

# 環境変異原研究

**Environmental  
Mutagen  
Research**

**Vol.20 No.1 1998**



トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に！

## DNAシーケンシング受託サービス

株アイシン・コスモス研究所では、お客様の研究をサポートするためにDNAシーケンシングの受託サービス業務を行っております。

### ◆Single Primer Extensionによるシーケンシング

基本料金：400ベースまで	¥12,000/run
401ベース以上460ベースまで	¥36/base
461ベース以上550ベースまで	¥42/base
551ベース以上600ベースまで	¥48/base

サンプル数に応じて割引致します！  
(サンプルの本数や状態に応じて別途お見積り致します。)

### ◆変異解析のためのgpt遺伝子(全長456bp)のシーケンシングの場合に限り累計注文数に応じ、価格をディスカウント!!

《累計注文数》 1run～50runまで	定価 ¥14,000	25% off	→	¥10,500/run
51run～100runまで	定価 ¥14,000	30% off	→	¥9,800/run
101run～	定価 ¥14,000	35% off	→	¥9,100/run

### ◆変異解析のためのc//遺伝子(全長300bp)のシーケンシングの場合

1runからでも **¥7,200/run** 40% off

突然変異部位の解析も別途料金にて承ります！

サンプルは、菌体(コロニー)・精製DNA・PCR産物、どの状態でも結構ですが、精製DNAおよびPCR産物の場合は、電気泳動のデータの添付をお願いいたします。

また、プライマーが特殊な場合は別途料金を申し受けることがあります。

その他、cDNAクローンなどのFull lengthシーケンシングも承っておりますので、お気軽にご相談下さい。



蛍光検出の未来を拓く

株式会社アイシン・コスモス研究所

東京：〒101-0021 東京都千代田区外神田5丁目2番11号

本社：〒448-865 愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地

<http://www.ai-c.co.jp>

TEL.03(3837)4856 FAX.03(3832)7716

(電子メール：acgt@bio.ai-c.co.jp)

## 魚類の小核試験を用いる沿岸水域の汚染モニタリング

谷所 達幸<sup>1</sup>, 八木 利仁<sup>1</sup>, 岩崎 浩一<sup>1</sup>, 下位 香代子<sup>1</sup>  
木苗 直秀<sup>1</sup>, 林 真<sup>2</sup>, 祖父尼 俊雄<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科 〒422-8526 静岡市谷田 52-1

<sup>2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 〒158-0098 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

### Monitoring of coastal water contaminated with mutagens and/or carcinogens using micronucleus test in fish

Tatsuyuki Tanisho<sup>1</sup>, Toshihito Yagi<sup>1</sup>, Koichi Iwasaki<sup>1</sup>, Kayoko Shimoi<sup>1</sup>  
Naohide Kinae<sup>1</sup>, Makoto Hayashi<sup>2</sup>, Toshio Sofuni<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka  
52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan

<sup>2</sup> Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-0098, Japan

### Summary

Qualities of environmental water are generally evaluated by physico-chemical data such as pH, chemical oxygen demand (COD), biochemical oxygen demand and total organic carbons. Although these values show the quantities of organic and/or inorganic compounds, they do not indicate the real adverse effects on aquatic organisms.

In this work, we examined seasonal changes in coastal water quality by using the micronucleus test in marine fish as well as mutagenic assays and COD analysis of water samples. The frequency of micronuclei in peripheral erythrocytes and gills of several kinds of fish increased in summer, especially in hiiragi (*Leiognathus nuchalis*). However the micronuclei frequency showed no correlation with the mutagenic activity of coastal water or with their COD data. Therefore, the micronucleus test in aquatic organisms may be a useful tool for the evaluation of coastal waters contaminated with genotoxic compounds.

**Keywords:** micronucleus test, Ames test, COD, marine fish, mutagen

### 緒言

従来、河川、湖沼、沿岸など水環境においては化学物質による汚染をモニタリングする方法として主に理化学分析と個別分析が用いられている。近年、それら化学物質の中に変異原物質や発がん物質が存在することが明ら

かとなったことから、河川や沿岸より採水し、溶媒抽出法や多孔性樹脂を用いて有機化合物を分離、濃縮した後、細菌や酵母を用いる変異原性試験が組み入れられるようになった(木苗, 1993)。水質の評価に理化学的、生物学的試験が繁用されるに至ったが、その水域に棲息する魚類を用いて直接細胞遺伝学的に検討した報告は少ない。そこで、著者らは水棲生物を用いて化学物質による水質汚染を把握する目的で、沿岸魚類を捕獲し、末梢血と鰓を用いて小核試験を行い、海水の理化学分析および変異原性試験の結果と比較することを試みた(祖父尼ら、

受付：1997年9月9日

受理：1997年12月1日

©日本環境変異原学会



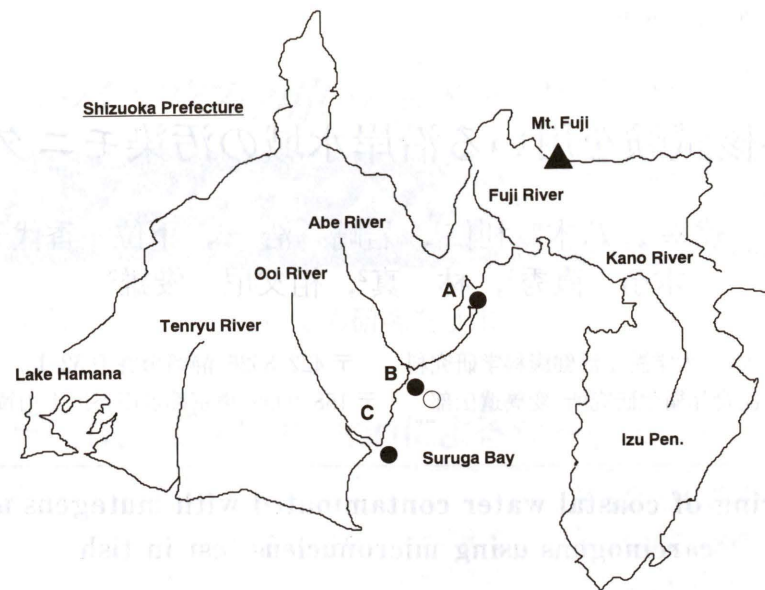


Fig. 1 Sampling points of coastal water and fish  
A : Shimizu harbor B : Mochimune harbor (● seashore, ○ offshore)  
C : Ooigawa harbor

1994).

化学物質が染色体に異常を誘発するか否かを調べる方法はすでにいくつか知られている。主なものは染色体を直接観察する染色体異常試験(石館ら, 1991)と、染色体異常に起因して出現する小核を観察する小核試験(MacGregor et al., 1980; 林 真, 1996)がある。魚類の染色体は哺乳動物と比べて小さく、また染色体数がフナやコイのように100本以上のものもあり、染色体異常を観察することは容易ではない。しかし、小核試験を適用すると、野外および実験室で染色体の大きさや数に関わりなく染色体異常を間接的に知ることができ、いずれの魚類も実験材料とすることができる利点がある(Ueda et al., 1992)。

本研究において魚類を実験材料とし、実験室内では金魚を用いて温度の影響等の基礎的試験を行い、自然界では棲息魚類を用いて小核誘発頻度の年内変動を検討した。1994~1996年にかけて静岡県太平洋側に位置する用宗港、清水港、大井川港を海水および魚類(ヒイラギ、ウグイ、カマスなど40魚種)の採取地点とした。用宗港については、1995~1996年にかけて毎月試料を採取し、理化学試験とともにヒイラギの末梢血と鰓における小核試験を行った。

## 実験材料および方法

### 1. 試料採取地点

静岡県の清水港(A地点: 1万5000~3万トン級の船舶が停泊, 海域B), 用宗港(B地点: 5~500トン級の小型船舶が停泊, 海域B)および大井川港(C地点: 5,000~15万トン級の船舶が停泊, 海域B)の3地点を試

料の採取地点とした(Fig. 1)。

各地点より理化学試験用(500 ml)および変異原性試験用(20 l)の海水を採取し、同時に同地点に棲息する魚類を、主として釣りにより捕獲した。試料の採取は1993年6月, 9月, 10月, 1994年4月~12月, 1995年5月~1996年4月, いずれも晴天の日に行った。また、対照として用宗港の沖合2 km 地点(海域A)を選び1995年11月に魚類を捕獲した。なお、Fig. 2, Fig. 3, Fig. 5でデータが示されていない月は海水あるいは魚類のサンプリングを行わなかった。

### 2. 海水の理化学試験

海水の理化学試験は衛生試験法(澤村良二ら, 日本薬学会編, 1990)に準じて行った。

1) pH: pHメーター(Hitachi-Horiba M-7)を用いて、25°Cで測定した。

2) 化学的酸素要求量(chemical oxygen demand, COD): アルカリ性過マンガン酸カリウム法により測定した。なお、CODについて、海域Aは2 mg/l以下、海域Bは3 mg/l以下が基準値となっている。

### 3. 魚類の小核試験

1) 末梢血を用いた小核試験

26 Gの注射針を用いて捕獲した魚類の尾部静脈より末梢血を採取した。末梢血10  $\mu$ lにFBS(fetal bovine serum, 牛胎児血清: GIBCO)40  $\mu$ lを加えて希釈した。アクリジンオレンジ・メタノール溶液(1 mg/ml)15  $\mu$ lを均一に塗布したスライドグラス(MATUNAMI, 70×26 mm)上に先の希釈液9  $\mu$ lを乗せ、カバーグラスをかけて標本作製した。各検体について標本を2枚ずつ作製した。2時間以上放置後、2日以内に蛍光顕微鏡(オ

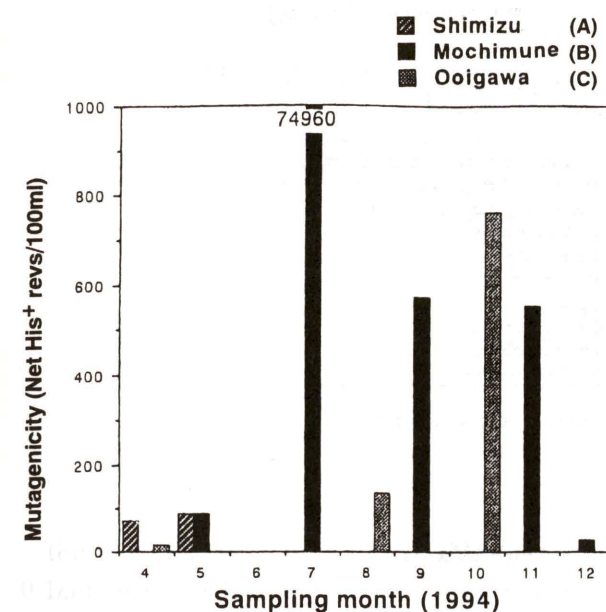


Fig. 2 Mutagenic activity of coastal water  
Toward *S. typhimurium* TA 100 (-S 9 mix)  
Each ether extract was submitted to the Ames test using  
*S. typhimurium* TA 100 in the absence of S 9 mix.

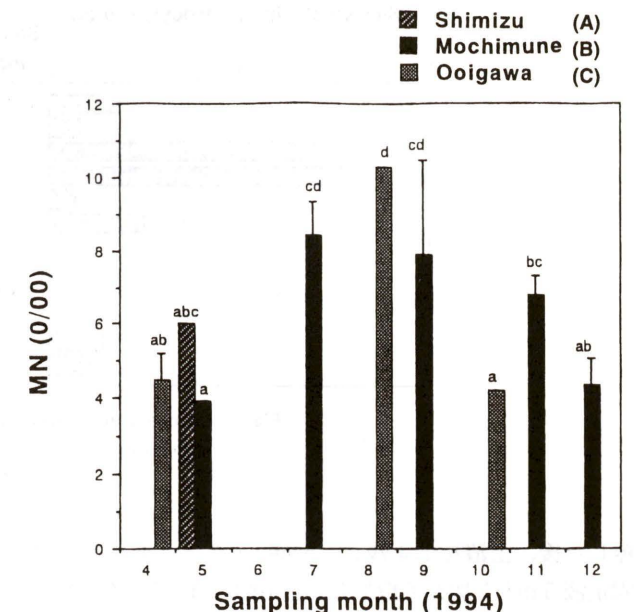


Fig. 3 Seasonal change of micronucleus frequency in gills of Hiiragi

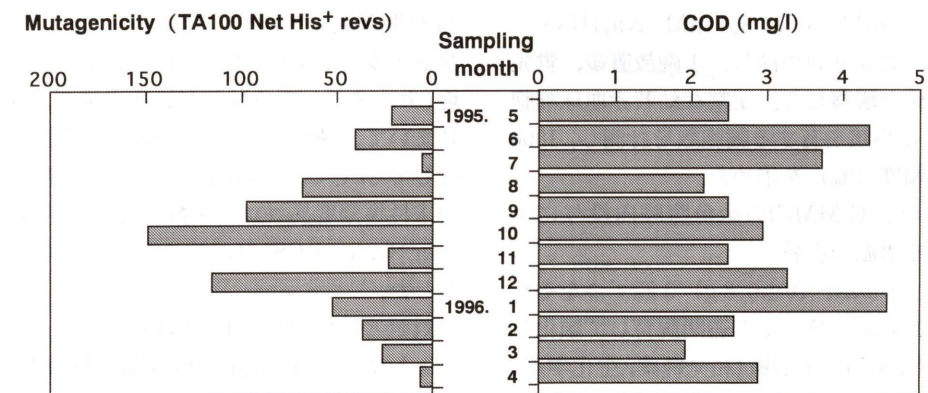


Fig. 4 Mutagenic activity and COD values of coastal water (Mochimune)  
COD value of water sample was examined by alkaline  $\text{KMnO}_4$  method.  
Ether extract of water sample was submitted to the Ames test using  
*S. typhimurium* TA 100 in the absence of S 9 mix.

リンパス製 AH 2-FL)を用いて励起波長490 nm, 蛍光波長515 nmで鏡検(×1000)した。標本1枚当たり、正常な幼若赤血球細胞に含まれる小核(主核から明らかに分離しているもの)を有する細胞数を2000個計測し、1000個当たりの小核誘発頻度(%)を求めた。

なお沿岸および沖合いで捕獲し、小核試験に用いた魚種はウルメイワシ(*Etrumeus micropus*), ウグイ(*Tribolodon hakonensis*), マルタ(*Tribolodon taczanowskii*), カマス(*Sphyræna schlegelii*), アジ(*Trachurus japonicus*), カイワリ(*Caranx equula*), ヒイラギ(*Leiognathus nuchalis*), スズキ(*Lateolabrax japonicus*), キジハタ(*Epinephelus akara*), サクラダイ(*Sacura margaritacea*), コトヒキ(*Therapon jarbua*),

メジナ(*Girella punctata* Gray), イシダイ(*Oplegnathus fasciatus*), タカノハダイ(*Goniistius zonatus*), スズメダイ(*Chromis notatus*), ササノハベラ(*Pseudolabrus japonicus*), カサゴ(*Sebastiscus marmoratus*), マツバゴチ(*Rogadius asper*), カワハギ(*Stephanolepis cirrhifer*)である。

2) 鰓を用いた小核試験

1)で用いた各魚類より鰓を3枚採取し、0.1%トリプシン平衡塩類溶液(0.26 M NaCl; 5.4 mM KCl; 4.8 mM  $\text{NaHCO}_3$ )5 ml 中に入れ2分間静置した。次いでピンセットを用いて2分間鰓をほぐし、1000 rpmで5分間遠心分離した。上清を捨て、75 mM KCl 5 mlを加えて攪拌した後、2分間静置した。1000 rpmで5分間遠心分



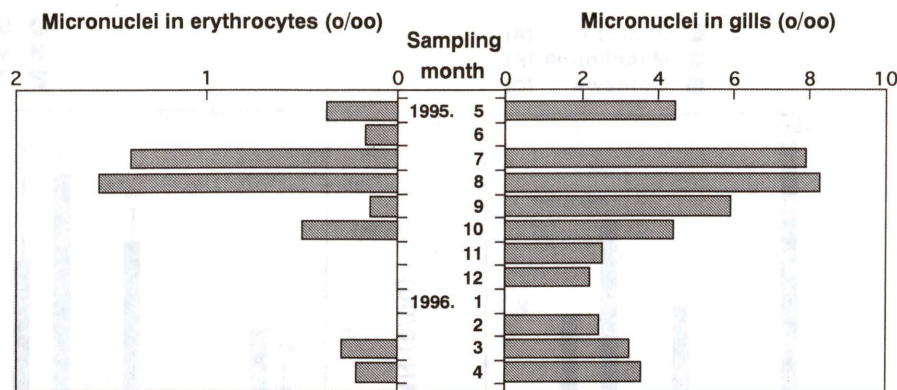


Fig. 5 Change of micronucleus frequencies in peripheral blood erythrocytes and gills of Hiiragi (*Leiognathus nuchalis*)

離した後、上清を1/4残し、酢酸-メタノール(1:20)固定液5mlを加えて攪拌した。1000rpmで5分間遠心分離した後、上清を1/3残し、酢酸-メタノール(1:20)固定液3mlを加えて攪拌した。1000rpmで5分間遠心分離した後、上清を1/3残し、細胞を懸濁したのち、2滴をスライドグラス上に滴下した。乾燥後、0.01%アクリジンオレンジ水溶液で30秒間染色した。リン酸緩衝液(0.14M NaCl; 2.7mM KCl; 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)で5分間洗浄し、1晩放置後、蛍光顕微鏡を用いて小核を観察した。正常な幼若赤血球細胞2000個中に含まれる小核を有する細胞数を計測し、1000個当りの小核誘発頻度(%)を求めた。

3) マイトマイシンC(MMC)の金魚腹腔内投与による小核誘発に対する水温の影響

和金(*Carassius auratus*, 10±0.8g)3匹ずつをそれぞれ10°C, 25°C, 30°Cの水槽内で3週間飼育して順化した後、金魚に0.04%MMC水溶液(和光純薬, 生化学用)100μlを腹腔内投与(4mg/kg)した。投与後2日, 3日, 4日, 5日後に末梢血および鰓細胞を採取し、誘発した小核をもつ細胞数を計測した。

#### 4. 海水中有機化学物質の分離、濃縮

ガラスカラム(φ2×30cm)に石英綿(和光純薬, 元素分析用)を詰め、非イオン交換樹脂Amberlite XAD-2000(オルガノ)50mlを蒸留水で湿式充填した。このカラムを海水20lを入れたポリ容器に接続し、海水を15ml/minの流速で通して溶存する化学物質を吸着させた。通水後、カラムを装置より外し、蒸留水でカラム内のXAD-2000を洗浄した。さらにカラムの先端をアスピレーターに接続し、20~30分間吸引して水分を除去した。カラムよりXAD-2000を取り出し、吸着物を精製ジエチルエーテル(関東化学, 特級)を用いて4時間ソックスレー抽出した。エーテル抽出液を無水硫酸ナトリウム(和光純薬, 残留農薬試験用)で脱水した後、溶媒をロータリーエバポレーターで減圧留去し、得られた残渣をエーテル抽出物としてAmes試験に用いた。

#### 5. Ames試験 (Ames et al., 1975; 矢作, 1975)

滅菌試験管にオートクレーブで滅菌した100mMリン酸緩衝液(PBS, pH7.4)0.5ml, 試料溶液(エーテル抽出物をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して一定濃度にしたもの)0.1ml, *Salmonella typhimurium* TA100(米国カリフォルニア大学B.N.Ames博士より供与された)懸濁液0.1mlを順次加えて混合し、37°Cで20分間保温(ブレインキューベーション)した。次いでソフトアガー2mlを加え、十分に混合した後、最小寒天培地(テスメディアAN培地, 和光純薬, 変異原性試験用)にまいて、速やかに均一に広げた。固化後シャーレを倒置して37°Cで、48時間培養した。誘発したヒスチジン非要求性復帰変異コロニー数を自動算定器(Colony Analyzer Systems CS-11, システムサイエンス)を用いて計測した。

対照として溶媒のDMSOを用いた。また、陽性対照物質として、4-nitroquinolin 1-oxide(4NQO, 和光純薬, 特級, 0.1μg/plate)を用いた。

なお、同一検体について2枚のプレートを使用し、その平均値を算出し、対照プレートのコロニー数(108~126)の平均値を差し引いて、真の復帰変異コロニー数(Net His<sup>+</sup> revs)を求めた。

### 結 果

1994年に採取した清水港(A), 用宗港(B), 大井川港(C)の海水より調製したエーテル抽出物の変異原性試験の結果をFig.2に示した。

用宗港海水は夏期(7月)に74,960 Net His<sup>+</sup> revs/100mlときわめて高い変異原性を示した。しかし、この試料中の変異原の構造および由来については現在までに明らかにできていない。また、用宗港の9, 11月および大井川港の10月の海水が100ml当たり553~760 Net His<sup>+</sup> revsを示した。3地点で捕獲した小型魚類の鰓における小核誘発頻度をTable1に示した。

夏期に捕獲した魚類の中では大井川港のカイワリが

Table 1 Micronucleus frequency in gills of coastal fish (1994)

Sampling		MN Frequency (%)			
Point	Date				
Shimizu Harbor (A)	4/29	Kasago	5.4	Sasanohabera	5.3
	5/22	Kawahagi	13.5	Kasago	6.9
		Sasanohabera	10.0	Hiiragi	6.3
		Suzumedai	8.0	Aji	5.0
		Sakuradai	7.5	Mejina	4.8
	5/1	Hiiragi	3.9		
	7/9	Hiiragi	9.4	Hiiragi	7.4
		"	9.0	"	7.3
		"	9.0	Mejina	
		"	8.5	"	9.9
Mochimune Harbor (B)	9/25	Hiiragi	9.9	Ishidai	9.4
		"	8.8	Urumeiwashi	3.9
		"	4.9		
	11/12	Hiiragi	6.8	Kotohiki	3.4
	12/10	Hiiragi	5.9	Hiiragi	4.0
		"	5.3	"	4.0
		"	4.5	"	3.9
		"	4.4	"	3.9
		"	4.4	"	3.5
		"	4.3	"	3.4
Ooigawa Harbor (C)	4/10	Hiiragi	5.0	Hiiragi	4.0
	8/7	Kaiwari	16.7	Suzuki	8.9
		"	16.5	"	8.0
		Hiiragi	10.3	"	7.4
	10/29	Mejina	5.9	Maruta	5.9
		"	5.5	Hiiragi	4.2
		"	4.4	Takanohadai	3.9

Table 2 Physico-chemical data of coastal water in Mochimune area (1995-1996)

Sampling		pH	COD (mg/l)	Ether ext. (mg/l)	Temperature (°C)
Point	Date				
Coastal	5/7	7.85	2.48	0.59	NT
	6/3	7.95	4.33	0.37	19
	7/12	7.77	3.71	0.36	22
	8/2	7.97	2.17	1.07	26
	9/4	7.85	2.48	1.03	24
	10/3	7.63	2.94	0.48	23
	11/6	7.85	2.48	0.57	18
Offshore	11/9	8.19	0.65	0.43	NT
Coastal	12/4	7.81	3.26	0.28	14
	1/10	7.34	4.57	0.52	6
	2/29	7.78	2.56	0.43	7
	3/28	7.41	1.92	0.48	10
	4/30	7.56	2.88	0.34	11

NT: not tested

16.7%と高い小核誘発頻度を示した。一方、末梢血においては夏期(7月と9月)にカイワリが最高5.4%と高値を示したが、他の月ではいずれの魚種も0%で小核の誘発は認められなかった。なお、捕獲した魚類の中で検体数が最も多かったヒイラギの鰓について小核誘発頻度の年内変動をFig.3に示した。

これらの結果から、夏期(7月~9月)にヒイラギの

小核誘発頻度が上昇する傾向を示すことが明らかとなった。特に、用宗港および大井川港においてその傾向が強くみられた。

Ames試験の結果から、海水のエーテル抽出物が明確な季節変動を示した用宗港に注目し、かつ魚類のうち1年中捕獲することが可能で、小核誘発頻度が季節変動を示したヒイラギを対象魚として1995年5月から1996年



Table 3 Chemical analysis of sea water and micronucleus frequency of fish (1995)

Sampling Date	Points	Sea water			Micronuclei (%)		
		COD (mg/l)	Ether ext. (mg/l)	Mutagenicity (TA100, His <sup>+</sup> revs/l)	Fish species (Number)	Erythrocytes	Gills
10/3	Coastal	2.94	0.48	294	Hiiragi (2)	0.5	4.4
					Ugui (6)	0.1	4.1
					Aji (1)	1.0	1.0
	Offshore	NT	NT	NT	Kamasu (6)	0.4	1.7
11/6	Coastal	2.48	0.57	54	Ugui (3)	0.2	1.6
					Hiiragi (6)	0	2.5
					Takanohadai (1)	0	1.5
	Offshore	0.65	0.43	89	Kigihata (2)	0.3	0.8
					Matsubagoti (4)	0	1.1

NT : not tested

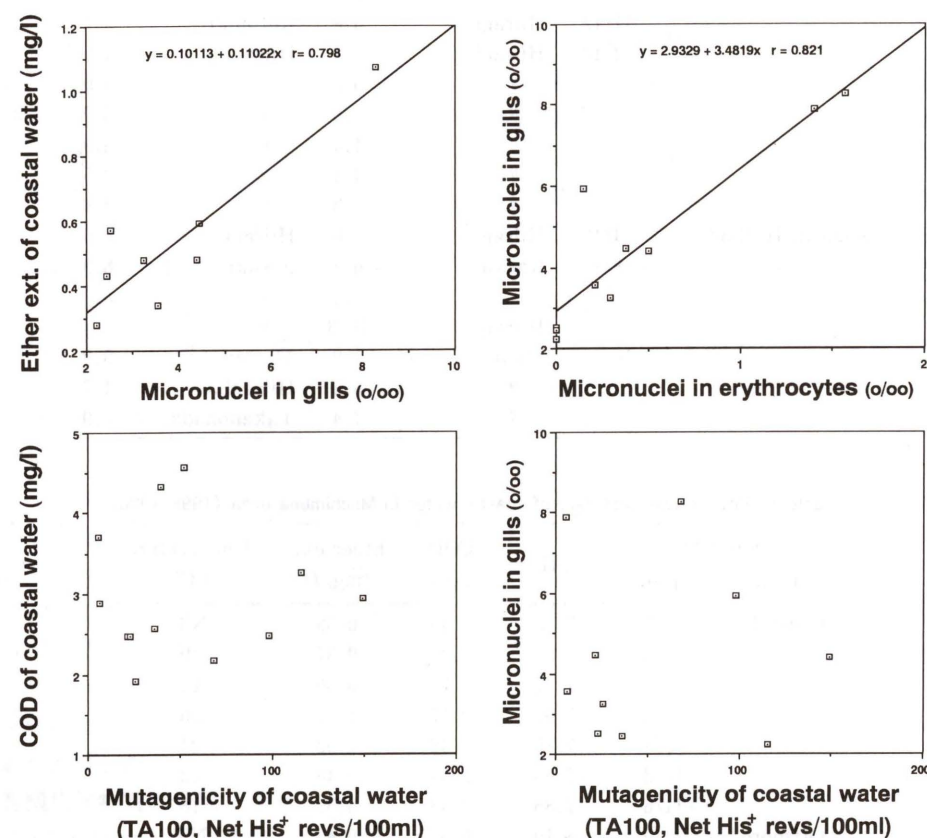


Fig. 6 Relationship between several items of coastal water and fish

4月まで同様のモニタリングを行った。

海水の理化学分析値とエーテル抽出物の収量を Table 2 に示した。

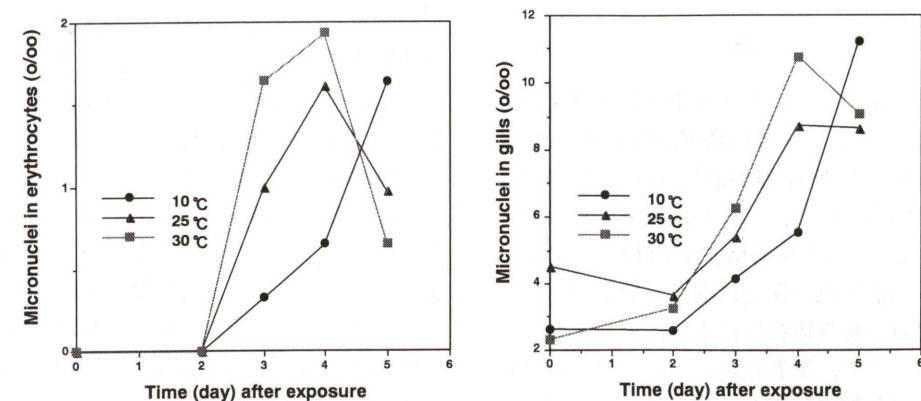
用宗港沖合海水の COD が 0.65 mg/l と低値であったのに対して、用宗港沿岸海水はいずれも 1.92~4.57mg/l と高値を示した。しかし、COD の明確な季節変動は認められなかった。エーテル抽出物の収量は 8 月、9 月にそれぞれ 1.07, 1.03 mg/l となり、夏期に多かった。その他の月は沖合海水も沿岸海水も同程度の収量であった。海水試料のエーテル抽出物について Ames 法により変異原性を検定し、TA 100, -S 9 mix における誘発した復

帰変異コロニー数を海水 100 ml 当たり に換算して Fig. 4 に示した。

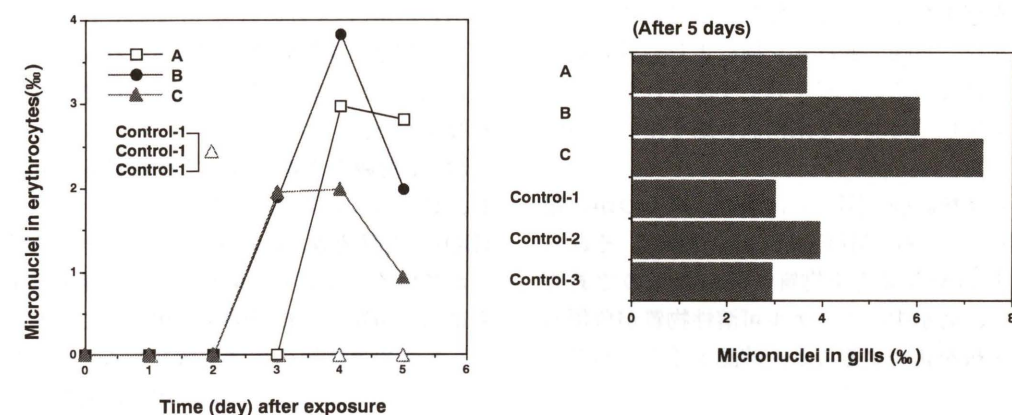
9 月、10 月および 12 月に変異原性を認めた。しかし、変異原性は 9 月の海水が 100 Net His<sup>+</sup> revs/100 ml となり、1996 年の同時期 (600 Net His<sup>+</sup> revs/100 ml) と比べて 1/6 の低値となった。

また、ヒイラギの末梢血と鰓における小核誘発頻度の結果を Fig. 5 に示した。

末梢血では 7 月、8 月に、鰓では、7 月~9 月に高値を示し、いずれも夏期に小核誘発頻度が上昇することを確認した。沖合 (海域 A) に棲息する魚類と沿岸 (海域

Fig. 7 Induction of micronuclei in erythrocytes and gills of goldfish (*Carassius auratus*) administered MMC (4 mg/kg)

MMC (4 mg/kg) was administered peritoriously into goldfish. At appropriate time, peripheral erythrocytes and gills were submitted to the micronucleus test.

Fig. 8 Induction of micronuclei in erythrocytes and gills of goldfish (*Carassius auratus*) with and without administration of coastal water extracts

Ether extract of XAD-2000 adsorbates was administered to goldfish and the induction ratio of micronuclei in gills and peripheral erythrocytes were compared with those of control.

B) に棲息する魚類の末梢血および鰓における小核誘発頻度を Table 3 に示した。

魚種が異なるため、断言できないが、同時期に採取した魚類の鰓について比較した場合、沿岸魚と比べて沖合魚で小核誘発頻度が低下する傾向がみられた。

次に海水の理化学分析値と魚類の小核誘発頻度との相関を調べた (Fig. 6)。

末梢血の小核誘発頻度は海水のエーテル抽出物量と  $r=0.798$ 、鰓の小核誘発頻度とは  $r=0.821$  と高い相関を示した。しかし、海水の変異原性と COD および鰓の小核誘発頻度との間に相関はみられなかった。また、COD とエーテル抽出物量との間にも相関はみられなかった。ところで、夏期に小核誘発頻度が上昇する傾向がみられているが、この現象が海水の水温の上昇と関連する可能性も考えられた。そこで、海水魚の代わりに容易に入手でき、飼育が簡単な金魚を用いてまず 10°C, 25°C, 30°C の水槽内で 3 週間順化した。次いで MMC 水溶液を腹腔内

投与して、さらに各水温で飼育し、経時的に小核誘発頻度を検討した (Fig. 7)。

いずれの水温においても末梢血と鰓で小核の誘発が認められ、水温による差は認められなかった。しかし、MMC 溶液を投与してから小核が最高値に達するまでの日数は水温が低いほど長時間を要した。水中に存在する化学物質により魚類の小核が誘発されることを確認するため、金魚に用宗の海水エーテル抽出物を腹腔内投与して経時的に小核の誘発を検討した (Fig. 8)。

その結果、海水抽出物投与群 (A, B, C) のうち B, C 2 個体の末梢血および鰓における小核誘発頻度は非投与群 (control 1, 2, 3) と比べて高値を示した。海水魚と淡水魚の差、また同じ海水魚であっても魚種により小核の誘発頻度が異なることが予想されるので、さらに海水魚を飼育して検討中である。



## 考 察

我が国では水質保全のため、平成5年3月8日付の環境庁告示第16号により新しい環境基準が告示され、有機塩素系化合物や農薬など15項目が追加されるとともに、一部項目の規制が強化された。しかし、従来から水質評価に用いられているCODや全有機炭素(TOC)量などの理化学的恒数は、生活環境の保全に関する数値であり、水環境中の発癌物質や変異原物質による汚染を把握することはできない。そこで、筆者らは、水環境中のそれら変異・がん原物質が魚類に何らかの悪影響を与えているものと推測し、比較的操作が簡単で、短時間に結果を得ることができる小核試験の利用を試みた。

哺乳動物では骨髄が造血組織であるが、魚類の場合、主として腎臓と脾臓が造血機能をもっており、赤芽球から網状赤血球を経由して赤血球を作り出していると考えられている。また、魚類の鰓は水交換により外界の化学物質の影響を受けていることが十分に予想された。そこで、捕獲した沿岸魚類について末梢血と鰓を用いて小核誘発頻度を調べた。

魚類を用いた小核試験に関しては最近、いくつかの報告がある(高井ら, 1996; Minissi et al., 1996)。それらは既知発がん物質や環境汚染物質を用いたものであるが、本研究では、海水中的エーテル可溶性物質が魚類の鰓や末梢血に小核を誘発することを確認することができた。

静岡県用宗港沿岸で捕獲した魚類の中で主に小核試験に用いた魚は、ヒイラギ(落合ら, 1986)とウグイであり、用宗港の沖合ではタカノハダイ、キジハタ、マツバゴチを捕獲したので、それらを実験に用いた。末梢血における小核誘発頻度が沖合魚では0%であったのに対して、沿岸魚では夏期にウグイが3.9%と高値を示した(木苗ら, 1995)。ヒイラギの末梢血および鰓における小核誘発頻度が春期と冬期の個体では近似していたことから、夏期に変異原物質の影響を受けたものと推定した。また、夏期の海水のエーテル抽出物の収量が多かったこと、同抽出物がAmes試験で高い変異原性を示したことなどから夏期は陸上および沿岸における人間の生活活動が盛んになり化学物質による汚染が悪化したものと推測している。本研究結果から魚類を用いた小核試験が変異原物質のモニタリングに有効であると思われた。しかし、小核の出現頻度は魚種や、個体により差がみられることから、さらに他の魚種、多くの個体について検討することが望ましいと考えた。また、鰓の場合、対照魚では1~2%であったのに対して、ヒイラギでは9.00%と夏期にきわめて高い値を示したこと、魚の末梢血と鰓との小核誘発頻度の間には、 $r=0.804$ と高い相関性が認められたことから末梢血より鰓の小核誘発頻度が指標になると推定した。沿岸海水は夏期に水温が上昇するので、魚体内で

化学物質の代謝活性化能が促進され、小核誘発頻度が高値を示す可能性が考えられた。そこで魚種は異なるが金魚を用いて実験を試みた。金魚を、10°C、25°C、30°Cの水槽中で順化した後、腹腔内にMMCを投与し、経時的に小核誘発頻度を調べた。各水温での小核誘発の速度に差がみられ、水温が低いほど最高値に達するまでに長時間を要した。しかし、最終的にはほぼ同程度の小核誘発頻度を示したこと、自然界では常に海水に暴露されていることを考えると水温の影響は無視できると考えた。

用宗港における沿岸海水についてCOD分析とエーテル抽出物の変異原性試験を行った結果、いずれも沖合海水のものに比べて高値を示したことから沿岸海水が無機あるいは有機物質により汚染されていることを確認した。しかし、CODの季節変動は認められなかった。1995~1996年の海水の変異原性は夏期に上昇する傾向を示したが、いずれの月も1994年と比較して変異原性は低く、明確な季節変動は認められなかった。また、エーテル抽出物の変異原性とCODの間には相関性はみられなかった。

現在、海域の水質については環境基準が設定され、A、B、Cの3つの類系について、pH、COD、溶存酸素量(DO)、大腸菌数、n-ヘキサン抽出物質(油分等)で規制されている。本研究結果からそれら環境基準の測定とともに沿岸魚類に小核試験を適用することが水環境中の主として変異原物質の生体影響を知るための有効な手段となることが示された。なお、現在、変異原性を示した用宗港海水のエーテル抽出物より変異原の分離、同定を行っている。

本実験の結果より、沿岸海水汚染の評価法として、海水の理化学試験とともに変異原性試験が有効であること、さらに棲息魚類を用いた小核試験との併用がより有効であることを明らかにすることができた。また、ヒイラギは関東地方以南の各海域で容易に捕獲できることから沿岸海水の汚染をモニタリングする指標生物の一つとして考えることが可能となった。

## 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
- 林 真(1996)小核試験による評価法, 水環境学会誌, 19, 775-779.
- Hayashi, M., T. Ueda, K. Ueno, K. Wada, N. Kinai, K. Saotome, N. Tanaka, A. Takai, Y. F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni, and Y. Ojima (1997) Development of genotoxic-assay systems using aquatic organisms, *Mutat. Res.* (in press).
- 石館 基, 祖父尼俊雄, 鈴木郁生(1991)染色体異常誘発性を指標とする試験, 続医薬品の開発, 第11巻, 医薬品の変異原性・遺伝毒性, 広川書店, 83-107.
- 木苗直秀(1993)魚類の腫瘍発生に基づいた水質評価, 用水と廃水, 35, 51-60

- 木苗直秀, 岩崎浩一, 谷所達幸, 八木利仁, 下位香代子(1995)小核を指標とした水環境のモニタリング, 合成洗剤研究会誌, 19(1), 108-109
- MacGregor, J. T., C. M. Wehr and D. H. Gould (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of a improve micronucleus test, *Environ. Mutagen.*, 2, 509-514
- Minissi S., E. Ciccotti, M. Rizzoni, (1996) Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutat. Res.*, 367, 245-251
- 落合 明, 田中 克(1986)“新版, 魚類学(下)”：ヒイラギ, 初版, 恒星社厚生閣, 東京, 652-654
- 澤村良二(1990)“衛生試験法・注解1990”：4.1水質試験法, 1990年版, 日本薬学会編, 金原出版, 東京, 921-1111.
- 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(1994)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法の開発に関する研究, 環境保全研究成果集(平成5年度)18-1~14
- 高井明德, 上野紘一, 林 真, 祖父尼俊雄(1996)魚類の鰓細胞を用いた小核試験法による水質汚染の細胞遺伝毒性影響評価, 日本環境変異原学会第25回大会要旨集, p84.
- Ueda, T., M. Hayashi, Y. Ohtsuka, T. Nakamura, J. Kobayashi and T. Sofuni (1992) A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells, *Water Sci. Technol.*, 25, 235-240.
- 矢作多貴江(1975)環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について, 蛋白質・核酸・酵素, 20, 1178-1189.



# Promotion of mutagenesis by *rumAB* genes in *Salmonella typhimurium* strains TA1535 and TA2659

Toshihiro Ohta<sup>1\*</sup>, Mie Watanabe-Akanuma<sup>2</sup>, Roger Woodgate<sup>3</sup>,  
Shin-ichi Tokishita<sup>1</sup>, Yasuhiro Shiga<sup>1</sup> and Hideo Yamagata<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science  
1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

<sup>2</sup> Institute of Environmental Toxicology  
Suzuki-cho 2-772, Kodaira, Tokyo 187-0011, Japan

<sup>3</sup> National Institute of Child Health and Human Development  
Bethesda, Maryland 20892, U. S. A.

## Summary

The *rumAB* operon, which was recently identified as *Escherichia coli umuDC*-complementing genes, strongly enhances spontaneous mutagenesis. We investigated the mutation-enhancing effects of the *rumAB* operon on a low copy number plasmid. Its effect was tested at the *hisG46* locus in strain TA1535 and the *hisG428 (ochre)* locus in strain TA2659 of *Salmonella typhimurium*. Mutability of strains carrying *rumAB* on plasmid pRW290 was compared with the mutability of those carrying *mucAB* on plasmid pRW144.

In both *Salmonella* strains, *rumAB* promoted approximately twice as many spontaneous mutations as *mucAB*. Both operons were equally effective, however, in enhancing sensitivity to mutagenesis induced by various kind of mutagens, such as UV light, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 4-nitroquinoline 1-oxide, hydrogen peroxide, formaldehyde, cumene hydroperoxide, 2-nitrofluorene, 5-azacytidine, and N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. When both strains carried either *rumAB* or *mucAB*, formaldehyde was strongly mutagenic to TA2659 but not to TA1535, whereas sodium azide was strongly mutagenic to TA1535 but not to TA2659. Neither *rumAB* nor *mucAB* genes seemed to enhance the mutagenicity of sodium azide or N<sup>4</sup>-aminocytidine.

**Keywords :** *rumAB*, *mucAB*, promotion of mutagenesis, *hisG428*, *hisG46*

## Introduction

The products of the *umuDC* operon are directly required for mutagenesis in enterobacteria (for review, see Walker, 1984). Four *umu*-like operons encoded on naturally occurring plasmids-*mucAB* (Perry et al., 1985), *impCAB* (Lodwick et al., 1990), *samAB* (Nohmi et al., 1991), and *rumAB* (Ho et al.,

1993)-have been characterized at the molecular level. The plasmid-encoded *umu*-like genes are functionally related to the chromosomally encoded *umuDC* genes of *Escherichia coli* (Kitagawa et al., 1985; Perry et al., 1985) and *Salmonella typhimurium* (Smith et al., 1990; Thomas et al., 1990). The *S. typhimurium umuDC* operon appears to have modest activity compared with the *E. coli umuDC* operon. The *samAB* operon on a 60 MDa cryptic plasmid that commonly exists in *S. typhimurium* LT2 and its derivatives, including TA1535 and TA1538, does not appear to express any mutagenesis-promoting activity under physiological conditions (Nohmi et al., 1992). In contrast, *mucAB* and *rumAB* loci promote

received : November 17, 1997

accepted : December 11, 1997

\* Corresponding author

Tel (81) 426-76-7093 Fax (81) 426-76-7081

E-mail ohta@ls.toyaku.ac.jp

© Environmental Mutagen Society of Japan



UV mutagenesis to a greater extent than *E. coli* *umuDC*, and *rumAB* is 3- to 5-fold more efficient than *mucAB* at promoting SOS-dependent spontaneous mutagenesis in *E. coli* (Kulaeva et al., 1995).

The enhanced mutagenic potential of *mucAB* in pKM101 was exploited in the creation of the Ames *S. typhimurium* tester strains (McCann et al., 1975). The potent ability of *rumAB* genes to enhance spontaneous mutability suggests that its introduction into *Salmonella* tester strains might increase their mutagen sensitivity. In this study we constructed tester strains harboring either the *rumAB* or the *mucAB* operon on a low copy number plasmid and tested their sensitivity to ten kinds of chemical mutagens and to UV light.

## Materials and Methods

### Chemical mutagens

2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2), hydrogen peroxide, and formaldehyde were purchased from Wako Pure Chemical Industry Ltd. (Tokyo, Japan). Cumene hydroperoxide, N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG), and 2-nitrofluorene were purchased from Aldrich Chemical Co. (WI, USA). 5-Azacytidine, 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), N<sup>4</sup>-aminocytidine, and sodium azide were purchased from Sigma Chemical Co. (MO, USA), Tokyo Kasei Kogyo Co. (Tokyo, Japan), Funakoshi Co. (Tokyo, Japan), and Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan), respectively. AF-2, 4-NQO, cumene hydroperoxide, 2-nitrofluorene, and ENNG were dissolved in dimethylsulfoxide (Wako Pure Chemical). All other mutagens were dissolved in sterile Milli-Q pure water immediately before use.

### Media

Minimal glucose agar plates consisted of Vogel-Bonner E medium (0.2% citric acid monohydrate, 1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.35% NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> · 4 H<sub>2</sub>O, and 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O) supplemented with 2% glucose and 1.5% agar. Top agar contained 45 µM L-histidine, 45 µM D-biotin, 0.5% NaCl, and 0.6% agar. LB medium was 1% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, and 1% NaCl. Spectinomycin (Sigma Chemical) was added at a final concentration of 50 µg/ml for the selection of cells carrying plasmid pRW144 or pRW290.

### Construction of bacterial strains

Strains TA1535 [*hisG46*,  $\Delta$ (*uvrB-bio*), *rfa*] (Maron and Ames, 1983) and TA2659 [*hisG428*,  $\Delta$ (*uvrB-bio*), *rfa*] (Levin et al., 1984) of *S. typhimurium* were sup-

plied by Dr. T. Kada (National Institute of Genetics, Mishima, Japan) and Dr. T. Nohmi (National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan), respectively. The plasmid pRW144 carrying the *mucAB* operon and pRW290 carrying *rumAB* operon are pSC101-derived low-copy number plasmids that confer spectinomycin resistance (Ho et al., 1993; Szekeres et al., 1996). Plasmids were isolated from *E. coli* strain RW126 [*recA*, *lexA*] (Ho et al., 1993).

Competent cells of TA1535 and TA2659 were prepared as follows: Cells growing in 500 ml of LB broth at 37°C (OD<sub>660</sub> = 0.7) were harvested and washed with 500 ml, then 300 ml ice-chilled Milli-Q water. Cells were then suspended in 0.5 ml of 10% glycerol. An aliquot (60 µl) of the competent cells was mixed with 1 µl of plasmid solution in a 0.2 cm electroporation cuvette and pulsed at 2.5 kV, 25 µF capacitance, by a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad). The pulsed cell suspension was added to 1 ml LB broth and cultured at 37°C for 60 min, with shaking. The cells were then spread on LB agar plates supplemented with 50 µg/ml spectinomycin and incubated overnight at 37°C for selection of spectinomycin-resistant colonies.

### Reverse mutation test

Each stock culture of the tester strains (which had been stored at -80°C) was inoculated with nutrient broth (Oxoid nutrient broth No. 2, Oxoid Ltd., U.K.) and grown overnight at 37°C, with shaking, to a density of 2-3 × 10<sup>9</sup> cells/ml. Assays were performed in duplicate by a preincubation method without exogenous metabolic activation. An aliquot of 0.5 ml of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 ml of an overnight culture of the tester strain, and 0.1 ml of a mutagen solution were added to a sterile small test tube and preincubated with shaking for 20 min at 37°C. After that, 2 ml of molten top agar kept at 45°C was added. The contents were mixed uniformly and overlaid on a minimal glucose agar plate. For the UV mutagenesis experiments, overnight cultures were washed twice with saline and resuspended in the same volume of saline. The cell suspension was exposed in a petri dish to ultraviolet light (germicidal lamp, Toshiba) at 0.2-2 J/m<sup>2</sup>. A portion (0.1 ml) of irradiated cells was poured onto minimal glucose agar plates by means of 2 ml molten top agar. All plates were incubated at 37°C for 48 hr, after which the number of His<sup>+</sup> revertant colonies was scored by a colony analyzer.

Table 1 Mutation-enhancing effects of *mucAB*- and *rumAB*-carrying plasmids in *S. typhimurium* strains TA1535 and TA2659.

Mutagens	Dose (µg/plate)	Number of His <sup>+</sup> revertants/plate					
		TA1535	TA1535/ pRW144	TA1535/ pRW290	TA2659	TA2659/ pRW144	TA2659/ pRW290
4-NQO	0	7	71	175	8	123	268
	0.001	7	126	325	10	254	376
	0.002	8	236	400	8	363	511
	0.005	12	487	791	11	617	914
AF-2	0	13	94	278	11	131	284
	0.001	10	145	341	7	410	540
	0.002	9	161	428	11	804	832
	0.005	7	345	746	9	1472	1364
5-Azacytidine	0	11	74	174	9	142	267
	10	29	296	233	5	505	468
	20	33	341	241	7	715	637
	50	35	323	305	9	828	994
N <sup>4</sup> -Amino-cytidine	0	7	81	227	11	198	290
	0.1	277	347	680	433	620	605
	0.5	839	1153	1493	980	1234	1046
	1	1325	1725	>2000	1461	1428	1334
Hydrogen peroxide	0	8	107	205	8	144	210
	20	9	179	336	6	255	325
	30	4	231	314	8	321	534
	40	5	228	420	6	364	612
Cumene hydroperoxide	0	7	71	175	8	123	268
	10	10	128	300	35	326	357
	20	21	229	335	67	469	635
	50	29	295	377	70	499	640
2-Nitrofluorene	0	13	98	190	8	179	331
	0.5	8	304	412	7	231	644
	1	7	391	539	9	286	803
	2	10	648	775	13	512	1266
ENNG	0	13	98	190	8	179	331
	0.5	30	204	456	15	278	822
	1	33	356	641	44	503	1512
	2	115	952	1202	315	1084	>2000

Values are the average of duplicate plates.

## Results

The introduction of plasmid pRW290 (*rumAB*) increased the frequency of spontaneous revertants to roughly 20 and 30 times the control value for strains TA1535 and TA2659, respectively (Table 1). Introduction of plasmid pRW144 (*mucAB*) increased the frequencies to roughly 10 and 15 times the control values (Table 1). These findings in *S. typhimurium* are consistent with those in *E. coli*, where *rumAB* is 3- to 5-fold more efficient than *mucAB* in promoting spontaneous mutagenesis (Kulaeva et al., 1995).

Figs. 1 and 2 show the dose-response curves for mutation induction by UV irradiation in TA2659 cells

and by AF-2 treatment in TA1535 cells with and without plasmids. In the absence of plasmids, neither strain gave a positive response. Introduction of plasmids carrying either the *rumAB* or *mucAB* operon made the strains hypersensitive to the mutagens to approximately the same degree.

Similar results were obtained with 4-NQO, hydrogen peroxide, 2-nitrofluorene, and formaldehyde (Table 1 and Fig. 3). Response to those mutagens depended completely on the presence of plasmid-encoded *rumAB* or *mucAB* genes. Cumene hydroperoxide and ENNG were mutagenic to TA1535 and TA2659 even without plasmids, but the introduction of pRW290 or pRW144 greatly enhanced sensitivity



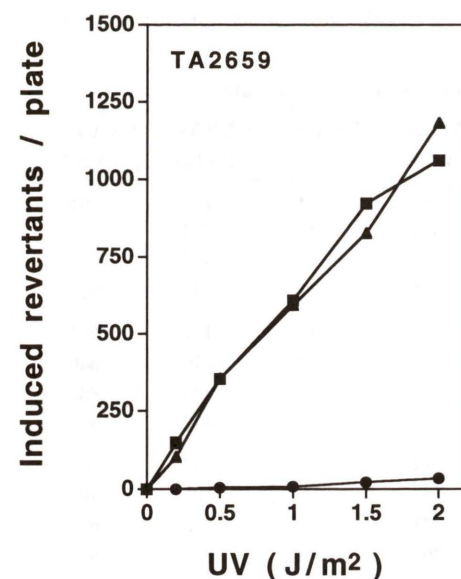


Fig. 1 Mutation induction by UV irradiation in TA2659 cells with and without plasmids. ■, with pRW290 (*rumAB*); ▲, with pRW144 (*mucAB*); ●, without plasmid. Data points represent the means of duplicate plates.

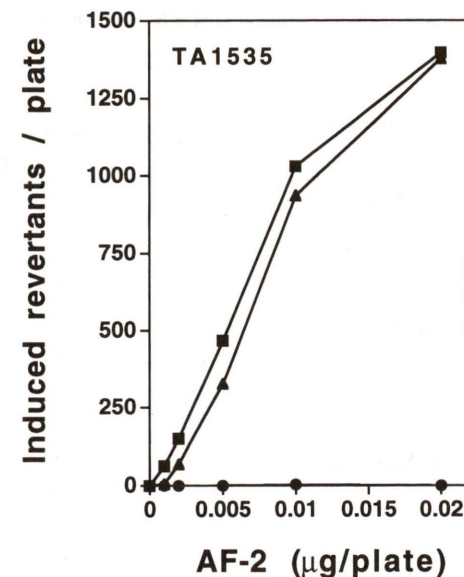


Fig. 2 Mutation induction by AF-2 in TA1535 cells with and without plasmids. ■, with pRW290 (*rumAB*); ▲, with pRW144 (*mucAB*); ●, without plasmid. Data points represent the means of duplicate plates.

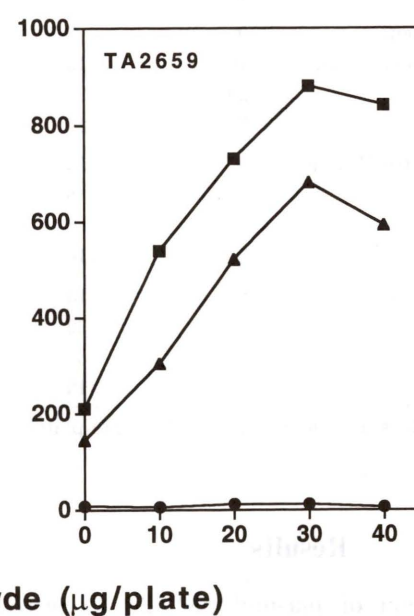
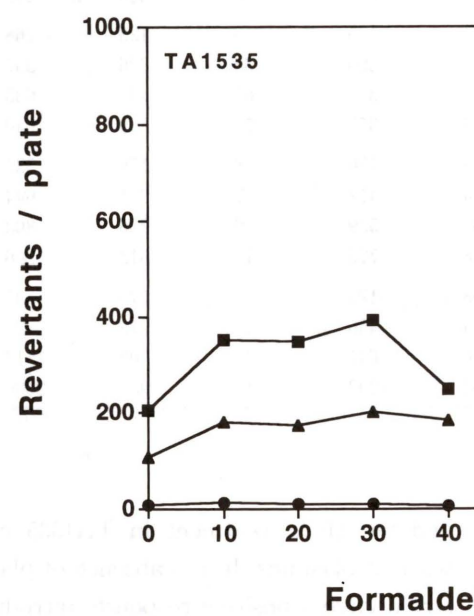


Fig. 3 Mutation induction by formaldehyde in TA1535 (left) and TA2659 (right) with and without plasmids. ■, with pRW290 (*rumAB*); ▲, with pRW144 (*mucAB*); ●, without plasmid. Data points represent the means of duplicate plates.

(Table 1). Although the number of revertants per plate induced by those chemicals increased considerably in strains with a high spontaneous mutation frequency (e.g. TA2659/pRW290 and TA2659/pRW144, the fold-increase was not as great as it was in the non-plasmid-containing strains). Also the amount of mutagen necessary for a doubling of the number of

revertants was not lowered by the plasmids. As shown in Fig. 3 and Table 1, TA2659 cells were more sensitive than TA1535 cells to formaldehyde and to oxidative mutagens such as hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, reflecting the greater sensitivity of *hisG428* over *hisG46*, which was reported by Levin et al. (1982).

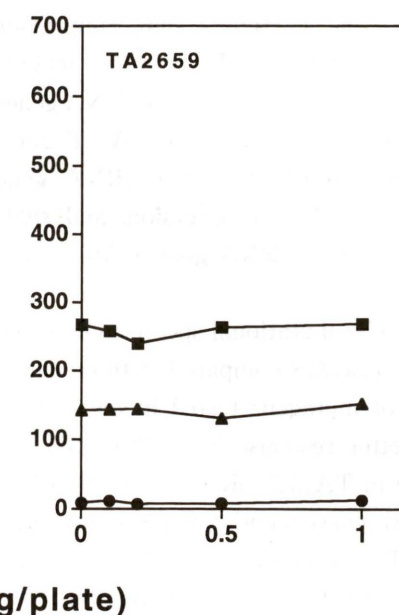
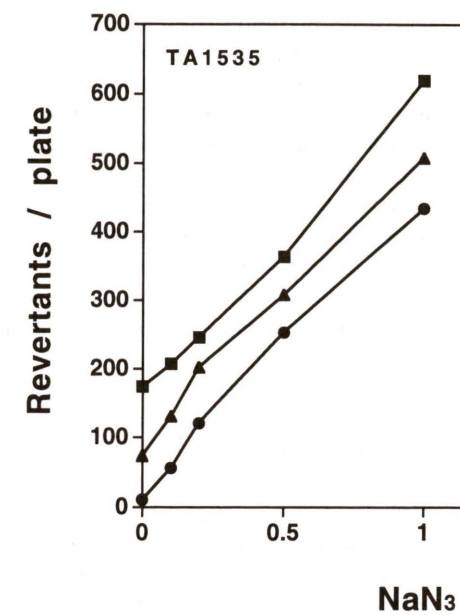


Fig. 4 Allele-specific His<sup>+</sup> reversion induced by sodium azide in TA1535 [*hisG46*] (left) but not in TA2659 [*hisG428*] (right). ■, with pRW290 (*rumAB*); ▲, with pRW144 (*mucAB*); ●, without plasmid. Data points represent the means of duplicate plates.

We also tested two base analogs, N<sup>4</sup>-aminocytidine and 5-azacytidine. N<sup>4</sup>-aminocytidine was reportedly highly mutagenic to TA1535 (Negishi et al., 1983). It was found that the chemical had almost the identical effect in TA2659 and TA1535 (Table 1) and that the effect did not change substantially with the introduction of plasmids containing *rumAB* or *mucAB*. In contrast, 5-azacytidine mutagenesis depended largely on the presence of *rumAB* or *mucAB* genes, and the *hisG428* allele was more sensitive than the *hisG46* allele. The allele-specific reversions were observed in mutagenesis induced by sodium azide. As Fig. 4 shows, *hisG46*-containing cells, but not *hisG428*-containing cells showed a dose-related response to NaN<sub>3</sub> regardless of the presence of plasmid pRW290 and pRW144. Neither *rumAB* nor *mucAB* promoted azide-induced mutagenesis in TA1535.

## Discussion

In previous studies we demonstrated the capabilities of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons to promote induced mutagenesis and changes in the spectrum of base substitutions in *E. coli* (Watanabe et al., 1994 a, b). In this study, we compared the ability of low-copy-number plasmids carrying *rumAB* or *mucAB* to enhance mutagenesis in *S. typhimurium* strains TA1535 and TA2659. In both *Salmonella* strains, *rumAB* promoted approximately twice as

many spontaneous mutations as *mucAB*. Both operons were equally effective, however, in enhancing sensitivity to mutagenesis induced by various kind of mutagens. The reason of different enhancing activity between spontaneous and induced mutagenesis is unknown.

TA1535 has the *hisG46* missense mutation, which substitutes a proline triplet (CCC) for a leucine triplet (CTC) at position 434 of the histidine operon (Barnes et al., 1982). Cells containing *hisG46* can revert to histidine prototrophy in any of the following ways: a change at position 434 to a wild type leucine codon (CTC) or a serine codon (TCC) by a C : G → T : A transition, to an alanine codon (GCC) by C : G → G : C transversion, to a histidine (CAC) or a threonine (ACC) codon by a C : G → A : T transversion (Miller and Barnes, 1986). TA2659, on the other hand, carries the *hisG428* nonsense mutation, which encodes an ochre stop codon (TAA) in place of a glutamine codon (CAA) at position 847 of the histidine operon (Levin et al., 1982). Strain TA2659 can revert to histidine prototrophy by base substitutions at either the ochre site or extragenic ochre suppressor sites (Levin and Ames, 1986). Reversions at the ochre site include mutations to a glutamine triplet (CAA) by a T : A → C : G transition, to a leucine (TTA) or a lysine triplet (AAA) by a A : T → T : A transversion, and to a glutamic acid (GAA) or a serine triplet



(TCA) by a T : A → G : C transversion. Suppressor mutations (anticodon change of tRNA genes) include *supC* and *supM* mutations of the tyrosine tRNA genes *tyrT* and *tyrU*, respectively, by a C : G → A : T transversion, *supG* mutation of the lysine tRNA gene (*lysT*) by a T : A → A : T transversion, and *supB* mutation of the glutamine tRNA gene (*glnU*) by a C : G → T : A transition.

Because of the wider mutational spectrum detected by strains carrying *hisG428* compared to those carrying *hisG46*, most of mutagens tested in the present study evoked a better response in TA2659/pRW290 (or pRW144) than in TA1535/pRW290 (or pRW144) (Table 1 and Fig. 3). One exception was sodium azide, which evoked similar responses in TA1535/pRW290, TA1535/pRW144, and TA1535. No reversion, however, was detected in *hisG428*-containing strains (Fig. 4). Koch et al. (1994) showed by DNA sequencing analysis that sodium azide preferentially induced C : G → T : A transition and C : G → A : T transversion at the target codon CCC in *hisG46* gene of *S. typhimurium* with a marked preference for the second G : C base pair over the first. The absence of sodium azide-induced Trp<sup>+</sup> reversions in *E. coli* WP2 *uvrA* containing the *trpE65* ochre mutation has also been reported (Kleinhofs and Smith, 1976), but the reason for the lack of mutagenicity is not well understood. Our recent analysis indicated that sodium azide preferentially induced C : G → T : A transitions in *E. coli* (unpublished observation). Since both C : G → T : A transition and C : G → A : T transversions are detected by cells containing *supB*, *supC*, or *supM* ochre suppressor mutations in *hisG428*-containing strains, azide-induced DNA-damage may be strongly dependent on sequences neighboring the mutational site.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Miriam Bloom for her critical reading of the manuscript.

#### References

- Barnes, W., E. Tuley and E. Eisenstadt (1982) Base-sequence analysis of His<sup>+</sup> revertants of the *hisG46* missense mutation in *Salmonella typhimurium*, Environ. Mutagen., 4, 297.  
 Ho, C., O. I. Kulaeva, A. S. Levine and R. Woodgate (1993) A rapid method for cloning mutagenic DNA repair genes: isolation of *umu*-complementing genes from multidrug resistance plasmids R 391, R 446 b, and R 471 a, J. Bacteriol., 175, 5411-5419.  
 Kitagawa, Y., E. Akaboshi, H. Shinagawa, T. Horii, H. Ogawa

- and T. Kato (1985) Structural analysis of the *umu* operon required for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4336-4340.  
 Kleinhofs, A., and J. A. Smith (1976) Effect of excision repair on azide-induced mutagenesis, Mutation Res., 41, 233-240.  
 Koch, W. H., E. N. Henrikson, E. Kupchella and T. A. Cebula (1994) *Salmonella typhimurium* strain TA100 differentiates several classes of carcinogens and mutagens by base substitution specificity, Carcinogenesis, 15, 79-88.  
 Kulaeva, O. I., J. C. Wootton, A. S. Levine and R. Woodgate (1995) Characterization of the *umu*-complementing operon from R 391, J. Bacteriol., 177, 2737-2743.  
 Levin, D. E., M. Hollstein, M. F. Christman, E. A. Schwiers and B. N. Ames (1982) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A : T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7445-7449.  
 Levin, D. E., L. J. Marnett and B. N. Ames (1984) Spontaneous and mutagen-induced deletions: mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4457-4461.  
 Levin, D. E., and B. N. Ames (1986) Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transitions and transversions, Environ. Mutagen., 8, 9-28.  
 Lodwick, D., D. Owen and P. Strike (1990) DNA sequence analysis of the *imp* UV protection and mutation operon of the plasmid TP110: identification of a third gene, Nucleic Acids Res., 18, 5045-5050.  
 McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 5135-5139.  
 Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, 173-215.  
 Negishi, K., C. Harada, Y. Ohara, K. Oohara, N. Nitta and H. Hayatsu (1983) N<sup>4</sup>-Aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity, Nucleic Acids Res., 11, 5223-5233.  
 Nohmi, T., A. Hakura, Y. Nakai, M. Watanabe, S. Y. Murayama and T. Sofuni (1991) *Salmonella typhimurium* has two homologous but different *umuDC* operons: cloning of a new *umuDC*-like operon (*samAB*) present in a 60-megadalton cryptic plasmid of *S. typhimurium*, J. Bacteriol., 173, 1051-1063.  
 Nohmi, T., M. Yamada, M. Watanabe, S. Y. Murayama and T. Sofuni (1992) Role of *Salmonella typhimurium umuDC* and *samAB* in UV mutagenesis and UV sensitivity, J. Bacteriol., 174, 6948-6955.  
 Perry, K. L., S. J. Elledge, B. B. Mitchell, L. Marsh and G. C. Walker (1985) *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light- and chemical-induced mutagenesis: UmuD, MucA and LexA proteins share homology, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4331-4335.  
 Smith, C. M., W. H. Koch, S. B. Franklin, P. L. Foster, T. A. Cebula and E. Eisenstadt (1990) Sequence analysis and mapping of the *Salmonella typhimurium* LT 2 *umuDC* operon, J. Bacteriol., 172, 4964-4978.  
 Szekeres, E. S. Jr., R. Woodgate and C. W. Lawrence (1996) Substitution of *mucAB* or *rumAB* for *umuDC* alters the relative frequencies of the two classes of mutations induced by a site-specific T-T cyclobutane dimer and the efficiency

- of translesion DNA synthesis, J. Bacteriol., 178, 2559-2563.  
 Thomas, S. M., H. M. Crowne, S. C. Pidsley and S. G. Sedgwick (1990) Structural characterization of the *Salmonella typhimurium* LT 2 *umu* operon, J. Bacteriol., 172, 4979-4987.  
 Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, Microbiol. Rev., 48, 60-93.  
 Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta (1994 a) Effects of the

- umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: I. Frameshift mutagenesis, Mutation Res., 314, 27-37.  
 Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta (1994 b) Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: II. Base substitution mutagenesis, Mutation Res., 314, 39-49.



## 微生物変異原性試験における各種溶媒の適合性の検討

伴野 富美子, 斉藤 昭二, 土屋 敏行, 萩原 雄二

昭和電工株式会社総合研究所 安全性試験センター 〒276-0056 千葉県千葉市緑区大野台 1-1-1

Comparative examination of various solvents  
for the microbial mutagenicity testsFumiko Banno, Shoji Saito, Toshiyuki Tsuchiya, Yuji Hagiwara  
Safety Evaluation Center, Central Research Laboratory, Showa Denko K. K.  
1-1 Ohnodai 1-chome, Midori-ku, Chiba City 267-0056, Japan

## Summary

We examined six different solvents to determine their compatibility with the *Salmonella* and *Escherichia*/microsome mutagenicity (Ames) assay. These solvents were acetone, 95% ethanol, ethylene glycol, glycerol formal, formamide and 10% PLURONIC F-68 solution. The standard mutagens used were 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, benzo (a) pyrene, 2-aminoanthracene, 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate, sodium azide and bleomycin hydrochloride. Tests were carried out in five histidine-requiring strains TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 and TA 1537 of *S. typhimurium*, and three tryptophan-requiring strains WP 2 *uvrA*, WP 2 *uvrA*/pKM 101 and WP 2/pKM 101 of *E. coli*, both in the absence of and in the presence of metabolic activation (S 9 mix), in two separate experiments. All treatments were performed after a 20-min. pre-incubation procedure. 50  $\mu$ l of each test article solution and solvent was administered per plate. Five solvents (acetone, 95% ethanol, ethylene glycol, formamide and 10% PLURONIC F-68 solution) were found to be compatible with the eight test strains. Glycerol formal was found to be toxic (inhibiting growth) to TA 102, TA 1535 and TA 1537. It is suggested that glycerol formal should not be used as a solvent in the Ames test.

**Keywords** : microbial mutagenicity test, *S. typhimurium*, *E. coli*, solvents

## 緒 言

微生物を用いる変異原性試験 (エームス試験) は, 一般化学品の変異原性を検出する試験法として広く利用されている。被験物質は, 通常, 蒸留水あるいは dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解あるいは懸濁して試験に使用するが, これらの溶媒に溶解あるいは懸濁しない化学物質を試験しなければならないことも多い。安衛法における変異原性試験のテストガイドラインには, 水, DMSO および acetone のいずれにも難溶である場合, テスト菌

株および S 9 mix に毒性を与えない溶媒を使用できる記載がある。この場合, 使用した溶媒が試験に用いる溶媒濃度でテスト菌株および S 9 mix に対して毒性を示さないことを陽性対照物質を用いた試験の用量-反応曲線を作成して確認する必要がある (安衛法における変異原性試験テストガイドラインと GLP, 1991)。

我々は, acetone あるいは 95 % ethanol を溶媒としたブレインキュベーション法による試験で, その溶媒濃度 (1 プレートあたりの添加量) を 100  $\mu$ l とした場合, 溶媒対照からテスト菌株に毒性を示すことを確認した。しかし, このブレインキュベーション法でテスト菌株に毒性を示す溶媒であっても, プレート法であれば使用可能な溶媒 (acetone など) もあった。したがって, 使用経験のない溶媒を試験に使用する場合, 溶媒の濃度およびプレ

受付: 1997 年 8 月 6 日

受理: 1997 年 12 月 25 日

©日本環境変異原学会



Table 1 Positive control chemicals and test strains		
Test strain	Positive control chemicals (within the limits of dose : $\mu\text{g}/\text{plate}^*$ )	
	Without S9mix	With S9mix
<i>S. typhimurium</i>		
TA98	AF-2 (0.02500~ 0.40)	B(a)P (1.25~20)
TA100	AF-2 (0.00250~ 0.04)	B(a)P (1.25~20)
TA102	BLM (0.25000~ 4.00)	2AA (0.50~ 8)
TA1535	NaN <sub>3</sub> (0.12500~ 2.00)	2AA (0.50~ 8)
TA1537	9A (1.25000~20.00)	2AA (0.50~ 8)
<i>E. coli</i>		
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2 (0.00250~ 0.04)	2AA (1.25~20)
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	AF-2 (0.00125~ 0.02)	2AA (0.50~ 8)
WP2/pKM101	AF-2 (0.01000~ 0.16)	2AA (1.00~16)

\* The mutagenicity test was performed with five doses at least twice.

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acylamide [CAS No. 3688-53-7] (和光純薬工業㈱)

BLM : bleomycin hydrochloride [CAS No. 9041-93-4] (和光純薬工業㈱)

NaN<sub>3</sub> : sodium azide [CAS No. 26628-22-8] (和光純薬工業㈱)

9A : 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate[CAS No. 52417-22-8] (Aldrich Chemical Co., Inc.)

B(a)P : benzo(a)pyrene [CAS No. 50-32-8] (和光純薬工業㈱)

2AA : 2-aminoanthracene [CAS No. 613-13-8] (和光純薬工業㈱)

インキュベーションの有無も検討する必要性がある。

また、エームス試験に使用可能な溶媒に関する文献は、*S. typhimurium* TA 98 あるいは TA 100 株に関するデータはあるが、その他のテスト菌株に関するデータは少ない。

そこで今回、我々は、安衛法テストガイドラインに記載されているテスト菌株など 8 菌株に使用できる適当な溶媒を選択するために、陽性対照物質を用いて 6 種類の溶媒によるエームス試験を実施した。なお、すべてのエームス試験は 37℃、20 分間のプレインキュベーション法で実施し、溶媒（試験溶液）の添加量は 50  $\mu\text{l}$ /プレートとした。

その結果について報告する。

### 実験材料および方法

#### 1. 検討した溶媒

acetone[CAS No. 67-64-1]（試薬特級，純度 99.5 %，和光純薬工業㈱），95 % ethanol[CAS No. 64-17-5]（試薬特級，純度 99.5 %，関東化学㈱），ethylene glycol [CAS No. 107-21-1]（試薬特級，純度 99.5 %，国産化学㈱），glycerol formal [CAS No. 4740-78-7]（東京化成工業㈱），formamide [CAS No. 75-12-7]（純度 98.5 %，東京化成工業㈱）および 10 % PLURONIC F-68 solution [CAS No. 9003-11-6]（Sigma Chemical Co.）について検討した。なお，対照溶媒として DMSO[CAS No. 67-68-5]（生化学用，純度 99.5 %，和光純薬工業㈱）および蒸留水（注射用水，大塚製薬工業㈱）を使用した。

#### 2. 使用したテスト菌株および陽性対照物質

本研究で使用したテスト菌株，陽性対照物質とその設定濃度範囲を Table 1 に示した。陽性対照物 2-(2-furyl)

-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide [AF-2]，benzo(a)pyrene [B(a)P] および 2-aminoanthracene [2 AA] は，それぞれ 10 mg/ml 濃度になるように DMSO に溶解し，9-aminoacridine hydrochloride monohydrate[9 A] は，50 mg/ml 濃度になるように DMSO に溶解し，sodium azide [NaN<sub>3</sub>] および bleomycin hydrochloride [BLM] は，10 mg/ml 濃度になるように蒸留水に溶解し，それぞれプラスチック製小試料びんに 0.2 ml ずつ分注して−20℃に保管した。これらの陽性対照物質保管溶液は，使用時に，各種溶媒を用いて最高濃度の溶液を調製し，その後，段階希釈により最低濃度の溶液までの各濃度溶液を調製した。

#### 3. 復帰突然変異試験（エームス試験）

##### 1) 前培養法

L 字管に Oxoid nutrient broth No. 2 (20 ml) を入れ，解凍した保管テスト菌液を加え，往復式の振盪機を使用して 37℃，8 時間培養し，静止期初期の前培養液を調製した。

##### 2) 試験法

試験は，代謝活性化系の有無で，37℃，20 分のプレインキュベーション法により実施した（Ames, McCann and Yamasaki, 1975 ; Maron and Ames, 1983）。1 プレートあたりの試験溶液（溶媒）の添加量は 50  $\mu\text{l}$  とした。使用した S 9 は，phenobarbital および 5,6-benzo-flavone で前処理した雄 Sprague-Dawley ラットの肝臓から調製されたものをオリエンタル酵母工業株式会社から購入した。コファクターは，エームス試験用の凍結乾燥品をオリエンタル酵母工業株式会社から購入した。使用したプレート数は，各用量あたり 2 枚とした。復帰突然変異により生じたコロニー数は，コロニーカウンター

(COLONY ANALYZER CA -11, SYSTEM SCIENCE CO.)を用いて計測した。それぞれの溶媒を使用したすべての試験は，少なくとも 2 回以上実施し，再現性を確認した。

#### 4. 結果の評価

すべての試験結果について，用量－反応曲線を作成し，蒸留水あるいは DMSO を対照溶媒として実施した試験結果と比較した。さらに陽性対照物質の誘発復帰コロニー数は，それぞれの溶媒対照の 2 倍以上のコロニー数の認められた範囲で，溶媒対照のコロニー数を差し引き，nmol あるいは  $\mu\text{g}$  あたりに換算した。これらの換算値の中で最も高い値を求め，対照溶媒に用いた蒸留水あるいは DMSO の換算値を 1.0 としたときの割合を算出し比較した。

それぞれの溶媒のテスト菌株に対する毒性は，蒸留水あるいは DMSO を溶媒とした試験の background lawn の生育状況を顕微鏡を用いて比較観察することによって確認した。

### 結 果

今回実施したすべてのエームス試験は，試験系に加える溶媒の添加量を 50  $\mu\text{l}$  とし，37℃，20 分間のプレインキュベーション法で実施した。その結果を以下に示した。

1) 今回使用した溶媒のうち glycerol formal は，代謝活性化系によらない場合の TA 102，TA 1535 および TA 1537 株で，溶媒対照のプレートから菌株の生育阻害が認められた (Fig. 1-E, G および I)。これ以外の溶媒の対照プレートには菌株の生育阻害は認められなかった。そして glycerol formal 以外の溶媒を使用した試験においては，すべてのテスト菌株において溶媒対照の 2 倍以上の誘発復帰コロニー数が用量に依存して認められ，今回使用した陽性対照物質を陽性と判定することができた。これらの結果には再現性が認められた。

2) 各試験における換算値 (Fig. 1) および用量－反応曲線 (Fig. 2) を比較した場合，テスト菌株および溶媒の種類によっては，それぞれ異なった値および傾き (反応) を示した。

3) Acetone, formamide および 95 % ethanol で調製した 9 A 溶液の TA 1537 株の試験において，それぞれの換算値および用量－反応曲線は，DMSO を使用した試験の結果と比較して低い値および傾きを示した (Fig. 1-I および Fig. 2-A)。なお，acetone での 9 A 溶液の調製時に沈殿/析出が認められたが，formamide および 95 % ethanol での調製時には沈殿/析出は認められなかった。

4) Formamide は，B(a)P の調製時に沈殿/析出が認められたが，この B(a)P 溶液を使用した TA 98 株の試験の換算値および用量－反応曲線は，DMSO を溶媒とした試験の結果と類似していた (Fig. 1-B および Fig. 2-B)。また，TA 100 株の試験の換算値は DMSO の結果と

類似していたが，用量－反応曲線の反応性は高かった (Fig. 1-D および Fig. 2-D)。さらに 10 % PLURONIC F-68 solution は，B(a)P および 2 AA の調製時に白濁が認められたが，これらの溶液を使用した試験の換算値および用量－反応曲線は，DMSO を溶媒とした試験の結果と類似していた (Fig. 1-B, D, H, J, L, N, P および Fig. 2-B, D, G)。なお，これらの沈殿/析出は，プレートでの培養終了時には認められなかった。

5) Acetone, glycerol formal および 95 % ethanol で調製した B(a)P 溶液を用いた TA 98 および TA 100 株の試験結果は，DMSO を溶媒とした試験の換算値と比較して 1.7~3.2 倍の値を示した (Fig. 1-B および D)。

6) Acetone, glycerol formal および 95 % ethanol で調製した B(a)P 溶液の TA 98 株の試験において，それぞれの用量－反応曲線にピークが認められた後，再び上昇する結果が認められた (Fig. 2-B)。

7) Acetone, ethylene glycol, 95 % ethanol および 10 % PLURONIC F-68 solution で調製した BLM 溶液を用いた TA 102 株の試験の結果は，水を溶媒とした試験の換算値と比較してそれぞれ 2 倍以上の値を示した。しかし，formamide で調製した BLM 溶液の換算値は，水を溶媒とした試験の換算値より低い値を示した (Fig. 1-E)。

8) Acetone は，揮発性が高いこと，10 % PLURONIC F-68 solution は，ピペット操作中に気泡が立ちやすいことから，これらの溶媒は使用しにくかった。

### 考 察

エームス試験を実施する場合，通常，水あるいは DMSO などを使用する。しかし，これらの溶媒に溶解あるいは均一に懸濁しない化合物も多く，このような場合，試験系に毒性を示さない溶媒を選択しなければならないが，選択した溶媒が使用するすべてのテスト菌株に毒性を示さないことを確認しなければならない。これらの溶媒以外にエームス試験に使用が可能であることが示唆されている有機溶媒に acetone, 95 % ethanol, ethylene glycol, glycerol formal, formamide, acetonitrile, ethylene glycol dimethyl ether, 1-methyl-2-pyrrolidinone, p-dioxane, tetrahydrofurfuryl alcohol および tetrahydrofuran などがある (Maron et al., 1981)。また，TA 98 および TA 100 株を使用したエームス試験（プレインキュベーション法）に用いる各種溶媒の検討を行い，ethylene glycol, formamide など 12 種類の溶媒に菌株の生育阻害を示さなかったことの報告もある (幾田由里子ら，1994)。さらにその他の溶媒として非イオン性界面活性剤である Tween 80 を使用して試験溶液を調製している報告などもある (J. M. Lockard et al., 1982 ; 蜂谷紀之ら，1994)。我々も，TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 および WP 2 *uvrA* 株については，20 %



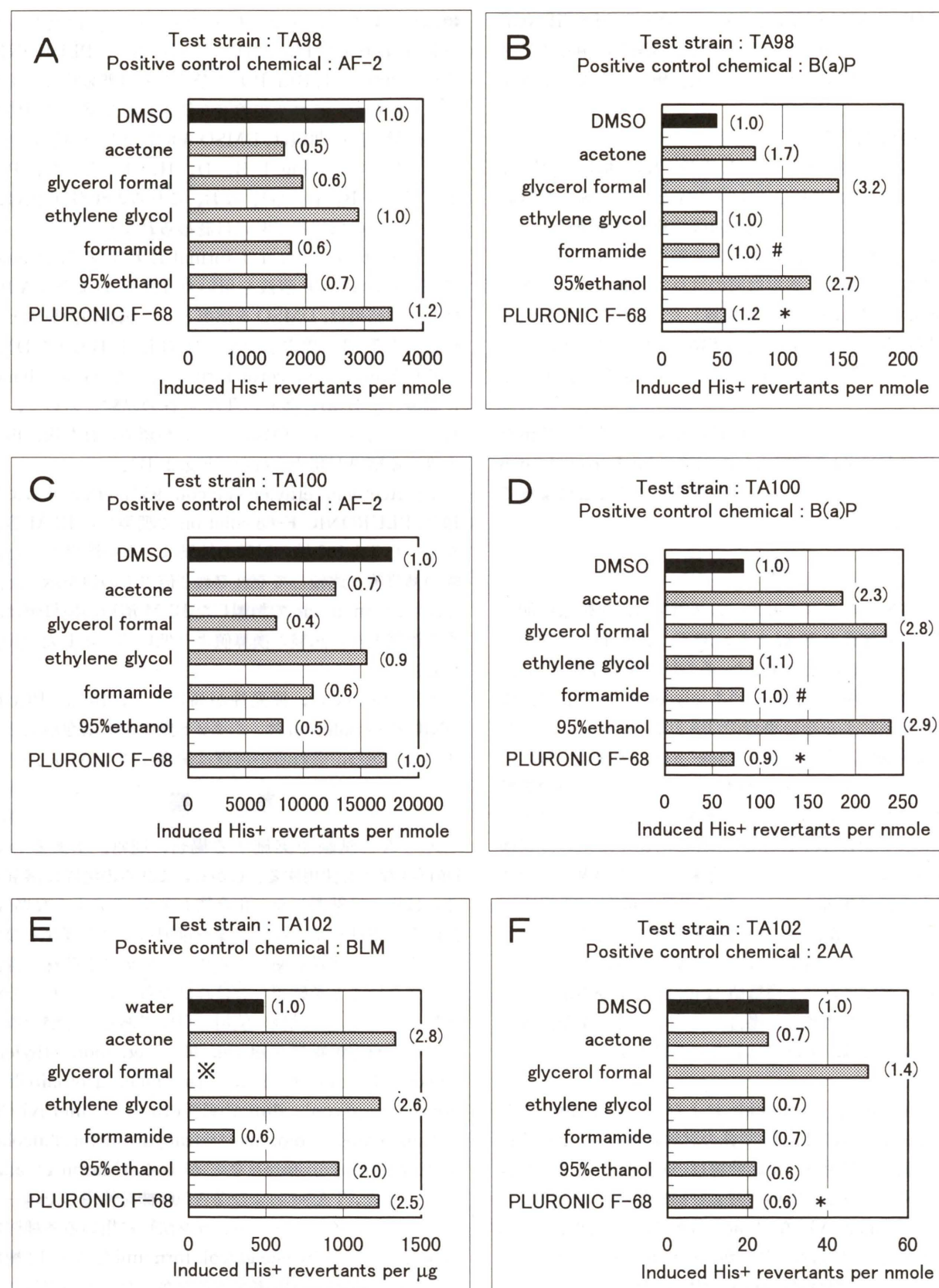


Fig. I (A ~ F)

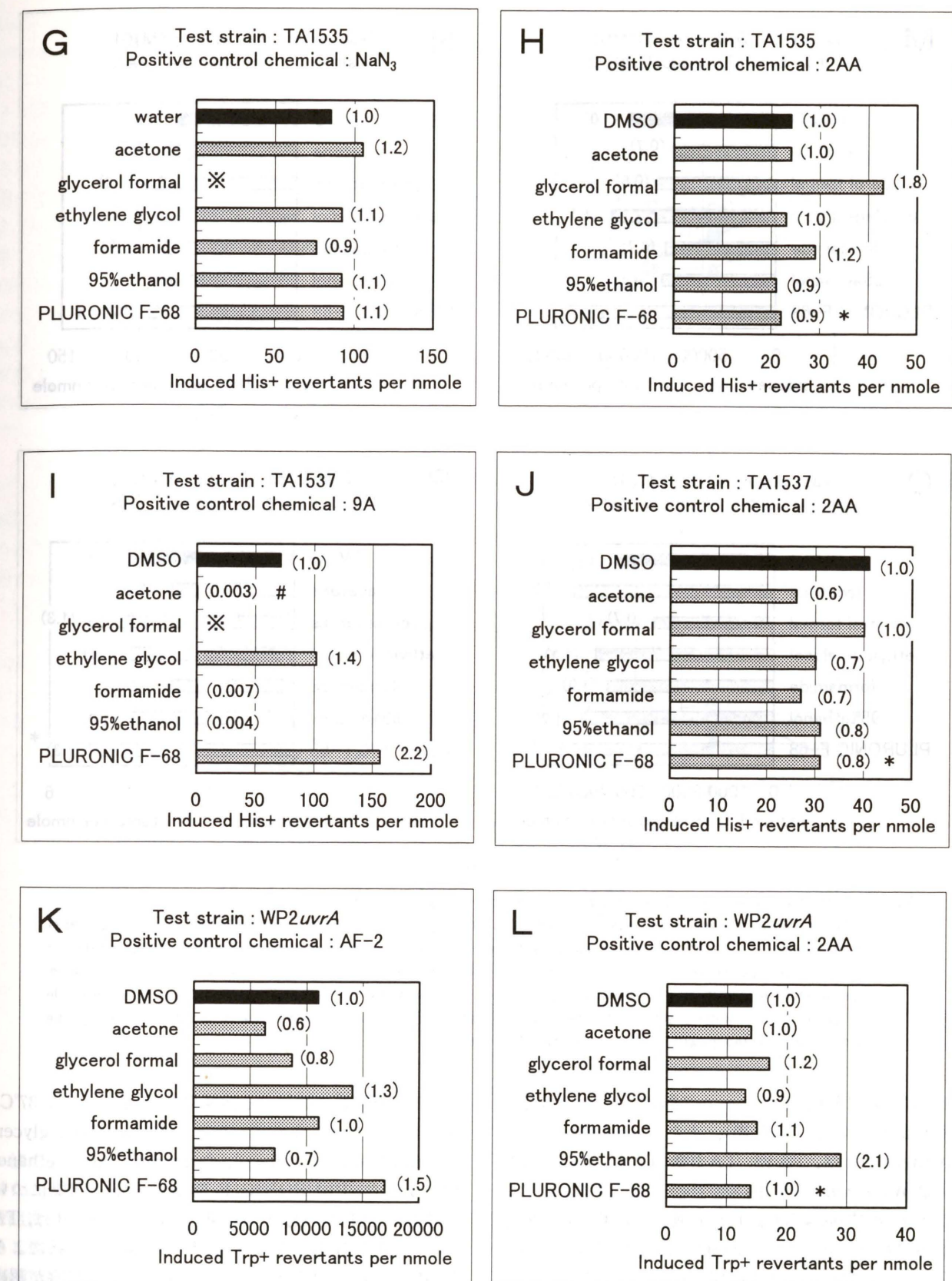


Fig. I (G ~ L)



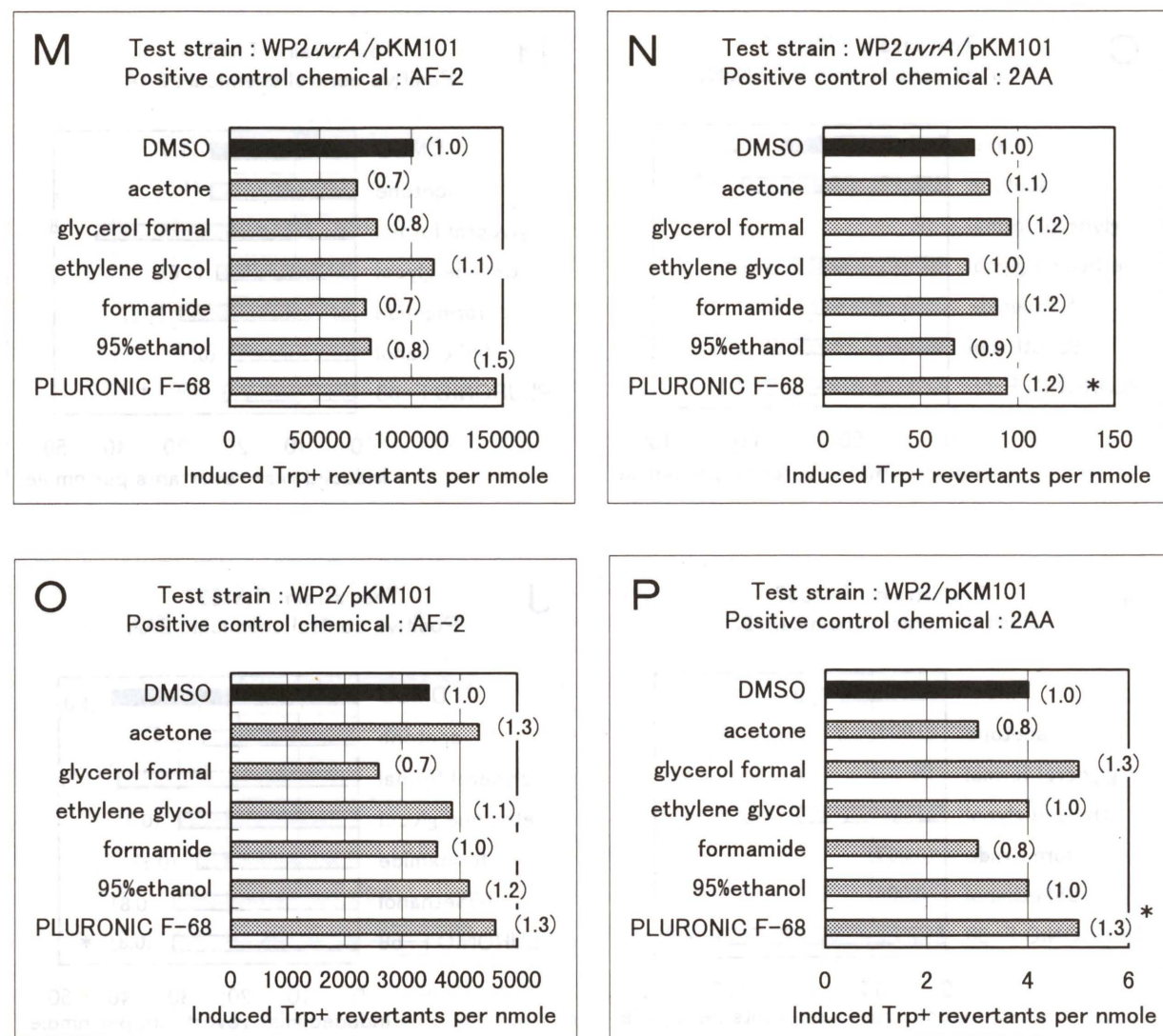


Fig. 1 (M~P)

Fig. 1 Comparative examination of 6 solvents with the microbial mutagenicity test

The microbial mutagenicity test was performed with a 20-min preincubation (Ames et al., 1975; Maron and Ames, 1983) at least twice. All test article solutions and solvents were screened with 50  $\mu$ l/plate. The number of induced His<sup>+</sup> or Trp<sup>+</sup> revertants per nmole or  $\mu$ g was calculated at every dose; the highest value for each chemical and strain is indicated. The numbers in parenthesis represent the relative values when the number of His<sup>+</sup> or Trp<sup>+</sup> induced revertants per nmole or  $\mu$ g of DMSO or water is set as 1.0. The symbols, # and \* indicated precipitation and white cloudy, respectively. The symbol, ※ indicated growth inhibition (toxicity) of test strain.

Tween 80-DMSO 溶液がエームス試験に有効であることも確認している (未発表). また, ethylene glycol dimethyl ether は, TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 および WP 2 uvrA 株を用いたプレート法 (試験系に加えた溶媒の添加量は 100  $\mu$ l) を実施した結果, TA 98 株の溶媒対照のプレートで DMSO の溶媒対照のプレートよりコロニー数がより多く出現する傾向にあり, そのエーテル臭から使用しにくい有機溶媒であった (未発表). また, PLURONIC POLYOLS の *in vitro* 試験での溶媒適合性については, 培養細胞に対して毒性はなく, 変異原性もないことなどの報告がある (R. J. Papciak et al., 1985).

今回, 試験系に添加する溶媒量を 50  $\mu$ l として, 37°C, 20 分間のプレインキュベーション法で acetone, glycerol formal, ethylene glycol, formamide, 95 % ethanol および 10 % PLURONIC F-68 solution の溶媒について適合性を検討した. その結果, glycerol formal は, TA 1535, TA 1537 および TA 102 株の代謝活性化系によらない場合の溶媒対照プレートから菌株の生育阻害が認められた. その他の有機溶媒は, すべてのテスト菌株において生育阻害は認められず, それぞれの陽性対照物質を陽性と判定することができた. これらの有機溶媒を使用した TA 100 株を用いた試験の結果については, Maron が報告した TA 100 株を用いたプレインキュベシ

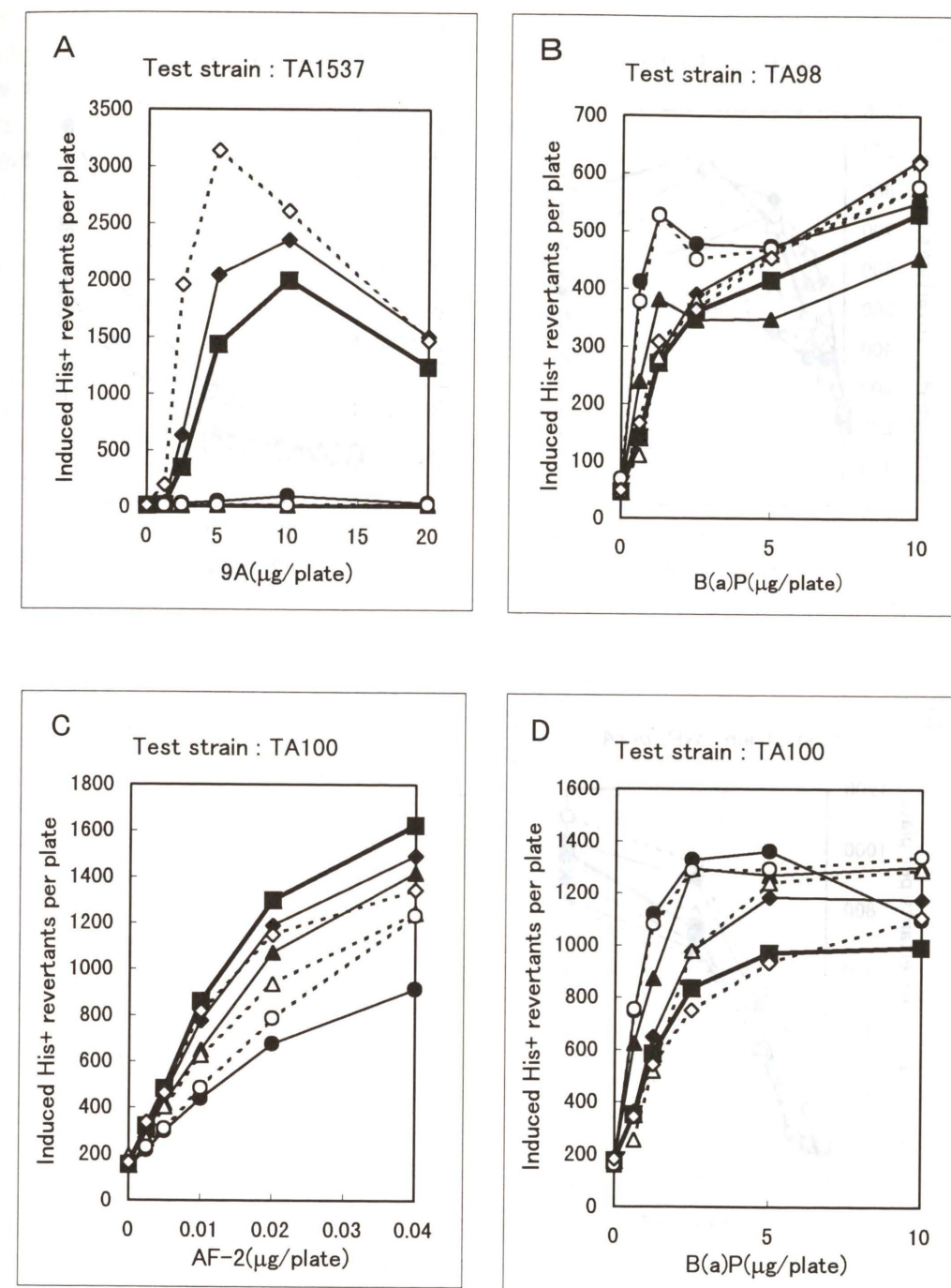


Fig. 2 (A~D)

ン法で陽性判定ができたことと一致していたが, glycerol formal は, TA 1535, TA 1537 および TA 102 株に生育阻害が認められたことから使用しにくい有機溶媒であると思われる. したがって, これまでに使用経験のない溶媒を使用する場合は, 使用するすべてのテスト菌株に対する適合性を検討しなければならないことが示唆された. 各試験における換算値および用量-反応曲線を比較した場合, テスト菌株および溶媒の種類によっては, それぞれ異なった値および傾きを示した. DMSO あるいは蒸留水を対照溶媒として使用した試験

結果と比較して, 溶媒によっては明らかに低い換算値あるいはより高い換算値を示し, 用量-反応曲線も低い反応性あるいは高い反応性を示した. この原因として, 低い換算値あるいは反応性を示した溶媒のうち, 試験溶液の調製時に沈殿/析出が認められた 9 A の acetone 溶液については実質用量の低下によるものと推察された. しかし, 陽性対照物質の沈殿/析出の有無にかかわらず換算値あるいは反応性の低下が認められた溶媒については, 今回の試験結果からは原因を推定することはできなかった. また, 換算値あるいは反応性の増加した溶媒の



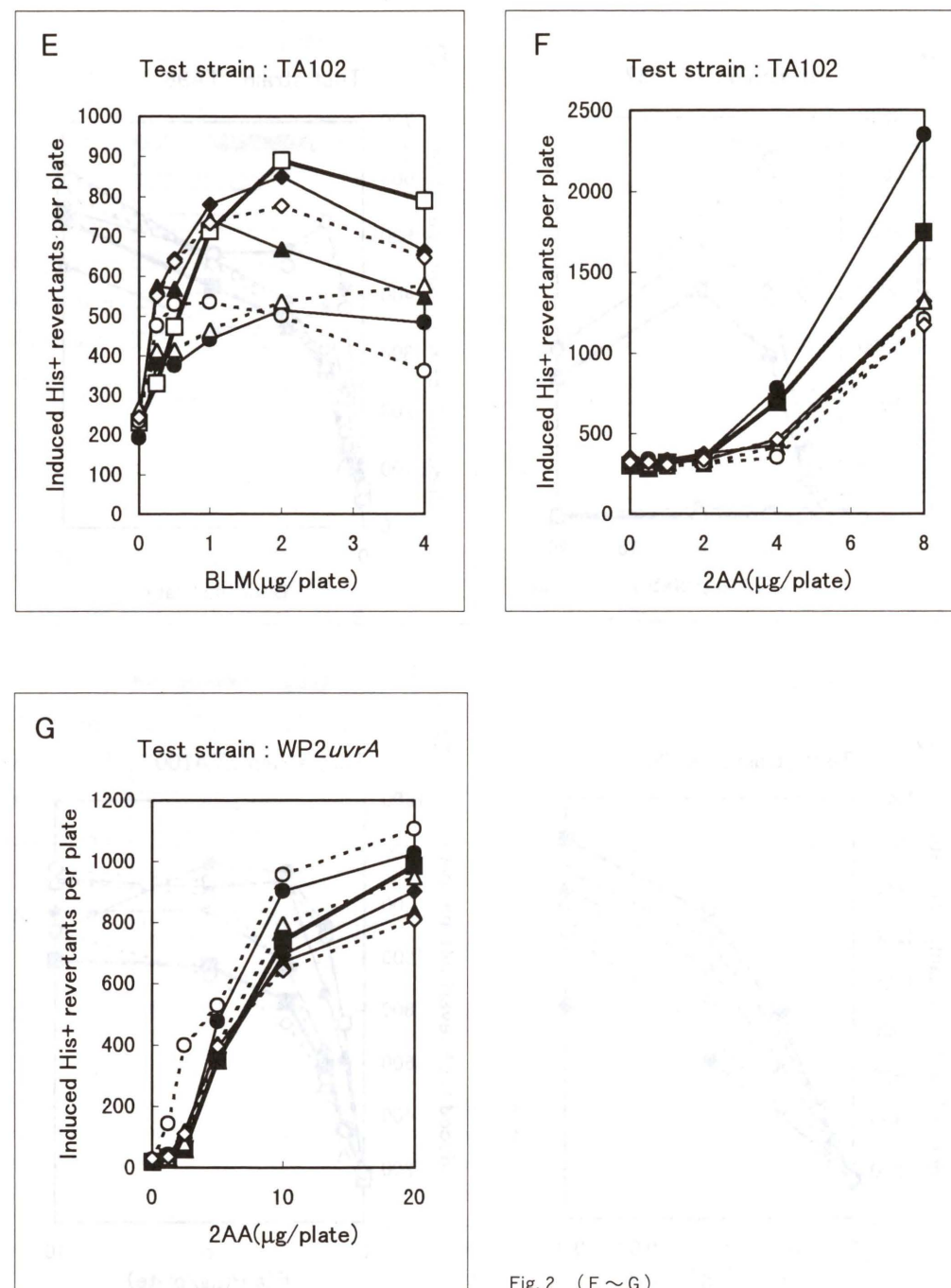


Fig. 2 (E~G)

Fig. 2 Typical dose-response curves to 6 solvents of positive control chemicals

The symbols, ■, □, ▲, ●, ◆, △, ○ and ◇ indicated DMSO, water, acetone, glycerol, formamide, ethylene glycol, formamide, 95% ethanol and PLURONIC F-68 (10%), respectively.

原因についても今後のさらなる検討が必要であると思われる。このような溶媒による誘発復帰コロニー数の出現に対する影響についてはいくつかの報告があり、2Aの変異原性は、acetoneを溶媒とした場合よりDMSOを溶媒とした方がより活性が高く、使用したDMSO量が結果に影響することが知られている (Anderson et al., 1980)。我々が実施したTA 1535およびTA 1537を用いた試験における2Aの変異原性についても、溶媒としてacetoneよりもDMSOを使用した方が用量-反応曲線

の反応性は高かった。また、Nestmannら (Earle R. Nestmann et al., 1985) は、hexachloroacetoneのエームス試験において、DMSOに溶解した場合は変異原性を示し、時間経過とともにその変異原活性は増強したことが、acetoneに溶解した場合には陰性であり、時間経過によって変異原活性を示すことはなかったことを確認している。その原因としてDMSOのhexachloroacetone溶液は、色の変化が観察され、化学反応が溶液中で起こっていることを示した。さらにMoriら (Yukio Mori et al.,

1985) は *S. typhimurium* TA 100 株に対するN-nitrosodialkylaminesの変異原性の有機溶媒の抑制作用について報告しており、水を溶媒として使用したエームス試験では、ラット肝S9の存在下で陽性を示すが、DMSOを溶媒とした場合、変異原性を検出することができなかったかあるいは水を使用した場合の結果より低い値を示すことを確認している。その原因として肝S9による代謝活性化の過程での影響の結果によるものと考察している。一方、Arimotoら (Sakae Arimoto et al., 1982) は、エームス試験におけるtryptophan-pyrollysateの変異原性に対する溶媒の影響について報告しており、acetoneは、Trp-P-1およびTrp-P-2の変異原性を増強し、Trp-P-2の変異原性に対するacetoneの増強作用は、試験系における活性代謝物の増加の結果であったことを示している。

その他の結果として、acetone, glycerol formalおよび95% ethanolで調製したB(a)P溶液のTA 98株の試験において、それぞれの用量-反応曲線にピークが認められた後、再び上昇する結果が認められたが、この原因については不明であるが試験系に何らかの影響を与えているものと思われる。

以上の結果から通常使用されている水あるいはDMSO以外の溶媒をエームス試験に使用する場合、使用するすべてのテスト菌株に対する溶媒の適合性を十分に考慮しなければならないことが示唆された。

#### 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.

Anderson, D. and D. B. McGregor (1980) The effect of solvents upon the yield of revertants in the *Salmonella*/activation mutagenicity assay, *Carcinogenesis*, 1, 363-366.

蜂谷紀之, 滝澤行雄 (1994) プラスチック添加剤の変異原性試験, 変異原性試験, 3, 147-154.

幾田由里子, 山崎裕子 (1994) Ames試験に用いる溶媒の検討, 日本環境変異原学会要旨集, p. 89.

Lockard, J. M., J. W. Prater, C. J. Viau, H. G. Enoch and P. S. Sabharwal, with technical assistance from N. S. Hansberger, J. R. Gleason Jr., S. J. Kamber, C. E. Lambert and J. C. Carter (1982) Comparative study of the genotoxic properties of Eastern and Western U. S. shale oils, crude petroleum, and coal-derived oil, *Mutat. Res.*, 102, 221-235.

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

Maron, D., J. Katzenellenbogen and B. N. Ames (1981) Compatibility of organic solvents with the *Salmonella*/microsome test, *Mutat. Res.*, 88, 343-350.

Nestmann, Earle R., George R. Douglas, David J. Kowbel, and Tina R. Harrington (1985) Solvent interactions with test compounds and recommendations for testing to avoid artifacts, *Environmental Mutagenesis*, 7, 163-170.

Mori, Y., H. Yamazaki, K. Toyoshi, Y. Emi, K. Uchida, M. Tsutsumi and Y. Konishi (1985) Inhibitory effect of organic solvents on the mutagenicity of N-nitrosodialkylamines in *Salmonella*, *Mutat. Res.*, 142, 153-158.

Arimoto, S., N. Nakano, Y. Ohara, K. Tanaka and H. Hayatsu (1982) A solvent effect on the mutagenicity of tryptophan-pyrollysate mutagens in the *Salmonella*/mammalian microsome assay, *Mutat. Res.*, 102, 105-112.



# ピレスロイド系殺虫剤およびその共力剤 (1,1'-オキシビス [2,3,3,3-テトラクロロプロパン]) の Ames 変異原性

森 康明<sup>1</sup>, 長谷川 一夫<sup>1</sup>, 宇都宮 暁子<sup>1</sup>, 節田 節子<sup>1</sup>  
後藤 純雄<sup>2</sup>, 小野寺 祐夫<sup>3</sup>, 松下 秀鶴<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 神奈川県衛生研究所 〒241 横浜市旭区中尾 1-1-1

<sup>2</sup> 国立公衆衛生院 〒108 東京都港区白金台 4-6-1

<sup>3</sup> 東京理科大学薬学部 〒162 東京都新宿区市ヶ谷船河原町 12

<sup>4</sup> 静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科 〒422 静岡市谷田 52-1

## Ames mutagenicity of pyrethroid pesticides (tetramethrin, permethrin, empenthrin, and allethrin) and 1,1'-oxybis[2,3,3,3-tetrachloropropane] as a synergist

Yasuaki Mori<sup>1</sup>, Kazuo Hasegawa<sup>1</sup>, Akiko Utsunomiya<sup>1</sup>, Setsuko Setsuda<sup>1</sup>,  
Sumio Goto<sup>2</sup>, Sukeo Onodera<sup>3</sup> and Hidetsuru Matsushita<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory  
1-1-1, Nakao, Asahi-Ku, Yokohama 241, Japan

<sup>2</sup> National Institute of Public Health  
4-6-1, Shirokanedai, Minato-Ku, Tokyo 108, Japan

<sup>3</sup> Faculty of Pharmaceutical Science, Science University of Tokyo  
12 Funagawara-machi, Ichigaya, Shinjuku-Ku, Tokyo 162, Japan

<sup>4</sup> Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka  
52-2, Yada, Shizuoka 422, Japan

### Summary

Pyrethroid pesticides (tetramethrin, permethrin, empenthrin and allethrin), with 1,1'-oxybis[2,3,3,3-tetrachloropropane] (S 421) as a synergist, were assayed for their mutagenic activities in both TA 98 and TA 100 strains by the micro-suspension method. Pyrethroid pesticides tested (below 1 mg per plate) in this assay were not mutagenic in either TA 98 or TA 100 strains, with or without S 9 mix. Only the S 421 compound was found to be mutagenic with 215 revertants per mg towards TA 100, in the absence of S 9 mix. The addition of S 9 mix reduced mutagenic activity.

Acetone extracts of household product samples were also assayed for their mutagenic activity in the TA 100 strain without S 9 mix. Pyrethroid pesticides and S 421 compound concentrations were assayed by GC/MS. All extracts were mutagenic in the TA 100 strain : their activities accounted for 9.3 to 74.4% by the S 421 compound content of the extracts, depending on the product.

**Keywords :** Ames mutagenicity test, 1,1'-oxybis[2,3,3,3-tetrachloropropane], synergist, pyrethroid pesticide, household product

受付 : 1997 年 11 月 28 日

受理 : 1998 年 1 月 8 日

©日本環境変異原学会



## 緒 言

1,1'-oxybis [2,3,3,3-tetrachloropropane] (S 421) は、日本では農薬登録されていないが、家庭用 pyrethroid 系殺虫剤の効果を高めるため、共力剤としてスプレー製品や防虫シートなどに添加されており、年間約 200 t (1987 年) 生産されている。S 421 は、ラットへ 10~60 mg/kg 体重の経口投与を続けると、雄の場合、腎臓肥大がみられるとの報告 (植村ら, 1991) や、ラットへの経口投与によって肝傷害が誘導 (関田ら, 1988) されるとの報告がある。また、母乳中からも S 421 が検出 (Miyazaki et al., 1981) されている。

近年、家屋内塵芥 (吉田ら, 1997) や家庭用品 (中島ら, 1996) 中の S 421 の測定例が報告されているが、現在、変異原性に関する報告例は見当たらない。そこで、今回マイクロサスペンション法を用いて pyrethroid 系農薬 4 種および S 421 の変異原性を測定した結果、S 421 のみが TA 100 菌株の S 9 mix 無添加のもとで高い変異原活性を示すことを認めた。ついで、防虫シート、衣料用防虫剤および掃除機用集塵パック試料を acetone 抽出し、GC/MS による S 421 および pyrethroid 系農薬濃度の測定および変異原性を測定したところ、若干の知見が得られたので報告する。

## 実験材料および方法

### 2.1 試 薬

empenthrin (純度 99.5 %), S 421 (純度 99 %) (CAS No 127-90-2), allethrin (純度 95 %) (CAS No 584-79-2), permethrin (純度 97 %) (CAS No 52645-53-1) および tetramethrin (純度 98 %) (CAS No 7696-12-0) は林純薬工業 (株) 製の試薬をそのまま用いた。また、dimethylsulfoxide はルミナゾール用試薬を、acetone は和光純薬工業 (株) の残留農薬用試薬を、その他の試薬は特級品を用いた。

### 2.2 家庭用防虫防ダニ剤の抽出と変異原性試験

細片した試料の 0.5 g を共栓付き三角フラスコに精密にはかり取り、acetone 50 ml を加えて 10 分間超音波抽出した。次に、ガラスろ過器 (G-1) でろ過し acetone で全量 50 ml とした。

これらの acetone 抽出物および標準物質の変異原性は *S. typhimurium* TA 98 菌株と TA 100 菌株を使用し、マイクロサスペンション法 (Kado et al., 1985) によって行った。試験菌株を 37°C で約 15 時間振とう培養して得た菌懸濁液 (100 ml) 中の菌を遠心分離 (10000 × g, 4°C, 10 分間) により集めた後、0.015 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) の 10 ml に再懸濁し、10 倍濃度の菌懸濁液を調製した。次にあらかじめ dimethylsulfoxide 5 μl を加えた滅菌済み小試験管に試料の一定量を段階的に

(5~6 dose) 加え 40°C 以下で溶媒変換した。以後の操作は既報 (Mori et al., 1993) に従った。試験は各濃度について原則として 2 枚のプレートを用いて復帰コロニー数の平均値を求め、量-反応関係が直線になる範囲から外そうとして単位重量当りの復帰コロニー数を求めた。

### 2.3 農薬の測定

既報 (宇都宮ら, 1996) に従って、acetone 抽出液の一定量を GC/MS に注入し SIM 法により定量を行った。GC/MS による分析測定条件は以下のとおりである。GC/MS 装置: HP-5972 型, カラム: HP-5 (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm), 注入口温度: 280°C, カラム温度: 50°C (1 分間) ~昇温 40°C/分~170°C~昇温 5°C/分~270°C (2 分間)。

## 結 果

### 3.1 S 421 と pyrethroid 系農薬標準品の変異原性

pyrethroid 系農薬 (tetramethrin, permethrin, empenthrin および allethrin) およびその共力剤として使用されている S 421 の変異原性を *S. typhimurium* TA 98 と TA 100 の両菌株を用いて ±S 9 mix の条件下でマイクロサスペンション法により試験した。その結果を Table 1 および Fig. 1 に示す。

S 421 は TA 100 (±S 9 mix) の条件下で変異原性を示し、TA 100 菌株の非代謝活性系で最も高い変異原性を示すことがわかった。TA 100 (-S 9 mix) における S 421 の変異原活性は 215 rev/mg であった。この変異原活性は S 9 mix の添加により減少した。また、pyrethroid 系農薬の 4 種類は TA 98 および TA 100 両株の試験系のいずれにおいても 0~1 mg の濃度の範囲内で変異原性を示さなかった。TA 100 菌株における Ames 試験で、allethrin は変異原性を示す (Moriya et al., 1983) とあるが、Moriya らの報告でも非代謝活性系でプレート当たり 0~1 mg の濃度範囲内における復帰コロニー数は、自然復帰コロニー数の 2 倍以下を示している。マイクロサスペンション法による今回の実験は 0~1 mg の濃度の範囲内で行っており非代謝活性系においては、Moriya らと同様な結果が得られた。代謝活性系においては、Ames 法に比べてマイクロサスペンション法の変異原活性は低く、そのため 0~1 mg の濃度の範囲内で変異原性を示さなかったと考えられた。permethrin については Moriya らの Ames 試験結果と一致した。

### 3.2 防虫・防ダニ処理の家庭用品から得られた acetone 抽出液の変異原性

試料として、カバータイプの防虫処理製品 3 種類 (紙部分とビニール部分を別々に測定)、防虫処理シートおよび集じんパックの各 1 種類の計 8 試料の acetone 抽出液の変異原性試験を行った。すなわち、抽出液の一定量をプレート当り試料重量として 2~60 mg となるよう段

Table 1 Mutagenicity of pyrethroid pesticides

Compounds	Dose μg/plate	Number of revertants per plate			
		TA98 strain		TA100 strain	
		-S9mix	+S9mix	-S9mix	+S9mix
Tetramethrin	0	26±3	25±6	127±14	130±8
	5	35,18	24,19	142,122	134,130
	10	23,23	17,20	126,115	126,150
	20	17,25	23,21	125,139	130,121
	50	22,17	21,19	118,116	163,136
	100	15,24	23,24	120,134	133,159
	200	22,19	27,27	141,164	156,147
	500	17,18	27,26	149,131	143,132
Permethrin	1000	16,28	28,22	130,145	160,153
	0	22±2	24±3	57±19	59±10
	5	22,28	26,28	68, 67	73, 59
	10	32,24	23,20	67, 82	61, 48
	20	23,11	39,20	55, 54	53, 63
	50	19,25	29,26	64, 66	72, 59
	100	30,22	30,24	51, 67	54, 57
	200	19,32	25,23	85, 74	71, 71
Empenthrin	500	28,28	28,29	73, 55	67, 73
	1000	24,27	33,21	78, 69	71, 66
	0	15±2	19±4	92±8	89±8
	50	12,18	11,15	98, 84	101,105
	100	12,18	11,15	95, 68	107, 96
	200	18,10	16,16	81, 79	101, 98
	500	14, 9	18,10	97, 79	99, 88
	1000	12,17	10,11	88, 69	92,104
Allethrin	2000	16,21	14,15	81, 85	83, 79
	0	26±3	25±6	127±14	130±8
	5	23,22	25,22	115,119	132,115
	10	25,18	19,13	122,114	146,124
	20	20,21	18,22	120,127	152,123
	50	21,25	18,26	121,105	117,111
	100	30,36	27,23	121,105	112,136
	200	23,23	17,22	103,131	127,146
	500	20,24	24,18	130,124	117,139
	1000	25,29	25,26	140,133	128,102

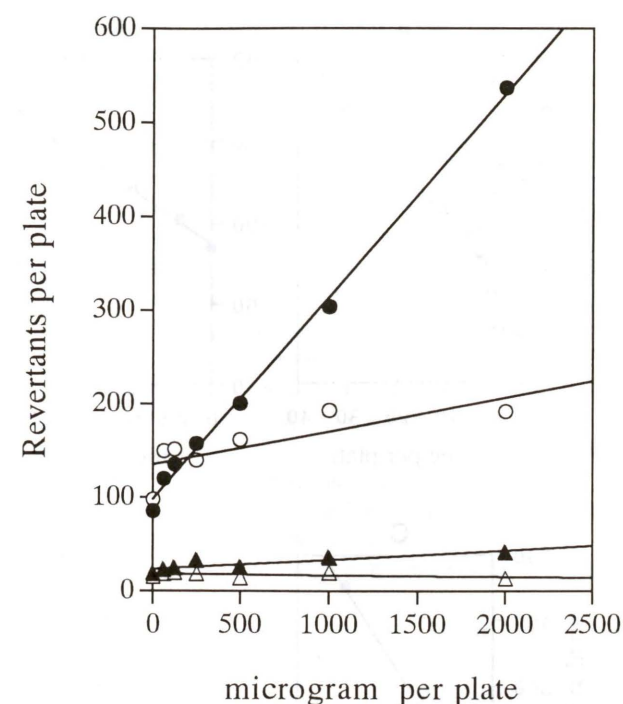


Fig. 1 Mutagenicity of S421 standard.

● : TA 100-S 9 mix, ○ : TA 100+S 9 mix,  
▲ : TA 98-S 9 mix, △ : TA 98+S 9 mix

## 考 察

S 421 は Fig. 1 に示したように TA 100 (±S 9 mix) の条件下で変異原性を示し、TA 100 菌株の非代謝活性系で最も高い変異原活性を示すことから、塩基置換型の直接変異原であると考えられる。

一方、家庭用品から得られた acetone 抽出液は、Fig. 2 に示したように、TA 100 (-S 9 mix) の試験系で陽性であることから、これらの変異原性に対する S 421 の寄与率を算出することを試みた。

抽出液の比変異原活性 (Fig. 2) と抽出液中 S 421 の存在量 (Table 2) および S 421 の比変異原活性 (215 rev/mg) のデータから、抽出液の全変異原性に対する S 421 の変異原寄与率を求めた。その結果を Table 3 に示す。Table 3 から、その寄与率は 9.3~74.4 % となり、試料によりその寄与率は大きく異なることが認められた。カバータイプの防虫処理製品は、その製品の材質部分により変異原活性が異なった。紙部分が高いものとビニール部分が高いものがあり、acetone より抽出される未知変異原性物質の相違によるものと推察された。

一方、試験した抽出液に存在する農薬の最高値は empenthrin が 1.15 mg/g, allethrin が 0.39 mg/g, tetramethrin が 1.88 mg/g, permethrin が 2.07 mg/g であることから、pyrethroid 系農薬による変異原性の寄与は認められなかった。

以上の結果から、共力剤として用いられている S 421

階的に添加し、抽出液の変異原性を測定した。その結果を Fig. 2 に示す。抽出液の変異原活性は、量-反応関係が直線になる範囲から外そうとして単位重量当りの復帰コロニー数を求めたところ、その値は 2,110~12,170 rev/g であった。なお、集じんパック試料は菌株に対する生長阻害作用のため量-反応曲線が得られなかった。

### 3.3 acetone 抽出物の GC/MS

acetone 抽出液中の pyrethroid 系農薬と S 421 濃度を GC/MS を用いて定量した。pyrethroid 系農薬および S 421 濃度の測定結果を Table 2 に示す。

empenthrin は 0.01 mg/g 以下~1.15 mg/g, allethrin 0.01 mg/g 以下~0.39 mg/g, tetramethrin は 0.02 mg/g 以下~1.88 mg/g, permethrin は 0.02 mg/g 以下~2.07 mg/g, また共力剤である S 421 は 3.11~7.30 mg/g であった。



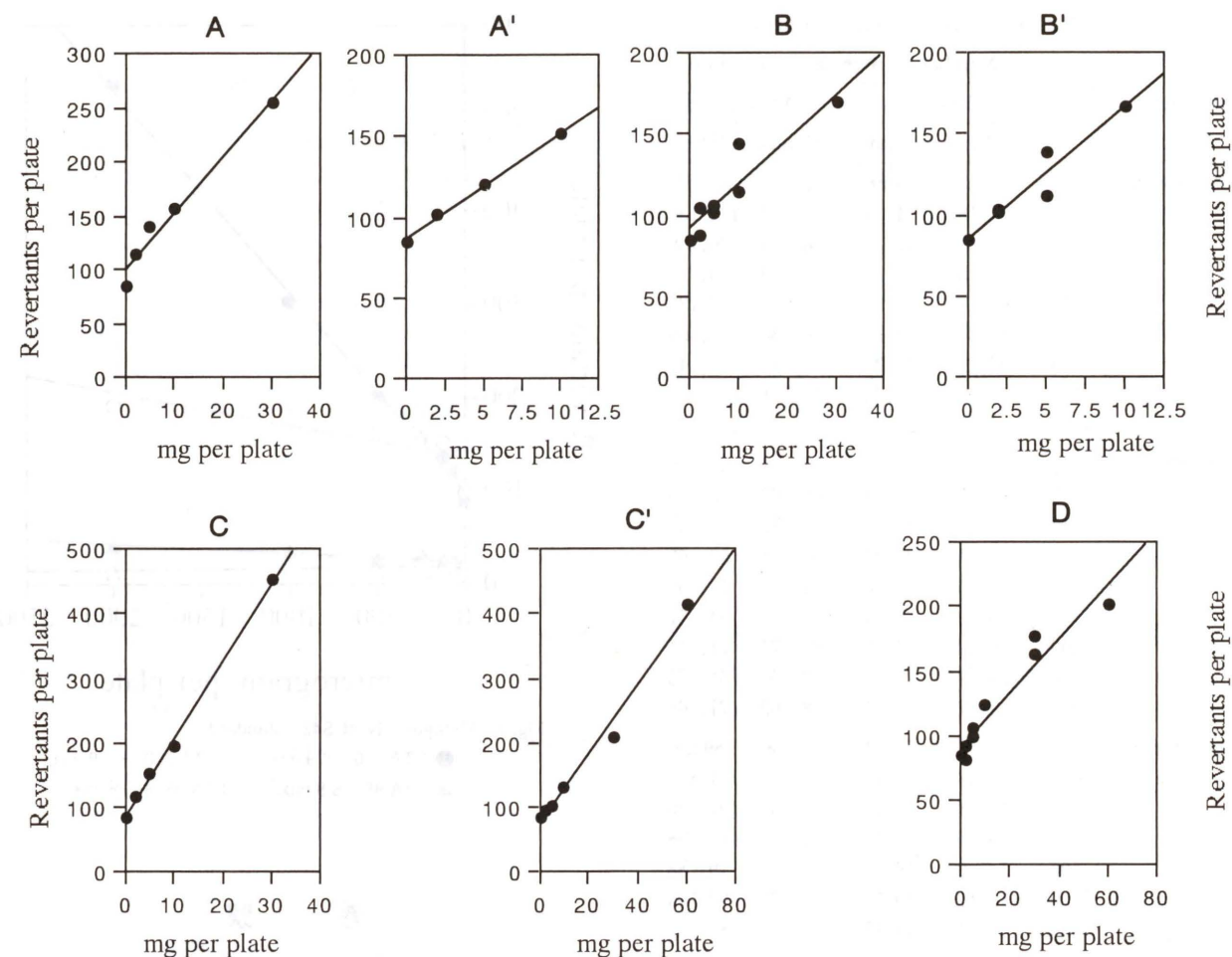


Fig. 2 Mutagenicity of acetone extracts of moth/mite-proofed household samples toward *S. typhimurium* TA 100 without S9 mix.  
A, A', B, B', C, C' and D : same as in Table 2.

Table 2 Concentrations (mg/g) of pyrethroid pesticides and S421 in acetone extracts of several moth/mite-proofed household

Samples	Emperthrin	Allethrin	Tetramethrin	Permetrin	S421
A <sup>a)</sup>	1.15	<0.01	1.88	<0.02	7.15
A <sup>1b)</sup>	0.84	<0.01	0.96	<0.02	5.47
B <sup>a)</sup>	0.78	<0.01	1.00	<0.02	5.28
B <sup>1b)</sup>	0.64	<0.01	0.84	<0.02	4.80
C <sup>a)</sup>	0.63	<0.01	0.86	<0.02	5.26
C <sup>1b)</sup>	0.03	<0.01	0.28	<0.02	3.11
D <sup>c)</sup>	<0.01	0.39	<0.02	<0.02	7.30
E <sup>d)</sup>	<0.01	<0.01	<0.02	2.07	4.42

a) A, B, C : part of paper in clothing insecticide (cover-type)

b) A<sup>1</sup>, B<sup>1</sup>, C<sup>1</sup> : part of vinyl in clothing insecticide (cover-type)

c) D : insecticidal sheet,

d) E : dust pack for a vacuum cleaner

Table 3 Contribution of S421 to the total mutagenicity of acetone extracts of several moth/mite-proofed household.

Samples	Mutagenicity (rev./g)	Concentrations of S421 (mg/g)	Contribution (%)
A	5240	7.15	29.3
A <sup>1</sup>	6550	5.47	18.0
B	2790	5.28	40.7
B <sup>1</sup>	8160	4.80	12.6
C	12170	5.26	9.3
C <sup>1</sup>	5420	3.11	12.3
D	2110	7.30	74.4

A, A<sup>1</sup>, B, B<sup>1</sup>, C, C<sup>1</sup>, D : same as in Table 2.

Mutagenic activity of S421 toward TA100 without S9mix was 215 rev/mg.

は Ames 試験による変異原性を示すことが明らかとなった。防虫・防カビ処理した家庭用品から得られた acetone 抽出液の変異原性に対する S 421 の寄与率には、大きな差が認められた。pyrethroid 系農薬による変異原性寄与は認められず、試料抽出液にはその他の変異原物質の存在が示唆された。

#### 参考文献

Kado, N. Y., C. Manson, E. Eisenstadt and D. P. H. Heieh (1985)

The kinetics of mutagen extraction in the urine of cigarette smokers, *Muta. Res.*, 157, 227-233.

Miyazaki, T., Kaneko, S., Horii, S. and T. Yamagishi (1981) Identification of the synergist bis (2,3,3,3-tetrachloropropyl) ether in Human Milk, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26, 420-423.

Mori, Y., Onodera, S., Takitani, S. and H. Matsushita (1993) A simple and sensitive method for detection of mutagens in water by a combination of solid phase extraction and micro-suspension procedure, *J. Environ. Chem.*, 3, 561-569.

Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato and Y. Shirasu (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Muta. Res.*, 116, 185-216.

中島晴信, 宮野直子, 松永一朗(1996)家庭用品中の 2,3,3,3'-2',3',3'-オクタクロロジプロピルエーテル (S-421) の定量, 大阪府立公衆衛生研究所報, 労働衛生編, 34, 23-28.

関田清司, 川崎 靖, 松本清司, 落合敏秋, 中路幸男, 小林和雄, 隆矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫 (1988) ラットによる bis (2,3,3,3-tetra-chloropropyl) ether の亜急性毒性試験, 衛生試験所報告, 106, 33-38.

植村振作, 河村 宏, 辻万千代, 富田重行, 前田静夫 (1991) 農薬毒性の事典, P 194, 三省堂, 東京.

宇都宮暁子, 長谷川一夫, 節田節子 (1996) 家庭用品中のピレスロイド系農薬の実態調査, 第 33 回全国衛生化学技術協議会年會講演集, 200-201, 京都.

吉田精作, 田口修三, 福島成彦 (1997) 家屋内塵芥中の残留オクタクロロジプロピルエーテル, 衛生化学, 43, 64-67.



# Rapid induction of replicating DNA synthesis in response to 2-amino-3, 4-dimethylimidazo [4,5-*f*] quinoline in rat hepatocytes

Ataru Okumura<sup>1</sup>, Shigeyuki Sugie<sup>1</sup>,  
Keiji Wakabayashi<sup>2</sup> and Hideki Mori<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology, Gifu University School of Medicine  
40 Tsukasa-machi, Gifu-City 500, Japan

<sup>2</sup> Cancer Prevention Division, National Cancer Center Research Institute  
1-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

## Summary

Genotoxicity and mitogenicity of 2-amino-3, 4-dimethylimidazo [4,5-*f*] quinoline (MeIQ) were estimated by the simultaneous measurement of unscheduled DNA synthesis (UDS) and replicative DNA synthesis (RDS). A newly developed "cell culture insert DNA retention" (CDR) method was used and results were compared with those of a liver carcinogen, 2-acetylaminofluorene (2-AAF) and a tumor promoter, phenobarbital. An increase in UDS and RDS was observed in primary cultures of male ACI/N rat hepatocytes exposed to 10<sup>-8</sup>~10<sup>-5</sup> M MeIQ, within four hours. This indicates that MeIQ-generated cell proliferation, as in the case of 2-AAF, is an early event in inhibition. This CDR approach suggests that the mitogenicity of MeIQ needs emphasis in multiple-step carcinogenesis.

**Keywords :** Cell culture insert DNA retention, MeIQ, Genotoxicity, Mitogenicity, Risk assessment

## Introduction

There are numerous synthetic or naturally occurring carcinogens including non-genotoxic types, in our environment (Gold et al., 1992 ; Higginson, 1993 ; Hirono, 1993 ; Karaer, 1996 ; Ruder, 1996). Ubiquitous exposure to environmental mutagens and carcinogens is one of the major problems of mankind (Ames, 1979 ; Shubik, 1995 ; Sugimura, 1988) and screening and risk assessment of such chemicals is a particularly important issue (Fan et al., 1995 ; Hayashi, 1992).

A series of mutagenic-carcinogenic substances have been found in cooked meat and fish in the last 15 years (Sugimura, 1995 ; Sugimura, 1997 ; Sugimura et al.,

1996 ; Wakabayashi et al., 1992). Those heterocyclic amines (HCAs) were isolated by monitoring the fractionation and purification of mutagens by using microbial mutation assays and produce malignant neoplasms of large intestine, mammary gland, liver or forestomach in rodents (Sugimura, 1995 ; Sugimura, 1997 ; Sugimura et al., 1996). The bacterial metabolite 2-amino-3,6-dihydro-3-methyl-7*H*-imidazo [4,5-*f*] quinolin-7-one (7-OHIQ) was suspected to induce colon cancer in rodents, although Weisburger et al. (1994) reported that 7-OHIQ is a direct-acting mutagen in the Ames test but negative in the Williams DNA repair test and concluded that this compound is not carcinogenic, indicating difficulties in risk assessment and carcinogenic testing of newly isolated chemicals.

Recently, evidences suggesting that mitogenesis (induced cell division) plays a dominant role in carcinogenesis have been accumulated (Ames and Gold,

received : November 13, 1997

accepted : February 16, 1998

\* To whom reprint requests should be addressed.

© Environmental Mutagen Society of Japan



1990; Butterworth et al., 1988; Cohen and Ellwein, 1990; Cohen and Ellwein, 1991; Furihata and Uno, 1993). Chronic proliferation induced via compensatory mechanisms has been well analyzed, but the direct action of chemicals in the early phase of initiation is still not understood well. Accordingly, simultaneous analysis of genotoxicity and mitogenicity of chemicals at various doses should be an advantageous approach for study of mechanisms of action in addition to simple screening of carcinogens. In the present report, genotoxic and mitogenic ability of MeIQ and other genotoxic carcinogens are evaluated using a newly developed cell culture DNA retention (CDR) method (Okumura et al., 1996).

### Materials and methods

A 25 mm cell culture insert container and membrane, Falcon 3091 (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) was employed for the cell culture, digestion of cytoplasm and retention of DNA. [Methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (1.5~2.2 TBq/m mol) was purchased from Amersham Japan Inc., (Tokyo, Japan).

2-Amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoline (MeIQ) was provided by Nard Institute, Osaka. 2-Acetylaminofluorene (2-AAF, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) and the promoter carcinogen, phenobarbital (PB, Maruishi Chemical Co. Ltd., Osaka, Japan) were used as typical carcinogens. 500 ml of Williams' Medium E Incomplete (WEI) was made by supplementing 50 mg streptomycin (Meiji-Seika Inc., Tokyo, Japan) and 0.15 g L-glutamine (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) to Williams' Medium E (GIBCO/BRL Life Technologies, Inc., New York). Williams' Medium E Complete (WEC) contained 10% fetal bovine serum (GIBCO/BRL).

Hepatocytes were isolated from ten-week-old male ACI/N rats (200 g) purchased from Clea Japan, Inc. (Tokyo, Japan) and collected by a modification of the method described previously (Okumura et al., 1996). Cells were prepared at  $1.43 \times 10^5$  viable cells/ml in WEC. 700  $\mu$ l aliquots of cell suspension were distributed into the cell culture inserts. 100  $\mu$ l of suppression medium (WEI for subgroups 1 and 3, WEI adjusted with 100 mM HU (Nacalai Tesque, Japan) for subgroups 2 and 4) were added and incubation was for 1 hour at 37°C with 100% humidity. Then, 100  $\mu$ l aliquots of RI medium (WEI containing 100  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H] thymidine) and the same volume of sample

medium (appropriate concentrations of sample chemicals for subgroups 3 and 4, WEI for subgroups 1 and 2) were overlaid, and the incubation was continued for an additional 4 hours. After the incubation, the steps of nucleation and DNA purification were performed and processed for liquid scintillation or autoradiography.

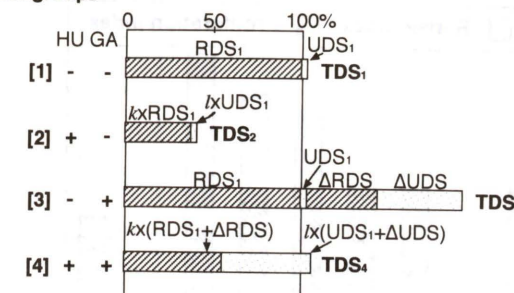
### Results

Fig. 1 displays effects of HU and the genotoxic agent (GA) on hepatocyte DNA synthesis. Total DNA synthesis (TDS) consisting of replicative DNA synthesis (RDS) and unscheduled DNA synthesis (UDS) was measured by scintillation counting. HU inhibits RDS by  $k$  and influences UDS by  $l$ . Base line RDS ( $RDS_1$ ), base line UDS ( $UDS_1$ ), chemically induced RDS ( $\Delta RDS$ ), chemically induced UDS ( $\Delta UDS$ ), total RDS and total UDS were calculated from the simultaneous equations of [1]~[4] (Fig. 1).

The  $k$  value is estimated by liquid scintillation and the  $l$  value by the autoradiographical method (Fig. 1). Fifty percent FBS was used for the estimation of  $k$  value which influences RDS but never induces DNA damage. Unless otherwise stated, data expressed as mean  $\pm$  S. D. were derived from at least 3 independent experiments. Amounts of DNA synthesis induced by test chemicals were expressed as percentages of  $RDS_1$  values (% $RDS_1$ ). The indices shown in Fig. 1, can be generally used to describe genotoxicity and mitogenicity of chemicals because they are independent of the amount of DNA applied or scintillation counter model. The viability of the cultured hepatocytes after incubation was always more than 90%. Supplementation of FBS reduced RDS by approximately 30%. HU suppressed RDSs by approximately 35%.  $RDS_1$  was calculated at  $3063 \pm 126$  cpm and  $UDS_1$  was  $167 \pm 15$  cpm. There were no significant differences in UDS grains between subgroups with HU (subgroups 2 and 4) and those without HU (subgroups 1 and 3). As a result, the  $l$  value was estimated at 1.0.

Values for DNA synthesis induced by genotoxic and non-genotoxic agents are shown in Table 1. Total UDS and total RDS, expressed as indices, are illustrated in Fig. 2. Treatment with MeIQ and 2-AAF was associated with increase of total amounts of DNA synthesis. MeIQ induced a larger extent of UDS at  $10^{-7}$  M to  $10^{-5}$  M. Of interest was the finding that

### Subgroups



### Solutions

$$\begin{aligned} RDS_1 &= \frac{l \times TDS_1 - TDS_2}{l - k} \\ UDS_1 &= \frac{TDS_2 - k \times TDS_1}{l - k} \\ \Delta RDS &= \frac{l \times (TDS_3 - TDS_1) - (TDS_4 - TDS_2)}{l - k} \\ \Delta UDS &= \frac{(TDS_4 - TDS_2) - k \times (TDS_3 - TDS_1)}{l - k} \\ \text{Total RDS} &= RDS_1 + \Delta RDS = \frac{l \times TDS_3 - TDS_4}{l - k} \\ \text{Total UDS} &= UDS_1 + \Delta UDS = \frac{TDS_4 - k \times TDS_3}{l - k} \\ k &= \frac{TDS_4 - TDS_2}{TDS_3 - TDS_1} \quad \left( 0 < k < \frac{TDS_2}{TDS_1} < \frac{TDS_4}{TDS_3} < l \right) \end{aligned}$$

### Simultaneous equations

$$\begin{aligned} TDS_1 &= RDS_1 + UDS_1 \\ TDS_2 &= k \times RDS_1 + l \times UDS_1 \\ TDS_3 &= TDS_1 + \Delta RDS + \Delta UDS \\ &= (RDS_1 + UDS_1) + \Delta RDS + \Delta UDS \\ TDS_4 &= k \times (RDS_1 + \Delta RDS) + l \times (UDS_1 + \Delta UDS) \end{aligned}$$

### Indices

$$\begin{aligned} \text{Repair index (\%RDS}_1\text{)} &= \frac{\text{total UDS}}{RDS_1} \times 100 \\ \text{Proliferation index (\%RDS}_1\text{)} &= \frac{\text{total RDS}}{RDS_1} \times 100 \\ \text{Induction specificity} &= \frac{\Delta RDS}{\Delta UDS} \\ \text{ARDS effect (\%RDS}_1^2\text{)} &= \frac{\Delta RDS}{RDS_1} \times \frac{\Delta UDS}{RDS_1} \times 100 \\ \text{Total efficiency (\%RDS}_1^2\text{)} &= \frac{\text{total RDS}}{RDS_1} \times \frac{\text{total UDS}}{RDS_1} \times 100 \\ &= \text{repair index} \times \text{proliferation index} / 100 \end{aligned}$$

Fig. 1 Influence of HU and GA on hepatocyte DNA synthesis. UDS and RDS induced by each chemical was estimated from the simultaneous equation of 4 subgroups. The indices expressed as percentages of  $RDS_1$  values (% $RDS_1$ ) can be generally used to describe genotoxicity and mitogenicity of chemicals. GA: genotoxic agent, HU: hydroxyurea

Table 1 Indices

Samples	Proliferation index (% $RDS_1$ )	Repair index (% $RDS_1$ )	Total synthesis (% $RDS_1$ )	Induction specificity ( $\Delta RDS/\Delta UDS$ )	$\Delta RDS$ effect (% $RDS_1^2$ )	Total efficiency (% $RDS_1^2$ )
MeIQ						
$10^{-8}$ M	116 $\pm$ 9 <sup>a</sup> *	5 $\pm$ 3	115 $\pm$ 6 <sup>**</sup>	-6.58 $\pm$ 5.24	0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 3
$10^{-7}$ M	109 $\pm$ 3 <sup>*</sup>	13 $\pm$ 5	116 $\pm$ 5 <sup>**</sup>	2.10 $\pm$ 1.67	1 $\pm$ 0	14 $\pm$ 5 <sup>*</sup>
$10^{-6}$ M	151 $\pm$ 15 <sup>**</sup>	22 $\pm$ 11	164 $\pm$ 10 <sup>***</sup>	5.78 $\pm$ 5.17	7 $\pm$ 4	32 $\pm$ 14 <sup>**</sup>
$10^{-5}$ M	122 $\pm$ 12 <sup>*</sup>	19 $\pm$ 3 <sup>**</sup>	134 $\pm$ 8 <sup>**</sup>	1.95 $\pm$ 1.26	3 $\pm$ 1	23 $\pm$ 3 <sup>#</sup>
2-AAF						
$10^{-8}$ M	126 $\pm$ 8 <sup>#</sup>	8 $\pm$ 1 <sup>*</sup>	128 $\pm$ 6 <sup>#</sup>	16.59 $\pm$ 12.6	1 $\pm$ 0	11 $\pm$ 1 <sup>**</sup>
$10^{-7}$ M	129 $\pm$ 12 <sup>*</sup>	10 $\pm$ 7	132 $\pm$ 4 <sup>***</sup>	-0.95 $\pm$ 4.93	0 $\pm$ 2	12 $\pm$ 9
$10^{-6}$ M	120 $\pm$ 10 <sup>*</sup>	63 $\pm$ 7 <sup>***</sup>	174 $\pm$ 6 <sup>###</sup>	0.38 $\pm$ 0.23	11 $\pm$ 5	75 $\pm$ 6 <sup>###</sup>
$10^{-5}$ M	124 $\pm$ 2 <sup>#</sup>	68 $\pm$ 4 <sup>###</sup>	182 $\pm$ 3 <sup>###</sup>	0.39 $\pm$ 0.05	15 $\pm$ 1	84 $\pm$ 5 <sup>###</sup>
$10^{-4}$ M	108 $\pm$ 14	110 $\pm$ 3 <sup>###</sup>	207 $\pm$ 12 <sup>###</sup>	0.08 $\pm$ 0.13	9 $\pm$ 14	119 $\pm$ 15 <sup>***</sup>
PB						
$10^{-4}$ M	114 $\pm$ 9	-2 $\pm$ 4	106 $\pm$ 6	-1.74 $\pm$ 0.50	-1 $\pm$ 1	-3 $\pm$ 4
Solvent control	100 $\pm$ 4	5 $\pm$ 1	95 $\pm$ 1			5 $\pm$ 1

a: Mean  $\pm$  SD.

Significantly different from the value of solvent control by Student's  $t$ -test (\*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.005$ , ##  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0005$ , ###  $P < 0.0001$ )



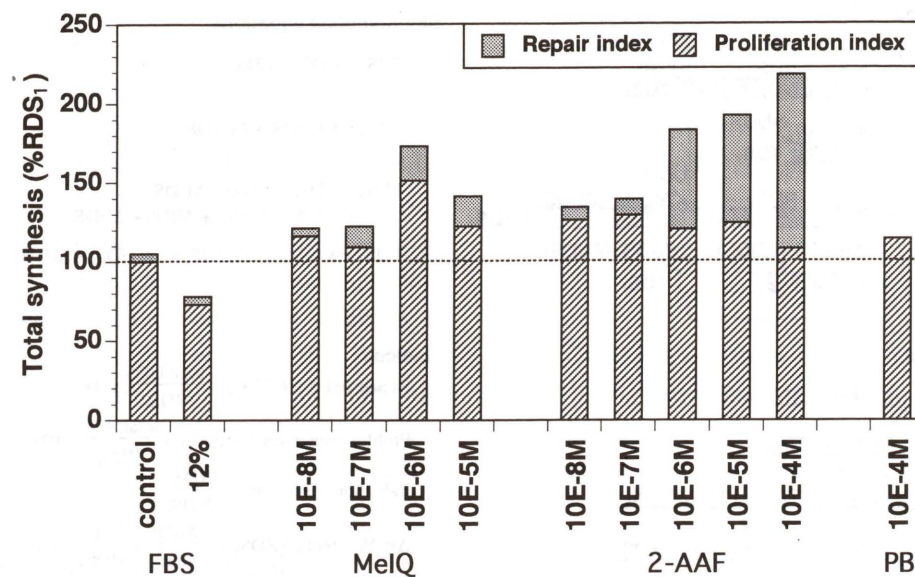


Fig. 2 Induction of UDS and RDS by MeIQ, 2-AAF and PB

MeIQ elevated RDS as well as UDS even at  $10^{-7}$  M, as did 2-AAF. MeIQ induced cell proliferation at  $10^{-5}$  M to  $10^{-8}$  M and it was highest at  $10^{-6}$  M. In contrast, PB generated only RDS as described previously (Okumura et al., 1996), indicating the individuality in response to mitogenicity of particular compound.

### Discussion

The role and significance of cell proliferation in carcinogenesis have been well known (Ames and Gold, 1990; Butterworth et al., 1988; Cohen and Ellwein, 1990; Cohen and Ellwein, 1991; Jutras et al., 1989; Kaufmann et al., 1991; Kokkinakis and Subbarao, 1993; St. Clair et al., 1991). Kaufmann et al. (1991) characterized hepatocellular proliferation and DNA damage during the initiation phase of rat hepatocarcinogenesis and reported that cell-cycle-dependent variation in sensitivity to initiation of hepatocarcinogenesis is, partly, related to efficient removal of potentially carcinogenic lesions from DNA during extended  $G_1$ . A similar significance of DNA damage, DNA repair and cell proliferation in other carcinogenesis models was also postulated by Kokkinakis and Subbarao (1993). From these reports, it can be concluded that S phase cells are most sensitive to initiation, not completing DNA repair so that damage remains after replication (Kaufmann et al., 1991). The fact that MeIQ and 2-AAF induced increase of cell proliferation in the 4 hours of the present experiment is quite interesting. Since proliferation reduces the possibility of DNA repair. Mitogenic

carcinogens, like MeIQ and 2-AAF could be considered to be stronger than those which cause RDS inhibition like aflatoxin  $B_1$  and 7,12-dimethylbenz [a] anthracene previously tested (Okumura et al., 1996). Thus induction of cell proliferation by carcinogens may play an important role in initiation as well as in the promotion stages of hepatocarcinogenesis. Furthermore, regulation of the cell-cycle may be of essential significance to the intracellular mechanisms of carcinogenesis (El-Deiry et al., 1993; Xiong et al., 1993). Some direct interaction between carcinogens and cellular proteins may exist as indicated in the case of 2-AAF, which was shown previously to interact specifically with a target protein, a liver fatty acid binding species and modulate the growth of hepatocytes (Keler et al., 1992; Khan and Sorof, 1990; Vinore et al., 1984). We have previously hypothesized that total RDS relates to the number of target cells of DNA damage, and total UDS corresponds to the extent of DNA damage (Okumura et al., 1996) in line with Kaufmann's concept (Kaufmann et al., 1991). The total extent of unexcised DNA damage remaining after replication in one cell culture insert could be estimated as a synergism between the extent of DNA damage and the number of target cells, and "total efficiency" one of the indices represents the initiating activity of chemicals. Thus, the most effective concentration of MeIQ leaving DNA damage may be  $10^{-6}$  M (Fig. 3). The high mitogenicity of MeIQ may generate damage more effectively as 2-AAF did. Chemically induced S phase cells are also likely to be more

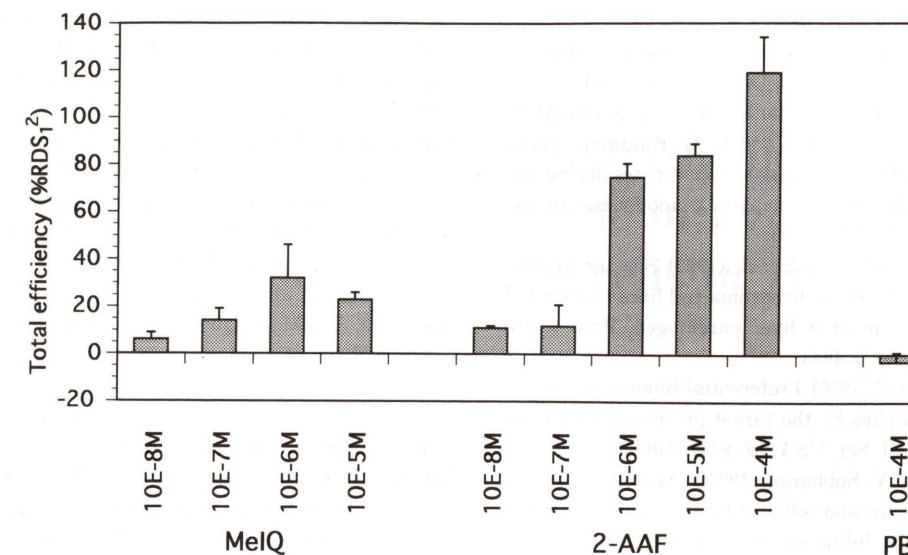


Fig. 3 Total efficiency reflects the extent of effective DNA damage induced by each chemical. Values are means  $\pm$  SD

sensitive to the effects of further exposure to carcinogenic factors. Although the concentrations of HCAs in foods might not be high enough to produce tumors by themselves, it should be emphasized that because of lifestyle and occupation, humans are continuously exposed to many carcinogenic agents including HCAs and are confronted with many different carcinogenic conditions (Sugimura et al., 1994; Wakabayashi et al., 1992). Mitogenicity of chemicals, like MeIQ and 2-AAF will be extremely important in multiple-step carcinogenesis because it prepares the condition for the accumulation of genetic alterations converting preneoplastic cells to malignant (Sugimura, 1992). Care should be taken in interpretation of total efficiency, however, because many factors involving intake, absorption, metabolism, intraplasmic density of chemicals and heterogeneity of DNA repair (LeDoux et al., 1991) will affect fixation of DNA damage *in vivo*. Nevertheless, such an index of unexcised DNA damage does suggest a way for the prediction of initiating activity of chemicals. CDR approach reported here suggests that mitogenicity of MeIQ should be more highlighted in the multiple-step carcinogenesis.

### Acknowledgements

This work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health and Welfare, Japan and by the program for promotion of Fundamental Studies in Health Sciences from the Organization for Drug ADR Relief, R & D promotion and Product Review,

Japan.

### References

- Ames, B. N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer, *Science*, 204, 587-593.
- Ames, B. N. and L. S. Gold (1990) Chemical carcinogenesis: Too many rodent carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 7772-7776.
- Butterworth, B. E., T. J. Slaga, W. Farland and M. McClain (1988) Chemically Induced Cell Proliferation: Implications for Risk Assessment, Wiley-Liss, New York, p. 547.
- Cohen, S. M. and L. B. Ellwein (1990) Cell proliferation in carcinogenesis, *Science*, 249, 1007-1011.
- Cohen, S. M. and L. B. Ellwein (1991) Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis, *Cancer Res.*, 51, 6493-6505.
- El-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell*, 75, 817-825.
- Fan, A., R. Howd and B. Davis (1995) Risk assessment of environmental chemicals, *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, 35, 341-368.
- Furihata, C. and Y. Uno (1993) Overview of *in vivo/in vitro* UDS and RDS tests in rats and mice, *Environ. Mutag. Res. Commun.*, 15, 155-171.
- Gold, L. S., T. H. Slone, B. R. Stern, N. B. Manley and B. N. Ames (1992) Rodent carcinogens: Setting priorities, *Science*, 258, 261-265.
- Hayashi, Y. (1992) Overview of genotoxic carcinogens and non-genotoxic carcinogens, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 44, 465-472.
- Higginson, J. (1993) Environmental carcinogenesis, *Cancer*, 72, 971-977.
- Hirono, I. (1993) Edible plants containing naturally occurring carcinogens in Japan, *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 997-1006.
- Jutras, D., M. Marion and F. Denizeau (1989) The effects of putative DNA repair inhibitors on DNA adduct levels and unscheduled DNA synthesis in rat hepatocytes exposed to 2-



acetylaminofluorene, *Mutat. Res.*, 216, 35-42.

Karaer, F. (1996) Environmental pollution and carcinogenic risk, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 15, 105-113.

Kaufmann, W. K., J. M. Rice, A. MacKenzie, G. J. Smith, M. L. Wenk, D. Devor, B. F. Qaquis and D. G. Kaufman (1991) Proliferation of carcinogen-damaged hepatocytes during cell-cycle-dependent initiation of hepatocarcinogenesis in the rat, *Carcinogenesis*, 12, 1587-1593.

Keler, T., C. S. Barker and S. S. Sorof, (1992) Specific growth stimulation by linoleic acid in hepatoma cell lines transfected with the target protein of a liver carcinogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4830-4843.

Khan, S. H. and S. Sorof (1990) Preferential binding of growth inhibitory prostaglandins by the target protein of a carcinogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9401-9405.

Kokkinakis, D. M. and V. Subbarao (1993) The significance of DNA damage, its repair and cell proliferation during carcinogen treatment in the initiation of pancreas cancer in the hamster model, *Cancer Res.*, 53, 2790-2795.

LeDoux, S., M. Thangada, V. A. Bohr and G.L. Wilson (1991) Heterogeneous repair of methylnitrosourea-induced alkali-labile sites in different DNA sequences, *Cancer Res.*, 51, 775-779.

Okumura, A., T. Tanaka and H. Mori (1996) Simultaneous measurement of unscheduled and replicating DNA synthesis by means of a new cell culture insert DNA retention method: Rapid induction of replicating DNA synthesis in response to genotoxic carcinogens, *Jpn. J. Cancer Res.*, 87, 805-815.

Ruder, A. M. (1996) Epidemiology of occupational carcinogens and mutagens, *Occup. Med.*, 11, 487-512.

Shubik, P. (1995) Chemical carcinogens and human cancer, *Cancer Lett.*, 93, 3-7.

St. Clair, W. H., B. S. Dwarakanath, H. Zhang and K. T. Wheeler (1991) Influence of proliferation on DNA repair rates in liver, *Exp. Cell Res.*, 197, 323-325.

Sugimura, T. (1988) New environmental carcinogens in daily life, *Trends Pharmacol. Sci.*, 9, 205-209.

Sugimura, T. (1992) Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective, *Science*, 258, 603-607.

Sugimura, T., M. Nagao and K. Wakabayashi (1994) Heterocyclic amines in cooked foods: Candidates for causation of common cancers, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, 2-4.

Sugimura, T. (1995) History, present and future, of heterocyclic amines, cooked food mutagens, *Princess Takamatsu Symposia*, 23, 214-231 (1995).

Sugimura, T., M. Nagao and K. Wakabayashi (1996) Carcinogenicity of food mutagens, *Environ. Health Perspect.*, 104, 429-433.

Sugimura, T. (1997) Overview of carcinogenic heterocyclic amines, *Mutat. Res.*, 376, 211-219.

Vinore, S. A., J. J. Churey, J. M. Haller, S. J. Schnabel, R. P. Custer and S. Sorof (1984) Normal liver chromatin contains a firmly bound and larger protein related to the principal cytosolic target polypeptide of a hepatic carcinogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2092-2096.

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

Weisburger, J. H., A. Rivenson, J. Reinhardt, C. Aliaga, J. Braley, L.M. Dolan, G. M. Williams, E. Zang, D. G. I. Kingston, M. Bashir, Y. Shu, T. D. Wilkins and R. L. V. Tassell (1994) Genotoxicity and carcinogenicity in rats and mice of 2-amino-3, 6-dihydro-3-methyl-7H-imidazo [4,5-f] quinolin-7-one: an intestinal bacterial metabolite of 2-amino-3-methyl-3H-imidazo [4,5-f] quinoline, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, 25-30.

Xiong, Y., G.J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi and D. Beach (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases, *Nature*, 366, 701-704.

# Genotoxic potency of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone in *Drosophila melanogaster* somatic cells *in vivo*

Kazuaki Kawai

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University  
Yagotoyama 150, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan

## Summary

3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), a mutagenic byproduct of chlorine disinfection, was assayed for DNA damaging potency and genotoxicity *in vivo* in *Drosophila melanogaster* using, respectively, the *mei-9<sup>a</sup> mei-41<sup>ps</sup>* DNA repair test and the *mwh/flr<sup>3</sup>* wing spot test. MX was inactive in both assay systems, despite the high mutagenicity of MX in *Salmonella* TA 100 strain. Treatment of this *Salmonella* strain with MX in the presence of S9 fraction from larval flies plus cofactors greatly reduced MX mutagenicity, demonstrating the existence of an efficient MX detoxifying system in larval somatic tissues. These results propose a pharmacodynamic reason why the consumption of water containing parts per trillion levels of MX might not represent an unacceptable hazard to human health.

**Keywords:** MX, *Drosophila*, DNA repair test, wing spot test

## Introduction

3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), a mutagenic byproduct of chlorine disinfection, can be found in drinking-water (Backlund, 1989; Hemming et al., 1986; Kronberg and Vartiainen, 1988; Meier et al., 1987a; Suzuki and Nakanishi, 1990) and also in chlorine-bleached wood pulp liquors (Holmbom et al., 1984; Kronberg et al., 1988). Since intake of MX by humans is unavoidable, its genotoxic effects have been intensively studied in a wide variety of short-term tests. These studies have shown that MX is highly active as a direct genotoxin in the *Salmonella* TA 100 strain (Holmbom et al.,

1984) and in cultured mammalian cells (Meier et al., 1987b). In contrast to the high activity *in vitro*, MX is ineffective in whole-body systems such as the mouse bone marrow micronucleus test (Meier et al., 1987b). However, data from the mouse studies are limited and further information on the *in vivo* genotoxicity of MX is needed in order to properly evaluate its genotoxic potential in humans.

In the present study, *in vivo* genotoxicity testing of MX has been extended to *Drosophila melanogaster*, a relatively simple whole-body system, using the DNA-repair and the wing spot tests. Results from these assays indicate that *D. melanogaster* has an efficient detoxifying system against MX.

## Materials and methods

### Chemicals

3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX, CAS No. 77439-76-0) was purchased from Salford ULTRAFINE Chemicals (North Manchester, UK). Immediately before use, it was dissolved in distilled water at appropriate concentrations. *N*-

received: November 20, 1997

accepted: February 26, 1998

All correspondence should be addressed to:

K. Kawai, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University, Yagotoyama 150, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan

TEL 052-832-1781 FAX 052-834-8780

e-mail kawai@meijo-u.ac.jp

© Environmental Mutagen Society of Japan



nitrosodimethylamine (NDMA) was purchased from Wako Pure Chem. Ind. Osaka.

#### DNA repair test

A mutagen-sensitive X-chromosome strain of *Drosophila melanogaster* with genotype *sc z<sup>1</sup> w<sup>+(TE)</sup> mei-9<sup>a</sup> mei-41<sup>D5</sup>* (Fujikawa, 1988) was used. The two *mei* markers are meiotic recombination-deficient mutations (Rec<sup>-</sup>). In addition to the Rec<sup>-</sup> character, *mei-9<sup>a</sup>* and *mei-41<sup>D5</sup>* elicit excision-repair and post-replication-repair deficiency, respectively (Boyd et al., 1976; Boyd and Setlow, 1976). This strain was kept as males in stock together with *C(1)DX, yf* females. The *C(1)DX* is an attached X-chromosome with wild type alleles of *mei-9<sup>a</sup>* and *mei-41<sup>D5</sup>* (i. e. Rec<sup>+</sup>). Hereafter, this stock is referred to as [Rec<sup>-</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] for simplicity. A stock consisting of *sc z<sup>1</sup> w<sup>+(TE)</sup>* males and *C(1)DX, yf* females (Fujikawa and Kondo, 1986), abbreviated as [Rec<sup>+</sup> male • Rec<sup>+</sup> female], was also used.

Three- to four-day-old males and females from the [Rec<sup>-</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] or [Rec<sup>+</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] stock were mated in culture bottles and allowed to oviposit for 10 hr. On day 3 post-oviposition, resulting larvae were sampled and introduced into 3 cm × 10 cm glass vials containing 1.2 g per vial of *Drosophila* Medium (Formula 4-24; Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, USA) hydrated with 4 ml of test solution. The concentration of MX in the hydrated medium (i. e., 0.2, 1.0 or 2.0 μmole/g) defined the dose used. As control, a batch of sampled larvae was introduced into vials containing *Drosophila* Medium hydrated with distilled water (4 ml per 1.2 g medium per vial). The larvae were allowed to develop to adulthood in the same vials.

After emergence as adult flies, males and females were scored separately and the numerical ratio of males to females was determined for control and for each of the treated groups. The sex ratio gives the survival to adulthood of Rec<sup>-</sup> or Rec<sup>+</sup> male larvae relative to Rec<sup>+</sup> female larvae. A decrease in the relative survival after treatment of [Rec<sup>+</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] stock suggests a male-specific toxicity of the test agent. In this assay, preferential killing of Rec<sup>-</sup> larvae in a dose-dependent manner is taken as evidence of DNA damaging activity of an agent (Fujikawa, 1988).

#### Wing spot test

Virgin *mwh jv*; *spa<sup>pol</sup>* females and *flr<sup>3</sup>/TM 3, Ser* males were mated and allowed to oviposit for 10hr,

and their F<sub>1</sub> progeny were sampled as third instar larvae at 72~82 hr after oviposition. The larvae were orally exposed to MX or to positive control NDMA in the same way as used in the DNA repair test.

Adult flies which emerged were scored, fixed and preserved in 70% ethanol. They were of two types, *mwh jv/flr<sup>3</sup>; spa<sup>pol</sup>/+* and *mwh jv/TM 3, Ser; spa<sup>pol</sup>/+*. For genotoxicity testing, wings of the *mwh jv/flr<sup>3</sup>; spa<sup>pol</sup>/+* flies were sampled and rinsed in water for 5~10 min. The hydrated wings were mounted on slide glasses using Faure's solution (Graf et al., 1984). The permanent preparations made in this way were examined microscopically at a magnification of ×400. Spots comprising only *mwh* hairs or *flr* hairs (single spots) and those with neighboring *mwh* and *flr* spots (twin spots) were scored as mutant clones. The spots were classified into two classes according to the number of mutant hairs per spot, namely, small spots with one or two mutant hairs and large spots with three or more mutant hairs. For each of the two classes of mutant spots, the frequency was calculated as the number of spots per wing. Necessary statistical tests for the frequencies were performed using the  $\chi^2$ -test with Yeat's correction.

For explanation of the genetic markers and the chromosomes used, see Lindsley and Zimm (1992). All the experiments were carried out at 25±1°C.

#### Ames test

Mutagenic activity of MX in *Salmonella typhimurium* TA100 strain was tested in the presence or absence of *Drosophila* S9 mix, a 1: 9 mixture of S9 homogenate fraction from larval flies and cofactor solution containing 5 mM glucose-6-phosphate, 4 mM NADH, 4 mM NADPH, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl and 100 mM Na-phosphate (pH 7.4). The S9 fraction was prepared as follows: Third-instar larvae were washed with sterilized deionized water and a 1 g sample was homogenized in 9 ml of 1.15% KCl solution with a Teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged at 9000 g for 10 min at 0°C and supernatant was used as *Drosophila* S9. In the mutation assay, his<sup>+</sup> *Salmonella* revertants were scored with MX present at 20 ng per plate.

#### Results and discussion

As shown in Table 1, MX caused a slight but not significant reduction from the control Rec<sup>-</sup> male/Rec<sup>+</sup> female ratio in the dose range used. However, the reduction was not dose-dependent, and a slight

Table 1 DNA damaging potency of MX as assayed in the *Drosophila* DNA repair test.

Stock	Number ratio <sup>a)</sup> of males to females at MX dose (μmole/g medium)			
	0	0.2	1	2
[Rec <sup>-</sup> male • Rec <sup>+</sup> female]	1.3±0.18 (117) <sup>b)</sup>	1.0±0.13 (140)	0.9±0.35 (145)	1.0±0.68 (117)
[Rec <sup>+</sup> male • Rec <sup>+</sup> female]	1.0±0.49 (139)	0.93 (109)	1.0 (108)	1.4±0.63 (100)

<sup>a)</sup> Mean±1SD (N=3-4 for the test with [Rec<sup>-</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] stock; N=2 for the test with [Rec<sup>+</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] stock)

<sup>b)</sup> Total number of Rec<sup>+</sup> females scored.

Table 2 Genotoxicity of MX as assayed in the *Drosophila* wing spot test.

Compounds	Dose (μmole/g medium)	Survival (%)	Number of wings	Small spots <sup>a)</sup>		Large spots <sup>d)</sup>	
				Number of spots	F <sup>c)</sup>	Number of spots	F <sup>c)</sup>
Control	0	100	198	74	0.373	15(3) <sup>d)</sup>	0.076
MX	0.2	90	188	83	0.441	17(2)	0.090
	0.5	106	202	78	0.386	15(4)	0.074
	1.0	66	156	62	0.397	16(2)	0.103
	2.0	65	100	22	0.220	2(1)	0.020
NDMA	0.03	98	168	256	1.523**	125(38)	0.744**

<sup>a)</sup> Spots with one or two mutant hairs

<sup>b)</sup> Spots with three or more mutant hairs

<sup>c)</sup> Number of spots per wing

<sup>d)</sup> Number of twin spots

\*\* Significant at p<0.01 compared with control by  $\chi^2$  test

reduction in the sex ratio also occurred when [Rec<sup>-</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] stock was used though at the highest dose this ratio increased slightly (Table 1). The highest dose used was marginally toxic to larval [Rec<sup>-</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] stock causing up to 20% reduction in survival (data not shown). This study demonstrates that orally administered MX was practically ineffective in causing somatic DNA damage in larval flies as measured by the Rec<sup>-</sup> male/Rec<sup>+</sup> female ratio under the conditions used.

The results obtained in the wing spot test are summarized in Table 2. In contrast to the positive control (*N*-nitrosodimethylamine) which was clearly effective in causing both small and large spots, MX was ineffective in producing either class of mutant spots at doses up to 2.0 μmol/g, a dose level corresponding to LD<sub>35</sub> for the tester larvae.

The test system used can detect not only mitotic recombinations in the left arm of the 3rd chromosome but also chromosome aberrations such as partial aneuploidy involving the *mwh* locus if they occur in the wing disk cells in the larval period (Graf et al., 1984). Hence, the negative genotoxicity of MX in the wing spot test is compatible with the negative clastogenicity in the mouse micronucleus assay (Meier et

al., 1987b), but it contrasts markedly with the high clastogenicity in cultured mammalian cells (Meier et al., 1987b).

Since the *in vitro* genotoxicity of MX has previously been shown to be drastically reduced in the presence of rat liver S9 homogenate fraction (Meier et al., 1987b), it seemed possible that the two sets of negative data (Tables 1 and 2) could be explained if *Drosophila* somatic cells possessed an ability to metabolize MX into an inactive form. This idea was tested in the Ames mutation assay where *Salmonella* strain TA100 was treated with MX in the absence or presence of *Drosophila* S9 mix, a mixture of S9 fraction from larvae used in the somatic assays with cofactors for NADPH generation.

As shown in Fig. 1, 20 ng of MX induced about 1600 his<sup>+</sup> revertants per plate. However, addition of *Drosophila* S9 mix caused a marked reduction in the mutagenicity of MX, irrespective of the larval stock S9 fraction. Since addition of the cofactors alone did not affect the mutagenicity, these results suggest the existence of an efficient detoxifying system against MX in *Drosophila* somatic cells; thereby, they may explain, at least partly, the absence of genotoxicity of MX in *Drosophila* somatic cells (Tables 1 and 2).



# N-nitrosodimethylamine に対するカテキン類の変異原性抑制機構

江幡 淳子<sup>1</sup>, 深貝 尚子<sup>2</sup>, 古川 秀之<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ジェフ野菜研究所 〒584-0073 大阪府富田林市寺池台 2-16-12

<sup>2</sup> 名城大学薬学部 〒468-0021 名古屋市天白区八事山 150

<sup>3</sup> 名城大学総合研究所 〒468-0021 名古屋市天白区八事山 150

## Mechanisms of antimutagenesis by catechins towards N-nitrosodimethylamine

Junko Ebata<sup>1</sup>, Naoko Fukagai<sup>2</sup> and Hideyuki Furukawa<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Jef Vegetable Research Institute

2-16-12 Teraikedai, Tondabayashi, Osaka 584-0073

<sup>2</sup> Pharmaceutical Sciences of Meijo University

150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-0021, Japan

<sup>3</sup> Research Institute of Meijo University

150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-0021, Japan

## Summary

The purpose of this study was to clarify the mechanism of the inhibitory effect of catechins on NDMA-induced mutagenesis, which has been expressed by hydroxyl radical-dependent mono-oxygenation on NDMA, as previously reported. Catechin anti-mutagenesis was measured in *Salmonella typhimurium* TA 100 with S9 from SD male rat liver, pre-treated with acetone and by fasting. The suppression of NDMA-induced mutagenesis by catechol-type and gallate-type catechins was approximately 30% and 100%, respectively. The results of voltammetry and coulometry of catechins revealed that the numbers of transferring electron of these catechins at an oxidizable potential of less than 550 mV were around two for the former and five for the latter catechins. These values related closely to the percentage inhibition of mutation.

**Keywords:** N-nitrosodimethylamine, catechins, hydroxyl radical, oxidation potential, antimutagenesis

## 緒 言

エイムス試験の系でN-nitrosodimethylamine (NDMA)の変異原性をカテキン類が抑制するが、その機構は十分に明らかではない。NDMA, *Salmonella*

*typhimurium* TA 100, SD系雄ラットにアセトン・飢餓処理を行いシトクロムP450 2E1を誘導した肝S9 mixの系で検出される変異はヒドロキシルラジカルが関与しており、この系で示すカテキン類の変異原性抑制はヒドロキシルラジカル消去に基づくと考えられた(古川ら, 1992)。ヒドロキシルラジカル依存のNDMAの変異原性発現をカテキン類が濃度依存的に抑制するか、さらにカテキン類のヒドロキシルラジカル消去率はその酸化電位に依存しているか、この変異原性抑制と酸化電位

受付: 1997年10月30日

受理: 1997年12月6日

©日本環境変異原学会

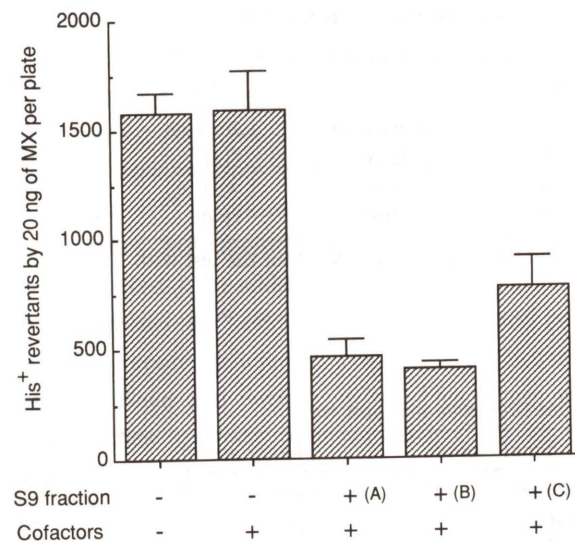


Fig. 1 Mutagenicity of MX on *Salmonella* TA100 strain in the presence of *Drosophila* S9 mix

Symbols + and - represent, respectively, presence and absence of the indicated component of S9 mix. S9 fraction was prepared from larval [Rec<sup>+</sup> male • Rec<sup>+</sup> females] stock (A), larval [Rec<sup>-</sup> male • Rec<sup>+</sup> female] stock (B) or F<sub>1</sub> larvae of mwh/mwh × flr/TM3 (C). Vertical lines show 95% confidence intervals for the frequencies of revertants.

At this stage, it is difficult to extrapolate these results to the human situation but it should be important to study MX metabolism in human cells and tissues. Aside from this, it has been expressed that the very low concentrations of MX usually found in drinking-water may not represent an unacceptable risk to human health (Daniel et al., 1990). Nevertheless, the MX induction of gastrointestinal tract nuclear anomalies (Daniel et al., 1991) and carcinogenesis in rodents (Komulainen et al., 1997) will be perceived as demonstrating an important hazard. The present results propose a pharmacodynamic reason why, at low doses of MX, this hazard may be nullified.

## Acknowledgments

I gratefully thank Dr. K. Fujikawa (Kinki University) for his help in preparing this paper and Prof. H. Furukawa (Meijo University) for support and encouragement.

## References

- Backlund, R. (1989) Mutagenic activity and presence of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in chlorinated raw and drinking waters in the Netherlands, *The Science of the Total Environment*, 84, 273-282.
- Boyd, J. B. and R. B. Setlow (1976) Characterization of post-replication repair in mutagen-sensitive strains of *Drosophila*

- melanogaster*, *Genetics*, 84, 507-526.
- Boyd, J. B., M. D. Golino and R. B. Setlow (1976) The *mei-9<sup>a</sup>* mutant of *Drosophila melanogaster* increases mutagen sensitivity and decreases excision repair, *Genetics*, 84, 527-544.
- Daniel, F. B., G.R. Olson and J. A. Stober (1991) Induction of gastrointestinal tract nuclear anomalies in B6C3F1 mice by 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and 3,4-(dichloro)-5-hydroxy-2(5H)-furanone, mutagenic by-products of chlorine disinfection.
- Frei, H. and F. E. Würzler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutat. Res.*, 203, 297-308.
- Fujikawa, K. (1988) A novel methodology of chemical mutagenicity assays in *Drosophila melanogaster*, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 29, 115-124 (in Japanese).
- Fujikawa, K. and S. Kondo (1986) DNA repair dependence of somatic mutagenesis of transposon-caused white alleles in *Drosophila melanogaster* after treatment with alkylating agents, *Genetics*, 112, 505-522.
- Graf, U., F. E. Würzler, A. J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall and P. G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, 6, 153-188.
- Hemming, J., B. Holmbom, M. Reunanen and L. Kronberg (1986) Determination of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in chlorinated drinking and humic waters, *Chemosphere*, 15, 549-556.
- Holmbom, B., R. H. Voss, R. D. Mortimer and A. Wong (1984) Fractionation, isolation, and characterization of Ames mutagenic compounds in kraft chlorination effluents, *Environ. Sci. Technol.*, 18, 333-337.
- Komulainen, H., V.-M. Kosma, S.-L. Vaitinen, T. Vartiainen, E. Kaliste-Korhonen, S. Lötjönen, R.K. Tuominen, J. Tuomisto (1997) Carcinogenicity of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in the rat, *J. Natl. Cancer Inst.*, 89, 848-856.
- Kronberg, L. and T. Vartiainen (1988) Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomer E-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxo-butenic acid in chlorine-treated tap waters, *Mutat. Res.*, 206, 177-182.
- Kronberg, L., B. Holmbom, M. Reunanen and L. Tikkanen (1988) Identification and quantification of the Ames mutagenic compound 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomer E-2-chloro-3-dichloromethyl-4-oxobutenic acid in chlorine-treated humic water and drinking water extracts, *Environ. Sci. Technol.*, 22, 1097-1103.
- Lindsley, D. and G. G. Zimm (1992) *The Genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego, CA.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-215.
- Meier, J. R., R. B. Knohl, W. E. Coleman, H. P. Ringhand, J. W. Munch, W. H. Kaylor, R. P. Streicher and F. C. Kopfler (1987 a) Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solutions, *Mutat. Res.*, 189, 363-373.
- Meier, J. R., W. F. Blazak and R. B. Knohl (1987 b) Mutagenic and clastogenic properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone a potent bacterial mutagen in drinking water, *Environ. Mol. Mutagen.*, 10, 411-424.
- Suzuki, N. and J. Nakanishi (1990) The determination of strong mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in drinking water in Japan, *Chemosphere*, 21, 387-392.



の関係を求め、カテキン類の NDMA の変異原性発現に対する抑制機構をより明らかにすることを目的とした。

## 実験方法

カテキン類：三井農林株式会社食品総合研究所，原征彦氏より供与された。

エイムス試験：著者らが日本環境変異原学会第 21 回大会（1992）で述べた方法により S 9 mix, *Salmonella typhimurium* TA 100 の前培養開始後 4～5 時間の対数増殖期早期のものを用い，NDMA (50  $\mu$ g/plate) とともに pH 6.4 で 60 分ブレインキュベーションした。なお，ここで用いた S 9 はアセトンを連続 4 日投与，3 日目より水のみを与えた SPFSprague-Dawley 系雄ラット肝臓より調製したものを用いた。この S 9 はシトクロム P 450 2 E 1 活性を有し，最適 pH 6.4 で NDMA, N-ニトロソエチルアミン，アセトン，エタノールなどの比較的小さい分子とインキュベートするとスーパーオキシド経路でヒドロキシルラジカルを生成する。ヒドロキシルラジカルの生成については著者らが第 19 回環境トキシコロジシンポジウム（江幡，1993）において NDMA をシトクロム P 450 2 E 1, NADPH-シトクロム P 450 レダクターゼ，シトクロム b 5, ジラウロイルホスファチジルコリン，スーパーオキシジスムターゼを用

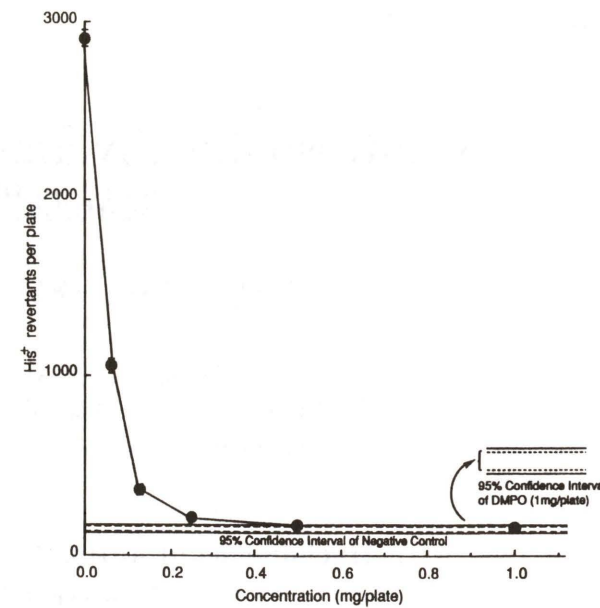


Fig. 1 Suppression of NDMA-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA 100 with DMPO.

The suppression of mutagenicity of NDMA was tested using a modified microsomal/bacterial pre-incubation assay in which 50  $\mu$ g of NDMA, S 9 mix (pH 6.4), varying amounts of DMPO, and bacteria were incubated for 60 min at 37°C with shaking, and then added top agar.

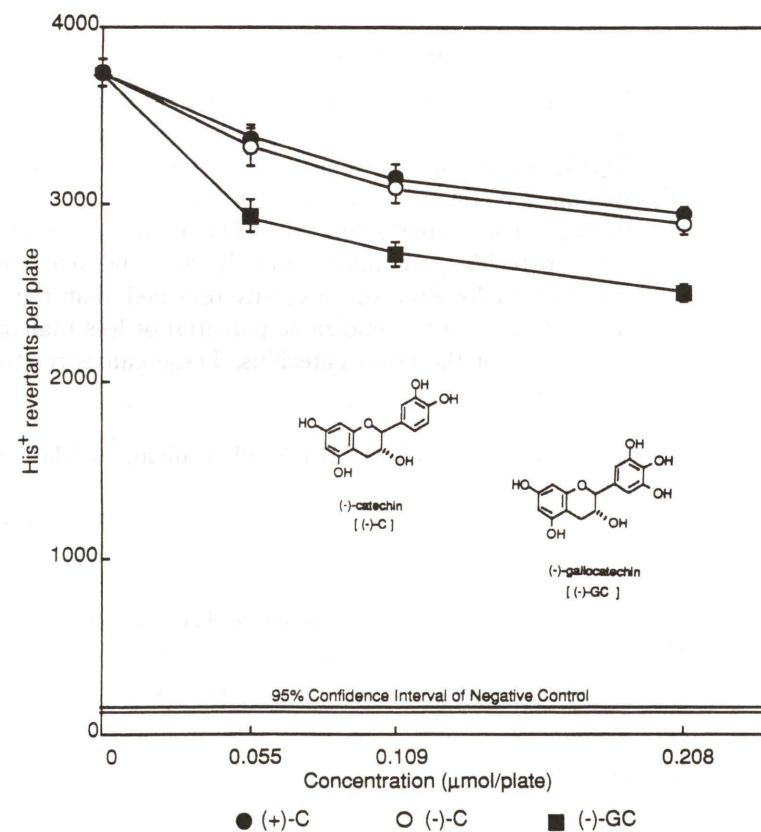


Fig. 2 Suppression of NDMA-induced mutagenesis in TA 100 with catechins. The assay was carried out under the same condition as described in Fig. 1.

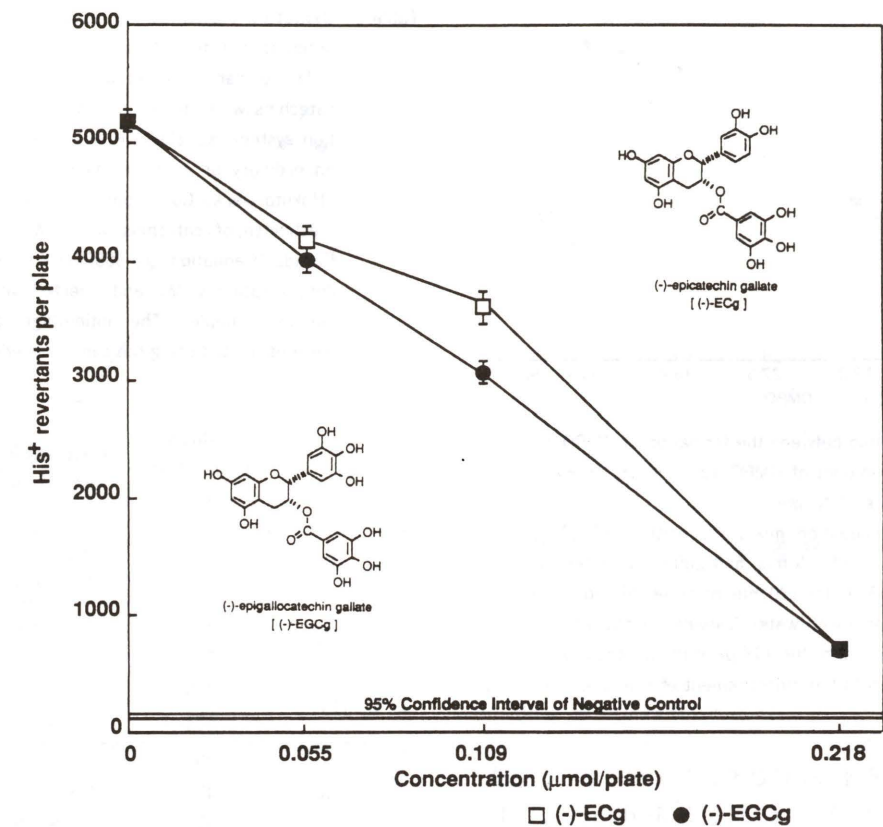


Fig. 3 Suppression of NDMA-induced mutagenesis in TA 100 with catechins. The assay was carried out under the same condition as shown in Fig. 1.

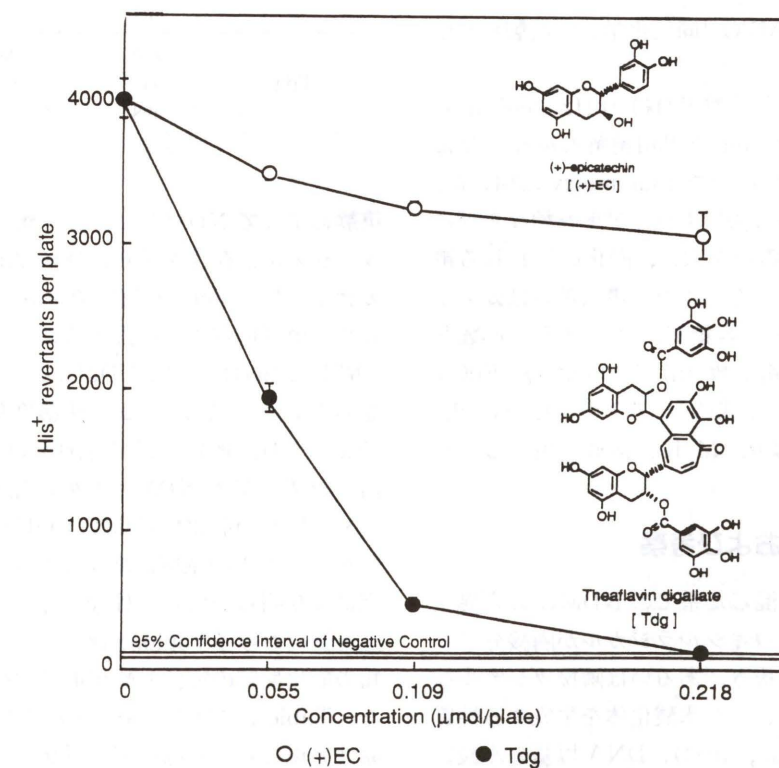


Fig. 4 Suppression of NDMA-induced mutagenesis in TA 100 with catechins. The assay was carried out under the same condition as shown in Fig. 1.



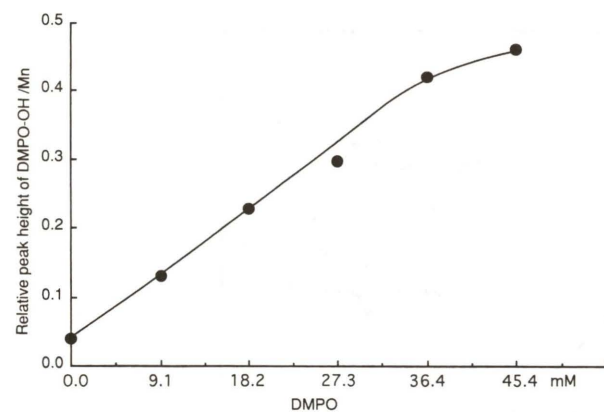


Fig. 5 The relationship between the formation of DMPO-OH and varying amount of DMPO added in the pre-incubation mixture of NDMA.

The pre-incubation mixture consisting of 200  $\mu$ l NDMA, 1000  $\mu$ l of S 9 mix, and 200  $\mu$ l of water was incubated at 37°C for 120 min, and then diluted to 400 times by volume with water. Varying concentration of DMPO was added to the 175  $\mu$ l of the diluted mixture and subjected to the measurement of ESR spectrum.

いる再構成系で pH 6.4, 37°C でインキュベートし, 生成するヒドロキシルラジカルを 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) のスピン付加体として証明している。

電子スピン共鳴 (ESR) によるラジカル種の捕捉: 日本電子 (株) 製 JES-RE 2 X 型装置, ESR 試料セル LLC-04 B を用いた。

スピントラップ剤: DMPO (同仁化学研究所製) を用いた。

酸化還元電位の測定: 北斗電工 (株) の HZ-3000 automatic polarization system と汎用電解セルならびに HX-203 (フローセルユニット) を coulometry に用いた。Cyclic voltammetry の方法によりカテキン類ならびに DNA 塩基の酸化される電位を求め, 酸化の行われる電位に固定して流れる電気量を求めた。電気量 Q はカテキン類などの濃度 C, 溶液の容積 V, ファラデー定数 F (96500 クーロン), 移動電子数 (n) との間に  $Q = F n C V$  の関係があり  $n = Q / F C V$  で求めた。カテキン類の cyclic voltammetry での溶媒は 0.1 M KCl 溶液を用いる方法に依った。

## 結果および考察

NDMA と S 9 mix を混じた系での NDMA の変異原性発現については, ヒドロキシルラジカルが隣接分子から水素または電子を引き抜き, あるいは隣接ラジカル種とラジカルカップリングにより水酸化体を生成する性質があり (Czapski, G. et al., 1984), DNA 塩基の水酸化が起こることについては 8-OHdG グリコシラーゼ欠損株 *S. typhimurium* YG 3001 を用い DMPO による抑制

Table 1 Oxidation potentials, oxidizable electrons and antimutagenicities of catechins.

The oxidation potentials and the coulomb values of catechins were determined with the automatic polarization system, HZ-3000 (Hokuto Denko Co., Japan) using an ordinary or a column type, HX-20 electrolytic cells (Hokuto Denko Co., Japan). The numbers of oxidizable electron(n) of catechins were calculated according to Faraday's equation,  $Q = 96500 n C V$  using coulomb value Q, concentration C(M) and injected volume V(l) of the catechin samples. The antimutagenicities of catechins were estimated using the same procedure as described in Fig. 1.

	Oxidation potential (mV)	Oxidizable electrons	Suppression against NDMA (%)
(-)C	494 819	1.5~1.7 4.3~4.4	23.8
(+)EC	469 892	2.9~3.2 5.2	24.5
(-)EC	439 974	2.8 7.49	24.8
(-)GC	395 439 974	1.5~2.2 1.8~2.2 4.5~4.9	34.6
(-)ECg	145 538 971	n.d. 5.3~5.9 7.0	88.9
(-)EGCg	387 534 994	n.d. 5.1 8.9	89.3
Tdg	103 535 998	n.d. 3.0~4.4 6.1~10.9	100

実験によって NDMA による変異原性発現のヒドロキシルラジカル依存性を示した (Furukawa, H. et al., 1997)。カテキン類が Fenton 反応で生成するヒドロキシルラジカルを濃度依存的に消去することはすでに報告している (古川ら, 1994)。一方, NDMA の変異原性発現は DMPO ならびにカテキン類により濃度依存的に抑制された (Fig. 1~4)。P 450 2 E 1 活性の低い PCB 誘導の S 9 を用いた場合でも NDMA との代謝反応において DMPO と  $\cdot$ OH との付加体 (DMPO-OH) が増加し, ヒドロキシルラジカルの生成が増すことを ESR スペクトルの測定により明らかにした (Fig. 5)。Cyclic voltammetry と定電位における coulometry によって得られたカテキン類の酸化反応の電位と酸化電子数を求め Table 1 に示した。Table 1 にはカテキン類の NDMA に起因する変異原性発現に対する抑制率を併せて示した。カテキン類の酸化される (相手を還元する) 電位での移動電子数と変異原性抑制率を Fig. 6 に示した。この図より, 2 電子酸

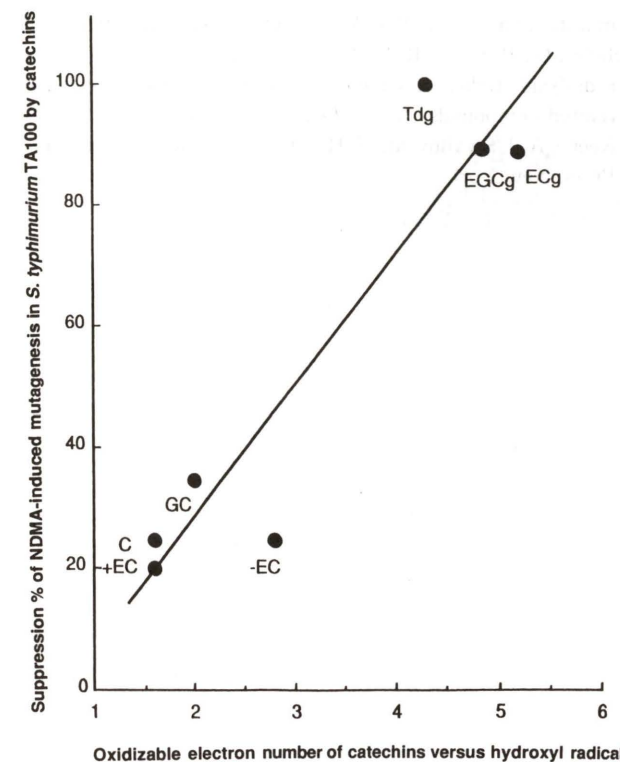


Fig. 6 The relationship of percent suppression of NDMA-induced mutagenesis and the numbers of oxidizable electron of catechins.

化を示すカテキン類と 4~5 電子酸化を示すカテキン類を比較すると, gallate 構造を有する後者の方が変異原性発現抑制率の高いことが明らかである。DNA 塩基のヒドロキシルラジカルとの反応性は塩基の酸化電位に対応することが予想されるので, Cyclic voltammetry でヌクレオチド類の酸化電位を測定し, Table 2 に示した。5'-dGMP の酸化電位は他のヌクレオチドに比べて著しく低いことがわかる。これらのヌクレオチド類の酸化電位をパルスラジオリシスの方法で測定した塩基類のヒドロキシルラジカルとの反応速度定数 (Scholes, G. et al., 1965) と比較すると, 5'-dGMP は  $6.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ , 5'-dTMP は  $5.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ , 5'-dCMP は  $5.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ , 5'-AMP は  $3.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  であり, 酸化電位の最も低い 5'-dGMP の反応速度定数が高いことがわかる。一方, DMPO のヒドロキシルラジカルとの反応速度定数 (Finkelstein, E. et al., 1980) は  $3.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  でこれらの塩基類より小さいことがわかる。DNA 塩基は細胞内に存在するからヒドロキシルラジカルによる影響を受けるためには若干の時間が必要であろう。その前にカテキン類がヒドロキシルラジカルを消去すれば変異原性発現は起こらないという結果となるのであろう。

## 謝 辞

本研究に用いたカテキン類は三井農林株式会社食品総

Table 2 Oxidation potential of nucleotides. The same procedure described in Table 1 was used.

	Oxidation potential (mV)	$K_{OH} (\times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1})$
5'-dGMP	45.0	6.8
5'-dTMP	131.0	5.2
5'-dCMP	139.5	5.0
5'-AMP	212.0	3.5
DMPO	392.2	3.4

合研究所, 原 征彦氏より供与頂いたもので厚く感謝いたします。また, Cyclic voltammetry ならびに定電位 coulometry の測定に関して種々指導をいただきました北斗電工株式会社に厚く感謝いたします。

## 参考文献

- Czapski, G. (1984) Reaction of  $\cdot$ OH, Method in Enzymology, ed. by Lester Packer, Academic Press, 105, 209-215.
- 江幡淳子, 豊原真佐子, 北原昇吾, 古川秀之 (1993) チトクロム P 450 2 E 1 による N-nitrosodimethylamine の代謝活性化と変異の対応, 第 19 回環境トキシコロジーシンポジウム要旨集, 124.
- Finkelstein, E., G. M. Rosen and E. J. Rauckman (1980) Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones, J. Am. Chem. Soc., 102, 4994-4999.
- Fueno, T., T. Lee and H. Eyring (1959) Polarographic oxidation half-wave potential versus energies of highest occupied MO's, J. Phys. Chem. 63, 1940-1948.
- 古川秀之, 河井一明, 豊原真佐子, 江幡淳子 (1992) N-nitrosodimethylamine 活性代謝物の dimethylsulfoxide 並びに 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide による不活性化, 日本環境変異原学会第 21 回大会要旨集, 72.
- 古川秀之, 河井一明, 深貝尚子 (1994) カテキン類の N-nitrosodimethylamine の変異原性抑制並びに Fenton 反応に対する抑制効果について, 日本環境変異原学会第 23 回大会要旨集, 73.
- Furukawa, H., J. Ebata, M. Toyohara, N. Ito, A. Imoto, K. Kuriki, T. Nohmi and T. Sofuni (1997) Oxy-radical mechanism in mutagenicity expression of N-nitrosodimethylamine in Ames test, Proceedings of 2nd International conference on Bioradicals, in press.
- Grollman, A. P. (1995) 8-Oxoguanine in DNA: Is mutagenic properties and repair, Environ. Mut. Res. Commun., 16, 239-243.
- Hendrickson, H. P., M. Sahafayen, M. A. Bell, A. D. Kaufman, M. E. Hadwiger and C. E. Lunte (1994) Relationship of flavonoid oxidation potential and effect on rat hepatic microsomal metabolism of benzene and phenol, J. Pharm. Biomed. Anal., 12, 335-341.
- Hodnick, W. F., E. B. Milosavljevic, J. H. Nelson and R. S. Pardini (1988) Electrochemistry of flavonoids: Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids, Biochem. Pharmacol., 37, 2607-2611.
- Kada, T., K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki, and Y. Hara (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor, Mutat. Res., 150, 127-132.
- Nakayama T. (1994) Suppression of hydroperoxide induced



cytotoxicity by polyphenols, Cancer Res. (suppl.), 1991s-1993s.  
Okuda, T., K. Mori and H. Hayatsu (1984) Inhibitory effect of  
tannins on direct-acting mutagens, Chem. Pharm. Bull., 32,  
3755-3758.  
Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara, and T. Kada  
(1986) The pyrogallol related compounds reduce UV-induced

mutations in *E. coli* B/r WP 2, Mutat. Res., 173, 239-244.  
Scholes, G., P. Show, R. L. Willson and M. Ebert (1965) Pulse  
radiolysis studies of aqueous solutions of nucleic acid and  
related compounds, "Pulse Radiolysis", Eds. M. Ebert, J. P.  
Keene, A. J. Swallow and J. H. Baxendale, 151-164, Academic  
Press, New York.

Environ. Mutagen Res., 20 : 51 - 62 (1998)

論 説

## マウス多臓器アルカリ SCG 法による 臓器特異的遺伝子毒性の検出

佐々木 有<sup>1</sup>, 上野 俊治<sup>2</sup>, 宮前 陽一<sup>3</sup>, 太田 敏博<sup>4</sup>  
津田 修治<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 八戸工業高等専門学校物質工学科 〒039-11 青森県八戸市田面木上野平 16-1

<sup>2</sup> 北里大学獣医畜産学部 獣医公衆衛生学教室 〒034 青森県十和田市東 23-35-1

<sup>3</sup> 藤沢薬品工業安全性研究所 〒532 大阪市淀川区加島 2-1-6

<sup>4</sup> 東京薬科大学生命科学部 〒192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

<sup>5</sup> 岩手大学農学部 獣医公衆衛生学教室 〒020 岩手県盛岡市上田 3-18-8

### Detection of organ specific genotoxicity by alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs

Yu F. Sasaki<sup>1</sup>, Syunji Ueno<sup>2</sup>, Youichi Miyamae<sup>3</sup>, Toshihiro Ohta<sup>4</sup>, Shuji Tsuda<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe  
National College of Technology

Tamonoki Uwanotai 16-1, Hachinohe, Aomori 039-11, Japan

<sup>2</sup> Laboratory of Veterinary Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal  
Sciences, Kitasato University

Higashi 23-35-1, Towada, Aomori 034, Japan

<sup>3</sup> Toxicology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

1-6, 2-chome, Kashima, Yodogawa-Ku, Osaka 532, Japan

<sup>4</sup> School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

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

<sup>5</sup> Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, Faculty of  
Agriculture, Iwate University

Ueda 3-18-8, Morioka, Iwate 020, Japan

### Summary

The genotoxicity of 54 chemicals, selected from IARC (International Agency for Research  
on Cancer) Group 1, 2 A, or 2 B, on mouse organs was determined by the alkaline single cell  
gel electrophoresis (SCG) assay. Groups of four mice were treated once orally or intraperi-  
toneally, and stomach, colon, liver, kidney, bladder, lung, brain, and/or bone marrow were  
sampled 3, 8, and/or 24 h after treatment.

The positive rate was 96.3% ; only two non-mutagenic carcinogens (benzenehexachloride  
and carbon tetrachloride) were negative. Concordance between genotoxicity and car-  
cinogenicity (in mice and/or rats) in target organs was 67.3%, 53.8%, and 41.9% for liver,  
stomach, and lung, respectively. At  $\geq 8$  h, however, concordance was 83.9%, 73.3%, and 65.0%  
for the same three organs. These results suggest that persistence of DNA lesions can play an  
important role in the target organ specificity of certain carcinogens. Our present approach  
confirms that the alkaline SCG assay can be used to detect carcinogens in many organs  
concurrently.

**Keywords :** alkaline SCG assay, *in vivo* genotoxicity, carcinogenicity, target organ,  
liver

受付 : 1998 年 1 月 5 日

受理 : 1998 年 1 月 14 日

©日本環境変異原学会



## 緒 言

現在もっとも汎用されている変異原性試験は微生物を用いる Ames 試験と哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で、癌原性の予測試験としての側面をもつものである。これら *in vitro* の試験系で陽性になった化合物については、*in vivo* 試験系での評価の必要性があることから、マウスを用いる小核試験が一般的に行われている。*In vivo* での染色体異常検出系としての小核試験は、実験方法が比較的簡便な短期試験として確立されており、背景データが豊富なことから有用性の高い試験系である。しかしながら、小核試験は骨髓細胞や末梢血液細胞を観察対象とするものであり、それゆえの限界がある (Morita et al., 1997)。特に、*in vitro* 染色体異常試験では陽性であるが小核試験で陰性である場合、被験物質が標的である骨髓細胞に到達していないために変異原性が検出されないということも考えられる。最近、再生肝や腸管を用いた小核試験も試みられているが、一般には造血組織以外での実施は困難である。これは染色体異常の誘発を指標とする限り、細胞分裂性のない組織を対象とはできないからである。

DNA 損傷を検出する試験系として、近年、alkaline single cell gel electrophoresis assay (アルカリ単細胞ゲル電気泳動法、アルカリ SCG 法、コメットアッセイ) が注目されている。本試験法は、DNA 損傷を DNA 鎖切断とアルカリ感受性部位として検出するものである (Singh et al., 1988)。この方法は染色体異常を指標とするものではないことから、非分裂性組織の DNA 損傷を検出できる可能性がある (Fairbairn et al., 1995)。我々はマウスの各種臓器から調製した核を用いる多臓器 SCG 法を開発し、その有用性を 1996 年に発表した (Sasaki et al., 1996)。アルカリ SCG 法は培養細胞や血球細胞のような単細胞における DNA 損傷の検出に適した方法であり、造血組織以外の組織における DNA 損傷性をこの方法で検出した例はまだ少ない。特に、多臓器を対象とする報告例は諸外国でもまれであるが、我々のグループで検討した化合物はすでに 54 化合物に達した (Sasaki et al., 1997 a, b, c, d, e, in press)。これらの化合物のほとんどは IARC (International Agency for Research on Cancer) でヒトに対する癌原物質 2 A, 2 B として評価された化合物である (Table 1, 2)。ここでは、多臓器 SCG 法の有用性を癌原性との相関性の観点から述べる。

### 標的臓器における遺伝子毒性和癌原性の相関

#### 1. 肝 臓

肝は薬物代謝が行われる主要な臓器であり、生体異物の影響をもっとも受けやすいと推測される。そのため、肝は我々が多臓器 SCG 法の導入を試みた当初の 4 臓器

(肝、腎、肺、脾)の一つであり、54 化合物のすべてについて肝での遺伝子毒性の結果が得られている。54 化合物中、肝で陽性を示したものは 49 化合物にのぼり、90.7 % という高い陽性率を示した。肝癌を誘発するにもかかわらず、肝での遺伝子毒性を検出し得なかったものはわずかに 2 化合物 (BHC, carbon tetrachloride) であった。Carbon tetrachloride については、投与 24 時間後の肝で migration が有意に増大した。しかし、剖検時に明瞭な小葉像、病理標本観察では顕著な壊死が認められたことから、migration の増大は壊死に起因するものであって遺伝子毒性は陰性と判断した。この 2 化合物は *in vitro* 変異原性試験も陰性であることから、いわゆる non-mutagenic carcinogen と考えられる。

Table 3 に肝、胃、肺について、発癌標的臓器における SCG 法による遺伝子毒性和癌原性との相関性についてまとめたものを示す。肝で陽性であった 49 化合物中、マウスで肝癌原性を示すものは 27 化合物 (55.1 %) に過ぎなかった。DNA 損傷が突然変異として固定されるまでの過程ではさまざまな DNA 修復機構が関与している (Pitot and Dragan, 1996)。しかし、アルカリ SCG 法は DNA 初期損傷を DNA 鎖の低分子化として検出するものであって (Singh et al., 1988 ; Fairbairn et al., 1995)、トランスジェニックモデルのように固定された DNA 損傷を検出するものではない。アルカリ SCG 法において投与 3 時間後のみで陽性を示す場合は、DNA 損傷が早期に修復される可能性を示唆している。そのため、投与後 8 時間以降の肝においても SCG 法陽性を示した 31 化合物について解析すると、マウスで肝癌原性のあるものは 19 化合物 (61.3 %)、マウスまたはラットの少なくとも一方で肝癌原性のあるものは 26 化合物 (83.9 %) であり、かなり高い相関性がみられる。

#### 2. 胃 (織胃粘膜)

胃粘膜細胞における遺伝子毒性を検討した 33 化合物中、胃で陽性であったものは 26 化合物 (78.8 %) であった。このうち、マウスの胃に癌原性を示すものは 12 化合物 (46.2 %)、マウスおよびラットの胃に癌原性を示すものは 14 化合物 (53.8 %) に過ぎなかった。しかし、投与後 8 時間以降の胃においても陽性を示したものの 15 化合物中、マウスで胃癌原性をもつものは 10 化合物 (66.7 %)、マウスまたはラットの少なくとも一方で胃癌原性をもつものは 11 化合物 (73.3 %) であった。以上のことから、肝と同様に投与後 8 時間以降の胃に認められる遺伝子毒性和胃癌原性は、比較的高い相関性が得られている。

#### 3. 肺

肺における遺伝子毒性を検討した 54 化合物中、肺で陽性であったものは 43 化合物 (84.3 %) であった。これらのうち、マウスの肺に癌原性を示すものは 18 化合物 (41.9 %) に過ぎなかった。しかし、投与後 8 時間以降の肺においても陽性を示したものの 19 化合物中、マウスで肺

Table 1 List of chemicals tested

Chemical	Abbreviation	IARC group	CAS No.	Source <sup>a</sup>	Vehicle <sup>b</sup>
AF2		2B	3688-53-7	W	O
<i>p</i> -Aminoazobenzene		2B	60-09-3	W	T
<i>o</i> -Anisidine		2B	90-04-0	W	O
Auramine		2B	2465-27-2	W	S
Benzo[a]pyrene	B[a]P	2A	50-32-8	S	O
Benzenehexachloride	BHC	2B	58-89-9	W	T
Biphenyl			92-52-4	W	O
Captafol		2A	2425-06-1	W	T
Carbon tetrachloride		2B	56-23-5	W	O
<i>p</i> -Cresidine		2B	120-71-8	W	O
<i>p</i> -Dimethylaminoazobenzene	DAB	2B	60-11-7	W	T
1,2-Dibromo-3-chloropropane	DBCP	2B	96-12-8	W	T
<i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -butylamine	DBN	2B	924-16-3	S	O
Dichlorvos	DDVP	2B	62-73-7	W	O
<i>N</i> -Nitrosodiethanolamine	DEoLN	2B	1116-54-7	S	S
<i>N</i> -Nitrosodiethylamine	DEN	2A	55-18-5	W	S
2,4-Diaminotoluene		2B	95-80-7	W	T
<i>p</i> -Dichlorobenzene		2B	106-46-7	W	T
Dichloromethane		2B	75-09-2	W	O
1,3-Dichloropropene		2B	542-75-6	W	T
<i>N</i> -Nitrosodimethylamine	DMN	2A	62-75-9	W	S
<i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -propylamine	DPN	2B	621-64-7	T	S
Ethylene dibromide	EDB	2A	106-93-4	W	T
Ethylene dichloride	EDC	2B	107-06-2	W	T
<i>N</i> -Nitrosoethylmethylamine	EMN	2A	10595-95-6	S	S
Ethyl methanesulfonate	EMS	2B	62-50-0	A	S
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea	ENU	2A	759-73-9	N	P
Ethyl acrylate		2B	140-88-5	T	S
Ethylene thiourea	ETU	2B	96-45-7	W	T
Hydrazine 2HCl	HZ	2B	5341-61-7	T	S
IQ		2A	76180-96-6	W	S
Potassium bromate	KBrO <sub>3</sub>	2B	7758-01-2	W	S
MeIQ		2B	77094-11-2	W	S
MeIQx		2B	77500-04-0	W	S
Mitomycin C	MMC	2B	50-07-7	K	S
Methyl methanesulfonate	MMS	2B	66-27-3	A	S
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	MNNG	2A	70-25-7	A	S
MX			77439-76-0	US	S
<i>N</i> -Nitrosomorpholine		2B	59-89-2	S	S
<i>N</i> -Nitrosopiperidine		2B	100-75-4	S	S
<i>N</i> -Nitrosopyrrolidine		2B	930-55-2	S	O
<i>o</i> -Phenylphenol	OPP	2B <sup>c</sup>	90-43-7	W	O
Procarbazine HCl	PCZ	2A	671-16-9	R	S
Phenobarbital		2B	57-30-7	Sa	S
PhIP		2B	105650-23-5	W	S
$\beta$ -Propiolactone		2B	57-57-8	T	S
1,2-Dimethylhydrazine HCl	SDMH	2B	306-37-6	W	S
Styrene-7,8-oxide		2A	96-09-3	W	T
Thiabendazole	TBZ		148-79-8	W	O
Tobacco smoke		1	-	NT	-
Trp-P-1 acetate		2B	68808-54-8	W	S
Trp-P-2 acetate		2B	72254-58-1	W	S
1,1-Dimethylhydrazine	UDMH	2B	57-14-7	T	S
Vinyl bromide		2A	593-60-2	T	O

<sup>a</sup>A : Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI (U. S. A.) ; K : Kyowa Hakko Kogyo Co., Tokyo (Japan) ; N : Nacalai Tesque Inc., Kyoto (Japan) ; NT : Nippon Tobacco Co., Inc., Tokyo ; R : Nippon Roche Co., Inc., Tokyo ; S : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO (U. S. A.) ; Sa : Sankyo Co., Inc., Tokyo (Japan) ; US : University of Shizuoka, Shizuoka ; W : Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka (Japan). <sup>b</sup>O : Olive oil ; P : Phosphate buffer (pH6.0) ; S : Saline ; T : 2% Tween 80.

<sup>c</sup>Sodium salt of OPP is in 2B group



Table 2 Migration of nuclear DNA from organs of mice treated with rodent carcinogens

Chemical	Dose (mg/kg)	Route	Sam- pling time (h)	Migration (μm, net value) <sup>a</sup>							Tumor sites in mice <sup>b</sup>	Other genotoxicity data <sup>b</sup>				
				Stomach	Colon	Liver	Kidney	Bladder	Lung	Brain		Spleen	Bone marrow	Ames	CA	MN
AF2	500	po	3	36.2	/	51.9	-	18.5	14.4	4.05	/	-	S,Lu	+	+	+
<i>p</i> -Amino- azobenzene	200	ip	24	37.6	/	38.8	14.8	-	15.0	-	/	-				
			3	/	/	24.6	14.5	/	-	/	8.83	-	L	+		+
<i>o</i> -Anisidine	690	po	24	/	/	68.3	40.7	/	22.7	/	14.2	16.2				
			3	-	24.7	-	-	26.3	-	-	/	-	Ub	+	+	I
Auramine	80	ip	24	-	-	-	-	15.5	-	-	/	-				
			3	/	/	34.9	13.1	/	9.24	/	-	-	L	+	+	-
B[a]P	250	po	24	/	/	33.5	9.68	/	-	/	-	-				
			3	/	/	9.48	-	/	12.1	/	-	-	L, Lu, E, Sk	+	+	+
BHC	80	po	24	/	/	-	-	/	-	/	-	-	S	-		
			3	/	/	-	-	/	-	/	-	-	L	-	-	-
Biphenyl	2000	po	24	/	/	-	-	/	-	/	-	-				
			3	-	/	-	-	-	-	-	/	-			+	-
Captafol	1000		8	-	/	-	-	-	6.70	-	/	-				
			24	34.6	/	15.4	20.3	24.4	8.84	2.98	/	4.70				
Carbon tetrachloride		po	3	26.2	-	11.3	11.4	-	15.2	-	/	-	S,I,L,Vs	+	+	
			24	20.1	-	-	-	-	-	-	/	-				
<i>p</i> -Cresidine	2000	po	3	-	-	-	-	-	-	-	/	-	L	-	-	-
			24	-	-	-	-	-	-	-	/	-				
DAB	595	po	3	-	-	-	-	39.0	-	-	/	-	Ub	+		-
			24	-	-	-	-	14.4	-	-	/	-				
DAB	500	ip	3	/	/	30.6	-	/	-	/	-	-	L	+	+	I
			24	/	/	15.0	-	/	-	/	-	-				
DBCP	100	ip	3	-	/	43.5	13.9	-	13.4	-	/	-	S,Lu,Nc	+	+	+
DBN	600	ip	24	21.9	/	-	-	-	-	-	/	6.74				
			3	19.8	10.7	53.5	-	24.1	10.2	-	/	3.10	S,E,I,L, Ub,Lu, S,L	+	+	-
DDVP	100	po	24	-	-	-	-	-	-	-	/	14.2		+	+	-
			3	51.9	/	54.4	15.4	7.63	16.8	2.97	/	-	Lu, (L, K)	+	+	-
DEoIN	2000	ip	24	27.3	/	21.7	-	-	8.89	-	/	-				
			3	25.8	/	37.0	22.8	/	9.51	-	/	-				
DEN	160	ip	24	-	/	25.3	24.5	/	14.5	-	/	-				
			3	/	/	42.9	16.7	/	14.7	/	/	-	S,L,K,Lu	+	+	+
2,4-Di- aminotoluene	240	ip	24	/	/	30.8	13.4	/	15.6	/	/	-				
			3	/	/	15.1	7.28	/	7.94	/	-	-	L,Hs	+	+	I
			24	/	/	26.6	24.4	/	-	/	-	-				

(次頁へつづく)

Table 2 つづき

Chemical	Dose (mg/kg)	Route	Sam- pling time (h)	Migration (μm, net value) <sup>a</sup>							Tumor sites in mice <sup>b</sup>	Other genotoxicity data <sup>b</sup>			
				Stomach	Colon	Liver	Kidney	Bladder	Lung	Brain		Spleen	Bone marrow	Ames	CA
<i>p</i> -Di- chlorobenzene	2000	ip	3	/	/	34.7	-	/	-	/	8.64	-	L, (K)	-	I
			24	/	/	-	-	/	-	/	-	-			
Di- chloromethane	1720	po	3	-	/	-	-	/	-	/	-	-	L, (K)	-	I
		24	-	/	12.4	-	/	12.8	/	-	-	-			
1,3-Di- chloropropene	150	ip	3	26.2	/	25.7	14.4	12.6	13.6	11.0	/	5.11	S,L,Ub	+	-
		24	-	/	-	-	-	-	-	4.86	/	-			
DMN	50	ip	3	26.3	-	49.7	19.6	19.6	44.8	-	-	-	L,K,Lu,Cn	+	+
		24	-	-	18.9	12.6	-	-	45.5	-	-	-			
DPN	400	ip	3	/	/	34.7	11.4	/	15.2	/	/	-	(E,L,K)	+	-
		24	/	/	26.9	-	/	/	9.87	/	/	-			
EDB	100	ip	3	-	/	23.9	13.5	-	18.1	-	/	-	S,E,Lu,Mg,Nc, Sk,(L,Sp)	+	+
		24	33.4	/	18.6	11.6	16.6	-	-	-	/	-			
EDC	200	ip	3	28.1	/	20.3	13.7	23.0	21.8	27.2	/	8.26	L,Lu,Ly,Mg, U,(S)	+	-
		24	27.1	/	24.8	21.9	9.35	22.1	12.6	/	/	-			
EMN	30	ip	3	-	/	24.6	22.3	/	14.4	-	/	-	L	+	-
		24	-	/	4.27	10.5	/	/	-	/	/	-			
EMS	300	ip	3	/	/	29.3	19.4	/	20.2	/	-	-	K, Lu	+	+
		24	/	/	-	-	-	/	-	/	-	-			
ENU	25	ip	3	/	/	57.4	44.2	/	34.9	/	21.6	11.0	L,K,Lu, Cn,Ly	+	+
		24	/	/	10.8	-	-	/	3.20	/	5.21	-	S	-	I
Ethyl acrylate	375	po	3	23.6	/	9.18	-	6.48	21.2	-	/	-		+	
		24	22.9	/	-	-	-	13.4	16.3	-	/	-	L	+	-
ETU	2000	ip	3	/	/	69.7	36.7	/	35.3	/	22.4	-		+	
		24	/	/	45.5	10.3	-	/	20.7	/	38.3	-			
HZ	150	po	3	19.9	-	7.95	-	11.3	8.92	-	/	-	L,Lu,Ly, Mg	+	+
		24	11.8	14.9	37.5	-	14.0	20.6	3.79	/	/	-	S,L,Lu,(Co)	+	-
IQ	13	ip	1	-	10.7	-	-	-	-	-	-	-		+	I
		3	-	15.7	8.51	-	-	-	9.37	5.55	-	-			
		8	-	12.5	6.04	-	-	-	/	/	/	-			
		24	8.51	/	-	6.79	-	/	10.4	-	-	-			
KBrO <sub>3</sub>	200	ip	3	/	/	10.8	13.1	/	-	/	-	-		+	+
		24	/	/	-	-	-	/	-	/	-	-			
MeIQ	13	ip	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S,L,(Co)	+	-
		3	12.1	34.7	12.4	6.88	-	-	-	5.71	-	-			
		8	13.1	35.2	11.9	-	-	-	/	/	/	-			
		24	-	/	-	-	-	/	8.28	-	-	-			

(次頁へつづく)



Table 2 つづき

Chemical	Dose (mg/kg)	Route	Sam- pling time (h)	Migration ( $\mu$ m, net value) <sup>a</sup>							Tumor sites in mice <sup>b</sup>	Other genotoxicity data <sup>b</sup>				
				Stomach	Colon	Liver	Kidney	Bladder	Lung	Brain		Spleen	Bone marrow	Ames	CA	MN
MeQx	13	ip	1	-	30.6	10.1	-	-	-	-	-	-	L,Lu,Hs	+	-	+
		3	3	27.9	36.7	9.90	8.51	-	10.2	8.42	-	-				
		8	8	14.4	25.1	3.45	-	-	/	/	/	/				
		24	24	9.94	/	-	-	/	8.28	-	-	-				
MMC	2	ip	3	/	/	61.8	43.5	/	33.3	/	28.2	8.85	Ls	+	+	+
		24	24	/	/	36.3	22.6	/	33.0	/	18.3	-				
MMS	80	ip	3	/	/	45.5	53.1	/	46.3	/	61.6	52.1	Lu, Hs	+	+	+
		24	24	/	/	28.2	20.9	/	21.5	/	23.6	-				
MNNG	100	ip	3	/	/	10.0	14.6	/	18.7	/	-	-	S	+	+	+
		24	24	/	/	-	8.62	/	-	/	-	-				
MX	100	po	1	12.7	12.0	19.4	7.40	13.5	3.40	-	-	-	(S)	+	+	-
		3	3	19.7	10.2	-	6.65	6.34	-	-	-	-				
		6	6	12.2	7.67	-	7.40	6.54	3.84	6.42	-	-				
		24	24	6.66	-	-	-	-	3.53	-	-	-				
N-Nitroso- morpholine	250	ip	3	/	/	78.1	41.3	/	30.7	/	/	-	L, Lu	+		+
		24	24	/	/	60.6	41.0	/	21.7	/	/	-				
N-Nitroso- piperidine	120	ip	3	/	/	31.9	-	/	11.9	/	/	-	E,S,L,Lu	+		-
		24	24	/	/	19.5	-	/	9.55	/	/	-				
N-Nitroso- pyrrolidine	800	ip	3	/	/	53.1	29.8	/	28.2	/	/	-	Lu, (L)	+		-
		24	24	/	/	52.1	33.2	/	29.4	/	/	-				
OPP	2000	po	3	19.2	/	16.2	6.91	-	16.4	-	/	-	(Ub)	-	+	-
		8	8	13.2	/	-	6.01	12.5	-	-	/	-				
		24	24	-	/	-	-	10.4	-	-	/	-				
PCZ	400	po	3	46.0	57.1	47.8	36.2	29.0	45.1	36.4	/	7.77	Lu,Cu,Hs,U, (S,I,L,Sp)	-	-	+
		24	24	-	-	40.7	-	-	9.37	-	/	-	L	+	+	I
Pheno- barbital	140	ip	3	/	/	13.5	-	/	-	/	-	-				
		24	24	/	/	9.95	-	/	-	/	-	-	Ly, (Co)	+	-	-
PhIP	40	ip	1	-	35.7	9.95	-	-	-	-	-	-				
		3	3	-	26.5	-	8.06	-	-	9.96	-	-				
		8	8	-	20.8	-	-	-	/	/	/	/				
		24	24	-	/	-	-	/	-	-	-	-				
$\beta$ -Propio- lactone	150	po	3	18.4	/	-	-	-	-	-	-	-	S	+	+	-
		24	24	-	/	-	-	-	-	-	-	-				
SDMH	30	po	3	-	14.5	44.1	23.2	13.9	-	-	/	6.34	Co,Lu,Vs	+	+	+
		24	24	-	-	-	-	-	-	-	/	-				

(次頁へつづく)

Table 2 つづき

Chemical	Dose (mg/kg)	Route	Sam- pling time (h)	Migration ( $\mu$ m, net value) <sup>a</sup>							Tumor sites in mice <sup>b</sup>	Other genotoxicity data <sup>b</sup>			
				Stomach	Colon	Liver	Kidney	Bladder	Lung	Brain		Spleen	Bone marrow	Ames	CA
Styrene- 7,8-oxide TBZ	400	ip	3	/	/	65.5	54.5	/	57.9	/	58.5	43.7	+	+	-
			24	/	/	22.8	9.12	/	8.68	/	7.25	-			
	200	po	3	30.6	/	15.8	18.7	18.4	17.9	14.5	/	8.93	+	+	+
Tobacco smoke			8	15.4	/	7.95	4.30	9.52	8.64	-	/	-			
			24	19.5	/	-	-	-	-	-	/	-			
	5-fold	ih	0.25	45.4	/	10.4	-	/	20.6	-	/	-	+		-
			0.5	15.9	/	10.9	-	/	12.9	-	/	-			
			1	13.9	/	-	-	/	-	-	/	-			
Trp-P-1			2	-	/	-	-	/	-	-	/	-			
			4	-	/	-	-	/	-	-	/	-			
	25	ip	1	-	/	13.4	-	/	-	-	-	-	+	+	+
			3	7.86	/	25.1	-	/	15.2	-	-	-			
			24	-	/	-	-	/	-	-	-	-			
Trp-P-2															
	13	ip	1	-	23.3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
			3	17.1	24.2	12.3	7.69	-	11.4	6.81	-	-			
			8	-	15.6	-	-	-	/	/	/	/			
UDMH			24	-	/	-	-	/	-	-	-	-			
	100	po	3	28.4	7.96	12.5	-	-	9.11	-	/	-	+		+
			24	-	-	-	-	-	-	-	/	-			
Vinyl bromide	2000	po	3	17.9	/	8.03	5.96	-	10.4	-	/	-		+	-
			24	17.7	/	6.55	-	12.4	-	10.4	/	-			

Abbreviations and marks: +, Positive; -, Negative; I, Inconclusive; /, Not done; ip, intraperitoneal treatment; po, oral treatment; ih, inhalation; CA, in vitro cytogenetic test; MN, micronucleus test in mouse bone marrow.

Abbreviations for tumor sites: Cn, central nervous system; Co, colon; E, ethophagus; Hs, hematopoietic system; I, intestine; K, kidney; L, liver; Ls, local sarcoma; Lu, lung; Ly, lymphoma/leukemia; Mg, mammary gland; Nc, nasal cavity; S, stomach; Sk, skin; Sp, spleen; U, uterus; Ub, urinary bladder; Vs, vascular system; Z, Zynbal's gland. Abbreviations in parentheses represent tumor sites in rats but not in mice.

<sup>a</sup> References for the alkaline SCG assay data: Sasaki et al., 1997a, b, c, d, e, in press (a), in press (b), in press (c)

<sup>b</sup> References for tumor sites and other genotoxicity data: IARC Monographs; Lee and Dixon, 1978; Ito et al., 1984; Morita et al., 1997



Table 3 Number of chemicals that gave positive and negative results in the alkaline SCG assay for each target organ

Traget organ of carcinogenicity	SCG assay positive					SCG assay negative		
	Carcinogenicity					Carcinogenicity		
	Positive		Negative		Total	Positive		Total
	N	%	N	%		N	%	
Stomach (M) <sup>a</sup>	12	46.2	14	53.8	26	0	0.0	7
Stomach (M+R) <sup>b</sup>	14	53.8	12	46.2	26	0	0.0	7
Liver (M)	27	55.1	22	44.9	49	2	40.0	5
Liver (M+R)	33	67.3	16	32.7	49	2	40.0	5
Lung (M)	18	41.9	25	58.1	43	1	9.09	11
Lung (M+R)	18	41.9	25	58.1	43	1	9.09	11
SCG assay positive at ≥8h								
Stomach (M)	10	66.7	5	33.3	15			
Stomach (M+R)	11	73.3	4	26.7	15			
Liver (M)	19	61.3	12	39.3	31			
Liver (M+R)	26	83.9	5	16.7	31			
Lung (M)	13	65.0	7	35.0	20			
Lung (M+R)	13	65.0	7	35.0	20			

<sup>a</sup> Tumor sites in mice

<sup>b</sup> Tumor sites in mice and/or rats

癌原性をもつものは13化合物(65.0%)であった。以上のことから、投与後8時間以降の肺に認められる遺伝子毒性と肺癌原性には比較的高い相関性が認められるものの、肝の場合に比べると相関性は低い。

#### 4. 膀胱

膀胱特異性が高い化合物として、マウスおよびラットに膀胱癌を誘発する *o*-anisidine (NTP, 1978), *p*-cresidine (NTP, 1979), およびラット膀胱に対して癌原性をもつ OPP (NTP, 1986) の3化合物についてのデータが得られている。*o*-Anisidine, *p*-cresidine は投与3, 24時間後の膀胱でSCG法陽性を示している。一方, OPP は胃, 肝, 腎, 膀胱, 肺においてSCG法陽性であるが, 投与24時間後までDNA損傷が残存しているのは膀胱のみである。このように複数の臓器にSCG法陽性を示す場合でも, 膀胱のDNA損傷がもっとも長時間にわたって残存するという事実は, 膀胱に対する癌原性を考える上で大変興味深い。

なお, *o*-anisidine, *p*-cresidine は Ames 試験, *in vitro* 染色体異常試験では陽性であるが (Ashby et al., 1988), マウスおよびラットを用いた *in vivo* 変異原性試験である骨髓小核試験, 肝小核試験, 肝UDS試験, 肝および膀胱でのアルカリ溶出法のいずれも陰性である (Ashby et al., 1991)。*o*-Anisidine については BigBlue トランスジェニックマウスの膀胱で陽性結果が報告されている (Ashby et al., 1994)。

#### 小核試験で陽性率が低い化合物群の遺伝子毒性の多臓器 SCG 法による検出

種々の変異原性試験は対象とする化合物群により, 感

受性が大きく異なることが知られている。なかでも, ハロゲン化合物, 合成ステロイドおよびホルモン, 金属化合物, ジアルキル型の *N*-ニトロソ化合物, 芳香族アミンの小核試験での陽性率は30%程度に過ぎない (Morita et al., 1997)。また, ヘテロサイクリックアミン類は Ames 試験ではきわめて強い変異原性を示すが (Holme, et al., 1988; Gayda, et al., 1983; Decloitre, et al., 1984; Watanabe and Ohta, 1993), *in vitro* 染色体異常試験や小核試験では陰性, または弱い陽性である (Alexander, et al., 1989; Overvik and Gustafsson, 1990; Wild, et al., 1985; Tucker, et al., 1987; Morita et al., 1997)。現在までに, ヘテロサイクリックアミン, ハロゲン化オレフィン, ジアルキル型の *N*-ニトロソ化合物についての多臓器 SCG 法の結果が得られている。

#### 1. ヘテロサイクリックアミン

腹腔内投与した6種類のヘテロサイクリックアミン (Trp-P-1, Trp-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP) について報告されている。いずれのヘテロサイクリックアミンも結腸粘膜細胞でDNA損傷が誘発されている (Trp-P-1 については検討されていない)。その他の臓器に対しては, Trp-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx は胃, 肝, 腎, 肺, 脳で, Trp-P-1 は胃, 肝, 肺で, PhIP は肝, 腎, 脳で遺伝子毒性を示した。膀胱, 脾, 骨髓でSCG法陽性を示したヘテロサイクリックアミンはない。

Trp-P-1, Trp-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx のマウスでの発癌標的臓器は肝であり, IQ, MeIQx は肺に, IQ, MeIQ は胃にも癌原性を示すことが報告されている (Sugimura, 1988; Sugimura, et al., 1990; Alexander, et al., 1989; Overvik and Gustafsson, 1990; Esumi, et

al., 1989)。これらの臓器における癌原性はアルカリ SCG 法での陽性結果と一致する。一方, PhIP はリンパ組織に癌を生じるが (Esumi, et al., 1989), これは骨髓での陰性結果とは一致しなかった。

結腸に対しては, Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, PhIP がラットで癌を生じるが, マウスでは生じない (Nagao and Sugimura, 1993)。マウス結腸における PhIP の DNA 付加物形成はラットの1/2~1/3であり, PhIP の DNA 付加物は発癌の充分条件ではないと考えられている (Nagao and Sugimura, 1993)。最近, MeIQ は BigBlue トランスジェニックマウスの結腸でも強い変異原性を示すことが報告されている (Suzuki et al., 1996)。臓器特異的な SCG 法陽性結果と癌原性との関連については種差も含めた今後の検討が必要であろう。

#### 2. ハロゲン化オレフィン

DBCP, 1,3-dichloropropene, EDB, EDC, vinyl-bromide, dichloromethane はいずれも胃, 肝, 腎, 肺などの複数の臓器でSCG法陽性を示している。SCG法では, DNA損傷をアルカリ感受性部位としてDNAの低分子化の指標で検出する。そのため, DNAの低分子化を伴うアポトシスまたは壊死が生じた場合には, 偽陽性の結果を得ることがある。そのため, SCG法の結果を評価する場合には, 細胞死の有無を考慮に入れることが重要である。Carbon tetrachloride では壊死に起因するものと考えられる二次的なDNA損傷が投与24時間後の肝で認められている。一方, DBCP には強い腎毒性が (Søderlund, et al., 1990; Låg, et al., 1989), また, EDB, EDC には肝毒性が知られている (Storer and Conolly, 1983)。しかし, 一般的に, 投与後24時間以内の生存動物について, 臨床および剖検での肉眼的な異常所見がみられなければ壊死は起こっていないと考えられていること (Gregus and Klaassen, 1996), 投与24時間後の剖検および病理標本での異常は認められていないことから, SCG法での陽性結果はこれらの化合物のDNA損傷作用に基づくものであり, 細胞壊死による二次的なものではないと考えられている。

#### *In vivo* 変異原性試験としての多臓器 SCG 法

マウス骨髓における遺伝子毒性は小核試験によって広範に検討され, 豊富なデータが得られている。そこで, 骨髓における遺伝子毒性を, 多臓器 SCG 法と小核試験の間で比較した。54の癌原性物質 (Table 1) に対するマウス骨髓での小核試験の陽性率は40.4% (21/52) である。しかし, SCG法の骨髓での陽性率は25.9% (14/54) とそれよりも低い。逆に, 骨髓でSCG法陽性であるにもかかわらず, 小核試験では陰性のものがDBN, DDVP, 1,3-dichloropropene, EDC, styrene 7,8-oxide と5化合物あり, SCG法と小核試験法では検出し得るものが必

ずしも一致していない。したがって, SCG法が広範な化合物の遺伝子毒性を検出し得るとしても, 骨髓という単一の臓器を対象としている限りはその特徴を十分に発揮できないといえる。

しかしながら, 以上の化合物について, 多臓器 SCG 法で陽性 (少なくとも一つの臓器で陽性) となったものは52化合物であり (陽性率96.3%, 陰性は変異原性がないと考えられているBHCとcarbon tetrachlorideである。Table 2参照), Ames 試験, *in vitro* 染色体異常試験, 小核試験の少なくとも一つで陽性となっているものと完全に一致する。また, 小核試験で陽性率が低いヘテロサイクリックアミン, ハロゲン化オレフィンだけでなく, ジアルキル型の *N*-ニトロソ化合物であるDMN, DEN, DBN, DPN, EMN, DEoLN, *N*-nitrosomorpholine, *N*-nitrosopiperidine, *N*-nitrosopyrrolodine についてもSCG法では肝, 肺などの複数の臓器でSCG法陽性である。したがって, *in vivo* でDNA損傷性を検出する試験系としてのSCG法の有用性はきわめて高いと評価される。

#### 結 語

従来の *in vivo* 変異原性試験は, 骨髓小核試験法や肝UDS試験法のように, ある特定の臓器における遺伝子毒性を検出するものであった。そのため, 化学物質のリスク評価をする場合に, *in vivo* 変異原性試験での観察対象臓器と毒性発現の標的臓器との不一致が常に問題とされてきた。近年, 小核試験法については皮膚, 肝, 消化管など, 従来対象としてこなかった臓器を用いた検出系の開発が試みられてきている。組織特異的な遺伝子毒性の解析系としては, トランスジェニックマウスによる *in vivo* 変異原性試験も注目されている。54化合物についていえば, SCG法で陽性の臓器は必ずしも発癌の標的臓器とはなり得ないことは事実であるが, 発癌標的臓器であるにも関わらずSCG法で陰性となることはまれであることがわかった。したがって, ここで述べた多臓器SCG法は, 癌原物質の検出系としては感受性の高い試験系であると期待される。我々が用いた多臓器SCG法の手法と操作上の留意点をTable 4に示す。

小核試験やトランスジェニックマウスの試験系ではDNA損傷が染色体異常または遺伝突然変異として固定されたものを検出しているのに対し, SCG法はDNA初期損傷を検出するものである。DNA損傷のほとんどは修復されるか, あるいは細胞の死として取り除かれると考えられ, 遺伝子突然変異としてトランスジェニックマウスの系で検出されるものはDNA初期損傷の一部分である。臓器特異的な遺伝子毒性の有効なリスク評価のためにも両試験系での結果の比較が待たれるところである。今後も, 多くの種類の変異原物質, 発癌物質について多臓器SCG法で検討し, データベースの充実をはか



Table 4 Standard procedure of alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs

1. 被験物質投与
  - (1) 7 週齢の雄マウス。1 群 4 匹。実験期間中、餌と飲水は自由に摂取
  - (2) 投与経路は小核試験等と同様に腹腔内または経口投与
  - (3) 投与 3～24 時間後に各臓器を摘出(臓器の一部をホルマリンで固定し、必要に応じて切片を作製)
2. 核の調製方法
  - (1) 肝、腎、肺、脳、脾の各臓器はそのままホモジナイズ
  - (2) 胃(織胃部分)、結腸、膀胱は切開して生理食塩水で内容物を洗い流した後、鈍性のペーパーナイフまたはスパーテルで表面をこすって粘膜細胞を剝離してこれをホモジナイズ
  - (3) 骨髓細胞は両側大腿骨からは 0.5 ml のホモジナイズ液で採取
  - (4) 冷ホモジナイズ液 (75 mM NaCl, 24 mM Na<sub>2</sub>EDTA ; pH 6.5～7.5) を加えてクリアランスの緩い<sup>a</sup> テフロン製の 10 ml ポッター型ホモジナイザーで 500～700 rpm で緩やかに 1 ストロークでホモジナイズ
  - (5) 700 xg で 10 分間冷却遠心し、上清を除き沈殿した核分画を冷ホモジナイズ液で再懸濁し、ゲル作製時まで水中に保存
3. アガロースゲルの作成
  - (1) 第 1 層、第 3 層用のアガロース GP 42、第 2 層用の低ゲル化温度アガロース LGT(ナカライテスク)は生理食塩水にそれぞれ 1%と 2%<sup>b</sup> になるように電子レンジで加熱溶解
  - (2) 第 1 層ゲルは溶解した GP 42 の 75  $\mu$ l を全面フロストスライドガラス (マツナミ) 上に置き、ただちにその上にスーパーフロストスライドガラス<sup>c</sup>(マツナミ) をかぶせてアガロースを広げ室温で水平に置いてアガロースを固化
  - (3) GP 42 アガロースの固化後<sup>d</sup>、ただちにスーパーフロストスライドガラスを横に滑らせるようにして引き剥がす
  - (4) アガロース LGT は溶解後 45°C に保温しておき、第 2 層ゲル作製の直前に、調製した核懸濁液または骨髓細胞懸濁液と 1:1 で混合し、その 75  $\mu$ l を固化した第 1 層ゲルに重層し、ただちにスライドガラスをかぶせて固化
  - (5) アガロースが固化したらスライドガラスを引き剥がし、さらに第 3 層ゲルとして GP 42 を 100  $\mu$ l 重層して同様に固化
4. アルカリ処理と電気泳動
  - (1) 作製したアガロースゲルを 10 cm ガラスシャーレに水平に置き、ただちに氷冷した核溶解液 (2.5 M NaCl, 0.1 M Na<sub>4</sub>-EDTA, 10 mM Tris, 1% Na-dodecanoylsalcosinate, 10% DMSO, 1% Triton X-100 ; pH 10) をアガロースゲルが完全に浸るまで静かに添加<sup>e</sup>
  - (2) 0～4°C の低温インキュベーターまたは冷蔵庫に移し 1 時間以上静置して<sup>f</sup> 核を溶解
  - (3) アガロースゲルをサブマリン型電気泳動槽に移して一列に並べ、氷冷した電気泳動緩衝液 (0.3 M NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA ; pH>13) をアガロースゲルが完全に浸るまで静かに加え、電気泳動槽ごと 0°C の低温インキュベーターに移動
  - (4) 10 分間静置して DNA を unwinding させた後、25 V で 15 分間、定電圧電気泳動を行う<sup>g</sup>
  - (5) 電気泳動が終了したアガロースゲルを静かに引き上げ、10 cm ガラスシャーレに水平に置き、アガロースゲルが完全に浸るまで静かに中和液 (0.4 M Tris ; pH 7.5) を加え、10～20 分間静置
  - (6) アガロースゲルを静かに引き上げ、20  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド液 50  $\mu$ l を滴下してカバーガラスをかけ、各臓器 50 核についてコメット像の全長、核の直径を測定

<sup>a</sup> 乾燥したテフロン乳棒をガラス外筒管に挿入し、外筒管を離れたときに抵抗なく外筒管が落下する程度までをテフロン乳棒を研磨したもの。

<sup>b</sup> 使用するアガロースの種類によって、試験に最適な濃度は異なる。

<sup>c</sup> GP 42 を広げる場合には、スーパーフロストスライドガラスが最適の重さであった。また、スーパーフロストスライドガラスの使用済みの面の再使用は不可。

<sup>d</sup> GP 42 の場合は約 1 分。

<sup>e</sup> ホモジナイズから核溶解開始までの時間をできる限り短くすると結果が良好。

<sup>f</sup> この状態で翌日まで置くことも可能。冷却下のため溶解液の析出が生じるが、結果には影響なし。

<sup>g</sup> 電流が 250～300 mA 程度になるように電気泳動緩衝液の量を調整。細胞溶解から電気泳動終了までは、ゲルを電気泳動槽にセットするときを除き、遮光・低温で行うことがきわめて重要。

ることが望まれる。

## 謝 辞

本研究は公益信託土川記念哺乳動物研究助成基金平成 7, 8 年度助成金および文部省科学研究費補助金(萌芽的研究)によって行われた。MX を分与頂いた静岡県立大学食品栄養科学部教授・木苗直秀博士、本研究に種々の御助言を頂いた東京農業大学客員教授・白須泰彦博士に深謝する。

## 参考文献

- Alexander, J., G. Becher, and L. Busk (1989) Cooked food mutagens-a general overview, Var. Foda, 42 (Suppl. 2), 9-59.
- Ashby, J. and R. W. Tennant (1988) Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the US NCI/NTP, Mutation Res., 204, 17-115.
- Ashby, J., P. A. Lefevre, H. Tinwell, G. Brunborg, P. Schmezer, B. Pool-Zobel, R. Shanu-Wilson, J. A. Holme, E. J. Soderlund, D. Gulati and J. P. Wojciechowski (1991) The non genotoxicity to rodents of the potent bladder carcinogens o-anisidine and p cresidine, Mutation Res., 250, 115-133.
- 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. J. Glickman and H. Tinwell (1994) Mutagenicity of o-anisidine to the bladder of lacI-transgenic B 6 C 3 F 1 mice : absence of <sup>14</sup>C or <sup>32</sup>P bladder DNA adduction, Carcinogenesis, 15, 2291-2296.
- Decloitre, F., G. Hamon, M. Martin, V. Thybaud-Lambay (1984) Mutagenic activation of 3-amino-1,4-dimethyl-5 H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P-1) and 3-amino-1-methyl-5 H-pyrido [4,3-b] -indole (Trp-P-2) by primary cultures of adult rat hepatocytes, Mutation Res., 137, 123-132.
- Esumi, H., H. Ohgaki, E. Kohzen, S. Takayama and T. Sugimura (1989) Induction of lymphoma in CDF 1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine, Jpn. J. Cancer Res., 80, 1176-1178.
- Fairbairn, D. W., P. L. Olive and K. L. O'Neill (1995) The comet assay : a comprehensive review, Mutation Res., 339, 37-59.
- Gayda, D. P. and M. W. Pariza (1983) Activation of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline and 2-aminofluorene for bacterial mutagenesis by primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes, Mutation Res., 118, 7-14.
- Gregus, Z., and C. D. Klaassen (1996) Mechanisms of toxicity, In : Klaassen, C. D. (Ed) Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons 5th ed., pp. 35-74, McGraw-Hill, New York.
- Holme, J. A., G. Brunborg, J. Alexander, B. Trygg and C. Bjornstad (1988) Modulation of the mutagenic effects of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ) and 2-amino-3,4-methylimidazo [4,5-f] quinoline (MeIQ) in bacteria with rat liver 9000 x g supernatant or monolayers of rat hepatocytes as an activation system, Mutation Res., 197, 39-49.
- Ito, N., T. Ogiso, S. Fukushima, M. Shibata, and A. Hagiwara (1984) Carcinogenicity of captafol in B 6 C 3 F 1 mice, Gann, 75, 853-865.
- Låg, M, E. J. Søderlund, G. Brunborg, J. E. Dahl, J. A. Holme,

J. G. Omichinski, S. D. Nelson, and E. Dybing (1989) Species differences in testicular necrosis and DNA damage, distribution and metabolism of 1,2-dibromo-3 chloropropane (DBCP), Toxicology, 58, 133-144.

Lee, I. P. and R. L. Dixon (1978) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of procabazine, Mutation Res., 55, 1-14.

Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y. F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi, Evaluation of the rodent micronucleus assay to screen IARC carcinogens (group 1, 2 A, and 2 B), The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS, Mutation Res., in press.

Nagao, M, and T. Sugimura (1993) Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development, Mutation Res., 290, 43-51.

National Toxicology Program (1978) Bioassay of o-anisidine hydrochloride for possible carcinogenicity, NTP TR 89.

National Toxicology Program (1979) Bioassay of p-cresidine for possible carcinogenicity, NTP TR 89.

National Toxicology Program (1986) Toxicology and carcinogenesis studies of *ortho*-phenylphenol (CAS No. 90-43-7) alone and with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (CAS No. 57-97-6) in Swiss CD-1 mice, Natl. Toxicol. Prog. Technical Report Services, 301, 1-144.

Overvik, E. and J. A. Gustafsson (1990) Cooked food mutagens : current knowledge of formation and biological significance, Mutagenesis, 5, 437-446.

Pitot III, H. C. and Y. P. Dragan (1996) Chemical carcinogenesis, In : Klaassen, C. D. (Ed) Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons 5th ed., pp. 201-267, McGraw-Hill, New York.

佐々木有, 泉山房子, 西館絵美 (1996) 新しい *in vivo* 遺伝毒性試験としてのマウス多臓器 SCG 試験, 環境変異原研究, 18, 125-136.

Sasaki, Y. F., S. Tsuda, F. Izumiyama, and E. Nishidate (1997 a) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, Mutation Res., 389, 33-44.

Sasaki, Y. F., F. Izumiyama, E. Nishidate, N. Matsusaka and S. Tsuda (1997 b) Detection of genotoxicity of rodent carcinogens targeting the liver by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow), Mutation Res, 391, 201-214

Sasaki, Y. F., F. Izumiyama, E. Nishidate, N. Matsusaka and S. Tsuda (1997 c) 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), Mutation Res, 391, 215-231.

Sasaki, Y. F., F. Izumiyama, E. Nishidate, T. Ohta, T. Ono, N. Matsusaka and S. Tsuda (1997 d) Simple detection of *in vivo* genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay, Mutation Res, 392, 251-259.

Sasaki, Y. F., E. Nishidate, F. Izumiyama, M. Watanabe-Akanuma, N. Kinae, N. Matsusaka and S. Tsuda (1997 e) Detection of *in vivo* genotoxicity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy 2 [5 H] -furanone (MX) by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs, Mutation Res, 393, 47-53.

Sasaki, Y. F., A. Saga, M. Akasaka, E. Nishidate, M. Watanabe



## 第7回国際環境変異原学会 (7th ICEM) 印象記

1997年9月7日～12日, Toulouse (仏)

野口 忠 (日本バイオアッセイ研究センター)

参加報告書を書くために資料を探していたら、島田弥太郎先生が書かれた1977年の第2回環境変異原国際会議 (エジンバラ) の参加報告を「遺伝毒性および関連領域の動向と解説」(1978年 第2集)の中に見つけた。第2回会議は出席者約500名で一般演題193の発表があり、その4年前に行われた第1回会議 (アシロマ) は出席者200名、一般演題50で、比較すると数の上だけでなく内容的にも著しい発展のあとが窺われると記されていた。今回の第7回トゥールーズ会議には約40ヵ国から800人以上が参加し、約550題の演題が発表されるという盛大さであった。参加国の顔ぶれも南米のブラジル、チリ、アルゼンチン、東南アジアのタイなどの変異原研究新興の国の参加があり研究がますます広がりを見せていることを実感した。これらの国の発表ではその国特有の植物から抽出した天然物質の抗変異原性など、独特の発表が目についた。

一般発表はポスター形式で行われ、教室と廊下にポスターが展示された。参加者がこれを見て回るのであるが、狭い場所に大勢の人が集まり、ごった返していた。この中で興味を持ったのはComet assayとFISH染色である。これらはNew mutagenicity tests and their evaluationというsessionで独立したpartが与えられるほど多くの発表があった。また、発表には美しい蛍光写真が掲示されているので、廊下にはComet通りとかFISH通りと名付けられるほど目立っていた。Comet assayは操作が簡単で、試験感度がよく、多臓器に応用することができるという特徴があり、人のepicelial cellやlymphocytesを用いたbiomonitoringの報告があった。またFISH染色も染色体中期像分析をせず、個別の染色体を識別できることから、人のlymphocytesやspermを用い、染色体の異数性を調べるというbiomonitoringに応用した発表があった。しかし、これらの方法もlymphocytesのSCEや染色体異常分析によるbiomonitoringと同様に、喫煙等の生活習慣や食物の影響が強く、特定の化学物質に対する人のbiomonitoringに用いるには検討が必要とのことであった。それにしても、会議中に配られたイギリスの受託機関HuntingdonとCentral Toxicology LaboratoryのパフレットにComet assayやFISH染色を用いた変異原性試験がすでに受託試験項目として上がっており、この分野の進歩

には驚かされた。

会議の2日目に次回の開催国は日本の静岡市に決定したことが発表された。1981年第3回大会は日本の三島市で行われており、それから20年後の2001年に再び日本で開催される。21世紀最初の環境変異原国際会議であり新しい時代を開く発表がなされるものと期待している。

日下部博一 (食品薬品安全センター-秦野研, 細胞毒性学研究室)

私は、これまで哺乳動物の染色体転座の研究を続けてきたが、今回、ヒト精子および末梢血リンパ球の化学物質誘発染色体転座に関する研究成果を7th ICEMでポスター発表する機会を得た。開催地はパリから遠い南フランス、ツールーズ市であったが、私はパリのオステルリッツ駅で夜行列車の切符 (2nd class) を買い、5～6時間かけて6日の早朝にツールーズに到着した。海外に出るのが初めてであったため、電車の利用法などを理解するのに少々苦労した。

ツールーズは、学会開催期間中、天候は穏やかであり日中は日差しが強く、歩くと汗ばむほどであった。古風な町並みで教会が多く、町全体に似たような建物が多く、よく道に迷った。学会会場の社会科学大学で受付を済ませたのだが、今回は会場に来てからプログラムや要旨集を渡されたので、発表日程などもそこではじめて知ることとなった。私が発表したのは「C. Aneuploidy and chromosome painting」というセッションであり、主に小核試験やFISH法を用いた染色体異常の検出に関する研究演題が集められていた。興味深かったのは、これまで日本では、実験的な展開がほとんどなされていないヒトやマウスのsperm headを用いた研究が思っていたよりも多かったことである。FISH法により特定の染色体をsperm head上で光らせば、雄性および雌性配偶子の第一卵割中期像を得なくてもaneuploid spermの検出が可能となり、当然検出のスピードも速い。私は演者のひとり (ヒトのaneuploid spermの自然誘発率を発表していた) にポスターの写真を指さしながらいろいろ尋ねた。ポスターに貼ってある写真以外にもたくさんの写真を持ってきて見せてくれた。実際にやっている人からsperm headのFISH像の生写真をはじめて見せてもらったので、少し感動した。私の今後の研究視野に入れようとも考えた。

一方、残念であったのは、私の発表した場所が、写真

- Akanuma, T. Ohta, N. Matsusaka and S. Tsuda, *In vivo* genotoxicity of heterocyclic amines detected by a modified alkaline single cell gel electrophoresis assay in a multiple organ study in the mouse, *Mutation Res.*, in press (a).
- Sasaki, Y. F., A. Saga, M. Akasaka, K. Yoshida, E. Nishidate, Y. Q. Su, N. Matsusaka and S. Tsuda, *In vivo* genotoxicity of ortho-phenylphenol, biphenyl, and thiabendazole detected in multiple mouse organs by the alkaline single cell gel electrophoresis assay, in press (b).
- Sasaki, Y. F., E. Nishidate, Y. Q. Su, N. Matsusaka, S. Tsuda, N. Susa, Y. Furukawa and S. Ueno, Organ-specific genotoxicity of the potent rodent bladder carcinogens o-anisidine and p-cresidine, *Mutation Res.*, in press (c).
- Sasaki, Y. F., A. Saga, M. Akasaka, S. Ishibashi, K. Yosida, Y. Q. Su., N. Matsusaka and S. Tsuda, Organ specific genotoxicity of the potent rodent colon carcinogen 1, 2 dimethylhydrazine and three hydrazine derivatives: Difference between intraperitoneal and oral gavage, *Mutation Res.*, in press (d).
- Sasaki, Y. F., A. Saga, M. Akasaka, S. Ishibashi, K. Yosida, Y. Q. Su., T. Ohta, N. Matsusaka and S. Tsuda, Colon specific genotoxicity of heterocyclic amines detected by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay of multiple mouse organs, *Mutation Res.*, in press (e).
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell. Res.*, 175, 184-191.
- Søderlund, E. J., M. Lå, J. A. Holme, G. Brunborg, J. G. Omichinski, J. E. Dahl, S. D. Nelson, and E. Dybing (1990) Species differences in kidney necrosis and DNA damage, distribution and glutathione-dependent metabolism of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP), *Pharmacol. Toxicol.*, 66,

287-293.

- Storer, R. D. and R. B. Conolly (1983) Comparative *in vivo* genotoxicity and acute hepatotoxicity of three 1,2-dihaloethanes, *Carcinogenesis*, 4, 1491-1494.
- Sugimura, T. (1988) Successful use of short-term tests for academic purposes: their use in identification of new environmental carcinogens with possible risk for humans, *Mutation Res.*, 205, 33-39.
- Sugimura, T., S. Takayama, H. Ohgaki, K. Wakabayashi and M. Nagao (1990) Mutagens and carcinogens formed by cooking meat and fish: heterocyclic amines, in: P. A. Finot, H. U. Aeschbacher, R. F. Hurrell and R. Liardon (Eds.), *The Maillard Nutrition and Physiology*, Birkhaeuser Verlag, Basel, pp. 323-334.
- Suzuki, T., M. Hayashi, M. Ochiai, K. Wakabayashi, T. Ushijima, T. Sugimura, M. Nagao, and T. Sofuni (1996) Organ variation in the mutagenicity of MeIQ in Big Blue™ *lacI* transgenic mice, *Mutation Res.*, 369, 45-49.
- Tucker, J. D., A. V. Carrano, N. A. Allen, M. E. Christensen, M. G. Knize, C. L. Strout and J. L. Felton (1987) *In vivo* cytogenetic effects of cooked food mutagens, *Mutation Res.*, 224, 105-113.
- Watanabe, M. and T. Ohta (1993) Analysis of mutational specificity induced by heterocyclic amines in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*, *Carcinogenesis*, 14, 1149-1153.
- Wild, D., E. Gocke, D. H. Harnasch, G. Keiser and M. T. King (1985) Differential mutagenic activity of IQ (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline) in *Salmonella typhimurium* strains *in vitro* and *in vivo*, in *Drosophila* and in mice, *Mutation Res.*, 156, 93-102.



中の FISH シグナルがよくわからなくなるほど暗かったことである(日のあたらない暑くて狭い廊下。私の場所はとくに暗かった)。もう少し会場側で配慮がなされてもよかったのではないかと感じた。帰りは、寝て過ごそうと考えていたので、ツールーズ〜オステルリッツ駅間の寝台車「ボワチュールリ」を利用し、旅を満喫してきました。

田中 裕司(岡山大学薬学研究科・修士1回生)

私は、学会の援助を受け、フランスのツールーズで開催された 7th ICEM に参加させていただきました。6 日間にわたって開かれたこの学会において“Preferential binding of heterocyclic amines to purines in polynucleotides”というテーマでポスター発表をするという機会もいただき、非常に貴重な体験をすることができました。

国際学会は残暑の厳しい 9 月の上旬に行われました。私は 8 月末までイギリスのヨーク大学の Dr. R. C. Garner の研究室に短期留学をしておりましたので、そこからロンドンやパリを経由してフランス西南部のツールーズへと向かいました。ロンドンから約 3 時間のユーロスターの旅を終え、パリの駅に降り立った私は、そこの公用語がフランス語であるということを再認識させられました。そこには、基本的に英語の通用しない、イギリスとは全く別の世界があったのです。イギリスの研究室の仲間から、「フランス人の多くは英語を話せるけれど、あまり話そうとはしないんだよ」ということを聞いていたのですが、実際に道を尋ねたり、買い物をしたりしての印象は、話さないのではなく話せないのではないかということでした。しかし、彼らは概して非常に親切で、私のつたない英語を一生懸命聞き取ろうとし、身振り手振りを交えて答えてくれたということも、ここでお伝えすべきでしょう。

7th ICEM には、ヨークでお世話になった Dr. Garner と夫人、秘書も参加されていたので、彼らにポスターを案内していただいたり、フランスについての話を伺ったりしました。また、私自身のポスター発表の際にも、さまざまな方から質問やアドバイスを受けて、彼らの研究の概略や私の研究との関わりあいについて教えていただいたりすることができました。ここではその詳細には触れませんが、非常に有意義なセッションでありました。さらに、毎朝早朝には、Plenary session と題して、各分野の第一線で活躍されている方々の講演がありました。眠い目をこすりつつ必死で英語を聞き取ろうとしたのですが、このときほど自分の英語力のなさを嘆いたことはありませんでした。残念ながら、話の内容はその概略ぐらいしかわかりませんでしたが、各先生に共通していたプレゼンテーションの巧みに感銘を受けまし

た。

このほか、カルカッソンヌへの小旅行、教会で行われたコンサート、早津教授も踊りの輪に加わったディナーパーティーなど大変思い出深い学会となりました。このような機会を未熟な私に与えてくださいました早津教授と学会員の皆さまに心より感謝いたします。

川西 優喜(京都大学環境質制御研究センター・大学院生)

去る 9 月 7 日から 12 日の 6 日間、フランス・ツールーズで第 7 回国際環境変異原学会が開催されました。出席者は約 1000 名で、そのうち 1 割強は私のような学生参加者だったようです。

私はこの本会議に先立ちイタリア・ローマで開催されたサテライトシンポジウム「Quantitative Modeling Approaches for Understanding and Predicting Mutagenicity and Carcinogenicity」にも顔を出していましたが、こちらは参加者 100 名程度の小さなワークショップで、QSAR が専門の化学屋さん和我のような Chemical mutagenesis 分野の(分子)生物屋さんが出席者の多くを占め、小さいながらも和気あいあいとした雰囲気気の集まりでした。会議終了後の深夜に 2 等寝台でローマを発ち、翌朝南仏の輝く海岸線と紺碧の海、白い町並みを車窓から眺め、夕方ツールーズに着きました。

ツールーズでは学会主催者が用意してくれたうちの最安の宿泊施設を根城にしましたが、ここは会場となった大学の学生寮で一泊 60 FF(約 1200 円)、バックパッカー御用達の一般の Bottom end of the Accommodation よりさらに低い料金ながら、清潔なベッドを備えたきれいな個室でなかなか快適でした。さらに学会場の建屋まで歩いて 2 分で行けるため、朝遅寝できるのが何よりでした(夏時間の終末期で 7 時を過ぎないと日が昇らないから、朝普通に起きると外はまだ真っ暗)。

学会は講演者に P. Hanawalt や J. Hoeijmakers をはじめとしてそうそうたる顔ぶれが並びましたが、日本の環境変異原学会と少し違って狭義の意味での「life science」色が濃厚で、分子生物学に familiar でない他の参加者にとっては、あるいは少ししんどい学会だったかもしれません。日本の環境変異原学会で DNA repair とか AT, CS, XP などに関する分子生物学の話が中心となることは稀ですが、こちらでは特に Plenary lecture などとはそういった話題が多くを占めました(そのような印象を持つのは私がその方面の話しか聞いていない、あるいは理解していないことに由来するのかもしれませんが)。

一般公募演題はすべてポスター発表でしたが、事前には何の案内もなかったため会場にくるまで割り当ての発表面積すらわからず、ポスター作成の段階からかなり苦労しました。これには他のみなさんも少々困惑されていたようです。

最後に、私のような貧乏学生に毎晩夕食を御馳走してくださった先生方にこの場を借りてお礼申し上げます。

加藤美津子(横浜市衛生研究所・環境衛生課・変異原室)

フランスのツールーズにて、9 月 7 日から 12 日まで 7th International Conference of Environmental Mutagens (ICEM) が開催されました。私は日本環境変異原学会からの援助を受け、ICEM に参加してきました。

国際学会の発表は初めての経験で、学会が終るまで期待と緊張の連続でしたが、実り多い経験でした。

学会には各国から多くの研究者が参加しており、初日のパーティーから日本の学会と違う活気が溢れていました。通常日本で行われる学会では、スーツ姿で臨んでいる方がほとんどですが、ICEM では T シャツ、Gパン、リゾートドレス、また民族服などを着た方などが目立ち、驚いた反面、堅苦しさもなく少し安心しました。

私の発表は、塩素処理した水試料の前処理法の検討と変異原性の季節変化という内容で、2 日間の示説でした。1 日目はあまり人が通らず、少し残念でしたが、2 日目は多くの方に見ていただきました。むずかしい質問はありませんでしたが、同じ分野の仕事をしている方からはデータの具体的な数値の質問が多く、その他実験者の健康影響を考慮した溶離溶媒の検討や、使用した分析機器の性能についても質問されました。以前に行ったプール水の変異原性について説明したとき、その着眼点が予想外だったのか、大変驚かれました。私のつたない英語の説明にもかかわらず、みなさん理解してくださり、仕事内容に関してお褒めの言葉をいただきました。他の発表者のポスターも拝見しましたが、高レベルな内容でとても刺激されました。また、同じような研究分野の示説をされている方が近くにおられましたので、さまざまな消毒副生成物の変異原性の検出法について意見交換をしました。口頭発表では、構造活性と変異原性についての発表が興味深く印象に残りました。

学会のオプションである Gala Dinner は予想していた雰囲気とは異なり、賑やかで親しみやすいものでした。ここで感じたことは、参加者が何事にも熱心であったことです。とにかく会話が途切れることなく続き、機械の性能の話一つでも 1 時間は熱い口調で話されていました。また、私の隣席の有名な先生が、学会のことや仕事のことで、そして食事のメニューまでいねいに説明してくれたのには感動しました(メニューが全部フランス語だったので)。

ツールーズは、9 月でも日本の真夏よりも日差しが強く焼けるように熱い所でした。会場の周辺は、私が想像していた、ぶどう畑に囲まれた田舎町の風景とは異なり、ファストフード店やスーパーマーケットがある都会

的な町並みでした。町を歩いていると、同じ学会の抄録を持った先生方が話しかけてくださり、親切にしてくださいました。

今回の ICEM 参加は、緊張の連続の中、世界的レベルの研究発表の聴講や研究者との交流、また語学勉強の実践の良い機会となり、有意義な経験でした。この経験を生かして次の発表に向けて頑張りたいと思います。学会発表に際し、お世話になりました先生方に深く感謝いたします。

奥野 祥治(近畿大学大学院工学研究科応用化学専攻)

第 7 回国際環境変異原学会は、9 月 7 日から 12 日までの 6 日間フランスのツールーズで開催されました。国際学会は昨年の 12 月に岡山で開催された 5th ICMAA に続き 2 度目だったのですが開催地が海外という事もあり周りのもの全てが新鮮で、一日一日がとても早く過ぎていきました。

学会では色々な分野での変異原に関する報告や講演がありこの分野の幅の広さ、奥の深さを改めて実感しました。ポスターセッションには私も「和漢生薬に含まれる SOS 誘導抑制成分について」発表させていただいたのですが、質問をしてくださった方々の英語をなかなか理解できず、答えを返せないでいる私に簡単な英語で聞き返してくださり、わかりづらい返答にも、しっかりと耳を傾けてくださったことにとてもうれしく感じました。またポスターセッションには多くの学生が発表しておりお互いに意見を交わしている姿が至る所でみられ、負けてはいられないと感じながらも、その輪の中にはいついけない自分が悔しくなりました。

学会中には Concert, Excursion, Congress Dinner 他さまざまなイベントもありました。その中でも最も印象に残っているのは、Congress Dinner でのダンスパーティーです。食事も終わり、そろそろおひらきかなと思っていたときにいきなり始まったダンスパーティー、周りの多くの人たちがとても楽しそうに踊りだしたのはびっくりしました。ヨーロッパではこれが当たり前のことだそうですが、私にはなかなか抵抗があり一緒に踊るといことはできませんでしたが、みているだけでもとても楽しく感じられました。

7th ICEM の後に、私はイタリアのピサで開催されたサテライトにも参加しました。こちらの方はそれほど大人数ではなく、ごくこじんまりとしたものでしたが、逆に参加されている先生方と接する機会を多く持て、色々な貴重なお話を聞くことができました。

最後に、今回はフランス、イタリアと計 14 日間の滞在となったのですが、その間色々な機会に、自分の語学力のなさを、しみじみと感じ、語学の必要性をとて感じました。しかし一方で、この学会参加中に体験できたさ



まざまなことは、私の研究に対する姿勢や視野に多くの影響を与えてくれた事と思います。

#### 滝波 昇悟 (岡山大学大学院薬学研究科)

日本環境変異原学会の援助を受け、フランスの Toulouse で開催された 7th ICEM に参加させていただきました。初めての学会参加、初めての海外という私にとって、何もかもが新鮮で興味深く感じました。

学会初日の 9 月 7 日早朝、パリからの夜行列車で Toulouse に到着しました。夜行列車でやってくる参加者など私ぐらいだろう、と自己満足を感じつつ会場に向かいました。

学会は朝 8 時半から夜 7 時まで多くの発表が行われ、密度の濃い内容でした。世界的に有名な先生方のお話を拝聴でき、大変勉強になりました。その反面、複数の興味深い内容の発表が同時刻に行われていたり、ポスターセッションの時間が短く、一部しか見ることができず残念でした。学会には非常に多くの人々が参加しており、アクティブな雰囲気で行われていました。私は Biological consequences of sun exposure というセッションでポスター発表を行いました。問題なく無事終わることができました。自分の関わる研究が世界中で行われていることを実感し、グローバルな視点で物事を考える必要性を感じました。自分の英語力の乏しさも実感しましたが、逆に今この時期に英語の必要性を実感できたことは良い経験でした。英語だけでなく、訪れる国の言葉を多少なりとも勉強しておく、と、滞在がさらに印象深いものになるのではないかと感じました。

勉強があれば息抜きもある。ということで、コンサートや遠足、ディナーパーティーといった楽しいイベントもありました。遠足は Carcassonne に行きましたが、そこは城壁に囲まれ、石畳が敷かれた素敵な町でした。城壁の上を歩き、そこから眺める南フランスの町並み、のどかな田園風景は印象的でした。ディナーパーティーではエンターテイナーに奇妙な似顔絵（自分では似ていると認めたくなかったのですが）を描いてもらい、良い学会土産ができました（翌日、朝から元気にセッションに参加している外国人の酒豪ぶりを目の当たりにしました）。日没時の夕日に照らされた Toulouse の町並みの美しさは感動的でした。このように、勉強以外にも多くの貴重な経験をさせていただきました。

学会のスタッフの方々は雰囲気がよく、大変好感がもてました。皆さん非常に親切で、お世話になりました。特に受付の方々には、飛行機のリコンファームやタクシーの手配などの図々しいお願いも親切に引き受けていただき助かりました。

この学会で経験できたさまざまなことは、これからの私の人生において大きな財産になると思います。このよ

うな素晴らしい機会を与えてくださった皆様に深く感謝いたします。

#### 宮田 裕子 (名古屋市立大学大学院薬学研究科博士前期課程 2 年)

日本環境変異原学会の援助を受け、9 月 7 日から 12 日までフランスで開催された 7th ICEM に参加した。初めての国際学会であり、学会経験の少ない私にとっては何でもない事が逐一大問題だった。印象記を作成するにあたり今学会の感想を述べさせていただきたいと思う。

3 月末に “Detection of quinoline-induced mutation in the *lacZ* transgenic mouse” という演題で参加を申し込み採用されたとき、国際学会という華やかな舞台への参加に感動を覚えたが、同時に世界各国の著名な先生方を前に自分にどれだけの事ができるかという大きな不安も芽生えた。ポスター作りに始まり、内容説明さらに質問対策と、出発直前まで慌ただしくその準備に追われた。国内の学会でも自分の説明能力にふがいなさを感じていたが、事が全て英語となると要する時間や苦労も倍増した。

学会会場のある Toulouse は煉瓦の街として有名なフランス第 6 番目の都市であり、家屋や教会さらに市役所も情緒溢れる煉瓦造りで、夕方になると街全体が赤茶色を帯び美しかった。Registration を済ませ、大会プログラムと自分の名前の記された名札を手渡されたときは本当にここまでできてしまった、と今更ながらに事の大きさを痛感したが、続いて行われた Opening ceremony ではさすが国際学会、という豪華なカクテルパーティーで気分も幾分和らいだ。私の発表は初日の午後であったため、当日朝ポスターを貼り付け、口演を聞いた。各国の研究者達が時間一杯まで熱心に質問し、それに対して演者が納得のいくまで解説するという真摯な姿勢に感銘を受けた。示説会場へ向かうとそこはもう示説を食い入るように見ている人達で溢れていた。自分の示説の前に立ち、一人前の研究者のように質問に答えようと思っていたが、身体が震えているのに気づき、その場から逃げ出したい気持ちで一杯になった。幸いにも私の示説に興味を示してくださった方も多く夢中で解説している内に時間はあっという間に過ぎたが、私と同じく英語を母国語としない人達からの質問も受けお互いに会話を成立させるのに必死になる事も多かった。

他の示説を見る機会にも恵まれ、普段論文などで目にする研究内容を手に届く距離で直接見聞する事がこれほど意義のあることなのかと感じた。プレゼンテーションに長けた研究グループも多く自分の発表をいかに面白く伝えるか大変勉強になった。また学会を通じて研究面、精神面で得るものも多くお世話になった方々に感謝致します。ありがとうございました。

Environ. Mutagen Res., 20: 67 (1998)

資料・情報

前号 (Vol.19, No.3, 203-204, 1997) に掲載した、IARC 情報：動物発がん性試験の対象物質リストに誤りがありましたので訂正いたします。(日本化学物質安全・情報センター)

(誤)		(正)
50-06-6	Paraformaldehyde	30525-89-4
56-93-0	Benzyltrimethyl ammonium chloride	56-93-9
68-12-2	Dumethyformamide	削除
74-09-2	Methylene chloride	削除
74-87-3	Methyl bromide	Methyl chloride
93-15-2	Methyeugenol	Methyleugenol
96-29-7	methyl rthyl ketoxime	Methyl ethyl ketoxime
115-96-8	Tris(2-chlororthyl)phosphate	Tris(2-chloroethyl)phosphate
120-12-7	Carbon tetrachloride	Anthracene
302-17-0	m-Chloroaniline	108-42-9
534-07-6	1,3-Dichloropropanone	1,3-Dichloropro-2-panone
607-57-8	2-Nierofluorene	2-Nitrofluorene
1317-36-8	Leadb oxide	Lead oxide
9002-89-5	Polyvityl alchol	Polyvinyl alchol
12001-29-5	Asbestos: chrysotite	Asbestos: chrysotile
12296-41-3	Sodium metaphosphate	13396-41-3
64742-53-6	Distillate	Petroleum distillates
145483-96-6	N-1-Dimethyl-4-(methylnitrosamino)-1H-imidazole-5-carboxamide	145438-96-6
74-83-9	Methyl bromide	追加
56-23-5	Carbone tetrachloride	追加





## Genotoxicity の翻訳は遺伝毒性でよいのか？

祖父尼 俊雄

(国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター変異遺伝部)

国際的な学術論文のみならず、OECD, WHO, IARC などの国際機関から出される正式文書などに、mutagenicity, mutagenic, mutagen などの代わりに genotoxicity, gonotoxic, gonotoxin という言葉が近年特に多用され、それが定着しつつある。もちろん、その意味するところは従来用いられていた広義の変異原性 (mutagenicity) と同義であり、それ自体には問題はないのであるが、それが翻訳されて「遺伝毒性」という言葉がこれに対応するようになってきたことから、いささか混乱が生じてきているように感じられる。

この問題については、すでの 10 年以上も前に本学会の大会の席上で近藤先生より問題提起されたとの記憶があるが、当時は私自身を含めてその問題の重要性を肌身で感じておらず、その後論議もほとんどないままに今日に至っている。問題は、「遺伝毒性」という言葉は、本来親から子に遺伝的に伝えられる障害を意味するものとして用いられていたが、それが DNA に対するさまざまな障害を包括する genotoxicity の訳語として用いられたことから、受け取る人によっては前者の意味にとる場合と、後者の意味にとる場合が生じることから、混乱あるいは誤解を招く結果となっている。

海外での状況を考えると、mutagenicity の代わりに genotoxicity という新語が作り出されたのは、おそらくはさまざまな DNA 損傷 (不定期 DNA 合成, DNA 鎖切断, DNA 付加体, DNA 修復, 姉妹染色分体交換など) の現象を mutagenicity という言葉で包括することに限界を感じたことによるのではないかと推察する。そのため、そのような事象を含め、本来の遺伝子突然変異および染色体異常を包括して表す言葉として genotoxicity を使い始めたものと思われる。情報によると、genotoxicity を最初に用いたのは Ehrenberg et al. (Ambio Special Report No. 3, Royal Swedish Academy of Sciences, Universitetsforlaget, 1973) であり、その後 Crow et al. (Identifying and estimating the genetic impact of chemical mutagens, National Academy Press, 1983), Bridges (Mutat. Res., 132; 139, 1984), Brusick

(Principles of Genetic Toxicology, Plenum Press, 1987) によって使われたそうである<sup>1)</sup>。一方、親から子に伝わる障害については heritable damage (effect) という言葉で厳密に区別しており、特段問題としてはいない。

Genotoxicity は新しい概念のために新たに作られた言葉であるとするれば、その訳としても新たな言葉が必要であったことになる。それを従来の言葉で転用したことに問題があったようである。そうであれば適切な新しい言葉を必要とする。そこで genotoxicity の訳語として「**遺伝子毒性**」を用いることを提案したい。場合によって「毒性」という言葉を使いにくいケースでは「遺伝子障害性」という言葉で置き換えてもよいだろう。その意味するところは遺伝子突然変異, 染色体異常, DNA 損傷 (不定期 DNA 合成, DNA 鎖切断, DNA 付加体, DNA 修復, 姉妹染色分体交換など) など全ての DNA に対する影響を包括し、あらゆる生物系での細胞から細胞へあるいは個体から (次世代の) 個体への伝達も含めた概念である。

「遺伝子毒性」あるいは「遺伝子障害性」という言葉はすでにこれまで何度か用いられたことがあり、目にした方も少なくないと思う<sup>2-4)</sup>。一方、「遺伝子毒性」という言葉に抵抗をもつ方もおられるであろう。この言葉から特に遺伝子突然変異が主体で染色体異常は含まれないような印象を受けるかもしれない。しかし、染色体が遺伝子の集合体であると考えれば自ずと遺伝子毒性の概念に入ることになると考えられると思う。もし、この言葉が多くの人に受け入れられるとすれば、慣れ親しむまでは時間が必要であるが、いずれは身近な言葉として定着していくのではないかと考えている。

これで問題は解決したかという点必ずしもそうではない。親から子に伝わる影響としての「遺伝毒性」という言葉に対応する英語は何かということを明確にしておかないと、ここで取り上げた翻訳上での問題は終結しない。英語の対訳上では、genetic toxicity が考えられるが、genetic toxicity は必ずしも厳密に定義していないようである。1 つの例としては、同一文書内で genotoxicity と genetic toxicity をほぼ同一の意味で用い、単に文章



上の流れから微妙に使い分けている場合がある。海外の知人に聞いてみても、ほとんど genotoxicity と同じ意味で使っているとの答えが返ってきた<sup>1,5)</sup>。

厳密な意味で親から子に伝わる影響を示す英語は、前述したように、heredity (inheritance) であり、その訳も遺伝<sup>6)</sup> で問題はないが、「遺伝毒性」に対応する heritable (inheritable) toxicity という言葉はほとんどみたことはない。米国の知人に聞いてみたら、そのような場合には germ cell mutations, germ cell mutagens を用いるとの答えである<sup>7)</sup> が、この翻訳も生殖毒性試験との誤解をさけることを考えると微妙なところがある。ということから「遺伝毒性」に対応する英語が何かが私にははっきりみえてこない。

別な問題提起としては、genotoxicity と mutagenicity の定義の問題がある。これについて、前者は既述のように DNA に対するあらゆる傷害を意味し、後者は DNA 損傷が固定された不可逆的な事象としての遺伝子突然変異と染色体異常 (数的異常も含め) を意味するとの提案<sup>7)</sup> がある。はたして多くの方がこの考えを受け入れることができるのかどうか私自身にも疑問が残る。

これらの問題は本学会員間で率直に意見交換を行うべ

きものと考えて、あえて本拙文を投稿した。ぜひ個人の考えをこの場に積極的に投稿していただき、会員相互で論議を進めたいかがであらうか、ご検討をお願いしたい。

#### 参考文献

- 1) Shelby, M. (1997) Personal communication.
- 2) 林 裕造, 祖父尼俊雄 (1994) 化学物質の発癌性評価における変異原性試験の役割—その現状と将来展望—, J. Toxicol. Scie., 19(App) : 103-110.
- 3) 菊池康基, 津志本元, 三宅幸雄編 (1995) 遺伝毒性試験用語集 (Glossary of Genetic Toxicology), サイエントリスト社, 「解説」 pp. xii~xiv.
- 4) 林 真, 渡部 烈, 島田弘康 (1997) レギュラトリーサイエンスにおける変異原性試験, 環境変異原研究, 19 : 111-115.
- 5) Kirkland, D. (1997) Personal communication.
- 6) 田中信徳監修 (1977) 遺伝学事典, 共立出版 (株).
- 7) 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, Mutat. Res., 352 : 153-157.

## 日本環境変異原学会会則

第1条 本会は日本環境変異原学会 (The Environmental Mutagen Society of Japan) と称する。

第2条 本会は人間環境における突然変異原, とくに公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。

第3条 本会の会員は、正会員、学生会員、賛助会員および購読会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者とする。学生会員は、大学、または大学院に在籍し、毎年所定の手続を経て、定められた会費を納入した者とする。賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。購読会員は学会誌「環境変異原研究」の購読のみを行うものとする。

第4条 本会に入会を希望するものは、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込みものとする。

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 国際交流幹事 1名  
編集幹事 1名 会 計 監 査 2名  
および評議員若干名

評議員は正会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。

庶務幹事、会計幹事、国際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。

役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

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  
東京都豊島区駒込 1-44-2 芥川ビル  
財団法人 口腔保健協会 内に置く。
3. 正会員、学生会員、賛助会員および購読会員の会費は、それぞれ年額 7,000 円, 5,000 円および 1 口 50,000 円および年額 10,000 円とする。ただし、Mutation Research 誌の配布を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。



日本環境変異原学会 役員名簿  
(平成 10 年度)

会 長 大西 克成  
庶務幹事 能美 健彦  
会計幹事 若林 敬二  
国際交流幹事 山添 康  
編集幹事 須藤 鎮世  
会計監査 黒田 行昭  
菊川 清見

賞等選考委員  
(委員長) 山添 康  
吉川 邦衛  
能美 健彦  
祖父尼俊雄  
田中 憲穂  
森 秀樹  
清水 英佑

編集委員  
(委員長) 須藤 鎮世  
太田 敏博  
下位香代子  
降旗 千恵  
荒木 明宏  
森田 健  
鈴木 勇司

企画委員  
早津 彦哉  
菊川 清見  
布柴 達男  
望月 正隆  
長尾美奈子  
島田 弘康

日本環境変異原学会 評議員名簿  
(平成 10～11 年度)

氏 名	所 属
荒木 明宏	日本バイオアッセイ研究センター
石館 基	オリンパス光学工業(株)・染色体研究センター
太田 敏博	東京薬科大学・生命科学部
大西 克成	徳島大学・医学部
葛西 宏	産業医科大学・産業生態科学研究所
鎌滝 哲也	北海道大学・薬学部
菊池 康基	(株)ラビトン研究所・大阪医薬品臨床開発研究所
木苗 直秀	静岡県立大学・食品栄養科学部
木内 武美	徳島大学・医学部(死去)
澁谷 徹	(財)食品薬品安全センター・秦野研究所
島田 弘康	第一製薬(株)・開発研究所
清水 英佑	東京慈恵会医科大学・医学部
須藤 鎮世	伊藤ハム(株)・中央研究所
祖父尼俊雄	国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部
田中 憲穂	(財)食品薬品安全センター・秦野研究所
長尾美奈子	国立がんセンター研究所・発がん研究部
能美 健彦	国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部
林 真	国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部
早津 彦哉	岡山大学・薬学部
森 秀樹	岐阜大学・医学部
森田 健	日本グラクソ(株)筑波研究所
山添 康	東北大学・薬学部
吉川 邦衛	三菱化学(株)・横浜総合研究所
若林 敬二	国立がんセンター研究所・がん予防研究部

日本環境変異原学会入会申込書

年 月 日

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)
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 位：	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) 印  
日付

入会申込書の送付先：〒 170-0003 東京都豊島区駒込 1-44-2 芥川ビル  
財団法人 日本環境変異原学会事務局  
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341



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明書（裏面に添付）を添えて申し込みます。

フリガナ：	
氏 名：	㊟
Name（ローマ字つづり）	
生年月日（性別）	19 年 月 日 （男・女）
校名／学部：	
住 所：〒	
TEL：	FAX：
電子メール：	
Affiliation Address 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

入会申込書の送付先：〒170-0003 東京都豊島区駒込1-44-2 芥川ビル  
（財）口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局  
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

環境変異原研究 投稿規定

1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」、「一般論文」、「短報」、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論文で、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。陰性データも受付ける。

「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。陰性データも受付ける。「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。（Letter to Editor も受付けます。）

2. 投稿資格

共著者のうちの1人は日本環境変異原学会会員でなければならない。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。頁数の超過分や多額の経費を要する図表の実費は著者負担とする。

4. 論文原稿の送り先

論文原稿は正1部コピー2部の計3部を、日本環境変異原学会誌編集係宛に（簡易）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して、テキストファイル形式で保存）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があった場合には、編集委員会において検討の上許可することがある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部の複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著作者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて申し出を行い、許諾を求めなければならない。

6. 校正

著者校正は原則として原稿に対する誤植の訂正に限る。原稿にない加筆・変更はしないこと。

7. 著者負担金

- 1) 投稿論文（一般論文、短報、論説）は、組版代の一部負担金として刷り上がり1頁につき2,000円を著者が負担する。また規定の頁数を超えた場合、超過頁分についての実費は著者負担とする。資料・情報については原則として無料扱いとするが、頁数の削減を求めることもある。
- 2) カラー印刷等の特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りは招待寄稿の場合も含め、すべて著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申し込み書に50部単位で申し込むこと。

論文原稿の送付先

〒170-0003  
東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル  
インテルナ出版  
日本環境変異原学会誌編集係  
Tel. 03-3944-2591  
Fax 03-3947-8073

最終稿の送付先、その他編集についての問い合わせ先

〒302-0104  
茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2  
伊藤ハム中央研究所  
日本環境変異原学会 編集委員長  
須藤 鎮世  
Tel. 0297-45-6311  
Fax 0297-45-6353  
E-mail sutou@fureai.or.jp



## 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。  
日本文の原稿：  
原稿はA4判用紙に1行約40字、1頁30～31行で印字する（刷り上がりの約1/2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。  
英文の原稿：  
原稿はA4判用紙にダブルスペースで印字する。1頁25～27行を標準とする。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。
- 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）、考案（Discussion）または結果および考察、結語、謝辞（Acknowledgments）、参考文献（References）、表、図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明文はすべて英文とする。
- 学名、遺伝子記号などはイタリックとし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
- 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、化学物質のCAS登録番号を記載する。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）。
- 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
- 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
- 句読点はカンマ（,）およびピリオド（.）とする。
- 表、図（写真）は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号 Fig. 1, 2…を付し、英

文の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判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。
- 表は上部に Table (一連番号) と英文の説明を記入すること。表には縦罫を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するときに表示の語句の右肩に a, b, c…を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
- 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
- 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名は Chemical Abstracts の記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁（単行本の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁）の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。

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

Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. Matter and M. D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds), *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.

藤川和男, 梁 治子, 近藤宗平 (1984) ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目されている短期試験法, *環境変異原研究*, 6: 107-113.

佐々木正夫 (1983) 環境変異原と染色体異常, *染色体異常* (外村 晶編), 朝倉書店, pp. 107-113.

JIMRO 研究用試薬

コードNo.: 655510 容量: 96テスト用 価格: 30,000円

## 変異原性試験キット

### umu-テスト ウムラック

#### ☆ヒスチジン含有物質でもテスト可能！

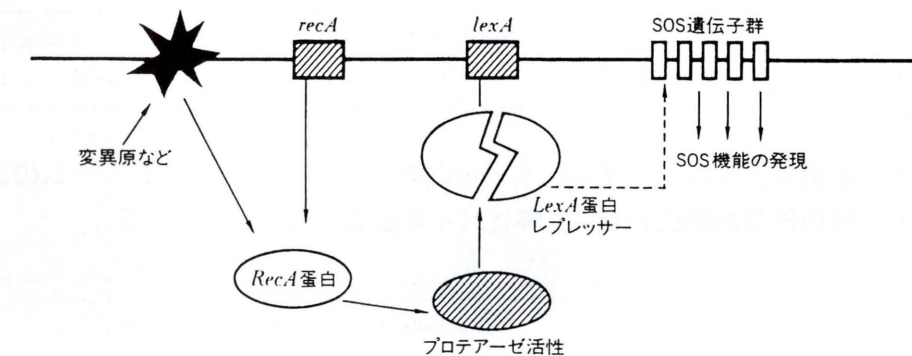
Amesテストでは不可能なヒスチジンを含んだ物質でもテスト可能。食品、尿、血液、粗抽出液等の検体にも適用できます。

#### ☆高感度！Ames法と相関

標準的変異原性物質 AF-2 で 5ng/ml まで測定。Ames法とよく相関します。

- 単一試験菌株**：Amesテストでは反応機構の異なる変異原を検出するために数種以上の試験菌株を要しますが、本テストでは一種類のみで同等以上の成果を期待できます。
- 簡便**：菌、S-9 Mix が凍結乾燥してあるので、無菌操作などの特殊な設備を必要とせず簡便な操作が可能です。
- 多数迅速**：マイクロプレート1枚/キットが添付されているので同時に多数の試料を約6時間で迅速にテストできます。
- 代謝活性化**：凍結乾燥した S-9 Mix を添加することによりすべての well において代謝活性化が可能です。
- 制癌剤のスクリーニング**：多くの制癌剤はDNAに作用するので制癌剤開発過程で、多数の抗生物質や合成化合物の中から制癌作用のもつ物質のスクリーニングに有用です。

#### ◇ SOS 誘発状態 (SOS調節機構のモデル)



製造・発売元 株式会社 日本抗体研究所

ホームページ <http://www.ijinet.or.jp/jimro/>

〒370-0021 群馬県高崎市西横手町 351-1

TEL. 027-353-1411 (代) FAX. 027-353-1770



# オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に！ より手頃な価格に！

## 特徴

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

製品名	包装単位	備考
エームテスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml×10本 コファクターA 9ml×10本	エームテストでのデータを添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 2ml×3本 コファクターC 4.7ml×3本	染色体異常試験でのデータを添付します

(保存は-80℃でお願い致します)

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

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

誘導法の変更や、サル、イヌなどラット以外のS-9またはマイクロソームの調製、その他、技術的なお問い合わせは、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・バイオ事業部

〒174-8505 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号  
Tel.(03)3968-1192 Fax.(03)3968-4863

販売元

**和光純薬工業株式会社**

本社 〒540-8605 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 〒103-0023 東京都中央区日本橋四丁目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



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

お問合せ先:

**加商株式会社** 〒103-0027 東京都中央区日本橋2丁目14番9号 電話 03-3276-7676 FAX.03-3276-7626  
ライフサイエンスグループ E-mail: kskt-ea@mxu.meshnet.or.jp



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

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

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

### ●活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

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

●包装単位：10ml×8本、5ml×4本

*Salmonella typhimurium* TA-100,  
Benzo(a)pyrene 5 $\mu\text{g}$ /plate

## 染色体異常試験用凍結S-9MIX

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

●包装単位：3.5ml×3本

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



-S-9 Mix



+S-9 Mix

家田貿易株式会社

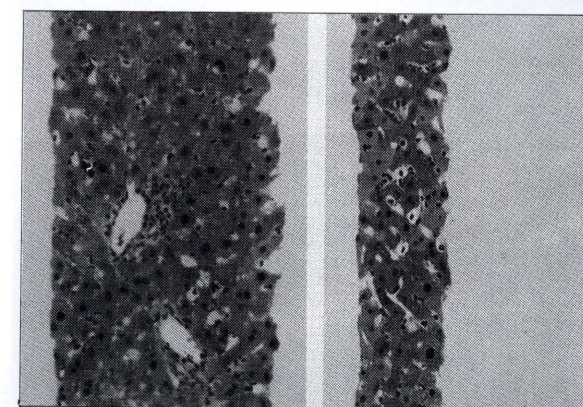
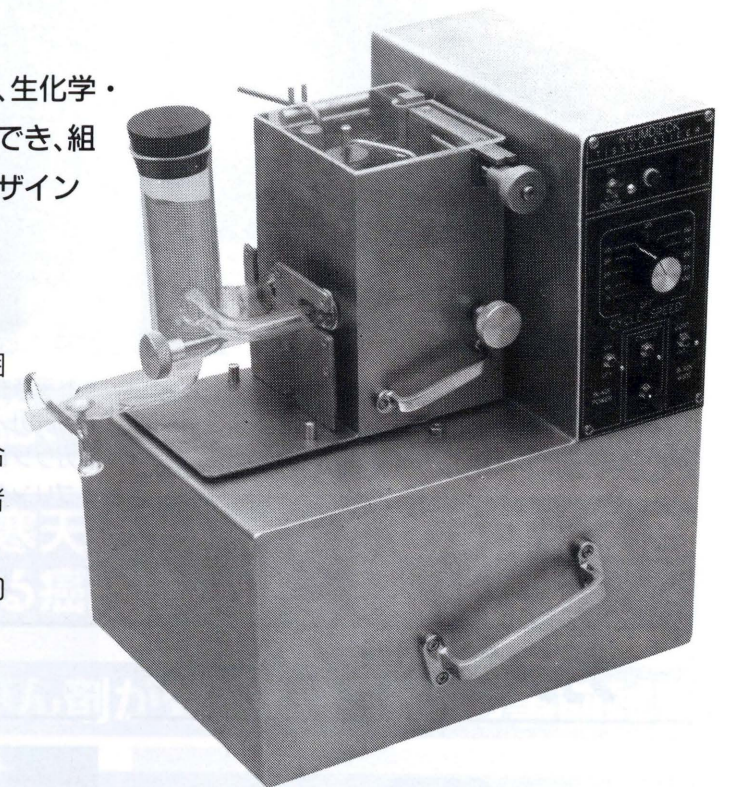
東京：〒113-0033 東京都文京区本郷3-14-16 EKビル  
TEL. 03 (3816) 2861 FAX. 03 (3814) 5347  
大阪：〒564-0044 大阪府吹田市南金田1-14-5  
TEL. 06 (338) 1518 FAX. 06 (338) 5626

# THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

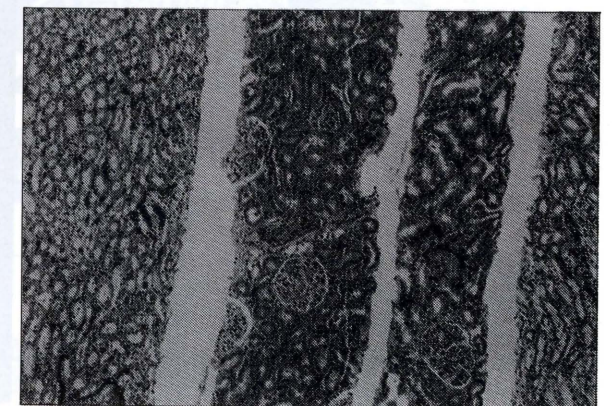
## 生きた組織の無菌スライスができます。

クルムディーク・ティッシュスライサーは、生化学・  
生理学・薬理学・毒物学などの研究に応用でき、組  
織培養のための無菌スライス作成用にデザイン  
されています。

- 薄い円形のスライスが、5～15mm直径の範囲  
で作成できます。
- ボタンを押すだけで、2～3秒に一枚の割合  
で(最高スピードの場合)作成でき、初心者  
でも取扱いは簡単です。
- スライスは再現性良く、バラツキもなく60  
～1000 $\mu\text{m}$ 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60 $\mu\text{m}$ および135 $\mu\text{m}$ )で、左の写真はラットの腎臓のスライス(135～200 $\mu\text{m}$ )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

〒444-0241 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14(ショーシンビル)

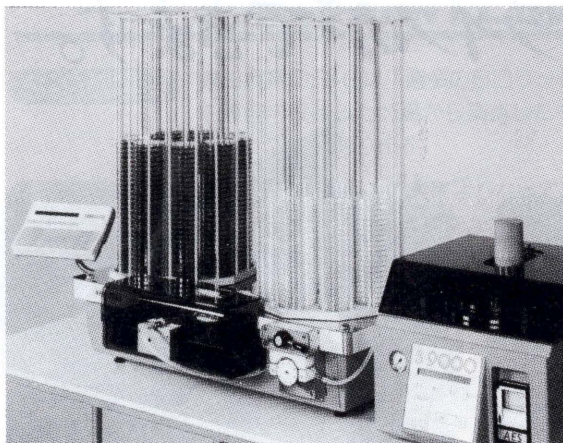
TEL. (0564) 54-1231番(代表)

FAX. (0564) 54-3207番



## 全自動培地作成システム

FULLY AUTOMATED MEDIA PREPARATION SYSTEM



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

種火のいらない電子着火式ブンゼンバーナー

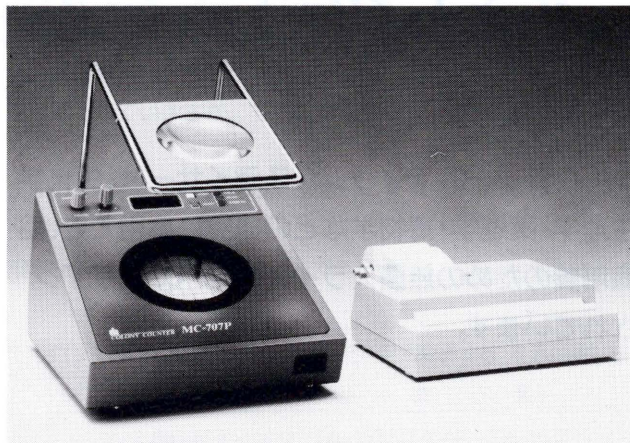
## ガスプロフィー



- コンパクト・低価格。
- IRセンサーによる電子着火。
- ガス配管不要(オプション装着)。
- タイマー/連続点火/フットスイッチ切替え付

## MC707P

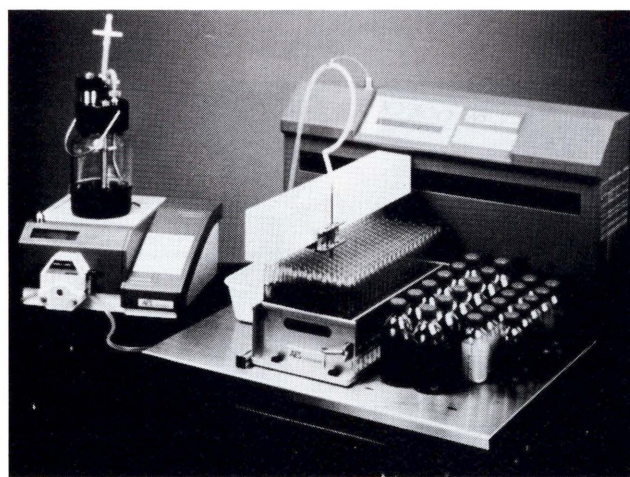
コロニーカウンター



- 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

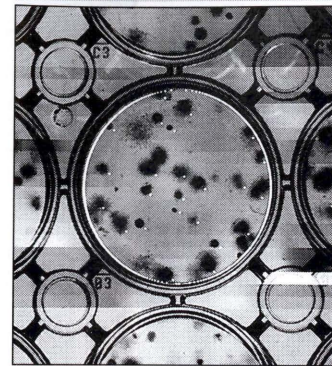


XY500は、2方向軸運動を行なうマイクロプロセッサー駆動のアームがあります。どんな種類の容量分注器(シリンジ、ポンプ、ペリスタルティックポンプ等)でも楽に使用することができる。どんな液体サンプルもスピードと正確さで手をわずらわさず分注することができる。

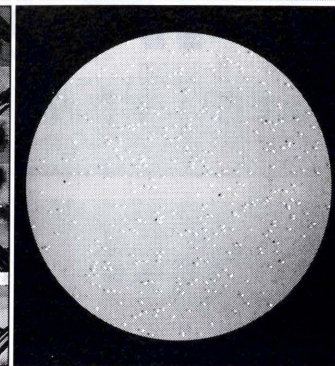
## PCA-11D 細胞測定システム

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。

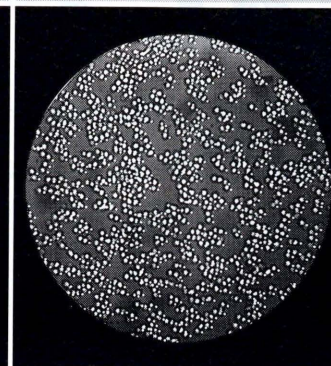
細胞毒性試験



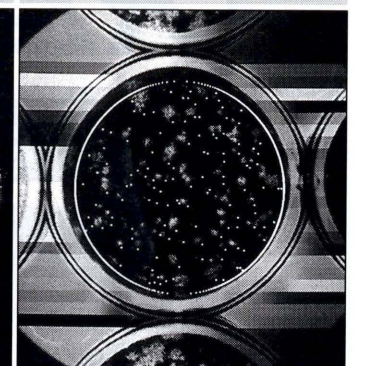
癌細胞コロニー



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	P2	RESULT
192 C	64 C	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

※ 依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

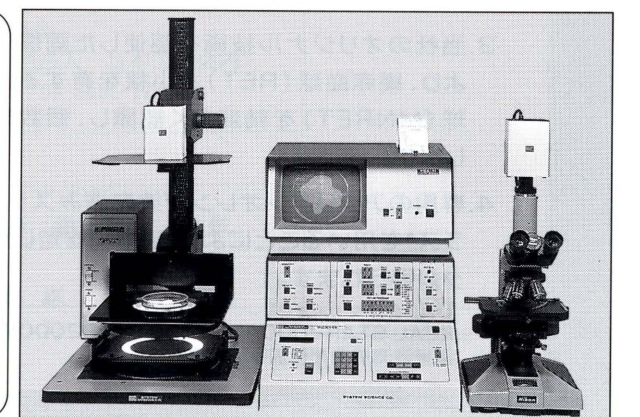
製造発売元



システムサイエンス株式会社

本社・工場/〒197-0011 東京都福生市福生1253-16

TEL 042(552)5956 (代表)



(PCA-11DSF SYSTEM)

フランス・AES Laboratoire 総代理店  
株式会社 東京エム・アイ商会

〒104-0033 東京都中央区新川2-7-1

TEL (03) 3551-7873

FAX (03) 3551-7318

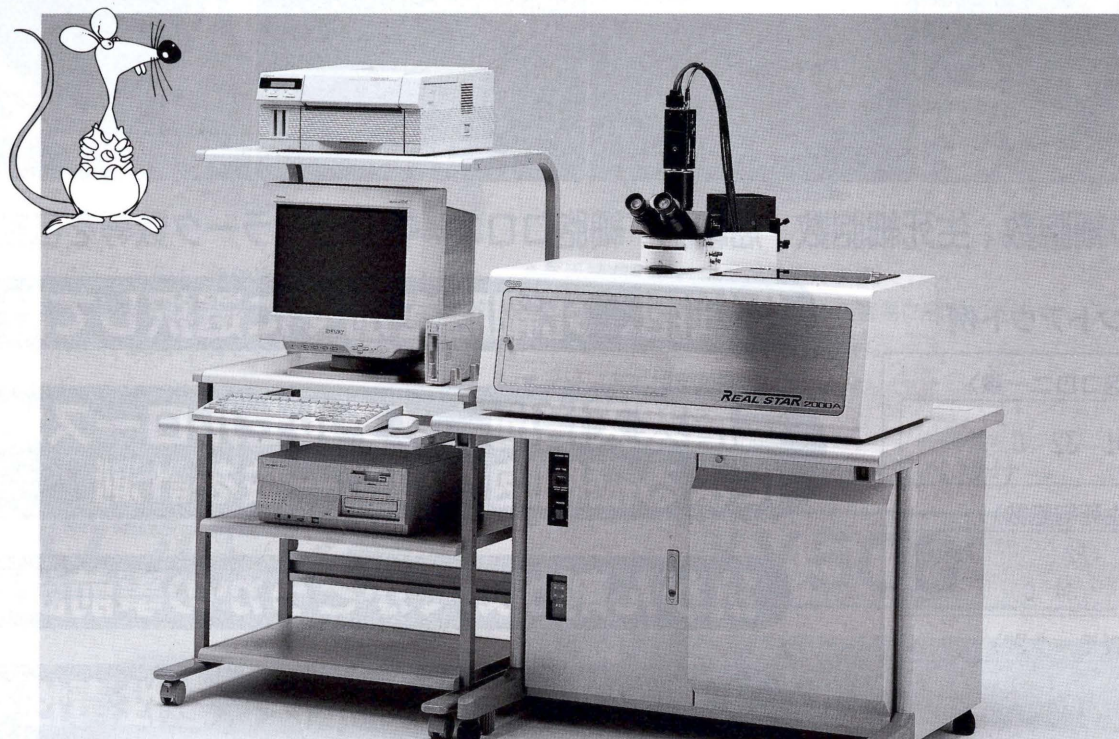


TOYOBO

## 小核試験自動計測装置

# REAL STAR 2000 2000A

マウス末梢血による小核試験を自動で行い、客観的なデータを計測することができます。



### 特徴

1. 標本(スライドガラス)自動供給装置を備えており、30枚までの標本を連続計測できます。
2. 標本名を入力するだけで、後は機械が自動的に計測を行います。
3. 当社のオリジナル技術を駆使した画像処理により、網赤血球(RET)と小核を有する網赤血球(MNRET)を精度良く認識し、個数を計測します。
4. 専用のアクリジンオレンジ塗布済みスライドガラス\*を用いることにより、簡単に安定したデータが得られます。

\*REAL STAR2000Aは、REAL STAR2000に連続計測機能を付加したものです。

### <A.O.COATED\*> (アクリジンオレンジ塗布済スライドガラス)



### 特徴

1. スライドガラスに既にアクリジンオレンジが塗布されています。
2. 専用の塗布装置を用いているため、均一な塗布が施されています。
3. グリッドありタイプ(末梢血滴下位置及びカバーガラス貼合わせ位置を印刷)とグリッドなしタイプがございます。

生化学事業部(東京)  
東京都中央区日本橋小網町17番9号 〒103-8530  
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951

TOYOBO  
**東洋紡績株式会社**  
[URL] <http://www.toyobo.co.jp>

生化学事業部(大阪)  
大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 〒530-8230  
TEL 06-348-3786 FAX 06-348-3833

テクニカルライン TEL 06-348-3888 (開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00 土、日、祝を除く) e-mail: techosk@bio.toyobo.co.jp

### 編集後記

本年より学会事務局の変更に伴い、学会誌編集と印刷がインテルナ出版に移りました。最初の号となった本号は論文の印刷書式の変更と統一、会則や規定等の原稿の新規作成も加わり、かなり大掛かりな編集作業となりました。十分に注意を払って編集を行ってきたつもりですが、全面改訂になったため、お気付きの点がありましたら編集委員にお知らせ願います。

編集担当者 太田 敏博

### 編集委員

須藤 鎮世 (委員長) (1998-)

〒302-0104 茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2  
伊藤ハム株式会社・中央研究所  
Tel: 0297-45-6311 Fax: 0297-45-6353  
E-mail: sutou@fureai.or.jp

太田 敏博 (1994-)

〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1  
東京薬科大学・生命科学部・環境分子生物学研究室  
Tel: 0426-76-7093 Fax: 0426-76-7081  
E-mail: ohta@ls.toyaku.ac.jp

下位 香代子 (1995-)

〒422-8526 静岡県静岡市谷田52-1  
静岡県立大学・食品栄養科学部・食品衛生学研究室  
Tel: 054-264-5528 Fax: 054-264-5528  
E-mail: shimoi@fnsl.u-shizuoka-ken.ac.jp

降旗 千恵 (1996-)

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1  
東京大学・医科学研究所・ヒト疾患モデル研究センター  
Tel: 03-5449-5623 Fax: 03-5449-5445  
E-mail: furi@ims.u-tokyo.ac.jp

荒木 明宏 (1997-)

〒257-0015 神奈川県秦野市平沢字大芝原2445  
日本バイオアッセイ研究センター・変異原性試験部  
Tel: 0463-82-3911 Fax: 0463-82-3860  
E-mail: akiaraki@da2.so-net.or.jp

鈴木 勇司 (1998-)

〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8  
東京慈恵会医科大学・環境保健医学教室  
Tel: 03-3433-1111 Fax: 03-5472-7526

森田 健 (1998-)

〒300-4247 茨城県つくば市和台43  
日本グラクソ株式会社・筑波研究所  
Tel: 0298-64-5532 Fax: 0298-64-8558  
E-mail: tm28417@glaxowellcome.co.uk

### 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20巻 第1号 1998年

平成10年4月3日 印刷  
平成10年4月10日 発行

発行者 日本環境変異原学会  
発行責任者 大西 克成  
製作 インテルナ出版



# 目次

## 一般論文

- 魚類の小核試験を用いる沿岸水域の汚染モニタリング  
 .....谷所達幸, 八木利仁, 岩崎浩一, 下位香代子, 木苗直秀, 林 真, 祖父尼俊雄 1
- Promotion of mutagenesis by *rumAB* genes in *Salmonella typhimurium* strains TA1535  
 and TA2659 .....Toshihiro Ohta, Mie Watanabe-Akanuma, Roger Woodgate,  
 Shin-ichi Tokishita, Yasuhiro Shiga and Hideo Yamagata 11
- 微生物変異原性試験における各種溶媒の適合性の検討  
 .....伴野富美子, 斉藤昭二, 土屋敏行, 萩原雄二 19
- ピレスロイド系殺虫剤およびその共力剤 (1,1'-オキシビス [2,3,3,3-テトラクロロプロパン]) の  
 Ames 変異原性.....森 康明, 長谷川一夫, 宇都宮暁子, 節田節子, 後藤純雄, 小野寺祐夫, 松下秀鶴 29
- Rapid induction of replicating DNA synthesis in response to 2-amino-3,4-dimethylimidazo  
 [4,5-*f*] quinoline in rat hepatocytes  
 .....Ataru Okumura, Shigeyuki Sugie, Keiji Wakabayashi and Hideki Mori 35
- Genotoxic potency of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5*H*)-furanone in  
*Drosophila melanogaster* somatic cells *in vivo* .....Kazuaki Kawai 41

## 短 報

- N*-nitrosodimethylamine に対するカテキン類の変異原性抑制機構  
 .....江幡淳子, 深貝尚子, 古川秀之 45

## 論 説

- マウス多臓器アルカリ SCG 法による臓器特異的遺伝子毒性の検出  
 .....佐々木有, 上野俊治, 宮前陽一, 太田敏博, 津田修治 51

## 資料・情報

- 第7回国際環境変異原学会 (7th ICEM) 印象記  
 .....野口 忠, 日下部博一, 田中裕司, 川西優喜, 加藤美津子, 奥野祥治, 滝波昇悟, 宮田裕子 63
- 訂正 [IARC 情報: 動物発がん性試験の対象物質リストについて] ..... 67

## Letter to Editor

- Genotoxicity の翻訳は遺伝毒性でよいのか? .....祖父尼俊雄 69

## 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10年度 役員名簿   |         | 執筆規定 |
|           | 10~11年度 評議員名簿 |         |      |
|           | 入会申込書         |         |      |
|           | 学生会員申込書       |         |      |