

環境変異原研究

**Environmental
Mutagen
Research
Communication**

Vol. 2. No. 1 1980

日本環境変異原学会奨励賞受賞に際して

国立がんセンター研究所

長 尾 美奈子



今回環境変異原学会奨励賞をいただきましたことを非常に光栄に思います。

振り返ってみますと、食品中の変異原・癌原物質の研究をするに至ったのは、我々の研究指向性の他に、偶然性と歴史的学門の流れによるところが非常に大きいものと思われます。

一時は変異原テストによって食品中の癌原物質を洗い出せるのではないかと考えたこともありましたが、事態は複雑をきわめているようです。それだけに大変興味深い問題が山積されていると思われます。

受賞に当りまして、指導して下さいました諸先生方、共同研究をして下さった方々に深く感謝いたします。

環境変異原研究当面の課題

国立遺伝学研究所 田 島 弥太郎

たゞいまから「環境変異原研究当面の課題」と題して以下4つの項目について申し上げてみることに致します。

(1) 変異原の鋭敏な検出法の開発とその結果生じた問題

環境変異原の研究が始まった時、まず我々が取り組んだ問題は、鋭敏な感度を持つ検出系の開発であった。これによりいくつかの、感度の高い検出系が確立された。中でも昨日来、しばしば研究発表に出てくる *Salmonella* の系、或は、賀田さんが枯草菌で開発された rec-assay の系、その他いろいろな感度のいい系が開発され、それにより変異原研究は急速な進歩を遂げた。

特に大変な功績を上げられたと思うことは、突然変異原性とがん原性との共通性—共通な agent により両方が発生してくる—という事実がアメリカの Ames 教授グループやがんセンターの杉村先生を中心とするグループの努力により解明されたことである。

今日では、発がん性の知られた物質の約85%から90%について突然変異性が認められるようになった。これについては、別の機会に杉村先生にお聞きしたこともあるし、又今後そういう機会もあると思うので、今ここでは、その問題にはふれない。

次に出てきた重要な問題は、我々の日常食べている食品の中にも、また医薬品その他の中にも変異原性をもった物質が予想外に広い範囲で含まれていることがわかってきたことである。

魚や肉の焼けこげや煙にいうまでもなく、主食の中にも、野菜、調味料、嗜好料、酒類の中にも、*Salmonella* や枯草菌の系で調べると高い突然変異性物質の存在が、検出されるに至った。そこでいったい我々は、何を食べたらよいかという質問さえ出てきたわけである。このことについて昨日の発表で長尾さんは、懊悩しているという表現をされていたが、こういう問題は至るところに出てきている。

ところで、これは我々研究者の責任もあると思うが、変異原性陽性という量的関係はまったく無視してしまって、それが少しでも変異性があるということになると「それは、危険だ」という判定をして、絶対に排除すべきだと考える。このことは注意しないと誤った大衆運動を触発するおそれがある。

その適例は、かつてパンの強化剤として使われたリジンの中にごくわずか、ppb のオーダーで、benzo(a)pyren が検出されたという理由から学校給食のパンにリジンを使用することを絶対排除すべきだという大衆運動が展開されたことである。この場合食下するパンの中に含まれる benzo(a)pyren の量は 10^{-10} 以下であるはずで、この量による生物作用はたとえあったとしても自然に起っている突然変異にくらべて、十分小さく、影響として感知できないものである。このような量と効果の関係を無視した主張に正面から立向うことをしなかった、私自身を今さらながら恥かしく思う次第である。

こういう誤った考え方を何とか是正してゆくことが少くとも変異原研究にあずかっているわれわれの任務ではなかろうかと思う。

(2) 投与量と作用率との関係

そこで投与量と作用率の関係についてもう少し考えてみたい。特に無作用域とか threshold という言葉で表わされる問題を取上げることとする。医薬や農薬など我々の生活のために便利に使っているものの中には、どうしても捨てられないものがある。その医薬がなければ他に代替薬品が見出せないとか、農薬でも農民の立場からどうしてもこれを使わなければならない時がある。

このような場合、もし低濃度域では害がないということがわかれば、大変好都合である。よく言われるが、塩でも砂糖でも濃度次第では害がある。しかし害のでない濃度でわれわれはこれを利用しているわけである。問題なのは、その量、使い方だと思う。そこで、もし無作用域、threshold といわれるものがあるならば、少くもその無作用域がどういう原因で表われてくるかをみきわめて threshold が確実にみられるものならば、その範囲内で利用してゆこうと考えることは当然である。

この考え方に対しては、人によっていろいろな意見がある。たとえば、我々がこういう事を言いたずと真先に攻撃されることとして threshold の研究は有害物質を使うための生産者側もしくは、行政側の言い逃れではないか、免罪符を得ようとするのではないかという意見である。私はこの考え方には科学的でないという事で立ち向わざるを得ないと思う。

反対意見はともかくどのような理由で threshold が表われてくるかという事を正しく理解することは大切な基本的な問題である。

Thresholdを検討するに当っては、まず第一に必要なことは mutagenicity を検討する系の感度が十分に高いものでなければならない。感度が鈍ければ当然大きな領域の threshold を示すことになるからできるだけ感度の高い系を用いて、正確に threshold を確認する努力が必要である。

さて threshold について考える時、少くも2つの種類に分けられると思う。真の threshold と見かけ上の threshold である。このことは本年春、環境科学班会議で述べた。

この2種の threshold の区分は、問題とする target まで我々が問題にしている物質が到着するか否かを前提とする必要がある。

たとえば、生体内のりんぱ球に起る染色体異常を対象とする場合には、注射により投与すればすぐその物質は細胞に到達できるはずであるが、生殖細胞のようなものとそこまで物質が到達する間にいろいろな path way があり、その途中で排除されてしまう可能性も考えられる。だから threshold を証明するにはその target としての DNA や、細胞の中まで物質が到達したことを前提として、その上で dose effect relationship に無作用域が認められるか否かを確かめる必要がある。

昨日の講演で衛生試験所の林さんが、「トリアジン系農薬シメトリンの染色体異常の誘起に対しシメトリンは、ある濃度以上のところから線量—効果曲線の立上りが始まる。それ以下のところでは、chromosome aberration は認められないが、そうとうな領域にわたって sister chromatid exchange が認められる。」という話をされたがそれなどは確かに低い濃度でも薬物は target に到達しているが、我々が問題にする chromosome aberration はその領域では起らない事を示して

いるからこれは真の threshold と考えてよい。

真の threshold のもう一つの例を紹介すると、cerbendazin (methyl-2-benzimidazolyl carbamate) (MBC) は防かび剤として用いられるものであるが、Seiler はこの物質を人間の体に投与して end-point として micro-nuclei の形成割合 (赤血球の微小核の形成) を調べた。

投与では 500 mg 投与しても、微小核細胞の有意な増加は見られなかったのに対し、経口投与では、no-effect level 50 mg/kg から始まってそれ以上の dose では dose に比例して微小核の出現がふえることが認められた (図 1)。

つぎに血中の MBC 濃度を調べてみると、IP 投与では図 2 に示すように 100 mg/Kg 入れても、500 mg/Kg 入れても共に血中濃度は 8 μ g/ml に保たれてそれ以上には上らなかった。

これに対し経口投与の場合には MBC の血中濃度は 100 mg/Kg で、IP で 500 mg/Kg 与えた場合よりも高くなること、しかし、やがて 8 μ g/ml のレベルに下って、おちつくことがわかった。

このことは、IP の場合には MBC が血中に溶ける溶解度に限度があり、それが 8 μ g/ml に相当するものであろう。したがって、血中濃度がこのレベル以上に上らなければ、IP でいくら投与しても無作用に止まることになる。

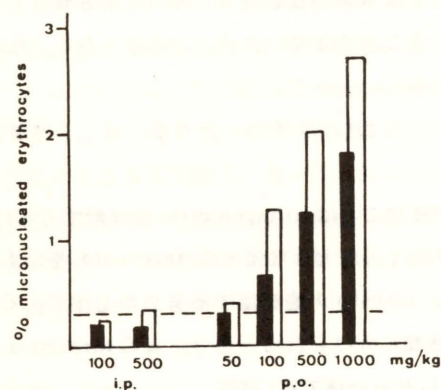


Fig. 1 Formation of micronucleated normochromatic (black columns) and polychromatic (white columns) erythrocytes by various dosages and application routes of MBC.

J.P. Seiler, Progr. in Genetic Toxicology,
(D. Scott, B.A. Bridges and F.H. Sobels eds)
pp 233, 1977, Elsevier.

ところで微小核が出来るのは恐らく細胞分裂装置が異常になるためと考えられる。細胞分裂装置としては spindle がまず考えられる。幸いに spindle を構成する蛋白の成分として tubulin が知られているので、Seiler は MBC が tubulin の生成を妨げる作用を持つのではないかと考え、仔牛の脳から tubulin 分子を抽出して in vitro で MBC を加えてこの分子の集結が妨げられるかどうか

を調べたところ、 $5 \cdot 10^{-5}$ M の辺から阻害が起ることを見た。この濃度は 10 μ g/ml に相当し、これ以上で小核の形成が始まるところに一致した。

前述の MBC 血中平衡レベル 8 μ g/ml ($4 \cdot 10^{-5}$ M) 以下では小核の形成も tubulin 分子の集結も起らないから、この濃度を threshold、真の閾値と見てよいであろう。

これに対し見かけ上だけで threshold を示すものがある。これは外部から投与された変異原物質がある量以下では target organ にまで到達できないような場合である。この場合には変異原物質が生物内に入った後代謝分解されるか、排泄される、あるいは target の細胞の中に透過できないなどといった機構が働くことが考えられる。

Threshold のある物質は真の threshold であろうと見かけだけのものであろうと、その作用がはっきりしていればある程度その領域でその物質を利用する事ができる。しかし threshold のないものはどこまですすめても生物作用をあらわすわけで、たとえ低濃度であったとしてもそれなりの危険性を持つことになる。このような理由で化学変異原について、threshold の有無を検討することは意義あることと言える。

(3) 人間に対する突然変異性の判定基準

次は人間に対する突然変異性の判定基準という問題で、昨日から Salmonella を用いた沢山の mutagenicity の研究報告があった。Salmonella や枯草菌で検出された mutagens が一体我々の体に対してどれだけの mutagenicity 又は carcinogenicity を表わすかという事が次に大きな問題である。

Virus から人間に至るまで遺伝子は DNA であるという点で共通性を持っている。多少の例外はあるが、したがって DNA を attack するものは、bacteria についても人間についても mutagenicity があるはずだという事が当然考えられる。しかし、生物により薬物の代謝過程が違うので一つの生物で mutagenic に働くことが判っても同じ物質が他の系で mutagenicity をあらわすとは限らない。

化学物質に対する変異原性のスクリーニングは、終局的には人間に対する変異原性を検出することを目的としているので、いろいろな生物を使うことが行われている。

今迄 Salmonella やその他の細菌の系を使って、carcinogen の mutagenicity 検出がうまくいった裏には、bacteria の系が somatic の系であるという事、bacteria では somatic と gametic とちょっと区別がつかないが、somatic な細胞であり人間のがんもやはり、体細胞に起るものであるという関係が大きく原因していると思う。

ところで私が本職にしている遺伝現象、遺伝子を通じて子孫に伝わる遺伝現象を考えると、そこには当然生殖細胞が介在する。その場合、bacteria について見た検出結果が人間の遺伝現象に関係した突然変異にも適用できるだろうか。私は細胞間における情報伝達の中で、体細胞から体細胞への方を横の関係、生殖細胞を通して子孫に伝えられる方をたての関係といて、簡単に区別をすることにしている。横の場合にはうまく適用できても、たての場合にうまく適用できるだろうかという問題である。ところが、この縦の関係と横の関係を区別して考えている人は少く、しばしば両者が混同されているきらいがある。

Salmonella や枯草菌による突然変異性の検定は代謝活性化と組合わせることによって実験動物

に対する発がん性テストの結果とよくつながったが、これは互いに横の関係で見られる現象だったためかも知れない。これに対し人間の遺伝する突然変異についての変異原性の prediction は縦の関係であるので、もっと別の factor を考慮しなければならないかも知れない。

そのため単一の検出方法だけでなく、幾つかの方法を併用する方法がとられている。

食品衛生調査会では食品の遺伝毒性を判定するために、少なくとも三つの段階のテストデータを要求することになっている。

一つは、bacteriaの系を使って、これにmetabolic activationを組合せたり、組合せなかったりして、primary screeningを行う。

第二は secondary screeningとして mammalの細胞、培養細胞を使って染色体異常が起るか否かを調べる。或いは、昆虫の系なら実行容易なのでショウジョウバエとか蚕を使って遺伝子突然変異を調べる。このどれでもよいからどちらかをしなくてはならない。

これだけの予備的なデータの上に mammalについての実験データが要求される。この段階では host-mediated assay, in vivo cytogenetics, dominant lethal test, specific loci method などのうちから、どれでもよいから一種以上のテストデータが求められる。これでもお判りのように縦の関係と横の関係とがいっしょに取りこまれていて、特に区別されていない。テストの項目を今後どうしたらよいかは検討を要する問題である。

AmericaのE.P.A (Environmental Protection Agency) では農薬を中心にいろいろ規制の方法を考えているが、昨年7月必要な検定項目に対する考え方の原案が示された。それには15項目をあげて、そのうち少くも8項目のテストを要求している。

〔第1群〕 遺伝子突然変異に関するもの

(A) metabolic activation との併用または非併用で bacteria を使ってテストする。

(B) eukaryote の微生物たとえば酵母のようなものを用いる。

(C) 昆虫、例えば Drosophila の劣性伴性致死突然変異

(D) 哺乳動物の体細胞を培養したものを用いる。代謝活性化と併用または非併用

(E) マウスの特定座位法

以上5つの系のうち少くも3つのテストを要求している。

〔第2群〕 染色体異常

ここでは次の4つの項目のうちから少くも3つ取り上げることを要求している。

(A) 哺乳動物の in vivo cytogenetics

(B) 遺伝する染色体異常

昆虫を用いて次代に伝えられる染色体異常を調べる。これには Drosophila が考えられている。

(C) 優性致死法

齧歯類を使って優性致死効果を調べる。

(D) 転座

やはり齧歯類を用いて次代に伝えられる転座を調べる。

〔第3群〕 DNA 損傷

第一次的にDNAに損傷を与える能力を次の4項目のうちから、2種取り上げ調査する。

(A) BacteriaにおけるDNA修復

代謝活性化と併用または非併用

(B) 哺乳動物細胞を使ったDNAの不定期合成

代謝活性化と併用または非併用

(C) 酵母における有糸分裂組換え

これは主として yeast を使って mitotic recombination 或は gene conversion の誘発能を調べる。

(D) 姉妹染色分体交換

哺乳動物の細胞を使った sister chromatid exchange、代謝活性化との併用または非併用。

こういう事をやって人間に対する、たての遺伝関係における突然変異性の有無を調べる。これには大変な労力と経費が必要であるが、子孫の健康のためには重要なことなので、今後研究を急がねばならぬ点である。がんの仕事はうまくいった。次は遺伝の問題だという考えが強くなってきたのが現状である。

それから、ある系では positive にでもある系では negative であるという事がある。その他に昨日来御議論のあった co-mutagen, anti-mutagen といったものがからんで、実際の面では複雑な関係を示すと思われる。一つ一つの物質については mutagenicity 作用があらわれても、別のものがくればその作用を打ち消してしまうかも知れない。逆にそれが高められる場合もある。したがって一つの系だけ使ったのでは、最終的な判断はできないので総合的な monitoring をやる必要がでてくる。しかし、それに対しどのような方法が実際的に最もすぐれているか、まだ名案はない。それで総合的にモニターしようという考えも出てくる。

ここにおられる外村さん達は染色体の形態的異常を monitoring に使おう、ということを考えて居るし、また培養細胞を使おうとする考えの人もある。また Michigan 大学の Neal 教授は血液に含まれる各種酵素や蛋白について、電気泳動ではかれるいろいろな変異を対象にして、これには20数種類あるそうですが、それを gene mutation の判定の手がかりにしようとしている。

しかし、これでやれば間違いなく簡単にできるという方法はまだないようである。いろいろ suggestion だけはされているが実際には何をやったらよいか困っているのが現状である。

(4) 自然界に広汎に変異原が存在する事実をどう受けとめたらよいか

これは昨日以来多数の報告が行われた点であるが、自然界に突然変異原物質があるという事は今新たに気がついた事ではない。例えば昨日報告にあったピロリチジンアルカロイドの仲間は羊に肝炎を起す牧草成分として早くから知られ、ショウジョウバエを用いて突然変異原性が認められていた。また穀物についているかびの生産する mycotoxin の中でも非常に mutagenic な有害性の高いものが

ある事がかなり前からわかっていた。例えば黄変米とかアカカビのついた麦などがその例であるし、強烈な変異原である Aflatoxin もカビの生えた落花生を餌に与えたシチメンチョウが大量に急死したことが発見の動機となった。

しかし Salmonella の系、或は枯草菌、その他の微生物を使う系が開発されて、感度よく化学変異原を検出できるようになって、自然界には予想以上に多数の変異原物質が存在していることがわかってきた。魚や肉の焼けこげの中にも、たばこを吸っても、野菜、その他の植物葉の中にも、Salmonella に復帰突然変異を起こさせる強い能力を持った物質が存在することがわかってきた。しかもそれがわれわれの日常食物の中に余りにも広汎にわたり存在しているので、一体我々は何を食べたらよいかという問いかけさえ行われるようになった。

この問題に対し、どう理解し、どう対処して行ったらよいだろうか。

人間が火を使うことを初めて発見したのはいつ頃か判らないが、それ以来おそらく数万年は経過しているであろう。その間に人間は焼き肉や焼き魚を食べ続けて来たに相違ない。これらの焼け焦げが、人間に対して mutagenic であるならば数万年の間に人間にはかなり高い率で突然変異が起り続け、それが蓄積されてきたにちがいないと思われる。その上、野菜などにも多量に含まれるフラボン、フラボノイドが変異原性を持つことまで考え合せれば、なおさらのことである。そしてそれだけ突然変異が起れば、当然遺伝学的に考えて人類は今日まで生存して来られなかったらという事さえ考えられる。ところが現実にはわれわれは生存している。

一見矛盾したこの事実を我々はどうか考えたらよいだろうか。まず drastic な考え方だが Salmonella とか、細菌類で detect される物質は細菌その他には mutagenic に働いても哺乳動物には mutagenic に働かないかも知れないという考え方がある。しかしそれが正しくないことは、たとえば細菌類で検出された mutagenicity がかなり高い確からしさでヒトに対する carcinogenicity 分と一致している事実から明らかである。

次の可能性は Salmonella その他の微生物で判定される突然変異原物質は、人の体内では体細胞には到達できる、だからがんになるが、生殖細胞までは到達できないと考えることである。この考え方も正しくない事は、人間ではその証拠を出すことはできないが、哺乳動物を使って実験すると、Salmonella で検出される強い mutagenic 物質が dominant lethal をおこし得る例がかなり知られることからわかる。したがって生殖細胞までは到達できないという仮説は成立しない。しかし後述するように、かなりの防御機構は存在しているらしい。

第3には mutagen が体内にとりこまれる前に、他の物質との interaction で消滅してしまう可能性である。或いは減弱されるという可能性も考えられよう。昨日賀田さん達が発表されていたいろいろな desmutagen というのがまさにこれで、つまり人間の体の中に入るまでに、体の外で物質同志の interaction で変異原性を失う現象である。こういうものは、恐らくかなり存在しているにちがいない。

第4の可能性は、体の中、或いは細胞の中に入ってから、そこに存在していた物質との interaction、その他生体内に存在する高分子との結合、代謝作用などによって突然変異性が消されてゆく可能性、賀田さんの定義では anti-mutagen という事に当たる。体の中に build in されて

いる anti-mutagen の例としては、先程下平さんがお話になった赤血球が dimethyl nitrosoguanidine のもつ mutagenicity を消してしまうという場合が好例であろう。

このような例は、杉村先生達が発見されたケルセチン、その他のフラボン、フラボノイドの仲間に見られる高い mutagenicity についても見られる。鱗翅目昆虫の幼虫には私共がやっている蚕をはじめ植物の葉しか食べないものが多い。植物の葉の中には、フラボンが沢山含まれている。ところが今日蚕も生きているし、鱗翅目昆虫も生きている。このことは、これらの昆虫体内に何か、フラボノイドの mutagenicity を消してしまうようなものが存在しているに違いないことを暗示している。その factor が何かを探し出すことは、そんなに難しいことではないと思われる。

この他に生殖腺自体にも生殖細胞を保護して、変異原物質がきても、なかなか寄せつけないような機構があって、昆虫をフラボンやフラボノイドによる突然変異による危険性から守っていることも合せて考えられる。

このように自然界における突然変異原の普遍的存在を生物の進化という立場から見直してゆくならば、人間をも含めて生物の中に build in された防ぎ機構がそなわっていないなければならないことが推論される。

それが何であるかを解明して行くことは我々の今後における重要課題である。

このことはいたずらに、環境変異原の恐怖というものを人々に与えることを防ぎ、正しい理解を与えるための一番真すぐな方法ではないかと思う。

そうかと言って変異原を軽視することはつゝしむべきで、自然界にはバランスがあり、それを越せば当然害が出てくる。正しい評価が必要であることをこの際つけ加えて置きたい。

まだいろいろ環境変異原について申し上げるべき事がありますが、時間の都合で、この程度にしておきたいと存じます。

御静聴ありがとうございました。

おわり

大腸菌の repair 機能変異株でみられる各種変異原に対する感受性の差異

坂本豊・山本清・菊池康基(武田薬品・中央研)

1977年の本学会において、松島ら¹⁾はネズミチフス菌のTAシリーズの菌株における repair 機能の有無とアルキル化剤に対する感受性の差異との関係を報告した。すなわち、メチル化剤に対する感受性は repair 機能を有する菌株の方が、欠損株よりも高く、エチル化剤に対しては、逆に repair 欠損株の方が高い感受性を示す、というものである。われわれは、大腸菌の WP2 株由来の種々の repair 機能の変異株を用い、各種変異原に対する感受性の差異を検討した。

材 料 と 方 法

1. 菌 株： 大腸菌 WP2、WP2 *hcr*⁻ [*uvrA*⁻]、および当研究室で WP2 株から分離した chlorate 耐性変異株²⁾で DNA に欠失をもつ、*chl*-4 [Δ (*uvrB*)]、*chl*-6 [Δ (*bio*, *uvrB*)] の計4株を用いた。さらに、ネズミチフス菌 G46 系統の TA92, TA100, TA1535 および TA1975, また、D3052 系統の TA98, TA1538 および TA1978 の合計7株についても比較検討した。これらの菌株のうち、WP2, WP2 *hcr*⁻ 株は国立遺伝学研究所 賀田恒夫博士より、TA1535, TA1538, TA98, TA100 株は国立がんセンター研究所 矢作多貴江博士より、TA92, TA1975, TA1978 株は東大 医科研 松島泰次郎博士より分与を受けた。
2. 変異原： 次の4組のメチル基およびエチル基をもつアルキル化剤、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) および N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG), nitroso-N-methylurea (NMU) および N-nitroso-N-ethylurea (NEU), dimethylnitrosamine (DMN) および diethylnitrosamine (DEN), dimethylsulfate (DMS) および diethylsulfate (DES) を用いた。さらに、 β -propiolactone (β PL), 2-aminoanthracene (2AA), 2-aminopurine (2AP), 3,4-benzpyrene (BaP), furylfuramide (AF-2), 2-nitrofluorene (2NF), sodium p-dimethylaminobenzenediazosulfonate (DAPA) の7種の変異原についても実験を行った。これらのうち、2AA, BaP, 2NF は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、他は滅菌蒸留水に溶解して実験に供した。これら変異原の試験濃度は Tables 1, 2 に示した。
3. 試験方法： 実験には矢作らの preincubation 法³⁾を一部改良して用いた。その主な点は、検体 0.1 ml, S-9 Mix または磷酸緩衝液 0.5 ml に菌液 0.2 ml を加え、37°C 30 分間 preincubation したこと、平板の寒天培地量を 20 ml, 重層する軟寒天量を 3 ml としたことなどである。S-9 Mix の調製には市販の S-9 (Litton Bionetics 製, Aroclor 1254 誘導の SD 雄ラット肝臓から調製) を使用した。

結 果 と 考 察

結果は Tables 1 および 2 に、2枚の平板のコロニー数の平均値を小数点以下を切上げて表示した。Table 1 から、大腸菌に関しては下記の結果が得られた。(1) WP2 系統の株では、エチル化剤に対する感

受性がメチル化剤に対する感受性よりも高かった。(2) WP2 *hcr*⁻ 株、*chl*-4 株および *chl*-6 株の repair 機能欠損株では 2AA, AF-2, BaP, DAPA, β PL などに対して感受性が著しく高まった。(3) *hcr*⁻ 株や *chl*-4 株では、アルキル化剤に対する感受性に若干の上昇傾向がみられたが明白ではなかった。しかし、*chl*-6 株においてはエチル化剤に対する感受性が、親の WP2 株に比べ顕著に増加した。一方、ネズミチフス菌の G46 系統の菌株 (TA1975, TA1535, TA100, TA92) では、Table 2 にみられるように大腸菌の WP2 系統株とは逆に、メチル化剤に対する感受性がエチル化剤に対する感受性よりも高かった。また、D3052 系統の frameshift 変異株 (TA1978, TA1538, TA98) では、これらのアルキル化剤に対する感受性の差異は明白ではなかった。

今回の大腸菌の試験結果から、*chl*-6 株のように *uvrB* 遺伝子から *bio* 遺伝子まで欠失した Δ (*bio*, *uvrB*) 株になると、親株の WP2 (*uvr*⁺) 株や、*chl*-4 株のように欠失部分の小さい Δ (*uvrB*) 株、あるいはこれらとは異なる変異 (*uvrA*⁻) をもつ *hcr*⁻ 株に比べ、エチル化剤に対する感受性が増加することがわかった。ネズミチフス菌の G46 系統の repair 機能欠損株 (TA100, TA1535) は欠失部分が *gal* 遺伝子にまで及んだ、大きな欠失をもつ Δ (*gal*, *bio*, *uvrB*) 株であるが、やはりエチル化剤に対する感受性は親株より増加している。この事実から、*uvrB* から *bio* に至る部分には repair 機能に関する未知の遺伝子を含む可能性も考えられ、この遺伝子が欠失することによりこれらの株でエチル化剤に対する感受性がより高まったのではないかと推測される。⁴⁾

次に、今回の試験結果は、エチル化剤に対する感受性に関しては松島らの結果とほぼ一致した。ただし、ネズミチフス菌 TA1535 株の ENNG に対する感受性については相違していた。一方、メチル化剤に関しては松島らの結果とは異なり、repair 機能の有無と感受性の間には相関関係は認められなかった。この理由については、松島らとわれわれの実験とでは変異原の試験濃度が異っていること以外不明である。

このように、base pair change を検出する指示菌といえども、菌株により変異原に対する感受性は異なっている。スクリーニングシステムの指示菌株として、ネズミチフス菌に加えて大腸菌、例えば本報告で用いた WP2 系統の菌株を用いることは、環境変異原検出の幅を拡げる意味からも有用性が大きいといえよう。

文 献

- 1) 松島泰次郎, 白井厚子, 沢村睦子, 梅沢一夫, 杉村 隆, (1977), 日本環境変異原研究会 第6回研究発表会, 吹田.
- 2) Adhya, S., Cleary, P. and Campbell, A. (1968), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 61, 956-962.
- 3) 矢作多貴江 (1975), 蛋白質・核酸・酵素, 20, 1178-1189.
- 4) 坂本 豊, 飯島貞二 (1971), 日本遺伝学会 第43回大会, 福岡.

Table 1. Induced revertant colonies in the derivatives of *Escherichia coli* B/r strain WP2

Agent	Dose plate	S-9 Mix	WP2	hcr ⁻	chl-4	chl-6
		(Marker uvr)	+	uvrA Δ (uvrB)	Δ (^{uvrB} _{bio})	
-	(water)	-	20	44	74	56
MNNG	10 nmol(1.47 μ g)	-	417	416	477	664
ENNG	10 nmol(1.61 μ g)	-	1466	2218	2137	5300
NMU	800 nmol(82 μ g)	-	536	261	486	498
NEU	800 nmol(93 μ g)	-	2873	2041	3500	6300
DMN	68 μ mol(5 μ l)	+	125	327	205	426
DEN	46 μ mol(5 μ l)	+	1230	1244	1213	3200
DMS	3 μ mol(380 μ g)	-	18	45	55	49
DES	3 μ mol(470 μ g)	-	111	941	1188	7200
ϕ PL	280 nmol(20 μ g)	-	28	1056	1086	1537
DAPA	100 nmol(25 μ g)	-	207	1190	2003	1296
AF-2	0.09 nmol(0.02 μ g)	-	30	1196	1212	2072
2AA	26 nmol(5 μ g)	+	26	70	84	59
BaP	79 nmol(20 μ g)	+	22	162	130	242
2AP	3.7 μ mol(500 μ g)	-	119	132	203	139
2NF	47 nmol(10 μ g)	-	19	49	64	30

Table 2. Induced revertant colonies in the derivatives of *Salmonella typhimurium* strains G46 and D3052

Agent	Dose		S-9 Mix	G46				D3052		
	plate			TA1975	TA1535	TA100	TA92	TA1978	TA1538	TA98
(Markers			rfa	-	-	-	+	-	-	-
			uvrB	+	(del)	(del)	+	+	(del)	(del)
			R-factor	-	-	+	+	-	-	+
-	(water)	-		4	8	141	6	12	9	61
MNNG	10 nmol	-		10500	7300	7700	8500	10	6	77
ENNG	10 nmol	-		147	116	807	174	11	12	123
NMU	800 nmol	-		12000	7200	8800	12000	8	12	78
NEU	800 nmol	-		146	2300	1256	185	12	17	151
DMN	68 μ mol	+		475	2512	2312	4500	17	15	30
DEN	46 μ mol	+		46	103	777	74	23	12	62
DMS	3 μ mol	-		50	32	312	63	10	10	53
DES	3 μ mol	-		527	2700	803	217	14	7	57
ϕ PL	280 nmol	-		17	4400	3800	20	11	11	71
DAPA	100 nmol	-		13	32	1322	37	51	267	751
AF-2	0.09 nmol	-		3	18	2700	5	12	14	585
2AA	26 nmol	+		4	107	1753	7	16	490	593
BaP	79 nmol	+		24	17	2026	6	26	34	191
2AP	3.7 μ mol	-		8	27	327	12	12	10	60
2NF	47 nmol	-		2	14	1840	7	196	1124	1765

小核試験に関する検討(2) 染色体切断剤と紡錘体 阻害剤で誘発された小核の大きさについて

山本好一・一ツ町晋也・菊池康基
(武田薬品・中央研究所)

小核は、染色体切断剤または紡錘体阻害剤で誘発されるが、いずれで誘発された小核も形態的にはよく似ている。¹⁾ このため、小核の外観から誘発原の種類を知ることができないとされている。一方、小核の大きさについては、通常、紡錘体阻害剤で誘発された小核の方が、染色体切断剤で誘発された小核よりもかなり大きい。¹⁾ したがって、小核の大きさについての詳細な分析により、小核誘発原の種類を推定することができるものと期待される。今回、われわれは、既知変異原物質を用い、上記の可能性について検討した。

材 料 と 方 法

既知の染色体切断剤7種および紡錘体阻害剤4種を使用した。Ansamitosin(ANSA)²⁾ busulfan(BUS)³⁾ および6-mercaptopurine(6-MP)⁴⁾ は当社製造の原末を用いた。Colcemid(COLC, Ciba)⁴⁾、colchicine(COL, 和光)、cytosine arabinoside HCL(ARA C, Aldrich)⁴⁾、Endoxan(EX, Asta)⁴⁾、mitomycin C(MMC, 協和発酵)⁵⁾、triethylenemelamine(TEM, Polyscience)⁵⁾ およびvincristine(VCR, Lilly)⁴⁾ は市販品を購入して使用した。

ANSAは10%エタノールに溶解し、BUSと6-MPは1%CMCに懸濁した。その他の化合物は蒸留水に溶解した。投与容量はいずれも10 ml/kg body weightとした。

10週令の(C3H \times SWV)F₁雄マウスへ上記化合物を1回腹腔内投与した。投与量は表1に示したとおりである。動物数は各群5個体とした。予備実験において、各投与量で骨髓中の小核を有する赤血球の頻度が無処理対照と比較して有意に高いことを確認した。投与から24時間または30時間後に動物を頸椎脱臼により屠殺した。各動物より大腿骨を摘出し、骨髓細胞を牛胎児血清で洗い出した。骨髓細胞を遠心分離した後、血清を捨て、沈渣をごく少量の血清に再浮遊させた。この細胞浮遊液をスライドガラスへ塗抹し、風乾、固定、ギムザ染色を経た後、検鏡した。

まず、TEMまたはVCRで処理した各マウスより、20個の小核赤血球(micronucleated erythrocyte:MNE)を任意抽出し、100倍の対物レンズを使用して写真撮影を行なった。2500倍に拡大した写真上で、各MNEの細胞質直径(D)および小核直径(d)をノギスで測定した。細胞質や小核の輪郭が円形でない場合は、平均直径として算出した。

上記の実験で $d \geq D/4$ となるMNEの頻度がVCR群で高く、TEM群で低いことが判明したので、他の化合物で処理した動物の標本については、 $d \geq D/4$ となるMNEの比率を求めた。実際には、

各細胞におけるdとDとを顕微鏡下で直接比較し、dがD/4を上まわるかどうかを判定した。この直接判定が困難な場合には、写真により判定した。

結 果 と 考 察

TEMまたはVCRで処理した動物における各MNEについて、細胞質直径(D)に対する小核直径(d)を図1にプロットした。VCR群では、ほとんどのdが1~4μの範囲内であったのに対し、TEM群では1μ前後であった。VCR群およびTEM群におけるDのおよその範囲は、それぞれ3~10μおよび5~8μであった。TEM群におけるDの範囲は、予備実験で調べた無処理動物における多染色赤血球の細胞質直径の範囲に一致していた。TEMおよびVCR群における代表的なMNEを図2に示したが、小核および細胞質の形態が両群においてかなり異なっていることがわかる。

染色体傷害に由来する断片から形成される小核⁶⁾は、紡錘体機能の障害に由来する遅滞染色体から形成される小核よりも小さいと推測されるので、上記結果は妥当であろう。VCR群における細胞質直径のばらつきは、赤血球の前駆細胞における分裂の異常を反映しているものと考えられる。VCRは、細胞分裂のみならず、細胞質分裂においても重要な役割を果たしている微小管の高次構造に影響を及ぼすため、細胞質の不均等な分裂や4倍体細胞の形成を惹起したものと思われる。

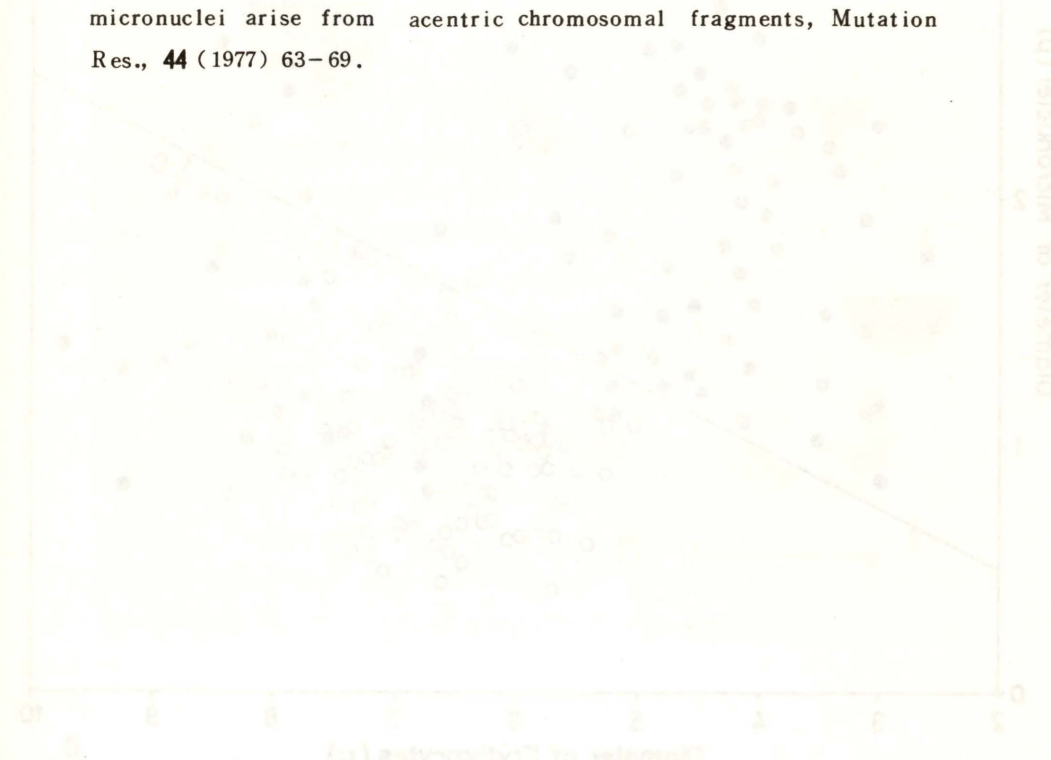
図1に示したように、VCR処理群では $d = D/4$ の直線より上に位置するMNE、すなわち小核の直径がそれを有する赤血球の直径の $\frac{1}{4}$ より大きいMNE、の頻度が高い(74%)のに対し、TEM群では低い(2%)。このような傾向が、他の染色体切断剤や紡錘体阻害剤についても認められるかどうかを確認するための実験結果を、TEMおよびVCRの結果とともに、表1に示した。

染色体切断剤(BUS, EMS, EX, MMC, ARACまたは6-MP)を投与した群では、 $d \geq D/4$ となるMNEの頻度はいずれも数パーセント以内と低かった。一方、紡錘体阻害剤(COL, COLCまたはANSA)を投与した群では、いずれも50%前後と高かった。したがって、 $d \geq D/4$ となるMNEの比率に基づいて、調査した染色体切断剤はすべてTEM typeとして、また紡錘体阻害剤はすべてVCR typeとして分類することができる。以上の結果は、小核の細胞質に対する相対的な大きさを調べることによって、小核誘発原の細胞における作用点を推定しうることを示している。

文 献

1. Schmid, W., The micronucleus test, *Mutation Res.*, **31** (1975) 9-15.
2. Higashide, E., M. Asai, K. Ootsu, S. Tanida, Y. Kozai, T. Hasegawa, T. Kishi, Y. Sugino and M. Yoneda, Ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumour properties from *Nocardia*, **270** (1977) 721-722.
3. Léonard, A. and E. D. Léonard, Cytogenetic effects of Myleran in vivo on bone-marrow cells from male mice, *Mutation Res.*, **56** (1978) 329-333.

4. Maier, P. and W. Schmid, Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test, *Mutation Res.*, **40** (1976) 325-338.
5. Matter, B. E. and J. Grauwiler, Micronuclei in mouse bone-marrow cells, A simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations, *Mutation Res.*, **23** (1974) 239-249.
6. Heddle, J. A. and A. V. Carrano, The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments, *Mutation Res.*, **44** (1977) 63-69.



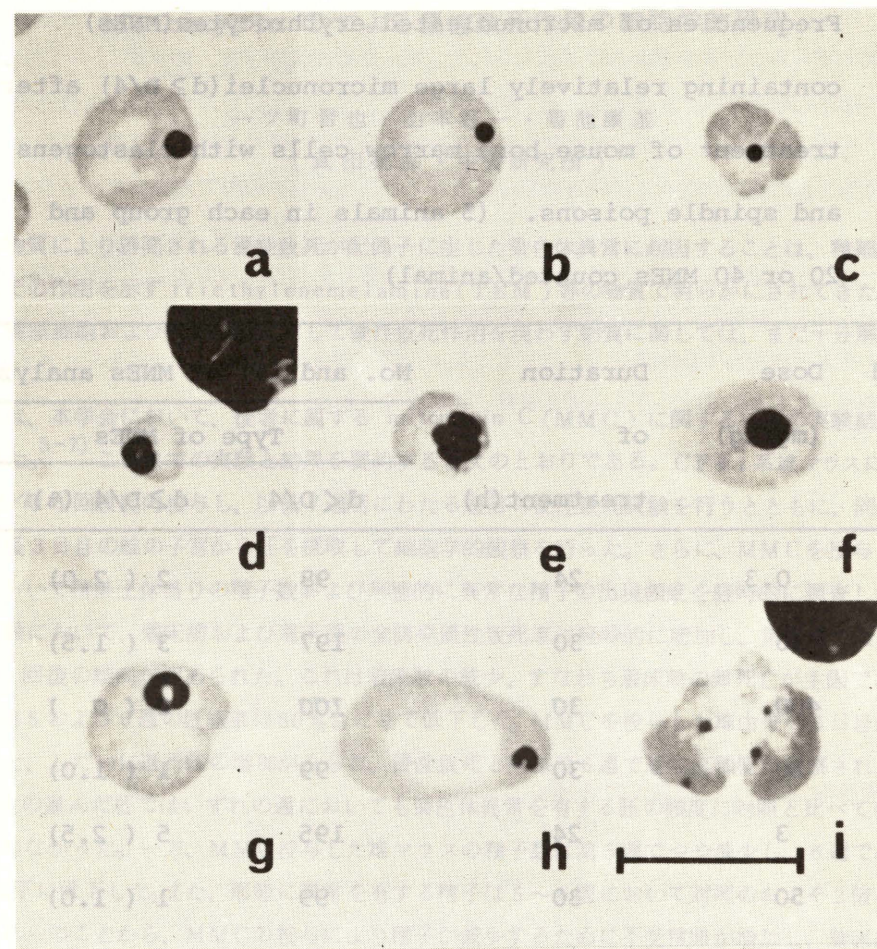
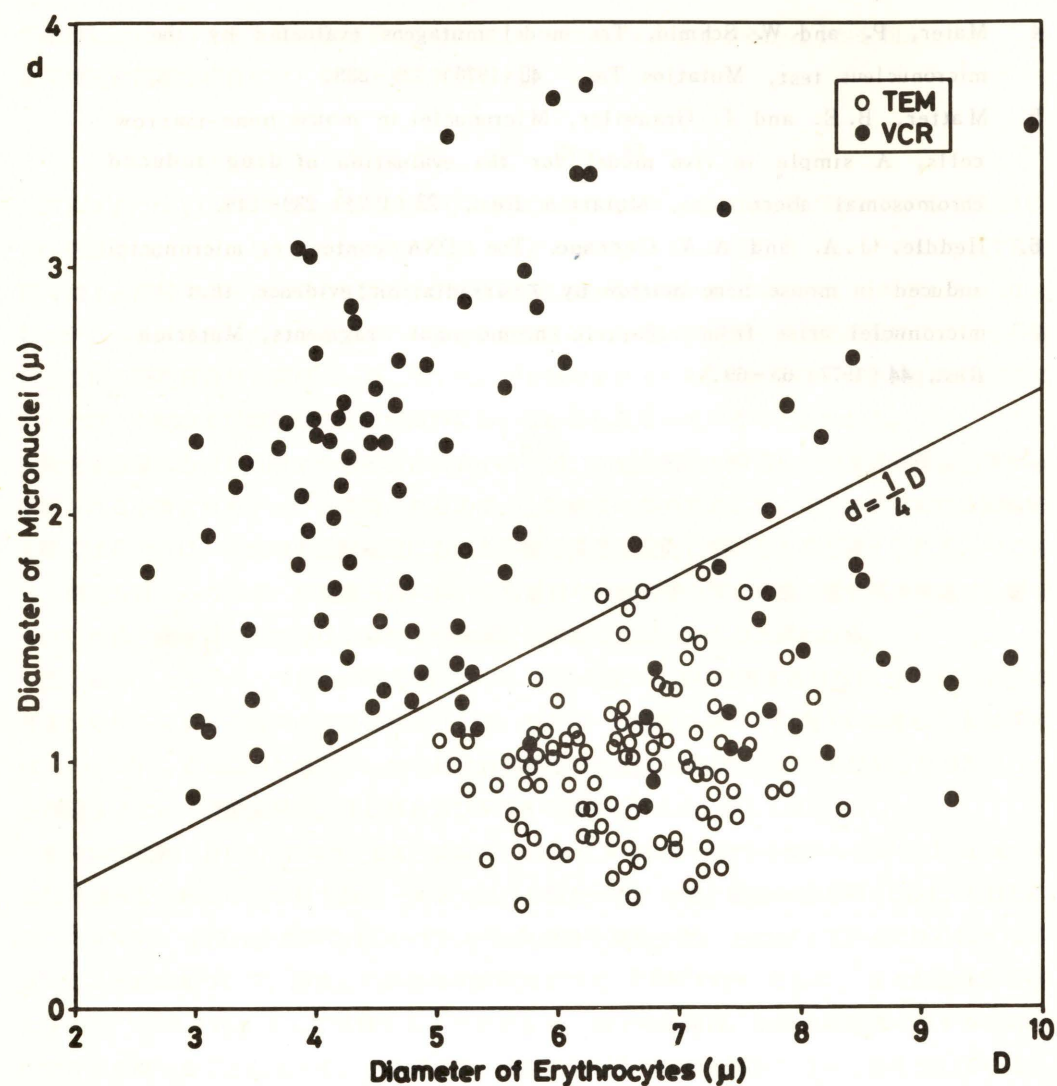


図 の 説 明

Fig. 1 A plot of the measured diameters of the micronucleus(d) and the cytoplasm(D) of each of 100 micronucleated erythrocytes (MNEs) treated with either TEM or VCR.

Fig. 2 Photomicrographs of bone-marrow micronucleated erythrocytes (MNEs) representative of TEM- and VCR-treated mice. a-c: from TEM-treated mice. d-i: from VCR-treated mice. The scale=10 μ.

Table I. Frequencies of micronucleated erythrocytes (MNEs) containing relatively large micronuclei ($d \geq D/4$) after treatment of mouse bone marrow cells with clastogens and spindle poisons. (5 animals in each group and 20 or 40 MNEs counted/animal)

Compound	Dose (mg/kg)	Duration of treatment (h)	No. and (%) of MNEs analyzed	
			Type of MNEs	
			$d < D/4$	$d \geq D/4$ (%)
TEM	0.3	24	98	2 (2.0)
BUS	30	30	197	3 (1.5)
EMS	400	30	100	0 (0)
EX	50	30	99	1 (1.0)
MMC	3	24	195	5 (2.5)
ARA C	50	30	99	1 (1.0)
6-MP	100	30	98	2 (2.0)
<hr/>				
VCR	0.125	24	26	74 (74.0)
COL	0.625	24	46	54 (54.0)
COLC	10	24	56	44 (44.0)
ANSA	0.33	24	47	53 (53.0)

Mitomycin C による優性致死作用の細胞学的研究

一ツ町晋也・山本好一・菊池康基

(武田薬品・中央研究所)

化学物質により誘発される優性致死が配偶子に生じた染色体異常に起因することは、精細胞および精子にその作用を示す triethylenemelamine (TEM) 等の物質で明らかにされてきた。¹⁻⁴⁾ しかし、精原細胞および精母細胞に対して優性致死作用を現わす物質に関しては、まだ十分解明されていない。

我々は、本学会において、後者に属する mitomycin C (MMC) に関する一連の実験結果を報告してきた。⁵⁻⁷⁾ これまでの実験と結果を要約すると次のとおりである。CF#1系雄マウスに MMC を 3 mg/Kg 1回腹腔内投与し、以後7週間にわたる通常の優性致死試験を行うとともに、同様の試験で交尾後3日目の雌の子宮から胚を採取して細胞学的観察を行った。さらに、MMCを投与した雄マウスにおいて精巢上体当りの精子数および形態的に異常な精子の出現頻度を経時的に調査した。優性致死試験において、着床前および着床後の全誘発優性致死率は経時的に増加し、第6週で最高値を示した後、回復の傾向が認められた。これは着床数の減少、すなわち着床前の卵死亡が主因であった。また、第5および6週の妊娠率は60%台にまで低下した。MMCを投与した雄由来の3日目胚についてみると、しだいに退行胚の増加がみられ、優性致死と同様第6週で最も高頻度に観察された。しかし、発生の進んだ胚ではいずれの週においても染色体異常を有する胚の頻度に対照と比べて有意な差はみられなかった。一方、MMC投与した雄マウスの精子数は第5週でやや減少し、6週では対照の50%以下に低下した。また、形態に異常を有する精子は5~6週において対照のおよそ2倍に増加した。これらのことから、MMCの投与により精子が減少するために不受精卵が増加し、着床前に消失してしまうことが示唆される。

そこで今回、実際に不受精卵が増加しているかどうかを調べるため、雄マウスにMMCを 3 mg/Kg 投与した優性致死試験において、交尾の確認された雌の卵管から排卵後12時間および24時間の胚を採取して受精の成否を確認した。また、MMCの生殖細胞に対する致死作用と染色体異常誘発作用との関連性をみるため、処理した雄マウスの精原細胞および第一次精母細胞で染色体を観察し、異常細胞の出現頻度を経時的に求めた。

排卵後12および24時間の胚において、不受精卵が第3週以降しだいに増加し、その出現頻度は第6週で最高値を示した。不受精卵の出現頻度の経時変化は12時間目胚でも24時間目胚でも差はなく、また3日目胚における退行率のそれときわめてよく一致し、さらに優性致死試験における着床前卵死亡率の変化ともほぼ一致した (Fig. 1)。このことから、MMCによって誘発される着床前卵死亡の原因は、不受精卵が3日後には変性して退行胚(卵)となり、着床することなく消失するためと考えられる。

Fig. 2 に生殖細胞における染色体観察の結果を示した。MMC 投与後 7 日目まで、精原細胞では染色体異常の増加および分裂頻度の低下がみられた。第一次精母細胞では、投与後 11～13 日目に染色体異常が高率に観察され、以後少くとも 1 週間分裂頻度が低下した。ところで、3 日目胚では MMC 投与後いずれの週においても染色体異常の顕著な増加は認められていないので、MMC により染色体異常を誘発された精原細胞および精母細胞のほとんどは精子形成の過程で死滅してしまうと考えられる。

以上、一連の実験結果から、MMC の雄マウスに対する優性致死作用の主因は、TEM のように配偶子に誘発された染色体異常が初期発生胚で顕在化すること起因するのではなく、MMC が生殖細胞に染色体異常を誘発して細胞死をもたらすことにより精子数を減少させることにあり、その結果不受精卵が増加するために不妊を含め着床前卵死亡が起こると結論される。

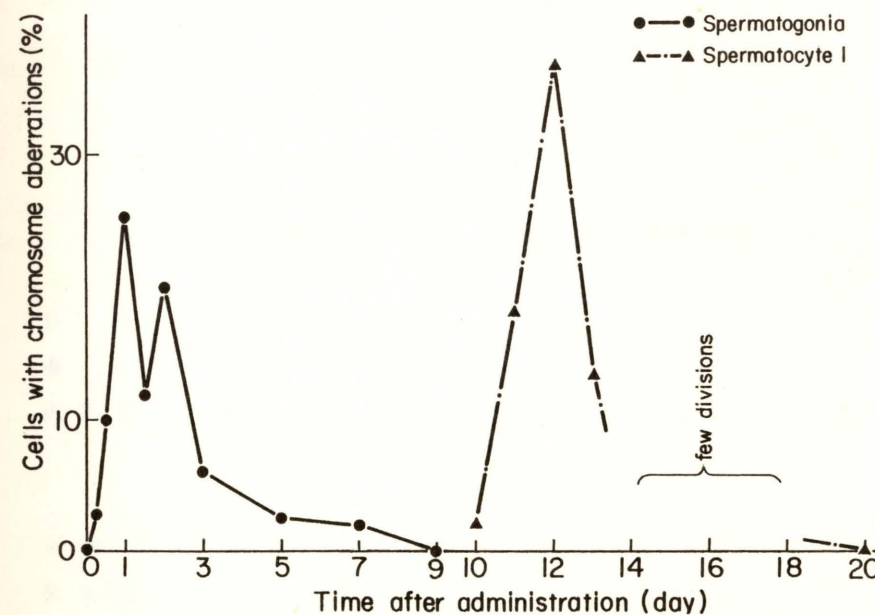
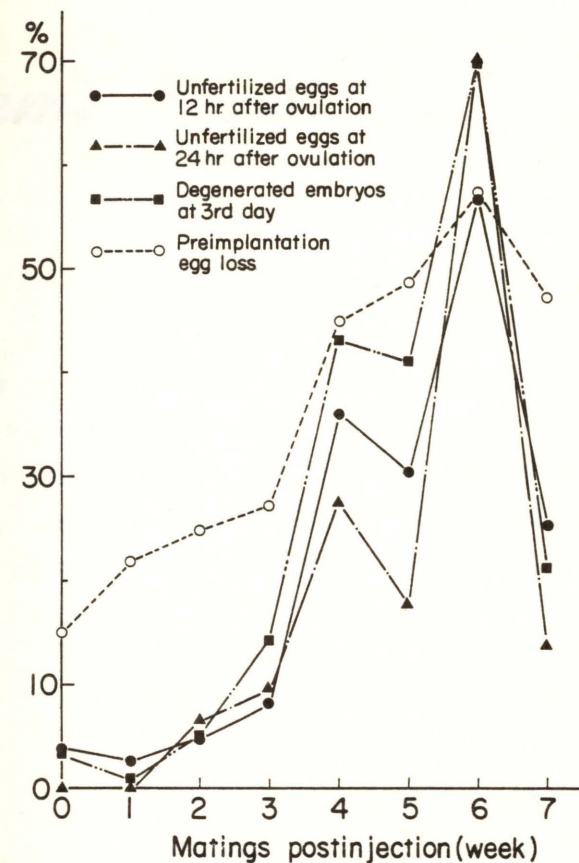
文 献

- 1) Brewen, J. G., et al. (1975) Mutation Res., 33, 239-250.
- 2) Matter, B. E. and I. Jaeger (1975) Mutation Res., 33, 251-260.
- 3) Hitotsumachi, S. and Y. Kikuchi (1977) Mutation Res., 42, 117-124.
- 4) Binkert, F. and W. Schmid (1977) Mutation Res., 46, 77-86.
- 5) 一ツ町晋也・菊池康基 (1975) 日本環境変異原学会第 4 回研究発表会, 京都.
- 6) 一ツ町晋也他 (1977) 日本環境変異原学会第 6 回研究発表会, 吹田.
- 7) 菊池康基他 (1978) 環境変異原研究, 1, 29-30.

Explanation of figures

Fig. 1. Frequencies of unfertilized eggs at 12 and 24 hours post-ovulation and those of embryos degenerated on day 3 of gestation as well as preimplantation egg loss after paternal treatment with MMC at 3 mg/Kg

Fig. 2. Time-dependent frequencies of spermatogonia and primary spermatocytes with chromosome aberrations in mice treated with MMC at 3 mg/Kg



日本環境変異原学会

先号は1979年9月25日に発行されましたが、本号は学会に改組されてから第4号目であり、研究会から通算して第14号目になります。

第8回研究会は去る昭和54年11月27日・28日の両日にわたり、箱根観光会館（箱根町湯本）で開催され、盛会に終了しました。その際の総会において、評議員の改選などが行われました。

本号は、経費節約のため、環境変異原研究（Vol 2 No 1）として、会員名簿と合本にしたため印刷・発行がくれたことをおわび致します。

日本環境変異原学会 第9回研究発表会予告

と き 昭和55年11月28日（金）、29日（土）
 と ころ 岡山県総合福祉会館（岡山市石関町2ノ1）
 連 絡 先 〒700 岡山市津島中 1-1-1
 岡山大学薬学部 早 津 彦 哉
 TEL (0862) 52-1111 内線 955

詳細は追って予告いたします。

日本環境変異原学会 第17回評議員会議事録

日 時 昭和54年11月26日（月） 18:30 ~ 20:00
 場 所 小田原市 レストラン プラザエイト
 出席者 石 館, 岩 原, 遠 藤, 賀 田, 河 内, 近 藤,
 菊 地, 黒 田, 佐 藤, 白 須, 杉 村, 土 川,
 田 島, 西 岡, 早 津, 松 島
 オブザーバー 渋谷
 欠 席 者 外 村, 菅 原

この評議員会における報告および協議了承事項は、翌日箱根観光会館で行われた総会において、そのまま報告提案され決定された。そこで重複をさけるため総会記事の記録を御参照されたい。

日本環境変異原学会 第8回 総会議事録

日 時 昭和54年11月28日(水) 13:00 ~ 13:40
場 所 箱 根 観 光 会 館

1) 今回の研究発表会の運営委員長である岩原繁雄氏を議長に選出した。

2) 以下の報告がなされた。

a) 会 長 報 告

杉村会長より以下の発言が行われた。

第8回研究発表会は盛会に進行中であり、喜ばしい。準備委員諸氏の労苦を謝す。

第3回国際環境変異原会議は、1981年(昭56年)9月21~26日にわたり、東京都および三島市で行われる予定である。また京都では、Satellite Meeting も行われる。本学会関係者を中心として準備を進めつつあるが、会員の御支援をお願いする。

b) 庶 務 報 告

賀田庶務幹事より以下の報告があった。

現時点での正会員は408 賛助会員数は4である。

新評議員の推せん選挙は、土川、天野両管理委員のもとに行われた。

日本環境変異原学会奨励賞の第1回選考は賞助成金等の推せん、選考委員によって行われ、長尾美奈子会員(国立がんセンター研究所)の行った「食品の変異原因因子に関する研究」に対し、授与されることになった。

c) 新評議員の推せん選挙に関し土川管理委員より投票者数は166名 投票率、45.7%で有効票717であったこと、その結果表1の16名が新評議員候補者として推せんされたとの報告があった。

d) 新評議員候補者の互選によって、杉村現会長を昭和55~56年度の会長に推せんすることとした。さらに杉村会長より

西 岡 一, 佐 藤 茂 秋, 早 津 彦 哉

の3会員を会長指名の評議員として推せんしたい、また会計監査として

滝 沢 行 雄, 梶 原 彊

の2会員を委嘱したい旨の発言がなされた。

e) 会 計 報 告

黒田会計幹事より

昭和53年度収支決算の報告がなされた(表2)

昭和54年度収支についての中間報告がなされた(表3)

昭和54年度 Mutation Res 誌について収支中間報告がなされた(表4)

3) 次の事項についての議事が行われ、以下のように決定された。

a) 報告事項で記載された選挙による推せん評議員(16名)および会長指名評議員(3名)計19名が新評議員として承認された。

b) 次期、昭和55~56年度の会長として現杉村会長の再任が承認された。

c) 次期の庶務幹事および会計幹事として、それぞれ現賀田幹事および黒田幹事の再任が了承された。

d) 次期の会計監査として滝沢行雄、梶原 彊 両氏が了承された。

e) 昭和53年度収支決算について表2の通り承認された。

f) 黒田会計幹事より、昭和55年度予算案(表5)の説明がなされ、これを承認した。

g) 次期の第9回研究発表会に、早津評議員のお世話で11月28日(金)、29日(土)の両日にわたり岡山で行われることが承認された。

表1 選挙によって推せんをうけた新評議員候補者

賀 田 恒 夫	杉 村 隆	田 島 弥太郎	近 藤 宗 平
松 島 泰次郎	石 館 基	岩 原 繁 雄	河 内 卓
黒 田 行 昭	土 川 清	白 須 泰 彦	菊 池 康 基
外 村 晶	長 尾 美奈子	田ノ岡 宏	武 部 啓

表2 昭和53年度収支決算報告(昭和53年末日)

日本環境変異原学会会計幹事 黒田 行 昭

収 入	
1. 昭和53年度会費(2,000円) 327人	653,000 ^円 (327人)
2. " 賛助会費(1口=2万円, 7口「3社」)	140,000 (7口)
3. " Mut. Res. 購読料	
(1) Env. Mut. (12,600円, Vol. 53-54)	1,020,000 (81人)
(2) Rev. Toxicol. Test. (6,300円, Vol. 55)	333,900 (53人)
(3) Genet. Toxicol. Test. (18,900円, Vol. 56-58)	831,600 (44人)
(4) Mut. Res. Complete. (104,247円, Vol. 49-58)	625,482 (6人)
4. 昭和54年度購読料一部前納金	312,390 (5人)
5. 昭和53年度 JEMS Royalty	109,581
6. 昭和52年度繰越金	169,742
7. 利 息	12,202 (3回分)
8. Chemical Mutagenesis 1972 @ ¥500	2,500 (5冊)
9. 名 簿 @ ¥500	1,500 (3冊)
合 計	4,213,497
支 出	
1. 昭和53年度 Mut. Res. 購読料	
(1) Env. Mut. (107Dfl)	1,014,642 ^円 (86人)
(2) Rev. Genet. Toxicol. (53.5 Dfl)	350,248 (59人)
(3) Genet. Toxicol. Test. (160.5 Dfl)	904,008 (51人)
(4) Mut. Res. Complete (891 Dfl)	592,538 (6人)
2. 昭和53年度本部納入金	31,514
3. 通 信 費(郵便代、手数料等)	234,805
4. 印 刷 費(ゼロックス代、タイプ代、印刷代)	155,300
5. 消耗品費(文具、封筒代)	45,186
6. 会 議 費(評議員会諸経費)	164,410
7. 予 備 費	0
8. 立 替 金(国際 EMS 準備委員会)	139,300
9. 購読料返金	62,478
合 計	3,691,429
差引残高(昭和54年度繰越金)	522,068

表3 昭和54年度収支中間報告(昭54.1.1~54.11.20現在)

収 入	予 算	
昭和53年度繰越金		522,068 ^円
昭和54年度学会費 @ 2,000 × 371人	600,000 ^円	742,000
昭和54年度賛助会費 @ 20,000 × 8口(4社)	120,000	160,000
昭和55年度学会費一部前納金 2人		4,500
昭和51,52年度学会費 @ 1,000 × 2人		2,000
昭和53年度学会費 @ 2,000 × 6人		12,000
研修基金(会長より寄付金)		150,000
利 息(2回分)		6,872
国際 EMS 準備委員会立替金返金		139,300
合 計		1,738,740
支 出	予 算	
通 信 費(郵便代、送金手数料等)	300,000 ^円	128,120 ^円
消耗品費(文具等)	70,000	12,522
印 刷 費(ゼロックス代、タイプ代、印刷代)	200,000	215,000
昭和54年度本部納付金(\$ 146,292人分)	40,000	32,500
遺伝子操作協議会醸金		50,000
昭和54年度 Mut. Res. 誌購読料前納金 預金通帳移行		187,434
" " 返金		62,478
会 議 費(評議員会諸経費)	150,000	91,750
合 計		779,804
差 引 残 高		958,936

表4 昭和54年度 Mut. Res. 誌収支中間報告
(S 54. 1. 11 ~ 54. 11. 20 現在)

収 入	
1. Mut. Res. 誌	
(1) Env. Mut. (Vol. 64) @ 6,300×86人	541,800 円
(2) Rev. Genet. Toxic. (Vol. 65) @ 6,300×48人	302,400
(3) Genet. Toxic. Test (Vol. 66~68) @ 18,900×51人	963,900
(4) Mut. Res. Complete (Vol. 59~68) @ 115,500×16人	1,848,000
2. 昭和54年度 JEMS Royalty (2,598 Dfl)	296,483
3. 利 息 (2回分)	4,979
合 計	3,957,562
支 出	
1. Mut. Res. 誌	
(1) Env. Mut. @ 57.5 Dfl×86人	517,459 円
(2) Rev. Genet. Toxic. @ 57.5 Dfl×48人	289,388
(3) Genet. Toxic. Test. @ 172.5 Dfl×51人	919,583
(4) Mut. Res. Complete. @ 1,051 Dfl×16人	1,756,554
2. 印刷費	22,800
3. 通信費 (郵便代, 送金手数料等)	36,650
4. 人件費 (1人分)	15,000
合 計	3,557,434
差 引 残 高	400,128

表5 昭和55年度 予 算

収 入

摘 要	予 算 (円)
1. 会 費 @ 2,000×400人	800,000
2. 賛助会費 @ 20,000×8口	160,000
合 計	960,000

支 出

摘 要	予 算 (円)
1. 昭和55年度本部納付金	40,000
2. 通信費 (郵便代, 手数料等)	300,000
3. 印刷費 (ゼロックス代, タイプ代, 印刷代)	300,000
4. 消耗品費 (文具, 封筒代)	70,000
5. 会議費 (評議員会諸経費)	150,000
6. その他 (予備費)	100,000
合 計	960,000

ICPEMC

(International Commission for Protection against Environmental
Mutagens and Carcinogens)

のニュース(№3)が送られてきましたので御紹介致します。

なお、関連事項については

Mutation Research 誌

Vol. 75 (1980) 203-204

" " (") 205-213

" " (") 215-241

を御参照下さい。

ICPEMC

INTERNATIONAL COMMISSION FOR PROTECTION AGAINST ENVIRONMENTAL MUTAGENS AND CARCINOGENS

ICPEMC NEWS Nr. 3

The International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC), founded in January 1977 (Sobels, 1979), has initiated in the past three years an international exercise to study the potentially hazardous effects in man of mutagenic and carcinogenic chemicals. In this way ICPEMC has responded to the widely recognized need to develop a scientific basis for the preparation of regulatory guidelines and of initiating new research and approaches in the field of genetic toxicology.

The most pressing requirement is to apply scientific expertise to the interpretation and validation of short-term screening tests to detect the genotoxic activities of chemicals.

ICPEMC has adopted a structured approach to study the scientific background of major problems in genetic toxicology by establishing five Committees. Each of these Committees has been allocated the task of evaluating particular parts of the overall mission. In September 1979 all Committees met together for the first time at "Chateau de Ripaille", Thonon, France, in order to exchange ideas about the problems involved and to develop programme strategies.

Committee 1 of ICPEMC (chairman: B.J. Kilbey, Edinburgh) is in charge of the validation and comparison of short term screening systems for the identification of possible genotoxic activity of chemicals. During the first year of the work, the Committee has chosen several specific tests for detailed consideration. These were whole mammal tests, sperm abnor-

malinity tests, *Drosophila* sex-linked-lethal test, *in vivo* and *in vitro* cytogenetics, mutation in mammalian cell lines, yeast mitotic gene conversion and recombination tests, and bacterial mutation and repair tests. The available data in literature are clearly far from complete, but as a result of the discussions a clearer view of the value of these test systems and of their shortcomings also was obtained. Committee 1 is preparing a number of workingpapers and position papers on the subject of those tests for which evaluations are nearing completion. An important, but in general neglected area of mutagenic screening tests, is the test for "induction of aneuploidy". There are tests available both for meiotic and mitotic misdistribution of chromosomes in fungi. Moreover, meiotic induction of aneuploidy can be scored in mammals and *Drosophila*. At present, however, these tests have not been validated and Committee 1 is intending to undertake a review of tests for the induction of aneuploidy, and, possibly, make suggestions for new research.

Committee 1 also discussed a proposal to eliminate cytogenetic tests from preliminary mutagen screening tests. The suggestion is based on the findings in *Drosophila* that far higher doses are needed to induce chromosomal lesions with chemicals than sex-linked-lethals. However, while the Committee members accept this result for *Drosophila*, they have reservations in extrapolating from such a limited database to organisms in general. They would, therefore, prefer not to eliminate tests for chromosomal damage from preliminary screens at this time.

Committee 2 of ICPEMC (chairman: D.B. Clayson, Omaha) is in charge of evaluating the relation between mutagenic and carcinogenic activity of compounds. This relation is of importance in assessing the utility and accuracy of certain rapid screening tests for the detection of carcinogens. These tests include microbial, mammalian cell and insect mutation, cell transformation, inhibition of DNA synthesis, stimulation of DNA repair, DNA adduct formation and many others.

It is noted that these systems, which recognize genotoxic agents, are dependent on the presence of adequate enzyme systems and co-factors to convert pro-carcinogens and pro-mutagens to their active forms. Committee 2 also noted that some agents may considerably enhance cancer incidence without demonstrating overt genotoxic effects. The Committee is aware that the magnitude of scientific effort expended on each system varies, the greatest effort having been in the microbial mutagenesis area. Also there are a number of important validation experiments in progress which will demonstrate the reproducibility of these test systems in different laboratories and their utility in predicting carcinogens. Pending the outcome of these studies Committee 2 is of the opinion that information from rapid screening tests for carcinogens be interpreted cautiously as a possible indication that agents may be carcinogens. It recommends that the results of such tests should not, by themselves, be regarded as adequate for the regulation of an agent as a carcinogen, nor that an agent is unlikely to enhance the yield of cancers in the whole animal. Short-term tests are, however, useful warning signals. For every agent the weight of all relevant data should be assessed by experts in all relevant fields.

Two working papers of Committee 2 have already appeared in the literature. The first paper by D.B. Clayson is entitled: "Differences between *in vivo* and *in vitro* (1980)"; the second working paper of Committee 2: "Metabolic differences *in vitro* and *in vivo*" is written by A.S. Wright (1980).

Efforts are undertaken on a national and international basis to compile data and to develop methods for detecting and evaluating the mutagenic/carcinogenic risk of chemicals. ICPEMC has recognized that it will be important to evaluate different regulatory approaches in order to compare the rationales and backgrounds behind them.

Committee 3 of ICPEMC (chairmen: E. Poulsen, Copenhagen and A. Kolbye, Washington DC) is compiling, reviewing and interpreting existing national and international regulations and legislation. Since cooperative international regulation of chemical exposure is required if carcinogenic and mutagenic risks to man are to be minimized, Committee 3 also would like to develop recommendations for the harmonization of control procedures. An inventory of existing legislation revealed considerable diversity with multiple schemes, both nationally and internationally, based most often on the use and exposure patterns of chemical classes: pharmaceuticals, cosmetics, food and feed additives, agricultural, industrial, or household chemicals. In many cases specific requirements for testing of chemicals existed in the absence of substantive legislation regarding control measures based on the outcome of such testing. With regard to occupational exposure, legislation concerning monetary compensation was more common than legislation for the primary prevention of cancer at work. National legislation controlling manufacturing practices, applicable internationally, did not uniformly cover export and import of regulated chemicals, opening the door to either "dumping" or illicit manufacturing elsewhere.

Committee 3 generally endorsed testing schemes in which data would be generated in a step-wise manner, with provision for the application of administrative or legal judgement at various stages in the progressive elucidation of the effects of a chemical. Selection of particular test procedures should be based on sound scientific principles, including sensitivity, specificity and predictive value with respect of clinical endpoints; the range of endpoints covered by the total testing system and the reproducibility of results within and between laboratories.

Committee 3 recommended that control measures with respect to chemical exposure should be designed to achieve the optimum risk-benefit balance. National priorities, such as combatting nutritional and commu-

nicable diseases may, in some cases, justify use of a potentially carcinogenic pesticide or drug. More generally, benefits to be considered might include therapeutic properties, a unique biological activity in food production, or an indispensable role in an industrial process. Consequences of control measures could include loss of consumer benefits (health, cost, convenience, or aesthetic); and losses due to required technological changes or displacement of labour. Against these must be placed the need to protect the public, or significant segments thereof, against avoidable, substantial risk of cancer or genetic disease. Comprehensive risk-benefit analysis would facilitate selection of the place, time and stringency of regulatory intervention.

Committee 3 gave special consideration to the problem of responding to positive results in limited (even single) short-term test system. Generally, more extensive testing would be required before any control measure could be justified. As for any other outcome of testing, such results could only be interpreted after review of the overall implications of all available information regarding usage and human exposure; risks and benefits of control measures; physical, chemical and toxicological profile, and any epidemiological data. However, if a compound with mutagenic properties has no perceived societal benefits, exposure should be minimized. On the other hand, provisional approval might be granted, subject to revision on the basis of new evidence, in the case of societally useful chemicals with only limited exposure and low potency.

In the case of a clearly established carcinogen, regulatory authorities must choose between prohibition, and control measures of varying stringency. The committee again recommended analysis of the risks and benefits associated with each regulatory alternative. Consideration should be given to the availability of a non-carcinogenic substitute and to the

feasibility of achieving zero exposure. Control measures might include restrictions on manufacture and handling, limitations on sales, setting of residue limits or action levels, establishment of exposure maxima, use of protective clothing and equipment, requirement for packaging and labelling, and many others, depending upon the particular context.

It was recognized that regulation of chemical exposure requires many difficult value judgements in which science, the law, and moral philosophy become intertwined. What constitutes "acceptable risk"? In some cases the decision may be clear, but in others wide consultation may be required. Specific segments of society may not agree on the relative importance of risks and benefits.

Committee 3 concluded that international harmonization of methods for both assessing risks and reacting to them would assist in removing value judgements from the emotional milieu of particular conflicts and promote their scientific resolution. Committee 3 of ICPEMC will continue to foster such harmonization, through review and analysis of the nature, rationale and implications of existing and proposed legislation.

The ultimate goal of all scientific evaluations in this field, however, will be the extrapolation from test data with chemicals to risk estimates in man.

ICPEMC recognizes that for the understanding of gene preservation and genetic load in man epidemiological approaches are of vital importance. Present information about the frequency of genetic diseases is of limited use in this context and relevant epidemiological data are rare. Scientifically, the preparation of statements on epidemiological approaches and tactics seems to be necessary in order to clarify both the potential and the limitations of epidemiological methods in the study of environmental mutagenesis.

The study of epidemiological approaches in ICPEMC is undertaken by Committee 5 (chairman: J.R. Miller, Vancouver), which started working only in September 1979. The Committee will collect and evaluate existing data on the incidence and prevalence of genetically determined diseases. The Committee also intends to evaluate the potential of new techniques for the study of mutations in somatic cells in population surveys. It also is intending to study data on chromosome aberrations in man. These data fall into three categories: (i) the prevalence of errors among newborns, which reflects germinal damage, (ii) the frequency of errors among abortuses and (iii) the frequency of errors observed in somatic cells of individuals exposed to mutagens and carcinogens. In addition, the Committee intends to examine the potential of abortuses from spontaneous termination and of studies of germ cells and sperm morphology in the development of monitoring systems for mutagens. The Committee is well aware of the fact that there is a great deal of available epidemiological data on populations exposed to proven or suspected mutagens. However, it is the opinion of the Committee members that much of this information is of limited use. It is hoped that the critical examination of the available studies, will lead to a better appreciation of what constitutes appropriate epidemiological studies in this field.

Quantitative estimation of mutagenic risk of chemicals to man is at the moment not feasible. Several factors and problems hamper a scientifically acceptable estimate of the hazard associated with genotoxic chemicals. Among these are: (i) the estimation of the genetically significant dose, which is defined as the weighted average gonadal dose, (ii) the possibility that ageing causes an increased sensitivity to mutagens, (iii) the likelihood that individuals vary in the response of germ cells to mutagens and (iv) the amount to which man can withstand

the detrimental effects of mutagens, bearing in mind that during evolution all organisms have been constantly exposed to "natural" mutagens.

ICPEMC has founded Committee 4 (chairperson: M. Lyon, Harwell) to study in detail all problems relating to risk estimate of genotoxic chemicals. This Committee already has prepared nine interim working papers, which were discussed for the first time at the combined Committee 1-5 meeting in Thonon, France, September 1979.

Two major themes running through the discussions concerned the meaning of dose and the form of dose-response curves. Unlike radiations for which there is a linear relation between exposure and absorbed dose, for chemicals the relation may be non-linear for many reasons, including processes of uptake, excretion, transport and metabolic conversion of the agent both in target cells and elsewhere. The absorbed dose of interest is that occurring at the chromosomes of germ cells. The Genetically Significant Dose (GSD) is this dose weighted according to reproductive expectation. Ideally some form of chemical dosimetry might provide information of GSD, but at present we know of no practical methods for this in human populations. There are however a variety of biological measures that may detect gonadal exposures in man, including rates of abortion and of congenital abnormalities, frequency of abnormal sperm, and the technique of using hamster eggs to reveal the chromosomal constitution of human sperm. Measurement of chromosome damage in somatic cells may also provide a useful indicator of possible genetic hazard.

Use of data from somatic cells involves extrapolation from one cell type to another, and in many estimates of genetic risk it may also be necessary to extrapolate from one species to another. The study of structure-activity relationships may be valuable in extrapolating from one chemical to another, particularly in deciding which compounds to test. The Committee recommends the study of computer predictions.

Specific aspects of risk estimation discussed included variation in sensitivity of germ cell stages, and mutational spectra. The variation in sensitivity to mutagens of mammalian germ cells at different stages of development can be very large, so that all stages must be considered in risk estimates. At present the reasons for these differences in sensitivity are unknown. There is some light evidence that germ cells of aged animals may be more sensitive, but further work is needed.

The spectra of genetic changes produced by different agents are variable. In particular, the effect on quantitatively inherited traits varies from agent to agent. The Committee proposes to study this question further.

Committee 4 considered the way in which genetic risks of radiation have been estimated, in spite of the inadequacy of the data on several points. For chemicals it seems likely that it will in most cases be necessary to make estimates on the basis of even more inadequate data.

For the future, the Committee proposes to prepare further papers on various subjects discussed here, including biotransformation in germ cells, mutational spectra, extrapolation, definition and measurement of genetically significant dose, and estimation of cases of genetic disease in man.

The Committee reaffirmed its view that estimation of carcinogenic risk was outside its term of reference.

Apart from a general evaluation of risk estimate procedures the need was recognized to investigate the possibility of whether a tolerance limit to chemical mutagens can be formulated. Task group 4 of the ICPEMC Commission is studying this problem under the chairmanship of A. Hollaender, Washington. The first explorative effort of this group is concerned with defining the concept of Mutagen Load (i.e. the amount of unavoidable exposure to various mutagens in analogy to exposure to background radiation).

REFERENCES

Bridges, B.A., N.P. Bochkov and J.D. Jansen (1979), Genetic monitoring of human populations accidentally exposed to a suspected mutagenic chemical (ICPEMC Publication no. 1), *Mutation Res.*, 64, 57-60; *Biologisches Zbl.*, 98, 117-120.

Bridges, B.A., J. Clemmesen and T. Sugimura (1979), Cigarette smoking - does it carry a genetic risk? (ICPEMC Publication no. 3), *Mutation Res.*, 65, 71-81; *Biologisches Zbl.*, 98, 333-343.

Clayson, D.B. (1980), Differences between *in vivo* and *in vitro* systems (ICPEMC working paper 2/1), *Mutation Res.*, 75, 205-213.

Jansen, J.D., J. Clemmesen and K. Sundaram (1980), Isoniazid - an attempt at retrospective prediction (ICPEMC Publication no. 4), *Mutation Res.*, in press; *Biologisches Zbl.*, in press.

Sobels, F.H. (1979), ICPEMC News no. 2, *Mutation Res.*, 64, 357-361; *Biologisches Zbl.*, 98, 597-601.

Wright, A.S. (1980), Metabolic differences *in vitro* and *in vivo* (ICPEMC working paper 2/2), *Mutation Res.*, 75, 215-241.

Attempts to define this principle are at present being undertaken for the following agents: nitrosamines, mycotoxins, flavonoids, chlorinated hydrocarbons and benz(a)pyrene.

In addition to the activities outlined above the Commission is engaged in responding to various other urgent problems in the field of environmental mutagenesis. For this purpose task group 1 and 3 were established. The first concern of Task Group 1 (chairman: B.A. Bridges, Sussex) is chemicals for which significant human exposure may have genetic or carcinogenic effects.

The task groups are charged to address a number of pertinent questions in genetic toxicology, such as: (i) what is the genetic risk resulting from "smoking"? (Bridges, Clemmesen and Sugimura, 1979), (ii) how should animal data be used for risk assessment in humans? (Jansen et al., in press), and (iii) what can we learn from accidental exposure from humans to mutagens? (Bridges, Bochkov and Jansen, 1979).

ICPEMC will continue its work through 1980 in finalizing the reports of Committee 1-4 and new reports of task groups 1 and 4. A major part of these reports will be discussed at the second combined Committee 1-5 meeting in Thonon in May 1981 and the Commission meeting in Lausanne in October 1981.

The activities of ICPEMC are sponsored by Institut de la Vie (director-general: M. Marois). Part of the work of Committee 1 is sponsored by EEC grant no.: 532-79-3 ECIN (NGO).

"Verte Rive", February 1980.

ICPEMC Doc.: 17-1980-N3.

日本環境変異学会誌

—— 編集後記 ——

環境変異原研究の第1巻第1号が大阪大学の近藤教授によって編集発行されて以来、本号が出るまで大分手間だったことをお許し下さい。

最近会員の増大が著しく、名簿の整備が必要となったので、費用の面もあって、これをくりこんだ次第です。本誌を定期的に発刊するためには何よりも予算的な裏付けが必要です。

編集に協力された、原雅子氏に感謝します。

目 次

日本環境変異原研究 第2巻 第1号 1980年

日本環境変異原学会奨励賞受賞に際して ----- 長尾 美奈子 1

環境変異原研究当面の課題 ----- 田島 弥太郎 2

報 文

大腸菌の repair 機能変異体でみられる各種変異原に
対する感受性の差異 ----- 坂本 豊, 山本 清, 菊池 康基 10

小核試験に関する検討 (2) 染色体切断剤と紡錘体阻害剤で
誘発された小核の大きさについて ----- 山本 好一, 一ツ町 晋也, 菊池 康基 13

Mitomycin C による優生致死作用の
細胞学的研究 ----- 一ツ町 晋也, 山本 好一, 菊池 康基 19

Jems News No. 14 : 日本環境変異原学会ニュース

(International Commission for Protection against
Environmental Mutagens and Carcinogens) News No. 3 ----- 30

日本環境変異学会・会員名簿 (昭和55年8月10日現在) ----- 42

日本環境変異原学会会則 ----- 58

昭和55年8月10日 印刷

昭和55年8月15日 発行

発行者 日本環境変異学会

編集責任者 賀 田 恒 夫
国立遺伝学研究所変異遺伝部
〒411 静岡県三島市谷田1,111
TEL 0559-75-0771

印刷所 石 川 印 刷

〒411 三島市栄町4-27

TEL 0559-75-1960