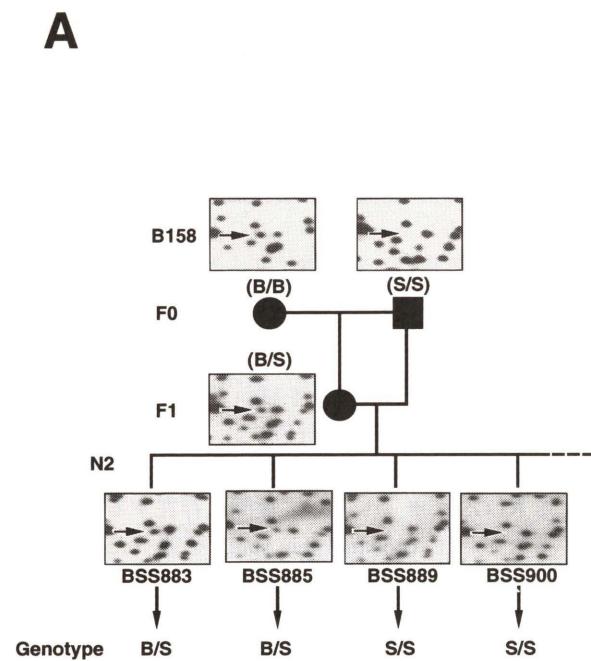


Fig. 3. Mouse genetic map using RLGS spots/loci.

A, Principle of linkage analysis using polymorphic spots on RLGS profiles. BSS backcross ([C57BL/6(B6) × *Mus spretus* (Sp)] × *Mus spretus* (Sp)) were used for genetic linkage analysis. Parts of RLGS profile of each progeny are magnified and shown in this figure. These spots that are present only on B6 profile (e.g.; B158 indicated by the arrow) but absent on Sp profile are defined as B6-specific spots. On F₁ profile, the intensity of spot B158 becomes half by following the Mendelian rule. In profiles of backcross progenies, spot B158 is seen in BSS883 and BSS885 but not in BSS889 and BSS900. Thus, each genotype of the locus corresponding to spot B158 in BSS883, BSS885, BSS889 and BSS900 is identified as B6/Sp, B6/Sp, Sp/Sp and Sp/Sp, respectively; B, Mouse genetic map composed of 575 RLGS spots/loci using BSS backcross.

という点で興味深い情報を得ることが可能である。そして第三に、polymorphic spot は遺伝子型を反映しているので (Fig. 3A), 戻し交配家系にて連鎖解析することにより、遺伝地図上にマップすることができる (Fig. 3B)。これはすなわちそのスポットと染色体上の位置とを対応させることができ、強度の変化したスポットが染色体上のどの位置にあるものか知ることができる。この情報は癌におけるDNA変化を解析する上で有用な情報となる。我々はこの情報を、強度の減少したスポットが LOH によるものなのかメチル化に起因するものなのかを推定するのに利用した (Ohsumi *et al.*, 1995)。つまり、DNAにおける変化としては LOH はDNAメチル化よりもより広範囲に生じるものと予想される為、一方のアレルのみについてスポット強度の減少が連続的に生じている領域は LOH が生じているもの、単独で強度が減少しているスポットはメチル化によるものと推定した。われわれはすでに雌の C57BL/6 (B6) 種と雄の *Mus spretus* (spretus) 種との雑種に spretus を掛け合せた戻し交配家系 ([B6 × spretus] F₁ × spretus; BSS back-

cross) を用いて 575 個の polymorphic spot を染色体上にマップしている。このマップされたスポットについて解析を行なった。

実験動物として B6 に SV40T 抗原を導入したトランスジェニックマウスと spretus との F₁ を用いた。この F₁ マウスには高頻度で肝臓癌が生じるのでこのDNAをサンプルとして RLGS 解析を行なった。一例として癌組織において強度の減少したスポットを図に示す (Fig. 4A)。

我々は polymorphic spot の強度変化とその位置情報とからそれぞれの癌試料における LOH を遺伝地図上にマップした。そして 30 種の肝臓癌試料について同様のマップを作製し、全体として LOH の頻度の高い領域を染色体上の第 1, 4, 5, 7, 13 番染色体上に検出した (Ohsumi *et al.*, 1995)。第 13 番染色体上の LOH の頻度の高い領域に存在するスポットをクローニングし、サザン法による解析を行なったところ実際に DNA の欠失が確認され、かつその欠失の状態は RLGS にて検出されたスポット強度の変化と一致していた (Fig. 4B)。以上のこととは RLGS による DNA 变化の解析は実際の DNA

変化を反映しており、癌組織など、DNA の変化を解析する手法として非常に有用であることが示された。これとは別に前述した予測に則ってメチル化を受けているスポットの同定も行なった。その結果 30 検体中で 75% 以上の検体でメチル化によると思われる強度の減少を示したスポットは 14 個あり、そのうちの一つは肝臓癌においてアレル特異的なメチル化を生じ、また正常組織においても種特異的なメチル化を生じるという興味深いものであった (Fig. 4C)。このように RLGS 法は PCR 法によるゲノムスキャニング法では成し得ないメチル化の変化をも検索することが可能であり、癌発症及び進展にかかる後生的な変化として注目されているメチル化の解析にも有効であるものと考えられた。

結語

正常細胞の癌化には多種多様な状況が考えられるが、全てはDNAの変異が蓄積し、そのうちの一つが引き金となって発症、またさらなる変異の蓄積が癌の増殖、浸潤といった悪性化へと進行する。このなかのどのDNA変異が引き金となって次のステップへと進むのか。その答えは癌DNAに蓄積された変異の中にあるはずである。RLGS 解析を用いたゲノムスキャニング法はこの膨大な変異の山の中から回答となる遺伝子を同定するに至るための非常に有用な手法であると考える。

謝辞

本稿を執筆するに当たり、奥泉久人博士、赤間公美、

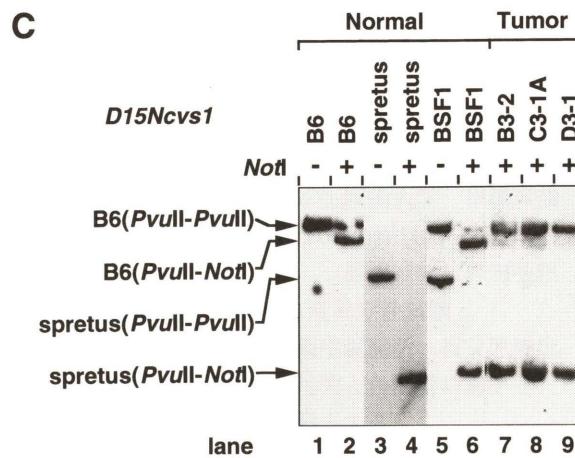
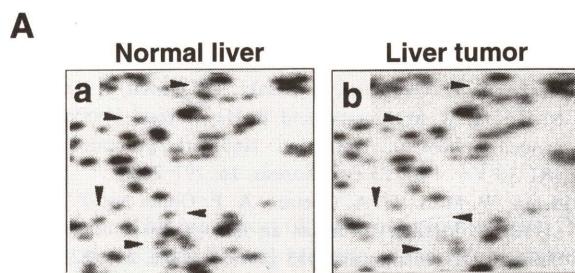
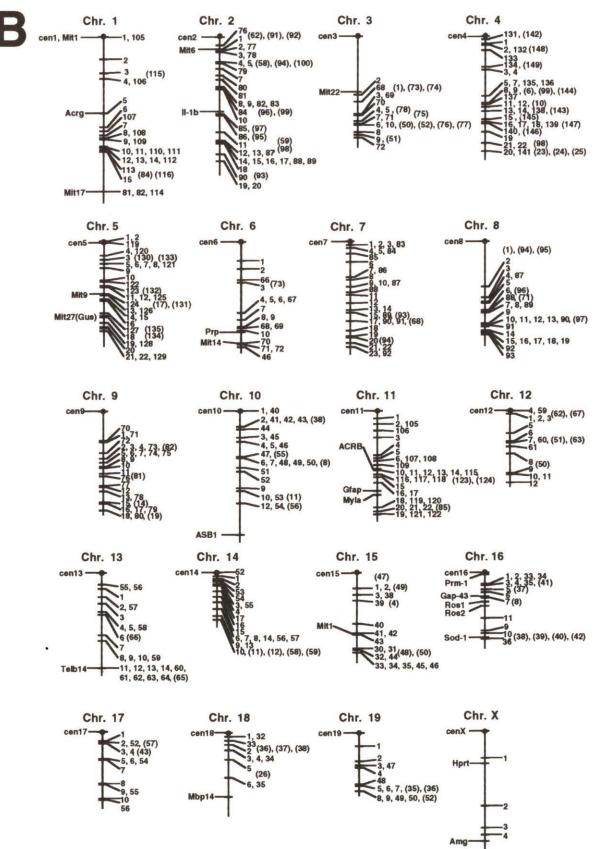


Fig. 4. Application of RLGS method to the search for the LOH in cancer.

A, A part of RLGS profile of normal (a) and tumor DNA (b). Five spots indicated by the arrowhead decreased in their intensity on the profile of liver tumor; B, Comparison of Southern blot and RLGS spot analysis. *D13Ncv10* (corresponds to spot B416; C57BL/6-specific spot) is shown as a representative. This spot/locus is located on a region showing sequential RLGS spot loss in common with 30 analyzed tumors. Sample IDs are shown on the top of Southern profile. The samples marked with asterisk (*) are those of tumor tissues and others are those of normal ones. 2, 0 and w represent diploid genome spot intensity, haploid spot intensity, loss of spot and reduced spot intensity (weak), respectively. We can see a good correspondence between RLGS spot intensity and that of B6-allele bands; C, Southern blot analysis showing strain specific methylation. The probe used here (spot B330; *D15Ncv1*) is deleted as being methylated in tumor DNAs. C57BL/6 (B6), *Mus spretus* (spretus), [B6 × spretus] F₁ (BSF₁) liver DNAs and liver tumor DNAs were digested with *Pvu*II and *Not*I (*Not*I-), or *Pvu*II only (*Not*I-). In B6 DNA, this site is methylated partially (lane 2), while the site is not methylated but the other normal DNA in spretus and BSF₁ (lane 4 and 6). In tumor tissues, only B6 allele is methylated in BSF₁ tumor DNAs (lane 7-9) suggesting that allele specific methylation occurs in cancer tissues at this locus.

海老根るみ子両氏のご協力を得ましたことを深く感謝致します。

参考文献

- Dietrich, W. F., E. H. Radany, J. S. Smith, J. M. Bishop, D. Hanahan and E. S. Lander (1994) Genome-wide search for loss of heterozygosity in transgenic mouse tumors reveals candidate tumor suppressor genes on chromosomes 9 and 16, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 9451-9455.
- Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma, *Nature*, **323**, 643-646.
- Greger, V., E. Passarge, W. Hopping, E. Messmer and B. Horshemke (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma, *Hum. Genet.*, **83**, 155-158.
- Hatada, I., Y. Hayashizaki, S. Hirotsune, H. Komatsubara and T. Mukai (1991) A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 9523-9527.
- Hayashizaki, Y., S. Hirotsune, Y. Okazaki, I. Hatada, H. Shiba, J. Kawai, K. Hirose, S. Watanabe, S. Fushiki, S. Wada et al. (1993) Restriction landmark genomic scanning method and its various applications, *Electrophoresis*, **14**, 251-258.
- Herman, J. G., F. Latif, Y. Weng, M. I. Lerman, B. Zbar, S. Liu, D. Samid, D. S. Duan, J. R. Gnarra, W. M. Linehan et al. (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 9700-9704.
- Hirotsune, S., I. Hatada, H. Komatsubara, H. Nagai, K. Kuma, K. Kobayakawa, T. Kawara, A. Nakagawara, K. Fujii, T. Mukai et al. (1992) New approach for detection of amplification in cancer DNA using restriction landmark genomic scanning, *Cancer Res.*, **52**, 3642-3647.
- Holliday, R. and G. W. Grigg (1993) DNA methylation and mutation, *Mutat. Res.*, **285**, 61-67.
- Laird, P. W. and R. Jaenisch (1994) DNA methylation and cancer, *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1487-1495.
- Merlo, A., J. G. Herman, L. Mao, D. J. Lee, E. Gabrielson, P. C. Burger, S. B. Baylin and D. Sidransky (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers, *Nat. Med.*, **1**, 686-692.
- Miwa, W., K. Yashima, T. Sekine and T. Sekiya (1995) Demethylation of a repetitive DNA sequence in human cancers, *Electrophoresis*, **16**, 227-232.
- Miwa, W., J. Yasuda, Y. Murakami, K. Yashima, K. Sugano, T. Sekine, A. Kono, S. Egawa, K. Yamaguchi, Y. Hayashizaki and T. Sekiya (1996) Isolation of DNA Sequences Amplified at Chromosome 19q13.1-q13.2 Including the AKT2 Locus in Human Pancreatic Cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 968-974.
- Nagai, H., H. Tsumura, M. Ponglikitmongkol, Y. S. Kim and K. Matsubara (1995) Genomic aberrations in human hepatoblastomas detected by 2-dimensional gel analysis, *Cancer Res.*, **55**, 4549-4551.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, Y. Miyoshi, Y. Miki, H. Ando, A. Horii, K. Koyama, J. Utsunomiya, S. Baba and P. Hedge (1991) Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients, *Science*, **253**, 665-669.
- Ohsumi, T., Y. Okazaki, H. Okuzumi, K. Shibata, T. Hanami, Y. Mizuno, T. Takahara, N. Sasaki, M. Ueda, M. Muramatsu et al. (1995) Loss of heterozygosity in chromosomes 1, 5, 7 and 13 in mouse hepatoma detected by systematic genome-wide scanning using RLGS genetic map, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 632-639.
- Ohtani-Fujita, N., T. Fujita, A. Aoike, N. E. Osifchin, P. D. Robbins and T. Sakai (1993) CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene, *Oncogene*, **8**, 1063-1067.
- Okazaki, Y., H. Okuzumi, N. Sasaki, T. Ohsumi, J. Kuromitsu, N. Hirota, M. Muramatsu and Y. Hayashizaki (1995) An expanded system of restriction landmark genomic scanning (RLGS Ver. 1.8), *Electrophoresis*, **16**, 197-202.
- Rideout, W. M. d., G. A. Coetze, A. F. Olumi and P. A. Jones (1990) 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes, *Science*, **249**, 1288-1290.
- Walker, L. C., T. S. Ganesan, S. Dhut, B. Gibbons, T. A. Lister, J. Rothbard and B. D. Young (1987) Novel chimaeric protein expressed in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia, *Nature*, **329**, 851-853.
- Zhan, S., D. N. Shapiro and L. J. Helman (1995) Loss of imprinting of IGF2 in Ewing's sarcoma, *Oncogene*, **11**, 2503-2507.

Environ. Mutagen Res., **19**: 111-115 (1997)

シンポジウム

シンポジウム「21世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」
「レギュラトリサイエンスにおける変異原性試験」(S4)

レギュラトリサイエンスにおける変異原性試験

Regulatory science and genotoxicology

林 真¹, 渡部 烈², 島田 弘康³

Makoto Hayashi¹, Tadashi Watabe², and Hiroyasu Shimada³

¹ 国立衛生試験所 変異遺伝部 158 東京都世田谷区1-18-1

² 東京薬科大学 192-03 東京都八王子市堀之内1432-1

³ 第一製薬安全性研究所 134 東京都江戸川区北葛西1-16-13

¹ Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences

1-18-1 Kamiyoga Setagaya-ku Tokyo 158, Japan

² School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science
(Formerly Tokyo College of Pharmacy),

1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

³ Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 16-13, Kitakasai 1-Chome, Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan

(受理: 1997年3月3日)

Summary

This is a report of the Symposium entitled "Regulatory Science and Genotoxicology" which was held at the 25th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan on November 22, 1996 in Tokyo. The idea of "Regulatory Science" was introduced by Dr. M. Uchiyama. Three speakers from the regulatory (Dr. Tsuda), academic (Professor Hayatsu), and industrial (Dr. Shimada) field presented their opinions, and discussed, on regulatory science from their particular viewpoint. Finally, Dr. Sofuni summarized and indicated problems facing regulatory science and genotoxicology as we approach the 21st Century.

Keywords: regulation, regulatory science, basic science, applied science, administration

緒 言

日本環境変異原学会第25回大会において、「レギュラトリサイエンスにおける変異原性試験」と題したシンポジウムを開催した。演題と演者は以下の通りである。

1. 「レギュラトリサイエンスとは何か」
前国立衛生試験所長 内山 充
2. 「行政が学会に求めるもの」
厚生省 津田重城
3. 「基礎科学と行政」
岡山大学 早津彦哉
4. 「企業における変異原性試験の現状」
第一製薬 島田弘康
5. 「21世紀の行政における変異原性試験」
国立衛生試験所 祖父尼俊雄

ここに、本シンポジウムの目的と各演者の講演要旨に著者のコメントをまとめて記録とする。

本学会ではこれまでにも、1992年の札幌大会、1993年の大阪大会においても「なぜ変異原性試験を行うのか」、「変異原性試験の役割とその評価」と題するシンポジウムが開催されており、熱い議論が交わされてきた。日本環境変異原学会は、academic people, industrial people, regulatory people が寄り集まり一堂に会する組織である。本学会の名誉会員である近藤宗平先生は札幌大会で、変異原研究の分野は、基礎と応用の両面での調和が必要であることを指摘された。Academic の場で培われた知識、情報をいかにかしこく応用面で生かせるかを考えるのがレギュラトリサイエンスではないかと考える。基礎研究が内的知的要請を満たすための行為であるのに対し、レギュラトリサイエンスは外的知的要請を満たすための行為である、との考え方もある。近藤宗平先生が寺田寅彦先生の言葉を引用されて、「恐がりすぎてもいけない、恐がらなきすぎてもいけない、正しく恐がるこ

とこそ大切である」と言った話をされたことがある。レギュラトリサイエンスは、この「正しく恐がる方法を極めるためのサイエンスである」と考えることができるのではないか。

本研究分野における基礎と応用の融合は本学会における大きなテーマである。本シンポジウムは、このテーマをレギュレーションを軸に考える場とし、化学物質の安全性評価等の行政における21世紀のあり方を模索するため、行政側が何を学会に期待しているのか？また、大学を中心とする基礎科学研究者がどのように行政に関与するのが理想的か？等の問題点を浮き彫りにすることを目的とする。

1. レギュラトリサイエンスとは

内山 充（日本薬剤師研修センター）

1) はじめに

厚生行政は、医療、医薬、化学物質、有害生物、食品等にかかるものと、人の生命と健康にどのような影響を与えるかを正しく判断し、処置・改善すべき所があればその対策を立てる等の評価を行い、国民の健康と生活を向上させるのが役目である。

このような「評価」には、予測・比較・調整のためのサイエンスを必要とする。これを「レギュラトリサイエンス」と呼ぶ。既存の実証的サイエンスとは異なる独自の目的と価値観を持つものであり、基礎研究の面は「評価科学」と表現され応用・実践の場は「行政科学」といえる。

レギュラトリサイエンスは今までのところ、行政に責任を持つ科学者たちが、自らの業務の目的と価値観を表現するための概念として認識されている。しかし本来は、保健・衛生にかかる全科学者が常時留意しておくべき概念でもあると考える。

2) レギュレーションを支えるもの

行政（レギュレーション）措置は、学問的あるいは技術的に得られた多くの基礎データに基づき立案される。そしてそれを支える試験研究の結論はすべて予測に基づいて導き出される。すなわち、「確認」や「立証」はすべて、少数のサンプルあるいは実験群で得られたデータから全母集団における現象や作用を予測し、動物や組織・細胞の反応から人への影響を予測し、増幅した条件や投与量の下で得られた結果を平常の条件や摂取量まで外挿して予測することなどにより行われる。

したがって、レギュラトリサイエンスの試験・研究では、適切な行政措置を生み出すことを目的とし、現実に立脚した予測・評価に役立つことに価値を認める。

このように、目的と価値観は独特ではあるが、新規性や創造性を追及し技術水準を向上させる努力は他のサイエンスに携わる場合と同様に、いささかも怠るべきではない。ハイテクノロジーは保健・衛生にも大いに利用す

べきであるが、それらを実際の場に利用するには評価が必要となり、そのような評価をするためにはそれより一步進んだ知識を必要とするからである。評価が無知で頑なであることが原因で、優れた技術や産物が国民に広く利用されないとすればその弊害は計り知れない。

3) 試験・研究におけるレギュラトリサイエンス

保健・衛生関連の研究者にとって、新しい現象の発見、機構の解明、あるいは各種新技術の開発は、それ自身立派な研究成果であろう。しかしそれだけでは直接国民の保健・衛生に役立つとは限らない。例えば、研究成果には positive の証明が多いが、行政は往々にして negative を保証する責任を負っており、この方がはるかに困難である。また、研究結果に例外は付き物だが、行政は例外のない結論を求められそれにより集団の生活を左右され集団の中の個人が拘束されることも忘れてはならない。ある物質に新しい作用が見いだされた場合、発現の機序だけでも学会報告にはなろうが、そのほかに、他の類似物質との作用強度の定量的比較、量-反応関係、無作用レベルの確認、体内動態などが付随していないと評価の役には立たず、どこかでそれらを再度繰り返さなければならない。

優れた分析法や試験法が開発された場合、検出限界や直線性のみならず、偽陽性・偽陰性の確率、各種共存物質あるいはマトリックスの影響、陽性結果の意義と数値化などに対する配慮も研究者の責任といえるのではなかろうか。

4) おわりに

保健・衛生の分野では行政、研究者、一般国民が互いに密着した関係にある。行政官は自らも科学者であると認識し、研究者は行政を通じて国民の健康を守る責任を自覚する必要がある。その意味でレギュラトリサイエンスの概念が生かされることを期待するものである。

2. 行政が学会に求めるもの

津田重城（厚生省 大臣官房国際課）

1) はじめに

毒性試験、その中でも変異原性試験は、今まで特に、発がん性のスクリーニング試験として行政に認識されてきた。日常、特に企業から申請されるデータなどを扱っていて具体的に感じるのは、以下の2点である。

2) 欧米諸国との試験法のハーモナイゼーションの重要性について

この問題は、OECD（経済協力開発機構）やICH（三極新医薬品承認審査国際会議）での議論を通じて、従来と比べると大幅な前進が見られているようであるが、今後もさらなる前進が望まれる。ただし、化学物質の場合には、医薬品と比べ、日・米・欧の法規制がかなり異なっているため、試験法及びデータの評価のハーモナイゼーションにやや困難な点が認められるかもしれない。

3) 遺伝毒性、遺伝子毒性 (Genetic Toxicity, Genotoxicity) などの用語について

これも専門家の間では、既に話題として取り上げられていることと思われるが、先般、ジャーナリストと話した際、遺伝毒性を、遺伝性の毒性、すなわち、子孫に伝達される毒性であるとの誤解を受けた。今後、ジャーナリストを通じた一般の人々へのリスクの伝達 (Risk Communication) が益々重要になる中で、このような誤解を与えない適切な表現の確立が望まれる。

われわれも、小さな一步かもしれないが、インターネットなどを用いた、ある物質の評価結果などの情報を、国民に提供することの重要性を認識しつつある。そして、評価結果は、定性的な情報のみでなく、定量的な情報が望まれていると思われる。

4) 全般的な点としては、環境化学物質の安全性評価など、非臨床分野における日本からの情報発信が、半導体・自動車製造などの他の分野に比べて、乏しいことを感じている人が多いと思われる。最近、EPA（米国環境保護庁）の出した発がん性リスク評価ガイドライン案に引用された200余りの論文中、日本人が第一執筆者と思われるものは5編しかなかった。このような状況を改善する方途を、専門家と共に模索することが重要であると思う。

そのためには、われわれは、もっと、本学会のような専門家集団を知る必要があると思う。われわれが、専門家に求めることといえば、当然、良質の研究と、それだけではなく、それらの持つ、社会における意味に関する情報を発信してもらいたいということであろうか。その専門家からの情報発信を助ける役割を、厚生省は、微力でも果たすべきであると考える。そのためにも、一般の人々への化学物質のリスクの適切な伝達（コミュニケーション）が大切であり、それを通じて、毒性学に関する健全な関心を呼び起こす一助になればと思う。

3. 基礎科学と行政

早津彦哉（岡山大学薬学部）

研究室にいて研究に考えを集中し、さらには毎週講義をするという生活をしている私のような人間にとって、行政への関与について考えよというのは、大変難しい問題を突きつけられたことになる。普通、科学者は目の前にある研究課題についてどのようにアタックし、結果を得、どのように発表していくかで頭の中は大体一杯になる。次に身近なフィールドだけでなくその周りの広い科学分野の知識を得ることに心がけるのだが、あふれかえっている巨大な情報量をいかに消化し利用するかで、もがいているわけである。行政について考えるのは、そのまた先のことであり、めったに考えをめぐらせるはない。

個人レベルのこうした気持ちとは別に、基礎科学が行政に反映されるべきかどうかということで言えば、それ

は当然そうあってしかるべきであろう。変異原性の持つ生物学的意義の解明が、変異原性試験の実用化とあいまって、現実に我が国において行政的な措置となってきた。科学という抽象的、概念的なものが、行政という対象に相互作用を持つか持たないかといえば、それは持つし、そうあるべきであろう。

しかし、そこに人間、すなわち科学者と行政者、を含めて考え出すと、これは各個人個人に行動を問うてくる生々しい問題となってくるのである。私は、この演題の中で、科学と行政、科学者と行政者、ということを分けて考えてみたいと思う。

4. 企業における変異原性試験に関する考察

島田弘康（第一製薬（株）安全性研究所）

現在わが国では、新規化学物質の変異原性試験について、薬事法、化審法、安衛法あるいは農薬、動物用医薬品とそれぞれの対象物質に応じたガイドラインが出されている。各ガイドラインは施行後十余年を経過して相応の実績を積んできているが、現行のガイドラインがレギュラトリーサイエンスとして、予測と評価のバランスのとれた理想的なものとなっているかどうかは議論の分かれるところである。ICHに連して医薬品の変異原性試験ガイドラインが見直されつつあるが、ICHガイドラインに特徴的なのは現行ガイドラインにはない評価に関する指針が盛り込まれている点である。企業にとっても変異原性は重大関心事でありながら、現行ガイドラインでは評価の点が曖昧にされているため、特に陽性反応が得られた場合には、その対応に苦慮しているのが実状である。

医薬品開発における変異原性と癌原性試験結果についてなされた調査では、変異原性が陽性でも発癌性に必ずしも結びつかないことも多く、これが変異原性試験の立場を微妙にしている一因である。レギュレーションとして偽陰性を少なくする立場は、必然的に偽陽性を増やす方向もある。現在の変異原性試験では *in vitro* での試験系が不可欠であるが、感受性の高すぎる *in vitro* での試験系は、ヒトに対するリスク評価の困難さを増幅させる一因ともなっている。企業内の研究者として一番苦しいのは、当該物質に変異原性が確認されたとき、確率論的に発癌リスクの予測はできたとしても、実際に臨床適用した場合の当該物質の生体内における変異原性/発癌性の評価が極めて困難な点である。変異原性試験がレギュラトリーサイエンスとして、予測と評価を十分に考慮したガイドラインとして成長するためにも、ガイドラインにヒトへの外挿が十分にできるような評価方法を導入すべきであると考えている。

ところで、産業界にあっては、対象とする物質あるいはその開発時期により、変異原性が少しでもあればダメとする立場から、変異原性はあってもそれは当該物質の特性の1つと考えて製品化していこうとする立場ま

で、その対応については多様性に富んでいる。本シンポジウムでは、企業にとって変異原性試験はどういう意味を持つのかを再考し、社会的責任を負う企業として変異原性試験の評価をどう考えていくのか、ガイドラインに必須の試験とそれが陽性になったときにどう対処していくのか等について、いくつかの事例を紹介しながら考察する。

5. 21世紀における安全性評価のための変異原性試験

祖父尼俊雄（国立衛試・変異遺伝）

化学物質の安全性の予測評価のための変異原性試験としてみると、1960年代の後半から1970年代にかけては、復帰突然変異試験の結果とヒトあるいは実験動物での発がん性との相関性を基にして、その予測性の高いとの判断から、過剰な期待感のもとに膨大なデータが蓄積された。多種多様な化合物に関するデータが蓄積されるに従ってその相関性も低下し、他の試験系による補足が必要となってきた。しかしながら、短期試験から長期試験結果の予測に明確な限界が存在することが知らされたことから、1980年代の半ばでは一部から変異原性試験の無用論までである程の過剰な反応もあった。そのため、その後今日まで予測性を高めるための努力がなされ、新技法の導入やメカニズムの研究などを基盤とした試験法の改良および新しい試験法の開発が行われてきている。これまでの努力の成果として、これから21世紀に向けての変異原性試験はまさに新たな展開を迎えることと言える。

変異原性試験における予測性の問題の1つとしては、*in vitro* 試験から *in vivo* 試験への外挿があげられる。Initial hazard identification としての *in vitro* 試験の有用性は明白であるが、ヒトへの安全性評価のためには、吸収、分布、代謝、排泄、さらにはDNA障害の修復機構やその他の生体の防御機構を反映する生体システムでの評価は欠かせない。そのため、同一の動物個体の複数臓器について、複数の遺伝的指標を用いて検索することが予測性を高める上で有効と考えられる。現在検討が行われているトランスジェニックマウスの妥当性が確立されれば、多臓器での遺伝子突然変異の検出に加えて、末梢血、再生肝、腸でのAO超生体染色法およびセントロメア染色法による小核試験、骨髄、末梢リンパ球あるいは生殖細胞での染色体ペインティング法による染色体異常の解析が可能となり、さらにはDNA修復（不定期DNA合成）、DNA鎖切断（コメットアッセイ）、DNA付加体（³²P-ポストラベリング）、細胞増殖亢進（定期DNA合成）などを利用することも可能である。

現在、多種多様なトランスジェニックマウスが作製されている。例えばp53ノックアウトマウスやDNA修復酵素（アルキル化、酸化的障害、ミスマッチなどに対する）ノックアウトマウスあるいはヒトP450遺伝子導入トランスジェニックマウスなどが作製されており、変異

原性の誘発機構に関する遺伝子を改変したマウスが今後多数作製されることが予想される。これらのトランスジェニックマウスの交配により、複合遺伝子改変マウスが作製されつつある。このようなマウスの利用が可能になれば、上述の *in vivo* マルチエンドポイントシステムの構築が可能となり、ヒトへの安全性評価の予測性がさらに高まることが期待される。

ま と め

内山先生は講演の中で、regulationは「規制」ではなく「調節」と呼ぶべきものであることを述べられた。また、行政の役割である評価は日本人の苦手な点であり、価値観の偏りを指摘された。評価は予測、比較、調整の科学を駆使し、実証できないことを言わなければならない。しかし、一方で「知らないままでは評価を担当する資格がない」と考えられ、常に一步進んだ知識が要求される。「評価が無知で頑なであることが原因で、優れた技術や産物が国民に広く利用されないとすればその弊害は計り知れない」とされ、レギュラトリサイエンスを無知であることの隠れ蓑に使ってはいけないことを述べられた。最後に、行政官はレギュラトリサイエンスに包含されるサイエンティストであるべきであり、研究者は行政を通じて国民の健康を守る責任を自覚する必要を強調された。

津田先生は、レギュラトリサイエンスにおける用語がほとんど外国語（例えば、GLP, Risk assessment, Hazard identification）であり、日本においてはこの分野が充分消化されていないのではないかとの見解が述べられ、適切な日本語の用語をもっと真剣に考えるべきとの考えを述べられた。マンパワーと予算が必要であるが、情報の公開の必要性、また、行政官、研究者、一般人、ジャーナリスト等が会合する場に基づくrisk communicationの確立が不可欠である。行政における科学的思考の重要性に関する認識をさらに深めることの必要性を強調された。ご意見、ご質問のある方は遠慮なく電子メールで連絡して欲しいとのことである（ST-RXY@mhw.go.jp）。

早津先生は、遺伝毒性の解釈に関して、全ての発がん物質は変異原であるが、その逆は真ならず、とされた後、AF2、間接喫煙、MX等の実例を挙げられた。また、瀬戸内海、日本海、太平洋沿岸の土壤中の変異原性の強さについて、また、シンガポールの山火事直後の雨水中に変異原性を有するヘテロサイクリックアミンが検出されたことを述べられた。本学会の目的は環境中の変異原を調べることにあり、基礎データの積み重ねが、自ずと評価の判断基準を変える、と結ばれた。

著者の一人である島田は日本製薬工業連絡協議会で行われたアンケート結果を中心に発がん性と各種の遺伝毒性試験結果の相関について紹介した。その後、構造活性相関のためのデータベースの構築は非常に重要であるにも関わらず、ほとんど国内ではなされていないのが現状

であり、行政の役割として整備すべきである点が強調した。また、労働衛生学的な見地も含めた環境問題としての、産業廃棄物のフローについても述べた。座長のコメントとして、化学物質の安全性データベースの構築計画が行政レベルで進行中であることが述べられた。

最後の演者である祖父尼先生は、化学物質の initial hazard identification を概説され、ヒトへの外挿をふまえた問題点をまとめられた。ヒトへの外挿の効率を高めるための手法に関して、multiple endpoint assay 等の紹介と、それらに基づく risk assessment の必要性を強調され

た。さらには、リスク評価のためのコストパフォマンスにも言及され、21世紀に向けての遺伝毒性に関する研究、評価の方向性についての考えを示された。

本シンポジウムでは総合討論は行われなかったが、いろいろな立場の演者より、いろいろな角度からの考えが紹介され、問題点が浮き彫りにされた。このような難しいテーマに対して、サイエンスを基にした議論ができたのは、日本環境変異原学会ならではないか、との発言が会場からあったことを記して、本文の終わりとする。

Poster Presentations in the 1996 Annual Meeting, the 25th Anniversary Meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan

- P-1: Positive selection for mutations in Big Blue transgenic rodents; Provost G. S., and D. L. Wyborski; Stratagene.
- P-2: Detection of chromosomal changes in transgenic mice using fluorescence *in situ* hybridization with lambda DNA and chromosome painting; Itoh T., T. Suzuki, M. Honma, A. Matsuoka, M. Hayashi*, T. Sofuni; Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences (*Fax: 03-3700-2348, e-mail: hayashi@nihs.go.jp); Key words: Big Blue, Muta Mouse, transgene, fluorescence *in situ* hybridization.
- P-3: The collaborative study on the transgenic mutation assay I. Overview of the collaboration and performance of MutaTMMouse positive selection assay; The collaborative study group for the transgenic mouse mutation assay, Mammalian Mutagenesis Study group of the Environmental Mutagen Society of Japan; Itoh S.*, T. Suzuki², N. Takemoto³, T. Itoh², N. Horiya⁴, N. Yajima³, T. Hara⁴; ¹Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., ²National Institute of Health Sciences, ³Snow Brand Milk Products CO., Ltd., ⁴Food and Drug Safety Center (*Fax: 03-5696-8335); Key words: transgenic mice, *lacZ*, ethylnitrosourea, MutaTMMouse, positive selection.
- P-4: The collaborative study on the transgenic mutation assay II. Organ variation in the mutagenicity of ethylnitrosourea in MutaTMMouse; The collaborative study group for the transgenic mouse mutation assay, Mammalian Mutagenesis Study group of the Environmental Mutagen Society of Japan; organizer; Suzuki T.*, S. Itoh², N. Takemoto³, T. Itoh¹, N. Horiya⁴, N. Yajima³, T. Hara⁴; ¹National Institute of Health Sciences, ²Daiichi Pharmaceutical CO., Ltd., ³Snow Brand Milk Products CO., Ltd., ⁴Food and Drug Safety Center (*Fax: 03-3700-2348, e-mail: suzuki@nihs.go.jp); Key words: transgenic mice, *lacZ*, ethylnitrosourea, organ specificity.
- P-5: *In vitro* mutation induced by oral administration of benzo[a]pyrene to the MutaTMMouse: analysis in eleven different kinds of the carcinogenic target and non-target organs; Hakura A.*, Y. Tsutsui, J. Sonoda, J. Kai, Y. Sugihara, T. Mikami; Department of Drug Safety Research, Eisai Co., Ltd. (*Fax: 0298-47-5956, e-mail: al-hakura@eisai.co.jp); Key words: *in vivo* mutation, benzo[a]pyrene, MutaTMMouse, oral administration, individual difference.
- P-6: Induction of mutagenicity by diethylnitrosamine in MutaTMMouse; Takemoto N., M. Kawabata, A. Honda, M. Wada, I. Masuko, N. Yajima*; Snow Brand Milk Products CO., Ltd., Research Institute of Life Science (*Fax: 0285-53-1314, e-mail: snows@tokyo.infoweb.or.jp); Key words: dimethylnitrosamine, MutaTMMouse.
- P-7: Induction of mutation in embryonic cells of Muta Mouse by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea; Shibuya T.*¹, T. Kashima², N. Horiya¹, T. Hara¹; ¹Food and Drug Safety

Center, ²Azabu University (*Fax: 0463-82-4751); Key words: *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, embryonic cells, Muta Mouse; *lacZ* mutation.

P-8: The feature of new transgenic mouse *gpt* delta for the detection of gene mutation *in vivo*; Nohmi T.*¹, M. Katoh², H. Suzuki³, M. Matsui¹, M. Yamada¹, K. Masumura¹, M. Watanabe⁴, M. Suzuki¹, N. Horiya⁵, O. Ueda³, T. Shibuya⁵, H. Ikeda⁶, T. Sofuni¹; ¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, ²Division of Molecular Biology, University of Chile, ³Fujigotoba Research Labs., Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., ⁴Biochem. Div., National Cancer Center Research Institute, ⁵Laboratory of Genetics, Food and Drug Safety Center, ⁶Inst. Med. Sci., Tokyo Univ. (*Fax: 03-3707-6950, e-mail: nohmi@nihs.go.jp); Key words: transgenic mouse, *gpt*, *Spi*, point mutations, deletion mutations.

P-9: A new transgenic mouse *gpt* for mutagenesis test system: Spectrum of ethylnitrosourea (ENU)-induced mutations in the *gpt* gene; Masumura K.¹, M. Matsui¹, M. Katoh², N. Horiya³, M. Yamada¹, T. Shibuya³, T. Nohmi^{1*}, T. Sofuni¹; ¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, ²Division of Molecular Biology, University of Chile, ³Laboratory of Genetics, Food and Drug Safety Center (*Fax: 03-3707-6950, e-mail: nohmi@nihs.go.jp); Key words: transgenic mouse, *gpt*, 6-thioguanine, ethylnitrosourea.

P-10: Detection of somatic mutations using HITEC mice; Ishidate K.¹, M. Watanabe¹, Y. Shioyama², M. Katsuki³, T. Sugimura¹, K. Wakabayashi^{1*}; ¹Biochem. Div. Natl. Can. Center Res. Inst., ²Dept. Radiol. Med., Kyushu-Univers., ³Inst. Med. Sci., Tokyo-Univers. (*Fax: 03-3543-9305, e-mail: kwakabay@gan2.ncc.go.jp); Key words: HITEC mouse, *in vivo* mutation assay, *rpsL* gene, pSSW shuttle vector plasmid, *E. coli* DH10B.

P-11: Simple method of *in vivo* single cell gel electrophoresis (Comet) assay with mouse to detect DNA lesions in liver, kidney, spleen, lung and bone marrow; Miyamae Y.¹, Y. F. Sasaki², H. Kobayashi³, M. Igarashi⁴, K. Shimori⁵, M. Hayashi⁶; ¹Fujisawa Pharmaceutical CO., Ltd., ²Hachinohe National College of Technology, ³Shiseido Co., Ltd., ⁴Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., ⁵University of Sizuoka, ⁶National Institute of Health Sciences (*Fax: 06-304-5716); Key words: single cell gel electrophoresis assay, Comet assay, DNA damage, homogenization, methylmethanesulfonate, diethylnitrosamine.

P-12: Gene expression alterations determined by fluorescent differential display: Gene expressions in rat stomach pyloric mucosa induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine; Furihata C.*¹, M. Oka², M. Ichinoe², K. Miki², T. Ito³, Y. Sakaki³; ¹Department of Molecular

- Oncology, ²First Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, ³Human Genome Center, Institute of Medical Sciences (*Fax: 03-5449-5423, e-mail: furi@ims.u-tokyo.ac.jp); Key words: fluorescent differential display, gene expression, *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitroso-guanidine, rat stomach pyloric mucosa, li.
- P-13: The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): Detection of DNA damage in TK6 human lymphoblastoid cells treated with various mutagens; Kobayashi H.^{1*}, M. Mori¹, Y. Katsumura¹, Y. Morikawa¹, M. Hayashi², T. Sofuni²; ¹Shiseido Safety & Analytical Research Center, ²Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences (*Fax: 045-545-3340, e-mail: kobayashi_hiroshi@po.shiseido.co.jp); Key words: Comet assay, single cell gel electrophoresis, TK6, lymphoblastoid, DNA damage.
- P-14: A novel *supF* mutation detection system; Obata F., T. Nunoshiba, K. Yamamoto*; Dept. of Molecular & Cellular Biology, Biological Institute, Graduate School of Science Tohoku University (*Fax: 022-263-9206, e-mail: yamamot@mail.cc.tohoku.ac.jp); Key words: mutation spectrum, *gyrAam*, *strAam*, positive double selection, suppressor.
- P-15: Induction of micronuclei by mutagens in human astrocytes in culture; Suzuki Y.^{1,2*}, H. Shimizu², S. U. Kim¹; ¹Division of Neurology, Department of Medicine, The University of British Columbia, ²Department of Public Health and Environmental Medicine, The Jikei University School of Medicine (*Fax: 03-5472-7526); Key words: astrocyte, Micronuclei, 1-nitroquinoline-*N*-oxide.
- P-16: Induction of micronuclei in NSC19 motoneuron cell line by mutagenic agents; Suzuki Y.^{1,2*}, H. Shimizu², S. U. Kim¹; ¹Division of Neurology, Department of Medicine, The University of British Columbia, ²Department of Public Health and Environmental Medicine, The Jikei University School of Medicine (*Fax: 03-5472-7526); Key words: NSC19, motoneuron, micronuclei, 1-Nitroquinoline-*N*-oxide.
- P-17: Improvement on early spermatids micronucleus test of rats: Induction of micronuclei by mitomycin C, methyl methanesulfonate and ethylnitrosourea; Noguchi T.*; M. Suzuki, K. Noda, T. Matsushima; Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety and Health Association (*Fax: 0463-82-3860); Key words: micronucleus test, spermatids, mitomycin C, methyl methanesulfonate, ethylnitrosourea.
- P-18: Studies of the *in vivo* micronucleus test using colonic epithelial cells of mice; The collaborative study group of JEMS, MMS for the *in vivo* micronucleus test with mice, colon sub-group (organizer chief: Tokumitsu T.; Yakult Central Institute for Microbiological Research (*Fax: 0425-77-3020); Key words: micronucleous, colon, epithelial cells, 1,2-dimethylhydrazine, *N*-methyl-*N*-nitroso-urea.
- P-19: Evaluation of genotoxic effect in water pollution by the micronucleus test with the gill cell of fish; Takai A.^{1*}, K. Ueno², M. Hayashi³, T. Sofuni³; ¹Osaka Shin-Ai College, ²Faculty of Agriculture, Kinki University, ³Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences (*Fax: 06-931-0373, e-mail: akinori_takai@msn.com); Key words: micronucleus test, water pollution, fish, gill cells.
- P-20: International collaborative study of mouse lymphoma assay (MLA)(2nd report); The study group for the international collaborative study of mouse lymphoma assay; organizer; Sofuni T.^{1*}, M. Honma¹, M. Hayashi¹, H. Shimada², N. Tanaka³, S. Wakuri³, T. Awogi⁴, K. Yamamoto⁵, N. Ushio⁵, Y. Nishi⁶, M. Nakadate⁷; ¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, ²Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., ³Food and Drug Safety Center, ⁴Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., ⁵Takeda Chemical Ind., Ltd., ⁶Japan Tabaco Inc., ⁷Division of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences (*Fax: 045-545-3340, e-mail: sofuni@nihs.go.jp); Key words: Mouse lymphoma assay, ICH, genotoxicity test, chromosome aberration.
- P-21: The usefulness of continuous treatment (24 h) in mouse lymphoma assay; Honma M.*; L. Zang, H. Sakamoto, M. Ozaki, K. Takeshita, M. Hayashi, T. Sofuni; Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences (*Fax: 03-3700-2348, e-mail: honma@nihs.go.jp); Key words: mouse lymphoma assay, chromosome aberration, ICH, treatment time.
- P-22: Improvement of sensitivity in a micronucleus test by means of an intentionally induced erythropoiesis; Hagiwara T., A. Kawaguchi, K. Hirano*; Sankyo Co., Ltd., Laboratory of Animal Science & Toxicology Laboratories (*Fax: 0538-42-4350, e-mail: hira@fuku.sankyo.co.jp); Key words: acetylphenylhydrazine, erythropoietin, erythropoiesis, micronucleus test, blood erythrocytes.
- P-23: An attempt to analyze chemically-induced micronucleus in cultured cells using laser scanning cytometer (LSC); Miura, K. F.*; T. Satoh, C. Otsuka, M. Ishidate Jr.; Chromosome Research Center, Olympus Optical Co., Ltd. (*Fax: 0426-91-7209, e-mail: kn_miura@ot.olympus.co.jp); Key words: *in vitro* micronucleus, human diploid fibroblasts; laser scanning cytometer (LSC), mitomycin C, diethylstibestrol.
- P-24: Detection of aneuploidy in the *in vitro* cell culture system; Matsuoka A., M. Ozaki, K. Takeshita, H. Sakamoto, M. Honma, H.-R. Glatt¹, M. Hayashi, T. Sofuni*; Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, ¹German Institute of Human Nutrition, Germany (*Fax: 03-3700-2348, e-mail: matsuoka@nihs.go.jp); Key words: aneuploidy, polyploidy, V79-MZ, benzo[a]pyrene, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene.
- P-25: Production of catalase and SOD overproducing mutants of *Escherichia coli* and their characteristics; Yamaguchi T., Y. Yonezawa, N. Matsui, M. Kawakami, H. Nishioka*; Department of Chemical Engineering and Materials Sciences, Doshisha University (*Fax: 0774-65-6686, e-mail: hnishiok@doshisha.ac.jp); Key words: catalase hydroperoxidase I, Mn-superoxide dismutase, *katG*, *sodA*.
- P-26: Mutagenicity of *p*-aminophenol in *E. coli* wp2uvrA/pKM101; Yoshida R., S. Oikawa, Y. Seki, H. Shimizu*; Department of Public Health and Environmental Medicine, The Jikei University of Medicine (*Fax: 03-5472-7526); Key words: hydroxy radical, hydrogen peroxide, mutagenicity, *p*-aminophenol, *E. coli*.
- P-27: Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy; Marshall R. R.¹, M. Murphy¹, D. J. Kirkland¹, K. S. Bentley²; ¹Corning Hazleton, ²E I Dupont de Nemours & Co.
- P-28: Comparisons on chemically-induced mutagenesis among four strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 uvrA/pKM101: Collaborative study II; Sakamoto K.¹, K. Watanabe^{2*}, T. Sasaki³, K. Kawakami¹ and 34 investigators of 19 laboratories, JEMS-BMS; ¹Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, ²The Institute of Environmental Toxicology, ³Japan Bioassay Laboratory (*Fax: 0423-83-7640, e-mail: iet@mxh.meshnet.or.jp); Key words: oxidative agents, crosslinking agents, collaborative study, comparisons on mutagenicity, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*.
- P-29: Mutagenic Activities of the repeatedly heated frying oils and the brown reaction products on fried preparations among some folk foods in Taiwan; Hong C.-L.^{1*}, H. Shimizu²; ¹Department of Public Health, School of Medicine, Taipei Medical College, ²Department of Public Health and Environmental Medicine, School of Medicine, The Jikei University (*Fax: +886-2-7384831, e-mail: hongcl@mail.tmc.edu.tw); Key words: mutagenic responses, *Salmonella*, brown reaction, frying oils, scorched foods.
- P-30: Formation of heterocyclic amine-like mutagens by heating a mixture of L-arginine, glycine and glucose; Nakazawa M.*; A. Oguri¹, N. Arakawa², T. Sugimura¹, K. Wakabayashi¹; ¹National Cancer Center Research Institute, Biochemistry Division, ²Food Science Faculty, Ochanomizu University (*Fax: 03-3543-9305, e-mail: mrnakaza@gan2.ncc.go.jp); Key words: heterocyclic amine, L-arginine, Blue rayon, MeIQx.
- P-31: Comparison of adsorbent resins of mutagens in beef hydrolysates; Ohkubo T.¹, W. Shimizu¹, S. Goto^{2*}, O. Endo², T. Hayashi¹, E. Watanabe¹; ¹Tokyo University of Fisheries, ²National Institute of Public Health (*Fax: 03-3446-7165); Key words: sep-pak cartridge, Blue rayon, beef hydrolysates, mutagenicity.
- P-32: Genotoxicity and safety of organic compounds in drinking water; Nozaka T.*; S. Tadaki, H. Morita, A. Tanaka, T. Omura, M. Haga, K. Shibuya; Public Health Dept. Pharmaceutical Affairs Division, Saitama Prefectural Government (*Fax: 048-840-1041); Key words: genotoxicity, organic compounds, drinking water, halo acetonitrile, halo acetic acid.
- P-33: Determination of Trp-P-2 in the Yodo river; Ohe T.*; Department of Food and Nutrition Science, Kyoto Women's University (*Fax: 075-531-7155); Key words: Trp-P-2; Trp-P-1; river water, Blue rayon, HPLC.
- P-34: Relationship between mutagenicity of river water and heterocyclic amines; Sasaki Y.*; H. Kise, M. Kikuchi; Basic Research Division, The Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection (*Fax: 03-3699-1345, e-mail: Sasaki.Yuko@tokyo-itc.metro.tokyo.jp); Key words: river water, Ames assay, Trp-P-1, Trp-P-2, blue chitin.
- P-35: Risk assessment of Trp-P-2 in the waste water and the environmental water; Mohri S.^{1*}, Y. Ono², I. Somiya¹; ¹Dept. of Environmental Engg., Graduate School of Engineering Kyoto University, ²Dept. of Environmental & Civil Engg. Inst. Environ. Sci & Tech., The University of Okayama (*Fax: 075-753-5784, e-mail: mohri@water.env.kyoto-u.ac.jp); Key words: genotoxicity, risk assessment, Trp-P-2, *umu* test, waste water.
- P-36: Mutagenic Activities of exhaust gas and ash from sludge incineration after treatment night soil or sewage; Yoshino H.*; K. Urano; Kanagawa Environmental Research Center (*Fax: 0463-24-3300); Key words: Sludge, Ames test, incineration, exhaust gas.
- P-37: Can the micronucleus test using fish monitor mutagens and/or carcinogens in coastal water?; Tanisho T.¹, M. Furugori¹, K. Shimo¹, N. Imamura¹, N. Kinae^{1*}, M. Hayashi², T. Sofuni²; ¹School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, ²Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences (*Fax: 254-264-5528, e-mail: kinae@fns1.u-shizuoka.ac.jp); Key words: Ames test, micronucleus test, COD, coastal fish, mutagens.
- P-38: Detection of genotoxicity of polluted sea water using shelfish and the alkaline single cell gel electrophoresis (SCG) assay; Nishidate E., F. Izumiya, Y. F. Sasaki*, T. Sofuni¹, H. Hayashi¹; Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology, ¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences (*Fax: 0178-27-7296, e-mail: yfsasaki-c@hachinohe-ct.ac.jp); Key words: genotoxic monitoring, sea water, alkaline single cell gel electrophoresis (SCG), shelfish.
- P-39: Evaluation by various different preconcentration method of mutagens in water environment; Nakamuro K.*; T. Okuno, T. Hasegawa, H. Ueno, Y. Sayato; Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University (*Fax: 0720-66-3122); Key words: Ames assay, environmental water, frameshift type mutagenicity, preconcentration method.
- P-40: Blue-chitin column concentration of mutagens from river waters; Sakamoto H.¹, T. Ohe², T. Hayatsu³, H. Hayatsu^{3*}; ¹Water Examination Laboratory, Okayama Municipal Water Bureau, ²Dept. of Hygiene, Kyoto Women's University, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ews1.okayama-u.ac.jp); Key words: blue chitin, river water mutagens, XAD-2.
- P-41: Comparison of mutagenicity of airborne particulate in Sapporo, Tokyo, Kanagawa; Matsumoto Y.^{1*}, S. Sakai¹, F. Kano², H. Matsuda³, K. Hayakawa⁴; ¹Hokkaido Res. Inst. For Environ. Sci., ²Tokyo Metropol. Res. Lab. Of Public Health, ³Ishikawa Pref. Inst. Of Public Health, ⁴Kanazawa Univ. (*Fax: 011-747-3254); Key words: mutagenicity, Ames test, airborne particulate, YG strain, nitroarene.
- P-42: Distributions of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in diesel engine particulate extracts; Nakamura A., K. Hayakawa*; Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanagawa University (*Fax: 0762-34-4456, e-mail: haya-kawa@dbs.p.kanazawa-u.ac.jp); Key words: nitroarene, diesel engine exhaust particulate, mutagenicity, column chromatography.
- P-43: Mutagenicity of reaction products by the thermal

decomposition of poly (vinyl chloride) in N_2 or air and formation of polycyclic aromatic hydrocarbons; Hisamatsu Y.*¹, S. Takarada¹, N. Haga², H. Hidaka²; ¹National Institute of Public Health, ²Meisei University (*Fax: 03-3446-4314, e-mail: hisa@iph.go.jp); Key words: poly (vinyl chloride), thermal decomposition, mutagenicity, polycyclic aromatic hydrocarbon.

P-44: Relationship between p53 gene, genotypes of cytochrome p450 1A1 and concentration of mutagens accumulated in human lung samples; Sera N.*¹, H. Tokiwa², Y. Nakanishi³, N. Hara³, J. Lewtas⁴; ¹Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, ²Kyushu Women's University, ³Research Institute of Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University, ⁴US-EPA (*Fax: 092-928-1203); Key words: 1-nitropyrene, benzo[a]pyrene, lung cancer.

P-45: Genetic effects of lifestyle factors assessed by urinary mutagenicity and chromosome alterations XI; Mure K., H. Ogura, T. Takeuchi, T. Takeshita, K. Morimoto*; Dept. of Hygiene and preventive Medicine, Faculty of Medicine, Osaka University (*Fax: 06-879-3929, e-mail: morimoto@envi.med.osaka-u.ac.jp); Key words: lifestyle, smoking, green tea, urinary mutagenicity, chromosome alterations.

P-46: Effect of personal exposure air on the mutagenicity of human urine; Endo O.*¹, M. Koyano¹, Y. Sekiya², Y. Takagi³, Y. Seki², K. Kohzaki³, S. Goto¹; ¹National Institute of Public Health, ²Kitasato University, ³Azabu University (*Fax: 03-3446-7165); Key words: human urine, personal exposure air, *Salmonell* mutagenicity, Nicotine and cotinine; polycyclic aromatic hydrocarbons.

P-47: Induction of chromosome aberration and transformation by smoker's urine extract in cultured cells; Chiba A., A. Miura, Y. Hara, Y. F. Sasaki*; Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology (*Fax: 0178-27-7296, e-mail: yfsasaki-c@hachinohe-ct.ac.jp); Key words: urine, smoking, chromosome aberration, transformation.

P-48: Sister chromatid exchanges induced by electromagnetic fields. —comparative study between *in vitro* and *in vivo*—; Iijima S., A. Asaka*; Department of Health Sciences, Yamanashi Medical University (*Fax: 0552-73-7882, e-mail: sijima@res.yamanashi-med.ac.jp); Key words: electromagnetic fields, sister chromatid exchange (SCE), *in vitro*, *in vivo*.

P-49: Effect of 5T static magnetic field on mutagenicity of chemical mutagen; Ikehata M.*¹, T. Koana; Environmental Biotechnology Laboratory, Fundamental Research Division, Railway Technical Research Institute (*Fax: 0425-73-7349, e-mail: ikehata@rtri.or.jp); Key words: static magnetic field; Ames assay; ENNG.

P-50: Simple detection of *in vivo* genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay; Izumiyama F., E. Nishidate, Y. U. Sasaki*, T. Ohta¹, T. Ono²; Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology, ¹School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, ²National Veterinary Assay Laboratory (*Fax: 0178-27-7296, e-mail: yfsasaki-c@hachinohe-ct.ac.jp); Key

words: single cell gel electrophoresis (SCG) assay, genotoxicity, multiple organs of mouse, pyrimethamine.

P-51: Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow); Komaki Y., E. Nishidate, F. Izumiyama, Y. U. Sasaki*; Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology (*Fax: 0178-27-7296, e-mail: yfsasaki-c@hachinohe-ct.ac.jp); Key words: single cell gel electrophoresis (SCG) assay, genotoxicity, multiple organs of mouse, micronucleus-inducing mutagen.

P-52: Detection of rodent liver carcinogen genotoxicity by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow); Sasaki Y. U.*¹, E. Nishidate, F. Izumiyama; Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology (*Fax: 0178-27-7296, e-mail: yfsasaki-c@hachinohe-ct.ac.jp); Key words: single cell gel electrophoresis (SCG) assay, genotoxicity, multiple organs of mouse, rodent liver carcinogens.

P-53: Mutagenicity of activated oxygen species-generating systems towards *E. coli* WP2 derivatives; Mochida H., Y. Tsutsui, A. Hakura*, S. Sawada, Y. Sugihara, T. Mikami; Department of Drug Safety Research, Eisai Co., Ltd. (*Fax: 0298-47-5956, e-mail: al-hakura@eisai.co.jp); Key words: mutagenicity, activated oxygen species, WP-2uvrA/pKM101, WP2uvrA.

P-54: Evaluation of DNA damage by organochlorine compounds and nitroarenes related to active oxygen; Ono Y.¹, U. Kobayashi^{2*}, I. Somiya²; ¹Dept. Environmental and Civil Engg., University of Okayama, ²Graduate School of Environmental Engg., Kyoto University (*Fax: 075-753-5784, e-mail: urara@water.env.kyoto-u.ac.jp); Key words: non-mutagenic carcinogen, active oxygen, *Sox RS*, organochlorine compound, nitroarene.

P-55: Mutagen(s) formed from norharman with phenylhydroxyamine; Totsuka Y.*¹, N. Hada, M. Watanabe, T. Sugimura, K. Wakabayashi; Biochem. Div., National Cancer Center Research Institute (*Fax: 03-3543-9305, e-mail: ytotsuka@gan2.ncc.go.jp); Key words: Norharman, phenylhydroxylamine, aniline, comutagen.

P-56: Induction of micronuclei and of DNA damage in the liver of rats by calcium antagonists; Igarashi M., and H. Shimada*; Drug Safety Research Laboratory, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd. (*Fax: 03-5696-8335); Key words: calcium antagonists; liver micronucleus test, single cell gel assay, rats, hypothermia.

P-57: Validation study of mouse liver micronucleus test; Shimada H.*¹, JEMS·MMS collaborative study group (*Fax: 03-5696-8335); Key words: liver micronucleus test, mice, auramine O, acrylamide, styrene oxide.

P-58: Quinoline (Q) did not induce micronuclei in rat bone marrow, but induced chromosome aberration (CA), sister chromatid exchanges (SCE) and replicative DNA synthesis (RDS) in rat liver; Sugihara T.¹, H. Daimon², S. Asakura^{2*}, H. Mochida², S. Sawada^{2*}; ¹Kawashima Co., Ltd., Dept. of Drug Safety Research, ²Eisai Co., Ltd., Drug Safety Research Laboratories (*Fax: 0586-89-5292, e-mail: s1-asakura@eisai.co.jp); Key words:

quinoline, rat bone marrow/liver, chromosome aberration, micronucleus, sister chromatid exchange, replicative DNA synthesis.

P-59: Species-specificity of pyrimethamine in the rodent bone marrow micronucleus test; Ogata T.*¹, T. Sekiya¹, Y. Takahashi¹, T. Ohta²; ¹National Veterinary Assay Laboratory, ²School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and life Science (*Fax: 0423-21-1769); Key words: pyrimethamine, clastogen, micronucleus test; rat bone marrow.

P-60: Mutagenic activity and clastogenicity of nitrobenzanthrones; Enya T.¹, H. Suzuki*¹, Y. Hisamatsu², T. Watanabe³, T. Hirayama³; ¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, ²Department of Community Environmental Science, The Institute of Public Health, ³Department of Public Health, Kyoto Pharmaceutical University (*Fax: 075-753-4000, e-mail: suzuki@kuchem.kyoto-u.ac.jp); Key words: nitrobenzanthrone, mutagenicity, clastogenicity.

P-61: The effects of pH of S9 on a chromosomal aberration test; Asakura M.*¹, T. Sugiyama, H. Satake, M. Inoue, T. Matsushima; Japan Bioassay Research Center (*Fax: 0463-82-3860); Key words: S9, pH, chromosomal aberration, metabolic activation.

P-62: Lifetime micronucleus frequencies in MS/Ae mice treated with mitomycin C; Higashiyama N., S. Sutou*¹, Itoham Central Research Institute (*Fax: 0297-45-6353, e-mail: sutou@fureai.or.jp); Key words: aging, mitomycin C, MS/Ae mouse, life span, MNRET.

P-63: The effect of dimethylarsinic acid on mouse bone marrow cells(*in vivo*); Kawashima E., K. Kuroda, G. Endo*¹; Department of preventive medicine & environmental Health, Osaka City University Medical School (*Fax: 06-646-0722); Key words: dimethylarsinic acid, mitotic arrest, aneuploidy, mouse bone marrow cells.

P-64: Mutagenicity of chlorinated organic compounds for *Escherichia coli* WP2 *uvrA* and WP2 *uvrA/pKM101*; Ando F.¹, K. (miyo)Aramaki², T. Ohkubo³, Y. Kato¹, Y. Seki², O. Endo³, S. Goto^{3*}; ¹Canon Inc., ²Kitasato University, ³National Institute of Public Health (*Fax: 03-3446-7165); Key words: *Escherichia coli* WP-2 *uvrA*, *Escherichia coli* WP-2 *uvrA/pKM101*, Chlorinated organic compounds.

P-65: The mutagenicity of phenazopyridine hydrochloride (II); Ota E., M. Nakagawa, F. Mizuno, M. Miyagawa^{2*}, T. Shirotori, T. Nishitomi; Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd. (*Fax: 0479-46-287); Key words: hepatocyte micronucleus assay, Inhibition of metabolic cooperation (IMC) test, mouse lymphoma assay (MLA), phenazopyridine hydrochloride, replicative DNA synthesis (RDS) test.

P-66: Mutagenicity test of epoxi-colors, poster colors and oil-inks using *S. typhimurium* TA98 and TA100; Oda H., R. Ishida, A. Araki¹, T. Matsushima; Japan Bioassay Research Center (*Fax: 0463-82-3860, e-mail: bioassay@po.iijnet.or.jp); Key words: *Salmonella* mutagenicity, color, ink.

P-67: Expression of CYP1A2 responsible for the metabolic activation of heterocyclic amines in cynomolgus monkey; Sakuma T.¹, M. Hieda¹, T. Igarashi¹, S. Ogiya², M.

Isogai³, S. Ninomiya³, R. Nagata⁴, T. Kamataki^{1*}, ¹Div. Drug Metab. Fac. Pharm. Sci. Hokkaido Univ., ²Hokkaido National Industrial Research Institute, Agency of Industrial Science and Technol., ³Daiichi Pure Chemicals Co., ⁴Shinnippon Biochemical Lab., Ltd. (*Fax: 011-706-4978, e-mail: kamataki@pharm.hokudai.ac.jp); Key words: metabolic activation, cynomolgus monkey, cytochrome P450, CYP1A2, heterocyclic amine.

P-68: Expression of mammalian cytochrome P450 in the genetically engineered yeast and their use in mutagenic assay — Species difference on the metabolic activation catalyzed by CYP1A1 and CYP1A2 among the human, mouse, hamster and guinea pig; Ohgiya S.*¹, T. Goda¹, T. Hosino¹, T. Kamataki², K. Ishizaki¹; ¹Hokkaido National Industrial Research Institute, ²Faculty of Pharmaceutical Science, Hokkaido University (*Fax: 011-857-8992, e-mail: ohgiya@hniri.go.jp); Key words: cytochrome P450, aflatoxin B₁, metabolic activation, mutagenic assay, yeast.

P-69: Role of hydroxyl radical and metal ions in formation of direct acting mutagen from *N*-nitrosodialkylamines; Tsutsumi N., M. Mochizuki*¹, Kyoritsu College of Pharmacy (*Fax: 03-5400-2695, e-mail: mochizuki-mt@kyoritsu-ph.ac.jp); Key words: hydroxyl radical, *N*-nitrosodialkylamine, fenton reagent, nitric oxide.

P-70: Investigation of implication of reactive oxygen species and their generating stages in mutagenicities of aromatic amine and nitro allene in *Escherichia coli*; Matsui N., Y. Yonezawa, M. Kawakami, T. Yamaguchi, H. Nishioka¹; Department of Chemical engineering and Materials Science, Doshisha University (*Fax: 0774-65-6686, e-mail: hnishiok@doshisha.ac.jp); Key words: aromatic amin, nitro allene, NRase, OATase, NO₂ radical.

P-71: The determination about toxicity mechanism of genotoxic substances and those relationship with active oxygens using antioxidant enzyme transfected cells; Chung Y.¹, K. Ichikawa¹, Y. Seko², N. Imura², H. Utsumi^{1*}; ¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University (*Fax: 092-641-5281, e-mail: usami@pch.phar.kyushu-u.ac.jp); Key words: active oxygens, antioxidant enzyme transfected cells, 2,4,6-trichlorophenol, micronucleus test, genotoxicity.

P-72: Nitration of hydroxypyrene by activated macrophages; Yamaguchi T., J. Suzuki¹, K. Takeda; Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo (*Fax: 03-3268-3045, e-mail: suzuki@ps.kagu.sut.ac.jp); Key words: nitration; hydroxypyrene, hydroxynitropyrene, macrophages, diesel-exhaust particles.

P-73: Mutagenic activation of *N*-nitroso compounds by human pancreatic juice; Takahashi M.¹, Y. Mori^{1*}, T. Kamano², Y. Konishi³; ¹Laboratory of Radiochemistry, Gifu Pharmaceutical University, ²The 1st Department of Surgery, Juntendo University School of Medicine, ³Department of Oncological Pathology, Nara Medical University (*Fax: 058-237-5979, e-mail: ymori@gifu-pu.ac.jp); Key words: mutagenic activation, pancreatic juice, pancreatic carcinogen, environmental *N*-nitrosamine, heterocyclic amine.

P-74: Rat liver Theta-class glutathione *S*-transferases Yrs-Yrs and 5-5: Their functional and immuno-chemical

- properties; Hiratsuka A., T. Nishijima, H. Okada, T. Watabe*; Dept. of Hygienic Chemistry, Tokyo College of Pharmacy (*Fax: 0426-76-4517, e-mail: watabet@ps.toyaku.ac.jp); Key words: glutathione S-transferase, Theta-class, arylmethyl sulfate, dichloromethane, metabolism.
- P-75: Detection of CYP1A2 inhibitors from grapefruit juice; Inoue K., K. Fukuda, M. Degawa, Y. Yamazoe*; Dept. Drug Metabolism and Molecular Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University (*Fax: 022-217-6826, e-mail: j23344@ccu.cc.tohoku.ac.jp); Key words: grapefruit juice, CYP1A2 inhibitor, Glu-P-1, Ames test.
- P-76: Antimutagenic effect of beer and hop-extract; Takeuchi M., S. Kimura, N. Harada, H. Hayatsu*, S. Arimoto; Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ews1.okayama-u.ac.jp); Key words: beer, hop, Trp-P-2(NHOH), MNNG.
- P-77: Inhibitory substances against the mutagenicity of 2-chloro-4-methylthiobutanoic acid (CMBA); Kimura S., M. Takeuchi, N. Harada, H. Hayatsu*, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ews1.okayama-u.ac.jp); Key words: beer, 2-chloro-4-methylthiobutanoic acid, antimutagenesis.
- P-78: Antimutagenicity of Rhubarb extracts in *in vitro* and *in vivo*; Kishi M.*¹, K. Ohmori¹, T. Nakaoka¹, M. Harada², ¹Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories, ²Osaka Prefectural Institute of Public Health (*Fax: 045-363-1037); Key words: Rhubarb, emodin, physcion, antimutagen; anticlastogen.
- P-79: Suppression of methyl methanesulfonate-induced chromosome aberrations *in vivo* after treatment with S-methyl methane thiosulfonate; Ito Y.*¹, Y. Nakamura²; ¹Public Health Research Institute of Kobe City, ²School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka (*Fax: 078-302-0894); Key words: methyl methanesulfonate, methyl methane thiosulfonate, chromosome aberration; wister rat, vegetable.
- P-80: Mutagenicity in cooked foods: Modification effect of porphyrin compounds; Murata N.*¹, M. Katsui, E. Miyamoto; Department of Food Science and Nutrition, Sanyo Gakuen College (*Fax: 086-273-3226, e-mail: muraoka@sguc.ac.jp); Key words: mutagenicity, porphyrin compounds, green vegetable, Ames test, antimutagenicity.
- P-81: Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides*; leaves): 4. Suppressing effect of Tochu tea on the induction of transformation in Balb 3T3 cells; Nakamura T.¹, Y. Nakazawa¹, S. Onizuka¹, N. Yasugahira¹, M. Sasaki², Y. U. Sasaki^{2*}; ¹Biotechnology Engineering Division, Hitachi Zosen Cor., ²Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology (*Fax: 0178-27-7296, e-mail: yfsasaki-c@hachinohe.ct.ac.jp); Key words: Tochu tea, *Eucommia ulmoides*, antimutagenicity, transformation, geniposidic acid
- P-82: Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 3. Suppressing effect of Tochu tea on the mutagenicity of smoker's urine; Nakazawa Y.¹, T. Nakamura¹, S. Onizuka¹, Y. Hara², F. Izumiya², A. Miura², M. Sasaki², Y. U. Sasaki^{2*}; ¹Biotechnology Engineering Division, Hitachi Zosen Cor., ²Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology (*Fax: 0178-27-7296, e-mail: yfsasaki-c@hachinohe.ct.ac.jp); Key words: *Eucommia ulmoides*, urine, antimutagenicity, smoking.
- P-83: Inhibitory effects of lemon grass extract on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon; Kinouchi T.¹, R. Suayum^{1,2}, H. Arimoto¹, U. Vimikketkumnuen², Y. Ohnishi^{1*}; ¹Department of Bacteriology, School of Medicine, The University of Tokushima, ²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University (*Fax: 0886-33-0771, e-mail: ohnishi@basic.med.tokushima-u.ac.jp); Key words: lemon grass, azoxymethane, aberrant crypt foci, DNA adducts, β -glucuronidase.
- P-84: Suppression of SOS-inducing activity of furylfuramide by cinnamic acid derivatives from *Scrophularia ningpoensis*; Miyazawa M.*¹, Y. Okuno¹, S. Nakamura², H. Kameoka¹; ¹Faculty of Science and Engineering, Kinki University, ²Osaka Prefectural Institute of Public Health (*Fax: 06-727-4301, e-mail: miyazawa@cc.kindai.ac.jp); Key words: *Scrophulariaceae*, *Scrophularia ningpoensis*, cinnamic acid derivatives, SOS response, *umu*-test.
- P-85: Antimutagenic component from *Dendrobium nobile*; Miyazawa M.*¹, H. Shimamura¹, S. Nakamura², H. Kameoka¹; ¹Faculty of Science and Engineering, Kinki University, ²Osaka Prefectural Institute of Public Health (*Fax: 06-727-4301, e-mail: miyazawa@cc.kindai.ac.jp); Key words: *Orchidaceae*, *Dendrobium nobile*, gigantol, antimutagenic activity, *umu* test.
- P-86: Antimutagenicity and redox potential of catechins; Ebata J.¹, N. Fukagai², H. Furukawa^{2,3*}; ¹JEF Vegetable Research Institute, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University, ³Research Institute of Meijo University (*Fax: 052-834-8780, e-mail: furukuki@meijo-u.ac.jp); Key words: antimutagenicity, epigallocatechin gallate, redox potential, cyclic voltmetry, oxygen radicals.
- P-87: The effect of chlorophyllin and chlorophyllin-chitosan on heterocyclic amine-DNA adduct formation; Chitose S.¹, T. Negishi², K. Negishi³, K. Wakabayashi⁴, H. Hayatsu^{2*}; ¹Graduate School of Natural Science and Technology, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, ³Gene Research Center, Okayama University, ⁴Biochemistry Division, National Cancer Research Institute (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ews1.okayama-u.ac.jp); Key words: chlorophyllin, chlorophyllin-chitosan, heterocyclic amine, DNA adduct.
- P-88: Antimutagenic effects of benzalacetone and 2-hydroxybenzalacetone on UV-induced mutation in *Escherichia coli*; Ashihara Y.¹, N. Motohashi^{1*}, C. Yamagami¹, Y. Saito²; ¹Kobe Pharmaceutical University, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 078-441-7580, e-mail: motohashi@kobepharma-u.ac.jp); Key words: benzalacetone, 2-hydroxybenzalacetone, antimutagenic effect, UV-induced mutation, *Escherichia coli*.
- P-89: Inhibitory effects of intestinal bacterial cultures on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon; Arimori H., T. Kinouchi, K. Kataoka, Y. Ohnishi^{1*}; Department of Bacteriology, School of Medicine, The University of Tokushima (*Fax: 0886-33-7069, e-mail: ohnishi@basic.mes.tokushima-u.ac.jp); Key words: *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium perfringens*, culture supernatants, aberrant crypt foci, azoxymethane.
- P-90: Genetic and environmental factors determining levels of hemoglobin-associated acetaldehyde; Takeshita T., K. Morimoto*; Dept. of Hygienic and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Osaka University (*Fax: 06-879-3929, e-mail: morimoto@envi.med.osaka-u.ac.jp); Key words: alcohol, acetaldehyde, aldehyde dehydrogenase, lifestyle, biomonitoring.
- P-91: Oxidative DNA damage in CHL cells with crocidolite fibers; Nakajima M., T. Takeuchi, K. Morimoto*; Dept. of Hygiene and Preventive Medicine, Osaka University, School of Medicine (*Fax: 06-879-3923); Key words: 8-hydroxydeoxyguanosine, crocidolite.
- P-92: Aromatic DNA adducts in white blood cells from coke oven workers; Ichiba M.*¹, T. Hanaoka², G. Pan³, K. Hara², Y. Yamano⁴, Y. Wang¹; ¹Department of Community Health Science, Saga Medical School, ²Institute of Industrial Science of Labor, ³Liaoning Public Health and Anti-epidemic Station, ⁴Department of Hygiene and Public Health, Tokyo Women's Medical School (*Fax: 0952-33-2518, e-mail: ichiba@smsnet.saga-med.ac.jp); Key words: coke, DNA adduct.
- P-93: Inhibition of 8-hydroxydeoxyguanosine formation by chlorogenic acid; Kasai H.*¹, S. Fukada¹, Z. Yamazumi², S. Sugie³, H. Mori³; ¹University of Occupational and Environmental Health, ²National Cancer Center Research Institute, ³Gifu University School of Medicine (*Fax: 093-601-2199, e-mail: h-kasai@med.uoe-u.ac.jp); Key words: chlorogenic acid, 8-hydroxydeoxyguanosine, 4NQO.
- P-94: DNA modification by glyoxal and mutagenesis; Iwamoto N.¹, S. Fukada¹, N. Murata-Kamiya², H. Kaji², H. Kasai^{1*}; ¹Dept. of Environmental Oncology, ²Dept. of Health Policy and Management, University of Occupational and Environmental Health (*Fax: 093-601-2199, e-mail: h-kasai@med.uoe-u.ac.jp); Key words: glyoxal, active oxygen, crosslink.
- P-95: Mechanism of DNA damage induced by isothiocyanates; Murata M.¹, N. Yamashita¹, S. Kawanishi^{1*}, S. Inoue²; ¹Department of Hygiene, Mie University School of Medicine, ²Department of Public Health, Graduate School of Medicine, Kyoto University (*Fax: 059-231-5011, e-mail: eisei@doc.medic.mie-u.ac.jp); Key words: isothiocyanates, oxidative DNA damage, SH group, copper.
- P-96: Oxidative DNA damage induced by vitamin E model compound trolox; Yamashita N.¹, M. Murata¹, S. Kawanishi^{1*}, S. Inoue²; ¹Department of Hygiene, Mie University School of Medicine, ²Department of Public Health, Graduate School of Medicine, Kyoto University (*Fax: 059-231-5011, e-mail: eisei@doc.medic.mie-u.ac.jp); Key words: nitrosation, green tea catechins, *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosomorpholine.
- P-97: Cytotoxicity of heterocyclic amines in rat hepatocytes; Ueno H., A. Sunagawa, Y. Sayato, K. Nakamura*; Faculty of Pharmaceutical Science, Setsunan University (*Fax: 0720-66-3123); Key words: heterocyclic amine, Trp-P-2, cytotoxicity, hepatocyte, rat.
- P-98: Affinity of heterocyclic amines to nucleic acids; Tanaka Y., T. Hayatsu, H. Hayatsu*; Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ews1.okayama-u.ac.jp); Key words: heterocyclic amines, DNA-chitosan, affinity to polynucleotides.
- P-99: Relationship between mutation and DNA-adducts induced by *N*-nitrosodialkylamines in *Drosophila melanogaster*; Goto Y., N. Huh, J. Thomale, M. F. Rajewsky, H. Hayatsu*, T. Negishi (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ews1.okayama-u.ac.jp); key words: *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosodiethylamine.
- P-100: Mutagenesis induced at natural abasic sites in Yeast deficient in AP-endonuclease; Hata Y.^{1,2}, Okuto H^{1,2}, H. Ide³, H. Hayatsu^{2*}, K. Negishi; ¹Gene Research Center, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, ³Graduate Department of Gene Science, Faculty of Science, Hiroshima University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ews1.okayama-u.ac.jp); Key words: abasic sites, AP-endonuclease, yeast.
- P-101: Photo-genotoxicity of Titonium dioxide particle; Nakagawa Y., S. Wakuri, K. Sakamoto, N. Tanaka*; Dep. Of Cellular and Genetic Toxicology, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center (*Fax: 0463-82-9627, e-mail: QZD02746@niftyserve.or.jp); Key words: Titanium dioxide, photo-genotoxicity, Comet assay, chromosome aberration, gene mutation.
- P-102: Base selectivity in covalent binding of the intrinsic mutagen, 5-chloromethylchrysene, to calf thymus DNA; Okuda H.*¹, T. Watabe; Department of Drug Metabolism and Molecular Toxicology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science (*Fax: 0426-76-4517, e-mail: okudah@ps.toyaku.ac.jp); Key words: modification, mutagenicity, 5-chloromethylchrysene, DNA, selectivity.
- P-103: Suppression on expression of aberrant crypt foci by spinach extract; Ebata J.¹, T. Eziri², H. Furukawa^{2,3*}, ¹JEF Vegetable Research Institute, ²Laboratory of Biological Science, Faculty of Pharmaceutical Science, Meijo University, ³Research Institute of Meijo University (*Fax: 052-834-8780, e-mail: furukuki@meijo-u.ac.jp); Key words: spinach, aberrant crypt foci (ACF), azoxymethane (AOM), *K-ras*; nitrobluetetrazolium (NBT).
- P-104: Tea catechins towards inhibition and enhancement of nitrosamine formation from secondary amines and nitrite; Tanaka K.¹, T. Hayatsu², T. Negishi², H. Hayatsu^{2*}; ¹Meiji College of Pharmacy, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ews1.okayama-u.ac.jp); Key words: nitrosation, green tea catechins, *N*-nitrosodimethylamine.
- P-105: Inhibitory effect of green tea on the mutagenicity of MeIQx in mice; Takemura H.¹, M. Furugori¹, K. Shimo¹, K. Wakabayashi², N. Kinae^{1*}; ¹School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, ²Biochemical Division, National Cancer Research Institute (*Fax: 054-264-5528, e-mail: p5106@fns.1.u-shizuoka-ken.ac.jp); Key words: antimutagenicity, MeIQx, 8-hydroxy-

- 2'-deoxyguanosine, green tea extract, Ames test.
- P-106: Food-derived heterocyclic amines potentiate the mutagenicity of a drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX); Watanabe-Akanuma M.^{1*}, K. Shimoi², N. Kinae², T. Ohta³; ¹Institute of Environmental Toxicology, ²School of Food and Nutritional Science, University of Shizuoka, ³School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science (*Fax: 0423-83-7640); Key words: heterocyclic amine, Trp-P-1, MX, mutation potentiation, *E. coli*.
- P-107: Mechanism for the formation of the mutagenic heterocyclic amines through the unstable free radicals; Hiramoto K., T. Kato, K. Kikugawa*; School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science (*Fax: 0426-76-4508, e-mail: kikugawa@ps.toyaku.ac.jp); Key words: heterocyclic amine, phenolic antioxidant, pyrazine cation radical, carbon-centered radical, bonito.
- P-108: DNA strand breaking activity of nitrosobenzene derivatives in the presence of thiols; Ojima N., K. Hiramoto, K. Kikugawa*; School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science (*Fax: 0426-76-4508, e-mail: kikugawa@ps.toyaku.ac.jp); Key words: nitrosobenzene, thiol compound, nitroxide radical, DNA, active oxygen species.
- P-109: DNA strand breaking by 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, a Maillard reaction product; Hiramoto K., A. Nasuhara, K. Kikugawa*; School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science (*Fax: 0426-76-4508, e-mail: kikugawa@ps.toyaku.ac.jp); Key words: glucose, glycine, DNA, active oxygen species, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one.
- P-110: Stimulation of homologous recombination in *E. coli* constitutive mutants of superoxide stress response *soxRS*; Nunoshiba T., K. Yamamoto*; Dept. of Molecular & Cellular Biology, Biological Institute, Graduate School of Science Tohoku University (*Fax: 022-263-9206, e-mail: yamamot@mail.cc.tohoku.ac.jp); Key words: oxidative stress, interplasmid homologous recombination, chromosomal homologous recombination, antimutagenesis, transcriptional regulation.
- P-111: Implication of reactive oxygen species in lethal and mutagenic effects by photodynamic action in *Escherichia coli*; Kawakami M., N. Matsui, T. Yamaguchi, Y. Yonezawa, d H. Nishioka*; Department of Chemical Engineering and Materials Science, Doshisha University (*Fax: 0774-65-6686, e-mail: hnishiok@doshisha.ac.jp); Key words: photodynamic action, free radical, phloxine B(R-104), kat-sod assay.
- P-112: The enhancing effect of L-histidine on the cytotoxicity and apoptosis induced by H₂O₂; Oya-Ohta Y.^{1*}, M. Yamada², T. Ochi³; ¹Dept. Pathol., Kanagawa Pref. Coll. Of Nursing and Med. Tecnol., ²Dept. Biol., Yokohama City Univ., ³Dept. Environ. Toxicol., Teikyo Univ. (*Fax: 045-362-8785); Key words: hydrogen peroxide, L-histidine, cytotoxicity, apoptosis, active transport.
- P-113: Enhancement of the clastogenicity of *N*-nitrosodialkylamines plus near-ultraviolet irradiation by ethanol; Yamashita Y.^{1,2}, H. Tamura¹, M. Watanabe¹, N. Sumi¹, S. Arimoto³, H. Hayatsu^{2,3*}; ¹Toxicology Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd., ²Graduate School of Natural Science and Technology, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ws1.okayama-u.ac.jp); Key words: ethanol, chromosome aberration, *N*-nitrosopyrrolidine, UVA.
- P-114: Reaction of ω -chloroalkyl- α -acetoxy nitrosamines in relation to mechanism of their mutagenicity; Ishikawa S.*, A. Tamai, M. Mochizuki; Kyoritsu College of Pharmacy (*Fax: 03-5400-2695, e-mail: ishikawa-st@kyoritsu-ph.ac.jp); Key words: ω -chloroalkyl- α -acetoxy nitrosamines, mutagenicity, cross-linking, reactivity.
- P-115: Relation of mutational fingerprint changes to inhibitory effect of acetate on mutagenicity of *N*-nitrosoalkylureas; Muramatsu Y., H. Murakami, M. Mochizuki*; Kyoritsu College of Pharmacy (*Fax: 03-5400-2695, e-mail: mochizuki-mt@kyoritsu-ph.ac.jp); Key words: acetate, *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *N*-nitrosoalkylurea.
- P-116: Effect of metal ions on the mutagenicity of *N*⁴-aminocytidine; Mito E.^{1,2}, H. Hayatsu^{2*}, K. Negishi¹; ¹Gene Research Center, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ws1.okayama-u.ac.jp); Key words: nickel ion, *N*⁴-aminocytidine, mutagenicity enhancement.
- P-117: Effect of Ni²⁺ on the incorporation of mutagenic *p*-nucleoside triphosphate into DNA template-primer; Moriyama K.¹, D. M. Williams², D. M. Brown², H. Hayatsu^{3*}, K. Negishi¹; ¹Gene Research Center, Okayama University, ²Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (*Fax: 086-254-2129, e-mail: hayatsu@ph2ws1.okayama-u.ac.jp); Key words: nucleoside analog P, incorporation into DNA, nickel ion.
- P-118: Enhancement of the DNA strand break activity of *N*-nitrosodimethylamine by phthalate ester; Kawai K.; Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University (*Fax: 052-834-8780, e-mail: kkawai@meijo-u.ac.jp); Key words: di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *Drosophila melanogaster*, DNA repair test, DNA strand break.
- P-119: Structure-specificity relationship of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on the base-substitution mutations induced in *S. typhimurium his* genes; Watanabe T., M. Takahashi, T. Kasai, T. Hirayama*; Kyoto Pharmaceutical University (*Fax: 075-595-4769, e-mail: hirayama@mb.kyoto-phu.ac.jp); Key words: nitropyrene; dinitropyrene, nitrophenanthrene, nitrofluoranthene, base-substitution mutation.
- P-120: Photoactivation of [60]fullerene: induction of cytotoxicity and transforming activity; Sakaki A.^{1*}, Y. Nakajima Yamakoshi², N. Miyata²; ¹Div. Microbiol., and ²Div. Org. Chem., Natl. Inst. Health Sci. (*Fax: 03-3707-6950); Key words: [60]fullerene; cytotoxicity, cell transformation, photoactivation, BALB/3T3 cells.
- P-121: Base-substitution mutations induced by 2-and 3-nitrodibenzopyranone isomers in *E. coli lacZ* gene; Hirayama T.* M. Takashima, T. Kasai, T. Watanabe; Kyoto Pharmaceutical University (*Fax: 075-595-4769, e-mail: hirayama@mb.kyoto-phu.ac.jp); Key words: 2-nitrodibenzopyranone, 3-nitrodibenzopyranone, *E. coli lacZ* gene, base-substitution mutation.
- P-122: Specificity of spontaneous mutations mediated by *dinP* gene of *Escherichia coli*; Kim S. R.¹, H. Ohmori², K. Matsui¹, M. Yamada¹, T. Sofuni¹, T. Nohmi^{1*}; ¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, ²Institute for Virus Research, Kyoto University (*Fax: 03-3707-6950, e-mail: nohmi@nihs.go.jp); Key words: SOS regulon, *dinP*; CC101-CC111, spontaneous frameshift mutation.
- P-123: Mutation spectrum of *gpt* gene of *Escherichia coli* induced by γ -ray irradiation: effects of DNA repair; Matsui M., K. Masumura, S.-R. Kim, T. Nohmi*, T. Sofuni; Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences (*Fax: 03-3707-6950, e-mail: nohmi@nihs.go.jp); Key words: 6-thioguanine, γ -ray, *gpt* gene.
- P-124: Mutational spectra of dimethylnitrosamine in liver of Big Blue mice; Wang X.*., T. Suzuki¹, T. Itoh¹, M. Honma¹, A. Nishikawa², F. Furukawa², M. Takahashi², M. Hayashi¹, T. Sofuni; ¹Division of Genetics and Mutagenesis, and ²Division of Pathology, National Institute of Health Sciences (*Fax: 03-3700-2348, e-mail: wang@nihs.go.jp); Key words: dimethylnitrosamine, Big Blue mouse, *lacI*, mutational spectrum, deletion.
- P-125: The effect of *O*⁶-methylguanine pretreatment on ENU induced mutations in the liver of MutaMouse; Hara T.¹, T. Kashima², N. Horiya¹, T. Shibuya^{1*}, ¹Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, ²Azabu University (*Fax: 0463-82-9627); Key words: methyltransferase, *O*⁶-methylguanine, ethylnitrosourea, *lacI*, liver.
- P-126: Study of *in vivo* mutagenicity of *o*-Toluidine with MutaTMMouse; Nakai Y., K. Hirabayashi, M. Suga, Y. Miyauchi, Y. Kasahara*, Y. Izawa; Safety Research Department, Pharmaceuticals Development Research Laboratories, Teijin Ltd. (*Fax: 0425-87-5519, e-mail: ksh05249@token1.teijin.co.jp); Key words: *o*-toluidine, transgenic mouse, Muta Mouse, mutation, carcinogen.
- P-127: Studies on interindividual variations in micronucleus frequency in human lymphocytes: Relationship between micronucleus level and antioxidative status of serum measured by electron spin resonance spectrometry; Odagiri Y.*¹, H. Uchida², M. Takahashi²; ¹Division of Human and Health Sciences, Yamanashi Prefectural College of Nursing, ²Dep. Public Health, Saitama Medical School (*Fax: 0552-53-7781, e-mail: BY104452@niftyserve.or.jp); Key words: micronucleus, interindividual difference, x-ray, colchicine.
- P-128: Hypothermia induces micronuclei; Asanami S.*¹, K. Shimono; Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. Naruto Research Institute (*Fax: 0886-86-8176); Key words: micronuclei, body temperature, mouse, hypothermia, chlorpromazine.
- P-129: Human plasma level of flavonoids after ingestion of a meal and their effect on peripheral blood cells; Shimoi K.^{1*}, R. Mochizuki¹, H. Okada¹, M. Furugori¹, M. Suzuki², Y. Hara², N. Kinae¹; ¹School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, ²Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co. (*Fax: 054-264-5528, e-mail: shimoi@fns1.u-shizuoka-ken.ac.jp); Key words: flavonoid, quercetin, human plasma, Comet assay.
- P-130: Analysis of Mutations in the human HPRT gene induced by heavy-ion irradiation; Yatagaya F.*¹, Y. Kagawa⁵, M. Hirano⁵, N. Inabe¹, K. Eguchi-Kasai², Y. Furusawa², M. Suzuki², M. Watanabe³, T. Kato⁴, F. Hanaoka¹; ¹Riken, ²NIRS, ³Nagasaki Univ., ⁴Osaka Univ., ⁵Toray Res. Center (*Fax: 048-462-4636, e-mail: yatagaya@postman.riken.go.jp); Key words: HPRT gene, heavy-ion irradiation, human lymphoblastoid cell line.
- P-131: Inhibition of intercellular communication by cigarette smoke condensates; Machida R.¹, K. Machii², S. Goto^{2*}, O. Endo², F. Fukai³, Y. Takagi¹, K. Kohzaki¹; ¹Azabu University, ²National Institute of Public Health, ³Science University of Tokyo (*Fax: 03-3446-7165); Key words: intercellular communication, cigarette smoke condensates, BALB/3T3, intercellular laser cytometer.
- P-132: The mechanism of chromosome rearrangements in the G₁ phase of human cells—Participation of the excision repair process to chromosome rearrangements—; Sekizawa K., K. Kishi*; Department of Cytogenetics, School of Health Sciences, Kyorin University (*Fax: 0426-91-1094); Key words: chromosome rearrangements, aphidicolin, 4-nitroquinoline-N-oxide, mitomycin C, ACNU.
- P-133: Recognition of acetaldehyde-1-formaldehyde-induced DNA damage: by the recombinant XPA protein; Kawanishi M.*¹, T. Matsuda¹, T. Yagi², S. Matsui¹, H. Asahina³, I. Kuraoka⁴, K. Tanaka⁴, H. Takebe²; ¹Research Center for Environmental Quality Control, ²Dept. of Radiation Genetics, ³Radiation Biology Center, Kyoto Univ., ⁴Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ. (*Fax: 075-753-4419, e-mail: kawanisi@eq1.eq1.kyoto-u.ac.jp); Key words: acetaldehyde, formaldehyde, recombinant XPA protein.
- P-134: Molecular cytogenetic analysis of Chinese hamster cell lines, CHL, CHO, and V79 by comparative genomic hybridization; Sakamoto H.*¹, M. Sakamoto², T. Satoh¹, M. Ishidate, Jr.¹; ¹Chromosome Research Center, Olympus Optical Co. Ltd., ²Sasaki Institute Kyoundo Hospital (*Fax: 0426-91-7209, e-mail: h_sakamoto@ot.olympus.co.jp); Key words: CGH (comparative genomic hybridization), Molecular cytogenetic analysis, CHL/IU, CHO-WBLT, V79.
- P-135: Analysis of stable chromosomal aberrations using chromosome painting combined with sister chromatid differential staining (SCDS) method; Satoh T.*¹, K. Yamamoto¹, H. Sakamoto, K. F. Miura, M. Ishidate, Jr.; Chromosome Research Center, Olympus Optical Co., Ltd., ¹Department of cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (*Fax: 0426-91-7209, e-mail: ta_sato@ot.olympus.co.jp); Key words: Chromosome painting, sister chromatid differential staining, stable chromosomal aberration, CHO-WBLT, mitomycin C.
- P-136: Measurement of RDS (replicative DNA synthesis) and gap junctional intercellular communication in rat liver after subacute treatment of D,L-menthol by feeding; Takasawa, H.*¹, Y. Uno, T. Murata, K. Goto, J. Mochizuki, M. Mutai, K. Yoshikawa; Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemi-

cal Co. (*Fax: 045-963-3966, e-mail: 2000106@cc.m-kagaku.co.jp); Key words: RDS (replicative DNA synthesis), gap junctional intercellular communication, D,L-menthol, rat; liver.

P-137: Results of the first collaborative study on an *in vivo* replicative DNA synthesis (RDS) test in rat livers with carbon tetrachloride; Collaborative study on non-mutagenic carcinogens (*in vivo* RDS/UDS assay group); organizer chief; Uno Y.*; Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Co. (*Fax: 045-963-3966, e-mail: 1306005@cc.m-kagaku.co.jp); Key words: replicative DNA synthesis test, RDS test, carbon tetrachloride, liver, rat.

P-138: *In vivo* replicative DNA synthesis (RDS) test on the chemicals inducing polyploidy (2); Asanoma K., Y. Ohsugi, A. Ohuchida*; Section of Immuno and Genotoxicity, Drug Safety Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd. (*Fax: 0886-65-5692); Key words: replicative DNA synthesis, narcotine, thiabendazole, cholchicine.

P-139: Analysis of PhIP-induced mutant frequency and mutational spectrum in the colon of the Big Blue rat; Okochi E.¹, H. Okonogi¹, T. Ushijima¹, G. Stuart², B. W. Glickman², T. Sugimura¹, M. Nagao^{1*}; ¹Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute, ²Biology Department, Center for Environmental Health, University of Victoria (*Fax: 03-5565-1753 e-mail: mnagao@ncc.go.jp); Key words: heterocyclic amine, Big Blue rat, PhIP, *lacI* gene, mutational spectrum.

P-140: The study of sampling time *in vivo* mouse liver micronucleus test; Suzuki H.*; N. Hirano, T. Hagiya, T. Ohshima, Y. Tarumoto; Taisho Pharmaceutical Co., Ltd. (*Fax: 048-654-6650, e-mail: s10602@ccm.taisho.co.jp); Key words: liver micronucleus test, liver carcinogen, sampling time, partial hepatectomy, 4-acetylaminofluorene.

P-141: Enhanced effect of *rumAB* plasmid on A : T → T : A transversion in *E. coli*; Watanabe-Akanuma M.*; R. Woodgate², T. Ohta³; ¹Institute of Environmental Toxicology, ²National Institute of Child Health and Human Development, ³School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science (*Fax: 0423-83-7640); Key words: A : T → T : A transversion, mutational specificity, *rumAB*, *E. coli*.

P-142: Investigation of intracellular generation of reactive oxygen species in *Escherichia coli* mutants irradiated to electro-magnetic wave; Yonezawa Y., N. Matsui, T. Yamaguchi, M. Kawakami, H. Nishioka*; Department of Chemical Engineering and Materials Science, Doshisha University (*Fax: 0774-65-6686, e-mail: hnishiok@

doshisha.ac.jp); Key words: active oxygen, electro-magnetic wave, X-ray, kat-sod assay.

P-143: Mutagenicity of hexavalent chromium — Study on micro colonies; Funasaka K.¹, M. Kitano¹, T. Mizuno², K. Kuroda^{3*}; ¹Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, ²Faculty of Engineering, Mie University, ³Osaka City University Medical School (*Fax: 06-772-0676); Key words: chromium trioxide, Ames assay, micro colony, filamentation, microscope.

P-144: Rec-assay on methanol and water extracts of paper products; Kitano M.*¹, T. Baba¹, K. Kuroda²; ¹Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, ²Osaka city University Medical School (*Fax: 06-772-0676); Key words: rec-assay, paper products, DNA damaging activity, methanol extracts.

P-145: Comparative examination of some organic solvents with the Ames test; Banno F., S. Saito, T. Tsuchiya, Y. Hagiwara*; Safety Evaluation Center, Central Research Laboratory, Showa Denko K. K. (*Fax: 043-226-5222); Key words: Ames test, preincubation method, organic solvents, *S. typhimurium*, *E. coli*.

P-146: New Development of Ames test colony counting method by computerized image process technique(1); Baba T.*¹, I. Uematsu¹, R. Ishida², A. Araki², T. Matsushima²; ¹DENNOU Corp., ²Japan Bioassay Research Center (*Fax: 81-44-788-9084, e-mail: dennou@fa2.son.net.or.jp); Key words: Ames test, colony counter, colony vision, computerized image process, precision.

P-147: New Development of Ames test colony counting method by computerized image process technique(2); Yabu M.*¹, I. Uematsu², T. Baba², R. Ishida³, A. Araki³, T. Matsushima³; ¹Kanematsu Medical System Corp., ²DENNOU Corp., ³Japan Biolassay Research Center (*Fax: 03-5645-5250, e-mail: yabu@kmc.co.jp); Key words: Ames test, colony counter, colony vision, computerized image process, precision.

P-148: Growth inhibition effects of some lots of OXOID Nutrient Broth No.2 on the *Salmonella* tester strains in bacterial reversion test; Araki A.¹, Y. Kawaguchi², Y. Sakamoto^{3*}, M. Sekijima⁴, C. Takeda⁵, T. Nishitomi⁶; ¹Japan Bioassay Research Center, ²Konica Corporation, Environment and Safety Dept., ³Takeda Chemical Ind., Drug Safety Research Labs., ⁴Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc., ⁵Olympus Optical Co., Ltd. Chromosome Research Center, ⁶Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd. (*Fax: 06-300-6916, e-mail: Sakamoto_yutaka@takeda.co.jp); Key words: OXOID Nutrient Broth, data of questionnaire, viable cell counting, OD and pH of culture, abnormal growth curve.

日本環境変異原学会会則

第1条 本会は日本環境変異原学会 (The Environmental Mutagen Society of Japan) と称する。

第2条 本会は人間環境における突然変異原, とくに公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。

第3条 本会の会員は, 正会員, 学生会員, 賛助会員および講読会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し, 環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し, 定められた会費を納入した者とする。学生会員は, 大学, または大学院に在籍し, 毎年所定の手続を経て, 定められた会費を納入した者とする。賛助会員はこの学会の事業を後援し, 定められた会費を納入した個人または法人とする。講読会員は学会誌「環境変異原研究」の講読のみを行うものとする。

第4条 本会に入会を希望するものは, 1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上, 本会事務所に申込むものとする。

第5条 会員は毎年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は評議員会において審議し総会において定める。

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し, 学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
2. 学会賞を設け, 環境変異原の分野ですぐれた研究を行った会員および将来の成果が期待される会員(原則として個人)に授与する。
3. *Mutation Research*誌を特価で購入配付する。
4. 国際環境変異原学会連合に加入し, 国際協力に必要な活動を行う。
5. 学会誌「環境変異原研究」を発行する。
6. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

会長 1名 庶務幹事 1名

会計幹事 1名 國際交流幹事 1名
編集幹事 1名 会計監査 2名
および評議員若干名

評議員は正会員の投票により選ぶ。
会長は評議員の互選によって定める。
庶務幹事, 会計幹事, 國際交流幹事, 編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て, 評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。
役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

第8条 評議員会は会員を代表し, 事業計画, 経費の収支, 予算決算およびその他の重要事項について審議する。

第9条 本会は年1回総会を開く。
総会において会則の改廃制定, 予算・決算の承認, その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。
会長は執行機関の長となり, また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

附記

1. 本会則は平成6年1月1日より施行する。
2. 本会の事務所を
東京都世田谷区上用賀1-18-1
国立衛生試験所内に置く。
3. 正会員, 学生会員, 賛助会員および講読会員の会費は, それぞれ年額7,000円, 5,000円および1口50,000円および年額10,000円とする。ただし, *Mutation Research*誌の配布を希望するものは, 会費の他に別途定める講読料を本会へ前納するものとする。

日本環境変異原学会入会申込書

年 月 日

役員名簿 (平成9年度)

評議員名簿 (平成8~9年度)

(五十音順)

氏 名 所 属

会長 祖父尼俊雄	荒木明宏 日本バイオアッセイ研究センター
庶務幹事 林 真	石館 基 オリンパス光学工業(株)・染色体研究センター
会計幹事 田中憲穂	太田敏博 東京薬科大学・生命科学部
国際交流幹事 大西克成	大西克成 徳島大学・医学部
編集幹事 若林敬二	葛西 宏 産業医科大学・産業生態科学研究所
会計監査 佐藤茂秋	菊川清見 東京薬科大学・薬学部
白須泰彦	木苗直秀 静岡県立大学・食品栄養科学部
賞等選考委員(委員長) 松島泰次郎	黒田行昭 麻布大学・環境保健学部
木苗直秀	坂本京子(株)ワンネス
島田弘康	瀧谷徹 (財)食品薬品安全センター・秦野研究所
葛西宏	島田弘康 第一製薬(株)・開発研究所
菊川清見	清水英佑 東京慈恵会医科大学・医学部
長尾美奈子	須藤鎮世 伊藤ハム(株)・中央研究所
後藤純雄	祖父尼俊雄 国立衛生試験所・変異遺伝部
編集委員(委員長) 石館基	田中憲穂 (財)食品薬品安全センター・秦野研究所
鈴木潤三	長尾美奈子 国立がんセンター研究所・発がん研究部
瀧谷徹	西富保 (株)三菱化学安全科学研究所
太田敏博	能美健彦 国立衛生試験所・変異遺伝部
下位香代子	林真 国立衛生試験所・変異遺伝部
西富保	早津彦哉 岡山大学・薬学部
降旗千恵	松島泰次郎 日本バイオアッセイ研究センター
企画委員 秋山實利	山添康 東北大学・薬学部
能美健彦	吉川邦衛 三菱化学(株)・横浜総合研究所
森秀樹	若林敬二 国立がんセンター研究所・生化学部
早津彦哉	渡部烈 東京薬科大学・薬学部

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の署名を添えて申しあげます。

フリガナ:		
氏名:	(印)	
Name (ローマ字つづり)		
生年月日(性別)	19 年 月 日	(男・女)
所属機関名:		
住所:	〒	
TEL:	FAX:	
電子メール:		
Affiliation		
Address		
Belong		
自宅住所:		
電話:		
Home address		
学会誌送付先:	①所属機関	②自宅
学年:	年取得	
研究領域(複数可)		
加入学会名:		

_____の本学会への入会を推薦致します。

日本環境変異原学会評議員

(署名)
日付

印

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:	印	
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 Belong		
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

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)を編集委員長宛に送付すること。

5. 著作権

本誌に掲載された記事、論文などの著作権は日本環境変異原学会に帰属するものとする。従って、本会が必要と認めた場合は転載し、また外部から引用の申請の許可があった場合には、編集委員会において検討の上許可があることがある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部の複製、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、許諾を求めるべきである。

6. 校正

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

7. 著者負担金

1) 投稿論文（一般論文、短報、論説）は、組版代の一部負担金として刷り上がり1頁につき2,000円を著者が負担する。また規定の頁数を越えた場合、超過頁分についての実費は著者負担とする。資料・情報については原則として無料扱いとするが、頁数の削減を求めることがある。

2) カラー印刷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) 別刷りは別途寄稿の場合も含め、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。

論文原稿の送付、その他編集についての問い合わせ先:

〒192 八王子市久保山町2-3
オリエ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。
日本文の場合：原稿はA4版用紙に1行22字、1頁20行で印字する（刷り上がりの1/4頁に相当する）。ただし、要約は英文（300語以内）とする。また、別に英文の題名、著者名（フルネーム）、所属機関名ならびに所在地を付ける。
- 英文の場合：原稿はA4版のタイプ用紙にダブルスペースでタイプする。一行打字数は約60字、1頁25-27行を標準とする。原稿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」）、結語、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宣指示を与える。
- 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、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
- 句読点はカンマ（,）および（.）とする。

- 表、図（写真）は本文と別にし、それらの押入筒所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号Fig. 1, 2…を付し、説明文を別紙に添える。
- 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面にFig. 1, 2…および上下を鉛筆書きし、A4版の台紙に一枚ずつ軽く糊付けする。台紙の下部にFig.（一連番号）を付す。
- 表は表の上部にTable（一連番号）と説明を記入すること。表には縦罫を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するとき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つてする。
- 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。記載順序は著者名、年号、題名、雑誌名、挙、頁（単行本の場合は著者名、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を従う。
Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 31, 347-364.
Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. Matter and M. D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds), Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.
藤川和男、梁 治子、近藤宗平（1984）ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目されている短期試験法、環境変異研究、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。

オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に！ より手頃な価格に！

特徴

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

製品名	包装単位	備考
エームステスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml × 10本 コファクターA 9ml × 10本	エームステストでのデータを添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 2ml × 3本 コファクターC 4.7ml × 3本	染色体異常試験でのデータを添付します

（保存は-80°Cでお願い致します）

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

- 従来品は引き取扱いしております。

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

誘導法の変更や、サル、イヌなどラット以外のS-9またはミクロソームの調製、その他、技術的なお問い合わせは、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

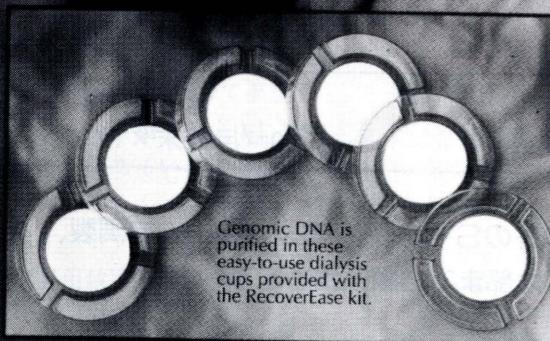
 和光純薬工業株式会社

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)

RECOVEREASE™ DNA ISOLATION KIT

- High-molecular-weight genomic DNA from whole tissue
- No organic extractions or ethanol precipitations
- DNA ready to use next day
- Ideal for DNA isolation for transgenic mutation assays
- Works great with Stratagene's Big Blue® system

Hands-On Time



Genomic DNA is purified in these easy-to-use dialysis cups provided with the RecoverEase kit.



STRATAGENE®
pioneering the future of in vivo mutation research

お問合せ先：

加商株式会社

ライフサイエンスグループ

〒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

E-mail:kskt-ea@mxu.meshnet.or.jp

変異原性試験画像解析支援システム

各種変異原性試験をサポートする画像解析システムをご用意しております。

SCG画像解析システム

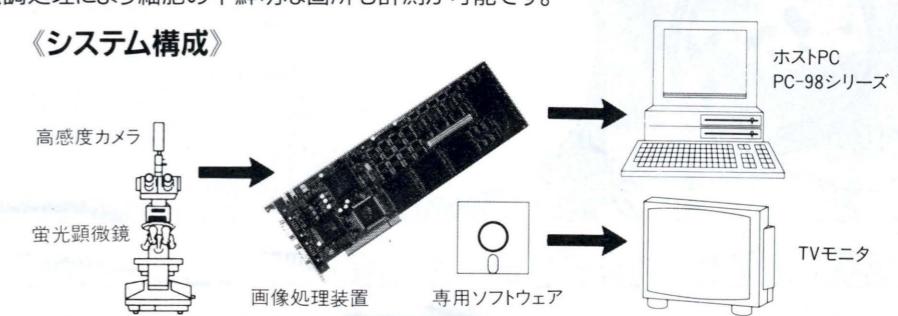
SCG試験に必要なデータを計測します。

高感度カメラの使用及び画像強調処理により細胞の不鮮明な箇所も計測が可能です。

《計測内容》

- Tail Length
- Shape Factor
- Nuclear Diameter
- Tail Intensity
- DNA Migration
- Ratio
- Tail Moment

《システム構成》



UDS画像解析システム

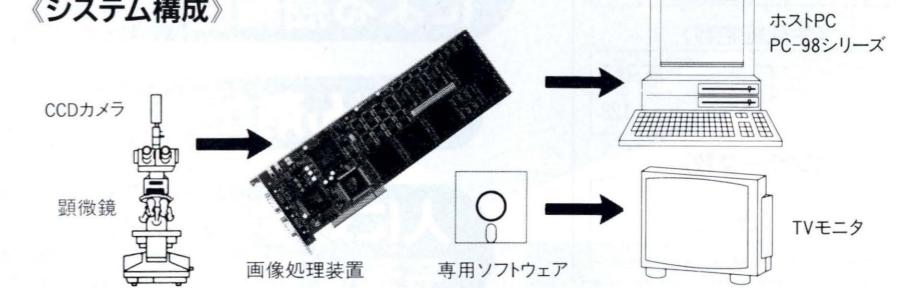
UDS試験に必要なデータを計測します。

フィルタ処理により画像強調を行ない、核と細胞質の各エリア内グレイン数及び、NETグレイン数の計測が行なえます。

《計測内容》

- 核グレイン数(1エリア)
- 細胞質グレイン数(3エリア)
- NETグレイン数

《システム構成》



小核画像解析システム

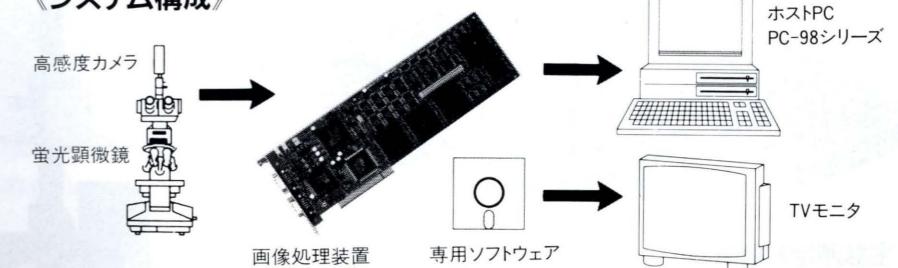
小核試験に必要なデータを計測します。

フルカラー画像解析装置に取込まれた画面内の核を抽出し、小核、主核のカウントやサイズを解析できます。

《計測内容》

- 小核カウント
- 小核サイズ
- 主核カウント
- 主核サイズ

《システム構成》



*この他にも各種画像解析ソフトウェアならびに
特注ソフトウェアも承っております。

開発製造元
(社)日本システムハウス協会会員)

ImageTech®

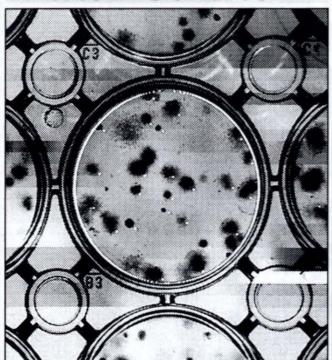
ケイオ一電子工業株式会社

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

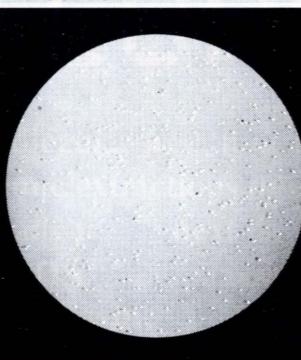
PCA-11D 細胞測定システム

種々のシャーレはもとより6穴から96穴までのプレート内の試料が計測できます。

細胞毒性試験



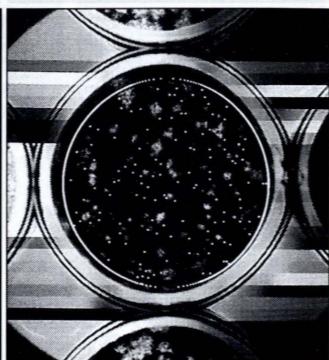
癌細胞コロニー



無培養の細胞



プラーク



無培養の細胞数、生死細胞数、癌細胞・細胞コロニー数からプラーク数等を自動計測

プリントアウト例

〈細胞コロニー数〉		
01	32	C
〈生死細胞数〉		
P1 192	P2 64	RESULT 128
〈プラーク数〉		
01	126	C

生細胞、死細胞を別々に選択して計測

二層寒天培地、メチルセルロース培地による癌細胞コロニー数を計測

抗がん剤が効くかどうかの事前試験

人に対する局所刺激性、急性毒性を予測する細胞毒性試験

プラーク数の計測により免疫毒性試験の迅速化



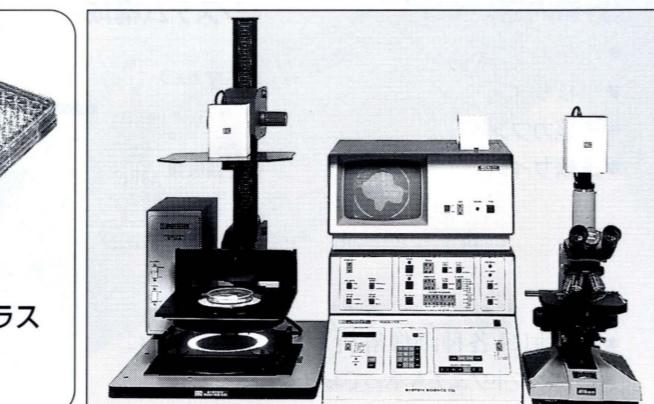
主な測定対象試料

- ・35~150mmシャーレ
- ・顕微鏡用スライドグラス
- ・6~96穴プレート
- ・血球計算盤等

※ 依託試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元

SSC システムサイエンス株式会社



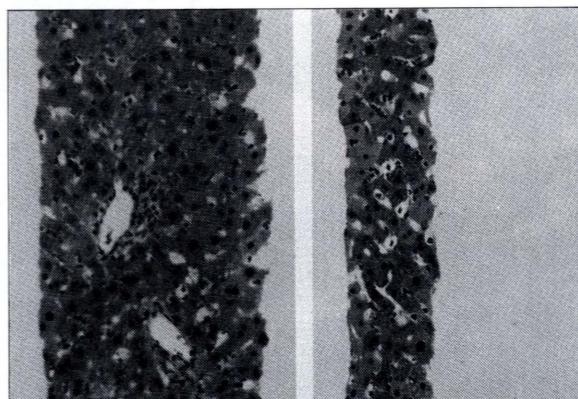
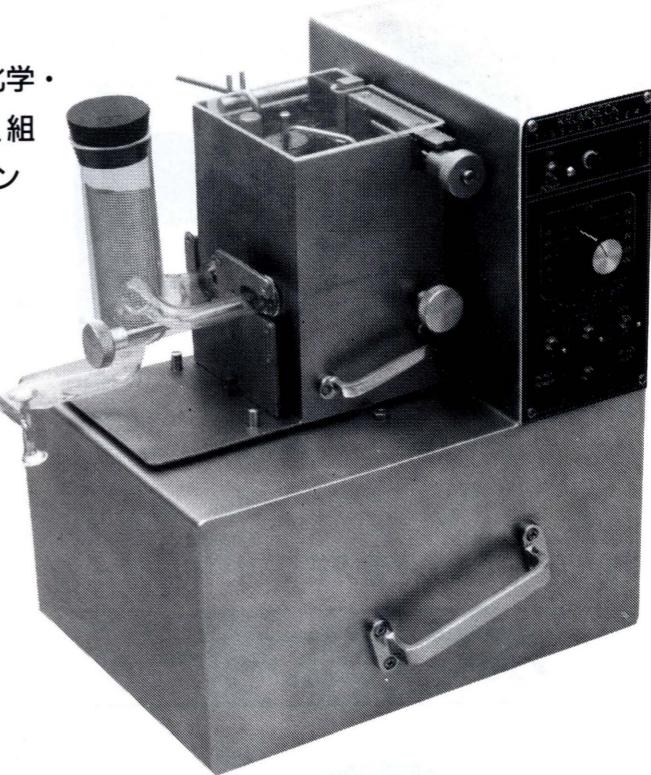
(PCA-11DSF SYSTEM)

THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

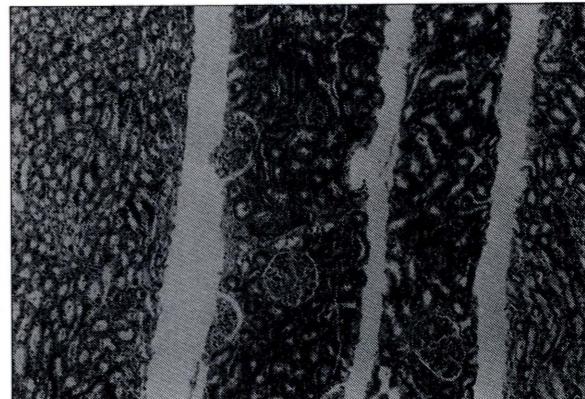
生きた組織の無菌スライスができます。

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

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



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

右の写真はラットの肝臓のスライス(厚さ80μm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

全自动培地作成システム

FULLY AUTOMATED MEDIA PREPARATION SYSTEM



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

種火のいらない電子着火式ブンゼンバーナー

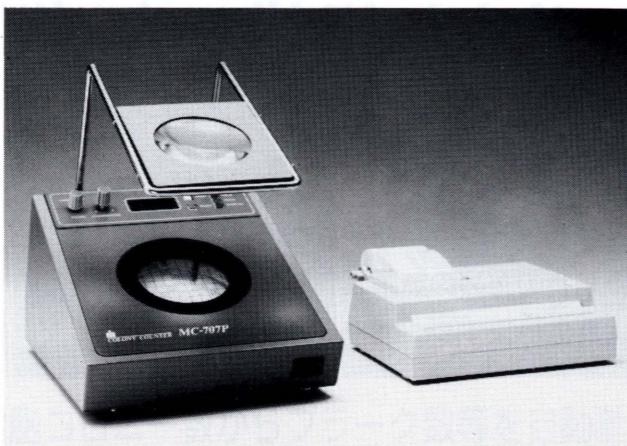
ガスプロфиー



- コンパクト・低価格。
- IRセンサーによる電子着火。
- ガス配管不要(オプション装着)。
- タイマー／連続点火／フットスイッチ切替え付

MC707P

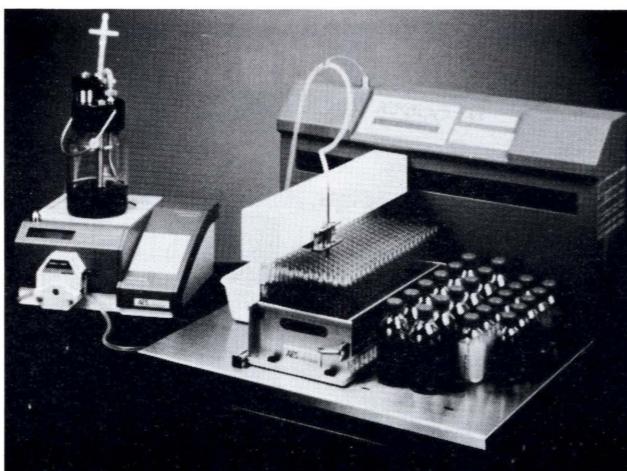
コロニーカウンター



- お手持ちのサインペンで使えます。
- ×2のレンズにより、コロニーを容易に判別できます。
- カウント数は、見易いLED表示。
- プリンター接続可能(オプション)。

精巧な、多目的ディスペンサー

XY500



XY500は、2方向軸運動を行なうマイクロプロセッサー駆動のアームがあります。どんな種類の容量分注器(シリンジ、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ざわざ分注することができる。

フランス・AES Laboratoire総代理店

株式会社 東京エム・アイ商会

〒104 東京都中央区新川2-7-1

TEL (03) 3551-7873

FAX (03) 3551-7318

編集後記

本号は、25周年記念大会(東京大会)の特集号ですが、ご講演の諸先生のご協力を得て原稿が沢山集まりました。Mutation Researchの再編によって大会の英文要旨をMutation Researchに出せなくなつたため、本誌にtitleおよびkeywordsのみを掲載することになりました。また、一般論文2編の投稿もありました。

18巻は1、2号を1996年、3号は1997年の発行となりましたが、本号を19巻の1・2号の合本号として発行することにしました。秋には、今年5月のシンポジウムを含む3号を発行する予定です(締切日7月末日)。一般論文を奮ってご投稿ください。

担当編集委員 降旗 千恵

編集委員

委員長 石館 基

委員 鈴木 潤三
濱谷 徹
太田 敏博
下位香代子
降旗 千恵
荒木 明宏

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19巻 第1・2号 1997年

平成9年6月10日 印刷
平成9年6月17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

マウスの体温降下による小核の誘発	朝波省吾, 下野和之	1
<i>In vitro DNA synthesis error specificity: A single amino-acid replacement in rat DNA polymerase β</i>		
.....Magdy Mahmoud Mohamed, Akio Matsukage, Takayasu Date, Fumio Hanaoka and Fumio Yatagai		7

第 25 回大会特別講演

One million + one carcinogens	Paul H. M. Lohman	17
-------------------------------	-------------------	----

受賞講演

学術賞

環境中の変異原の検出とその抑制因子に関する研究	早津彦哉	19
-------------------------	------	----

研究奨励賞

ショウジョウバエを用いた変異原性修飾因子の研究	根岸友恵	21
染色体異常試験における培養環境の研究 (非生理的 pH 環境における染色体異常の誘発)	森田 健	27

シンポジウム 「21 世紀に向けての環境変異原研究の目指すもの」 S1～S4

大気中の変異原・がん原物質	渡辺徹志, 平山晃久	37
---------------	------------	----

放射線・紫外線の変異原性, 発癌性: 太陽光紫外線のバイオドシメトリー	宗像信生	43
-------------------------------------	------	----

磁場の変異原性・癌原性	鈴木勇司, 清水英佑	49
-------------	------------	----

農薬, 医薬品の変異・がん原性	荒木明宏	55
-----------------	------	----

水中の変異原・発がん物質	小野芳朗	63
--------------	------	----

水中変異原と生物影響	木苗直秀	71
------------	------	----

変異原性試験による癌原性物質の検出状況	森田 健	79
---------------------	------	----

中期ならびに長期動物発がん性試験と変異原性試験	立松正衛	91
-------------------------	------	----

発がん研究における動物種間, 実験系間のギャップ	黒木登志夫	97
--------------------------	-------	----

Comparative Genomic Hybridization (CGH) による婦人科癌の分子細胞遺伝学的解析

.....坂本 優, 坂本宙子, 岩渕浩之, 菊池義公, 石館 基, 野田哲生, 杉下 匡, 天神美夫	101
---	-----

染色体変化の全ゲノム領域にわたる検索 (増幅, 欠失およびメチル化の変化について)

.....大隅智也, 伊藤充輝, 岡崎康司, 村松正實, William A. Held, 林崎良英	105
--	-----

レギュラトリサイエンスにおける変異原性試験	林 真, 渡部 烈, 島田弘康	111
-----------------------	-----------------	-----

第 25 回大会演題リスト一覧 (英文)

Poster Presentations in the 1996 Annual Meeting, the 25th Anniversary Meeting of the Environmental Mutagen

Society of Japan	117～126
------------------	---------

付 記

日本環境変異原学会 会則

環境変異原研究

投稿規定

平成 9 年度 役員名簿

執筆規定

8～9 年度 評議員名簿

入会申込書

学生会員申込書