

環境変異原研究

**Environmental
Mutagen
Research**

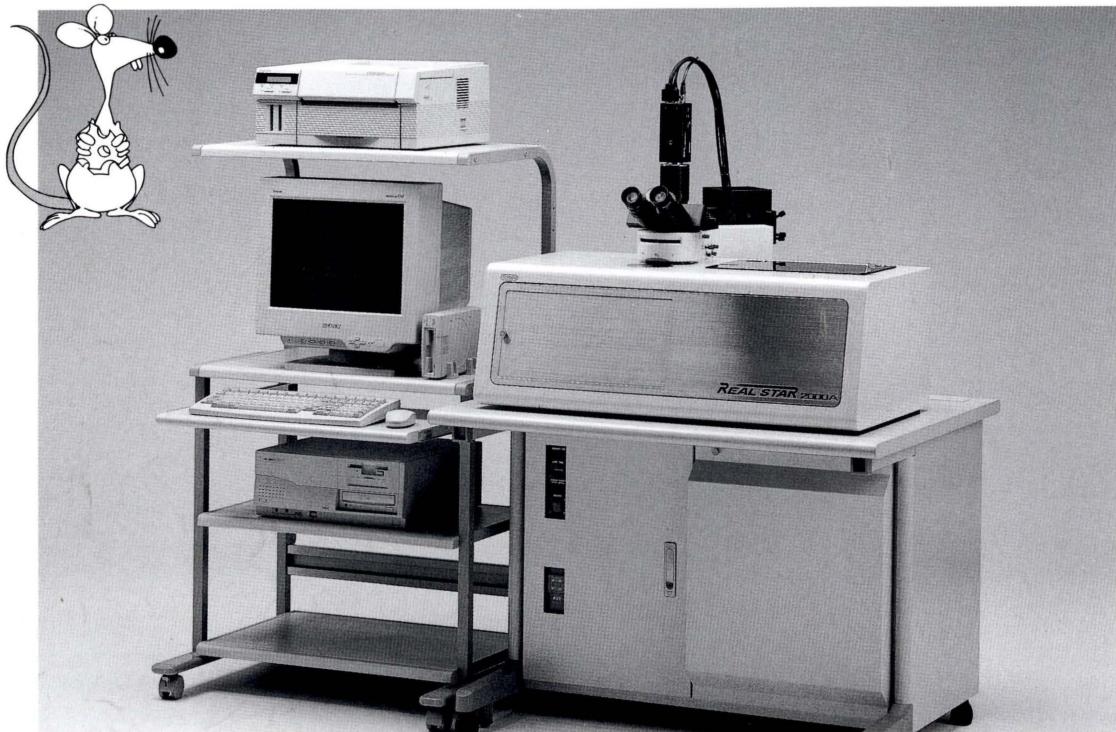
Vol.20 No.2 1998

TOYOB

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(スライドグラス)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グラス*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グラス)



特徴

- 1.スライドグ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

TOYOB

東洋紡績株式会社

[URL] <http://www.toyobo.co.jp>

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

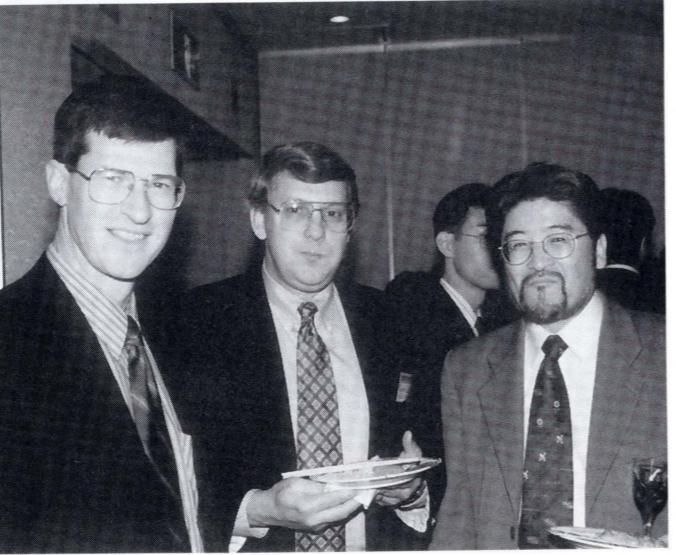
生化学事業部(大阪)

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

日本環境変異原学会 第26回大会

1997年 秦野大会 会場風景





Effect of hyperthermia on the micronucleus induction in mice

Shougo Asanami and Kazuyuki Shimono

Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. Naruto Research Institute
115 Tateiwa, Muya-cho, Naruto, Tokushima, 772-8601, Japan

Summary

We investigated the time course of micronucleus induction by hyperthermia in the mouse to speculate on the possible mechanism. The hyperthermia was induced by ambient heat (37°C for 4h). Statistically significant increases in micronucleated polychromatic erythrocyte frequencies were observed from 9h to 48h after the start of the hyperthermic treatment. The ratio of polychromatic erythrocytes to total erythrocytes remained almost constant. We also examined whether repeated hyperthermic treatment (37°C for 3h) for 4 days can induce adaptation to micronucleus induction in mice. Statistically significant increases in micronucleated reticulocyte frequencies were observed from day 3 to day 6, the frequencies for those 4 days were not, which tended to decrease slightly, significantly different from each other. The results suggest that heat effect is not likely due to erythropoietic stimulation but might be due to disturbance of the mitotic apparatus, and repeated hyperthermia did not induce adaptation to micronucleus induction in mice.

Keywords : Micronuclei, body temperature, mouse, repeated hyperthermia, time-course study

Introduction

The micronucleus test, an *in vivo* short-term screening test developed by Schmid (1973; 1975) and Heddle (1973), is widely used to detect clastogens and microtubule poisons (Mavourin et al., 1990; Hayashi et al., 1994). It is therefore important to clarify test conditions that might affect the results.

We reported previously that hyperthermia and hypothermia affects micronucleus frequency in mice (Asanami and Shimono, 1997a; 1997b; 1997c, Asanami et al., 1998). We demonstrated in mice that body temperatures of 39.5°C or higher for more than 30 min induce micronuclei and speculated that one possible mechanism was disturbance of the mitotic apparatus (Asanami and Shimono, 1997a). Ford (1997) noted that hyperthermia and hypothermia

are one of the factors that can induce aneuploidy, and the suggested mechanism is disruption of microtubule polymers. Our reports suggested that micronuclei can be induced in mice not only by chemicals but also a drug-secondary effects, such as hyperthermia or hypothermia.

In this paper, we demonstrated that the time course of micronucleus induction by hyperthermia is consistent with that mechanism. On the other hand, Cai and Jiang (1995) reported that mild heat treatment (41°C for 1h) can protect animals against cytogenetic damage caused by subsequent X irradiation. No published studies have examined adaptation to micronucleus induction by repeated hyperthermia. We investigated that effect in this paper.

Materials and methods

Animals

Six-week-old male ddY mice (SPF) were purchased from Japan SLC, Inc., and used at 8-12 weeks of age. The animals were housed up to five

Received : March 12, 1998

accepted : April 28, 1998

© Environmental Mutagen Society of Japan

per cage in transparent plastic cages with a controlled environment of $55 \pm 10\%$ relative humidity (RH) and $23 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 12:12h light/dark cycle. They were provided food (CRF-1, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) and water ad libitum.

Hyperthermia induction and micronucleus testing

a. Single treatment (bone marrow assay)

Groups of 3 mice were exposed to 37°C at $29.3 \pm 1.5\%$ RH for 4h using a hot air sterilizer (LCS-120, TABAI ESPEC Co., Japan). The mouse bone marrow micronucleus test was conducted to investigate the time course of micronucleus induction by the single hyperthermic treatment. Bone marrow cells were sampled 0, 5, 9, 16, 24, 48, 72 and 96h after the beginning of the hyperthermic treatment. The slides were fixed with methanol, stained with acridine orange (Hayashi et al., 1983), and coded. Micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) frequencies among 2000 polychromatic erythrocytes (PCE) were recorded per animal. The ratio of PCE to total erythrocytes, based on 1000 PCE per animal, was also recorded.

b. Repeated hyperthermia (peripheral blood assay)

Six mice were exposed to 37°C at $29.3 \pm 1.5\%$ RH for 3h per day for 4 consecutive days using the hot air sterilizer. The hyperthermic treatment started at 2:00p.m. on the day 1-4. The mouse peripheral blood micronucleus test was conducted to investigate the changes of the micronucleus frequencies induced by repeated hyperthermia in the same animals. Five μl peripheral blood was taken from a tail vein at 11:00a.m. on the day 1-7, and stained supravitally with acridine orange (Hayashi et al., 1990; CSGMT, 1992). Micronucleated reticulocyte (MNRET) frequencies among 2000 reticulocytes (RET) were recorded per animal.

c. Measurement of body temperature

Rectal temperature ($^\circ\text{C}$) was taken with a thermistor thermometer (MGA3-219, NIHON KOHDEN Co., Japan); the probe was carefully inserted into the rectum to a depth of 1.5 cm and the temperature read about 10 sec later before and after hyperthermic treatment.

d. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by comparison of each group with its control group using the tables of Kastenbaum and Bowman (1970) for micronucleus frequencies, and Dunnett's test (1955) for the ratio of PCE or RET to total erythrocytes.

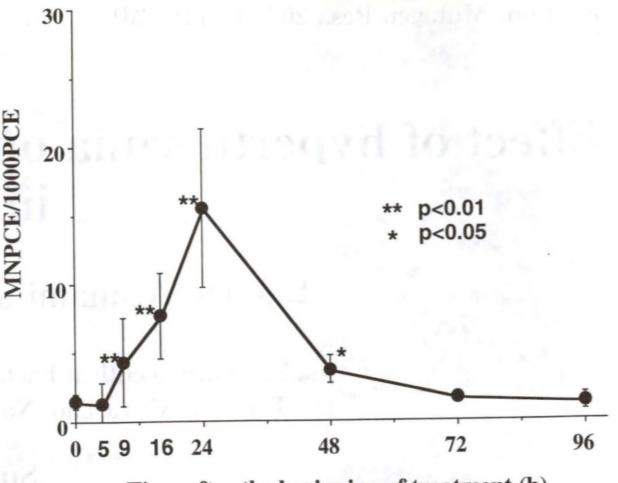


Fig. 1 Time course of micronucleus frequency in mice treated at 37°C for 4h.

Statistical analysis was performed by comparison with time 0 (non-treatment animals as control) using the tables of Kastenbaum and Bowman (1970).

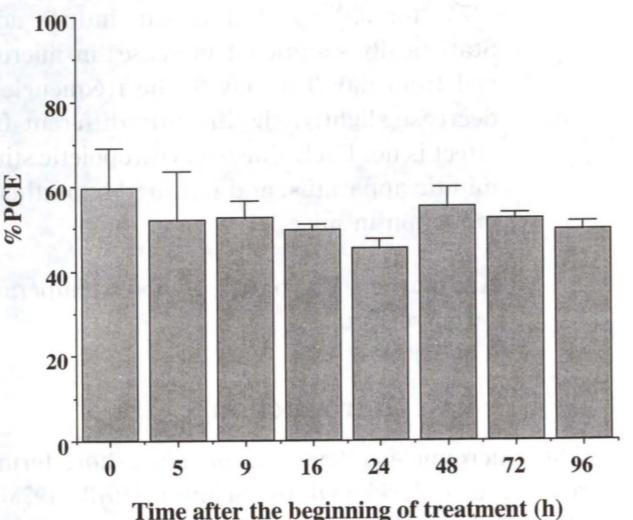


Fig. 2 Effect of hyperthermia on the ratio of polychromatic erythrocytes to total erythrocytes (%PCE). Statistical analysis was performed by comparison with time 0 (non-treatment animals as control) using Dunnett's test (1955).

Results

a. Single treatment (bone marrow assay)

The mean rectal temperature of the groups subjected to 37°C for 4h increased to $40.5 \pm 1.7^\circ\text{C}$ (data not shown).

Fig. 1 shows MNPCE frequencies following hyperthermic treatment. The MNPCE frequency showed an increase at 9h and peaked at 24h after the start of the treatment. The frequency decreased gradually and reached background level at 72h.

Table 1 Effects of repeated hyperthermic treatment (37°C for 3h) for 4days on micronucleus frequency in mouse peripheral blood

Day	N	Rectal temperature (Mean \pm S.D., $^\circ\text{C}$)	% RET	MNRET based on 2000 RET assessed per animal	
		pre-treatment		Individual animal data	Mean \pm S.D. (%)
1	6	37.8 ± 0.6	5.95 ± 0.76	4, 1, 2, 4, 2, 3	1.3 ± 0.6
2	6	38.0 ± 0.2	5.60 ± 0.55	1, 2, 4, 2, 2, 1	1.0 ± 0.5
3	6	38.1 ± 0.3	5.33 ± 0.55	15, 8, 8, 9, 6, 14	$5.0 \pm 1.8^{**}$
4	6	38.0 ± 0.2	5.85 ± 0.49	8, 4, 12, 7, 8, 6	$3.8 \pm 1.3^{**}$
5	6	—	5.55 ± 1.01	9, 5, 10, 11, 9, 6	$4.2 \pm 1.2^{**}$
6	6	—	4.61 ± 1.11	8, 4, 10, 5, 9, 7	$3.6 \pm 1.2^{**}$
7	6	—	4.78 ± 0.95	4, 2, 5, 1, 3, 4	1.6 ± 0.7

**, $p < 0.01$ vs day 1 as control by table of Kastenbaum and Bowman (1970)

Statistically significant increases in MNPCE frequencies were observed from 9h to 48h. The ratio of PCE to total erythrocytes was similar at all sampling times (Fig. 2).

b. Repeated hyperthermia (peripheral blood assay)

Following each treatment, the mean rectal temperature increased to $39.7 \pm 4.07^\circ\text{C}$ (Table 1). Statistically significant increases in MNRET frequency relative to day 1 were observed from day 3 through day 6, but the frequencies for those 4 days, which tended to decrease slightly, were not significantly different from each other.

Discussion

The mean rectal pre-treatment temperature ($n=27$) was $37.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Hyperthermic treatment of 37°C for 3 or 4h increased to about 40°C in the rectal temperature. MNPCE began to increase significantly 9h after the start of the hyperthermic treatment (5h after the completion of the treatment) in Fig. 1. Hayashi (1991) indicated that MNPCE peaked at 12h after a single intraperitoneal injection of 2.0mg/kg of colchicine, whereas MNPCE peaked from 24h to 30h treatment of 1.0mg/kg of mitomycin C, and also described that, in general, micronuclei induced by spindle poisons seem to arise earlier than those induced by clastogens. Therefore our results are consistent with our hypothesis; one possible mechanism of micronucleus induction by hyperthermia is disturbance of the mitotic apparatus (Asanami and Shimono, 1997a). Another possibility is that the hyperthermia stimulated erythropoiesis, which can induce micronuclei in mouse bone marrow (Hirai et al., 1991; Suzuki et al., 1989). Hyperthermia, however, did not stimulate erythropoiesis because PCE to total erythrocyte ratio were similar at any sampling time (Fig. 2).

Because mild hyperthermic treatment (41°C for 1h) can protect against cytogenetic damage caused

by subsequent X irradiation (Cai and Jiang, 1995), we examined whether repeated hyperthermia can protect against micronucleus induction by subsequent hyperthermic treatment. The significant MNRET induction was observed from day 3 in this peripheral blood study because the transition time from bone marrow MNPCE to peripheral blood MNRET was reported to be about 24h (CSGMT, 1992). Based on counts taken day 3, daily hyperthermic treatment for 4 days induced no statistically significant difference in MNRET frequencies compared with day 4, 5, or 6, although a slight decreases in MNRET frequencies was observed. In addition, hyperthermic treatment (37°C for 4h) repeated for 5 days (mean MNPCE frequency induced by this treatment was $11.7 \pm 4.6\%$) had the same effect on MNPCE frequency as single hyperthermic treatment (data not shown). The results suggest that repeated hyperthermia did not induce adaptation to micronucleus induction in mouse bone marrow.

In conclusion, hyperthermia induced micronuclei in mouse bone marrow and the one mechanism is more likely to be disturbance of the mitotic apparatus than erythropoietic stimulation. Moreover, adaptation to micronucleus induction by repeated hyperthermia was not observed.

Acknowledgements

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

References

- Asanami, S and K. Shimono (1997a) High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Res., 390, 79-83.
- Asanami, S and K. Shimono (1997b) Hypothermia induces micronuclei in mice, Environ. Mutagen. Res., 19, 1-6, in Japanese.
- Asanami, S and K. Shimono (1997c) Hypothermia induces

- micronuclei in mouse bone marrow cells, *Mutation Res.*, 393, 91-98.
- Asanami, S., K. Shimono and S. Kaneda (1998) Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Res.*, in press.
- Cai, L and J. Jiang (1995) Mild hyperthermia can induce adaptation to cytogenetic damage caused by subsequent X irradiation, *Radiat. Res.*, 143, 26-33.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS, *Mutation Res.*, 278, 83-89.
- Dunnett, C. W. (1955) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with control, *J. Am. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- Ford, J. H. (1997) Does aneuploidy per se cause developmental abnormalities?, *Mutation Res.*, 396, 195-203.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate, Jr (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.*, 245, 245-249.
- Hayashi, M. (1991) The micronucleus test, *Scientist Co.*, Tokyo, pp. 37-40, in Japanese.

- Hayashi, M., R. Tice, J. T. MacGregor, D. Anderson, D. H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F. B. Oleson, Jr., F. Pacchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou, and B. Vannier (1994) *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Res.*, 312, 293-304.
- Heddle, J. A. (1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Res.*, 18, 187-190.
- Hirai, O., Y. Miyamae, Y. Fujino, H. Izumi, A. Miyamoto and H. Noguchi (1991) Prior bleeding enhances the sensitivity of the *in vivo* micronucleus test, *Mutation Res.*, 264, 109-114.
- Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation Res.*, 9, 527-549.
- Mavourmin, K. H., D. H. Blakey, M. C. Cimino, M. F. Salamone and J. A. Heddle (1990) The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, 29-80.
- Schmid, W. (1973) Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells, *Agents and Actions*, 3, 77-85.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Mutation Res.*, 31, 9-15.
- Suzuki, Y., Y. Nogae, T. Ishikawa, Y. Watanabe, T. Nagashima, K. Matsukubo and H. Shimizu (1989) Effect of erythropoietin on the micronucleus test, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 314-318.

Environ. Mutagen Res., 20 : 75 - 82 (1998)

大腸菌 WP 2 *uvrA* 株を用いた突然変異スペクトル解析系の開発

太田 敏博¹, 赤沼 三恵², 石原 啓美³, 北 陽子³, 島村 万紀³,
川口 泰史³, 時下 進一¹, 志賀 靖弘¹, 山形 秀夫¹

¹ 東京薬科大学生命科学部 環境分子生物学研究室 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

² (財)残留農薬研究所毒性部 毒性第三研究室 〒187-0011 東京都小平市鈴木町2-772

³ コニカ株式会社環境安全推進室 安全性試験センター 〒191-8511 東京都日野市さくら町1

A set of tester strains for the determination of mutational specificity in *E. coli* WP2*uvrA* with and without pKM101

Toshihiro Ohta¹, Mie Watanabe-Akanuma², Hiromi Ishihara³, Yoko Kita³,
Maki Shimamura³, Yasushi Kawaguchi³, Shin-ichi Tokishita¹, Yasuhiro Shiga¹,
and Hideo Yamagata¹

¹ School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392 (Japan)

² Institute of Environmental Toxicology, Suzuki-cho 2-772, Kodaira, Tokyo 187-0011 (Japan)

³ Environmental and Safety Department, Konica Corporation, No. 1 Sakura-machi,
Hino, Tokyo 191-8511 (Japan)

Summary

Two sets of useful tester strains (WP3101-WP3106 and WP3101P-WP3106P) derived from *E. coli* WP2*uvrA* were constructed for the detection and classification of mutagens. Six kinds of F' plasmid (*lacI*⁻, *lacZ*⁻, *proAB*⁺) in strains WP3101-WP3106 carried a different *lacZ*⁻ allele. Assays for transitions and transversions are based upon Lac⁺ reversion of a specific mutation located within the *lacZ*⁻ gene on an F' plasmid in the strains. Plasmid pKM101 was further transferred to each strain to make a set of strains WP3101P-WP3106P. In any strain the *trpE65* (*ochre*) allele is available for the Trp⁺ reversion assays which is commonly used for mutagenicity test with the WP2*uvrA* strain.

Using the new tester strains, the mutational specificities of 1,2-dibromo-3-chloropropane and cumene hydroperoxide were investigated. In the presence of S9mix, 1,2-dibromo-3-chloropropane specifically induced G:C → A:T transitions. Cumene hydroperoxide induced two types of transversions, G:C → T:A detected in WP3104 and A:T → T:A detected in WP3105, with G:C → T:A predominating. In pKM101-carrying strains, all 6 types of base substitutions were induced by cumene hydroperoxide with different efficiencies. The frequency of predominant G:C → T:A transversions was not affected by the introduction of pKM101, while that of other types of transitions and transversions were markedly increased.

Keywords : transition, transversion, mutational specificity, pKM101, *E. coli* WP2*uvrA*

受付：1998年4月16日

受理：1998年5月9日

* Tel. : 0426-76-7093; Fax : 0426-76-7081

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

©日本環境変異学会

緒 言

近年、変異原性試験に用いる標準試験菌株の選定について、*hisG* 46 マーカーを持つ従来のサルモネラ菌 TA 1535 株、TA 100 株に加え、*hisG* 428 マーカーを持つサルモネラ菌 TA 102 株、あるいは *trpE* 65 マーカーをもつ大腸菌 WP 2 *uvrA* 株、WP 2 *uvrA*/pKM 101 株の有用性が議論されている (Wilcox et al., 1990; Gatehouse et al., 1994; Watanabe et al., 1996)。これらの菌株の変異原に対する特異性や感受性は、対象とするマーカーにおける復帰可能な突然変異パターンの種類と各々の誘発頻度によって決まると考えられる。

hisG 遺伝子はヒスチジン合成系の ATP ホスホリボシルトランスフェラーゼの構造遺伝子であり、*hisG* 46 マーカーは 69 番目のアミノ酸ロイシン (CTC) がプロリシン (CCC) に置き変わったミスセンス変異である (Barnes et al., 1982)。プロリシンから元のロイシンに戻る場合のほか、セリン (TCC), アラニン (GCC), ヒスチジン (CAC), スレオニン (ACC) に変化しても酵素活性は回復するため、いずれの場合でも His⁺ の表現型となる (Miller and Barnes, 1986; Koch et al., 1994)。したがって *hisG* 46 マーカーを持つ菌株は G:C → T:A, G:C → A:T, G:C → C:G の 3 種類の変異のいずれかを誘発する変異原、すなわち G:C 塩基対に作用する変異原の検出に有効である。一方、*hisG* 428 マーカーや、大腸菌の *trpE* 65 マーカー (*trpE* はトリプトファン合成系のアントラニル酸シンターゼの構造遺伝子) ではアミノ酸の一つが終始コドン (TAA) に変異している。*hisG* 428 の場合、元のグルタミン (CAA) に戻る場合のほか、リジン (AAA), ロイシン (TTA), セリン (TCA) に変化しても酵素活性が回復する。さらに、チロシン tRNA 遺伝子、リジン tRNA 遺伝子、グルタミン tRNA 遺伝子のアンチコドン部位に生じたサプレッサー変異 (各々 GTA → TTA, TTT → TTA, TTG → TTA の変異) によっても酵素活性が回復して His⁺ の表現型になる (Levin and Ames, 1986)。大腸菌の Trp⁺ の復帰変異の場合は *trpE* 65 の変異の位置が報告されていないため、対応する野生型の元のコドンは不明であるが、復帰変異の基本パターンは *hisG* 428 の場合と同様である。したがって *hisG* 428 や *trpE* 65 マーカーを持つ菌株は G:C → C:G 以外の 5 種類の変異パターンのいずれかを誘発する変異原の検出に有効であり、G:C 塩基対だけでなく A:T 塩基対に作用する変異原も検出できる。

このように変異原が誘発する突然変異の特異性を明らかにすることは、変異原性試験における有用な菌株の開発や、突然変異生成や DNA 修復のメカニズムを知るうえでも重要であると考えられる。われわれはこれまで大腸菌の F' 因子上の *lacZ* 遺伝子に生じる特定の型の復帰突然変異を指標にして、変異原の突然変異スペクトル

を解析してきた (Watanabe and Ohta, 1993; Watanabe et al., 1994 a, b; Watanabe-Akanuma et al., 1997)。用いた大腸菌株は K-12 株系統の 6 菌株、CC 101~CC 106 株 (Cupples and Miller, 1989) で、DNA 修復能や膜透過性については野生型であったため、試験菌株に除去修復欠損変異 (*uvrA*) やリポ多糖類合成欠損変異 (*rfa*) を導入して試験菌株の改良を図ってきた (Watanabe-Akanuma and Ohta, 1994)。改良により変異原に対する菌株の感受性は向上したが、それでも大腸菌 B 株系統の WP 2 *uvrA* 株を用いた Trp⁺ 復帰変異試験で検出される弱い変異原について調べると解析が困難な場合が多かった。これは K-12 株と B 株の外膜構造の違い (Nikaido and Vaara, 1987) による感受性の差が一因と考えられた。そこで変異原性試験で一般的に用いられている大腸菌 WP 2 *uvrA* 株に上記の F' 因子を導入して、従来の Trp⁺ 復帰変異試験に加え、Lac⁺ 復帰変異による突然変異スペクトルを解析することができる菌株を作製した (Ohta et al., in press)。今回、これらの菌株にさらにプラスミド pKM 101 を導入した新たな菌株のセットを作製し、その有用性と突然変異スペクトルに対する pKM 101 の影響について調べた。

実験材料および方法

1. 菌株の作製

菌株の遺伝子型と由来は Table 1 に示した。P1 ファージを用いて CSH 26 株の *Δ(pro-lac)* 欠失変異を WP 2 *uvrA* 株に形質導入した WP 2000 (*trpE*, *Δ(pro-lac)*, *uvrA*) 株を作製した。WP 2000 株の分離には MacConkey 寒天プレート上で Lac⁻ 菌を選択し、この中から Pro⁻ となっている形質導入菌をレプリカ法で選んだ。K-12 株系統の CC 101~CC 106 株の F' 因子 (*lacI*⁻, *lacZ*⁻, *proAB*⁺) を直接 B 株系統の WP 2000 株に接合で移すための適当な選択マーカーがなかったので、まず、CC 101~CC 106 株の F' 因子を接合により K-12 株系統の AB 1157 (*hisG*, *argE*, *ΔproA*, *thr*, *leuB*, *lacY*, *thi*, *Sm^r*) 株に移した。LB 培地で一晩掛け合わせを行い、100 μg/ml streptomycin 含有の最少グルコース寒天プレート (His, Arg, Thr, Leu, V. B₁ 添加) にまいて、Pro⁺, Sm^r 選択を行って AB 101~AB 106 株を分離した。次に AB 101~AB 106 株から F' 因子を接合伝達により WP 2000 株に移した。LB 培地で一晩掛け合わせた菌液を最少グルコース寒天プレート (Trp 添加) にまいて、Pro⁺, His⁺, Arg⁺, Thr⁺, Leu⁺ 選択を行って WP 3101~WP 3106 株 (*trpE*, *Δ(pro-lac)*, *uvrA*/F' (*lacI*⁻, *lacZ*⁻, *proAB*⁺)) を分離した。

プラスミド pKM 101 (Ap^r) の導入は WP 3101~WP 3106 株とサルモネラ菌 TA 100 株 (*hisG*, pKM 101) を LB 培地で一晩掛け合わせ、10 μg/ml ampicillin 含有の最少グルコース寒天プレート

Table 1 Bacterial strains

Strain	Genotype	Source	Reference
<i>Escherichia coli</i> K-12			
CC101-CC106	F' (<i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>proAB</i> ⁺) / <i>ara</i> , <i>Δ(lac-pro)</i> 5	J. H. Miller	Cupples and Miller (1989)
AB1157	F ⁻ , <i>thr</i> ⁻¹ , <i>leuB</i> ⁶ , <i>hisG</i> ⁴ , <i>argE</i> ³ , <i>Δ(gpt-proA)</i> 62, <i>thi</i> ⁻¹ , <i>lacY</i> ¹ , <i>ara</i> ⁻¹⁴ , <i>rpsL</i> ³¹	T. Kato	Bachmann (1972)
AB101-AB106	F' (<i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>proAB</i> ⁺) / <i>thr</i> ⁻¹ , <i>leuB</i> ⁶ , <i>hisG</i> ⁴ , <i>argE</i> ³ , <i>Δ(gpt-proA)</i> 62, <i>thi</i> ⁻¹ , <i>lacY</i> ¹ , <i>ara</i> ⁻¹⁴ , <i>rpsL</i> ³¹	CC101-CC106 × AB1157	Ohta et al. (in press)
CSH26	F ⁻ , <i>ara</i> , <i>Δ(lac-pro)</i> , <i>thi</i>	A. Nishimura	Miller (1972)
<i>Escherichia coli</i> B			
WP2uvrA	F ⁻ , <i>uvrA</i> 155, <i>trpE</i> 65, <i>malB</i> 15, <i>lon</i> ⁻¹¹ , <i>sulA</i> 1	T. Kada	Witkin and George (1973)
WP2000	F ⁻ , <i>uvrA</i> 155, <i>trpE</i> 65, <i>malB</i> 15, <i>lon</i> ⁻¹¹ , <i>sulA</i> 1, <i>Δ(lac-pro)</i>	WP2uvrA × P1(CSH26)	Ohta et al. (in press)
WP3101-WP3106	F' (<i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>proAB</i> ⁺) / <i>uvrA</i> 155, <i>trpE</i> 65, <i>malB</i> 15, <i>lon</i> ⁻¹¹ , <i>sulA</i> 1, <i>Δ(lac-pro)</i>	AB101-AB106 × WP2000	Ohta et al. (in press)
WP3101P-WP3106P	F' (<i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>proAB</i> ⁺) / <i>uvrA</i> 155, <i>trpE</i> 65, <i>malB</i> 15, <i>lon</i> ⁻¹¹ , <i>sulA</i> 1, <i>Δ(lac-pro)</i> / pKM101(<i>mucAB</i> , Ap ^r)	WP3101-WP3106 × TA100	this study
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2			
TA100	<i>hisG</i> 46, <i>Δ(uvrB-bio)</i> , <i>rfa</i> / pKM101(<i>mucAB</i> , Ap ^r)	T. Kada	Maron and Ames (1983)

(Trp 添加) にまいて His⁺, Ap^r 選択を行って WP 3101 P~WP 3106 P 株を分離した。

2. 培地

菌の掛け合わせに用いた LB 培地の組成は 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl で、最少グルコース培地は Vogel-Bonner E medium (Maron and Ames, 1983) に 0.5% glucose を加えたものを基本とし、必要に応じてアミノ酸を 50 μg/ml, ビタミンを 1 μg/ml, agar を 1.5% の濃度で添加した。WP 3101~WP 3106 株の前培養には 50 μg/ml (250 μM) tryptophan を加えた最少グルコース培地 (MGT 培地) を用いた。ラクトースオペロンの転写は培地中のグルコースによって抑制されるので、菌の前培養に用いる MGT 培地のグルコース濃度は 0.5%とした。このグルコース濃度は大腸菌の培養で一般的に用いられる濃度であり、菌の生育には十分な量である。WP 3101 P~WP 3106 P 株の前培養にはさらに 5 μg/ml の ampicillin を加えた。Lac⁺ 復帰変異の測定には、最少ラクトース寒天プレート (Vogel-Bonner E medium, 0.5 lactose, 50 μg/ml tryptophan, 1.5% agar) と NB-トップアガ (0.5 mg/ml Oxoid nutrient broth No. 2, 0.5% NaCl, 0.6% agar) を用いた。一方、Trp⁺ 復帰変異の測定には、WP 3101 株および WP 3101 P 株を nutrient broth 培地 (25 mg/ml Oxoid nutrient broth No. 2) で前培養した菌液、最少グルコース寒天プレート (Vogel-Bonner E medium, 2% glucose, 1.5% agar) と TP-トップアガ (10 μg/ml (50 μM) tryptophan, 100 μg/ml proline, 0.5% NaCl, 0.6% agar) を用いた。

3. 試薬

3-Amino-1-methyl-5 H-pyrido[4,3-b]indole (Trp

-P-2, CAS No. 72254-58-1), 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP, CAS No. 96-12-8), dimethylsulfoxide (DMSO) は和光純薬工業より購入した。5-Azacytidine (CAS No. 320-67-2), N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG, CAS No. 4245-77-6), 2-aminoanthracene (CAS No. 613-13-8), および cumene hydroperoxide (80%, CAS No. 80-15-9) は Aldrich Chemical Co. (WI, USA) から入手した。また、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO, CAS No. 56-57-5) は東京化成工業より、N⁴-aminocytidine (CAS No. 57294-74-3) はフナコシより購入した。5-Azacytidine と N⁴-aminocytidine は滅菌した純水 (Milli-Q, Ultra-Pure Water system, Millipore Ltd.) に溶解させた。その他の変異原は DMSO を溶媒として用いた。代謝活性化には、オリエンタル酵母工業より購入した S9 分画とコファクター A を 1:9 の割合で混合した S9 mix を用いた。

4. 突然変異スペクトルの解析 : Lac⁺ 復帰変異

保存菌を MGT 培地に接種して 37°C で一晩振盪培養した。MGT 培地で培養した菌液は遠心分離による洗浄を行わず、そのまま試験に供した。小試験管に菌液 0.1 ml, 変異原溶液 0.01~0.1 ml, 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) または S9 mix 0.5 ml を分注し、37°C で 20 分間、緩やかに振盪しながらプレインキュベーションを行った。溶解して 45°C に保温しておいた NB-トップアガを 2 ml 加えてよく混ぜた後、最少ラクトース寒天プレートにまいた。37°C で 48 時間培養後、Lac⁺ 復帰変異コロニーを数えた。

5. Trp⁺ 復帰変異試験

WP 3101 株または WP 3101 P 株を nutrient broth 培地に接種して、37°C で一晩振盪培養した菌液を使用し

Table 2 *lacZ* reversion events required to restore Lac⁺ phenotype in tester strains, and base substitutions detected.

Strain		Reversion event at Glu-461 codon (Amino acid change)			Base substitution	
<i>uvrA</i>	<i>uvrA</i>	AAT TAG TCA	→ AAT GAG TCA	(Stop → Glu)	A:T → C:G	transversion
	pKM101					
WP3101	WP3101P	AAT TAG TCA	→ AAT GAG TCA	(Stop → Glu)	A:T → C:G	transversion
WP3102	WP3102P	AAT GGG TCA	→ AAT GAG TCA	(Gly → Glu)	G:C → A:T	transition
WP3103	WP3103P	AAT CAG TCA	→ AAT GAG TCA	(Gln → Glu)	G:C → C:G	transversion
WP3104	WP3104P	AAT GCG TCA	→ AAT GAG TCA	(Ala → Glu)	G:C → T:A	transversion
WP3105	WP3105P	AAT GTG TCA	→ AAT GAG TCA	(Val → Glu)	A:T → T:A	transversion
WP3106	WP3106P	AAT AAG TCA	→ AAT GAG TCA	(Lys → Glu)	A:T → G:C	transition

All the strains contain *trpE65* (*ochre*), which is available for a Trp⁺ reversion assay, and are of Trp⁻, Lac⁻ phenotype.

た。Lac⁺復帰変異の場合と同様の操作でプレインキュベーションを行い、TP-トップアガーミリを加えて最少グルコース寒天プレートにまき、37°Cで48時間培養後、Trp⁺復帰変異コロニーを数えた。菌をnutrient broth培地で培養するため、F'因子が脱落した菌も増殖するので、トップアガーナプロリンを加えることによってその影響を除いた。

結果

1. 菌株の特性と試験法

作製したWP3101～WP3106株およびWP3101P～WP3106P株において検出できる復帰変異のパターンをTable 2に示した。F'因子上の*lacZ*遺伝子の変異位置はβ-ガラクトシダーゼ蛋白のN末端から461番目のグルタミン酸に対応するGAGコドンである。この位置のグルタミン酸はβ-ガラクトシダーゼの酵素活性に必須であり、他のどのアミノ酸に変わっても活性を失うことが知られている(Cuckles and Miller, 1989)。したがって、いずれの菌株もグルタミン酸のコドン(GAG)に変異した場合のみLac⁺となる。この原理をもとに、Lac⁺復帰変異コロニーを数えることによってWP3101株とWP3101P株はA:T → C:G変異、WP3102株とWP3102P株はG:C → A:T変異、WP3103株とWP3103P株はG:C → C:G変異、WP3104株とWP3104P株はG:C → T:A変異、WP3105株とWP3105P株はA:T → T:A変異、そしてWP3106株とWP3106P株はA:T → G:C変異の誘発を特異的に検出することができる。

菌株をnutrient broth培地やLB培地に直接接種して一晩培養すると、F'因子が脱落した菌の割合が高くなり(80%以上になることもある)試験に用いるには不適切な状態になる。F'因子が脱落した菌はプロリン要求性となるので、プロリンを含まないMGT培地で生育させることでF'因子を維持することができる。試験法に関してはこれまで、MGT培地で一晩前培養した菌液をLB培地に1/50容量接種して3～4時間振盪培養し、得られる

た対数増殖期後期の菌液を遠心分離による洗浄を行った後、緩衝液に懸濁したものを試験に用いていた(Ohta et al., in press)。しかしその後、洗浄して緩衝液に懸濁した菌液を用いると塩基アナログなどの変異原に対する感受性が著しく低下することがわかった。今回、N⁴-aminocytidine、ENNG、4-NQO、5-azacytidineを用いての検討の結果、MGT培地で培養した菌液を洗浄せずにそのまま用いた場合が、相対的に良好な結果を与えた。この場合、培地中のグルコースがラクトースオペロンの発現を抑制することが懸念されたが、試験に用いる菌培養液0.1mLに含まれるMGT培地中のグルコースの残存量は、突然変異誘発頻度でみるとかぎりでは*lacZ*遺伝子の発現には影響しなかった。なお、NB-トップアガーナ方にはトリプトファンを添加する必要はなく、添加しても突然変異誘発頻度での結果に差は認められなかった。

2. 陽性対照

WP3101～WP3106株の陽性対照として用いることのできる変異原の種類と用量の一例をTable 3に示した。ENNGはWP3103株以外の5菌株にLac⁺復帰変異を誘発し、4-NQOはWP3102、WP3103、WP3104の3菌株にLac⁺復帰変異を誘発する。また、塩基アナログのN⁴-aminocytidineはWP3102とWP3106の2菌株に、5-azacytidineはWP3103株だけに特異的にLac⁺復帰変異を誘発する(Ohta et al., in press)。なお本菌株を用いたLac⁺復帰変異の場合、塩基アナログの変異原性はプレインキュベーション法よりもプレート法の方が感受性が高い傾向があり、同一の培養液を用いて比較したとき、プレート法で数倍多いLac⁺復帰変異コロニーが出現した。一方、S9 mix存在下で変異原性が検出される陽性対照としては、2-aminoanthracene(WP3102株)やTrp-P-2(WP3104株)などがある(Table 3)。S9 mixの酵素活性を確認するための陽性対照なので、どれか一菌株を用いて調べればよいと考えられる。

Table 3 Examples of mutagens which could be used as positive controls for tester strains WP3101-WP3106.

Compound	Dose (μ g/plate)	S9 mix	Lac ⁺ revertants/plate						Trp ⁺ revertants/plate
			WP3101 (A:T → C:G)	WP3102 (G:C → A:T)	WP3103 (G:C → C:G)	WP3104 (G:C → T:A)	WP3105 (A:T → T:A)	WP3106 (A:T → G:C)	
N ⁴ -Amino- cytidine	0	-	*	9	*	*	*	3	24
	0.01	-	*	232	*	*	*	-	-
	0.1	-	*	-	*	*	*	116	188
5-Azacytidine	0	-	*	*	0	*	*	*	*
	5	-	*	*	110	*	*	*	*
	0.2	-	*	134	18	317	*	*	206
ENNG	0	-	1	9	*	5	2	2	24
	0.2	-	262	*	-	-	-	-	119
	5	-	45	-	*	41	48	60	-
2-Amino- anthracene	0	+	*	11	*	7	*	*	42
	5	+	*	333	*	32	*	*	138
	0	+	*	9	*	6	*	*	47
Trp-P-2	2	+	*	69	*	128	*	*	396

* Negative response (less than 3-fold increase over the control)

Table 4 Examples of mutagens which could be used as positive controls for pKM101-carrying tester strains WP3101P-WP3106P.

Compound	Dose (μ g/plate)	S9 mix	Lac ⁺ revertants/plate						Trp ⁺ revertants/plate
			WP3101P (A:T → C:G)	WP3102P (G:C → A:T)	WP3103P (G:C → C:G)	WP3104P (G:C → T:A)	WP3105P (A:T → T:A)	WP3106P (A:T → G:C)	
N ⁴ -Amino- cytidine	0	-	*	11	*	*	*	3	107
	0.01	-	*	270	*	*	*	-	-
	0.1	-	*	-	*	*	*	183	744
5-Azacytidine	0	-	*	*	1	10	*	*	93
	2	-	*	*	287	-	*	*	-
	5	-	*	*	1037	106	*	*	292
4-NQO	0	-	*	8	1	12	5	*	93
	0.05	-	*	-	-	403	-	*	552
	0.2	-	*	266	148	>2000	22	*	-
ENNG	0	-	2	7	1	5	2	4	87
	0.2	-	301	-	-	-	-	-	285
	5	-	138	-	26	184	145	720	-
2-Amino- anthracene	0	+	*	19	2	16	13	*	165
	5	+	*	146	22	330	199	*	674
	0	+	2	20	1	17	12	*	140
Trp-P-2	2	+	46	210	18	1136	252	*	1126

* Negative response (less than 3-fold increase over the control)

Table 4には、pKM101を導入したWP3101P～WP3106P株の陽性対照となる変異原の種類と用量の一例を示した。pKM101上の*mucAB*遺伝子は突然変異誘発頻度を高める作用があるが(McCann et al., 1975; Walker, 1984)，同時に突然変異スペクトルも大きく変わることが知られている(Watanabe et al., 1994b)。一般的な傾向としては、G:C → A:T変異はpKM101の導入による影響が少なく、WP3102株とWP3102P株で突然変異頻度に大きな差は生じなかつた(Table 3, 4)。一方、G:C → T:A変異とA:T → T:A変異はpKM101導入菌株(WP3104P, WP3105P)で突然変異の増強効果が強く現れた。また、A:T → C:G変異(WP3101P株)やG:C → C:G変異(WP3103P株)も検出されやすくなつた。5-AzacytidineはTrp⁺

復帰変異で調べると、WP3101株では変異原性が検出できないがpKM101を導入したWP3101P株では変異原性が検出された。これはpKM101を導入したことによりG:C → C:G変異以外にG:C → T:A変異も誘発(Table 4)されるように変化したためと解釈された。

3. 1,2-Dibromo-3-chloropropane (DBCP) の突然変異スペクトル

DBCPはWP2 *uvrA*株で変異原性が検出され、変異原性発現のためには代謝活性化が必要な変異原である(Moriya et al., 1983)。Table 5にはDBCPで誘発される突然変異のスペクトルを示した。S9 mixの存在下ではWP3102株でG:C → A:T変異がきわめて高頻度で誘発されることがわかつた。また、G:C → T:A変異は

Table 5 Mutation spectra of 1,2-dibromo-3-chloropropane in the presence and absence of the S9 metabolic activation in tester strains WP3101-WP3106.

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix	Lac ⁺ revertants/plate					Trp ⁺ revertants/plate
			WP3101 (A:T → C:G)	WP3102 (G:C → A:T)	WP3103 (G:C → C:G)	WP3104 (G:C → T:A)	WP3105 (A:T → T:A)	
DBCP	0	-	2	9	0	3	1	0
	10	-	0	6	0	2	2	30
	20	-	2	6	0	1	0	31
	50	-	2	7	0	2	1	27
	100	-	0	10	0	9	1	20
DBCP	0	+	1	15	0	7	4	47
	1	+	-	49	-	-	-	-
	2	+	-	123	-	-	-	-
	5	+	-	238	-	-	-	-
	10	+	1	886	0	5	6	58
	20	+	0	>2000	0	10	3	91
	50	+	2	-	1	17	9	125
	100	+	1	-	0	28	9	223

WP 3104 株で高用量でわずかに誘発されていた。その他のタイプの変異は検出されなかった。

4. Cumene hydroperoxide の突然変異スペクトルと pKM 101 の影響

Cumene hydroperoxide によって誘発される突然変異のタイプを WP 3101～WP 3106 株と WP 3101 P～WP 3106 P 株を用いて解析した結果を Fig. 1 にまとめて示した。pKM 101 を持たない菌株では、G:C → T:A 変異が最も多く誘発され、ついで A:T → T:A 変異がわずかに誘発された。一方、pKM 101 導入菌株では 6 種類すべてのタイプの変異が誘発され、G:C → T:A 変異に加えて G:C → A:T 変異、A:T → T:A 変異もほぼ同程度の頻度で誘発された。この化合物の変異原性は Trp⁺ 復帰変異で調べると、WP 2 uvrA 株よりも WP 2 uvrA/pKM 101 株でより強く検出されることが報告されているが (Kato et al., 1994)，これは WP 2 uvrA 株において誘発されていた G:C → T:A 変異が pKM 101 導入によって単純に増強されたのではなく、その他のタイプの変異が高頻度で誘発されるようになったためと考えられた。

考 察

突然変異スペクトルを研究するための手法としては、DNA シークエンサー等により塩基配列変化を直接解析する方法の他、コロニープローブハイブリダイゼーションによる解析法 (Miller and Barnes, 1986; Cebula and Koch, 1990) が開発されている。

これらの手法では、塩基対置換だけでなく数塩基の付加や欠失によるフレームシフトも同時に調べられる利点がある。しかし、解析できるサンプル数に実際的な限界があるため、誘発された突然変異体の中での存在比が 1%

以下しかないように発生頻度の低いタイプの変異の場合には、自然突然変異によるものか変異原で誘発されたものかを区別、定量することは困難である。ここで用いた復帰突然変異を指標とする解析方法では、塩基対置換だけを解析の対象にしても 6 菌株のセットが必要になるが、各々のタイプの変異を個別に定量できるため、発生頻度が低いタイプのものでも用量相関のデータを容易にとることができる。この目的のための菌株がこれまでに大腸菌 (Cupples and Miller, 1989) とサルモネラ菌 (Gee et al., 1994) で開発されている。前者の大腸菌株は F' 因子上の lacZ 遺伝子の変異を指標としているため、F' 因子を他の菌株に比較的容易に移すことができる。今回われわれは変異原性試験で広く用いられている WP 2 uvrA 株および WP 2 uvrA/pKM 101 株に移した菌株のセットを作製した。作製した菌株の表現型はいずれも Lac⁻ である以外は元の株と変わらず、したがって Trp⁺ 復帰変異試験も従来と同じ方法で培地やプレートの種類も変更せずに実施できる。このため、Trp⁺ 復帰変異試験で変異原性が検出された変異原については、Lac⁺ 復帰変異試験で突然変異スペクトルを調べることにより直接的な比較が可能になった。K-12 株由来の F' 因子を B 株に移したため、当初プラスミドの安定性が心配されたが、プロリン無添加の最少グルコース培地で継代培養を繰り返すことできなり安定なクローンを得た。

塩基アナログやアルキル化変異原について特異的なタイプの突然変異が誘発され (Table 3)，これらの結果は K-12 株で得られたデータ (Watanabe et al., 1994 b) とよく一致したことから、作製したテスト菌株の中で F' 因子が維持され、機能していることが明らかとなった。

WP 3101～WP 3106 株を用いた突然変異スペクトルの解析から、各種の変異原で誘発される突然変異の特異性のほか、DNA 付加体形成における塩基配列依存性の

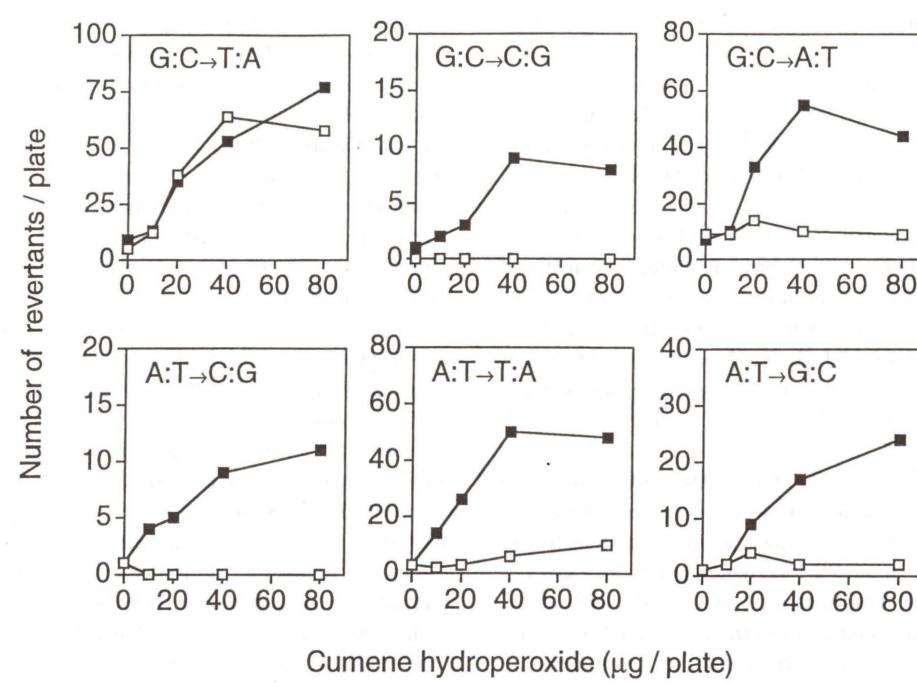


Fig. 1 Base substitutions induced by cumene hydroperoxide and the effect of *mucAB* genes in pKM101 on the mutational specificity. Each type of transition and transversion was assayed in strains WP3101-WP3106 (□) and pKM101-carrying strains WP3101P-WP3106P (■).

ことも明らかとなってきた。変異原性試験の陽性対照物質としてしばしば用いられる furylfuramide (AF-2) を Lac⁺ 復帰変異で調べたところ、WP 3104 株で G:C → T:A 変異のみがわずかに増加傾向である以外は突然変異の誘発は観察されなかった (Ohta et al., in press)。しかし、同一菌株で行った Trp⁺ 復帰変異試験では、親株の WP 2 *uvrA* 株と同程度に AF-2 の強い変異原性が検出された。AF-2 はグアニン塩基に付加体を形成し主に G:C → T:A 変異を誘発するが、なかでも 5'-TGC 配列中の G が AF-2 誘発突然変異のホットスポットであることが報告されている (Lambert et al., 1991)。ところで、G:C → T:A 変異を検出するための WP 3104 株における lacZ 遺伝子の標的塩基 (GCG) の前後の配列をみると、5'-AATGCGTCA となっている (Table 2)。この菌において Lac⁺ 復帰変異が生じるためには GCG → GAG の塩基対置換が必要であるが、5'-TGC 配列が含まれているため、GCG の真ん中の C よりも 5' 側の G の変異の方が起きやすいと考えられる。この変異に隠されてしまうため、Lac⁺ 復帰変異が生じにくくなり、AF-2 の変異原性が WP 3104 株でわずかしか検出されなくなったと推察された。DNA 付加体形成における塩基配列依存性の問題は、復帰変異を指標にしている突然変異スペクトルの解析系にとって結果に大きな影響を与える重大な問題であり、菌株の開発、改良にあたっては慎重に検討していく必要がある。

突然変異スペクトルは pKM 101 プラスミド (*mucAB*

参考文献

- Bachmann, B. J. (1972) Pedigree of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12, Bacteriol. Rev., 36, 525-557.
- Barnes, W., E. Tuley and E. Eisenstadt (1982) Base-sequence analysis of His⁺ revertants of the hisG46 missense mutation in *Salmonella typhimurium*, Environ. Mutagen., 4, 297.
- Cebula, T. A. and W. H. Koch (1990) Analysis of spontaneous and psoralen-induced *Salmonella typhimurium* hisG46

- revertants by oligo-deoxyribonucleotide colony hybridization : Use of psoralens to cross-link probes to target sequences, *Mutation Res.*, 229, 79-87.
- Cupples, C. G. and J. H. Miller (1989) A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5345-5349.
- Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt and E. Zeiger (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233.
- Gee, P., D. M. Maron and B. N. Ames (1994) Detection and classification of mutagens : A set of base-specific *Salmonella* tester strains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 11606-11610.
- Kato, T., M. Watanabe and T. Ohta (1994) Induction of the SOS response and mutations by reactive oxygen-generating compounds in various *Escherichia coli* mutants defective in the *mutM*, *mutY*, or *soxRS* loci, *Mutagenesis*, 9, 245-251.
- 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.
- Lambert, I. B., T. A. Chin, D. W. Bryant, A. J. E. Gordon, B. W. Glickman and D. R. McCalla (1991) The mutational specificity of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (AF2) in the *lacI* gene of *Escherichia coli*, *Carcinogenesis*, 12, 29-34.
- 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.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- 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.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, J. K. and W. M. Barnes (1986) Colony probing as an alternative to standard sequencing as a means of direct analysis of chromosomal DNA to determine the spectrum of single-base changes in regions of known sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1026-1030.
- Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato and Y. Shirasu (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutation Res.*, 116, 185-216.
- Nikaido, H. and M. Vaara (1987) Outer membrane, In : F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (Eds), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Vol. 1, American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 7-22.
- Ohta, T., M. Watanabe-Akanuma, S. Tokishita, Y. Shiga and H. Yamagata, Development of new tester strains derived from *E. coli* WP2 *uvrA* for the determination of mutational specificity, *Mutation Res.*, (in press).
- 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.
- Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, 48, 60-93.
- Watanabe, K., K. Sakamoto and T. Sasaki (1996) Comparisons on chemically-induced mutagenicity among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101 : collaborative study I, *Mutation Res.*, 361, 143-155.
- 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.
- Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta (1994a) 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 (1994b) Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli* : II. Base-substitutional mutagenesis, *Mutation Res.*, 314, 39-49.
- Watanabe-Akanuma, M. and T. Ohta (1994) Effects of DNA repair deficiency on the mutational specificity in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, 311, 295-304.
- Watanabe-Akanuma, M., R. Woodgate, and T. Ohta (1997) Enhanced generation of A:T → T:A transversions in a *recA730 lexA* (Def) mutant of *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, 373, 61-66.
- Wilcox, P., A. Naidoo, D. J. Wedd and D. G. Gatehouse (1990) Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP2 tester strains, *Mutagenesis*, 5, 285-291.
- Witkin, E. M. and D. L. George (1973) Ultraviolet mutagenesis in *polA* and *uvrA* derivatives of *E. coli* B/r : evidence for an inducible error-prone repair system, *Genetics*, 73, 91-108.

Environ. Mutagen Res., 20 : 83 - 84(1998)

NDA, a red-pigment derived from ascorbic acid, induced micronuclei in mouse bone marrow hematopoietic cells

Michiko Nonaka^{1*}, Masata Mitsuiki², Tetsushi Kodama³ and Hirohisa Omura¹

¹ Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-09
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

² Food Research & Development Laboratory, Ajinomoto Co. Inc.
1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-0801, Japan

³ Tokyo Office, Nikka Whiskey Co. Inc.
5-4-31 Minamiaoyama, Minato-ku, Tokyo 107-0062, Japan

Summary

NDA (2, 2'-nitrilodi-2 (2')-deoxy-ascorbic acid monoammonium salt), a red-pigment synthesized by the reaction of dehydroascorbic acid with L-phenylalanine, induced micronucleated polychromatic/normochromatic erythrocytes (MNPCEs/MNNCEs) in ddY mouse bone marrow. Six male mice per group were intraperitoneally injected with red-pigment two times at 24 h intervals and the bone marrow cells were examined 6 h after the last treatment. Statistically significant increase of MNPCEs or MNNCEs was observed in all treatment groups.

Keywords : 2, 2'-nitrilodi-2 (2')-deoxy-ascorbic acid monoammonium salt, ascorbic acid, mouse, bone marrow, micronucleus assay

Introduction

NDA (2, 2'-nitrilodi-2 (2')-deoxy-ascorbic acid monoammonium salt), a red-pigment, is often produced in the foodstuffs added ascorbic acid as a food additive (Kurata et al., 1973 ; Hayashi, 1984). NDA induces DNA-damaging and gene mutations in bacteria (Nonaka et al., 1991). In the present study, we tested the genotoxicity of this chemical *in vivo* using the mouse bone marrow micronucleus assay.

Materials and methods

NDA was synthesized by the reaction of dehydroascorbic acid with L-phenylalanine (Nonaka et al., 1991).

received : February 16, 1998

accepted : March 26, 1998

* Correspondence (Phone : +81-9-2642-3009 ; Fax : +81-9-2642-3030 ; E-mail : nonakami@agr.kyushu-u.ac.jp)

© Environmental Mutagen Society of Japan

al., 1991). Six-week-old male ddY mice were purchased from Kyudo Co. (Kumamoto, Japan) and acclimated for one week. Six mice were randomly assigned into treatment, negative control, and positive control groups. They were fed commercial pellets and given water *ad libitum* throughout the acclimation and experimental periods.

Mitomycin C [50-07-7] was obtained from Kyowa Hakko Kogyo Co. (Tokyo, Japan) and used as positive control. Mitomycin C and NDA were dissolved in phosphate-buffered saline immediately before use. Mitomycin C was injected intraperitoneally twice 24 h apart at 2.0 mg/kg, thus mice received 4.0 mg/kg in total. NDA was injected intraperitoneally twice 24 h apart at 62.5, 125, 250, and 500 mg/kg, thus mice received 125, 250, 500, and 1000 mg/kg in total (doses were determined by a small preliminary dose-finding test). The mice in the concurrent negative control group received only PBS. The volume of injection was 10 mL/kg for each

Table 1 MNPCE and MNNE frequencies in ddY male mouse bone marrow following 2 daily treatments of NDA

Dose (mg/kg) per injection	No. mice	MNPCEs		MNNEs		PCE
		Per 4000 PCEs	Mean±SD (%)	Per 4000 NCEs	Mean±SD (%)	Mean±SD (%)
0	6	7, 6, 19,	0.23±0.13	6, 4, 11,	0.18±0.12	60.1±1.9
		11, 4, 8		15, 3, 4		
62.5	6	27, 27, 20,	0.56±0.10	28, 33, 25,	0.61±0.14*	56.0±3.1
		18, 19, 24		18, 23, 20		
125	6	44, 25, 37,	0.94±0.31**	37, 28, 30,	0.74±0.12**	54.4±1.3
		59, 33, 28		33, 24, 26		
250	6	90, 66, 54,	1.73±0.40**	27, 21, 19,	0.59±0.18*	45.4±3.2
		85, 50, 69		37, 20, 18		
500	3 ^a	133, 141, 148,	3.52±0.19**	40, 53, 44	1.14±0.17**	39.6±1.6*
MMC ^b 2.0	3	298, 204, 230	6.10±1.21**		ND ^c	ND ^c

^a 3 mice died.

^b Mitomycin C.

^c not determined.

* p<0.05, ** p<0.01 (Kastenbau and Bowman's method (1970) for MNPCEs and MNNEs; Student t-test for PCE).

treatment. Mice were killed 6 h after the last treatment** and femur marrow cells were collected with fetal bovine serum (Schmid, 1975; Heddle, 1973). Cells were smeared, fixed with methanol, and stained with acridine orange (Hayashi et al., 1983). 4000 polychromatic erythrocytes (PCEs) and 4000 normochromatic erythrocytes (NCEs) per mouse were analyzed for the frequencies of micronucleated PCEs (MNPCEs) and micronucleated NCEs (MNNEs), respectively, and 4000 total erythrocytes for percentage of PCE to assess inhibition of bone marrow cell proliferation.

Results

The results of the micronucleus assay on NDA are presented in Table 1. The mean MNPCE frequency in the negative control group was 0.23% and the frequency in the positive control group was 6.10%. These values were in the expected range and revealed that the experiment was technically acceptable. The increases of the MNPCEs frequencies at 125, 250 and 500 mg/kg and the MNNEs frequencies at 62.5, 125, 250 and 500 mg/kg were statistically significant (Kastenbau and Bowman, 1970). The decrease in percentage of PCEs among total erythrocytes at 500 mg/kg was statistically significant (Student's *t*-test). These indicated the NDA affected bone marrow cells, induced micronuclei and inhibited cell proliferation.

** This was performed according to the original protocol (Schmid, 1975). The effect of the last treatment may not have evident at 6 h (CSGMT, 1990).

Discussion

NDA is positive in the DNA-repair test and two different gene mutation assays using bacteria (Nonaka et al., 1991). In this study, NDA was positive in the micronucleus assay. These results suggest that NDA poses a carcinogenic or genetic hazard to humans and it may be important therefore to prevent the occurrence of NDA in foodstuffs.

References

- CSGMT (collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1990) Single versus multiple dosing in the micronucleus test: The summary of the fourth collaborative study by CSGMT/JEMS · MMS, Mutat. Res., 234, 205-222.
- Hayashi, M., T. Sofuni, and M. Ishidate, Jr. (1983) An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutat. Res., 120, 241-247.
- Hayashi, T. (1984) New radical products and browning of the reaction of dehydroascorbic acid with amino acids, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 58, 53-59.
- Heddle, J. A. (1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutat. Res., 18, 187-190.
- Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutat. Res., 9, 527-549.
- Kurata, T., M. Fujimaki and Y. Sakurai (1973) Red pigment produced by the reaction of dehydro-L-ascorbic acid with α -amino acid, Agric. Biol. Chem., 37, 1471-1477.
- Nonaka, M., M. Mitsuiki, T. Kodama and H. Omura (1991) DNA-damaging activity and mutagenicity of red-pigment derived from ascorbic acid, J. Food Hyg. Soc. Japan, 32, 13-19.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, Mutat. Res., 31, 9-15.

本稿は1997年12月3-5日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第26回大会で発表された1997年度学術賞受賞講演である（座長：祖父尼俊雄）。

染色体異常を指標としたがん原性物質検出法の開発と評価

石館 基

オリンパス光学工業株式会社 染色体研究センター (CRC) 〒192-8512 東京都八王子市久保山町2-3

Development of the *in vitro* Chromosomal Aberration Test System for screening environmental carcinogens —Quantitative evaluation of the results—

Motoi Ishidate, Jr.

Chromosome Research Center (CRC), Olympus Optical Co., Ltd.,
2-3 Kuboyama-cho, Hachioji, Tokyo 192-8512

Summary

The Chromosomal Aberration Test using cultured mammalian cells, was proposed as an alternative screening tool to bacterial mutation assays (Ames test), for the detection of environmental mutagens and/or carcinogens. The Micronucleus Test in mice was also proposed as an additional *in vivo* test for evaluating the genotoxic potential of those chemicals which were positive in the *in vitro* systems.

Mutagenic potency in the Ames test was estimated from the number of revertant colonies induced per unit dose (mg/plate) and in the Chromosomal Aberration Test was calculated from the minimum dose (mg/ml) inducing at least 20% aberrant cells (D_{20} value). It was found from these assays that there were some 10^6 fold differences in their mutagenic/clastogenic potencies and that only potent chemicals may give positive responses in the *in vivo* Micronucleus Test. It was also found that, in the Chromosome Aberration Test, the incidence of exchange-type rather than break-type aberrations is more important in predicting the carcinogenic risk of exposure to clastogens.

In this review, the significance of a battery system comprising at least three different mutagenicity tests is discussed together with the importance of quantitative rather than qualitative evaluation in the genotoxicity of chemicals. In addition, recent analytical studies on the mechanisms of induced chromosomal aberrations in cultured cells, using the Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) technique and Laser Scan Cytometry (LSC) are presented.

(This paper, chaired by Toshio Sofuni, is the lecture of The JEMS Award (1997) presented at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords : chromosomal aberration, a battery system for mutagenicity testing, D_{20} value, TR value, FISH, LSC

1. はじめに

今回、本学会の名誉ある学術賞を受けるにあたり、著

者が本学会にどの程度の貢献をしてきたのか、改めて反省させられた。一昨年の本学会第25周年に、清水英佑会長が過去25年間に発表された会員の演題のリストを作成されたので、その中から、著者の関連した演題を拾つてみたが、合計約100題であった。これらのほかに、癌学会や組織培養学会その他の国内外での発表を加えなけ

Table 1 Screening tests on paired compounds, carcinogenic and non-carcinogenic or chemically related substances.

Pairs of compounds [CAS No.]	Ames test	Chromosome test <i>in vitro</i>
4-Nitroquinoline-1-oxide [56-57-5]	+	+
4-Aminoquinoline-1-oxide [2508-86-3]	+	+
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine [70-25-7]	+	+
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitrosoguanidine [4245-76-5]	-	+
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourethane [615-53-2]	+	+
<i>N</i> -Methylurethane [105-40-8]	-	-
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea (MNU) [684-93-5]	+	+
<i>N</i> -Methylurea [598-50-5]	-	-
Dimethylnitrosamine (DMN) [62-75-9]	+(S9)	+(S9)
Dimethylamine [124-40-3]	-	-
Butylbutanolnitrosamine (BBN) [3817-11-6]	+(S9)	+(S9)
Butylbutanolamine [4543-95-7]	-	-
Benzo(a)pyrene (B(a)P) [50-32-8]	+(S9)	+(S9)
Pyrene [129-00-0]	-	-
Furylfuramide (AF-2) [3688-53-7]	+	+
Nirofurantoin (Furadantin) [67-20-9]	+	+
Maleic anhydride (2,5-Furandione) [108-31-6]	-	+
Succinic anhydride [108-30-5]	-	-
7,12-Dimethylbenz(a)anthracene [57-97-6]	+(S9)	+(S9)
Anthracene [120-12-7]	+(S9)	+(S9)
Phenacetin [62-44-2]	+(S9)	+(S9)
Acetaminophen (Paracetamol) [103-90-2]	-	+
Thiourea (Thiocarbamide) [62-56-6]	-	-
Urea (Carbamide) [57-13-6]	-	+
4-Dimethylamino-3'-methylazobenzene	+(S9)	+(S9)
4-Dimethylamino-2'-methylazobenzene	+(S9)	+(S9)
Styrene oxide (Epoxyethylbenzene) [96-09-3]	+	+
Styrene (Vinylbenzene) [100-42-5]	+(S9)	+(S9)
Tris-dibromopropylphosphate [126-72-7]	+(S9)	+
Tris-dichloropropylphosphate [78-43-3]	+(S9)	+(S9)
Progesterone [57-83-0]	-	-
17-Ethinylestradiol [57-63-6]	-	-

ればならないが、いざにせよ、これらの研究は、著者の実績というよりも、著者の属する研究室の協力者の実績であり、また、研究室以外の諸先輩の援助によって初めて得られたものであることを痛感している。

著者が、財団法人癌研究所から前国立衛生試験所に入所したのは、昭和47年(1972)であった。当初は病理部の室長の一人として、故小田島成和部長の許で、種々のアルキルニトロソ尿素によってラットに誘発された白血病細胞の染色体分析などを手掛けていた。ちょうどその頃、米国の Ames らによって開発されたサルモネラ復帰突然変異試験(Ames 試験)が注目を浴びていた。食品添加物の一つとして使用されてきた AF-2 に強い変異原性が認められ、その後、国立衛試の実験(故池田良雄部長ら)によって、発がん性が実証され、その使用が禁止さ

れるという事件が起きたのもこの頃である。発がん性を実証するためには、莫大な経費と試験期間を要する。厚生省では、食品化学課を中心となり、生活環境中の発がん性物質を早期に予測し得るような短期スクリーニング法の開発の重要性を考慮し、国内における研究班を組織した。行政的需要から昭和53年(1978)には国立衛試(現在の国立衛研)に変異原性部(現在の変異遺伝部)が新設されることになった。

2. 発がん性物質の短期スクリーニング

厚生省の研究班は大きく2つのグループに分かれた。第1は、微生物あるいは乳類培養細胞を用いる試験法によって年間約25種類の化学物質を検索するグループ(河内卓班)であり、主に細胞学あるいは遺伝学分野の

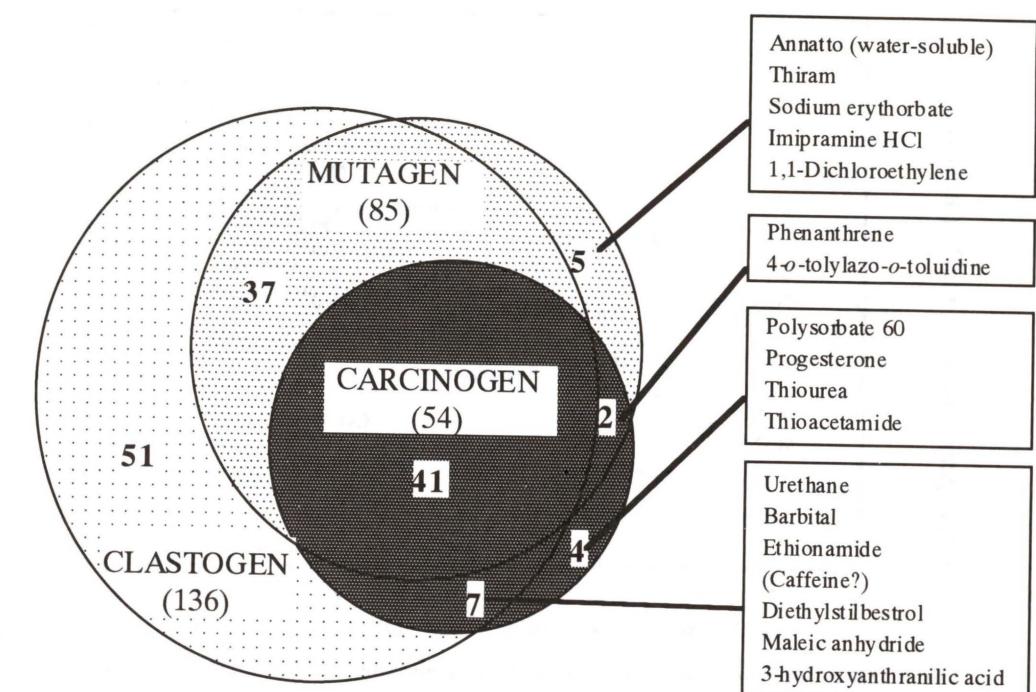


Fig. 1 Correlation among clastogens (positive in CHL cells), mutagens (positive in the Ames test) and carcinogens. The chemicals outside of the carcinogen-circle, have not been tested for their carcinogenic potential (Ishidate, M., Jr., et al., 1981).

研究者が担当した。第2のグループは、第1のグループで陽性となった化合物について、実際に動物を用いて発がん性試験を実施するグループ(小田島成和班)であり、主に実験病理学者が担当した。本研究班は、その後も約10年以上継続したが、このように全国的な協力体制のもとに同じ目標に取り組んだ例は他ではなく、諸外国でも注目されるところとなった(Kawachi et al., 1980)。

1980年頃からスタートした米国の毒性計画(NTP)もその刺激を受けた結果とも考えられる。厚生省の研究班と平行して、科学技術庁でも短期スクリーニング法の開発グループ(故賀田恒夫班)が発足しているが、この機会に、わが国におけるがんの研究者と遺伝学者との今までにない協力体制が確立したといつても過言ではあるまい。

3. 既知発がん性物質と変異原性との比較

上記の研究班では、まず、既知発がん性物質とそれらに構造が似ているが、発がん性のない物質との比較がなされた。その結果、両者の間にはかなり良い相関が得られた(Table 1)。既知発がん物質54種類とAmes試験で陽性となった化合物85種類、さらに染色体異常試験(CHL/IU細胞)で陽性となった化合物136種類とを定性的に比較してみた結果をFig. 1に示す。発がん性物質の輪は上記2試験の大きな輪の中に重なってくる。すなわち、発がん性物質の大部分は、どちらか一方の試験で陽性となり、しかも、両者で同時に陽性となる場合の多

いことがわかった。ただし、ある発がん性物質は、上記の2つの輪からはずれてくる。その数は少ないが、この中にはTween 60, progesterone, thioureaあるいはthioacetamideなどが含まれている。Phenanthreneや4-*o*-tolylazo-*o*-toluidineなどは、Ames試験でかかっても、染色体試験ではかかりにくいが、逆に、urethane, barbital, ethionamideあるいはethylstilbestrol(DES)などは、前者ではかかりにくく、後者では陽性となる(Ishidate et al., 1977)。

後に、試験結果を定量的に評価する必要性を論じるが、上記の研究班で得られたAmes試験の活性値(mg当たりの復帰コロニー数)と、染色体の異常発生の強さ(D₂₀値)とを比較した場合をFig. 2に示す。これによると、指標の異なる試験法でも、活性の強弱はかなり平行する可能性があることがわかる。

4. 染色体異常試験に関する国際協力

1983年から1988年にかけて発がん性物質の短期スクリーニング法の評価に関する国際協力事業であるWHOの企画によるIPCS(国際化学物質安全性計画)事業に参加した。英国のDr. J. Ashby, 米国のDr. F. J. de SerresやDr. M. Shelbyらが中心となって行われた。ここでは、Ames試験では検出されないか、あるいは、検出しにくい化合物8種類(Table 2)について、種々の指標をもつ変異原性試験が実施された。著者は、CHL/IUを用いる染色体異常試験を分担した。結果は単行本

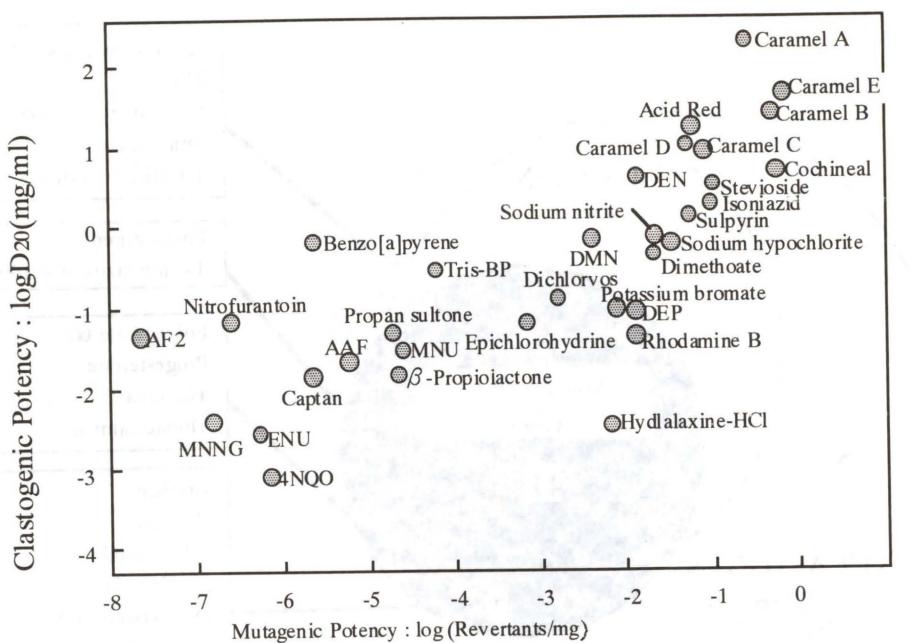


Fig. 2 Quantitative comparison of the clastogenic and mutagenic potential of chemicals tested in the chromosomal aberration test in CHL/IU cells and in the Ames test, respectively.

Table 2 Eight carcinogens which were tested in the CSSTT/IPCS/WHO collaborative study.

Carcinogens tested	AT [#]	CA [#]	MN [#]
1) Hexamethylphosphoramide (HMPA)	-	+	+
2) o-Tolidine	+	+	-
3) Benzene	-	+	+
4) Safrole	+	+	-
5) Acrylonitrile	+	+	-
6) Diethylhexylphthalate (DEHP)	-	-	-
7) Diethylstilbestrol (DES)	-	+	+
8) Phenobarbital	+	+	+

AT[#]: Ames test, CA[#]: Chromosome test *in vitro*, MN[#]: Micronucleus test in.

(グリーンブック)にまとめられている (Ashby et al., 1985)。全体を通して、は乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が Ames 試験を補足し得る試験法として、最も良い成績を示した。

上記の国際協力事業は、さらに日米間における協力研究に発展した。米国では、1980 年以来、NTP(毒性計画)事業を開始しているが、そこでは、年間いくつかの選ばれた化学物質について、変異原性試験および齧歯類による発がん性試験が実施されている。著者らは、特に、培養細胞を用いる染色体異常試験の結果に注目したが、同じ化合物でも、NTP とわが国での結果との間にかなりの隔たりのあることに気づいた。そこで、米国から同じロットの化合物 25 種類を取り寄せ、日本のガイドライン

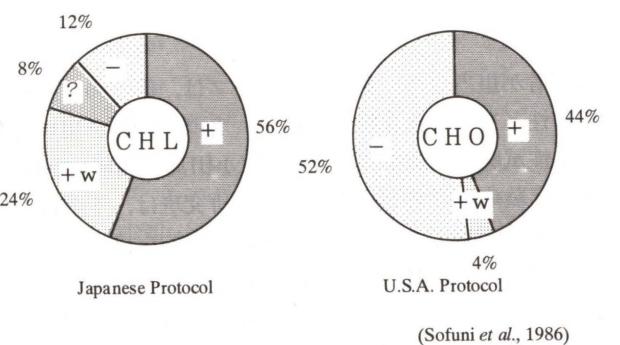


Fig. 3 Comparison of the results in the chromosomal aberration tests carried out with CHO cells (in the NTP protocol) and CHL cells (in the Japanese protocol).

に沿って試験を実施した。NTP では、チャイニーズ・ハムスター由来の CHO 系細胞を用い、わが国では、CHL/IU 細胞が用いられている。細胞も違うが、試験法プロトコールも違う。細胞とプロトコールを入れ換えて実験を繰り返したところ、わが国のプロトコールで陽性率がかなり向上し、その原因は、細胞の違いというよりも、試験条件の違いによるものであることがわかった (Fig. 3) (Sofuni et al., 1986)。近年、OECD あるいは ICH などによって、毒性試験法ガイドラインの見直しが行われ、プロトコールに関する国際間での調和が叫ばれるようになったのも、上記のような共同研究の一つの産物であるといつてもよいかも知れない。

Table 3 Chromosomal aberration test *in vitro* combined with S9mix.

Carcinogenic compounds	Cell suspension method ^{a)}		Monolayer method ^{b)}	
	Dose(mg/ml)%	Aberrants	Dose(mg/ml)%	Aberrants
Benzo(a)pyrene (B(a)P)	0.5	22.0	0.04	47.6
3-Methylcholanthrene (3 MC)	2.0	3.0	0.08	12.3
Dimethylnitrosamine (DMN)	4.0	77.3	1.0	73.3
7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)	0.5	25.0	0.1	60.6
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'Me-DAB)	8.0	10.0	0.05	25.6
Phenacetin	3.2	51.0	0.8	23.3

a) Cultures were treated for 3 hours with rat S9 mix in a cell suspension, shaking gently.

b) Cultures were treated for 6 hours with rat S9 mix directly on the monolayer.

5. 染色体試験実験条件の吟味

1) 最高濃度の設定

In vitro の試験は、生体と異なり、いくらでも濃度を上げることができる。しかし、著者らは、培養液中の浸透圧の影響を考慮し、被験物質が水溶性の場合は、最高 10 mM までとし、不溶の場合でも、細胞毒性が現れない場合には、5 mg/ml を限度とするべきことを提唱した。砂糖や塩でも 100 mM も作用させると染色体異常(主に切断型の構造異常)を誘発するが、細胞にとってこのような非生理的な条件で試験を行うこと自体に問題がある (Fig. 4)。このことは、国際的にも受け入れられるようになつた (Scott et al., 1990)。

2) 代謝活性化法の吟味

培養株細胞には多少の薬物活性化能力を維持しているものもあるが、CHL/IU あるいは CHO 細胞では、Ames 試験の場合と同様、ラット S9 の添加が必要である (Natarajan et al., 1976; Matsuoka et al., 1979)。著者らは、Natarajan の手法を改良し、細胞を単層培養のまま、約 5 % の S9 mix を 6 時間作用させる方法を提唱した。この方法によると、代謝活性化を要する既知発がん性物質の多くは、より低濃度で、より高い効果を示すことがわかつた (Table 3) (松岡ら, 1982)。

3) 染色体異常の判定

染色体異常は、構造的異常と数的異常に大別される。化学物質は多くの場合、DNA 合成の前の時期に作用して、染色分体型の異常を誘発する。本学会の MMS 分科会では、染色体異常の基準となるアトラスを編集し、異常の種類とその発生機構について解説を加えた (MMS 分科会編, 1985)。特に、ギャップの定義については、必ずしも、国際的な基準に沿っていないため、近年の国際的調和の要望に従い、将来訂正せざるを得ないと思われる。

試験結果の陽性の判定については、10 % 法 (石館法) (石館ら, 1987) を提唱した。背景データを基に、10 % 以上の異常細胞が出現した場合を陽性とし、5 % 以下を陰性、その間を疑陽性とした。観察細胞数が 100~200 個であり、培養条件によって対照値が左右される可能性もある。

るため、統計学的な有意差によって判定を下すよりも、経験を積んだ観察者による生物学的判定による方が正しい場合もある。また、生物現象には、ついに、疑陽性が存在する。これを無理に陰性、あるいは陽性と決めつけることにも問題があるようと思える。

6. 変異原性試験結果の定量的評価

米国では、変異原性のデータを定性的にのみ評価し定量的に取り扱うことに抵抗があるようである。その理由は、試験法の違いや担当者によって、かなりデータがばらつくためであるという。しかしながら、わが国では、Ames 試験など、学会の分科会を通して試験条件の精度管理が行われており、同じ手法で、同じ土俵の上でデータを比較し得る体制にある。したがって実際に、労働省の調査会では、試験結果についての定量的な評価を行っている。

著者らは、染色体異常試験の結果を定量的に評価するため、D₂₀ 値および TR 値という概念を提唱した。すなわち、前者は、中期分裂像の 20 % に何らかの異常を誘発するに要する濃度 (mg/ml) であり、後者は、特に交換型の異常の相対的な出現頻度を示す。発がん性のある 4-NQO の D₂₀ 値は 0.0003 である、TR 値は 30,000 であるが、活性の弱い Isoniazid では、D₂₀ 値が 2.1 で、TR 値はわずかの 4.3 である。これらをともに陽性であると一括して評価すべきではないように思われる (石館ら, 1987)。

これまでに試験を行い、陽性となった化合物約 150 種類について、D₂₀ 値の分布を Fig. 5 に示す。グラフ上の線は、D₂₀ 値にある化合物の中で発がん性物質がどの位含まれているかを示しており、D₂₀ 値の低い、すなわち、活性の高いグループに属するものの中には、発がん性が疑われるものがより多く含まれていることを示唆している。一方、同じように、TR 値の分布をみると、この値が高いグループに発がん性物質がより多く含まれている傾向にある (Fig. 6)。

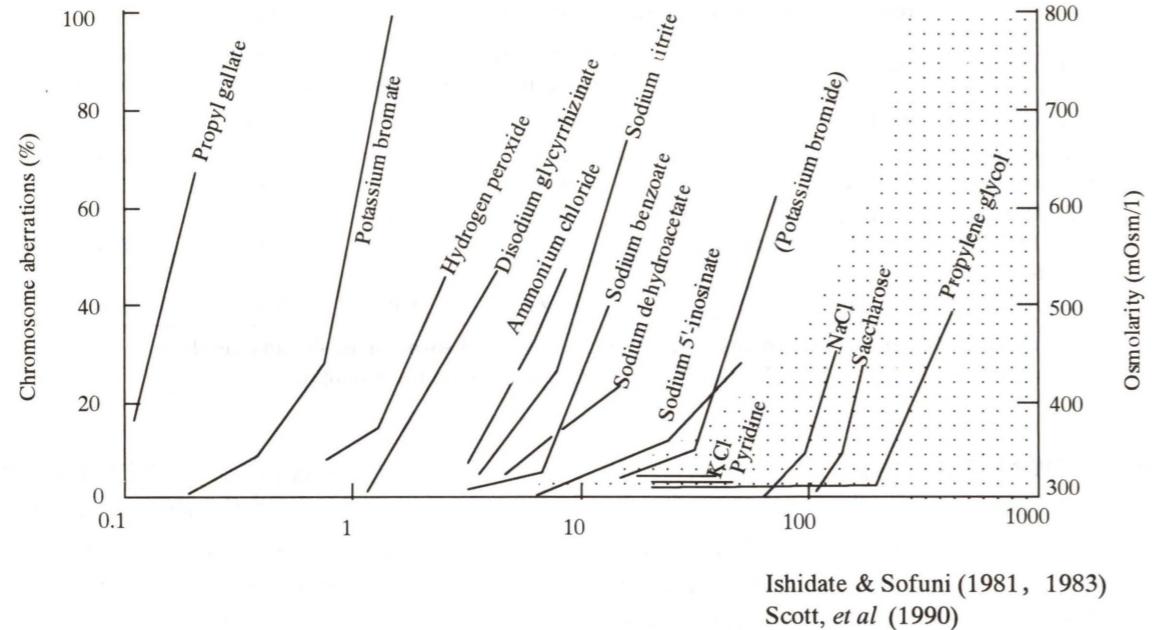


Fig. 4 False positive results in the chromosomal aberration tests in the culture medium with a high osmolarity.

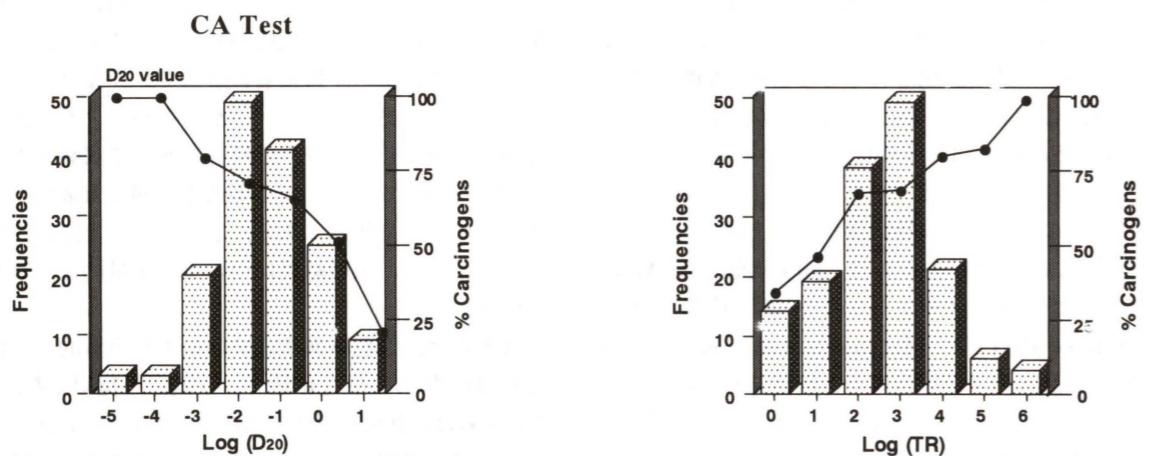


Fig. 5 Distribution of D_{20} values of the clastogens positive in the CHL test. The line indicates the percent incidence of carcinogens in each range of the D_{20} values.

Fig. 6 Distribution of TR values of the clastogens positive in the CHL test. The line indicates the percent incidence of carcinogens in each range of the TR values.

7. 染色体異常の生成機構

化合物の種類によって、染色体の切断を多く誘発するもの、交換型を多く誘発するもの、および、これらの構造異常を誘発しないが、倍数体などの数的異常を多く誘発するものがある。もちろん、これらのものが同時に出現してくる場合もある。たとえば、食品加熱変異原として知られている Me-A α C の 0.06 mg/ml を CHL/IU 細胞に 48 時間連続的に処理すると、50 %以上の倍数体が出現する。しかし、ラット S 9 mix を併用し、短時間処理すると、0.125 以上の濃度で、構造異常が出現してくる。代謝産物の作用機序が全く異なることを示す良い例である。

染色体の構造異常の生成機構の詳細については、なお不明な点があるが、著者らは、最初の分裂期に切断あるいは交換型を生ずる場合とがあるが、第 2 回目の分裂で、交換型が起こり、さらに、異常を伴った倍数体が形成され、生き延びた細胞が、変異細胞として、新しい細胞集団を形成してくるという仮説を立てている (Fig. 7)。現在、この問題について、FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) を用いる染色体ペイント法による解析を試みている (佐藤ら, 1996)。

細胞に紫外線を照射すると、典型的な交換型異常が多発する。化学物質や X 線の場合とはかなり様相が異なっているが、染色体の融合あるいは相互転位の解析に良い

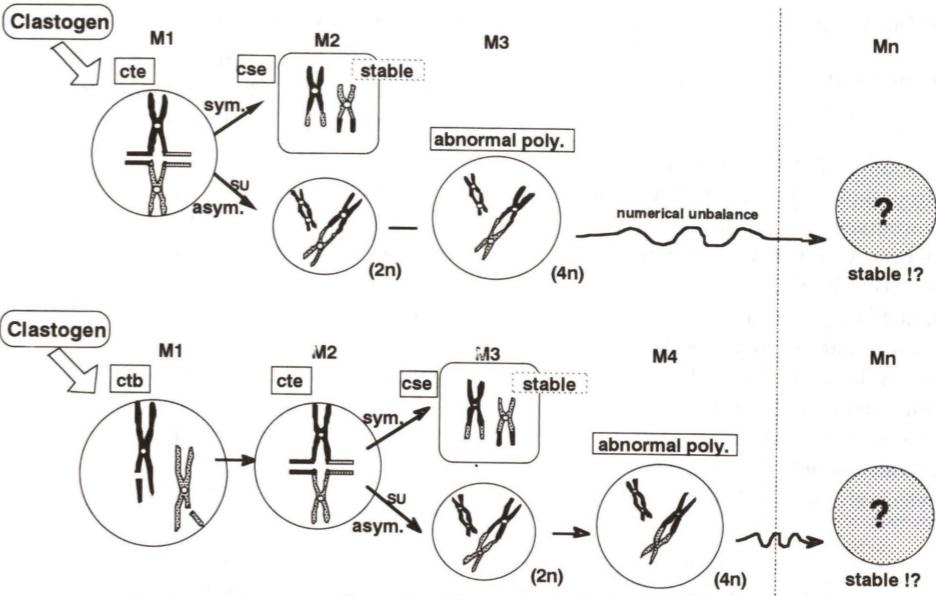


Fig. 7 A possible scheme to induce stable or unstable type of structural aberrations induced by clastogens in cultured cells.

材料と思われる。

数的異常については、異数体が種々の遺伝病に関係している事実から、今後も重要な課題と思われる。しかし、発がん性との関連性についてはいまだに不明であるため、現行の試験法ガイドラインではその評価を避けている感もある。おそらく、将来、異数性を目的とする別の試験法が作成されると思われる。ただし、著者らは、発がん性の知られる合成女性ホルモン剤 diethylstilbestrol (DES) が 0.01 mg/ml の低濃度で、85 %の細胞に倍数性を誘発する性質があることを見出出した (Sawada et al., 1978)。

8. マウス小核試験の導入

従来、変異原性試験のうち、生体内における影響を評価するためには、主に、ラットの骨髄を用いる染色体異常試験が起用されてきた。Schmid らは、これらの代りに、骨髄中の小核を持つ幼若赤血球 (PCE) の出現率を求める小核試験を提唱した (Schmid et al., 1975)。また一方、イスでは、環境変異原に対して高い感受性を示す MS/Ae マウス (CD-1 系由来) が開発されていた。著者らは、早速このマウス入手し、わが国における SPF 化をはかるとともに、小核試験の有用性について確証試験を実施した (林ら, 1984)。本試験は、前記した *in vitro* の試験系で、陽性となった場合、生体内でも同様な効果があるか否かを吟味するうえで、きわめて重要な試験である。小核は、血芽球の分化増殖中に生じた染色体の切断あるいは不分離によって PCE 中に形成される。

結果が陰性の場合には、被験物質が骨髄に到達していることを実証する必要がある。諸外国では、肝臓その他の

臓器を用いる試験法(たとえば、不定期 DNA 合成試験など)を追加することを推奨している。あるいは、肝臓を用いる小核試験なども有効かも知れない。

本学会の分科会 MMS 研究会では、骨髄あるいは末梢血を用いる小核試験法のプロトコールについて精力的な共同研究を繰り広げてきた。これらの業績は国際的にも高く評価され、現行の試験法ガイドラインにも広く反映されている (Sutou et al., 1997)。

合計 119 種の化合物について小核試験を行った結果と、*in vitro* の染色体異常試験の結果とを比較すると、両者で陽性となるものが約 31 %、両者でともに陰性となるものが約 20 %、染色体異常試験だけが陽性となるものが約 44 %であった。染色体異常試験で陰性であり、小核試験で陽性となるような化合物はほとんど見受けられないのは、小核の生成が染色体の異常に起因するためであろう。これらの結果を定量的に比較すると、染色体異常誘発性が強い場合、すなわち、 D_{20} 値が低いほど、本法で陽性となる傾向にある (Table 4)。生体内における臓器特異性あるいは代謝機構の多様性を考慮すれば、*in vitro* 系で陽性であっても、*in vivo* 系で陽性となるとは限らない。

9. 試験法のバッテリーによる結果の評価

被験物質に変異原性があるか否かは、まず、第一段階として、遺伝学的に指標を異にする 2 種以上の *in vitro* 系の試験を行う。ここで、いずれかの試験で陽性となつたものは、“*in vitro* mutagens” と呼ばれる。“*in vitro* mutagens” は必ずしも “*in vivo* mutagens” とは限らないため、少なくとも 1 種類の生体内の試験を追加する。

Table 4 Specific clastogenic activity *in vitro* (D_{20} value) and the micronucleus test in mice.

Compounds tested [CAS No.]	Clastogenic activity D_{20} value (mg/ml)	Micronucleus test in mice The minimum effective dose (mg/kg, single, i. p.)
Mitomycin C (MMC) [50-07-7]	0.00001	3 (+)
4-Nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) [56-57-5]	0.0003	80 (+)
5-Fluorouracil (5-FU) [51-21-8]	0.0004	100 (+)
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (MNNG) [70-25-7]	0.003	50 (+)
Acetaldehyde [75-07-0]	0.03	190 (+)
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea [759-73-9]	0.06	50 (+)
Potassium bromate [7758-01-2]	0.07	100 (+)
Sodium nitrite [7632-00-0]	0.3	200 (-)
Fast Green FCF [2353-45-9]	2.0	2000 (-)
Potassium bromide [7758-02-3]	3.7	500 (-)
Propylene glycol [57-55-6]	20.0	15000 (-)

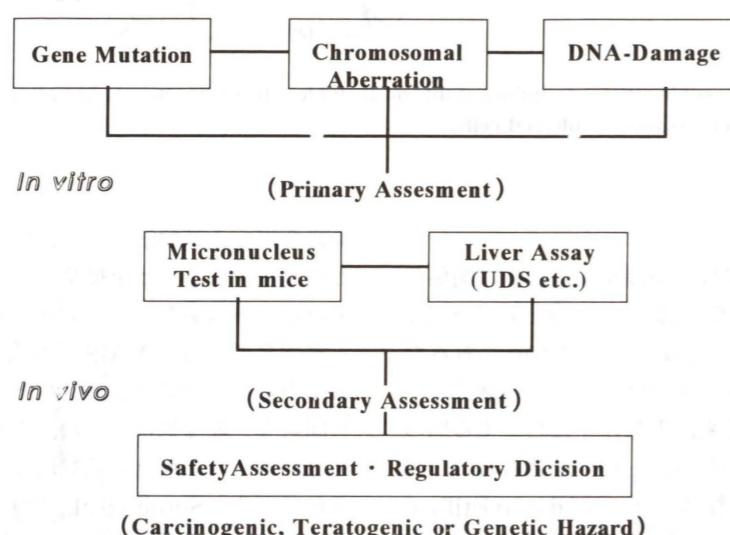


Fig. 8 A battery scheme for the evaluation of genotoxic potency of chemicals.

これらの試験は最少単位のバッテリーであるが、試験の数を増す方が、より確実な情報が得られる。もしも、これらのすべての試験で陰性に終わったものは、変異原性がなく、また、発がん性の疑いもきわめて低いといえよう。*in vitro* 系で陽性となった場合には、その活性値を比較し、さらに *in vivo* 試験を追加する。*in vivo* 系でも陽性となった場合には、発がん性および遺伝毒性を疑う必要があろう。

しかしながら、変異原性試験はいずれもきわめて短期間に生ずる遺伝学的変化であるため、多くの要因が長期間にわたって関与する発がん性試験を代行するわけには行かないのは当然である。ヒトへの安全性を確認するためには、さらに、高次の動物試験が必要である (Fig. 8)。ただし、最近、発がん性の有無あるいはその機構を解析するうえで、変異原性試験のデータが改めて重要視されつつある。

10. 変異原性データ集の作成

現在、化学工業界で使用されている化学物質の総数は数万種に及び、毎年、新しく数千種類の物質が市場に登場するといわれる。既存物質の変異原性については、専門誌に報告されてはいるが、それを検索することは必ずしも容易ではない。そこで、著者らは、故賀田恒夫博士らと共同して、「環境変異原データ集」の作成を試みた(賀田・石館監修, 1981)。約1000種類の専門誌から、1708種の化合物の変異原性情報を抽出した。パソコンの普及していない時代であり、約2年間を要したため、第1巻で終了せざるを得なかった。

同一のプロトコールを用い、構造の異なる化合物の活性を比較することはきわめて重要と思われる。著者らは、さらに、「染色体異常試験のデータ集」を編集し、781種の物質に関する情報を公開した(石館監修, 1987)。また、305種類の化合物に関する「微生物を用いる変異原性試験データ集」を出版した(石館監修, 1990)。特に、後

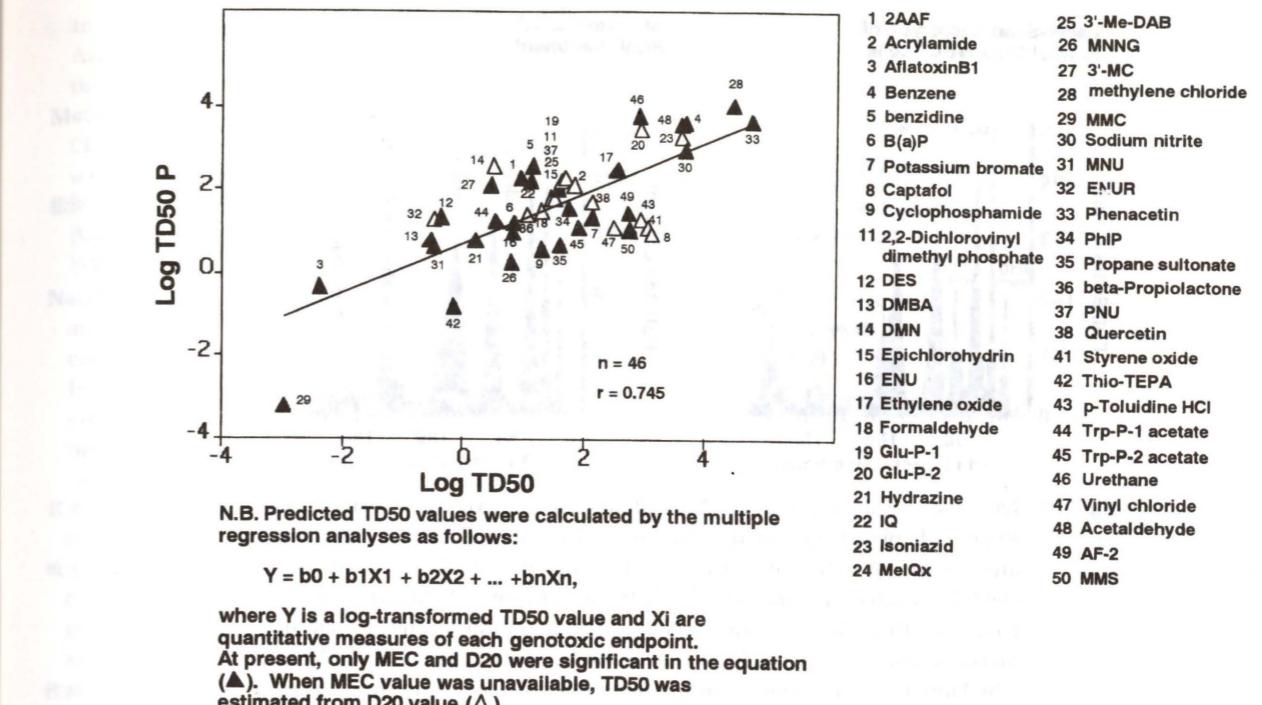


Fig. 9 A trial to predict carcinogenic potentials from the genotoxic data quantitatively evaluated in the battery system. TD₅₀ values were cited from the US/NTP data of animal bioassays. TD₅₀ P means the predictive TD₅₀ value calculated.

者のデータ集には、能美および渡辺らによって新しく開発された高感受性菌株(YG株)を用いたデータも記載されている。YG株は、遺伝子操作によって、ニトロ還元酵素あるいはアセチルトランスフェラーゼ遺伝子が組み込まれているために、環境中に微量に存在するニトロアレン類あるいはヘテロサイクリックアミン類の検出にきわめて有用であり、国内外で広く利用されている(渡辺ら, 1987)。

11. 変異原活性による発がん性の予測

変異原性試験は、当初、発がん性物質の短期スクリーニング法としての役割を演じてきた。そのためには、発がん性の疑わしい物質を逃さず拾い上げることが肝要である。換言すれば、偽陽性は許されても偽陰性は許されない。しかしながら、ホルモン類やプロモーターの範疇に入るものは変異原性試験では検出できない。現在、いわゆる“non-genotoxic carcinogens”とよばれる発がん性物質は現行の変異原性試験の対象とはなりにくい。最終的には遺伝物質の損傷によって細胞の変異につながる問題と思われるが、その機構の解明は今後の問題であろう。

一方、変異原性のあるものについて、その活性値から、発がん性を予測できないものであろうか。最近、著者らは、(財)日本化学品協会(通産省の依頼による)の研究班に加わり、上記問題に取り組んでいる。まず、米国

NTPのデータから、適切な発がん性物質を選び、それについて、複数の変異原性試験で得られた活性値の総和から発がん性の強さ(TD₅₀ 値)の予測値を算出した(Fig. 9)。これによると、実際の動物試験による TD₅₀ 値と予測値との間に予想以上の相関がみられた。今後、化合物の種類を増やし、TD₅₀ のみならず、用量の信頼限界を考慮した LED₁₀ との相関性もみたいと考えている。

12. その他の活動

上記の試験法およびその結果の定性的ならびに定量的評価に関する研究のほか、特記すべき研究業績を下記に示す。誌面の都合上、その詳細については割愛する。

- 1) ガス状物質の染色体異常試験法の開発 (環境庁関連)
- 2) 水道水中の有機化合物の変異原性 (厚生省関連)
- 3) 照射食品成分の変異原性 (厚生省関連)
- 4) 食品添加物の変異原性 (厚生省関連)
- 5) *In vitro* 小核試験法の開発 (労働省関連)
- 6) 細胞バンクの運営および細胞品質管理 (厚生省関連)
- 7) 本学会第10回大会(東京)の開催
- 8) IARC/WHO, FAO/WHO, IPCS/WHO, OECD, および日米医学協力, ICPEMCなどの国際協力
- 9) 本学会誌「環境変異原研究」の編集

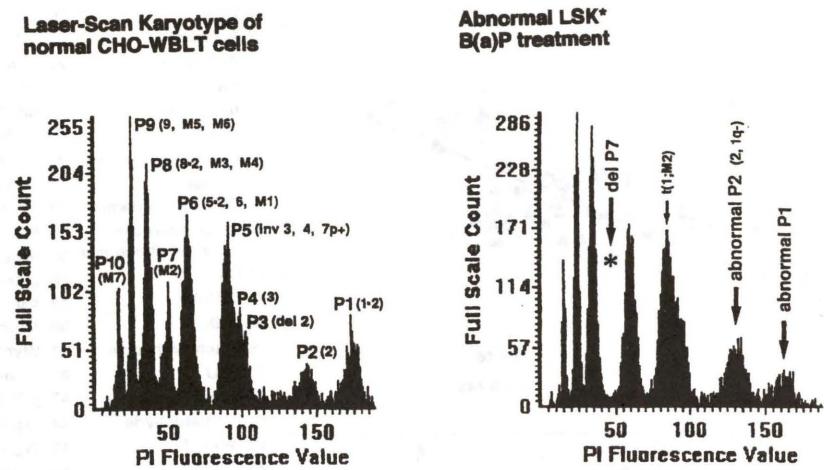


Fig. 10 Laser-Scan Karyotypes. Left: Normal pattern of karyotype of CHO cells. Right: Abnormal pattern detected in a CHO variant subclone isolated after treatment with benzo(a)pyrene. P: The Peak of DNA absorption; Del P7: A deletion of the Peak No. 7. It was confirmed by the Q-banding technique that the long arm of No. 2 (2q) was translocated to one of marker chromosomes, No. 15. A conversion between Peak No. 1 and No. 2 (the largest 2 chromosome) was also noted in this Laser-Scan Karyotype.

10) Mutation Res. 誌 Review の編集

13. 染色体異常解析技術の開発

近年、染色体の異常の検出には、従来の形態学的観察の検出に加え、種々の分子生物学的手法を取り入れられるようになった。著者らは、染色体のFISH法あるいは、その応用であるComparative Genomic Hybridization(CGH)法を導入し、発がん性物質によって誘発される染色体あるいはゲノムの異常の解析を行っている。現在までのところ、化学物質の種類によって特異的な異常は見出されていないが、チャイニーズ・ハムスターの株化細胞(CHO, CHL/IU, V79など)間では、X染色体の長腕部が共通して欠損していることを確認している。

また、Laser-Scanning Cytometry(LSC)を用い、細胞周期の解析あるいはLaser-Scan Karyotype(LSK核型)による染色体異常の検出法を確立した(Fig. 10)。後者では、従来のFlow Cytometryと原理は同じであるが、いわゆる“Re-call System”的機能によって、顕微鏡下で、観察した個々の細胞を再度確認できるという利点がある(佐藤ら, 1997)。

14. おわりに

変異原性試験は、単に、発がん性の予測ばかりではなく、われわれの子孫に伝わる本来の遺伝毒性を予測し得るものでなければならない。今後、試験の結果を安易に評価することなく、その機構についてさらに解明していく必要があろう。

本稿は、本学会の学術賞受賞講演の内容を紹介したものである。過去約25年間の研究業績の集約であるため、

In : R. Montesano et al., (Eds), Molecular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening Test, Lyon, IARC Scientific Publications, No. 27, pp. 323-330.

Matsuoka, A., M. Hayashi, and M. Ishidate, Jr. (1979) Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S 9 mix *in vitro*, Mutat. Res., 66, 277-290.

松岡厚子、祖父尼俊雄、石館 基(1982) 染色体異常試験における代謝活性化法について…振盪法と静置法の比較、第11回日本環境変異原学会。

Natarajan, A. T., A. D. Tates, P. P. W. van Buul, M. Meijers and N. Vogel (1976) Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system *in vitro*. I. Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchange by diethylnitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of Rat-liver microsomes. Mutat. Res., 37, 83-90.

日本環境変異原学会・MMS 分科会編(1988) 化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店、東京。

坂本宙子、坂本 優、佐藤卓朋、石館 基(1996) CGH(Comparative Genomic Hybridization)法を用いたチャイニーズ・ハムスター由来培養細胞株の分子細胞遺伝学的解析、第25回日本環境変異原学会。

佐藤卓朋、山本清高、坂本宙子、三浦邦彦、石館 基(1996) SCDSとChromosome Paintingの併用による安定型構造異常の解

析、第25回日本環境変異原学会。

佐藤卓朋、山本清高、佐々木功典、石館 基(1996) Laser-Scan Karyotypingによる染色体変異の解析、Cytometry Res., 6, 5-8.

Sawada, M., and M. Ishidate, Jr. (1978) Colchicine-like effect of diethylstilbestrol (DES) on mammalian cells *in vitro*, Mutat. Res., 57, 175-182.

Schmid, W. (1975) The micronucleus test, Mutat. Res., 31, 9-15.

Scott, D., S. M. Galloway, R. R. Marshall, M. Ishidate, Jr., D. Brusick, J. Ashby and B. C. Myhr (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions, A Report from ICPEMC Task Group 9, Mutat. Res., 257, 147-205.

Sofuni, T., A. Matsuoka, M. Sawada, M. Ishidate, Jr., E. Zeiger and M. D. Shelby (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHO and CHL) systems in culture. Mutat. Res., 241, 175-213.

Sutou, S. (1996) Achievements by CSGMT/JEMS/MMS: the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test in the Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environment Mutagen Society of Japan, Mutat. Res., 340, 151-174.

能健彦(1993) 環境変異原検出系・評価系の開発、環境変異原研究, 15, 203-212.

参考文献

- Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B. H. Margolin, B. E. Matter and M. D. Shelby (1985) Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Report of the IPCS on Chemical Safety's Collaborative Study on *In Vitro* Assays, Progress in Mutat. Res., 5, Elsevier.
賀田恒夫・石館 基(監修)(1981) 環境変異原データ集(1), サイエンティスト社, 東京.
Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1982) High-sensitive in micronucleus induction of a mouse strain (MS), Mutat. Res., 105, 253-256.
Ishidate, M. Jr. and S. Odashima (1977) Chromosome tests with ¹³⁴I compounds on Chinese hamster cells *in vitro* a screening for chemical carcinogens, Mutat. Res., 48, 337-354.
Ishidate, M., Jr., M. C. Harnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, Mutat. Res., 195, 151-213.
石館 基(監修)(1987) 染色体異常試験データ集, LIC, 東京.
石館 基(監修)(1990) 微生物を用いる変異原性データ集, L. I. C., 東京.
Kawachi, T., T. Yahagi, T. Kada, Y. Tajima, M. Ishidate, Jr., M. Sasaki and T. Sugiyama (1980) Cooperative programme on short-term assays for carcinogenicity in Japan.

本稿は1997年12月3-5日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第26回大会で発表された1997年度研究奨励賞講演である(座長:祖父尼俊雄)。

ニトロアレーンの構造・変異活性相関およびヒト暴露の実態

世良暢之

福岡県保健環境研究所 〒818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野39

Structure-activity relationship between mutagenicity and NO₂ substitution of nitroarenes, and the presence of mutagens/carcinogens in excised lung cancer specimens from Japan and China

Nobuyuki Sera

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences
39 Mukaezano, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-0135, Japan

Summary

Nitrobenzo[a]pyrenes (NBPs) and related nitroazabenzo[a]pyrenes (NABPs) are extraordinarily mutagenic to *Salmonella typhimurium*. 3-Nitro-6-azabenzo[a]pyrene-N-oxide is especially mutagenic and the NABP was found to be a more potent mutagen than 1,8-dinitropyrene. Mutagenicity of NBPs and NABPs was associated with the position of substitution of the nitro function when NO₂ was substituted at the third position on the BP and ABP structure. The mutagenicity of 22 nitrophenanthrenes and 19 nitroazaphenanthrenes was investigated, and these mutagens were activated by O-acetyltransferase esterification following nitroreductase and so were active against TA100 rather than TA98. Mutagenic nitropyrenes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were detected in resected lung specimens of Japanese lung cancer patients living in Fukuoka, and in lung specimens of Chinese patients who were living in areas of high risk for developing lung cancer in China.

(This paper, chaired by Toshio Sofuni, is the lecture of The JEMS Achievement Award (1997) presented at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords: nitrobenzo[a]pyrene, nitroazabenzo[a]pyrene, mutagenicity, lung cancer

緒言

今日、ヒトは常に多くの環境汚染物質に暴露されている。これら汚染物質の中には変異原物質や発がん物質が含まれているが、変異原性や発がん性を動物実験により確認するには膨大な費用と時間が必要である。しかし近年、特定の菌株、細胞および動物を使用してその染色体

受付: 1997年12月22日

受理: 1998年2月16日

©日本環境変異原学会

上に生じた突然変異を測定することにより変異原物質を短期間に検索する方法が開発され(Ames et al., 1975; Maron and Ames, 1983), ヒトを取りまく環境から種々の変異原物質が検出されている。汚染物質の中でも特に大気浮遊粒子状物質は肺がんとの関連で注目されている。しかも大気汚染の内容は産業構造ならびに生活様式の変遷とともに年々変化しており、その汚染度は、たとえば工場煙突からのばい煙は以前に比べて軽減しているのに対し、自動車の排気ガス汚染は自動車台数の増加、なかでも粒子状物質を多量に排出するディーゼル自動車台数の急増に伴って高まってきている。

従来、これらを汚染源とする変異原物質についてはベンツピレン等の多環性芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) を中心に詳細な検討が行われてきたが、そのほかジニトロピレンなどの多環性芳香族炭化水素のニトロ誘導体 (ニトロアレーン) についても変異原性、環境中の分布、生体内での代謝経路および発がん性などについて多くの報告がある。しかし、それ以外のニトロアレーンならびにその関連化合物である含窒素多環性芳香族炭化水素のニトロ誘導体 (ニトロアザアレーン) については、ほとんど研究されていない。そこで、強い遺伝毒性が予想されるベンツピレンのジニトロ誘導体 (Fukuhara et al., 1990; Sera et al., 1991), アザベンツピレン (Fukuhara et al., 1992; Sera et al., 1992; 1994), フェナンスレンおよびアザフェナンスレンのニトロ誘導体 (Sera et al., 1996) について、変異原性、環境中の挙動を中心に検討した。さらに変異原性、発がん性を示す環境汚染物質についてヒトへの影響を直接検討するため、肺がん患者の摘出肺組織中に残存しているPAHおよびニトロアレーンを定量し (Nakanishi et al., 1997; Tokiwa et al., 1993; 1994), 環境汚染物質と肺がん誘発との因果関係について考察を行った。

1. ニトロアレーンの構造・変異活性相関

Benzo[a]pyrene (BP) のニトロ誘導体については従来から 1-, 3- および 6-nitrobenzo[a]pyrene (NBP) について変異原性および発がん性等の報告があるが、いずれも遺伝毒性が弱いことから、BP のジニトロ誘導体である 1,6- および 3,6-dinitrobenzo[a]pyrene (diNBP) を合成し、その変異原性、環境中の挙動、還元的代謝および発がん性等について検討した。

1) 1,6- および 3,6-diNBP の変異原性

Fig. 1 に 1,6- および 3,6-diNBP およびその関連化合物の構造を示した。

Table 1 に、新規変異原物質の *S. typhimurium* TA 98, TA 98 NR, TA 98/1,8-DNP₆, YG 1021 および YG 1024 株に対する S9 mix 非存在下での変異原性の結果を示した。3,6-diNBP は TA 98 株に対して 400 rev./ng (100 %) の変異原性を示し、ニトロ還元酵素欠損株である TA 98 NR 株では 256 rev./ng (64 %), アセチル転移酵素欠損株である TA 98/1,8-DNP₆ 株では 3.8 rev./ng (0.95 %) を示した。TA 98 株にニトロ還元酵素産生遺伝子を導入した YG 1021 株では 240 rev./ng (60 %) の変異原性を示し、アセチル転移酵素産生遺伝子を導入した YG 1024 株では 4,800 rev./ng (1,200 %) に増強された。また、TA 98 株に対する S9 mix 存在下での変異原性は 3.8 rev./ng, TA 100 株に対する S9 mix 非存在下および存在下での変異原性は 66 および 3.5 rev./ng であった。これらの結果から、3,6-diNBP は、ニトロ還元酵素

よりもアセチル転移酵素によって活性化されるフレームシフト型の直接型変異原物質であることを明らかにした。

2) 1,6- および 3,6-diNBP の環境中濃度

大気浮遊粒子状物質は、ハイポリュームエアサンプラーを用いてテフロン被膜纖維濾紙に採取した。採取時の大気中の二酸化窒素濃度は平均 26 ppb であった。大気浮遊粒子状物質はジクロロメタンで超音波抽出し、脱水濾過後、減圧濃縮し、液一液分配操作で中性画分を分別し、中性画分はさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC で分画精製した後、GC-MS ならびに MS で分析した。

同定した 3,6-diNBP の濃度は粒子状物質 1 gあたり、0.0017 (0.00013)-0.098 μg (0.0017 ng/m³) であった。他の PAH の濃度は粒子状物質 1 g あたり、pyrene が 0.62 (0.057)-47.2 μg (9.2 ng/m³), fluoranthene が 6.8 (1.2)-134.4 μg (32.1 ng/m³), BP が 0.31 (0.055)-31.9 μg (5.4 ng/m³), 9-fluorenone が 0.39 (0.069)-19.5 μg (3.6 ng/m³), phenanthrene が 0.93 (0.16)-25.3 μg (5.0 ng/m³), benzo[a]anthracene が 0.99 (0.24)-1.37 μg (0.23 ng/m³), chrysene が 1.05 (0.25)-1.97 μg (0.33 ng/m³), perylene が 0.62 (0.057)-2.72 μg (0.46 ng/m³) および benzo[ghi]perylene が 2.3 (0.41)-126.2 μg (25.4 ng/m³) であった。ニトロアレーンの濃度は粒子状物質 1 g あたり、1-nitropypyrene (NP) が 0.13 (0.0097)-0.58 μg (0.14 ng/m³), 1,3-diNP が 0.014 (0.0013)-0.021 μg (0.0016 ng/m³), 1,6-diNP が 0.011 (0.001)-0.023 μg (0.017 ng/m³), 1,8-diNP が 0.018 (0.0017)-0.074 μg (0.013 ng/m³), 3-nitrofluoranthene (NF) が 0.17 (0.013)-0.98 μg (0.23 ng/m³), 3,7-diNF が 0.011 (0.0011)-0.102 μg (0.024 ng/m³), 3,9-diNF が 0.011 (0.0011)-0.098 μg (0.023 ng/m³) であった。

大気浮遊粒子状物質中の主要な直接型変異原物質は、1,3-, 1,6- および 1,8-diNP, 3,7- および 3,9-diNF, 3,6-diNBP 等のニトロアレーンである。しかしその変異原性への寄与率は 15 %程度であり、まだまだ多くの変異原物質を見逃していると考えられる。この汚染源としては各種工場からのばい煙、ディーゼルおよびガソリン自動車からの排気ガス等による排出源が多いことに加え、大気中の二次的な生成も考えられる。

3) 1,6- および 3,6-diNBP の *in vitro* での還元的代謝

酵素反応液は、50 mM ナトリウムリシン酸緩衝液 (pH 7.4) 1 mL 中に、0.02 μmol の 1,6- または 3,6-diNBP, 1- または 3-NBP, 1 μmol の EDTA, 1 μmol の NADPH または NADH, 蛋白量 1 mg/mL に調整した細胞質上清画分から成る。反応は好気または嫌気的条件下で、37°C, 30 分間行った後、クロロホルム/メタノール

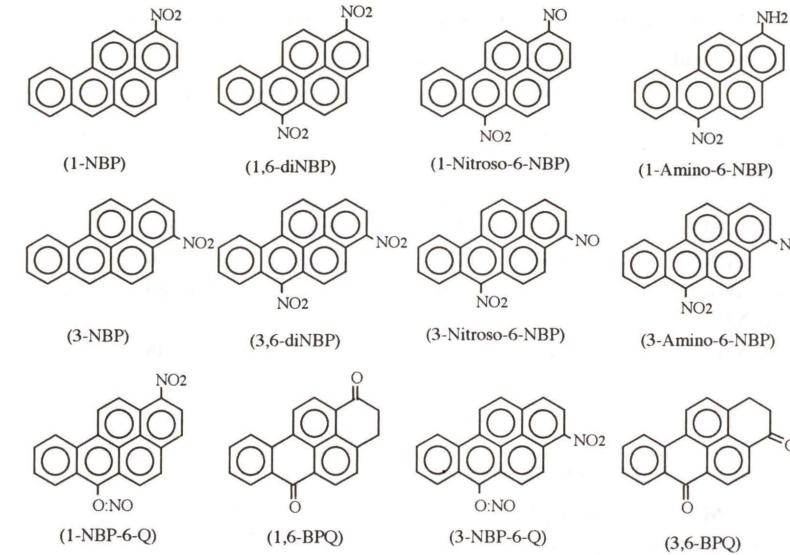


Fig. 1 Structure of nitrobenzo[a]pyrenes and its related compounds

Table 1 Mutagenicity of nitrobenzo[a]pyrene and its related compounds

Chemical	Mutagenicity (-S9 mix, rev./ng)				
	TA 98	TA 98 NR	TA 98/1,8-DNP ₆	YG 1021	YG 1024
1-NBP	2.2	0.4	2.3	118	63
3-NBP	4.6	0.8	38	109	22
1-Nitroso-BP	6.4	6.8	5.9	—	—
3-Nitroso-BP	20.6	18.9	21.7	—	—
1-Amino-BP	2.7	2.6	2.7	—	—
3-Amino-BP	12.8	11.8	12.2	—	—
1,6-diNBP	4.4	0.9	0.1	6	242
3,6-diNBP	400	256	3.8	240	4,800
1-Nitroso-6-NBP	0.5	0.1	0	—	—
3-Nitroso-6-NBP	0.2	56	0.95	—	—
1-Amino-6-NBP	0.16	0.11	0.15	0.15	4.7
3-Amino-6-NBP	1.9	1.2	1.7	0.77	16.1

(1:1, v/v) 2 mL を加えることによって反応を停止し、反応生成物はクロロホルム 2 mL で抽出し、減圧濃縮し、メタノール 1 mL に溶解した後、HPLC で定量を行った。1,6- および 3,6-diNBP が、細胞質上清画分による *in vitro* での還元的代謝により、1- および 3-nitroso-6-NBP を経て 1- および 3-amino-6-NBP へと代謝される還元速度を測定した。その結果、1,6-diNBP は、嫌気的条件下で補酵素 NADPH 添加によって 1-nitroso-6-NBP を 25±20, 1-amino-6-NBP を 58±19, 补酵素 NADH 添加によって 1-nitroso-6-NBP を 25±20, 1-amino-6-NBP を 46±7 pmol/mg protein/min 生成した。一方、3,6-diNBP は好気的条件下で NADPH 添加によって 3-nitroso-6-NBP を 89±15, 3-amino-6-NBP を 112±15, NADH 添加によって 3-nitroso-6-NBP を 143±11, 3-amino-6-NBP を 46±7 pmol/mg protein/min 生成した。同様に、嫌気的条件下で NADPH 添加によって 3-nitroso-6-NBP を 242±64, 3-amino-6-NBP を 847±102 pmol/mg protein/min, NADH 添加によ

って 3-nitroso-6-NBP を 100±11, 3-amino-6-NBP を 141±21 pmol/mg protein/min 生成した。これらの結果から、3,6-diNBP は嫌気的条件、NADPH 存在下できわめて還元されやすく、この還元のされやすさは 3,6-diNBP の遺伝毒性 (変異原性および発がん性) が 1,6-diNBP, 1- および 3-NBP よりも強いこととも関連しているものと思われた。

4) 1,6- および 3,6-diNBP のラットに対する発がん性

発がん実験には F 344/DuCrj 雄性ラットを使用した。1,6- および 3,6-diNBP, 陽性対照である BP はビーズワックス/トリカプリリンに溶解し、ラット 1 匹あたり 1,000, 200, 40 および 8 μg の濃度で、1- および 3-NBP は 2,000 μg の濃度で、溶媒対照群はビーズワックス/トリカプリリンのみを、ラット背部皮下に接種した。接種局所に皮下腫瘍が発生したラットは各臓器をパラフィン包埋ブロック (薄切, 4-7 μm) とし、ヘマトキシリジン・エオジン染色を行った。3,6-diNBP の 1,000 μg を接種

Table 2 Mutagenicity of nitroazabeno[a]pyrene and its related compounds

Chemical	Mutagenicity (-S9 mix, rev./ng)				
	TA 98	TA 98 NR	TA 98/1,8-DNP ₆	YG 1021	YG 1024
1-N-6-CBP	134	54	14	273	1,080
3-N-6-CBP	539	156	29	832	3,810
1-N-6-ABP	352	353	270	352	2,750
3-N-6-ABP	348	308	63	354	7,670
1-N-6-ABPO	115	123	47	106	1,930
3-N-6-ABPO	1,260	1,360	80	1,186	30,500
1,6-diNBP	4.4	0.9	0.1	6	242
3,6-diNBP	400	256	4	240	4,800

したラットの最初の皮下腫瘍の発生は接種後 24 週目に観察され、200 μg 接種群では 26 週目に、40 μg 接種群では 63 週目に、8 μg 接種群では 87 週目に 1 匹だけが皮下腫瘍を形成した。BP の 1,000 μg を接種したラットの最初の皮下腫瘍の発生は接種後 25 週目に観察され、200 μg 接種群では 26 週目に、40 μg 接種群では 32 週目に、8 μg 接種群では 61 週目に 2 匹が皮下腫瘍を形成した。皮下腫瘍の組織学的所見はいずれも悪性纖維性組織球腫であり、特徴的な唐草模様 (storiform pattern) を示した。3,6-diNBP および BP の皮下腫瘍発生頻度をプロビットモデルで統計的に解析すると、接種濃度と皮下腫瘍の発生頻度の間には濃度依存性があり、3,6-diNBP および BP の 50 % 腫瘍発生濃度 (TD₅₀) は 744 および 299 nmol/rat となり、3,6-diNBP のラットに対する発がん強度は BP よりも弱いことがわかった。

2. ニトロアザアレーンの構造・変異活性相関

azabeno[a]pyrene (ABP) のニトロ誘導体およびその関連化合物である 1- および 3-nitro-6-cyanobenzo[a]pyrene (N-6-CBP), 1- および 3-nitro-6-azabenzo[a]pyrene (N-6-ABP), 1- および 3-nitro-6-azabenzo[a]pyrene-N-oxide (N-6-ABPO) を合成し、その変異原性、環境中での挙動等について検討した。

1) nitro azabeno[a]pyrene およびその関連化合物の変異原性

Fig. 2 に nitro azabeno[a]pyrene およびその関連化合物の構造を示した。

Table 2 に、新規変異原物質の *S. typhimurium* TA 98, TA 98 NR, TA 98/1,8-DNP₆, YG 1021 および YG 1024 株に対する S 9 mix 非存在下での変異原性の結果を示した。1- および 3-N-6-CBP は TA 98 株に対して 134 および 539 rev./ng (100 %) と高い変異原性を示し、TA 98 NR 株では 54 (40.3) および 156 rev./ng (28.9 %) とあまり変異原性の低下が認められず、TA 98/1,8-DNP₆ 株で 14 (10.4) および 29 rev./ng (5.4 %) と変異原性が顕著に減少した。また YG 1021 株では 273 (203.7) およ

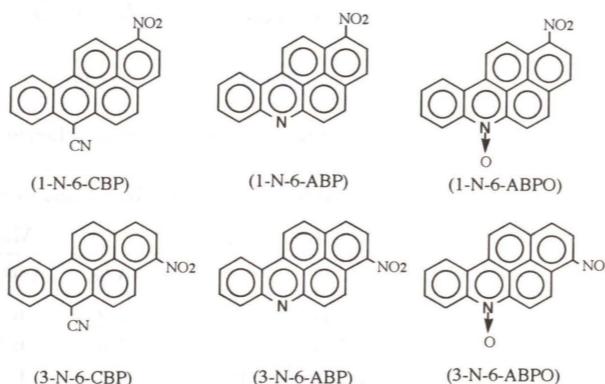


Fig. 2 Structure of nitroazabeno[a]pyrenes and its related compounds

び 832 rev./ng (154.4 %) と変異原性があまり増強されず、YG 1024 株で 1,080 (806.3) および 3,810 rev./ng (706.9 %) と変異原性が顕著に増強された。1- および 3-N-6-ABP は TA 98 株に対して 352 および 348 rev./ng (100 %) と高い変異原性を示し、TA 98 NR 株では 353 (100) および 308 rev./ng (88.5 %) とあまり変異原性が低下せず、TA 98/1,8-DNP₆ 株で 270 (76.7) および 63 rev./ng (18.1 %) と変異原性が顕著に減少した。YG 1021 株では 352 (100) および 354 rev./ng (101.7 %) と変異原性があまり増強されず、YG 1024 株で 2,750 (781.3) および 7,670 rev./ng (2,204 %) と変異原性が顕著に増強された。1- および 3-N-6-ABPO は TA 98 株に対して 115 および 1,260 rev./ng (100 %) と非常に高い変異原性を示し、TA 98 NR 株では 123 (107) および 1,360 rev./ng (107.9 %) とあまり変異原性が低下せず、TA 98/1,8-DNP₆ 株で 47 (40.9) および 80 rev./ng (6.3 %) と変異原性が顕著に減少した。YG 1021 株では 106 (92.2) および 1,186 rev./ng (94.1 %) と変異原性があまり増強されず、YG 1024 株で 1,930 (1,678.3) および 30,500 rev./ng (2,420.6 %) と変異原性が顕著に増強された。

新規変異原物質 1- および 3-N-6-CBP 等のニトロアザアレーン、1- および 3-N-6-ABP, 1- および 3-N-6-ABPO

Table 3 Mutagenicity of nitroarenes and nitroazaarenes

Chemical	Mutagenicity (-S9mix, rev./nmol)	
	TA 98	YG 1024
3-Nitro-6-azabenzo[a]pyrene-N-oxide	396,000	9,580,000
1,8-Dinitropyrene	296,000	6,190,000
3-Nitro-6-cyanobenzo[a]pyrene	174,000	1,230,000
3,6-Dinitrobenzo[a]pyrene	137,000	1,640,000
1,6-Dinitropyrene	126,000	4,120,000
3,7-Dinitrofluoranthene	123,000	6,600,000
1-Nitro-6-azabenzo[a]pyrene	105,000	820,000
3-Nitro-6-azabenzo[a]pyrene	104,000	2,290,000
3,9-Dinitrofluoranthene	104,000	1,910,000
1,3-Dinitropyrene	85,900	1,190,000
1-Nitro-6-cyanobenzo[a]pyrene	43,100	348,000
1-Nitro-6-azabenzo[a]pyrene-N-oxide	36,100	606,000
3-Nitrofluoranthene	4,670	57,000
1,6-Dinitrobenzo[a]pyrene	1,510	82,600
3-Nitrobenzo[a]pyrene	1,370	32,000
1-Nitrobenzo[a]pyrene	650	35,000
1-Nitropyrene	470	2,870

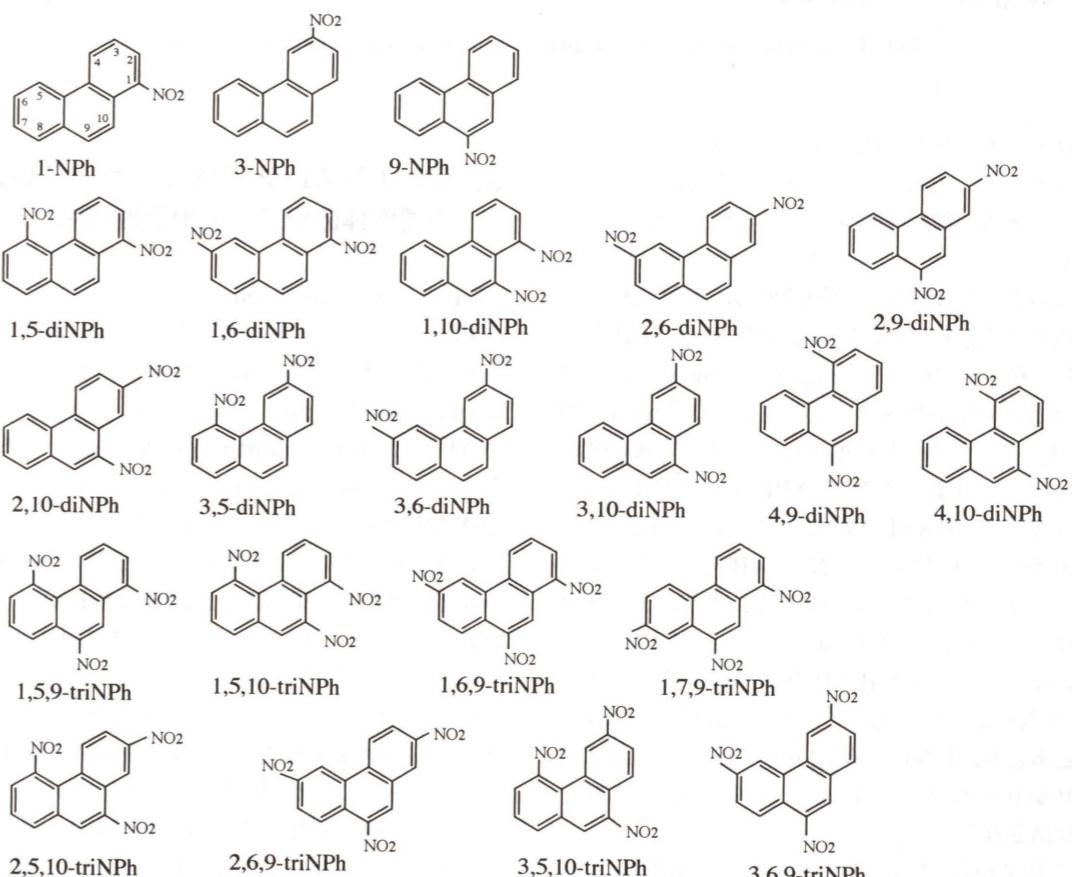


Fig. 3 Structure of polynitrophenanthrenes

等のニトロアザアレーンは非常に高い変異原性を示し、ニトロ還元酵素よりもアセチル転移酵素によって活性化されることが明らかになった。特に 3-N-6-ABPO は、現在知られているニトロアレーンおよびニトロアザアレーン等の直接型変異原物質の中でも最強であった (Table 3)。

2) nitro azabeno[a]pyrene およびその関連化合物の環境中濃度

1- および 3-N-6-CBP, 1- および 3-N-6-ABP, 1- および 3-N-6-ABPO 等の環境中濃度を明らかにするために、大気、その汚染源と考えられるディーゼルおよびガソリン自動車からの排気ガスについて検討した。その結

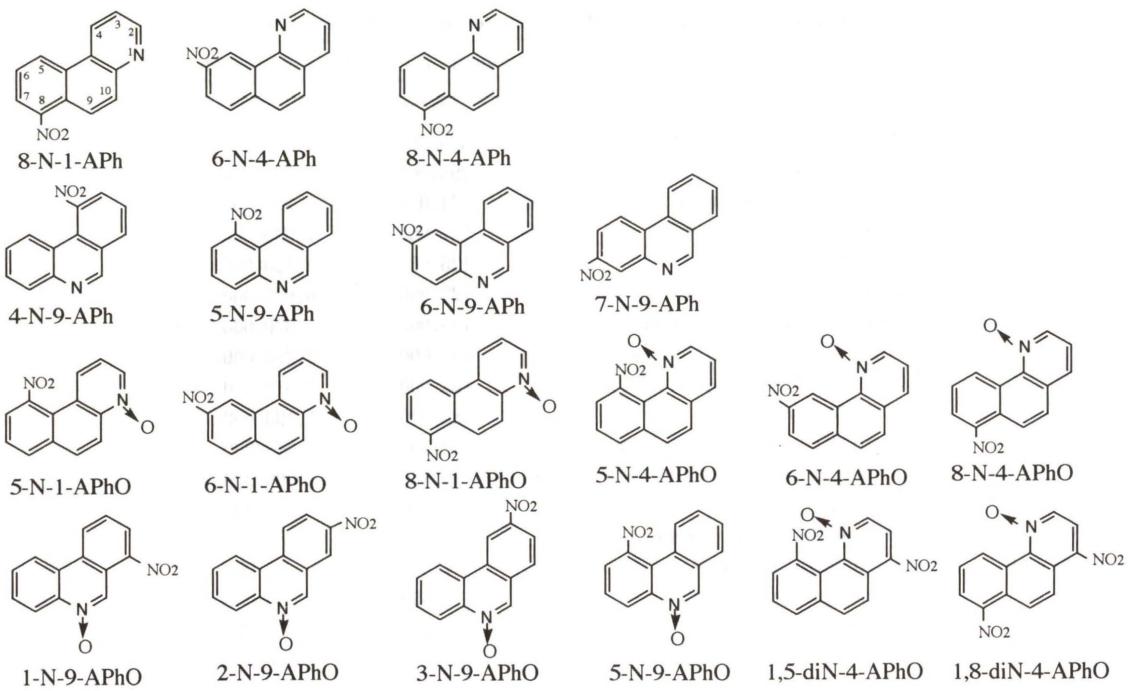


Fig. 4 Structure of polynitroazaphenanthrenes and its related compounds

果、ニトロアザアレーンは纖維濾紙に採取される粒子状物質には含まれず、主にアンバーライト XAD-4 樹脂に採取されるガス状の微粒子に含まれるという挙動を示すことがわかった。

検出したニトロアザアレーンの濃度は、大気試料ではガス状の微粒子 1 gあたり、1-および 3-N-6-ABP がそれぞれ、1.1 (0.09) および 1.2 ng (0.11 pg/m³)、1-および 3-N-6-ABPO が 0.8 (0.07) および 0.3 ng (0.03 pg/m³) であった。ディーゼル車試料からはガス状の微粒子 1 gあたり、1-および 3-N-6-ABP が 4.9 および 7.7 ng、1-および 3-N-6-ABPO が 2.2 および 3.8 ng、ガソリン車試料からは 1-および 3-N-6-ABP が 3.4 および 4.9 ng 排出されていることがわかった。また、ディーゼル車試料からは粒子状物質 1 gあたり、1-NP が 37.4 μg、1-3-, 1,6-および 1,8-diNP が 0.076, 0.151 および 0.23 μg、3-NF が 12.6 μg、ガソリン車試料からは粒子状物質 1 gあたり、1-NP が 0.32 μg、1,3-, 1,6-および 1,8-diNP が 0.048, 0.061 および 0.079 μg、3-NF が 0.21 μg 検出された。

これらの結果から、1,3-, 1,6-および 1,8-diNP, 3,7-および 3,9-diNF, 3,6-diNBP 等のニトロアレンは大気浮遊粒子状物質中に含まれているのに対し、1-および 3-N-6-ABP, 1-および 3-N-6-ABPO 等のニトロアザアレンは大気中のガス状の微粒子に含まれている従来見逃していた新規変異原物質であることを明らかにした。

3. フェナスレン、アザフェナスレンのニトロ誘導体の構造・変異活性相関

Fig. 3 に phenanthrene のモノニトロ誘導体 3種類 (NPhe), ジニトロ誘導体 11種類 (diNPhe) およびトリニトロ誘導体 8種類の合計 22種類の構造を、Fig. 4 に azaphenanthrene のモノニトロ誘導体 7種類 (NAPhe), azaphenanthrene-N-Oxide のモノニトロ誘導体 10種類 (NAPheO), ジニトロ誘導体 2種類 (diNAPheO) の合計 19種類の構造を示した。

Table 4, 5 に新規変異原物質 41種類の *S. typhimurium* TA 98, TA 98 NR, TA 98/1,8-DNP₆, TA 100, YG 1021, 1024, 1026 および 1029 株に対する S9 mix 非存在下での変異原性の結果を示した。これらのニトロアレーン、ニトロアザアレーンは、TA 98 株よりも TA 100 株でやや強い変異原性を示す塩基対置換型の直接型変異原物質であることが明らかとなった。

得られた変異原性を化学的に解析するため、サイクリックボルタメトリーによる酸化還元電位の測定、分子軌道計算「AM 1」による最低空軌道 (LUMO) およびフェナスレン母骨格とニトロ基との二面角 (dihedral angle) を求め、両者の関連について検討した。その結果、ニトロフェナスレンはニトロ基の数が増加すると 1電子目の還元が起きやすくなること、ジニトロ、トリニトロ誘導体の 2電子目の還元電位はニトロ基の付加位置によって変化することがわかった。一方、ニトロアザフェナスレンおよび N-オキシド体の 1, 2電子目の還元

Table 4 Mutagenicity of nitrphenanthrenes in the *Salmonella* tester strains

Chemical	Mutagenicity (rev./nmol) in <i>S. typhimurium</i> His-strains (-S9 mix)							
	TA98	TA98NR	TA98/ 1,8-diNP ₆	TA100	YG1021	YG1024	YG1026	YG1029
1-NPh	105	0.4	10.7	327	1,321	2,135	572	4,839
3-NPh	321	119	29.9	629	6,181	20,548	466	11,309
9-NPh	58	0.9	1.6	446	1,131	5,319	1,203	16,728
1,5-diNPh	4	0.8	0.8	5	268	634	115	1,224
1,6-diNPh	117	1.9	38.3	1,244	5,458	12,403	2,305	20,209
1,10-diNPh	0.8	0.5	0.5	2	1.1	209	1.6	5.1
2,6-diNPh	729	7.2	54.4	1,788	4,054	7,868	1,882	11,872
2,9-diNPh	3	0.8	2.4	586	619	761	281	4,620
2,10-diNPh	117	2.7	19.6	243	403	1,594	188	1,327
3,5-diNPh	70	3.8	2.4	239	410	1,465	192	3,060
3,6-diNPh	93	3.5	3.8	2,117	6,210	24,500	1,498	24,926
3,10-diNPh	107	3.2	1.9	1,367	3,196	5,522	752	10,197
4,9-diNPh	1	0.5	1.1	2	1.1	2.4	3.5	7.2
4,10-diNPh	107	1.9	3.2	160	91.7	382	137	18
1,5,9-triNPh	168	33.8	8.8	115	237	1491	90.8	635
1,5,10-triNPh	14	4.4	1.3	4	180	93.9	68.9	131
1,6,9-triNPh	1,034	277	88.3	1,336	1,558	4,394	724	420
1,7,9-triNPh	358	213	181	720	894	3,569	686	4,377
2,5,10-triNPh	63	5.9	4.1	370	458	3,656	111	5,969
2,6,9-triNPh	178	18.5	3.1	1,212	1,467	3,418	804	7,568
3,5,10-triNPh	50	5	1.3	44	110	447	178	1,448
3,6,9-triNPh	531	51.6	4.7	1,282	2,275	13,087	898	8,638

Table 5 Mutagenicity of nitroazaphenanthrenes and its derivatives in the *Salmonella* test strains

Chemical	Mutagenicity (rev./μg) in <i>S. typhimurium</i> His-strains (-S9 mix)							
	TA98	TA98NR	TA98/ 1,8-DNP ₆	TA100	YG1021	YG1024	YG1026	YG1029
8-N-1-APh	538	42	0.3	1,046	8,479	35,600	13,040	1,246
6-N-4-APh	2,052	149	530	6,060	42,370	6,260	46,800	11,020
8-N-4-APh	828	16	141	1,528	14,480	7,980	1,282	4,018
4-N-9-APh	112	31	48	160	806	609	785	401
5-N-9-APh	6	2	1.6	7	47	18	53	9
6-N-9-APh	728	168	98	818	1,050	3,478	5,194	788
7-N-9-APh	452	61	185	251	850	1,018	918	408
5-N-1-APhO	3	1	0.7	6	16	9	16	8
6-N-1-APhO	150	99	82	493	1,247	170	5,949	718
8-N-1-APhO	38	3	17	113	998	79	1,310	122
5-N-4-APhO	63	15	19	146	247	87	97	92
6-N-4-APhO	700	142	215	1,854	6,893	1,818	7,258	4,354
8-N-4-APhO	67	4	23	151	1,038	786	1,528	704
1-N-9-APhO	764	170	482	1,252	1,756	915	4,627	897
2-N-9-APhO	213	20	36	148	174	639	737	106
3-N-9-APhO	634	141	684	173	596	3,482	748	413
5-N-9-APhO	4	1	0.5	5	16	12	38	7
1,5-diN-4-APhO	10,460	6,420	1,440	2,906	24,980	11,637	9,541	6,575
1,8-diN-4-APhO	5,580	1,716	5,240	8,440	21,640	11,002	48,850	5,916

電位は、N-オキシド体 > アザ体 > フェナスレンの順で増加しており、特に 1電子目の還元電位はフェナスレンと比較して、アザ体は約 100 mV、N-オキシド体は 200 mV 還元されやすくなっていることがわかった。これらのことから、アザニトロフェナスレンは、ニトロフェナスレンと比べ化学的な還元性が増加していることから強い変異原性が予測されたが、それほど増強されず、N-オキシド体は逆に変異原性が低下した。また、ニトロフェナスレンの LUMO は 1電子還元電位と相関し、LUMO が低く化学的に還元されやすい化合物ほど強い

ナスレンと比べ化学的な還元性が増加していることから強い変異原性が予測されたが、それほど増強されず、N-オキシド体は逆に変異原性が低下した。また、ニトロフェナスレンの LUMO は 1電子還元電位と相関し、LUMO が低く化学的に還元されやすい化合物ほど強い

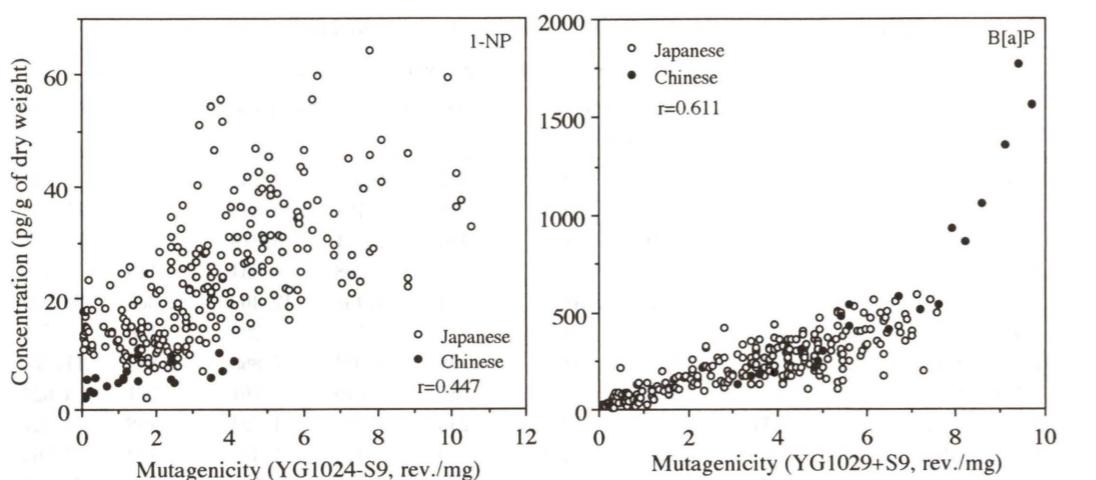


Fig. 5 Relationship between 1-NP or B[a]P and mutagenicity of extracts of lung specimens removed from Japanese and Chinese

Table 6 Mutagenicity and mutagens detected in the resected human lung in Japan and China

Chemical	Concentration (pg/g of dry weight)				
	Japanese		Chinese		
	Carcinoma	Tuberculosis	Carcinoma	Tuberculosis	Carcinoma
1991-1997(n=261)	1961-1962(n=35)	1991-1997(n=26)	1961-1962(n=37)	1991-1997(n=21)	
Mutagenicity (rev./mg)					
YG1024 (-S9 mix)	3.14±1.92	—	2.40±0.95	—	2.77±1.71
(+S9 mix)	4.40±2.10	—	3.40±1.32	—	3.14±1.92
YG1029 (-S9 mix)	1.62±1.33	—	1.35±1.07	—	6.22±2.07
(+S9 mix)	3.61±1.44	—	3.47±2.11	—	9.16±2.17
Nitroarene					
1-NP	19.70±10.5	32.30±12.3	18.70±11.4	26.40±14.6	5.90±2.40
1,3-diNP	3.50±0.14	5.50±1.17	2.60±0.17	4.20±0.35	—
1,6-diNP	4.82±1.69	6.15±2.14	4.60±1.80	5.60±2.84	—
1,8-diNP	6.26±1.76	8.54±1.76	6.10±2.10	8.40±2.45	—
PAH					
Benzo[a]pyrene	196±114	301±108	178±118	274±116	959±473
Benzo[k]fluoranthene	399±220	399±220	516±125	426±264	151±90
Benzo[ghi]perylene	138±82	138±82	168±95	162±168	276±240

変異原性を示したが、良い相関は認められなかった。しかし、dihedral angle の大きさは変異原性の強さと非常によく相関し、dihedral angle が小さくニトロ基がフェナスレン母骨格と同一平面に近いほど強力な変異原性を示した。すなわち、ニトロフェナスレンの変異原性の強さは、ニトロ基の化学的な還元のされやすさよりも、ニトロ基の立体的な因子が大きく影響し、平面構造を持ち立体障害が小さいほど強力な変異原性を示すことが示唆された。

4. ヒト肺試料中に残留する環境汚染物質

今まで環境中には種々の汚染物質が存在することを明らかにしてきたが、これらの環境汚染物質が実際にヒトにどの程度の影響を与えていたかについて日本および中

国の肺がん患者の摘出肺組織中に沈着残留するPAHおよびニトロアレンの蓄積量を分析定量した。

分析に用いた肺試料は28歳から68歳までの肺がん患者から外科的に摘出されたもので、日本人肺試料がS病院からのホルマリン標本5検体、K病院からのホルマリンおよび凍結標本354検体、中国人肺試料（雲南省、富源県、肺がん訂正死亡率25%）がホルマリン標本21検体、合計380検体である。肺試料は減圧乾燥し、0.1Mナトリウムリソ酸緩衝液（pH 7.4）に懸濁し、ポリトロンでホモジナイズした後、ジクロロメタンを加えて超音波抽出し、脱水濾過後、減圧濃縮し、液一液分配、カラムクロマトグラフィー、HPLCで分画精製した後、HPLCならびにGC-MSで分析した。

分析した日本および中国人肺試料の粗抽出物の変異原性は、YG 1024 株 S9 mix 非存在下でそれぞれ 3.14±

1.92 および 2.77±1.71 rev./mg、YG 1029 株 S9 mix 存在下でそれぞれ 1.62±1.33 および 6.22±2.07 rev./mg であった。直接型変異原物質である 1-NP 蓄積濃度は YG 1024 株 S9 mix 非存在下での変異原性（相関係数 $r = 0.456$ ）と、間接型変異原物質である BP 蓄積濃度は YG 1029 株 S9 mix 存在下での変異原性（相関係数 $r = 0.835$ ）と相関が認められた（Fig. 5）。1-NP 濃度は日本および中国人肺試料がそれぞれ 19.7 ± 10.5 および 5.9 ± 2.4 pg/g と日本人肺試料が有意に高い値を示し、BP 濃度はそれぞれ 196 ± 114 および 59 ± 473 pg/g であり、中国人肺試料が有意に高い値を示した（Table 6）。雲南省、富源県では、暖房ならびに調理には依然として石炭を使用しており、室内換気も行われていないため、石炭の燃焼に伴う室内暴露が大きな要因として考えられる。肺がん患者の住居内に付着している煤の分析を行ったところ、粒子状物質 1 gあたり、BP が 96 ± 6 μg、benzo[k]fluoranthene が 39 ± 4 μg、benzo[ghi]perylene が 54 ± 8 μg であり、灯油、都市ガスおよび重油の燃焼生成物に比べてもはるかに高い値であった。

これらの結果から、ヒトは大気中に広く存在する種々の環境汚染物質に暴露されており、一部の 1-NP および BP 等の変異原および発がん物質は肺内に沈着残留していることを明らかにした。日本の肺がん患者の摘出肺組織中に蓄積している 1-NP および BP のバックグラウンドは乾燥重量 1 gあたり、それぞれ 19.7 および 196 pg であり、この濃度を肺全体の量（肺全体の乾燥重量約 50 g）に換算するとそれぞれ 0.99 および 9.8 ng となり、ほぼヒトが 1 日に大気から吸入する 1-NP および BP 量（大気中に含まれる 1-NP および BP 濃度はそれぞれ、 0.068 および 1.4 ng/m³、ヒトの 1 日の呼吸量 10 m³ として算出） 0.68 および 14 ng に相当した。

結語

本研究では、新規変異原物質 1,6-および 3,6-diNBP 等のニトロアレン、1-および 3-N-6-CBP、1-および 3-N-6-ABP、1-および 3-N-6-ABPO 等のニトロアザアレン、phenanthrene および azaphenanthrene 等のニトロ誘導体を合成し、その遺伝毒性および環境中での挙動を明らかにした。さらにヒト肺試料中に残留している環境汚染物質の暴露実態を明らかにした。今後、環境汚染物質のヒトへの危険度を的確に考察するため、さらに研究を進める必要があると考えられる。

謝辞

本研究は多くの先生方のご指導ならびに福岡県保健環境研究所の理解があって成し得たものです。九州大学医

学部の原信之教授、中西洋一博士、九州女子大学の常盤寛教授、国立医薬品食品衛生研究所の宮田直樹部長、福原潔博士、山越葉子博士、産業医科大学の葛西宏教授、国立環境研究所の嵯峨井勝博士、九州大学薬学部の内海英雄教授、US-EPA の Joellen Lewtas を初め、共同研究の方々にこの場を借りてお礼申し上げます。また、試験菌株をご恵与下さいました国立医薬品食品衛生研究所の能美健彦博士、鈴木任博士、国立がんセンターの渡辺雅彦博士に深く感謝いたします。最後に、貴重な御助言と激励をいただきました日本環境変異原学会の会員の皆様に感謝の意を捧げます。

参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Method for detection carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mut. Res.*, 31, 347-364.
- Fukuhara, K., N. Miyata, M. Matsui, K. Matsui, M. Ishidate, Jr. and S. Kamiya (1990) 1,6-and 3,6-dinitrobenzo[a]pyrene: synthesis, chemical properties and mutagenicity, *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 3158-3161.
- Fukuhara, K., A. Hakura, N. Sera, H. Tokiwa and N. Miyata (1992) 1-and 3-nitro-6-azabenz[a]pyrene and their N-oxides: highly mutagenic nitrated azaarenes, *Chemical Res. Tox.*, 5, 149-153.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mut. Res.*, 113, 173-215.
- Nakanishi, Y., S. Chen, S. Inuzuka, Y. Ma, X. Jinag, N. Hara, N. Sera and H. Tokiwa (1997) Possible role of indoor environment and coal combustion emission in lung carcinogenesis in Fuyuan County, China, *Neoplasma*, 44, 69-72.
- Sera, N., M. Kai, K. Horikawa, K. Fukuhara, N. Miyata and H. Tokiwa (1991) Detection of 3,6-dinitrobenzo[a]pyrene in airborne particulates, *Mut. Res.*, 263, 27-32.
- Sera, N., K. Fukuhara, N. Miyata, K. Horikawa and H. Tokiwa (1992) Mutagenicity of nitro-azabenz[a]pyrene and its related compounds, *Mut. Res.*, 280, 81-85.
- Sera, N., K. Fukuhara, N. Miyata and H. Tokiwa (1994) Detection of nitro-azabenz[a]pyrene derivatives in the semivolatile phase originating from airborne particulate matter, diesel and gasoline vehicles, *Mutagenesis*, 9, 47-52.
- Sera, N., K. Fukuhara, N. Miyata and H. Tokiwa (1996) Mutagenicity of nitrophenanthrene derivatives for *Salmonella typhimurium*: effect of nitroreductase and acetyltransferase, *Mut. Res.*, 349, 137-144.
- Tokiwa, H., N. Sera, A. Nakashima, K. Nakashima, Y. Nakanishi and N. Shigematsu (1994) Mutagenic and carcinogenic significance and the possible induction of lung cancer by nitro aromatic hydrocarbons in particulate pollutants, *Environ. Health Persp.*, 102, 107-110.
- Tokiwa, H., N. Sera, K. Horikawa, Y. Nakanishi and N. Shigematsu (1993) The presence of mutagens/carcinogens in the excised lung and analysis of lung cancer induction, *Carcinogenesis*, 14, 1933-1938.

This paper, in a session chaired by Yujiro Kamiguchi and Akihiro Shima, was presented to the symposium "A new research trend in germ cell mutagenesis", organized by Tohru Shibuya, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.

Identification and characterization of genetic risk from germ cell mutagens

Ilse-Dore Adler

GSF-National Research Center for Environment and Health, Institute of Mammalian Genetics
D-85758 Neuherberg, Germany

Summary

The germ cell tests detect chromosomal aberrations, gene mutations and aneuploidy induced in rodent germ cells by chemical or physical agents. The rodent germ cell tests are usually conducted by treating male animals. Recently, molecular cytogenetic techniques (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) were developed to detect aneuploidy in sperm of experimental rodents and humans. A variety of assays are available which detect chromosomal aberrations in germ cells of treated animals, i. e. the germ cell cytogenetic tests, the dominant lethal assay and the heritable translocation test. Transgenic mice were recently used to detect gene mutations in germ cells. This assay promises to be faster and less animal consuming than the classical gene mutation tests in germ cells, the specific locus tests with various recessive and dominant marker genes. Recent data with the environmentally and occupationally important chemical 1,3-butadiene were used to demonstrate the identification, characterization and quantification of potential genetic hazard for humans. Clastogenicity data in somatic and germinal cells of mice and in somatic cells of exposed workers were applied to the parallelogram approach for human risk assessment proposed by Sobels.

Introduction

Newly occurring mutations are a major source of the genetic burden of the human population. About 0.6% of all newborns carry chromosomal mutations which impair their health. Of these, 37% are numerical anomalies of the sex chromosomes the best known are the Turner syndrome (XO) and the Klinefelter syndrome (XXY). Another 23% of the human chromosomal disorders are trisomies such as the Down syndrome (trisomy 21). Finally, 40% of children born with chromosomal disorders carry structural chromosome aberrations such as translocations, inversions or large deletions. It is the responsibility of geneticists of our generation to

prevent an increase in the already existing genetic burden due to our industrialized environment. Therefore, we have to identify chemical mutagens in the environment, to characterize their effects and to quantify the genetic risk they impose on humans.

Identification of germ cell mutagens

This task is performed by animal experiments. The main experimental object is the mouse. The tests are performed almost exclusively by treating male animals due to the biology of germ cell development which allows easier experimentation with males than with females. The main test systems applied to detect the mutagenic effects of chemicals by their respective genetic endpoints are listed in Table 1.

Aneuploidy is a genetic alteration which has long been ignored in mutagenicity testing. Recently, molecular cytogenetic techniques (fluorescent *in*

received : December 3, 1997

accepted : February 10, 1998

© Environmental Mutagen Society of Japan

Table 1 Tests developed to detect germ cell mutagens

Test	Endpoint	Stage sensitivity	Germ cell stages tested
FISH	Aneuploidy	yes	Spermatocytes
Transgenic mice	Mutagenicity	no	All stages
Specific locus mutations	Mutagenicity	yes	All stages
CA in mitotic divisions	Clastogenicity	no	Spermatogonia
CA in meiotic divisions	Clastogenicity	no	Spermatogonia and spermatocytes
Dominant lethal mutations	Clastogenicity	yes	All stages
Heritable translocations	Clastogenicity	yes	All stages

CA = chromosomal aberrations

FISH = fluorescent *in situ* hybridization

situ hybridization, FISH) have been developed to detect aneuploidy in sperm of experimental rodents and humans (Lowe et al., 1996; Robbins et al., 1995). Preliminary unpublished data indicate that diazepam, the active ingredient of Valium®, is a germ cell aneugen in mice and men. The data base is still limited and the protocols require validation and improvement. However, it is likely that this method may become a standard requirement for genetic toxicology testing in the future, in particular because it is able to bridge the gap between data from experimental animals and exposed humans.

The transgenic rodent animal stocks were developed to detect mutagenic events in various tissues and to correlate these effects with rodent carcinogenicity (Gorelick, 1995). These transgenic mice also provide a tool for detecting gene mutations in testicular cells. A collaborative study was initiated to standardize and validate the transgenic mouse assay for germ cell effects (Ashby et al., 1997). It is envisaged that the transgenic germ cell assay may be quicker and easier than the traditional germ cell tests for gene mutations, the specific locus assay (W. L. Russell, 1951), the biochemical specific locus assay (Malling and Valcovic, 1977) and the dominant skeletal or dominant cataract mutation assays (Ehling and Randolph, 1962; Favor, 1983). These latter procedures require enormous numbers of animals and are only justified to be performed for quantitative risk assessment with known germ cell mutagens.

Structural chromosome alterations have been studied in germ cells of male mice for decades and the protocols for these test systems are standardized and validated (Adler, 1984). The dominant lethal test is best established germ cell mutagenicity test which detects stage specificity of mutagens (Bateman, 1960). For this assay, mice are treated with the test chemical and mated sequentially to untreated females to determine the frequencies of

dead implants in the female uterus. The sequential mating scheme allows the detection of specific sensitive stages of gametogenesis which is important for genetic risk evaluation. In case of positive dominant lethal results, the heritable translocation test is performed to determine the transmission of structural chromosomal alterations to the progeny (Generoso et al., 1979). Data for the environmentally and occupationally important chemical mutagen 1,3-butadiene will be presented to demonstrate the process from identification via characterization to quantification of the human genetic risk.

Characterization of germ cell mutagens

In this chapter, I will go one step beyond characterization and also present an example of quantification of heritable mutagenic effects. The steps of identification, characterization and quantification will be exemplified with the chemical 1,3-butadiene.

1,3-butadiene and its metabolism

The monomer 1,3-butadiene is a colourless gas which by polymerization forms synthetic rubbers. Wide usage is made of butadiene in rubber industry, tyre plants, petroleum industry and polymer production. Two comprehensive reviews describe the metabolism and its species differences as well as other areas of toxicology of butadiene (Himmelstein et al., 1997; ECETOC, 1997). The first step of metabolism is a cytochrome P-450 mediated epoxidation to epoxybutene which is further oxidized to diepoxibutane. However, epoxybutene is also subjected to glutathione conjugation or hydrolysis by which steps it is detoxified without forming the diepoxide. Basically, the metabolic pathways are qualitatively similar in mice, rats and humans, however, the rate of GSH conjugation of epoxybutene is faster in mice than in rats or humans while hydrolysis of epoxybutene and diepoxibutane is faster in humans than in rats or mice (Csanády et al., 1992). The rate of epoxidation of epoxybutene to

diepoxibutane is highest in mice, lower in rats and greatly variable in humans (Seaton et al., 1995). These species differences in rates of metabolism are important in view of the extrapolation of experimental animal data to humans and the major unresolved question is whether mice or rats are the adequate animal model for humans.

Carcinogenicity of 1,3-butadiene

Butadiene carcinogenicity was demonstrated in mice at exposure concentrations as low as 6.25 ppm (Melnick and Huff, 1992) and required much higher concentrations in rats (Owen and Glaister, 1990). Recently, retrospective follow-up studies of workers employed in the styrene/butadiene/rubber industries indicated an increased risk of leukemia which was associated with the exposure to butadiene (Delzell et al., 1996; Macaluso et al., 1996). Two mortality studies of workers in butadiene production units suggested an association between butadiene exposure and excess mortality from lymphomas and reticulosarcomas (Ward et al., 1996; Divine and Hartman, 1996). Thus, it is most likely that butadiene is a human carcinogen.

Genotoxicity of 1,3-butadiene

Butadiene metabolites form adducts with DNA and hemoglobin (Koivisto et al., 1997; Albrecht et al., 1993). The latter could also be measured in exposed workers (Osterman-Golka et al., 1996). *In vitro* studies and *in vivo* studies with somatic cells demonstrated that butadiene and its epoxy-metabolites were clastogenic and mutagenic (Adler et al., 1997; Cochrane and Skopek, 1994; 1995). Thus, it became clear that butadiene was genotoxic, the metabolites interacted with DNA and the diepoxide was the strongest mutagen of the epoxide metabolites.

Germ cell mutagenicity of butadiene

For genetic risk characterization and quantification it was necessary to determine the mutagenicity of butadiene and its metabolites in germ cells of rodents. Butadiene induced dominant lethal mutations in mice but not in rats (Adler et al., 1994;

Table 2 Doubling doses (DD) for butadiene-induced bone marrow micronuclei (BM-MN) and heritable translocations (HT)

	Experimental Exposure Conditions	Spontaneous Rates (%)	Linear Regression Coefficient	DD (ppm)
BM-MN	0, 50, 200, 500 ppm, 6h/d, 5d	0.27	1.12×10^{-4}	2411
HT	500, 1300 ppm, 6h/d, 5d	0.05	6.9×10^{-5}	725

1997; Adler and Anderson, 1994; Anderson et al., 1997). The most sensitive stages of spermatogenesis were late spermatids and epididymal sperm. Subsequently, it was demonstrated that butadiene also induced heritable translocations in these germ cell stages of mice (Adler et al., 1995). With these data, it was concluded that butadiene was a germ cell mutagen in mice and it was characterized to affect late spermatids and sperm.

Quantification of the human genetic risk from butadiene exposure

The step of quantification of the possible genetic risk to humans was performed using the parallelogram approach suggested by Sobels (1980; 1989). The parallelogram approach says that if one has mutation data in somatic and germinal cells of rodents and in somatic cells of humans one can calculate the expected germinal mutation rate in humans assuming that the relationship between somatic and germinal effects is the same in rodents and humans. This procedure requires dose-response data. The dose response data were available for clastogenicity of butadiene in somatic and in germinal cells from the mouse bone marrow micronucleus test and the heritable translocation assay (Adler et al., 1994; 1997). For both endpoints the dose-response relationships were linear which allowed to calculate doubling doses. The doubling dose is defined as the dose that induces as many mutational events per generation as occur spontaneously and it is calculated as a/b , the spontaneous rate divided by the linear regression coefficient, from the linear equation $Y = a + bX$. The respective values are shown in Table 2 and resulted in doubling doses for the mouse bone marrow micronucleus test of 2411 ppm and for the heritable translocation assay of 725 ppm.

Additionally, data were used of a human biomonitoring study in the Czech Republic in which a significant increase of chromosomal aberrations had been found in peripheral lymphocytes of exposed workers (Tates et al., 1996; Sram et al.,

Table 3 The Parrallelogram Approach for risk quantification based on the doubling doses (DD) estimated experimentally

DD for micronuclei in mouse bone marrow :	2411 ppmh	↔ DD for aberrations in lymphocytes of workers :	16394 ppmh
↓		↓	
DD for heritable translocations in male mouse germ cells :	725 ppmh	↔ Estimated DD for heritable translocations in human germ cells :	4930 ppmh

Table 4 The Parrallelogram Approach for risk quantification based on induced rate of genetic effects per unit dose (ppmh)

Micronucleus induction in mouse bone marrow cells :	21.2×10^{-6}	↔ Aberration induction in lymphocytes of workers :	1.24×10^{-8}
↓		↓	
Heritable translocation induction in male mouse germ cells :	0.69×10^{-6}	↔ Estimated rate of induction for heritable translocations in human germ cells :	0.76×10^{-6}

1996). Since the human data did not allow to determine a dose response they were used as a point estimate assuming linearity. The mean exposure concentration for the workers was 1.58 ppm. Using the average life span of human lymphocytes (3 years, or 5520 hours if a year has 46 working weeks of 40 hours) as exposure time the resulting exposure dose was 8722 ppmh. The doubling dose was then calculated as the spontaneous rate (2.03%) times the exposure dose (8722 ppmh) divided by the induced rate (1.08%) and came to 16394 ppmh.

The three doubling dose values were entered into the parallelogram (Table 3) and a doubling dose for heritable translocations in human germ cells of 4930 ppmh was calculated (Pacchierotti et al., 1997). In the same paper, the quantification was also based on the calculation of a unit dose (Table 4) which again using the parallelogram resulted in an estimation of the induced translocation rate in human germ cells of 0.8×10^{-6} or 8 new cases of balanced translocation carriers per 10 million live born for 1 ppmh of paternal exposure.

Both the doubling dose and the induction rate per unit dose are very abstract figures. Therefore, the authors went one step further and calculated the risk for the actual mean exposure concentration of the Czech workers (Table 5). Assuming that the stages of sensitivity of male germ cells are identical in mouse and humans the sensitive period in men would last for 4–5 weeks or 200–240 working hours, representing the duration of the stages of sper-

Table 5 Calculation of expected offspring with reciprocal translocations due to occupational butadiene exposure of the male parent

Sensitive period of spermatogenesis in men :	4–5 weeks, i.e. 200–240 h
Mean exposure concentration at the workplace :	1.58 ppm
Effective exposure dose (concentration × time) for workers :	320–380 ppmh
Induction rate per ppmh :	0.8×10^{-6}
Expected cases of reciprocal translocations due to exposure :	$256-304 \times 10^{-6}$
Spontaneous incidence of children with reciprocal translocations :	879×10^{-6}

matids and sperm in humans (Adler, 1996). This time multiplied with an exposure concentration of 1.58 ppm results in an effective exposure dose of 320–380 ppmh. With an induction rate per unit dose of 0.8×10^{-6} , the expected number of newborns with reciprocal translocations due to the actual paternal exposure would be $256-304 \times 10^{-6}$. This value has to be seen in relation to the spontaneous incidence of children with reciprocal translocations of 879×10^{-6} (Sankaranarayanan, 1982). By the above hypothetical calculation, the occupational exposure of the male parent increases the genetic risk of having a child with a reciprocal translocation by one third.

Conclusion

The present example of butadiene was used to describe the processes of identification, characterization and quantification of the genetic risk. It is important that before starting to perform germ cell mutagenicity studies information is available on metabolism, genotoxicity and somatic mutagenicity of the chemical under study. An important role in deciding to perform germ cell and/or carcinogenicity studies plays the mouse bone marrow micronucleus assay (Ashby, 1986). A chemical positive in the bone marrow micronucleus assay will trigger both a cancer bioassay and germ cell tests for characterization and quantification of carcinogenic and mutagenic risk.

The choice of the rodent species is critical. As for butadiene, it could not be decided based on metabolism studies if the mouse was the proper animal model on which to base the calculation human genetic risk. It rather seemed that humans were closer to rats than to mice. If that was so, human carcinogenicity was unlikely. However, recent evi-

dence emerged from epidemiological studies that butadiene might actually be a human carcinogen. If that holds true, then the mouse model regains importance. For germ cell mutagenicity, rat data were negative and only mouse experiments provide useful data for the exercise of risk quantification. This has been described in the previous chapter and figures have been derived that indicate an increased risk of translocation carriers among children born to butadiene workers. If that increase will ever be recognized in genetic epidemiology studies is doubtful. However, it gives an order of magnitude of the expected increase of the genetic burden in the worst case, namely if men are like mice. There are many assumptions underlying this risk calculation and it only relates to one genetic endpoint, namely translocations which are balanced chromosomal aberrations. Carriers of these chromosomal alterations generally don't display severe congenital malformations but are of impaired fertility. It is yet unknown if gene mutations also present a sizable risk after butadiene exposure. However, two arguments stand against that possibility. Firstly, the primary active metabolite of butadiene is the diepoxide which as a bifunctional agent causes predominantly clastogenicity, and secondly, gene mutations were found in somatic tissue to a lesser extent than clastogenic effects.

Despite the many caveats entailed in extrapolation from rodent somatic and germ cells data and human somatic cell data to germ cell hazard in humans, the present data have provided the first reliable indication of the germ cell hazard to humans by occupational exposure to butadiene.

Acknowledgement

Experimental work was performed under EU contracts STEP-CT91-0144 and EV5V-CT940543.

References

- Adler, I.-D. (1984) Cytogenetic tests in mammals. In : S. Venitt and J. M. Parry (Eds), Mutagenicity Testing, A Practical Approach, IRL Press, Oxford, pp. 275–306.
- Adler, I.-D. (1996) Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans, Mutat. Res., 352, 169–172.
- Adler, I.-D. and D. Anderson (1994) Dominant lethal effects after inhalation exposure to 1,3-butadiene, Mutat. Res., 309, 295–297.
- Adler, I.-D., U. Kliesch and K. Peltonen (1997) *In vitro* and *in vivo* mutagenicity of the butadiene metabolites butadiene diepoxide, butadiene monoepoxide and di-epoxybutane, Mutagenesis, 12, 339–345.
- Adler, I.-D., J. Cao, J. G. Filser, P. Gassner, W. Kessler, U. Kliesch, A. Neuhäser-Klaus and M. Nüse (1994) Mutagenicity of 1,3-butadiene inhalation in somatic and germinal cells of mice, Mutat. Res., 309, 307–314.
- Adler, I.-D., J. G. Filser, P. Gassner, W. Kessler, J. Schöeich and G. Schriever-Schwemmer (1995) Heritable translocations induced by inhalation exposure of male mice to 1,3-butadiene, Mutat. Res., 347, 121–127.
- Adler, I.-D., J. G. Filser, H. Gonda and G. Schriever-Schwemmer (1997) Dose-response study for 1,3-butadiene-induced dominant lethal mutations and heritable translocations in germ cells of male mice, Mutat. Res. (in press).
- Albrecht, O. E., J. G. Filser and H.-G. Neumann (1993) Biological monitoring of 1,3-butadiene: species differences in haemoglobin binding in rat and mouse, In : M. Sorsa, K. Peltonen, H. Vainio and K. Hemminki (Eds), Butadiene and Styrene: Assessment of Health Hazards, IARC Scientific Publications No. 127, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 135–142.
- Ashby, J. (1986) The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens, Mutagenesis, 1, 3–16.
- Ashby, J., N. J. Gorelick and M. D. Shelby (1997) Mutation assays in male germ cells from transgenic mice: overview of study and conclusions, Mutat. Res., 388, 111–122.
- Bateman, A. J. (1960) The induction of dominant lethal mutations in rats and mice with triethylenemelamine (TEM), Genet. Res., 1, 381–392.
- Cochrane, J. E. and T. R. Skopek (1994) Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1,2-epoxybutene, 1,2,3,4-diepoxybutane and 3,4-epoxy-1,2-butanediol in cultured human lymphoblasts, Carcinogenesis, 15, 713–717.
- Cochrane, J. E. and T. R. Skopek (1995) Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: II. Mutational spectra of butadiene, 1,2-epoxybutene and diepoxybutane at the *hprt* locus in splenic T-cells from exposed B6C3F₁ mice, Carcinogenesis, 15, 719–723.
- Csanády, G. A., F. P. Guengerich, and J. A. Bond (1992) Comparison of the biotransformation of 1,3-butadiene and its metabolite, butadiene monoepoxide, by hepatic and pulmonary tissues from humans, rats, and mice, Carcinogenesis, 13, 1143–1153.
- Delzell, E., N. Sathiakumar, M. Hovinga, M. Macaluso, J. Julian, R. Larson, P. Cole and D. C. F. Muir (1996) A follow-up study of synthetic rubber workers, Toxicology, 113, 182–189.
- Divine, B. J. and C. M. Hartman (1996) Mortality update of butadiene production workers, Toxicology, 113, 169–181.
- ECETOC (1997) Special Report No. 12, 1,3-Butadiene OEL Criteria Document, 2nd ed., pp. 1–57.
- Ehling, U. H. and M. L. Randolph (1962) Skeletal abnormalities in the F₁ generation of mice exposed to ionizing radiation, Genetics, 47, 1543–1555.
- Favor, J. (1983) A comparison of the dominant cataract and recessive specific locus mutation rates induced by treatment of male mice with ethylnitrosourea, Mutat. Res., 110, 367–382.
- Generoso, W., S. W. Huff and K. T. Cain (1979) Relative rates at which dominant lethal mutations and heritable translocations were induced by alkylating chemicals in postmeiotic male germ cells of mice, Genetics, 93, 163–171.

- Gorelick, N. J. (1995) Overview of mutation assays in transgenic mice for routine testing, Environ. Mol. Mutagenesis, 25, 218-230.
- Himmelstein, W. M., J. F. Acquavella, L. Recio, M. A. Medinski and J. A. Bond (1997) Toxicology and epidemiology of 1,3-butadiene, Crit. Rev. Toxicol., 27, 1-108.
- Lowe, X., S. O'Hogan, D. Moore II, J. Bishop and A. Wyrobek (1996) Aneuploid epididymal sperm detected in chromosomally normal and Robertsonian translocation-bearing mice using a new three-chromosome FISH method, Chromosoma, 105, 204-210.
- Macaluso, M., R. Larson, E. Delzell, N. Sathiakumar, M. Hovinga, J. Julian, D. Muir and P. Cole (1996) Leukemia and cumulative exposure to butadiene, styrene and benzene among workers in the synthetic rubber industry, Toxicology, 113, 190-202.
- Malling, H. V. and L. R. Valcovic (1977) A biochemical specific locusmutation system in mice, Arch. Toxicol., 38, 45-51.
- Melnick, R. C. and J. Huff (1992) 1,3-Butadiene : Toxicity and carcinogenicity in laboratory animals and in humans, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 124, 111-142.
- Pacchierotti, F., I.-D. Adler, D. Anderson, M. Brinkworth, N. A. Demopoulos, J. Laehdetie, S. Osterman-Golkar, K. Peltonen, A. Russo, A. D. Tates and R. Waters (1997) Genetic effects of 1,3-butadiene and associated risk for heritable damage, Mutat. Res. (in press).
- Osterman-Golkar, S., K. Peltonen, T. Anttilainen-Klemetti, H. H. Landoin, V. Zorcec and M. Sorsa (1996) Haemoglobin adducts as biomarkers of occupational exposure to 1,3-butadiene, Mutagenesis, 11, 145-149.
- Owen, P. E. and J. R. Glaister (1990) Inhalation toxicity and carcinogenicity of 1,3-butadiene in Sprague-Dawley rats, Environ. Health Perspect., 86, 19-25.
- Robbins, W. A., J. E. Baulch, D. Moore II, H.-U. Weier, D. Blakey and A. J. Wyrobek (1995) Three-probe fluorescence in situ hybridization to assess chromosome X, Y, and 8
- aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups : Evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy, Reprod. Fertil. Dev., 7, 799-809.
- Russell, W. L. (1951) X-ray-induced mutations in mice, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 16, 327-336.
- Sankaranarayanan, K. (1982) Genetic Effects of Ionizing Radiation in Multicellular Eukaryotes and the Assessment of Genetic Radiation Hazard in Man. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, p. 190.
- Seaton, M. J., M. H. Follansbee and J. A. Bond (1995) Oxidation of 1,2-epoxy-3-butene to 1,2:3,4-diepoxybutane by cDNA-expressed human cytochrome P4502E1 and 3A3 and human, mouse and rat liver microsomes, Carcinogenesis, 16, 2287-2293.
- Sobels, F. H. (1980) Evaluating the mutagenic potential of chemicals. The minimal battery and extrapolation problems, Arch. Toxicol., 46, 21-30.
- Sobels, F. H. (1989) Models and assumptions underlying genetic risk assessment, Mutat. Res., 212, 77-89.
- Sram, R., P. Rössner, K. Peterkova, G. Mrackova, K. Peltonen, N. A. Demopoulos, D. Vlachodimitropoulos and G. Stephanou (1996) Cytogenetic biomonitoring of workers exposed to 1,3-butadiene. 26th EEMS Annual Meeting : Workshop on Chromosome Instability and Cell Cycle Control, Instituto Superiore di Sanita, Rome, 3-7. 9. 1996, Abstract Book p. 244.
- Tates, A. D., J. J. van Dam, F. A. de Zwart, F. Darroudi, A. T. Natarajan, P. Rössner, K. Peterkova, K. Peltonen, N. A. Demopoulos, G. Stephanou, D. Vlachodimitropoulos and R. J. Sram (1996) Biological effect monitoring in industrial workers from the Czech Republic exposed to low levels of butadiene, Toxicology, 113, 91-99.
- Ward, E. M., J. M. Fajen, A. M. Ruder, R. A. Rinsky, W. E. Halperin and C. A. Fessler-Flesch (1996) Mortality study of workers employed in 1,3-butadiene production units identified from a large chemical workers cohort, Toxicology, 113, 157-168.

Environ. Mutagen Res., 20 : 113 - 118(1998)

本稿は1997年12月3-5日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第26回大会のシンポジウム「生殖細胞変異研究の新しい動向」(企画:渋谷徹)で発表された(座長:上口勇次郎, 島昭絵)。

メダカ特定座位突然変異 —発生過程での生殖細胞突然変異の検出—

島田 敦子, 島 昭絵

東京大学大学院 理学系研究科生物科学専攻 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Specific-locus mutation test using the Medaka : Germ-cell mutations detected during embryogenesis

Atsuko Shimada and Akihiro Shima

Laboratory of Radiation Biology, Department of Biological Science, University of Tokyo
Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Summary

A specific-locus test (SLT) system has been established using the fish medaka (*Oryzias latipes*), where recessive visible mutations (at the *b*, *If* or *gu* loci) detected during embryonic stages (TM) or after hatching (VM), and dominant lethals (DL) can be examined in the same individual *F₁* progeny of treated parents. It was found that about 90% of the *F₁* embryos with γ -ray-induced specific-locus mutations were concomitantly accompanied by DL irrespective of doses and germ-cell stages, suggesting that DNA alterations in such mutants might include both either one of the marker loci and region(s) responsible for DL. In contrast, embryonic lethality of ENU (ethylnitrosourea)-induced specific-locus mutants varied with the different concentrations and germ-cell stages treated. DNA alterations at the 87 AP-PCR markers were examined for individual dominant lethal embryos from 4.75 Gy-irradiated sperm or spermatids and the results indicated that such embryos had multiple DNA deletions in the genome. To examine whether irradiated male germ cells manifest genetic changes after fertilization, we began to investigate mosaic mutations at the *wl* locus during embryogenesis. Wildtype inbred HNI males were irradiated with Cs-137 γ -rays and mated to non-irradiated newly established T5 (*b/b*; *If/If*; *gu/gu*; *i⁺/i⁺*; *wl/wl*) females. When sperm or spermatids were irradiated, a dose-dependent increase in the frequency of mosaic mutant at the *wl* locus was observed.

(This paper, in a session chaired by Yujiro Kamiguchi and Akihiro Shima, was presented to the symposium "A new research trend in germ cell mutagenesis", organized by Tohru Shibuya, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords : Medaka, Specific-locus test, Germ-line mutation, AP-PCR

緒 言

放射線をはじめとする環境変異原は、生殖細胞の遺伝

受付：1998年2月21日

受理：1998年4月27日

©日本環境変異原学会

子に変化を起こし、そのうちのあるものが突然変異として検出される。これはマウスを用いた特定座位試験や相互転座試験など、さまざまな方法で実験的に明らかにされているが、それらの遺伝子変化が、配偶子形成過程や次世代の発生過程でどのように突然変異として固定され、どのようなメカニズムで孫世代に伝えられていくのかに関する研究は少ない。メダカ (*Oryzias latipes*) は

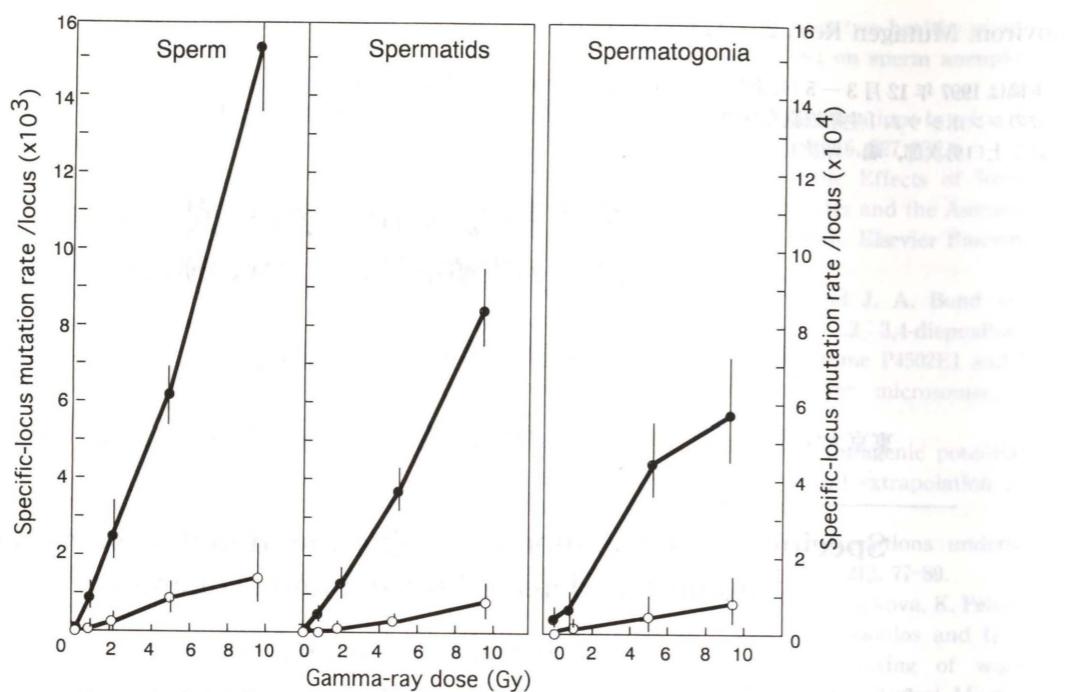


Fig. 1 Dose-response curves for specific-locus mutations induced in sperm (left), spermatids (middle) and spermatogonia (right) by γ -rays (0.95 Gy/min). Closed circles: total mutation (TM) rate in the F_1 embryos detected at 6 day postfertilization. Open circles: viable mutations (VM). Vertical bars indicate upper and lower 90% confidence limits.

卵膜が非常に透明であり、発生過程が容易に観察できる数少ない脊椎動物のひとつである。われわれは、継世代突然変異を解析するには発生過程がみえる動物を使う必要があり、メダカがそれに適していると考えた。これまでグッピー (Schroeder, 1969) やゼブラフィッシュ (Chakrabarti et al., 1983; Walker and Streisinger, 1983) などの魚類を用いた誘発突然変異の報告はいくつもあるが、いずれも検出系を確立するまでにはいたらなかった。われわれがメダカで開発した生殖細胞突然変異検出系は、親世代を変異原処理し、劣性可視突然変異と優性致死、さらに奇形を同一 F_1 個体で検出するものである (Shima and Shimada, 1988, 1991, 1994)。また、 F_1 個体にみられる DNA の変化を AP-PCR フィンガープリント法などによって調べている (Kubota et al., 1992, 1995)。本稿では、過去 12 年間の自家研究結果の要約と、最近着手した研究の予備的結果について述べる。

1. メダカを用いる利点

特定座位法では、変異原で処理した野生型の親を、調べたい標識遺伝子座についてあらかじめ劣性ホモになっている未処理の個体（テスター）と交配することによって、 F_1 世代でその遺伝子座における劣性突然変異を検出する。メダカでは発生の比較的早い時期に発現する *b* (黒色素形成抑制；受精後 2 日で発現), *If* (白色素胞欠如；受精後 2 日) および *gu* (虹色素減少；受精後 3 日)

(Tomita, 1990) 各自然突然変異を 3 重劣性ホモに持つテスターを作成し、これら標識遺伝子座における野生型から劣性型への色変わりの突然変異を検出している。

さて、卵生動物であるメダカでは、胎生動物であるマウスと違って、優性致死（両親どちらかの遺伝損傷によって F_1 が発生途中で死亡すること）などによる発生異常胚の死亡時期が非常に遅いことが、われわれの研究でわかっている。メダカを用いる利点は、重篤な発生異常胚であっても、標識遺伝子座における突然変異を発生中に確実に同定できるという点にある。例えば、ほとんどの優性致死胚は、表現型による突然変異判定後、数日たってから死亡する。

2. γ 線誘発特定座位突然変異

メダカ特定座位突然変異において、 F_1 生存性の「生存突然変異」は、マウスでのいわゆる特定座位突然変異に相当する指標である。これまでに得られた γ 線誘発生存突然変異率は、マウス特定座位突然変異率 (Russell and Kelly, 1982) とほぼ同等であり、メダカ特定座位検出系が環境変異原の遺伝リスクを研究する実験系として有効であることを確認した。一方、胚発生過程で検出する「総突然変異」は優性致死によって淘汰されてしまう特定座位突然変異を含んでいるため、リスク推定という点からはあまり重要ではないかもしれない。しかし、これを用いれば突然変異の初発事象に近いものが解析できるはず

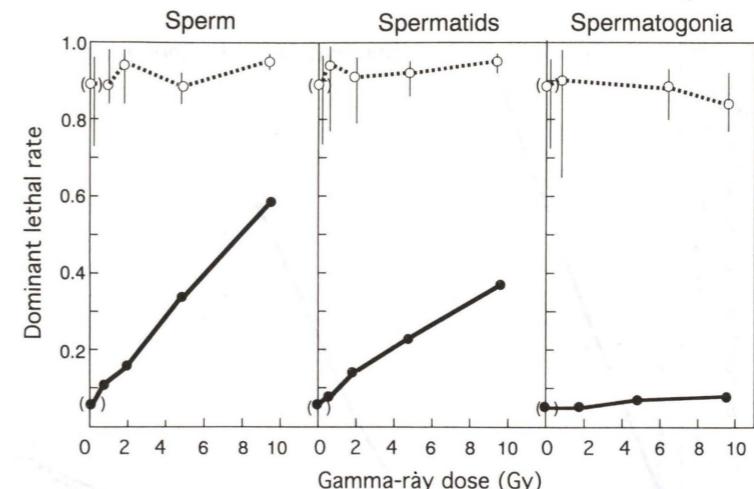


Fig. 2 Dose-response curves for dominant lethals induced in sperm (left), spermatids (middle) and spermatogonia (right) by γ -rays (0.95 Gy/min). Solid lines: dominant lethal rates in the wildtype embryos. The upper and lower 90% confidence limits were so small that they fall within the size of each symbol. Dotted lines: dominant lethal rate in the specific-locus mutant embryos. Vertical bars indicate upper and lower 90% confidence limits.

である。

Fig. 1 に、雄親 (サクラ集団) を γ 線照射した場合の、 F_1 における 3 標識遺伝子座平均の突然変異率を示す。生存突然変異率（白丸）、総突然変異率（黒丸）とも線量とともに増加したが、被曝した雄の生殖細胞の段階によって変異率が大きく異なっていた。

Fig. 2 に同じ実験で得られた F_1 における優性致死率を示す。 F_1 全体の優性致死率（黒丸）は線量依存性がみられたが、おもしろいことに、総突然変異体の中での致死率（白丸）は、線量や照射された雄生殖細胞の段階にかかわりなく、約 0.9 と非常に高かった。精子や精細胞が被曝した場合には突然変異体の致死率が高いことはある程度予測できたが、精原細胞が被曝した場合でも同じように致死率が高いことは新しい発見であった。また、メダカ精子の誘発突然変異の倍加線量（自然突然変異率を 2 倍にするのに必要な線量）が 2~3 cGy であり、他の実験系（数 10 cGy 程度）に比べてけた違いに低く、高感受性であることもわかった。そもそも γ 線誘発総突然変異は生存突然変異よりも約 10 倍変異率が高いので、総突然変異をメダカ精子で調べれば、環境変異原を非常に高感度にモニタリングできるものと思われる。

3. ENU 誘発特定座位突然変異

ENU を雄親メダカに処理した場合は、特定座位突然変異率や優性致死率の濃度一効果関係が γ 線の場合のように単純ではなかった。総突然変異率は、精子・精細胞期処理では濃度が上がるとともに直線的に増加したが、精原細胞期処理では直線的には増加しなかった

(Fig. 3, 黒丸)。一方、生存突然変異率はその逆で、精子・精細胞期処理では直線的ではなかったのに対して、精原細胞期処理では直線性がみとめられた (Fig. 3, 白丸)。

F_1 胚全体における優性致死率の濃度一効果関係も非常に複雑で、精子・精細胞期処理では 2 次曲線的に増加したが、精原細胞期処理ではどの濃度でも優性致死そのものがみとめられなかった (Fig. 4, 黒丸)。また、総突然変異は、精子が最も感受性が高かったのに対して、優性致死では精細胞が最も感受性が高く、2つの遺伝的指標の間で誘発されやすい生殖細胞が異なっていた。さらに、総突然変異胚の致死率は、 γ 線とは異なり、濃度によって著しく異なっていた (Fig. 4, 白丸)。特に、精原細胞期処理の場合はそれが顕著で、0.1 mM では約 80 % もの総突然変異体が死亡したが、0.5 mM では約 22 %、1 mM では約 10 % しか死亡しなかった。以上の結果から、ENU による特定座位突然変異と優性致死の誘発メカニズムは異なる可能性があり、さらに、処理する濃度によっても誘発メカニズムが異なる可能性が示された。

4. 雄親被曝による F_1 胚の DNA 変異

前述したように、 γ 線照射された雄から得られた特定座位突然変異胚（総突然変異胚）は、線量によらず約 9 割が優性致死をともなっていた。そこで、われわれは「 γ 線で雄生殖細胞に誘発される遺伝子変化の主なものは、線量によらず複数遺伝子座欠失のような大きなゲノム変異であり、これらが特定座位突然変異と優性致死を同時に引き起こしているのではないか」という仮説を立てた。

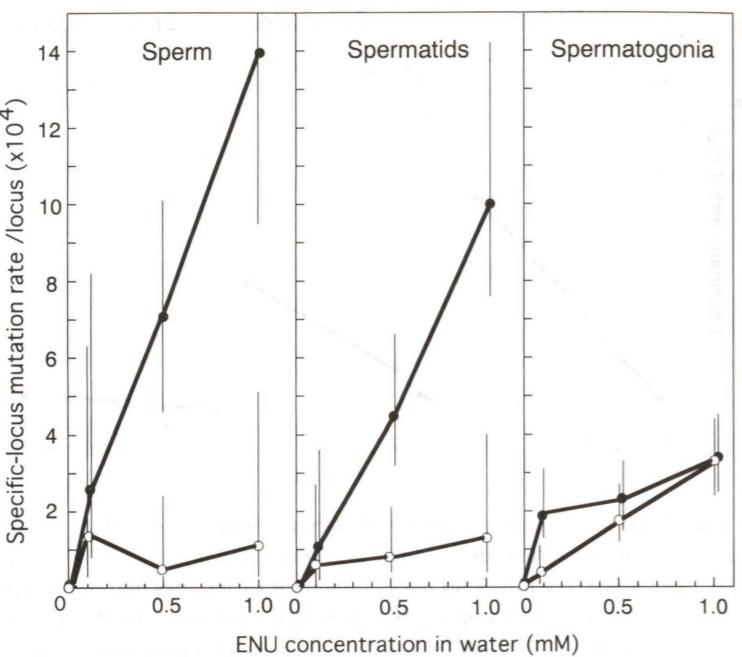


Fig. 3 Dose-response curves for total mutations (TM) (closed circles) and viable mutations (VM) (open circles) induced in sperm (left), spermatids (middle) and spermatogonia (right) by ethyl-nitrosourea (ENU) (2h, 27°C). Vertical bars indicate upper and lower 90% confidence limits.

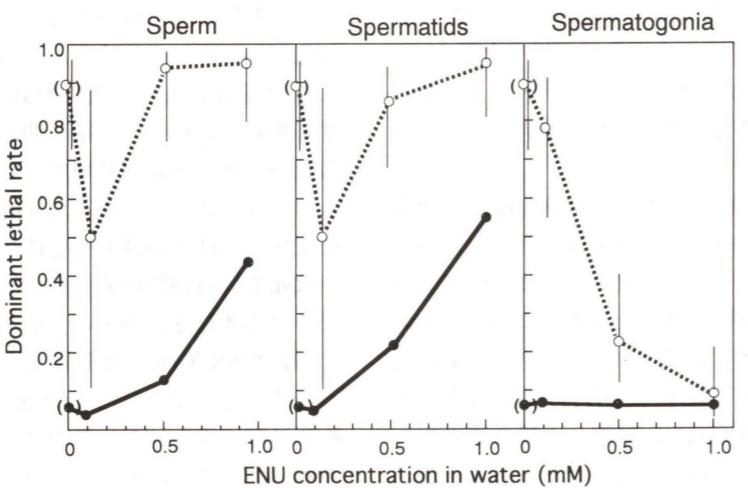


Fig. 4 Dose-response curves for dominant lethals induced in sperm (left), spermatids (middle) and spermatogonia (right) by ENU (2h, 27°C). Solid lines: dominant lethal rate in wildtype embryos. The upper and lower 90% confidence limits were so small that they fall within the size of each symbol. Dotted lines: dominant lethal rates in the specific-locus mutant embryos. Vertical bars indicate upper and lower 90% confidence limits.

そして、大きな欠失の検出に適しているとされている AP-PCR 法を用いて、雄親被曝による F_1 胚の DNA 変異をできるだけ多くのゲノム領域について調べることにした。AP-PCR 法とは、1 個のプライマーで、ゲノムの多数の箇所から DNA 断片を増幅する方法である。メダカでは、Kubota らが生殖細胞突然変異検出方法として

導入し (Kubota, et al., 1992, 1995)，その後、Wada らが増幅される DNA 断片のうち 170 個を AP-PCR マーカーとして染色体地図上にマッピングした (Wada et al., 1995)。

われわれは、野生型の近交系 HNI (Hyodo-Taguchi, 1980) の雄に 4.75 Gy の γ 線を照射し、非照射テスター

Table 1 Frequency of band loss from fingerprints of embryos from non-irradiated and irradiated males^a

Dose (Gy)	no. males	no. embryos	no. markers ^b	Band loss		
				no. lost/total no. ^c	%	(LL/UL)
0	Viable	7	20	65/1290	0	(0/0.209)
	Spontaneous lethal	7	20	24/451	0.22	(0.050/1.00)
4.75	Viable	9	24	58/1258	0.079	(0.018/0.36)
	Dominant lethal	7	20	58/1716	3.4	(2.7/4.1)

^a Male germ cells of the HNI strain were exposed to γ -rays (4.75 Gy, 0.95 Gy/min) as sperm and spermatids, and F_1 embryos were obtained by crossing irradiated males with unirradiated tester females.

^b Number of AP-PCR markers examined per embryo.

^c Sum of the number of AP-PCR markers examined per embryo, or (number of embryos used) \times (number of AP-PCR markers) - (number of bands failed to be amplified).

^d 90% upper/lower confidence limits of percentage of band loss.

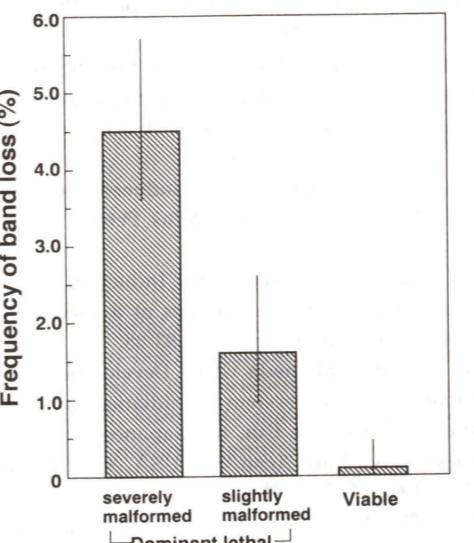


Fig. 5 Relationship between severity of malformation of embryos and frequency of band loss from their genomic fingerprints. All the embryos including viable ones were the progeny of males whose sperm or spermatids were γ -irradiated (4.75 Gy). Frequency of band loss was expressed as (total number of band loss)/(total number of bands expected) in the 12 severely malformed embryos (47/1,020) (left column), 8 slightly malformed embryos (11/696) (middle column), and 24 non-malformed normal embryos (1/1,258) (right column), respectively. Severely malformed embryos: embryonic bodies were shorter than 1/2 of the normal ones, slightly malformed embryos: embryonic bodies were longer than 1/2 of the normal ones, but apparently shorter than the normal ones.

メスと交配、精子・精細胞期被曝とみなせる照射後 1 ~ 9 日に受精した個々の F_1 胚からゲノム DNA を抽出し、胚 1 個体につき、ゲノム中に分布する父親系統特異的な 87 個（うち 61 個はマップされている）の AP-PCR マーカーの変異を、フィンガープリント上のバンドの消失を指標として調べた。Table 1 に、観察されたバンド消失延べ数と消失頻度を示した。照射群では、優性致死に至る発生異常胚で約 3.4% (58/1,716) の頻度で消失がみとめられた。ところが照射されていても見かけ上、正常に発生しているものでは消失率が低かった (1/1,258)。さらに、発生異常胚のなかでも胚体の長さが正常の 1/2 以下であったものでは、それ以上の長さのものに比べて有意に消失率が高かった (Fig. 5)。

さて、20 個体の発生異常胚のうち、調べた範囲では消失がみられなかったのは 6 個体のみで、残り 14 個体では、最高 10 バンドまでの消失が複数の連鎖群上に散在してみられた。そのうち 7 個体で同じ連鎖群上にある 2 個以上のマーカーが同時に消失していた（平均の遺伝的距離は約 11 cM）。これらより、優性致死胚はゲノムの多数の箇所に散在的に消失を持っており、しかもそのひとつひとつはかなり大きなものである可能性が示された。さらに、優性致死をともなった b 遺伝子座における特定座位突然変異胚 10 個体のうち、8 個体が b 遺伝子座に連鎖する AP-PCR マーカー（遺伝的距離はオスで約 1.5 cM、メスで約 30 cM）の消失がみられた。一般的に優性致死の原因となる遺伝子の変化は、染色体異常だとされているが (Bateman and Epstein, 1971), AP-PCR マーカーを用いた今回の実験から、「多重欠失」も優性致死の原因となっていることが示唆された。

5. 生殖細胞被曝によって F_1 に誘発される体細胞突然変異

これまでの研究で、生殖細胞に生じた突然変異が F_1 世代の発生過程で「除かれる」現象を調べてきた。しか

し最近、放射線被曝した細胞が何回か分裂をするうちに突然変異が顕在化してくるいわゆる「遺伝的不安定性」が注目されるようになり、生殖細胞が被曝した場合にも、 F_1 世代で遅延的に突然変異が顕在化するかどうかが問題となっている。受精後発生過程で突然変異が顕在化すれば、その個体は変異した遺伝子座についてモザイク個体となる。そこで、メダカを用い、今度は発生過程で突然変異が顕在化し、「新しく」生じてくるようにみえる問題を、受精後早い時期に可視突然変異のモザイク個体を検出できる実験系を作つて調べることにした。

まず、モザイク突然変異を検出できる標識遺伝子 *wl* を持つをテスター (*T5 : b/b ; If/If ; gu/gu ; wl/wl ; i^b/i^b*) を交配によって新しく作成した(未発表)。次に野生型近交系 HNI オス成魚に Cs-137 γ 線 (0.95 Gy/min) を全身照射し、無照射の *T5* メスと交配、 F_1 受精胚について、5 標識遺伝子座における全身変異 (whole-body mutation)，および *wl* 遺伝子座におけるモザイク変異 (mosaic mutation) を発生中と孵化後に検索した。

その結果、*wl* の野生型では発生中の胚の白色素胞は黄色であるが、変異型胚では白色を示す体色変異であり、表現型によりモザイク変異体が容易に同定できることがわかった。自然突然変異によって生じる *wl* 遺伝子座のモザイク変異体の頻度は約 1.2×10^{-3} (12/9,907) であった。精子、精細胞が被曝した場合、*wl* 遺伝子座におけるモザイク変異体の出現頻度は線量依存的に増加し、全身変異頻度よりも高かった。しかし、そのほとんどは発生異常をともなっており、ふ化せずに死亡した。また、上述の雄配偶子ではなく接合子すなわち胚の発生の種々の時期に照射して得られたモザイク変異体にみられる変異白色素胞細胞の分布から、精子、精細胞被曝によって生じた初発変化が、受精後に体細胞突然変異として顕在化していく時期は、発生のかなり早い時期である可能性が示された(未発表データ)。生殖細胞のゲノムに生じたどのような初発変化が受精後の時間経過とともに突然変異として顕在化していくか、さらに、このような突然変異が F_2 にも伝わるのか、などを今後引き続き調べたい。

参考文献

- Bateman, A. J. and S. S. Epstein (1971) Dominant lethal mutations in mammals, in: A. Hollaender (Ed.), *Chemical mutagenesis-Principles and methods for their detection*, Plenum, New York, pp. 541-568.
- Chakrabarti, S., G. Streisinger, F. Singer and C. Walker (1983) Frequency of gamma-ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, *Genetics*, 103, 109-123.
- Hyodo-Taguchi, Y. (1980) Establishment of inbred strains of the teleost, *Oryzias latipes*, *Zool. Mag. (Tokyo)*, 89, 283-301 (in Japanese).
- Kubota, Y., A. Shimada and A. Shima (1992) Detection of γ -ray-induced DNA damages in malformed dominant lethal embryos of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using AP-PCR fingerprinting, *Mutat. Res.*, 283, 263-270.
- Kubota, Y., A. Shimada and A. Shima (1995) DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 330-334.
- Russell, W. L. and E. M. Kelly (1982) Specific-locus mutation frequencies in mouse stem-cell spermatogonia at very low radiation dose rates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 539-541.
- Schroeder, J. H. (1969) X-ray induced mutations in the poeciliid fish, *Lebistes reticulatus* Peters, *Mutat. Res.*, 7, 75-90.
- Shima, A. and A. Shimada (1988) Induction of mutations in males of the fish *Oryzias latipes* at a specific locus after γ -irradiation, *Mutat. Res.*, 198, 93-98.
- Shima, A. and A. Shimada (1991) Development of a possible nonmammalian test system for radiation-induced germ-cell mutagenesis using a fish, the Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2545-2549.
- 富田英夫 (1990) 系統と突然変異体、メダカの生物学 (江上信雄、山上健次郎、嶋 昭紘編), 東京大学出版会, pp. 111-128.
- Wada, H., K. Naruse, A. Shimada and A. Shima (1995) Genetic linkage map of a fish, the Japanese medaka *Oryzias latipes*, *Mol. Marine Biol. Biotech.*, 4, 269-274.
- Walker, C. and G. Streisinger (1983) Induction of mutations by γ -rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos, *Genetics*, 103, 125-136.

Environ. Mutagen Res., 20 : 119 - 121 (1998)

シンポジウム

本稿は 1997 年 12 月 3-5 日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第 26 回大会のシンポジウム「生殖細胞変異研究の新しい動向」(企画: 渋谷徹)で発表された(座長: 上口勇次郎、嶋 昭紘)。

雄マウスの変異原処理による F_1 奇形と自然発生奇形

長尾 哲二¹, 藤川 和男²

¹ (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 生殖生物学研究室 〒257-0025 神奈川県秦野市落合 729-5
² 近畿大学原子力研究所 放射線生物学研究室 〒577-0818 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

Male-mediated teratogenesis and spontaneous teratogenesis in mice

Tetsuji Nagao¹ and Kazuo Fujikawa²

¹ Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-0025, Japan

² Atomic Energy Research Institute, Kinki University
Kowakae 3-4-1, Higashiosaka, Osaka 577-0818, Japan

Summary

Congenital malformations can be induced in the offspring of laboratory animals treated with a mutagen before copulation. Spectra of external malformations in offspring classified as male-mediated F_1 malformations after exposure of paternal mice to mutagens showed no evidence of a mutagen-specificity nor a germ-cell stage-dependent variation. More importantly, none of the spectra differed significantly from the type distribution of spontaneous malformations. When a teratogen was applied at the organogenic stage, embryos whose sires were preconceptually exposed to a mutagen suffered malformations with a higher frequency than those derived from untreated males. Thus, paternal exposure to mutagens can enhance susceptibility of F_1 embryos not only to spontaneous teratogenesis but also to induced malformations.

(This paper, in a session chaired by Yujiro Kamiguchi and Akihiro Shima, was presented to the symposium "A new research trend in germ cell mutagenesis", organized by Tohru Shibuya, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords : male-mediated teratogenesis, spontaneous teratogenesis, susceptibility

緒 言

交配前の雄マウスの生殖細胞を変異原で処理すると、処理された生殖細胞由来の次世代で奇形胎児 (F_1 奇形) の出現頻度が上昇するということが、Nomura (1975) によって報告されて以来、マウス、ラットで同様な現象が繰り返し確認されている (Jenkinson et al., 1987; Kirk

and Lyon, 1984; Nagao, 1987, 1988)。ヒトでも、父親が重度の喫煙者であると、先天奇形の発現率が約 2 倍高くなり、特に顔面裂が多いとか、ベトナム戦争中に、枯れ葉剤「Agent Orange」に曝露したアメリカ帰還兵に、帰国後先天異常児をもつ率が高いのではないかとする報告があった (Erickson et al., 1984; Lathrop et al., 1984; Field and Kerr, 1988)。しかし、これらの報告は後に否定されており (Aschengrau and Monson, 1989)、ヒトにおける父親起原の奇形については確たる証拠は得られていない (Brown, 1985; Colie, 1993)。環境変異原による生殖細胞の遺伝的傷害に起因する次世代奇形のリ

受付：1998 年 2 月 16 日

受理：1998 年 3 月 5 日

©日本環境変異原学会

スク評価のためには、さらに動物実験を重ね、次世代奇形の発生機構に関する知見の蓄積が必要である。

本稿では、まず雄処理による次世代奇形(以下、F₁奇形)の研究法を紹介した後、雄マウスの生殖細胞処理によるF₁奇形のスペクトラムの特徴を問題にし、自然発生奇形と比較してF₁奇形の特徴を論ずる。

1. F₁奇形誘発実験系

雄マウスの生殖細胞処理による「F₁奇形」実験では、成熟雄マウスに変異原物質を投与した後、一定の間隔をおくて無処理雌マウスと交配させ、妊娠末期に帝王切開して胎児観察する。変異原物質を作用させてから雌と交尾するまで一定の間隔をおくことにより、どの時期の雄生殖細胞に傷害を与えたかが判る仕組みになっている。すなわち、変異原物質を雄マウスに投与し、1~21日のうちに同系統の雌と交尾すれば還元分裂後細胞(精子、精細胞)、64日以降に交尾すれば精原細胞のときに、それぞれ変異原物質の処理を受けた細胞からF₁ができたことになる。交尾した雌は妊娠18日に帝王切開し、胚死亡の有無を調べ、児の形態(外表および骨格の異常)を観察する。

始原生殖細胞処理によるF₁奇形を調べるには、妊娠10日に変異原物質を投与した雌マウスを自然分娩させて得た雄出生児が成熟期(8週以降の週齢)に達するのを待って、無処理雌と交配させればよい。この実験でも妊娠18日に帝王切開により胎児を摘出し形態観察する。

なお、F₁奇形の観察は出生後でもできるが、この時期では致死性の奇形は観察できないので、検出できる奇形のタイプは限られる(Nomura, 1982)。

2. F₁奇形は自然発生奇形の頻度を上昇させる

Fig. 1には、ENU(ethylnitrosourea)、MNU(methylnitrosourea)、TEM(triethylenemelamine)、MMC(mitomycin C)、PCZ(procyclidine)、PMS(propyl methanesulfonate)を用いて、ICRマウスの精原細胞を処理したときの、次世代に誘発された外見奇形のタイプ分布を示している。いずれのスペクトラムも変異原による有意差は認められず自然発生奇形のスペクトラムとも統計学的な有意差を示さなかった。Fig. 1には、また、ICRマウスの還元分裂前後の生殖細胞すなわち精子や精細胞、および精原細胞あるいは始原生殖細胞処理によって、F₁胎児に誘発された外見奇形のタイプ分布も示している。ENU、MNU両処理群とも、還元分裂後の細胞、精原細胞あるいは始原生殖細胞処理によって誘発された奇形の主なタイプは、いずれも口蓋裂と外脳症で、外見奇形のスペクトラムには、生殖細胞の発生段階による差も認められなかった(Nagao, 1987, 1988; Wada et al., 1994)。

Fig. 2には、ICR、C57BLおよびA/Jaxの精原細胞をENUに曝露したときに誘発されるF₁奇形の相対頻度を示している。誘発されたF₁奇形のタイプは、それぞれのマウスの系統に特異的な自然発生奇形のタイプとはほぼ一致した。

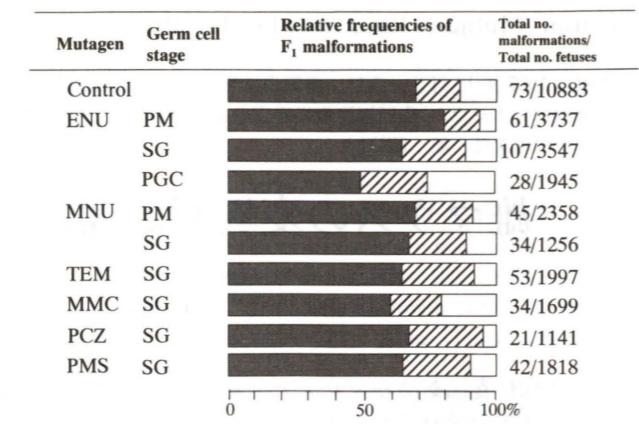


Fig. 1 Relative frequencies of external malformations detected in fetal offspring of ICR males treated with various kinds of mutagens at various germ-cell stages (data from Nagao, 1987, 1988; Nagao and Fujikawa, 1990; Wada et al., 1994). Abbreviations are: PM: post-meiotic germ cells; SG: spermatogonial stem cells; PGC: primordial germ cells. ■: cleft palate; ▨: dwarfism; □: others.

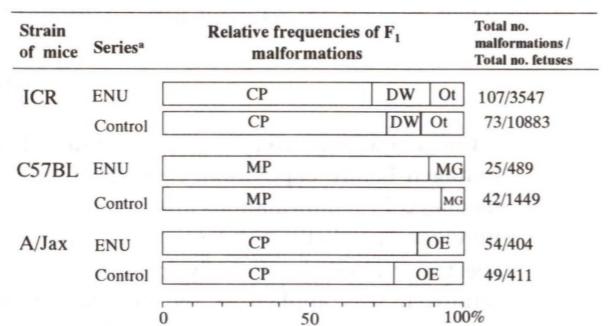


Fig. 2 Relative frequencies of external malformations detected in fetal offspring of three different strains of mice treated with ethylnitrosourea (ENU) at spermatogonial stem cell stage (data from Nagao, 1987, 1988; Nagao and Fujikawa, 1990, 1996; Nagao, unpublished). a, Paternally ENU-treated (ENU) or untreated (Control) series. Abbreviations are: CP: cleft palate; DW: dwarfism; Ot: others; MP: microphthalmia; MG: micrognathia; OE: open eyelid.

度を示している。誘発されたF₁奇形のタイプは、それぞれのマウスの系統に特異的な自然発生奇形のタイプとはほぼ一致した。

以上の結果から、F₁奇形の大部分は自然発生奇形が自然発生頻度以上で出現したものであると提唱する。

3. 変異原処理された生殖細胞由来のF₁胎児は誘発奇形に対しても高感受性である

自然発生奇形のみならず、誘発奇形に対しても、親世

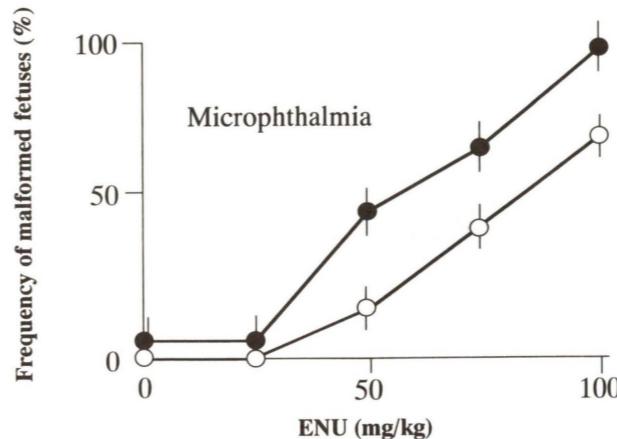


Fig. 3 Frequencies of fetuses with microphthalmia observed 10 days later after ethylnitrosourea (ENU) exposure on day 8 of gestation to pregnant ICR females that had been conceived by ICR males treated with ENU at spermatogonial stem cell stage (●) or by untreated ICR males (○). Vertical lines represent standard errors of the frequencies.

代生殖細胞処理が増感効果を示すか否かについて調べた。10週齢のICR雄マウスにENUを腹腔内投与して、投与後64日以降に無処理のICR雌マウスと交配させた。すなわち、受精に関与した精子は、変異原物質で処理したときには精原細胞であった生殖細胞になる。このようにして得られた妊娠マウスの妊娠8日に、催奇形物質としてENUを腹腔内投与した。比較のため無処理の雄マウスと交配させて得られた妊娠マウスにも同様に妊娠8日にENUを投与した。妊娠マウスは妊娠18日に帝王切開して胎児を摘出し、生死を判別後、体重を測定し、外見と骨格の観察をした(Nagao and Fujikawa, 1998)。結果の一部をFig. 3に示す。この図は、雄生殖細胞を変異原物質で処理し、さらに器官形成期胚を催奇形物質で処理した場合の奇形出現率は、器官形成期胚のみを催奇形物質で処理した場合の奇形出現率よりも有意に高かったことを示す。このような結果は、親世代の生殖細胞の変異原処理は次世代胎児の催奇形物質感受性を高進しうることを示唆する。

結語

父親に原因がある奇形発生は、父親由来のある種の突然変異が胎児の自然発生奇形に対する感受性を高めた結果である。このことを示す証拠をマウスの実験で得た。F₁胎児の感受性の高進は、催奇形物質による誘発奇形に関しても起きていることを示唆する証拠も得た。誘発奇形が関わるこの問題は、われわれにとって今後の重要課題である。

謝辞

本研究の一部は、厚生省厚生科学研究費および平成9年度土川記念哺乳動物研究助成基金により行われた。

参考文献

- Aschengrau, A. and R. R. Monson (1989) Paternal military service in Vietnam and the risk of spontaneous abortion. *J. Occup. Med.*, 31, 618-623.
- Brown, N. A. (1985) Are offspring at risk from their father's exposure to toxins? *Nature (London)*, 316, 110.
- Colie, C. F. (1993) Male mediated teratogenesis, *Reprod. Toxicol.*, 7, 3-9.
- Erickson, J. D., J. Mulinarei and P. W. McClain (1984) Vietnam veterans' risks for fathering babies with birth defects. *JAMA*, 252, 903-912.
- Field, B. and C. Kerr (1988) Behavior and consistent patterns of abnormality in offspring of Vietnam veterans. *J. Med. Genet.*, 25, 819-826.
- Jenkinson, P. C., D. Anderson and S. D. Gangolli (1987) Increased incidence of abnormal foetuses in the offspring of cyclophosphamide-treated male mice. *Mutat. Res.*, 188, 57-62.
- Kirk, K. M. and M. F. Lyon (1984) Induction of congenital malformations in the offspring of male mice treated with X-rays at pre-meiotic and post-meiotic stages. *Mutat. Res.*, 125, 75-85.
- Lathrop, G. D., W. H. Wolfe, R. A. Albanese and P. M. Maynahan (1984) Project Ranch Hand II. An epidemiological investigation of health effects in Air Force personnel following exposure to herbicides. San Antonio, Texas: Aerospace Medical Division.
- Nagao, T. (1987) Frequency of congenital defects and dominant lethals in the offspring of male mice treated with methylnitrosourea. *Mutat. Res.*, 177, 171-178.
- Nagao, T. (1988) Congenital defects in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea. *Mutat. Res.*, 202, 25-33.
- Nagao, T. and K. Fujikawa (1990) Genotoxic potency in mouse spermatogonial stem cells of triethylenemelamine, mitomycin C, ethylnitrosourea, procarbazine, and propyl methanesulfonate as measured by F₁ congenital defects. *Mutat. Res.*, 229, 123-128.
- Nagao, T. and K. Fujikawa (1996) Frequency and type of malformations in the offspring of C57BL/6 male mice treated with ethylnitrosourea. *Cong. Anom.*, 36, 29-33.
- Nagao, T. and K. Fujikawa (1998) Modified susceptibility to teratogenesis in the offspring of male mice exposed to mutagen. *Cong. Anom.*, 38, 1-8.
- Nomura, T. (1975) Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethan treatment. *Cancer Res.*, 35, 264-266.
- Nomura, T. (1982) Paternal exposure to X rays and chemicals induces heritable tumors and anomalies in mice. *Nature (London)*, 296, 575-577.
- Wada, A., M. Sato, H. Takashima and T. Nagao (1994) Congenital malformations in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea at the embryonic stage. *Carcinogen. Mutagen.*, 14, 271-279.

本稿は 1997 年 12 月 3-5 日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第 26 回大会のシンポジウム「生殖細胞変異研究の新しい動向」(企画: 渋谷 徹) で発表された(座長: 上口勇次郎、嶋 昭弘)。

ヒト精子を用いた染色体突然変異原性試験の最近の状況

上口 勇次郎

旭川医科大学生物学教室 〒 078-8510 旭川市西神楽 4-5-3-11

Recent aspects of chromosomal mutagenicity testing with human spermatozoa

Yujiroh Kamiguchi

Department of Biological Sciences, Asahikawa Medical College,
4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa 078-8510, Japan

Summary

Recent aspects of chromosomal mutagenicity testing with human spermatozoa were reviewed with emphasis on the development of new research techniques. These include (1) sperm chromosomal mutagenicity test of chemical metabolites by applying a metabolic activator, S9 (microsomal fraction of rat liver cells), (2) Detection of mutagen-induced sperm chromosome translocations using a chromosome painting method, (3) micronucleus test in 2-cell embryos after *in vitro* fertilization of hamster oocytes with mutagen-treated human spermatozoa, (4) detection of aneuploid human spermatozoa using multicolor FISH (fluorescence *in situ* hybridization) on sperm nuclei, and (5) chromosome analysis of human spermatozoa with aberrant head morphologies after microinjection of the sperm into mouse oocytes. Outline of these methods and new findings thereby obtained were briefly mentioned. The merit and demerit of these methods and their applicability to genetic risk assessment in humans are also discussed.

(This paper, in a session chaired by Yujiroh Kamiguchi and Akihiro Shima, was presented to the symposium "A new research trend in germ cell mutagenesis", organized by Tohru Shibuya, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords : human spermatozoa, mutagenicity testing, sperm chromosome analysis, sperm nuclear FISH, micronucleus test

緒 言

ヒト精子の染色体分析法は種々の環境変異原の遺伝的影響を直接ヒトの生殖細胞で調査する手段として重要である。この方法が最初に報告されてから (Rudak et al., 1978), まもなく 20 年になろうとしている。研究は精子染色体標本作製法の改良から始まり, 80 年代にはヒト一

般集団における精子染色体異常自然発生率の調査, 相互転座染色体保因者の精子染色体分析など, 現象論的な報告が主流であった。80 年代末から 90 年代には, 精子染色体に及ぼす環境変異原の影響の *in vitro* 調査, 放射線・化学療法を施された癌患者の精子染色体調査などが報告されるようになり, 研究は次第に精子染色体異常の原因論へ向かってきた。

最近, この分野に新たな研究方法として, (1) S9 系を用いた化学物質代謝産物の影響調査法, (2) 蛍光 *in situ* 分子雜種形成(FISH)を利用した精子染色体着色法, (3) 精子核 FISH 法, (4) 2 細胞期小核試験, (5) 卵細胞質内

受付: 1997 年 12 月 15 日

受理: 1998 年 1 月 12 日

©日本環境変異原学会

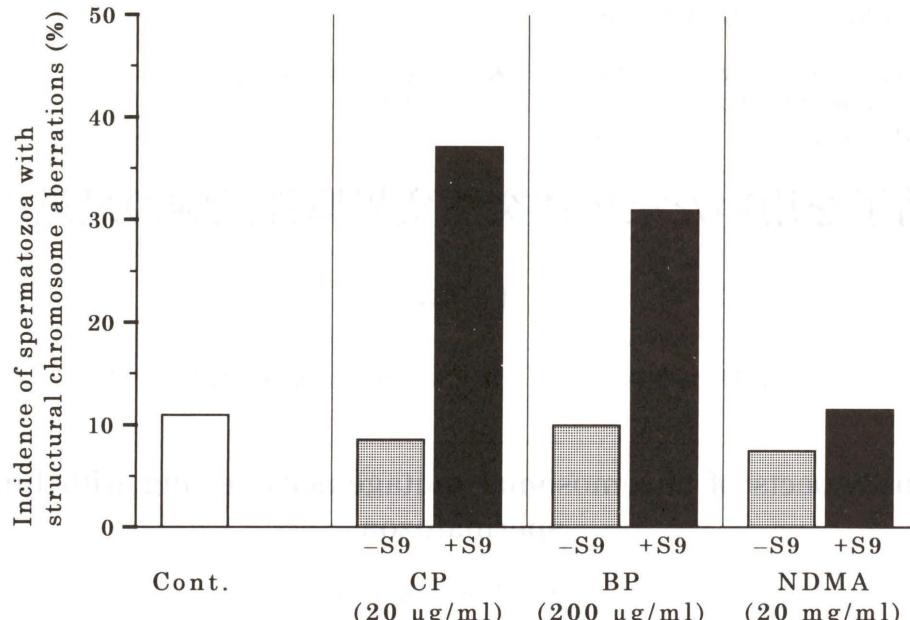


Fig. 1 Incidence of human spermatozoa with structural chromosome aberrations after *in vitro* exposure to chemicals in combination with (+) or without (-) S9 treatment. Cont., non-treated control; CP, cyclophosphamide; BP, benzo(a)pyrene; NDMA, N-nitrosodimethylamine.

精子注入 (ICSI) による精子染色体分析法などが導入され、研究は新たな進展をみせている。ここでは、これらの新しい研究の成果とその発展性について簡単に紹介したい。

化学物質代謝産物の精子染色体異常誘発能

すでにわれわれは数種の制癌剤についてヒト精子染色体に及ぼす影響を *in vitro* で調査し、bleomycin, daunomycin, methylmethanesulfonate, triethylenemelamine が構造的染色体異常を誘発すること、それに対して cyclophosphamide (CP) は異常を誘発しないということを報告した (Kamiguchi et al., 1995)。一方、培養細胞を用いた実験系では、CP と S9 (ラット肝細胞 microsome 分画) を同時に作用させることによって初めて構造的染色体異常が誘発される (CP の代謝産物が異常誘発能をもつ) ことが知られており、ヒト精子の実験系でも同様の機序の存在が示唆された。そこでわれわれは、培養細胞系で代謝産物が異常誘発能をもつと報告されている物質として CP の他に benzo(a)-pyrene (BP) および N-nitrosodimethylamine (NDMA) を選定し、これら 3 種の薬品のヒト精子染色体に及ぼす影響を S9 系を用いて調査した (渡邊ら, 1997)。

各薬品の処理濃度は培養細胞でのデータ (石館 基, 1987)に基づいて決定した (CP, 20 µg/ml; BP, 200 µg/ml; NDMA, 20 mg/ml)。射精後の精子は受精能力を長時間保持できないので、処理時間 (2 時間) について培養細胞+S9 系と精子+S9 系の結果を組み合わせるこ

くしなければならなかった。処理後、精子懸濁液を遠心し、さらに、沈殿物を 80 % パーカール溶液上に積層して遠心し、精子と S9 残渣を分離した。薬品処理精子をハムスター卵へ体外受精させ、1 細胞期に染色体標本を作製してヒト精子由来核板の染色体異常出現率を調査した。

CP+S9 群における染色体異常精子の出現率 (52/140, 37.1%) は CP 単独処理 (-S9) 群 (11/128, 8.6%) と比べて有意に増加した (Fig. 1)。同様に、BP+S9 群の異常精子出現率 (39/126, 31.0%) は BP 単独処理群 (12/120, 10.0%) より有意に高かった。一方、NDMA 群では、+S9 群 (15/129, 11.6%) と -S9 群 (8/107, 7.5%) の間に有意差はなかった。各薬品の単独処理群の異常精子出現率は未処理対照群の場合 (12/109, 11.0%) とほぼ同率であった。CP+S9 群、BP+S9 で誘発された構造異常をタイプ別にみると、染色体型切断の頻度が最も高率であり、次いで染色分体型交換、染色分体型切断、染色体型交換の順であった (Fig. 2)。また、CP と S9 の混合液を 37°C で 6 時間保温した後に -80°C で凍結保存し、解凍液を精子に作用させた場合にも異常の誘発が認められた。しかし、BP の場合には同様の処理、保存をした液に異常誘発能が認められなかった。また、NDMA+S9 群の場合、培養細胞系とは異なり、染色体異常は誘発されなかった。この理由の一つとして、異常誘発能をもつ代謝産物の生成には細胞質内の代謝系も関与しているという可能性が考えられる (精子は細胞質をもっていない)。今後さらに研究が必要であるが、培養細胞+S9 系と精子+S9 系の結果を組み合わせるこ

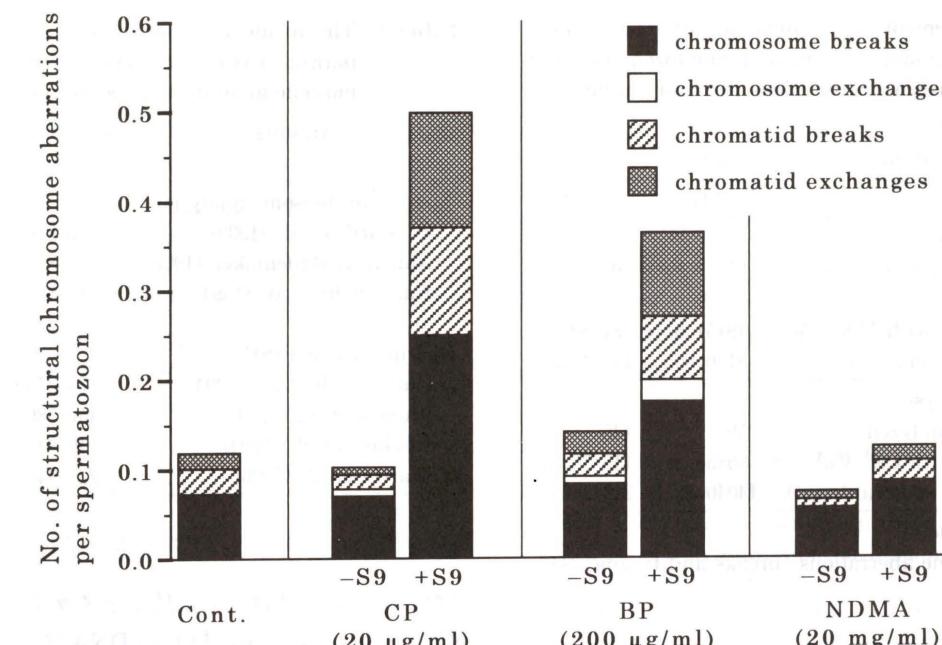


Fig. 2 Number of structural chromosome aberrations per spermatozoon after *in vitro* exposure to chemicals in combination with (+) or without (-) S9 treatment. For legend, see explanation of Fig. 1.

とにより、化学物質の染色体異常誘発機序を(1)物質の直接作用、(2)肝臓代謝産物の作用、(3)薬品処理細胞の細胞質内代謝産物の作用、(4)肝臓および細胞質内の両代謝系による産物の作用、に区別して考えることができるかもしれない。

染色体着色法による精子染色体分析

染色体異常の次世代 (出生児) への伝達という点からいうと、一般に切断型異常よりも転座型異常の方が高い危険性をもつと考えられる。なぜなら、切断型異常は卵割の過程で欠失型の異常となり、異常胚の大多数が発生初期に淘汰されるのに対し、転座型異常をもつ胚の生存能は前者より高いと考えられるからである。事実、新生児では転座型異常が欠失型異常よりもはるかに高頻度に出現している。したがって、変異原のもつ転座型染色体異常誘発能を正確に評価できる技術の開発は重要である。

FISH による特定染色体の着色法は小さな転座の識別も可能にするので、上述の目的に叶うものである。この方法は体細胞染色体で開発されたものであるが、われわれはそれがヒト精子染色体にも応用できることを報告した (Cui et al., 1994)。その後、Kusakabe ら (1996) は 2 番染色体への FISH を用いて制癌剤 neocarzinostatin の転座誘発能をヒト精子で詳細に検討した。その結果、この薬品の転座誘発能は精子において体細胞 (リンパ球) の場合の約 2 倍高く、次世代への転座型異常の伝達リスクの高いことが明らかとなった。このような特

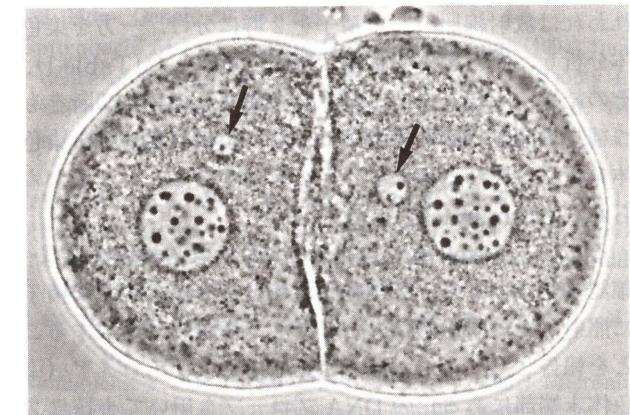


Fig. 3 A two-cell embryo developed from a hamster oocyte penetrated by a gamma-irradiated human spermatozoon. Arrows indicate micronuclei.

定薬品に対する精子染色体の反応は、変異原のもつ遺伝的影響を評価するうえで今後留意すべき点であろう。

小核試験による精子染色体傷害の検出

これまで述べてきたように、精子染色体分析は変異原の遺伝的影響評価法として有用である。しかし、高度な染色体標本作製技術を必要とし、時間もかかるという難点をもっていることは否めない。そこで、より簡便な方法の開発が模索してきた。その一つが小核試験である。この方法は、変異原で処理した精子を受精させた卵を 2 細胞期まで体外培養し、軽く押しつぶして小核の有無を

Table 1 Measurement of gamma-ray-induced chromosome damage in human spermatozoa: comparison between micronucleus test and chromosome analysis

Assay system	gamma-ray dose	
	1.11	2.13
<u>Micronucleus test</u>		
No. of 2-cell embryos examined	95	98
No. of embryos with MN ^a (%)	49(51.6)	81(82.7)
No. of MN (per embryo)	81(0.85)	147(1.50)
<u>Chromosome analysis</u>		
No. of sperm analyzed	159	145
No. of sperm with CA ^b (%)	80(50.3)	115(79.3)
No. of CA (per spermatozoon)	140(0.88)	210(1.45)

^a MN, micronuclei

^b CA, chromosome aberrations (breaks and fragments)

顕微鏡下で調査するという簡単なものである。変異原の作用で生じた染色体断片（動原体をもたない）は第1卵割の際に細胞極へ移動できず（核内へ取り込まれない）、細胞質中に小核を形成する（Fig. 3）。小核の数が染色体断片の数を反映しているかどうかを確かめるために、われわれは放射線照射した精子を2群に分け、一方を染色体分析し、他方を小核試験で調べて比較した（Table 1）。その結果、小核をもつ2細胞胚の頻度と染色体切断をもつ精子の頻度はよく一致しており、小核試験が精子染色体分析法に代わる簡便法として有効であることが確かめられた（Kamiguchi et al., 1991）。

その後、Tusellら（1995）はわれわれの結果を追試・確認するとともに、2細胞胚における小核出現率が精子に照射した放射線線量とともに直線的に増加することを報告した。また、彼らは動原体およびテロメア（染色体末端部にある）のDNAプローブを用いて小核に2色同時FISHを施し、染色体断片由来の小核（テロメアのシグナル陽性）と染色体をまるごと含む小核（動原体のシグナル陽性）を区別する方法を開発した（Tusell et al., 1996）。この方法による調査の結果、テロメア陽性の小核のみならず動原体陽性の小核にも放射線線量增加とともに増加が認められた。後者の増加の原因には、動原体部分での切断、1細胞期に生じた転座型異常の二次的染色体不分离（モザイクの生成）などが考えられ、この方法は放射線照射によって生じた構造異常が細胞分裂過程でどのような挙動を示すのかを推定するうえで有用と思われる。

精子核FISHによる染色体異常の検出

上述の小核試験でもなお、ヒト精子とハムスター卵を体外受精させなければならないという煩わしさが残る。そこで、さらに簡便な方法として精子核FISH法が考案

Table 2 The incidence of aneuploid spermatozoa: comparison between two assay systems, sperm chromosome analysis and sperm nuclear FISH

Authors	No. of sperm analyzed	Aneuploidy (%)
Sperm chromosome analysis		
Brandriff et al. (1990)	5,000	2.1%
Martin & Rademaker (1990)	6,821	3.9%
Kamiguchi et al. (1994)	15,864	1.4%
Sperm nuclear FISH		
Guttenbach et al. (1994)	76,253	15%
Miharu et al. (1994)	450,580	7%
Bischoff et al. (1994)	40,641	19%
Martin et al. (1996)	225,846	7%

された。この方法は、射精精子をスライドグラスに擦り付け、特定の染色体に特有のDNAプローブを用いてFISHを行うというものであり、短時間に多数の精子を分析できるという利点がある。構造的染色体異常の有無の判定には利用できないが、異数性精子出現頻度の調査には有効である。

この方法の精度を確かめるために、一般集団における異数性精子の出現頻度を染色体分析法で調査した場合と精子核FISH法で調査した場合の間で比較してみた。精子核FISH法では特定の染色体における異数性しか検出できないが、精子染色体の異数性はどの染色体グループでもほぼ同じ頻度で生じているので（Kamiguchi et al., 1994）、精子ゲノム全体の異数性頻度を計算によりおよそ推定できる。Table 2に示すとおり、FISH法で得られた異数性頻度は染色体分析で得られた頻度よりかなり高い。その理由としては、2つの研究群で精子集団の質が異なる（FISH法では全射精精子が研究対象になっているのに対し、染色体分析法では卵子に受精できた精子のみが対象となっている）ことも考えられるが、方法論上の欠陥という可能性もある（研究者によって異数性出現率に大きなばらつきがみられる）。今後さらに検討が必要である。

Van Hummelenら（1996）はこの方法を発展させて、構造的染色体異常を検出する方法を開発した。すなわち、第1染色体の動原体およびテロメア近傍のプローブを併用し、動原体のシグナルが1に対してテロメアのシグナルが2または0のものをそれぞれ染色体端部重複または欠失と判定するものである。しかし、この方法では精子の構造的染色体異常の主流を占める染色体切断や転座の検出ができないという難点があり、in vitroでの変異原性試験への応用には不向きであると思われる。

変異原の影響評価研究としては、最近、Martinら（1995, 1997）が化学療法を受けた癌患者（リンパ腫、精巣癌）の精子に精子核FISHを施し、異数性精子の増

Table 3 Chromosomal abnormality in human spermatozoa with morphologically abnormal heads and in immotile spermatozoa

Authors	Sperm characteristics	Chromosome aberrations
Lee et al. (1996)	amorphous head	+
Rybouchkin et al. (1996)	round head	-
In't Veld et al. (1997)	enlarged head	+
Rybouchkin et al. (1997)	immotile (dead)	+

^a Significant increase as compared with the incidence in normal-headed spermatozoa

加は認められなかったと報告している。

卵細胞質内精子注入法による染色体調査

環境変異原の生殖細胞に及ぼす影響を評価する指標として奇形精子の誘発率や精子運動能の低下などが広く用いられている。しかし、仮にこのような精子が受精した場合、どの程度遺伝的影響が現れるのかに関してはまだはっきりしたデータが得られていない。この点を明らかにするためには、特定の性状の精子を選択的に卵子へ注入して（ICSI法）染色体異常の有無を調査するという方法が有効である。

われわれはマウス卵へのヒト精子ICSIによる特定精子の染色体分析法を開発し、頭部形態異常をもつ精子には構造的染色体異常も多いことを報告した（Lee et al., 1996）。その後、同じ実験系を用いて、巨大頭部をもつ精子（In't Veld et al., 1997）や不動性精子（Rybouchkin et al., 1997）にも構造的染色体異常が多いこと、球形頭部をもつ精子では染色体異常が増加していないこと（Rybouchkin et al., 1996）などが報告された（Table 3）。しかし、これらの報告は一般男性または不妊症男性における調査であり、変異原に曝露された精子を用いた研究はまだ行われていない。

ICSI法はかなり高度な技術を要するので、一般的な変異原性試験法として用いるのには不向きであるが、これまで行われてきたヒト精子／ハムスター卵異種間受精系そのものの妥当性、受精時に奇形精子の淘汰があるか否かなどを検討する実験系としては有用であろう。

結語

これまで述べてきたように、最近、ヒト精子染色体研究にS9法、小核試験、FISH法、ICSI法などの新しい技術が導入されて、環境変異原の精子染色体に及ぼす影響がより広範な角度から検討されるようになり、変異原には精子で特有の現れ方をするものがあることも浮き彫りにされてきている。しかし、ヒト精子を用いた研究は、(1) 材料の入手が手軽でないこと、(2) in vivoでの実験ができないこと、(3) 研究方法にも高度の技術を要する

ものが多いことなど、日常の変異原性試験法としてはかなり足取りが重いという難点がある。したがって、今後この分野の研究は培養細胞や実験動物の生殖細胞を用いた変異原スクリーニング研究の後に続く研究として位置づけられるべきであろう。すなわち、他の変異原性試験系でヒトへの影響が強く懸念された変異原に的を絞って詳細な調査を行う、さらには、変異原への職業被曝や医療被曝のケースを重点的に研究するなど、より現実的なヒトへの対応を念頭に置いた研究にその力点を移していくことが望ましいと思われる。

参考文献

- Bischoff, F. Z., D. D. Nguyen, K. J. Burt and L. G. Shaffer (1994) Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence *in situ* hybridization on human sperm, Cytogenet. Cell Genet., 66, 237-243.
- Brandriff, B. F., L. A. Gordon and A. V. Carrano (1990) Cytogenetics of human sperm: Structural aberrations and DNA replication, In: M. L. Mendelsohn, R. J. Albertini (Eds.), Mutation and the Environment, Part B, Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 425-434.
- Cui, X., H. Tateno, I. Hayata, K. Sato and Y. Kamiguchi (1994) A chromosome painting method for human sperm chromosomes using fluorescent *in situ* hybridization, Jpn. J. Hum. Genet., 39, 255-258.
- Guttenbach, M., R. Schakowski and M. Schmid (1994) Incidence of chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive *in situ* hybridization, Hum. Genet., 93, 7-12.
- In't Veld, P. A., F. J. Broekmans, H. F. De France, P. L. Pearson, M. H. E. C. Pieters and R. J. Van Kooij (1997) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomal-abnormal spermatozoa, Hum. Reprod., 12, 752-754.
- 石館 基（監修）（1987）染色体試験データ集、エル・アイ・シー社、東京、pp. 1-511.
- Kamiguchi, Y., H. Tateno and K. Mikamo (1991) Micronucleus test in 2-cell embryos as a simple assay system for human sperm chromosome aberrations, Mutat. Res., 252, 297-303.
- Kamiguchi, Y., H. Tateno and K. Mikamo (1991) Chromosomally abnormal gametes as a cause of developmental and congenital anomalies in humans, Cong. Anom., 34, 1-12.
- Kamiguchi, Y., H. Tateno, Y. Iizawa and K. Mikamo (1995) Chromosome analysis of human spermatozoa exposed to antineoplastic agents *in vitro*, Mutat. Res., 326, 185-192.
- Kusakabe, H., K. Yamakage and N. Tanaka (1996) Detection of neocarzinostatin-induced translocations in human sperm chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization of chromosome 2, Mutat. Res., 369, 51-58.
- Lee, J. D., Y. Kamiguchi and R. Yanagimachi (1996) Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes, Hum. Reprod., 11, 1942-1946.
- Martin, R. H. and A. W. Rademaker (1990) The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements, Cytogenet. Cell Genet.,

- Martin, R. H., A. W. Rademaker and N. J. Leonard (1995) Analysis of chromosomal abnormalities in human sperm after chemotherapy by karyotyping and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), *Cancer Genet. Cytogenet.*, 80, 29-32.
- Martin, R. H., E. Spriggs and A. W. Rademaker (1996) Multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225,846 sperm from 10 normal men, *Biol. Reprod.*, 54, 394-398.
- Martin, R. H., S. Ernst, A. Rademaker, L. Barclay and N. Summers (1997) Chromosomal abnormalities in sperm from testicular cancer patients before and after chemotherapy, *Hum. Genet.*, 99, 214-218.
- Miharu N., R. G. Best and S. R. Young (1994) Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence *in situ* hybridization, *Hum. Genet.*, 93, 502-506.
- Rudak, E., P. A. Jacobs and R. Yanagimachi (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa, *Nature*, 274, 911-913.
- Rybouchkin, A., D. Dozortsev, M. J. Pelinck, P. De Sutter and M. Dhont (1996) Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed

human spermatozoa by their injection into mouse oocytes, *Hum. Reprod.*, 11, 2170-2175.

Rybouchkin, A., J. Benjits, P. De Sutter (1997) Disintegration of chromosomes in dead sperm cells as revealed by injection into mouse oocytes, *Hum. Reprod.*, 12, 1693-1698.

Tusell, L., R. Alvarez, M. R. Caballin, A. Genescà, R. Miró, M. Ribas and J. Egozcue (1995) Induction of micronuclei in human sperm-hamster egg hybrids at the two-cell stage after *in vitro* gamma-irradiation of human spermatozoa, *Environ. Mol. Mutagen.*, 26, 315-323.

Tusell, L., R. Alvarez, A. Genescà, M. R. Caballin, R. Miró and J. Egozcue (1996) Analysis of radiation-induced micronuclei in two-cell human-hamster embryos using telomeric and centromeric FISH probes, *Cytogenet. Cell Genet.*, 74, 102-106.

Van Hummelen, P., X. P. Lowe and A. J. Wyrobek (1996) Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence *in situ* hybridization, *Hum. Genet.*, 98, 608-615.

渡邊誠二・立野裕幸・上口勇次郎 (1997) 化学物質の代謝産物がヒト精子染色体に及ぼす影響:S9系を用いた解析, 第48回染色体学会, 札幌。

本稿は1997年12月3-5日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第26回大会のシンポジウム「癌原性物質検出系としてのセルトランスクォーメーション試験の現状」(企画:田中憲穂)への序文である(座長:梅田 誠, 山崎 洋)。

はじめに:癌原性物質検出系としての細胞形質転換試験の現状

梅田 誠¹, 土屋 敏行^{2*}

¹横浜市立大学 ☎ 236-0027 横浜市金沢区瀬戸22-2

²昭和電工株式会社総合研究所 安全性試験センター ☎ 267-0056 千葉市緑区大野台1-1-1

Introduction : The present condition of cell transformation assays for predicting the carcinogenic potential of chemicals

Makoto Umeda¹ and Toshiyuki Tsuchiya^{2*}

¹ Yokohama City University

Seto 22-2, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan

² Safety Evaluation Center, Central Research Laboratory, Showa Denko K. K.
Ohnodai 1-1-1, Midori-ku, Chiba 267-0056, Japan

Summary

Genotoxicity test batteries have become a standard tool for identifying chemicals that have potential carcinogenic risk to humans. Their use for assessing carcinogenic potential, however, has limitations such as an overall low specificity and negative detection of non-mutagenic carcinogens.

In vitro cell transformation models, employing Syrian hamster embryo cells, BALB/c 3T3 cells or C3H10T1/2 cells, have been recognized as being relevant to carcinogenesis and regarded as useful tools for predicting carcinogenic potential of chemicals and for studies on the mechanisms of action of carcinogens and carcinogenic processes. In spite of the expectation, their use for screening carcinogens has not been fully exploited. Some difficulties still exist in employing them as a routine procedure. It seems that further improvement of the methods and further studies on detailed mechanisms of cell transformation are still necessary.

In this symposium, speakers presented studies on methods improvement and on mechanisms of cell transformation, and discussed the advantages in predicting carcinogenic potential of chemicals by *in vitro* cell transformation assays.

(This introduction, in a session chaired by Makoto Umeda and Hiroshi Yamasaki, is a preface to the symposium "The present condition of cell transformation assays for predicting the carcinogenic potential of chemicals", organized by Noriho Tanaka, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords : cell transformation, detection of carcinogens, BALB/c 3T3 cells, Syrian hamster embryo cells, gap junctional intercellular communication

受付: 1998年1月30日

受理: 1998年2月16日

* To whom correspondence should be addressed:

Toshiyuki Tsuchiya, Safety Evaluation Center,
Central Research Laboratory, Showa Denko K. K.,
Ohnodai 1-1-1, Midori-ku, Chiba 267-0056, Japan
Phone : 043-226-5216 Fax : 043-226-5222
E-mail : tsuchiya@ctl.sdk.co.jp

©日本環境変異原学会

現在、化学物質の癌原性スクリーニング試験には、Ames試験や培養細胞を用いる染色体異常試験をはじめとした変異原性試験が用いられている。しかし、これらの試験結果を顧みると、癌原性物質に対する検出感度は当初期待されたほど高くなく、非変異原性物質も数多く見出されている。したがって、現行の変異原性試験を

組み合わせても、化学物質の癌原性を評価するには明らかに不十分であることが指摘されている。これは化学物質による発癌が突然変異という単一の過程で生じるのではなく、少なくともイニシエーション、プロモーション、プログレッションといった異なる多段階の過程により、発現するためと考えられている。

形質転換試験は *in vivo* の発癌過程を模しており、二段階発癌を再現できることなどから化学物質の癌原性予測に有用な手段と考えられている。また、癌原性物質の作用機序および発癌過程の解明などの研究ツールとしても有用である。これまで、BALB/c 3 T 3 細胞、C 3 H 10 T 1/2 細胞および Syrian hamster embryo (SHE) 細胞などを用いる形質転換試験が開発されている。しかし、これらの試験法は化学物質の癌原性評価法としてあまり普及していないのが現状である。その理由として、いざれの細胞の場合も形質転換頻度が低いことにより定量性や再現性のある実験結果を得ることが難しいこと、形質転換の機構が十分に理解されていないことなどがある。近年、形質転換試験法の有用性を生かし、化学物質の癌原性評価法として利用するために、さまざまな改良が試みられている。また、形質転換の機構も少しずつ解明されてきた。

本シンポジウムでは、形質転換試験の第一線の研究者を招き、形質転換試験の改良とその有用性評価、また、形質転換の機構について発表していただいた。

形質転換試験法の改良

LeBoeuf らは SHE 細胞を用いる形質転換試験において、pH 6.86 に調節した培地を用いることにより形質転換頻度が増加し、試験結果が安定することを示した。この試験法は癌原性物質の検出率が非常に高く、短期間

で実施可能である。

梅田らはリッチな培地の使用と発癌プロモーターの処理時期の最適化により、BALB/c 3 T 3 細胞を用いる形質転換試験を高感度で、かつ短期間で実施可能な試験法に改良した。現在、新毒性試験法の有用性評価（バリデーションスタディ）が行われている。

形質転換の機構

Barrett らは SHE 細胞を用いて細胞の老化機構について検討した。その結果、癌原性物質処理による細胞の不死化は遺伝子的な制御を受けていたことを明らかにした。正常な細胞が細胞老化から逸脱して不死化することは遺伝子の不安定性を導き、発癌の危険性を増加させることに関与することを示した。

筒井は SHE 細胞の形質転換試験を用い、突然変異、不定期 DNA 合成、DNA 付加体などの検出法を確立し、各種化学物質の癌化機構の解析を行った。

Yamasaki らは多くの癌細胞で認められる細胞間ギャップジャンクション (GJIC) の低下、発癌プロモーターによる GJIC の阻害、コネキシン遺伝子導入による癌細胞の細胞増殖抑制などから、GJIC を構成する蛋白質コネキシンが発癌過程において重要な役割を果たしていることを報告した。

このように、各細胞を用いる形質転換試験について有用な試験法への改良が行われている。また、形質転換の機構もかなり理解されてきた。今後、これらの形質転換試験をルーチンに行える画一化された試験法として確立するため、バリデーションスタディの作業が必要である。本シンポジウムが形質転換試験の今後の展開および発展に寄与することを望んでいる。

Environ. Mutagen Res., 20 : 131 - 135 (1998)

Symposium

This paper, in a session chaired by Makoto Umeda and Hiroshi Yamasaki, was presented to the symposium "The present condition of cell transformation assays for predicting the carcinogenic potential of chemicals", organized by Norio Tanaka, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.

The use of Syrian hamster embryo transformation results for assessing the carcinogenic potential of chemicals

R. A. LeBoeuf, K. A. Kerckaert, M. J. Aardema, D. P. Gibson and R. J. Isfort

The Procter & Gamble Co., Cincinnati, OH 45239-8707

Introduction

Chemical carcinogenesis is a complex process involving multiple steps and mechanisms. Genetic alterations and the subsequent changes in gene expression that give rise to tumorigenic cells result from a variety of mechanisms, including direct interaction of the carcinogen with DNA as well as non-DNA targets which can ultimately affect normal cell proliferation and differentiation resulting in neoplastic transformation.

Commonly used genetic toxicity assays and batteries of assays typically address two potential mechanisms believed to be important in carcinogenesis, namely DNA alteration including mutation (*Salmonella* mutation assay and mammalian cell mutation assays) and structural and numerical chromosomal alterations (*in vitro* cytogenetic assays) (Waters et al, 1998). While genetic toxicity assays have significant utility for predicting a chemical's carcinogenic potential, there continues to be a need for improving the predictive capabilities of short term tests. For example, 1) genetic toxicity assays are not capable of predicting carcinogens acting via "non-genotoxic" mechanisms 2) a significant proportion of non-carcinogens yield a positive response in commonly used genotoxicity assays when employed as a screening "battery" (Haseman et al, 1990) and 3) the carcinogenic activity of certain classes of chemicals such as aromatic amines

which frequently demonstrate mutagenicity *in vitro*, are difficult to predict accurately (Ashby and Tennant, 1991).

In contrast to genetic toxicity tests which measure a specific type of genetic effect, cell transformation assays detect a chemical's ability to induce changes in cells, or phenotypes, which are associated with increased neoplastic potential of the cells. Because this "increased potential" can be induced by a wide variety of carcinogenic mechanisms, both genotoxic and non-genotoxic chemicals should be detectable with these assays. Additionally, chemically-induced genetic damage which does not result in increased "neoplastic potential" (for example genetic damage which is cell lethal) should not be detected in transformation assays, and hence should result in improved assay specificity compared to genetic toxicity tests.

Mechanisms of cellular transformation

Cellular transformation in all systems studied to date (including human cells) is a multistage process involving changes at each stage in order for progression to the next stage in the transformation process to occur (Barrett and Fletcher, 1987, reviewed in Isfort and LeBoeuf, 1995). These include several characteristic phenotypes (from primary to fully malignant cells), namely (1) morphological transformation (MT) in the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay, which is an indication of altered cellular differentiation in this system, (2) acquisition of immortality characterized by unlimited lifespan, an aneuploid karyotype and decreased genetic stability (3) the acquisition of tumorigenicity which is closely associated with the *in vitro* phenotypes of foci formation, anchorage-indepen-

received : May 18, 1998

accepted : May 21, 1998

Corresponding author : R. A. LeBoeuf, The Procter & Gamble Company, Eurocor, Temselaan 100 B-1853 Strombeek-Bever, Belgium

© Environmental Mutagen Society of Japan

dent growth in semi-solid agar and autocrine growth factor production, and finally (4) full malignancy including metastasis in some cases when the cells are injected into a suitable host. Genetic changes associated with some of these specific "stages" have been identified (reviewed in Isfort and LeBoeuf, 1995). This scheme is valid for both rodent and human cell transformation. The SHE cell transformation assay utilizes the initial stage in cellular transformation, morphological transformation, as the carcinogen-induced preneoplastic endpoint that is scored for carcinogen screening purposes. In total, the existing data strongly support the conclusion that cell transformation *in vitro* recapitulates those events involved in *in vivo* carcinogenesis and hence a biologically relevant model for predicting the carcinogenic activity of chemicals.

Use of the SHE assay for assessing carcinogenic potential

Cell transformation assays have been evaluated extensively by numerous investigators as a predictive tool for assessing chemical carcinogenicity (discussed by Swierenga and Yamasaki, 1992; LeBoeuf et al., 1996). The SHE cell transformation assay was originally developed by Berwald and Sachs (1963) and developed subsequently by several investigators (DiPaolo, 1980; Pienta et al., 1977; Barrett et al., 1984; LeBoeuf et al., 1996; Sanner and Rivedal 1985; Tsutsui and Barrett, 1991). This system has been extensively used both in its original and modified forms for assessing carcinogenic potential. A review of the carcinogenic and noncarcinogenic agents that have been tested in the SHE assay has been published (Isfort et al., 1996). In total, this includes over 470 chemical or physical agents tested either individually or in combination. While the SHE assay has been recognized as a potentially useful carcinogen identification tool, experimental parameters which have resulted in the need for extensive experience to conduct the assay and laboratory-to-laboratory variability have affected the wide-spread use of the assay. Parameters leading to inter-laboratory variability which have been identified include production lots of fetal bovine serum, the isolate of primary SHE cells, and subjectivity and hence variability of scoring of the transformed phenotype (reviewed in LeBoeuf et al., 1996). Low transformation responses with known carcinogens in many labs has also made it difficult to obtain dose response relationships and apply rigorous statistical analysis to test for treatment-related effects. It is important to note however, that depending on the specific assay conditions, sources

of serum etc, the above listed problematic characteristics have not been experienced equally across all labs conducting the assay.

Several of the reported problematic characteristics have been reduced with a modification of the SHE assay that involves the use of reduced pH DMEM (pH 6.7) to culture the SHE cells (LeBoeuf et al., 1996). Reduction of the culture medium pH to pH 6.70 from pH 7.15-7.35 improves assay performance by increasing the transformation frequency approximately five to tenfold over the "standard" SHE cell assay as well as significantly decreasing the cell isolate and serum lot variability (Kerckaert et al., 1996b). The reasons that reducing the culture medium pH from 7.3 to 6.7 has such a profound effect on SHE cell assay performance has recently been investigated and has been found to be due to multiple changes in cell physiology (discussed in Isfort and LeBoeuf, 1996). It is important to note however that the reduced pH protocol SHE assay has not been universally implemented by those conducting the SHE assay.

Of the 472 agents evaluated in the standard pH 7.15-7.35 SHE cell transformation assay, 213 have rodent carcinogenicity bioassay data available, including 177 carcinogenic agents and 36 noncarcinogens. With the above 213 chemical/physical/biological agents, the standard pH SHE assay displayed an 80% (171/213) concordance between MT induction and carcinogenicity, which included a sensitivity of 82% (146/177) and a specificity of 69% (25/36) (Isfort et al., 1996). Within this data set, 86% (91/106) of *Salmonella* assay positive carcinogens and 76% (47/62) *Salmonella* assay negative carcinogens were detected, respectively. One hundred and twelve chemicals out of the 213 evaluated were tested in more than one lab with a qualitative agreement (same overall "call" on the chemical) 82% of the time. As such, despite the technically demanding nature of this assay, these results indicate the assay can be conducted successfully in multiple laboratories. These results are summarized in Table 1.

In comparison, 70 chemicals including 43 carcinogens and 27 non-carcinogens have been tested under pH 6.70 conditions at the time of this writing with an overall correlation with rodent bioassay results of 86% (60/70). These results are summarized in Table 2 and Table 3. Sensitivity and specificity for this data set are 86% (37/43) and 85% (23/27) respectively. Concordance between *Salmonella* results and the rodent bioassay for the same data set was 55% (38/69). The sensitivity and specificity of the SHE assay for chemicals positive in the *Salmonella* assay is 95%

Table 1 Carcinogen Prediction Approaches

Prediction Method	Concordance (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Battery of <i>Salmonella</i> , ML, CY. ^a	60 (68/114)	79 (53/67)	32 (15/47)
SHE (high pH) ^b	80 (171/213)	82 (146/177)	69 (25/36)
SHE (low pH) ^c	86 (60/70)	86 (37/43)	85 (23/27)

^a Data from Haseman et al., 1990.

^b Data from Isfort et al., 1996.

^c Data from LeBoeuf et al., 1996, Kerckaert et al., 1996 a,c and Kerckaert et al., 1998.

Table 2 Summary of pH 6.70 SHE Assay Validation Studies

	pH 6.70 SHE ^{a,b}
Overall concordance	86% (60/70)
Sensitivity	86% (37/43)
Specificity	85% (23/27)
Positive Predictivity	90% (37/41)
Negative Predictivity	79% (23/29)

^a Data from LeBoeuf et al., 1996, Kerckaert et al., 1996 a,c and Kerckaert et al., 1998.

^b Ames assay concordance with the rodent bioassay for same data set = (38/69) 55%.

(18/19) and 100% (7/7) respectively. The one *Salmonella* carcinogen not detected in the SHE assay was primaclone. For chemicals negative in the *Salmonella* assay, sensitivity and specificity is 79% (19/24) and 80% (16/20) (LeBoeuf et al., 1996; Kerckaert et al., 1996a,c; Kerckaert et al., 1998).

If one evaluates these results in the context of previous correlative analysis done on these assays, there has been a consistency of cell transformation results to be predictive of a chemical's carcinogenic activity in the range of 70 to 85% with the pH 6.70 SHE assay representing the upper end of this range. Consistent with this analysis is the recently conducted "prospective" study with the use of the SHE assay to predict the outcome of NTP bioassays (Kerckaert, 1996a). With bioassays completed on 14 of the 30 chemicals under test, the SHE assay has correctly predicted 11 out of 14 or 78%. Furthermore, the ability of cell transformation assays to detect human carcinogens is equally consistent with the rodent bioassay results. Namely a sensitivity of around 75% (Swierenga and Yamasaki, 1992). This number may be higher as some of the reported human carcinogens for which the transformation results are reported as negative represent mixtures which have not necessarily been adequately tested in the transformation assays. The specificity of cell transformation assays relative to human noncarcinogens can not be adequately determined because of the paucity of chemicals classified as human

Table 3 Summary of pH 6.70 SHE Assay Validation Studies Stratified by *Salmonella* Assay Results

	pH 6.70 SHE ^a
Overall concordance	96% (25/26)
Sensitivity	95% (18/19)
Specificity	100% (7/7)
Positive Predictivity	100% (18/18)
Negative Predictivity	88% (7/8)

Salmonella assay positive chemicals

	pH 6.70 SHE ^a
Overall concordance	80% (35/44)
Sensitivity	79% (19/24)
Specificity	80% (16/20)
Positive Predictivity	83% (19/23)
Negative Predictivity	76% (16/21)

^a Data from LeBoeuf et al., 1996, Kerckaert et al., 1996 a, c and Kerckaert et al., 1998.

non-carcinogens.

Additional considerations for the SHE assay

As stated previously in this paper, a number of parameters which historically have led to technical difficulties with the SHE assay have been identified and have been either been reduced, eliminated or can be controlled via experimental design. However, implementation of the revised assay protocols on an international basis does not currently exist. Ideally, internationally harmonized protocols can be developed. At a minimum, criteria for an acceptable assay and what response constitutes a positive result needs to be clearly stated by the investigator. Recent progress towards automated scoring of the MT phenotype via the use of image analysis should contribute to a more standardized assay and increased ease of conducting the assay (Ridder et al., 1997).

Use of cell transformation methods in the carcinogen assessment process

A comparison of results from the SHE assay and a commonly employed genetic toxicology test battery is shown in Table 1. From these data it can be concluded that results from the SHE assay do have value with respect to predicting chemical carcinogenicity and hence should be considered in carcinogen prediction approaches.

It is recognized that because of the complexities of the cancer process and the fact that some mechanisms of cancer induction involve complex, multicellular or multi-organ interactions, such as chronic inflammation, alterations in hormonal status or cell toxicity followed by regenerative hyperplasia (reviewed in Butterworth, 1990) and the possibility of organ-specific metabolism of a chemical that is not modeled *in vitro*, it is unrealistic to expect any one assay to detect all mechanisms of cancer induction. However, considering the demonstrated high sensitivity of the SHE for a wide variety of chemical classes acting via a presumed variety of mechanisms, it is concluded that a high proportion of chemical carcinogens are in fact acting at the cellular level and can be detected *in vitro*. As our mechanistic understanding of carcinogenesis *in vivo* increases, incorporation of this understanding into *in vitro* transformation approaches should also occur.

As with any method, results from the SHE assay needs to be considered in combination with other available data to predict a chemical's likely carcinogenic activity (Isfort and LeBoeuf, 1996). This includes 1) results from structure activity relationship analysis for the chemical class of interest, 2) genetic toxicology tests, with consideration for the predictivity of these assays for the chemical class in question, 3) when available results from 28 and 91 day sub-chronic toxicity studies to determine whether organ specific phenomena which can be associated with neoplastic development in rodents are present (Butterworth, 1990) and 4) knowledge if the chemical is from a functional class with known carcinogenic properties (eg. immunosuppressants).

Finally, it needs to be reiterated that as with any other short-term approach used to predict carcinogenic potential, positive results in a short term assay indicate a potential for carcinogenic activity *in vivo* but do not speak to the relative human carcinogenic risk of such activity under anticipated human exposure conditions. Similar to results obtained from the rodent bioassay, additional information such as likely mode of carcinogenic activity and its relevance to

humans, metabolism and pharmacokinetic data, dose-response data and knowledge of the anticipated exposure to the chemical is needed to assess accurately the carcinogenic risk to humans from chemical exposure.

References

- Ashby, J. and R. W. Tennant (1991) Definitive relationship among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U. S. NTP., *Mutat. Res.*, 257, 229-306.
- Barrett, J. C. and Fletcher W. F. (1987) Cellular and molecular mechanisms of multi-step carcinogenesis in cell culture models. In : J. C. Barrett (Eds.), *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis: Multistep Models of Carcinogenesis*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, Vol. 2, pp. 73-116.
- Barrett, J. C., T. W. Hesterberg and D. G. Thomassen (1984) Use of cell transformation systems for testing and mechanistic studies of carcinogens, *Pharm. Rev.*, 36, 53S-70S.
- Berwald, Y., and L. Sachs (1963) *In vitro* transformation with chemical carcinogens, *Nature*, 200, 1182-1184.
- Butterworth, B. E. (1990) Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential, *Mutat. Res.*, 239, 117-132.
- DiPaolo, J. A. (1980) Quantitative *in vitro* transformation of Golden Syrian hamster embryo cells with the use of frozen stored cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, 64, 1485-1489.
- Haseman, J. K., E. Zeiger, M. D. Shelby, B. H. Margolin and R. W. Tennant (1990) Predicting rodent carcinogenicity from four *in vitro* genetic toxicity assays: an evaluation of 114 chemicals studied by the National Toxicology Program, *J. Am. Stat. Assoc.*, 85, 964-971.
- Isfort, R. J., G. A. Kerckaert and R. A. LeBoeuf (1996) Comparison of the standard and reduced pH Syrian hamster embryo (SHE) cell *in vitro* transformation assays to predict the carcinogenic potential of chemicals, *Mutat. Res.*, 356, 11-64.
- Isfort, R. J., and R. A. LeBoeuf (1995) The Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation system: a biologically relevant *in vitro* model—with carcinogen predicting capabilities—of *in vivo* multistage neoplastic transformation, *Critical Reviews in Oncogenesis*, 63, 251-260.
- Isfort, R. J. and R. A. LeBoeuf (1996) Application of *in vitro* cell transformation assays to predict the carcinogenic potential of chemicals, *Mutat. Res.*, 365, 161-173.
- Kerckaert, G. A., R. Brauninger, R. A. LeBoeuf and R. J. Isfort (1996a) Use of the Syrian hamster embryo cell transformation assay for carcinogenicity prediction of chemicals currently being tested by the National Toxicology Program in rodent bioassays, *Environ. Health Perspec.*, 104, Supp. 5, 1075-1084.
- Kerckaert, G. A., R. J. Isfort, G. J. Carr, M. J. Aardema and R. A. LeBoeuf (1996b) A comprehensive protocol for conducting the Syrian hamster embryo cell transformation assay at pH 6.70, *Mutat. Res.*, 356, 65-84.
- Kerckaert, G. A., R. A. LeBoeuf and R. J. Isfort (1996c) Use of the Syrian hamster embryo cell transformation assay for determining the carcinogenic potential of heavy metals compounds, *Fund. Applied Tox.*, 34, 67-72.
- Kerckaert, G. A., LeBoeuf, R. A., and Isfort, R. J. (1998) Assessing the predictiveness of the Syrian hamster embryo cell transformation assay for determining the rodent carcinogenic potential of single ring aromatic/nitroaromatic amine compounds, *Toxicological Sciences*, 41, 189-197.
- LeBoeuf, R. A., G. A. Kerckaert, M. J. Aardema, D. P. Gibson, R. Brauninger and R. J. Isfort (1996) The pH 6.7 Syrian hamster embryo cell transformation assay for assessing the carcinogenic potential of chemicals, *Mutat. Res.*, 356, 85-127.
- Pienta, R. J., J. A. Poiley and W. B. Lebhertz, III (1977) Morphological transformation of early passage Golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens, *Int. J. Cancer*, 19, 642-655.
- Ridder, G. M., S. B Stuard, G. A. Kerckaert, D. B. Cody, R. A. LeBoeuf and R. J. Isfort (1997) Computerized image analysis of morphologically transformed and nontransformed Syrian hamster embryo (SHE) cell colonies: Application to objective SHE cell transformation assay scoring,
- Carcinogenesis, 18, 1965-1972.
- Sanner, T. and E. Rivedal (1985) Tests with the Syrian hamster embryo cell transformation assay, In : J. Ashby, F. J. deSerres, M. Draper, M. Ishidate, B. H. Margolin and M. D. Shelby (Eds), *Progress in Mutation Research—Evaluation of Short Term Tests for Carcinogens*, Elsevier, New York, Vol. 5, pp. 665-671.
- Swierenga, S. H. H. and H. Yamasaki (1992) Performance of tests for cell transformation and gap junction intercellular communication for detecting nongenotoxic carcinogenic activity, In : H. Vainio, P. N. McGee, D. B. McGregor and A. J. McMichael (Eds), *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 165-193.
- Tsutsui, T., and J. C. Barrett (1991) Detection of non-mutagenic carcinogens using cultured Syrian hamster embryo cells, *Altern. Anim. Test. Exp.*, 1, 65-73.
- Waters, M. D., Stack, H. F., and Jackson, M. A. (1998) Short term tests for defining mutagenic carcinogens, In : S. Venitt, J. Rice and D. McGregor (Eds), IARC Publications, Vol. 146, In Press.

本稿は1997年12月3—5日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第26回大会のシンポジウム「癌原性物質検出系としてのセルトランスマッテーション試験の現状」(企画:田中憲穂)で発表された(座長:梅田 誠, 山崎 洋)。

シリアン・ハムスター胎仔(SHE)細胞による 非変異原性がん原物質のがん化機構の解析

筒井 健機

日本歯科大学歯学部薬理学教室 〒102-8159 東京都千代田区富士見1-9-20

Use of Syrian hamster embryo cells for mechanistic studies of carcinogenic activity of non-mutagenic carcinogens

Takeki Tsutsui

Department of Pharmacology, The Nippon Dental University, School of Dentistry at Tokyo
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159

Summary

The mechanisms of carcinogenesis induced by putative non-mutagenic carcinogens were studied using Syrian hamster embryo(SHE) cells. SHE cells were treated with 33 chemicals, which are negative in *Salmonella* mutagenicity tests, and assayed for determining the abilities of the chemicals to induce cell transformation and genetic effects. Twenty-two of the 33 chemicals are reported to be carcinogenic in rodents or humans. Treatment of SHE cells with each of the carcinogenic chemicals, except for clofibrate and progesterone, induced morphological transformation of the cells. Fifteen of 20 chemicals, which were positive for SHE cell-transforming activity, were positive in one or more genotoxicity tests including gene mutations at the *hprt* and/or Na^+/K^+ ATPase loci, chromosomal mutations (structural and numerical abnormalities), DNA damage detected by unscheduled DNA synthesis, and DNA adduct formation determined by ^{32}P -postlabeling. These findings indicate that the SHE cell assay system could be useful for mechanistic studies as well as for detecting potential carcinogenic activity of non-mutagenic carcinogens, and that genetic mechanisms may be important in the carcinogenic activity of non-mutagenic carcinogens.

(This paper, in a session chaired by Makoto Umeda and Hiroshi Yamasaki, was presented to the symposium "The present condition of cell transformation assays for predicting the carcinogenic potential of chemicals", organized by Noriho Tanaka, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords : Syrian hamster embryo(SHE)cells, Cell transformation, Genotoxicity, Non-mutagenic carcinogen

緒 言

培養哺乳類細胞を用いた形質転換実験系は、細胞のがん化機構の解析や化学物質等のがん原性の有無の判定に

受付：1998年2月4日

受理：1998年2月16日

©日本環境変異原学会

重要な役割を果たしてきた。形質転換実験には主に、シリアン・ハムスター胎仔由来のSHE細胞や新生ハムスター腎由来のBHK 21/C 13細胞、BALB/cマウス由来のBALB/c 3T 3細胞、C 3 H マウス由来のC 3 H 10 T 1/2細胞が使われている。これらの細胞を用いた形質転換実験はよく知られてはいるが、あまり普及していない。その理由はいずれの細胞の場合も、培養条件や細胞の扱い方が難しく、再現性のある結果が得にくいためで

ある。しかし、ひとたび実験条件が整って実験が軌道に乗ると、それなりの威力を發揮する。おのとの細胞にはそれぞれ異なる特徴がある(Barrett and Thomassen, 1985)。したがって、各細胞によって実験系や出現する形質転換体の意味するものが異なる。ここでは、SHE細胞の特徴と、SHE細胞を用いてわれわれの研究室でこれまでに得られた、Ames試験陰性のがん原物質のがん化機構に関する結果を紹介する。

SHE細胞とその特徴

SHE細胞は、胎生13日目のシリアン・ハムスター(ゴールデン・ハムスターともいう)の体軀組織由来の線維芽細胞様細胞(筒井, 1993)である。形質転換実験には継代2, 3代目の培養初期の細胞が使われる。この細胞の 10^9 個を新生ハムスターに移植しても造腫瘍性を示さない(Huberman and Sachs, 1966; Barrett et al., 1979)。軟寒天培地中でもコロニーを形成しない(Barrett et al., 1979)。したがって、ほとんどの細胞が形質転換していない正常細胞と考えられる。染色体数は44(2n)で、95~96%の細胞が2倍体、残りが4倍体である(Tsutsui et al., 1983)。自然形質転換率が低く、種々のがん原物質に高感受性を示す[実験動物でがん原性の証明された物質を陽性と検出する率(sensitivity): 82%, 実験動物でがん原性を示さない物質を陰性と検出する率(specificity): 69%, 実験動物の結果との間の一一致率(overall concordance): 80%, 研究室間における一致率(interlaboratory agreement): 82%](Isfort et al., 1996)。また、SHE細胞は種々の細胞型からなる混合細胞集団であるため、薬物代謝酵素活性やペルオキシダーゼ活性をもつ(Pienta, 1980; Barrett et al., 1984; Degen et al., 1983)。このことが、がん原物質に対する高感受性の一因と考えられる。一部のニトロソアミン、たとえば、N-nitrosodiethylamine〔55-18-5〕に対しては陰性(false negative)を示すが、肝細胞との共存培養や薬物代謝活性系の導入により、陽性を示す(Pienta, 1980)。

形質転換実験で大切なことは、がん原物質と非がん原物質を誤りなく高率に検出できることのほかに、がん原物質による効果が直接、定量的に形質転換率に反映されてくることである。言い換えれば、1ヒット(one hit)で形質転換が誘導されなければならない。先にあげた4つの細胞系で1ヒット(one hit)効果を示すのは、SHE細胞(Gart et al., 1979)とBHK 21/C 13細胞(Bouck and DiMayorca, 1976)であり、C 3 H 10 T 1/2細胞は2段階(two steps)効果を示す(Fernandez et al., 1980)。BALB/c 3T 3細胞ではよくわかっていない。

SHE細胞を用いた形質転換実験では、継代2, 3代目の正常と考えられる細胞に被験物質を作用させ、7~9日後に形質転換体を観察する。したがって、この形質転換体は悪性化過程のごく初期に起きる変化を反映してい

ることになる。これに対して、BHK 21/C 13細胞やBALB/c 3T 3細胞、C 3 H 10 T 1/2細胞は悪性化過程の途中にある株細胞であるため、これらの細胞を用いた形質転換実験では、各細胞によって、悪性化過程のそれぞれ異なる段階における変化を観察していることになる。たとえば、BHK 21/C 13細胞は、悪性細胞になる一步手前の段階にあるため、この細胞による形質転換実験では、1段階(one step)で悪性形質転換するところを捕えている(Bouck and DiMayorca, 1976)。BALB/c 3T 3細胞やC 3 H 10 T 1/2細胞は、BHK 21/C 13細胞より悪性化過程では初期に近い(Barrett and Thomassen, 1985)。悪性形質転換という現象は、正常細胞に遺伝的変異が幾重にも蓄積された結果起きること、また、悪性腫瘍は正常細胞を起源としていること、正常細胞と株細胞とでは化学物質その他に対する反応が異なる可能性があることなどを考えると、株細胞を用いた実験では、常にその結果の意味するものを慎重に考慮する必要がある。しかし、細胞の悪性化には複数の生活環境内因子が関与し、それが悪性化過程の異なる段階で作用していることも考えられるので、がん原物質の検出やがん化機構の研究には、悪性化段階のはっきりした細胞系を複数用いる必要がある。この意味で、悪性化過程の初期における変化をみるSHE細胞と悪性化途中有る株細胞を併用することが重要であろう。

SHE細胞を用いた形質転換実験系

Pientaら(1977)によって開発された最も一般的な方法は以下のとおりである(Fig. 1)。凍結から培養に戻した細胞の一部をX線で50 Gy照射する。その 2.0×10^4 個を支持細胞として60 mmシャーレに播種し、炭酸ガス培養器(10% CO₂, 90% 空気)で培養する。培地はDulbecco改変Eagle培地(DMEM)にウシ胎仔血清を20%添加したものを使っている。翌日、このシャーレにさらにX線未照射のSHE細胞(250個)を標的細胞として播種する。さらにその翌日から被験物質を1週間作用させたのち、細胞を固定し染色する。1週間の作用期間中は培地交換を行わない。形成されたコロニーの形態を観察して形質転換コロニー(Fig. 2)を数え、全コロニー数に対する割合を算出して形質転換率とする。形質転換したコロニーは、コロニー辺縁部の細胞の配列が乱れ、細胞同士が互いに交差し合う(criss-crossing)。ギムザ液で染色すると、塩基性色素(青)に強く染まる。また、個々の細胞では、核の細胞質に対する割合が増加し、核が大きく、細胞質がやせたように見える。一方、形質転換していないコロニーの最大の特徴は、コロニー辺縁部の細胞の配列に方向性がみられることである。

Pientaら(1977)が開発したこの方法は、シャーレに播種した少数の標的細胞が直接コロニー形成に関わることから、直接法と呼ぶこともできる。われわれが行っている

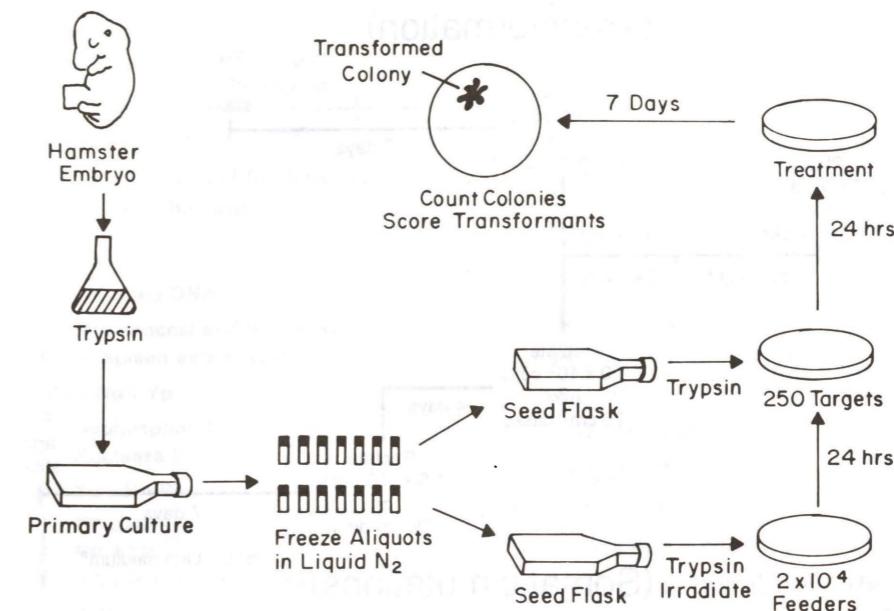


Fig. 1 SHE cell transformation system for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis.



Fig. 2 Normal colony, on the left, and morphologically transformed colony, on the right, of SHE cells treated with benzo[α]pyrene for 48h and subsequently replated at clonal density.

る実験系はこの方法とは異なり、再播種法と呼ばれている方法である(Tsutsui et al., 1983; 1984 a; 筒井, 1987)(Fig. 3)。この方法は、まず 75 cm^2 フラスコにSHE細胞の 5.0×10^5 個(被験物質を24時間作用させる場合)、または、 2.5×10^5 個(48時間作用させる場合)を播種し、一昼夜培養後、被験物質を24時間または48時間作用させる。細胞をフラスコから剥離したのち、その2,000個を100 mmディッシュに再播種し、1週間培養してコロニーを形成させる。通常、1群20枚のディッシュを用いる。再播種法は直接法と比べて、次のような利点をもつ。1) イニシエーション過程とプロモーション過程を区別できる。2) 支持細胞を用意する必要がない

ため、操作が比較的容易。3) アッセイできるコロニー数が多い。ちなみに、直接法では対照群でシャーレあたり40~60個のコロニーが形成されるのに対して、再播種法では250~350個。4) 被験物質作用後の細胞を使って、形質転換実験と突然変異試験のような遺伝毒性試験を同時にを行うことができる。

SHE細胞による非変異原性 がん原物質のがん化機構

われわれはこれまでにSHE細胞を用いた形質転換実験法(再播種法)(Tsutsui et al., 1983, 1984 a; 筒井, 1987), 遺伝子および染色体突然変異検出法(Tsutsui et al., 1978, 1983), 不定期DNA合成検出法(Tsutsui et al., 1984 b, c), ³²P-ポストラベリング法によるDNA附加体検出法(Hayashi et al., 1996; 筒井, 1997)を確立し、各種化学物質のがん化機構を解析してきた。ここでは、これらの方針について簡単に説明したのち、Ames試験陰性のがん原物質を中心にこれまでに得られた結果について述べる。なお、形質転換実験法についてはすでに述べたので省略する。

1. 方 法

1) 遺伝子および染色体突然変異検出法
(1) 遺伝子突然変異検出法(Fig. 3)
形質転換実験の場合と同様に細胞を播種し、被験物質を作用させる。剥離した細胞の 4.0×10^5 個を 75 cm^2 フラスコに再播種し、4日間培養する。細胞を再度剥離し、その 1.0×10^5 個を1群10枚の100 mmディッシュに播く。4~6時間培養後、各ディッシュに最終濃度が20

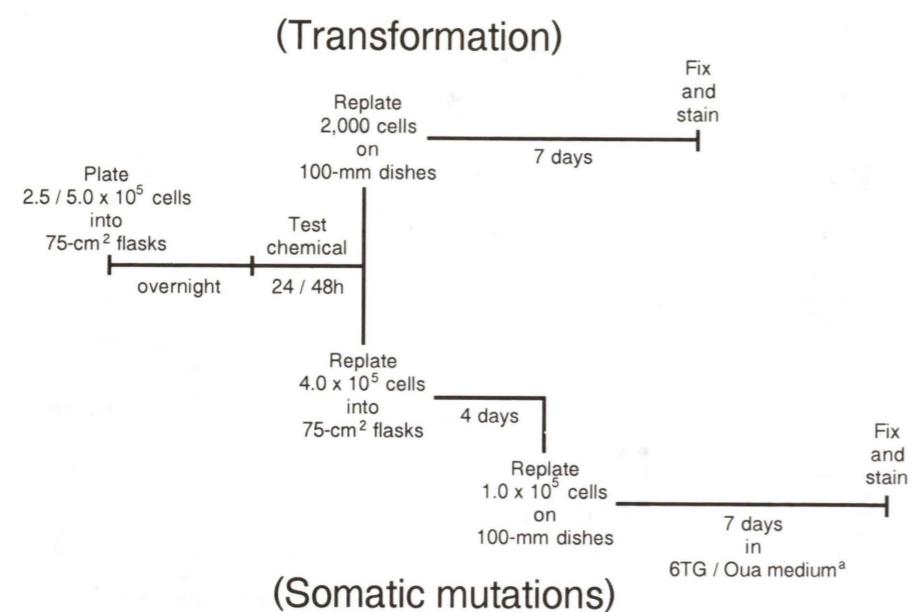
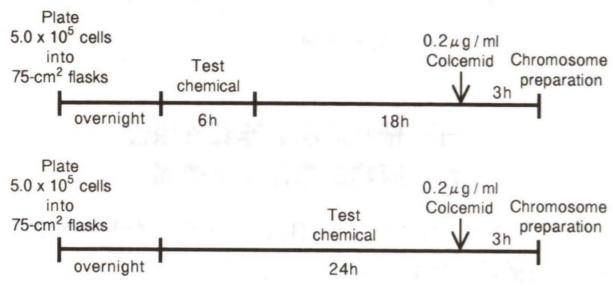


Fig. 3 Experimental scheme for the concomitant study of morphological transformation and somatic mutations of SHE cells treated with test chemicals.

^a Medium containing either 20 μM 6-thioguanine (for hprt) or 1.1 mM ouabain (for Na⁺/K⁺ ATPase).

(Chromosome aberrations)



(Numerical abnormality)

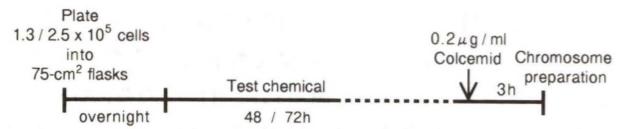


Fig. 4 Methods for detecting chromosomal abnormalities in SHE cells treated with test chemicals.

μM または 1.1 mM になるように、それぞれ、6-thioguanine [154-42-7] または ouabain [11018-89-6] を加える。1週間培養後、コロニーを固定し染色する。突然変異率は Barrett ら (1978) の方法によって算出する。

(2) 染色体突然変異検出法 (Fig. 4)

i) 染色体異常 (構造異常)

被験物質を 6 時間作用させる場合と 24 時間作用させ

る場合がある。いずれの場合も 5.0×10^5 個の細胞を 75 cm² フラスコに播種し、一昼夜培養後、被験物質を作用させる。6 時間作用群では、作用後正常培地で洗浄し、18 時間培養後に染色体標本を作製する。24 時間作用群では、被験物質の作用開始から 24 時間に標本を作製する。両者とも、標本作製の 3 時間前に最終濃度が 0.2 μg/ml になるように Colcemid [477-30-5] を加える。なお、6 時間作用群における作用開始から標本作製までの時間 (24 時間) は、SHE 細胞の細胞周期時間の 1.5 倍に相当する。6 時間作用群で異常が検出されない場合、24 時間作用の実験を行う。

ii) 染色体数的異常

染色体の数的異常 (aneuploidy) は以下のようにして調べている。SHE 細胞に被験物質を 48 時間作用させたのち、染色体標本を作製し染色体数を数える。被験物質による毒性で細胞の増殖速度が低下する場合は、72 時間作用させた細胞についても調べる。本来なら被験物質とともに 5-bromodeoxyuridine (BrdU) [59-14-3] を作用させ、ギムザ液で染色分体を分離して、作用開始後 2 回目の分裂中期細胞だけについて、染色体数を数えなければならないが、BrdU の毒性等のため、この方法で実験するのは難しい。

SHE 細胞の 1.3×10^5 個 (72 時間作用群) または 2.5×10^5 個 (48 時間作用群) を 75 cm² フラスコに播種する。一昼夜培養後、被験物質を作用させ、48 または 72 時間後に標本を作製する。なお、作用終了 3 時間前に Colcemid (0.2 μg/ml) を加える。

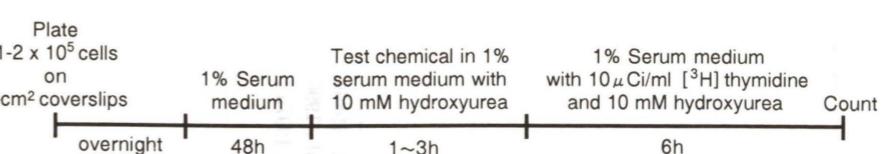


Fig. 5 The method for detecting unscheduled DNA synthesis in SHE cells treated with test chemicals.

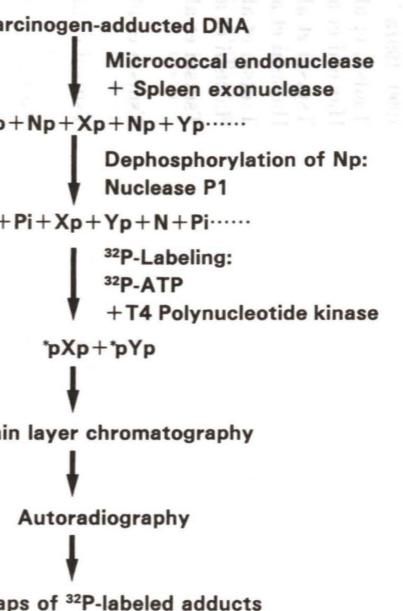


Fig. 6 The ³²P-postlabeling method. Np, normal nucleotide; Xp, Yp, nucleotide with adducts; N, nucleoside; Pi, inorganic phosphoric acid; *pXp, *pYp, ³²P-labeled nucleotide with adducts.

リヌクレオチドキナーゼと [γ -³²P] ATP により、[³²P] リン酸基を 5' 側に付加する (ポストラベル)。この試料を polyethyleneimine cellulose シート上に 2 次元展開したのち、オートラジオグラフィーを行う。

4) 薬物代謝活性系

薬物代謝活性系を導入する実験では、上記のいずれの実験においても、ラット肝ミクロソーム画分を含む反応液で被験物質を細胞に 1 ~ 3 時間作用させる (Tsutsui et al., 1984 b, c, 1986 a, 1993; Hayashi et al., 1996; 簡井, 1997)。肝ミクロソーム画分の濃度や作用時間の決定にあたっては、被験物質ごとに予備実験を行い、誘導率が最も高くなる条件を選定する。

2. 結 果

SHE 細胞アッセイ系でテストした Ames 試験陰性のがん原物質名とその実験結果を Table 1 と 2 に示した。ここではそのうち、近年增加傾向にある乳癌や卵巣癌の発生に深く関与しているエストロゲンについてまず解説し、その後、他のがん原物質についても簡単に説明を加える。

1) エストロゲンのがん化機構

エストロゲンはヒトやげっ歯類に対して明らかにがん原性を示す (IARC, 1979; Brinton et al., 1986)。しかし、その機構は十分には解明されていない。エストロゲンは、エストロゲン受容体と結合して細胞増殖 (Preston-Martin et al., 1990) や遺伝子発現 (Nelson et al., 1994) を刺激する。このことがエストロゲン発がんの重要な機構の一つであるという仮説がある (Preston-Martin et al., 1990; Barrett and Huff, 1991)。細胞増殖は自然誘発突然変異やがん原物質誘発突然変異の固定化を促進し、かつ、前腫瘍状態の細胞のクローナルな増大を容易にする (Barrett, 1993)。現に、がん原物質でイニシエーションを受けた動物にエストロゲンを投与すると乳癌や肝癌、腫瘍形成の促進がみられる (IARC, 1979; Barrett and Huff, 1991)。しかし、この仮説にはがん化開始のためのイニシエーション機構やエストロゲンの細胞分裂刺激機構などについて不明な点が多い。

エストロゲン発がんの標的細胞がエストロゲン受容体を持っているとは限らない。生後 1 ~ 5 日目のマウスの子宮上皮にはエストロゲン受容体がほとんど存在しないにもかかわらず、この時期に合成エストロゲンである diethylstilbestrol [56-53-1] (DES) を投与すると子宮腺

Table 1 SHE Cell-transforming Activity and Genetic Effects of Chemicals Which are Negative in *Salmonella* Mutagenicity Tests

Chemical	CAS number	Carcinogenicity	Morphological transformation	Gene mutation	Unscheduled DNA synthesis		Chromosomal mutation	Aneuploidy	DNA adduct formation	Reference
					Aberration	Aneuploidy				
Amitrole (herbicide)	61-82-5	+	+	+	—	—	—	—	+	Tsutsui et al., 1984d
Asbestos (mineral)	12001-29-5	+	+	—	—	—	—	—	+	Oshimura et al., 1984
Benzene (industrial chemical)	71-43-2	+	+	+	—	—	—	—	+	Tsutsui et al., 1997d
Phenol (benzene metabolite)	108-95-2	±	+	+	+	+	+	+	+	Tsutsui et al., 1997d
Catechol (benzene metabolite)	120-80-9	+	+	+	+	+	+	+	+	Tsutsui et al., 1997d
Hydroquinone (benzene metabolite)	123-31-9	+	+	+	+	+	+	±	—	Tsutsui et al., 1997d
Clofibrate (hypolipidemic drug)	637-07-0	+	—/ _c	—/ _c	—	—/ _c	—	—	+	Tsutsui et al., 1993
Colcemid (mitotic inhibitor)	477-30-5	+	—	—	—	—	—	—	+	Tsutsui et al., 1984a, 1990
Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP : plasticizer)	117-81-7	+	+/ _a _b _c	+/ _a _b _c	—/ _c	+/ _c	—	—	—	Tsutsui et al., 1993
Mono(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP metabolite)	4376-20-9	—/ _c	—/ _c	—/ _c	—/ _c	—/ _c	—	—	—	Tsutsui et al., 1993
Diethylstilbestrol (synthetic estrogen)	56-53-1	+	+/ _a _b _c	+/ _a _b _c	—	—/ _c	—	+	+	Tsutsui et al., 1983, 1984c, 1986a, 1990, 1997a ; Hayashi et al., 1996
17 β -Estradiol (E ₂ : natural estrogen)	50-28-2	+	+	—	—	—	—	+	+	Tsutsui et al., 1987, 1990, 1997a ; Hayashi et al., 1996
2-Hydroxyestradiol (E ₂ metabolite)	362-05-0	+	+	+	+	+	+	+	+	Tsutsui et al., 1997b ; Hayashi et al., 1996
4-Hydroxyestradiol (E ₂ metabolite)	5976-61-4	+	+	+	+	+	+	+	+	Tsutsui et al., 1997b ; Hayashi et al., 1996
Estrone (E ₁ : natural estrogen)	53-16-7	+	—	—	—	—	—	—	—	Tsutsui et al., 1997b
2-Hydroxyestrone (E ₁ metabolite)	362-06-1	+	—	—	—	—	—	—	—	Tsutsui et al., 1997b
16 α -Hydroxyestrone (E ₁ metabolite)	566-76-7	—	—	—	—	—	—	—	+	Tsutsui et al., 1997b
Estriol (E ₃ : natural estrogen)	50-27-1	+	—	—	—	—	—	—	—	Tsutsui et al., 1997b
Eugenol (disinfectant)	97-53-0	± ^a	+	—	—/ _c	+/ _c	+	+	—	Fukuda, 1987
Progesterone (progestin)	57-83-0	+	+	—	—	—	—	—	—	Tsutsui et al., 1995

Reserpine (antihypertensive drug)	50-55-5	+	+	—	—	—	—	—	—	Tsutsui et al., 1994
Na-Arsenite (metal)	7784-46-5	+	+	—	—/ _c	+/ _c	+	—	—	Tsutsui, 1990
Na-Bisulfite (food additive)	7631-90-5	+	—	—	—	—	—	—	—	Tsutsui and Barrett, 1990
Na-Fluoride (cariostatic agent)	7681-49-4	E ^b	+	—	+/ _c	+/ _c	+	+	+	Tsutsui et al., 1984e
Tamoxifen (antiestrogen)	54965-24-1	+	+	—	—	—	—	+	+	Tsutsui et al., 1997a
Toremifene (antiestrogen)	89778-26-7	+	—	—	—	—	—	+	+	Tsutsui et al., 1997a
ICI 164,384 (antiestrogen)	98007-99-9	+	—	—	—	—	—	+	+	Tsutsui et al., 1997a
Testosterone (androgen)	58-22-0	+	+	—	—	—	—	—	—	Tsutsui et al., 1995
Testosterone propionate (androgen)	57-85-2	+	+	—	—	—	—	—	—	Tsutsui et al., 1995
Vincristine sulfate (mitotic inhibitor)	2068-78-2	+	—	—	—	—	—	+	+	Tsutsui et al., 1986b, 1990
Wy-14,643 (peroxisome proliferator)	50892-23-4	+	—/ _c	+/ _c	—/ _c	+/ _c	—/ _c	—	—	Tsutsui et al., 1993

^a Insufficient ; ^b equivocal ; ^c results from experiments without/with exogenous metabolic activation.

Table 2 SHE Cell-transforming Activity and Genetic Effects of Diphenyl Compounds

Chemical	CAS number	Carcinogenicity	Morphological transformation	Gene mutation	Unscheduled DNA synthesis		Chromosomal mutation	Aneuploidy	DNA adduct formation	Reference
					Aberration	Aneuploidy				
Diethylstilbestrol (synthetic estrogen)	56-53-1	+	+/ _a _b _c	-/+ _b	—	+	—	—	+	Tsutsui et al., 1983, 1984c, 1986a, 1990, 1997a ; Hayashi et al., 1996
Bisphenol-A (monomer of plastics)	80-05-7	E ^a	+	—	—	+	—	—	+	Tsutsui et al., 1998
Phenolphthalein (cathartic agent)	77-09-8	+	+	+	+	+	—	—	—	Tsutsui et al., 1997c

^a Equivocal ; ^b results from experiments without/with exogenous metabolic activation.

癌が発生する(Newbold et al., 1990)。これに対して成熟マウスではすべての細胞がエストロゲン受容体陽性であるにもかかわらず、子宮癌は誘導されない(Newbold et al., 1990)。また、エストロゲン活性のみでエストロゲンのがん原性のすべてを説明できない。エストロゲン活性は強くても、ある種のエストロゲンにはがん原性がないからである。ハムスターにDESや 17β -estradiol(E₂) [50-28-2]を投与すると、いずれの場合も腎臓に腫瘍が形成される(Li et al., 1988)。しかし、DESやE₂と同等のエストロゲン活性を持つethinyl estradiol[57-63-6]や2-fluoroestradiol [16205-32-6]のがん原性は非常に弱い(Li et al., 1988; Liehr, 1983)。

種々のエストロゲンによってハムスターに腎腫瘍が形成され、これらの腫瘍はエストロゲンの投与で増大する。すなわち、エストロゲン依存性である(Li et al., 1988)。したがって、エストロゲンによる腫瘍の発生や維持には、後生的(epigenetic)な機構が関与していることが考えられるが、すべてのエストロゲンのがん原性があるとは限らないことから、エストロゲン活性はがん化には必要ではあるが、これのみでは十分でないものと思われる。エストロゲン活性以外の機構、たとえば、エストロゲンのDNA傷害能に起因する突然変異の誘発などが示唆されている(Barrett et al., 1985; Barrett and Huff, 1991; Tsutsui and Barrett, 1997; Li et al., 1988; Newbold et al., 1990; Tsutsui et al., 1983, 1984c, 1987)。

(1) SHE細胞によるエストロゲンのがん化機構の解析

著者らはこれまでにSHE細胞を使って、エストロゲンが直接細胞を形質転換することを明らかにしてきた(Hayashi et al., 1996; Tsutsui et al., 1983, 1986a, 1987, 1997a; Tsutsui and Barrett, 1997)。DESやE₂、その他のエストロゲンによって、SHE細胞に形態形質転換やその後の継続培養で造腫瘍性を示す悪性形質転換が誘導される。SHE細胞にはエストロゲン受容体の発現がほとんどみられず(Korach and McLachlan, 1985)、また、エストロゲンによって細胞増殖も誘導されない(Tsutsui et al., 1983; 1987)。したがって、この細胞を使うと、エストロゲンのもつエストロゲン活性をがん化機構から除外して考えることができる。

(2) エストロゲンの突然変異原性

SHE細胞にDESやE₂を作用させると、細胞の形質転換が誘導されるが、*hprt*やNa⁺/K⁺ATPase遺伝子の突然変異や不定期DNA合成は誘導されない。染色体の構造異常も起きないが、染色体の数的異常が誘導される(Tsutsui et al., 1983, 1987, 1990, 1997a)。したがって、これらのエストロゲンはSHE細胞に対して遺伝子突然変異は起こさないが、染色体突然変異を誘導することがわかる。また、DESを薬物代謝酵素存在下でSHE細胞に作用させると、細胞の形質転換率が上昇し、Na⁺/

K⁺ATPase遺伝子の突然変異や不定期DNA合成が誘導される(Hayashi et al., 1996; Tsutsui et al., 1984c, 1986a)。よって、DESの代謝過程でDNAが傷害される可能性がある。DESはチトクロームP-450によって酸化され、DESセミキノンやDESキノンになるといわれている(Liehr, 1990)。このDESキノンは、チトクロームP-450還元酵素やキノン還元酵素でDESセミキノンやDESに還元される。したがって、DESとDESキノンとは酸化と還元のサイクル(redox cycling)を繰り返すことになる(Liehr, 1990)。このDESキノンがDNAと付加体を形成するといわれている(Gladek and Liehr, 1989)。また、この酸化還元サイクルの過程でDESフリーラジカルが生じ、これがDNAに結合するという報告もある(児玉ら, 1990)。その他、DESセミキノンが酸素分子と反応してスーパーオキシドラジカルが形成され、これがスーパーオキシドジスマターゼによって過酸化水素になり、さらにOHラジカルに還元されて、これがDNAのグアニン塩基のC-8位を水酸化して8-水酸化デオキシグアノシン(8-OH-dG)を形成するともいわれている(Roy et al., 1991)。いずれの場合もこれらの反応が起こる結果としてDNA傷害が誘起される。

E₂の代謝産物であるestrone(E₁)、2-hydroxyestrone(2-OH E₁)、16 α -hydroxyestrone(16 α -OH E₁)、2-hydroxyestradiol(2-OH E₂)、4-hydroxyestradiol(4-OH E₂)、estriol(E₃)をSHE細胞に作用させると、E₃以外のすべての物質によって形態形質転換が誘導される。形質転換活性の強さは、2-OH E₁≥16 α -OH E₁≈2-OH E₂≈2-OH E₄≈E₂≈E₁≈E₃である(Tsutsui et al., 1997b)。また、2-OH E₁や2-OH E₂、4-OH E₂によってSHE細胞に染色体の構造異常が、E₂や2-OH E₂、4-OH E₂、16 α -OH E₁によって染色体の数的異常が誘導される(Tsutsui et al., 1997b)。DNA付加体形成能を³²P-ポストラベリング法で調べると、付加体形成能はE₂よりも2-OH E₂、2-OH E₂よりも4-OH E₂で強く現れる(Hayashi et al., 1996)。これらの結果は、多数のE₂代謝産物がE₂と同等かそれ以上の形質転換活性を持っていることを示し、かつ、この活性の上昇は代謝産物の遺伝毒性、すなわち、染色体の構造異常および数的異常誘起性やDNA付加体形成能等による可能性を示している。

E₂はカテコールエストロゲンに酸化され、DESの場合のように酸化還元サイクルを起こすと考えられている(Liehr et al., 1986)。しかし、2-OH E₂や4-OH E₂とこれらに対応するキノン間の酸化還元サイクルによってフリーラジカルが発生するかどうかは不明である。Royら(1991)は、DESの投与によってハムスターのオスの腎臓や肝臓のDNAで8-OH-dGレベルが増加していることをみいだしているが、この現象はE₂では起こらないという。したがって、DESとE₂によって誘導されるが

ん化や細胞の形質転換には、異なる機構が関与している可能性がある。

エストロゲンは、エストロゲン依存性細胞の増殖を刺激し、これらの細胞の分化や遺伝子発現に影響を及ぼす。このような後生的な機構がエストロゲン発がんに関与していることは明らかであるが、エストロゲンは、また、エストロゲン受容体を介さない機構によって細胞に遺伝的変異を起こす。これらのことはエストロゲン発がんが、後生的因子と遺伝的変異の両因子の相互作用の結果発生することを示唆している。

2) その他の非変異原性がん原物質のがん化機構

Table 1と2に示した化学物質のうち、エストロゲン以外の25種類は抗高脂血症薬のclofibrateを除いて、すべて、SHE細胞に形質転換を誘導する。Clofibrateは、Wy-14,643やポリ塩化ビニールに柔軟性を与えるために添加されているdi(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)と同様、ラットやマウスに肝細胞癌を誘発する(Reddy et al., 1980)。これらの物質によって、ラットの肝細胞内のペルオキシゾームが増加し増大する。その作用は Wy-14,643 > clofibrate > DEHP の順で強い(Reddy and Lalwani, 1984)。DEHPはSHE細胞に形質転換を誘導するが、clofibrateやWy-14,643は誘導しない。ラット肝ミクロソーム由来の薬物代謝酵素存在下では、DEHPの形質転換活性が非存在下より上昇し、Wy-14,643でも形質転換活性が陽性となる。しかし、clofibrateでは、薬物代謝酵素存在下でも形質転換活性が陽性に転じない(Tsutsui et al., 1993)。これらの3化合物はともにSHE細胞に染色体異常を誘起しない。薬物代謝酵素存在下ではDEHPとWy-14,643は染色体異常誘起性を示すが、clofibrateは示さない(Tsutsui et al., 1993)。Clofibrate、Wy-14,643、DEHPはいずれもSHE細胞に対してペルオキシゾーム増殖作用を示さないが、薬物代謝酵素存在下ではペルオキシゾーム増殖作用を示し、その活性は、clofibrate ≈ Wy-14,643 > DEHP の順で強い(Tsutsui et al., 1993)。これらの結果は、clofibrateやWy-14,643、DEHPのSHE細胞に対する形質転換活性は、細胞内ペルオキシゾーム増殖作用よりも、むしろ、染色体異常誘起性と関連していることを示している。Isfortら(1996)の研究によると、低pH(6.7)下でclofibrateを作用させると、SHE細胞に形質転換が起こる。細胞内ペルオキシゾームはH₂O₂を生成する場として知られている。ペルオキシゾーム内にはH₂O₂産生酵素〔glycolate(α -hydroxy acid)oxidase, urate oxidase, D-amino acid oxidase, fatty acyl-Co A oxidase, polyamine oxidaseなど〕やH₂O₂分解酵素であるcatalase、その他acyl transferaseやdehydrogenaseなどの酵素が存在する(Reddy and Lalwani, 1984)。Clofibrate作用時のpHの違いでこれらの酵素活性に変化が生じ、このことが形質転換活性に影響を与えている可能性がある。

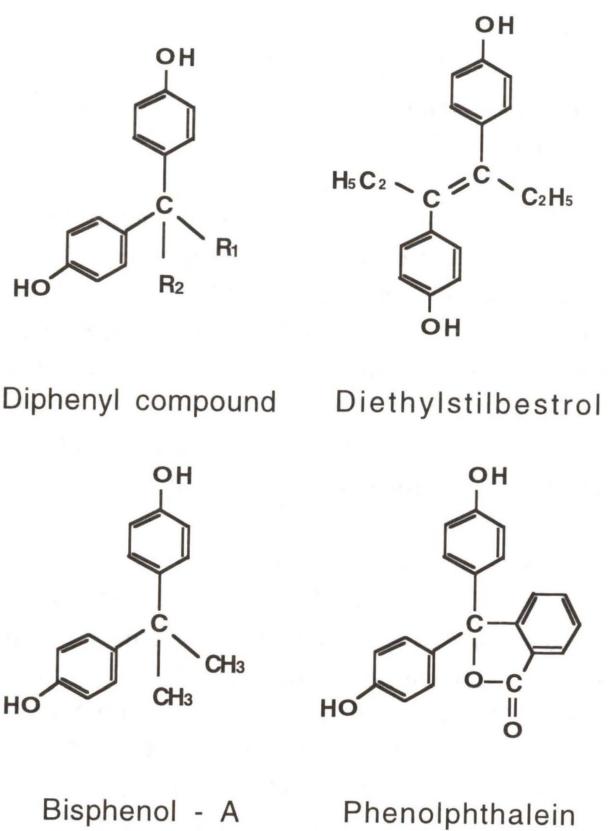
実験動物に甲状腺癌や肝癌を誘起する除草剤のamitroleは、Ames試験では突然変異原性を示さないが、SHE細胞では突然変異原性を示す(Tsutsui et al., 1984d)。このことは、SHE細胞ではAmes試験で使用されている代謝活性系とは異なる経路でamitroleが代謝されていることを示唆している。Amitrole発がんの標的臓器である甲状腺や突然変異原性試験で陽性を示すSHE細胞ではperoxidase活性が高い(Degen et al., 1983)。KraussとEling(1987)によると、amitroleはperoxidaseを介して代謝活性化されるという。Amitroleによって甲状腺に腫瘍が発生するのは、amitroleを代謝活性化するperoxidase活性が高い甲状腺がその標的となるためであろう。

Table 1と2に示した化学物質のうち、エストロゲン以外で形質転換活性が陽性を示した化学物質では、progesteroneとreserpineそれにNa-bisulfiteとtestosterone, testosterone propionateを除いて、すべてに遺伝子または染色体突然変異原性や不定期DNA合成誘起性、ないしは、DNA付加体形成能等の遺伝毒性が認められる。これらの機構の一つないしは複数が、これらの化学物質のがん原性に関与しているものと思われる。

一方、progesterone, reserpine, Na-bisulfite, testosterone, testosterone propionateは、いずれもSHE細胞に形質転換を誘導するが、われわれの行っている遺伝毒性試験では陰性である(Tsutsui and Barrett, 1990; Tsutsui et al., 1994, 1995)。SHE細胞形質転換実験系では、これらの化学物質を48時間作用させたのち、細胞を正常培地中に再播種し、1週間培養後に形質転換コロニーを観察する。このことは、48時間の作用期間中に細胞が受けた何らかの変化が、コロニー形成期間中も安定して維持され、形質転換体となって現れたことを示している。言い換えれば、これらの化学物質には直接細胞に遺伝的変化を誘起する作用があることを示している。遺伝子突然変異や染色体突然変異を直接誘導しないような未知の機構がこれらに関与しているのかもしれない。

次に、diphenyl化合物であるbisphenol-Aとphenolphthaleinについての結果を述べる。Bisphenol-Aは最近、環境ホルモンとして問題になっている。また、phenolphthaleinは緩下剤として広く使用されている。これらはいずれもFig. 7に示すように、ヒトや実験動物にがん原性を示す合成女性ホルモンのDESと化学構造が類似している。Phenolphthaleinもラットやマウスにがん原性を示すが(Dunnick and Hailey, 1996), bisphenol-Aのがん原性は、米国のNCI/NTPの報告では不確定(equivocal)となっている(Ashby and Tennant, 1988)。これらの物質はいずれもAmes試験で陰性を示す。

Bisphenol-AもphenolphthaleinもSHE細胞に形



Bisphenol - A

Phenolphthalein

Fig. 7 Chemical structures of diphenyl compounds.

質転換を誘導する。Bisphenol-A は DES と同様、遺伝子突然変異や染色体異常を誘起しないが、染色体の数的異常を起こす。また、DNA に付加体を形成する (Table 2) (Tsutsui et al., 1998)。一方、phenolphthalein は *hprt* 遺伝子に突然変異を誘起し、染色体異常も起こす。しかし、染色体の数的異常は誘起せず、DNA 付加体も形成しない (Tsutsui et al., 1997c)。

このことから、両化学物質は化学構造は似ているが、SHE 細胞に対する遺伝毒性機構は互いに異なることがわかる。Bisphenol-A は CHO 細胞に姉妹染色分体交換や染色体異常を誘起しないが (Ivett et al., 1989)、V 79 細胞に微小管形成阻害や染色体の数的異常を起こす (Pfeiffer et al., 1996, 1997)。また、bisphenol-A は *in vitro* のペルオキシダーゼ活性系存在下で bisphenol-A セミキノンや bisphenol O-キノンに代謝され、DNA に付加体を形成する (Atkinson and Roy, 1995)。前述したように、SHE 細胞はペルオキシダーゼ活性を持っているので、bisphenol-A が SHE 細胞によって DNA 結合代謝物に代謝される可能性がある。しかし、現在のところ、付加体形成物が bisphenol-A の分子の一部なのか、あるいは DES の場合の酸化還元サイクルのように、bisphenol-A の代謝によって生じるフリーラジカルが DNA 付加体形成に関与しているのかはわかっていない。

Bouck, N. and G. DiMayorca (1976) Somatic mutation as the

結語

SHE 細胞を用いた形質転換実験は、がん原物質の検出やがん化機構の解明にそれなりの威力を發揮する。しかし、SHE 細胞を含め、培養哺乳類細胞を用いた形質転換実験に成功している研究グループは非常に少ない。SHE 細胞に限っていえば、成功のためには、がん原物質によって敏感に形質転換する細胞と良いウシ胎仔血清を見つけだす必要があり、その上で、これらの細胞を厳重に管理し、かつ厳格に実験を行う必要がある。SHE 細胞形質転換系のようなコロニー・アッセイ法では、培地の pH も重要で、これがコロニーの発育に大きく影響する。したがって、たとえば培地に添加する NaHCO_3 液の pH を下げる工夫や、培養操作ができるだけ短時間に終了させる工夫が必要である。形質転換実験は簡単ではなく、困難で苦労を伴うことを常とする。

参考文献

- 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 U. S. NCI/NTP, *Mutat. Res.*, 204, 17-115.
- Atkinson, A. and D. Roy (1995) *In vivo* DNA adduct formation by bisphenol-A, *Environ. Mol. Mutagen.*, 26, 60-66.
- Barrett, J. C. (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment, *Environ. Health Perspect.*, 100, 9-12.
- Barrett, J. C., N. E. Bias and P. O. P. Ts'o (1978) A mammalian cellular system for the concomitant study of neoplastic transformation and somatic mutations, *Mutat. Res.*, 50, 121-136.
- Barrett, J. C., B. D. Crawford, L. O. Mixter, L. M. Schechtman, P. O. P. Ts'o and R. Pollack (1979) Correlation of *in vitro* growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines, *Cancer Res.*, 39, 1504-1510.
- Barrett, J. C., T. W. Hesterberg and D. G. Thomassen (1984) Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis, *Pharmacol. Rev.*, 36, 53s-70s.
- Barrett, J. C. and J. Huff (1991) Cellular and molecular mechanisms of chemically induced carcinogenesis, *Ren. Fail.*, 13, 211-225.
- Barrett, J. C., M. Oshimura, N. Tanaka and T. Tsutsui (1985) Role of aneuploidy in early and late stages of neoplastic progression of Syrian hamster embryo cells in culture, In: V. Dellarco, P. E. Voytek et al. (Eds), *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*, Plenum Press, New York, pp. 523-538.
- Barrett, J. C. and D. G. Thomassen (1985) Use of quantitative cell transformation assays in risk estimation, In: V. B. Vouk, G. C. Butler et al. (Eds), *Methods for Estimating Risk of Chemical Injury: Human and Non-human Biota and Ecosystems*, John Wiley and Sons, New York, pp. 201-234.
- Brinton, L. A., R. Hoover and J. F. Fraumeni, Jr. (1986) Menopausal estrogen and breast cancer risk. An expanded case-control study, *Br. J. Cancer*, 54, 825-832.
- Degen, G. H., A. Wong, T. E. Eling, J. C. Barrett and J. A. McLachlan (1983) Involvement of prostaglandin synthetase in the peroxidative metabolism of diethylstilbestrol in Syrian hamster embryo fibroblast cell cultures, *Cancer Res.*, 43, 992-996.
- Dunnick, J. K. and J. R. Hailey (1996) Phenolphthalein exposure causes multiple carcinogenic effects in experimental model systems, *Cancer Res.*, 56, 4922-4926.
- Fernandez, A., S. Mondal and C. Heidelberger (1980) Probabilistic view of the transformation of cultured C3H10T1/2 mouse embryo fibroblasts by 3-methylcholanthrene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77, 7272-7276.
- 福田真也 (1987) 歯科臨床で使用されている薬物の発癌性と遺伝毒性の検討, *歯学*, 74, 1365-1384.
- Gart, J. J., J. A. DiPaolo and P. J. Donovan (1979) Mathematical models and the statistical analyses of cell transformation experiments, *Cancer Res.*, 39, 5069-5075.
- Gladek, A. and J. G. Liehr (1989) Mechanism of genotoxicity of diethylstilbestrol *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, 264, 16847-16852.
- Gupta, R. C. (1985) Enhanced sensitivity of ^{32}P -postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts, *Cancer Res.*, 45, 5656-5662.
- Hayashi, N., K. Hasegawa, A. Komine, Y. Tanaka, J. A. McLachlan, J. C. Barrett and T. Tsutsui (1996) Estrogen-induced cell transformation and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Mol. Carcinogenesis*, 16, 149-156.
- Huberman, E. and L. Sachs (1966) Cell susceptibility to transformation and cytotoxicity by the carcinogenic hydrocarbon benzo(α)pyrene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 56, 1123-1129.
- IARC. (1979) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Sex Hormones (II), Vol 21: International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Isfort, R. J., G. A. Kerckaert and R. A. LeBouef (1996) Comparison of the standard and reduced pH Syrian hamster embryo (SHE) cell *in vitro* transformation assays in predicting the carcinogenic potential of chemicals, *Mutat. Res.*, 356, 11-63.
- Ivett, J. L., B. M. Brown, C. Rodgers, B. E. Anderson, M. A. Resnick and E. Zeiger (1989) Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*. IV. Results with 15 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 14, 165-187.
- 児玉昌彦, 井上富貴子, 斎藤 肇, 小田泰子, 佐藤良博 (1990) ステロイドホルモンの DNA 結合にラジカルが関与するか, 日本癌学会総会記事(第 49 回総会), p. 104.
- Korach, K. S. and J. A. McLachlan (1985) The role of the estrogen receptor in diethylstilbestrol toxicity, *Arch. Toxicol.*, 58, (Suppl. 8), 33-42.
- Krauss, R. S. and T. E. Eling (1987) Macromolecular binding of the thyroid carcinogen 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) catalyzed by prostaglandin H synthase, lactoperoxidase and thyroid peroxidase, *Carcinogenesis*, 8, 659-664.
- Liehr, J. G., S. A. Li and T. Oberley (1988) Estrogen carcinogenicity: hormonal morphologic and chemical interactions, In: P. Politzer and F. J. Martin, Jr. (Eds), *Chemical Carcinogens. Activation Mechanisms, Structural and Electronic Factors, and Reactivity*, Elsevier, New York, pp. 312-321.
- Liehr, J. G. (1983) 2-Fluoroestradiol: separation of estrogenicity from carcinogenicity, *Mol. Pharmacol.*, 23, 278-281.
- Liehr, J. G. (1990) Genotoxic effects of estrogens, *Mutat. Res.*, 238, 269-276.
- Liehr, J. G., A. A. Ulubelen and H. W. Strobel (1986) Cytochrome P-450-mediated redox cycling of estrogens, *J. Biol. Chem.*, 261, 16865-16870.
- Nelson, K. G., Y. Sakai, B. Eitzman, T. Steed and J. A. McLachlan (1994) Exposure to diethylstilbestrol during a critical developmental period of the mouse reproductive tract leads to persistent induction of two estrogen-regulated genes, *Cell Growth Differ.*, 5, 595-606.
- Newbold, R. R., B. C. Bullock and J. A. McLachlan (1990) Uterine adenocarcinoma in mice following developmental treatment with estrogens: a model for hormonal carcinogenesis, *Cancer Res.*, 50, 7677-7681.
- Oshimura, M., T. W. Hesterberg, T. Tsutsui and J. C. Barrett (1984) Correlation of asbestos-induced cytogenetic effects with cell transformation of Syrian hamster embryo cells in culture, *Cancer Res.*, 44, 5017-5022.
- Pfeiffer, E., B. Rosenberg, S. Deuschel and M. Metzler (1997) Interference with microtubules and induction of micronuclei *in vitro* by various bisphenols, *Mutat. Res.*, 390, 21-31.
- Pfeiffer, R., B. Rosenberg and M. Metzler (1996) Bisphenol-A disturbs microtubule assembly and induces micronuclei *in vitro*, In: J. J. Li, S. A. Li et al. (Eds), *Hormonal Carcinogenesis II*, Springer-Verlag: New York, pp. 450-453.
- Pienta, R. J. (1980) Transformation of Syrian hamster embryo cells by diverse chemicals and correlation with their reported carcinogenic and mutagenic activities, In: J. deSerres and A. Hollaender (Eds), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, vol. 6, Plenum Press, New York and London, pp. 175-202.
- Pienta, R. J., J. A. Pooley and W. B. Lebherz, III (1977) Morphological transformation of early passage Golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens, *Int. J. Cancer*, 19, 642-655.
- Preston-Martin, S., M. C. Pike, R. K. Rose, P. A. Jones and B. E. Henderson (1990) Increased cell division as a cause of human cancer, *Cancer Res.*, 50, 7415-7421.
- Reddy, J. K., D. L. Azarnoff and C. E. Hignite (1980) Hypolipidemic peroxisome proliferators from a novel class of chemical carcinogens, *Nature*, 283, 397-398.
- Reddy, J. K. and N. D. Lalwani (1984) Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 12, 1-58.
- Reddy, M. V. and K. Randerath (1986) Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ^{32}P -postlabeling test for structurally diverse DNA adducts, *Carcinogenesis*, 7, 1543-1551.
- Roy, D., R. A. Froyd and J. G. Liehr (1991) Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of diethylstilbestrol-treated Syrian hamsters: covalent DNA damage by free

- radicals generated by redox cycling of diethylstilbestrol, *Cancer Res.*, 51, 3882-3885.
- 筒井健機 (1987) 変異原性III. 培養哺乳類細胞による癌原性物質の短期検出系—おもにBHK 21細胞の軟寒天培地内コロニーアッセイ法とハムスター胎児細胞のコロニーアッセイ法について、医・歯科用バイオマテリアルの安全性評価法 (佐藤温重, 桜井靖久編), サイエンスフォーラム, pp. 66-71.
- Tsutsui, T. (1990) Detection of nonmutagenic carcinogens, Proc. Syrian Hamster Embryo Cell Transformation Workshop held in Wintergreen, Virginia, pp. 270-283.
- 筒井健機 (1993) ハムスター胎児代細胞 (SHE), 研究テーマ別動物培養細胞マニュアル (瀬野博二他編), 共立出版, pp. 160-161.
- 筒井健機 (1997) 培養哺乳類細胞によるエストロゲンのがん化機構の研究—³²P-ポストラベリング法によるDNA付加体の検出一, 日薬理誌, 110, 1-9.
- Tsutsui, T. and J. C. Barrett (1990) Sodium bisulfite induces morphological transformation of cultured Syrian hamster embryo cells but lacks the ability to induce detectable gene mutations, chromosome mutations or DNA damage, *Carcinogenesis*, 11, 1869-1873.
- Tsutsui, T. and J. C. Barrett (1997) Neoplastic transformation of cultured mammalian cells by estrogens and estrogenlike chemicals, *Environ. Health Perspect.*, 105 (suppl. 3), 619-624.
- Tsutsui, T., J. C. Barrett and P. O. P. Ts'o (1978) Induction of 6-thioguanine and ouabain resistant mutations in synchronized Syrian hamster cell cultures during different periods of the S phase, *Mutat. Res.*, 52, 255-264.
- Tsutsui, T., G. H. Degen, D. Schiffmann, A. Wong, H. Maizumi, J. A. McLachlan and J. C. Barrett (1984c) Dependence on exogenous metabolic activation for induction of unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells by diethylstilbestrol and related compounds, *Cancer Res.*, 44, 184-189.
- Tsutsui, T., N. Hayashi, H. Maizumi, J. Huff and J. C. Barrett (1997d) Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells, *Mutat. Res.*, 373, 113-123.
- Tsutsui, T., A. Komine, J. Huff and J. C. Barrett (1995) Effects of testosterone, testosterone propionate, 17 β -estradiol and progesterone on cell transformation and mutagenesis in Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 16, 1329-1333.
- Tsutsui, T., H. Maizumi and J. C. Barrett (1984a) Colcemid-induced neoplastic transformation and aneuploidy in Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 5, 89-93.
- Tsutsui, T., H. Maizumi and J. C. Barrett (1984d) Amitrole-induced cell transformation and gene mutations in Syrian hamster embryo cells in culture, *Mutat. Res.*, 140, 205-207.
- Tsutsui, T., H. Maizumi, J. A. McLachlan and J. C. Barrett (1983) Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosome mechanism in carcinogenesis, *Cancer Res.*, 43, 3814-3821.
- Tsutsui, T., N. Suzuki, S. Fukuda, M. Sato, H. Maizumi, J. A. McLachlan and J. C. Barrett (1987) 17 β -Estradiol-induced cell transformation and aneuploidy of Syrian hamster embryo cells in culture, *Carcinogenesis*, 8, 1715-1719.
- Tsutsui, T., N. Suzuki, H. Maizumi and J. C. Barrett (1984b) Characterization of an unscheduled DNA synthesis assay with Syrian hamster embryo cells, *Mutat. Res.*, 129, 111-117.
- Tsutsui, T., N. Suzuki, H. Maizumi and J. C. Barrett (1986b) Vincristine sulfate-induced cell transformation, mitotic inhibition and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 7, 131-135.
- Tsutsui, T., N. Suzuki, H. Maizumi and J. C. Barrett (1990) Aneuploidy induction in human fibroblasts: comparison with results in Syrian hamster fibroblasts, *Mutat. Res.*, 240, 241-249.
- Tsutsui, T., N. Suzuki, H. Maizumi, J. A. McLachlan and J. C. Barrett (1986a) Alteration in diethylstilbestrol-induced mutagenicity and cell transformation by exogenous metabolic activation, *Carcinogenesis*, 7, 1415-1418.
- Tsutsui, T., N. Suzuki and M. Ohmori (1984e) Sodium fluoride-induced morphological and neoplastic transformation, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and unscheduled DNA synthesis in cultured Syrian hamster embryo cells, *Cancer Res.*, 44, 983-941.
- Tsutsui, T., S. Taguchi, K. Hasegawa, T. Ide, K. Kojima, M. Matsumura, J. Huff and J. C. Barrett (1994) Reserpine-induced cell transformation without detectable genetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture, *Carcinogenesis*, 15, 11-14.
- Tsutsui, T., S. Taguchi, Y. Tanaka and J. C. Barrett (1997a) 17 β -Estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells, *Int. J. Cancer*, 70, 188-193.
- Tsutsui, T., Y. Tamura, E. Yagi, K. Hasegawa, Y. Tanaka, A. Uehama, T. Someya, F. Hamaguchi, H. Yamamoto and J. C. Barrett (1997c) Cell-transforming activity and genotoxicity of phenolphthalein in cultured Syrian hamster embryo cells, *Int. J. Cancer*, 73, 697-701.
- Tsutsui, T., Y. Tanaka, Y. Tamura and J. C. Barrett (1997b) Cell transformation and chromosomal alterations by estradiol and its metabolites in cultured Syrian hamster embryo (SHE) cells, *Proc. Am. Assoc. Canc. Res.*, 38, 293 (abstract).
- Tsutsui, T., Y. Tanaka, E. Yagi, K. Hasegawa, M. Takahashi, N. Maizumi, F. Yamaguchi and J. C. Barrett (1998) Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Int. J. Cancer*, 75, 290-294.
- Tsutsui, T., E. Watanabe and J. C. Barrett (1993) Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 14, 611-618.

Environ. Mutagen Res., 20 : 149 - 157 (1998)

本稿は1997年12月3-5日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第26回大会のシンポジウム「癌原性物質検出系としてのセルトランスマーケーション試験の現状」(企画:田中憲穂)で発表された(座長:梅田 誠, 山崎 洋)。

BALB/c 3T3細胞を用いる形質転換試験の改良

土屋 敏行^{1*}, 梅田 誠²

¹ 昭和電工株式会社総合研究所 安全性試験センター 〒267-0056 千葉市緑区大野台1-1-1

² 横浜市立大学 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸22-2

Improvement in the efficiency of the cell transformation assay using BALB/c 3T3 cells

Toshiyuki Tsuchiya^{1*} and Makoto Umeda²

¹ Safety Evaluation Center, Central Research Laboratory, Showa Denko K. K.
Ohnodai 1-1-1, Midori-ku, Chiba 267-0056, Japan

² Yokohama City University
Seto 22-2, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan

Summary

The *in vitro* cell transformation assay utilizing BALB/c 3T3 cells is regarded as a useful method for screening potential carcinogens. In spite of the expectation, however, its use for screening carcinogens has not been fully exploited. It is evident that some difficulties still exist in employing it as a routine procedure, and for this reason we considered it important to attempt further improvement of the method.

In the present study, we examined basal culture conditions of the transformation assay using DME/F12 medium plus insulin-transferrin-ethanolamine-sodium selenite (ITES) and FCS, and optimal duration and timing of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) addition to achieve transformation. The results showed that the use of T medium (modified DME/F-12) or DME/F12 supplemented with 1% ITES plus 2% FCS resulted in a high transformation frequency, but also well supported the growth of transformed foci. Transformation frequency was highest when TPA was started from 1 week after *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) treatment. Optimal duration of TPA-exposure on MNNG-initiated cells was at least 11 days.

In addition, we tested several typical carcinogens and promoters in order to confirm the applicability of the new protocol to the two-stage transformation assay. MNNG and benzo[a]pyrene but not non-carcinogenic benzo[e]pyrene induced transformation foci. With the addition of a metabolic activation system, dimethylnitrosamine was a potent inducer of transformation. Okadaic acid and other tumor promoters enhanced transformation of MNNG-initiated cells.

A collaborative study of the transformation assay was performed by a subgroup of the Non-Mutagenic Carcinogen Study Group, which is a suborganization of the Environmental Mutagen Society of Japan. The results showed that the performance characteristics of this transformation assay were very similar between laboratories.

受付: 1998年1月30日

受理: 1998年2月16日

* To whom correspondence should be addressed:

Toshiyuki Tsuchiya, Safety Evaluation Center, Central Research Laboratory, Showa Denko K. K., Ohnodai 1-1-1, Midori-ku, Chiba 267-0056, Japan

Phone: 043-226-5216 Fax: 043-226-5222

E-mail: tsuchiya@ctl.sdk.co.jp

©日本環境変異原学会

These studies demonstrate that the use of the proposed medium and protocol drastically improves the transformation frequency in this two-stage *in vitro* cell transformation assay.

(This paper, in a session chaired by Makoto Umeda and Hiroshi Yamasaki, was presented to the symposium "The present condition of cell transformation assays for predicting the carcinogenic potential of chemicals", organized by Noriho Tanaka, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords: two-stage cell transformation, BALB/c 3T3 cells, detection of carcinogens, action of tumor promotion, collaborative study

緒 言

近年の化学工業の発展により、数多くの新規化学物質が合成され、身の回りの製品に使用されている。これら新規化学物質の安全性を確認することは、製品の安全管理に加え、研究開発の効率化および労働衛生の立場からも重要である。とくに、癌原性に関しては癌が長い潜伏期間のうちに発症するため、あらかじめその危険性を慎重に調べることが必要である。現在、化学物質の癌原性評価は動物を用いる癌原性試験により行われているが、この試験は莫大な費用と多大な労力、そして長い年月が必要なため、すべての化学物質について検査することは現実的に不可能である。こうした問題に対応する目的で、癌原性予測の短期スクリーニング法として、Ames試験や培養細胞を用いる染色体異常試験などの各種変異原性試験法が開発されている。確かに、変異原性試験が採用された結果、癌原性物質についての予測が容易になった。しかしながら、癌原性物質に対する検出感度は当初期待されたほど高くなく、非変異癌原性物質も数多く見出されている (Mavournin et al., 1990; Zeiger et al., 1990; 宇野ら, 1992; 吉川, 1993; 森田, 1997)。したがって、変異原性試験だけでは癌原性予測には不十分と考えられるようになっている。そのようななか、変異原性試験では陽性とならない発癌のプロモーターを検出する試験の必要性が指摘されている。

われわれは細胞形質転換試験に注目した。形質転換試験は、1個の細胞を起点とする細胞癌化の過程を *in vitro* で観察できる試験系で、二段階発癌実験が可能なことから、癌原性物質のイニシエーションおよび発癌プロモーション作用を評価できるなどの利点を持っている (Kakunaga, 1973; Sakai and Sato, 1989)。また、形質転換試験は発癌に関する癌遺伝子の解析などにも利用されている。したがって、形質転換試験は化学物質の癌原性評価法として優れた *in vitro* 試験法といえる。

1984年フランス・リヨン市にあるWHOの国際癌研究センター(IARC)に、関係研究者が集まり、樹立細胞株を用いての形質転換実験の推奨標準プロトコールの作成が試みられた (IARC/NCI/EPA Working Group, 1985)。そして、本方法の普及を期待したが、今日化学物

質の癌原性評価に本方法を利用している研究機関は世界的にみても限られている。

その主な理由として、①形質転換頻度が比較的低いので、1群に多くの培養皿(12~30枚)を使用する必要があること、②適したFCSロットの選択が難しく、また高価なFCSを大量に使用すること、③培養期間が5~6週間と長いことなど、簡易実験法といわれながらかなりの労力と費用を必要とする試験法であることが、癌原性評価法として利用され難い理由と考えられた。

われわれは形質転換試験法を労力的にも経済的にも実用的な方法に改良するとともに、細胞形質転換のメカニズム解析を試みてきた。本稿では、培地の組成を替えることによる形質転換率の上昇、発癌プロモーターの作用時期の検討などについて紹介する。現在、非変異がん原性物質への対策研究会において本試験法のバリデーションスタディ(新毒性試験法の有用性評価)を実施しており、それらの結果についても合わせ紹介する。

試験法の改良

1. 培地の組成検討

われわれの形質転換試験法は、BALB/c 3T3細胞をイニシエーター処理したのち、1週間通常培地で、ついで2週間プロモーター処理し、さらに1週間培養する。この計4週間の培養のち培養皿を固定・染色して、形成された形質転換細胞増殖巣(フォーカス)の数を算定する。このときの通常培地としては、MEM+10%FCS (Table 1; A)を使用してきた。FCSのロット差、高額

Table 1 Culture Medium for Transformation Assay Using BALB/c 3T3 Cells

Factor	(A) Usual	(B) GIT	(C) Improved
Basal medium	MEM	T	DME/F12 (or T)
NaHCO ₃ (mg/ml)	2.2	1.8	1.2
HEPES (mM)	-	18	15
ITES ¹⁾ (%)	-	1	1
FCS (%)	10	-	2
GFS ²⁾ (mg/ml)	-	3	-

¹⁾ ITES: insulin, transferrin, ethanolamine and sodium selenite

²⁾ GFS: growth factor in serum

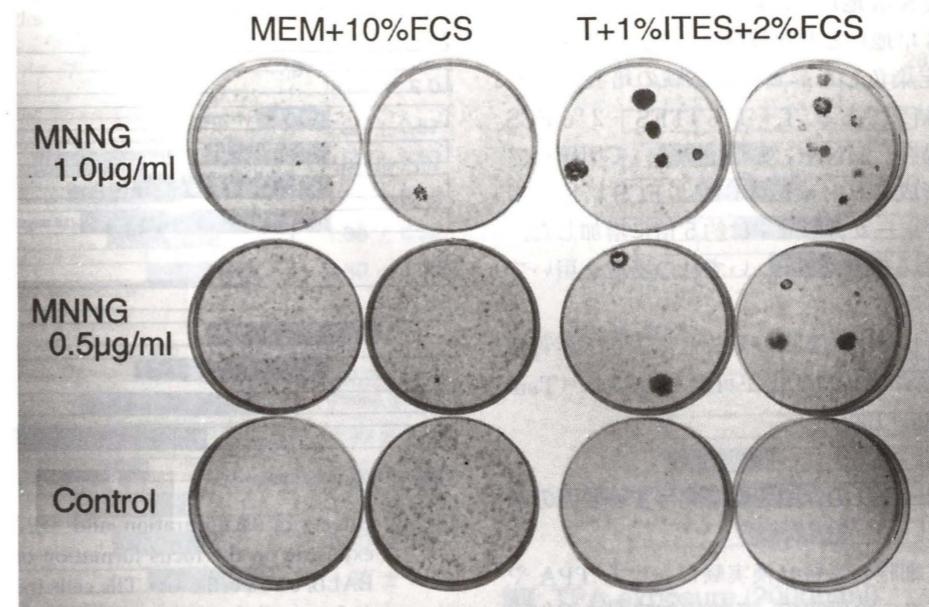


Fig. 1 Giemsa-stained dishes showing the development of foci in MEM+10% FCS medium or T+1% ITES+2% FCS medium. The cells treated with MNNG or DMSO for 4 hours were replated and then cultivated for 3 weeks. TPA (100 ng/ml) was present for the period from 1 to 2.5 weeks.

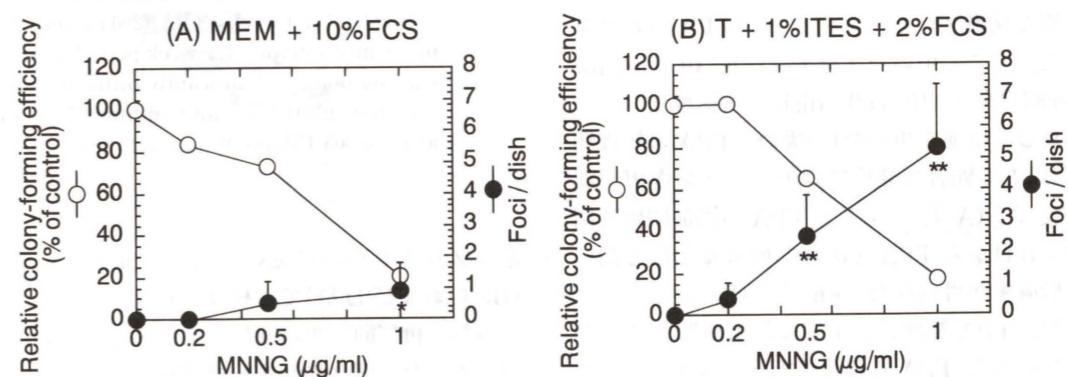


Fig. 2 Colony-forming efficiency and transformation frequency of MNNG and TPA-treated BALB/c 3T3 cells. BALB/c 3T3 cells treated with MNNG at various concentrations for 4 hours were replated and then cultivated for 3 weeks. TPA (0.1 μg/ml) was present for the period from 7 to 18 days. * **Significantly different from samples additionally treated with TPA at $P < 0.01$ and $P < 0.005$, respectively (Mann-Whitney U test).

ということがあります。まず最初に市販されている無血清培地を用いて形質転換試験を試みてみた。MNNG処理した後の培地として、市販のGIT培地を用いたところ、従来法で用いられているMEM+10%FCS培地に比べ、フォーカスの形成頻度が高くなかった。GIT培地はT培地にインスリン、トランスフェリン、エタノールアミンおよび亜セレン酸ナトリウム(以後、ITESと略す)と、牛血清の硫安沈殿成分(GFS)が添加された培地である(Table 1; B)。しかし、このGIT培地は製造ロットによりフォーカス形成頻度が大きく異なることやコロニーが形成できないなど、形質転換試験には難点があった。

われわれは従来法の形質転換試験に用いられている

MEM+10%FCS培地にインスリンを添加することにより、フォーカス形成頻度が高まることを明らかにしている(Umeda et al., 1983)。GIT培地を用いることで形質転換頻度が高くなることに興味をもち、フォーカス形成率を指標にGIT培地の各成分を検討した。ITESの添加量や基本培地などの検討結果から、基本培地としてTまたはDME/F12培地、GFSを2%FCSに替えた培地が優れた形質転換率を示すことを見出した(Table 1; C)。

この培地の有用性をFig. 1, 2に示す。MNNGによるイニシエーション、TPAによるプロモーションの二段階形質転換試験において、従来法で使用されている培地

(MEM+10 % FCS 培地) と、新しい培地 (T+1 % ITES+2 % FCS 培地) とを比較検討した。Fig. 1 は培養 3 週間後に固定染色した形質転換試験の培養皿の写真、Fig. 2 はその結果である。T+1 % ITES+2 % FCS 培地を使用した場合、MNNG 处理群において明確なフォーカスが多数形成され、MEM+10 % FCS 培地を用いた場合に比べフォーカス形成率は約 5 倍に増加した。一方、MNNG による細胞毒性は、いずれの培地を用いてもほぼ同様であった。

このように改良した培地を用いることにより、形質転換試験の短期化および高感度化が可能となった (Tsuchiya and Umeda, 1995)。

2. 発癌プロモーターの作用発現に関する要因の解析

BALB/c 3 T 3 細胞の形質転換実験における TPA や他の発癌プロモーターの研究で、その添加時間や添加時期を検討した報告は乏しい。これまでの形質転換試験における発癌プロモーターの作用時間は 2 ~ 5 週間で、その作用時間は実験者により異なっている。発癌プロモーター処理の至適な実験条件を探る目的で、改良した培地を用い代表的な発癌プロモーターである TPA の処理条件を検討した。ここで用いたプロトコール ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ MNNG 処理細胞を $2 \times 10^4 \text{ cells/dish}$ で再播種し、このときから改良した培地を用いた) の場合、TPA の処理期間は 11 日間以上で顕著な発癌プロモーション作用が認められた (Fig. 3 ; (A))。さらに、TPA の添加開始時期は、再播種 7 日目から TPA を添加し始めると最も高いフォーカス形成率が得られた (Fig. 3 ; (B))。

このように、TPA 处理には至適な作用期間と時期が存在した。これには、TPA 处理時の細胞の状態が関与することが示唆された。そこで、イニシエーター処理後、再播種数を変え、細胞がさまざまな時間に confluence に達するような条件下で、TPA 处理によるフォーカス形成の促進効果を検討した。その結果、播種細胞数により、TPA の至適な処理時期が異なる (Fig. 4)。 1×10^3 ~ $3 \times 10^4 \text{ cells/dish}$ で再播種した場合、TPA の至適な添加時期は細胞が confluence に達した時に一致した。TPA は細胞が confluence に達したときに添加し始めることが重要であることが示唆された。一方、 $1 \times 10^5 \text{ cells/dish}$ で再播種した場合再播種 5 日目には confluence に達したが、TPA の至適な添加開始時期は再播種 7 日目であった。これは *in vitro* 変異原性試験で認められているいわゆる突然変異発現時間 (expression time) が関与していると考えられた。

つぎに、再播種法を用いて形質転換細胞の出現時期を検討した。すなわち、フォーカスの出現時期を調べるために以下の実験を設定した (Fig. 5)。イニシエートした細胞を培養皿に播種したのち、A 群の培養皿は通

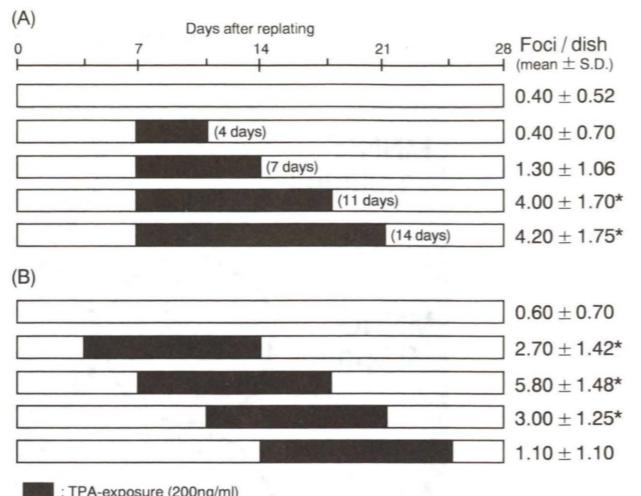


Fig. 3 Effects of (A) duration and (B) timing of TPA-exposure on the focus formation of MNNG-exposed BALB/c 3T3 cells. (A) The cells treated with MNNG ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 4 hour were replated at $2 \times 10^4 \text{ cells/dish}$ and then cultivated for 4 weeks with 2 medium changes per week. TPA ($200 \text{ ng}/\text{ml}$) was present in the medium for various durations starting 1 week after replating. (B) The cells treated with MNNG ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 4 hours were replated, and then cultivated for 4 weeks. TPA ($200 \text{ ng}/\text{ml}$) was present in the medium for a 1.5-week period that varied in its starting point. *Significantly different from MNNG-initiated cultures without additional TPA treatment at $P < 0.005$ (Mann-Whitney U test).

常のプロトコールに従い 3 週間培養した。その他の群 (B, C および D 群) では種々の時間にトリプシン処理したのち、再び同一の培養皿に再播種し、さらに 1 ~ 2 週間培養した。個々の形質転換細胞はフォーカスを形成する能力をもっている。したがって、再播種した培養皿中に形成されたフォーカス数は、トリプシン処理時にフォーカスを形成している形質転換細胞数を示していることになる。

$0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ MNNG 处理した細胞を $1 \times 10^4 \text{ cells/dish}$ で播種し、 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ の TPA を播種後 7 ~ 18 日まで添加した場合の結果を Fig. 6 に示す。細胞を 4 日目に再播種した B 群ではフォーカス形成率は再播種しない場合 (A 群) とほぼ同じであった。細胞播種 7 日後に再播種した場合 (C 群)、10 枚中 6 枚の培養皿ではフォーカスが増加しなかったが、その他の 4 枚ではフォーカスが明らかに増加していた。そのフォーカス形成率は A および B 群の約 2 倍であった。細胞播種 11 日後に再播種した場合 (D 群)、すべての培養皿で多くのフォーカスが観察された。この結果は、 $1 \times 10^4 \text{ cells/dish}$ で細胞を播種した場合、形質転換細胞はイニシエーター処理後 7 日目前後に出現したことを示している。

Fig. 4 と 6 の結果から、TPA の至適な処理開始時期に

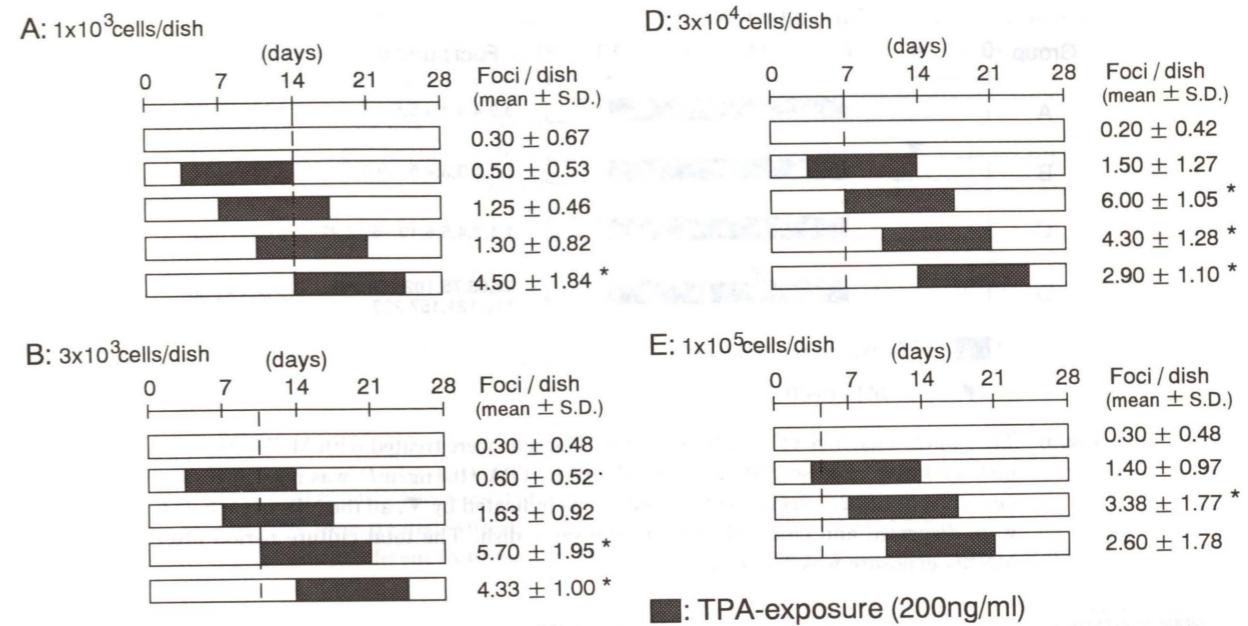


Fig. 4 Relationship between inoculum size at the time of replating and the starting time of TPA-exposure on the focus formation of MNNG-exposed BALB/c 3T3 cells. Cells were treated with MNNG ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 4 hour, and seeded at 1×10^3 (A), 3×10^3 (B), 1×10^4 (C), 3×10^4 (D) or 1×10^5 (E) cells/dish, respectively, and cultured for another 4 weeks with 2 medium changes per week. TPA ($200 \text{ ng}/\text{ml}$) was present in the medium for a 1.5 week period from varied starting times as indicated in the figure. The dash lines in the figure indicate approximate time reaching confluence. *Significantly different from MNNG-initiated cultures without additional TPA treatment at $P < 0.001$ (Mann-Whitney U test).

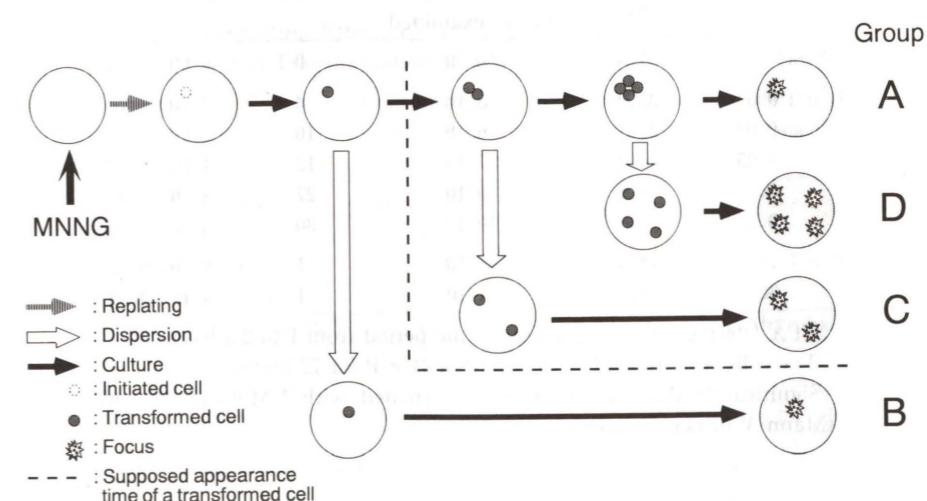


Fig. 5 Rationale of examining the appearance time of transformed cells. In the top line, appearance of a transformed cell and its growth are schematically shown. The other lower lines describe resuspension and reseeding of individual dishes at different times after plating. Any increase in the number of foci observed in the reseeded dishes will represent the number of expanded transformed cells present at the dispersion of the cells.

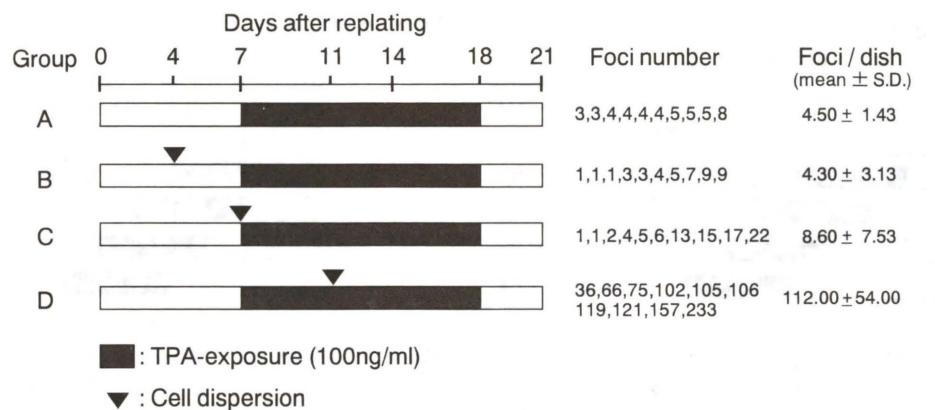


Fig. 6 The appearance time of transformed cells. The cells were treated with MNNG ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 4 hour, and seeded at 1×10^4 cells/dish. TPA ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) was present for the period from 1 to 2.5 weeks. At the time points indicated by ▼, all the cells in each dish were dispersed and cultured again in the same dish. The total culture period after MNNG exposure was 3 weeks.

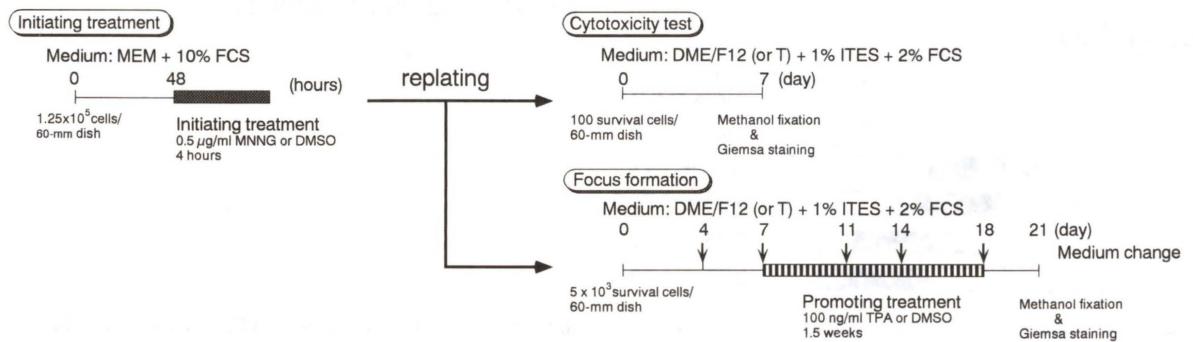


Fig. 7 Improved protocol of *in vitro* transformation assay using BALB/c 3T3 A31-1-1 cells.

Table 2 Induction of transformation in BALB/c 3T3 cells treated with various concentrations of benzo[a]pyrene or benzo[e]pyrene^{a)}

Initiating treatment ^{b)} (μg/ml)	Colony-forming efficiency (%)	Transformation		
		No. of dishes with foci/No. of dishes examined	Total No. of foci	Foci/dish (mean ± SD)
DMSO	51.8	0/10	0	0.00 ± 0.00
B[a]P 0.01	35.9	3/10	4	0.40 ± 0.70
0.02	27.1	6/10	10	1.00 ± 1.25*
0.05	14.4	7/10	12	1.20 ± 1.03*
0.1	8.1	10/10	27	2.70 ± 1.34*
0.2	3.6	10/10	30	3.00 ± 1.15*
B[e]P 10	44.5	1/10	1	0.10 ± 0.32
30	43.4	1/10	1	0.10 ± 0.32

^{a)} TPA ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) was present for the period from 1 to 2.5 weeks.

^{b)} The cells were treated with B[a]P or B[e]P for 72 hours.

* Significantly different from the one treated with DMSO at $P < 0.005$ (Mann-Whitney *U* test).

は添加時の細胞の状態（特に confluence に達する時期）と突然変異発現時間が関与することが示唆された（Tsuchiya and Umeda, 1997）。

1985 年に発表された推奨プロトコール（IARC/NCI/

EPA Working Group, 1985）では、BALB/c 3T3 細胞または C3H 10T1/2 細胞を培養皿に播種し、*in situ* で試験物質を処理する方法が採用されている。この方法では、試験物質処理群の細胞増殖は細胞死や傷害のため、

Table 3 Induction of transformation in BALB/c 3T3 cells treated with various concentrations of dimethylnitrosamine in the absence or the presence of the exogenous metabolic activation system^{a)}

Initiating treatment ^{b)} (μg/ml)	S9 mix treatment	Colony-forming efficiency (%)	Transformation		
			No. of dishes with foci/No. of dishes examined	Total No. of foci	Foci/dish (mean ± SD)
DMSO	—	62.0	0/10	0	0.00 ± 0.00
DMN500	—	63.0	3/10	3	0.30 ± 0.48
DMSO	+	60.0	2/10	2	0.20 ± 0.42
DMN100	+	59.0	3/10	3	0.30 ± 0.48
DMN200	+	27.6	6/10	9	0.90 ± 0.99
DMN300	+	13.3	10/10	33	3.30 ± 1.70*
DMN500	+	2.9	10/10	48	4.80 ± 2.04*

^{a)} TPA ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) was present for the period from 1 to 2.5 weeks.

^{b)} The cells were treated with dimethylnitrosamine with or without S9 mix for 3 hours.

* Significantly different from the one treated with DMSO and S9 mix at $P < 0.005$ (Mann-Whitney *U* test).

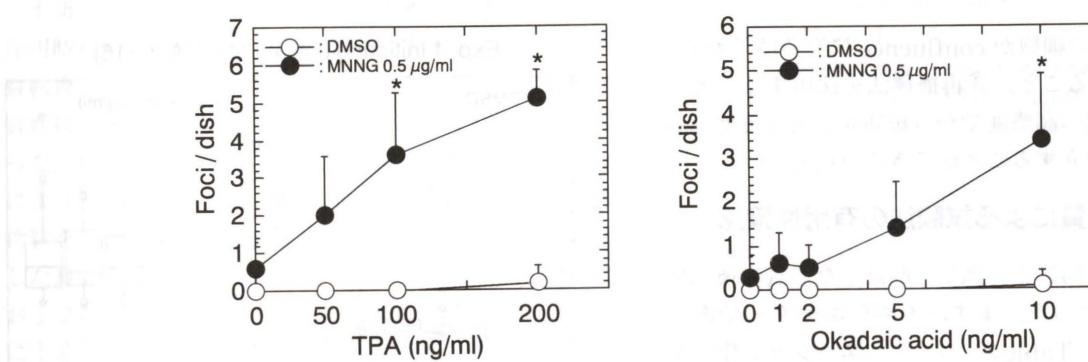


Fig. 8 Promoting effect of TPA and okadaic acid in the two-stage transformation assay using BALB/c 3T3 cells. The cells treated with $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ MNNG for 4 hours were replated, and then cultivated for 3 weeks. TPA or okadaic acid were present at various concentrations for the period from 1 to 2.5 weeks. *Significantly different from samples treated with $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ MNNG without additional TPA or okadaic acid treatment at $P < 0.005$ (Mann-Whitney *U* test).

Table 4 Promoting Effects of Ames-negative Chemicals on MNNG-induced Transformation of BALB/c 3T3 Cells

Chemicals	Concentration (μg/ml)	Transformation frequency (% of control)	Rodent carcinogenicity
DMSO (control)	0.1 % (v/v)	1.0	-
TPA	0.2	10.4	skin
Okadaic acid	0.01	11.7	skin, stomach
Lithocholic acid	10	6.0	colon
Sodium phenobarbital	1	2.6	liver, thyroid

对照群に比べ著しく遅くなり、発癌プロモーター添加時期の細胞の状態もかなり異なることになる。一方、われわれの適用したプロトコールでは、試験物質を処理したのち予備試験の結果から生存細胞数を揃えて播種し直すこととした。再播種法は生存細胞数を揃えるため、発癌プロモーター添加時期の細胞の状態は対照群とほぼ同様

になる。細胞形質転換試験の高感度化および短期化のために再播種法は利点がある。

以上のように、培地の組成検討および発癌プロモーターの添加時期を検討した結果、① MEM+10% FCS 培地に替え、DME/F12（または T）+1% ITES+2% FCS 培地を用いること、② 発癌プロモーターである

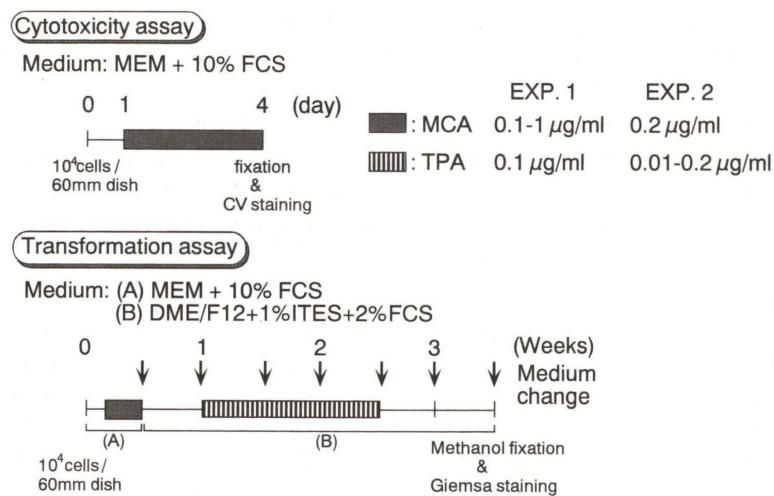


Fig. 9 Protocol of two-stage transformation assay using BALB/3T3 A31-1 cells for validation study.

TPAを培養皿中の細胞がconfluenceになる時期から、1.5週間作用させること、③再播種法を採用することにより、従来法に比べ高感度かつ短期間で実施可能な形質転換試験法を確立することができた(Fig. 7)。

各種化学物質による試験法の有用性確認

代表的な癌原性物質を評価し、改良した形質転換試験法の検出力を検討した。まず、イニシエーターであるMNNG, B[a]P(Table 2)のイニシエーション作用を確認した。非癌原性物質のB[e]Pは陰性であった。DMNはラットS9 mixの代謝活性化により、イニシエーション活性を確認できた(Table 3)。

また、作用機序の異なるTPAおよびokadaic acid (Fig. 8)をはじめ、代表的な発癌プロモーターのプロモーション作用を確認した(Table 4)。これらのことから、さまざまな臓器で発癌プロモーション作用を発現する代表的な発癌プロモーターを、従来の形質転換試験法に比べ約半分の期間で検出できることを明らかにした。

このように、検討した化合物数は少ないものの、本試験法で種々のイニシエーターおよび発癌プロモーターの検出が可能である。

多研究施設での再現性確認

これまでの代表的なイニシエーターおよび発癌プロモーター検出の検討から、検出感度および再現性などの点からも一段と有用な試験法に改良できたことが示唆された。しかし、開発した毒性試験が広く用いられるようになるためには、一つの研究室だけでなく、多くの研究室において信頼性、感受性、特異性、そして再現性などを検討する必要がある(小野、1991)。現在、日本環境変異原学会の非変異がん原性物質への対策研究会のサブグループであるTF-MCワーキンググループにおいて、本試

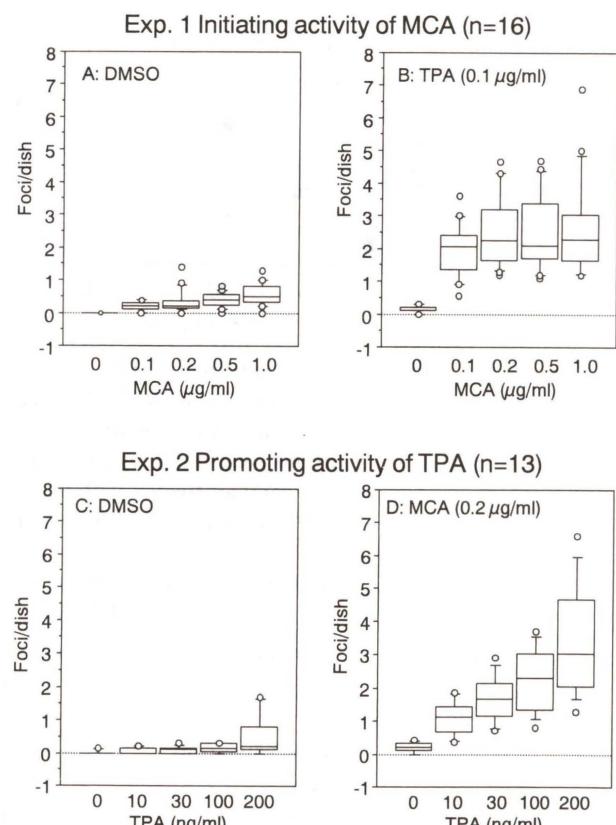


Fig. 10 Box-whisker-plots of transformation frequency from two-stage transformation assay using BALB/c 3T3 cells. The height of box indicates the 25th and 75th percentile of data. A line inside the box indicates median, and bars indicate the range from 10th and 90th percentile and open circles indicate outliers from the range.

験法の標準化および有用性を検討するバリデーションスタディを、20研究機関で進めている。第1回の共同研究で、陽性物質として20-methylcholanthrene(MCA)とTPAを用い、本実験の再現性を検討した(Fig. 9)。その結果、MCAおよびTPAの二段階処理により、濃度依存的なフォーカス形成の増加がほとんどの研究機関で認められた(Fig. 10; 土屋ら、1997)。数回の予備実験は行ったが、とくに技術訓練を行わなくても、改良培地を用いるプロトコールにより、いずれの研究機関でもおおむね良好な結果が得られることが明らかになった。今後、さらに多くの化合物を用いて、この試験法の有用性評価を進める計画している。われわれの改良した形質転換試験法が各方面で利用され、それにより多くの新しい成果の得られることを期待している。

結語

本研究において培地の改良および発癌プロモーターの作用時期などを検討し、BALB/c 3T3細胞を用いる形質転換試験法の改良を試みた。これらの改良により、形質転換試験の高感度化、短期化および安定化が可能となった。代表的なイニシエーターおよび発癌プロモーターによりその有用性が確認された。さらに、多施設で陽性物質を評価した結果、ほとんどすべての研究機関で安定した良好な結果が得られた。今後、この試験法の検出力および特異性を明確にするため、さらに多くの化学物質による詳細な検討が必要である。実験動物数を削減し、増大する癌原性物質を一刻も早くみつけ出せる癌原性試験法の一つとして、改良形質転換試験法を利用できる可能性は大きいと考えている。

謝辞

本研究のバリデーションスタディは以下の方々との共同研究による成果である。浅倉眞澄、杉山淑江(日本バイオアッセイ)、安心院祥三、梶原美次(化検協)、岩瀬裕美子、武田祐子、馬場博(三菱化学)、江部洋史(三井化学)、大石英俊(大日本製薬)、太田絵律奈、水野文夫(三菱化学安研)、笠原靖、出羽康明、増子かおり(杏林製薬)、川端政義、高橋千登勢、矢嶋信浩(雪印乳業)、北田恵美子、久保欣也(キリンビール)、酒井綾子(国立衛研)、佐藤美穂、中村好志(静岡県大)、田中憲穂、若栗忍(食薬安全セ)、筒井健機(日本歯大)、豊泉千佳子(キャノン)、野部尚子、浜田修一(エスエス製薬)、浜村哲夫、伏脇裕一(神奈川環科セ)、水橋福太郎(クミアイ化学)、矢島聰(高砂香料)(五十音順)の諸氏に感謝いたします。また、試験結果の統計学的な解析に御

協力いただいた東京理科大学、吉村功教授、西山智氏に感謝いたします。

参考文献

- IARC/NCL/EPA working group (1985) Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assay of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: Overview and recommended protocols, *Cancer Res.*, 45, 2395-2399.
- Kakunaga, T. (1973) A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from BALB/3T3, *Int. J. Cancer*, 12, 463-473.
- Mavourin, K. H., D. H. Blakey, M. C. Cimino, M. F. Salamone and J. A. Heddle (1990) The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental protection agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.*, 239, 29-80.
- 森田健(1997)変異原性試験による癌原性物質の検出状況、環境変異原研究, 19, 79-89.
- 小野宏(1991)新毒性試験法の有用性確認(Validation)の諸問題、秦野研究年報, 14, 13-20.
- Sakai, A. and M. Sato (1989) Improvement of carcinogen identification in BALB/3T3 cell transformation by application of a 2-stage method, *Mutat. Res.*, 215, 285-296.
- Tsuchiya, T. and M. Umeda (1995) Improvement in the efficiency of the *in vitro* transformation assay method using BALB/3T3 A31-1-1 cells, *Carcinogenesis*, 16, 1887-1894.
- Tsuchiya, T. and M. Umeda (1997) Relationship between exposure to TPA and appearance of transformed cells in MNNG-initiated transformation of BALB/c 3T3 cells, *Int. J. Cancer*, 73, 271-276.
- 土屋敏行、浅倉眞澄、安心院祥三、岩瀬裕美子、梅田誠、江部洋史、大石英俊、太田絵律奈、笠原靖、梶原美次、北田恵美子、久保欣也、酒井綾子、佐藤美穂、武田祐子、田中憲穂、筒井健機、出羽康明、豊泉千佳子、中村好志、馬場博、浜田修一、浜村哲夫、伏脇裕一、増子かおり、水野文夫、水橋福太郎、矢島聰、矢嶋信浩、若栗忍、TF-MCワーキンググループ(非変異・がん原性物質への対策研究会)(1997)BALB/c 3T3細胞による形質転換試験法の有用性的評価: 第1回共同研究の中間報告、日本環境変異原学会 第26回大会要旨集, p. 95.
- 宇野芳文、岩瀬裕美子、吉川邦衛(1992)変異原性試験実施の立場から、一ラット複製DNA合成(RDS)試験の推奨一、環境変異原研究, 14, 75-83.
- Umeda, M., K. Tanaka and T. Ono (1983) Effect of insulin on the transformation of BALB/3T3 cells by X-ray irradiation, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 74, 864-869.
- 吉川邦衛(1993)発がん性予測試験一ラット・マウスの肝複製DNA合成(RDS)試験一、ファルマシア, 29, 44-48.
- Zeiger, E., J. K. Haseman, M. D. Shelby, B. H. Margolin and R. W. Tennant (1990) Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 16, 1-14.

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)

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

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:	印	
Name (ローマ字つづり)		
生年月日(性別)	19 年 月 日	(男・女)
校名/学部:		
住所:	〒	
TEL:	FAX:	
電子メール:		
Affiliation		
Address		
Belong		
自宅住所:		
電話:		
Home address		
学会誌送付先:	①大学	②自宅
研究領域(複数可)		
指導教官名:		
連絡先:		

_____の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。

指導教官

(署名)

日付

印

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
(駒込保健協会内) 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 も受け付けます。)

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) 投稿料は無料とする。ただし規定の頁数を超えることが明らかな場合、頁数の削減を求めることがある。
- 2) カラー印刷等の特殊印刷のため附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

1. 用語は日本語または英語とする。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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)。
7. 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。
8. 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。
9. 句読点はカンマ(,) およびピリオド(.) とする。
10. 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。
11. 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 判の台紙に一枚づつ軽く糊付けする。台紙の下部に Fig. (一連番号) を付す。
12. 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。
13. 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. MacCann 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.



トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に!

DNAシークエ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シークエンシングの受託サービス業務を行っております。

◆Single Primer Extensionによるシークエンシング

基本料金 : ¥12,000/run (納期: お問い合わせ下さい)

一度にお受けするサンプル数に応じて割り引き致します!
(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)のシークエ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!!

15% off

《累計注文数》 1run~ 50runまで 定価 ¥12,000 → ¥10,200/run

20% off

51run~100runまで 定価 ¥12,000 → ¥9,600/run

25% off

101run~ 定価 ¥12,000 → ¥9,000/run

40% off

◆変異解析のための cII 遺伝子(全長 300bp)のシークエンシングの場合

1runからでも ¥7,200/run

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、精製DNA・PCR産物の状態でクール宛配便にてお送り下さい(電気泳動のデータの添付をお願いいたします)。

なお、プラスミドは菌体の状態でも別途料金にて受け付けております。

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

AI-C 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: 〒448-8650 愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地

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

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

E-mail address : acgt@bio.ai-c.co.jp

オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に！ より手頃な価格に！

特徴

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

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

(保存は-80°Cでお願い致します)

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

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

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

製造元



〒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



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)

JIMRO 研究用試薬

コードNo.:655510 容量:96 テスト用 値格: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！

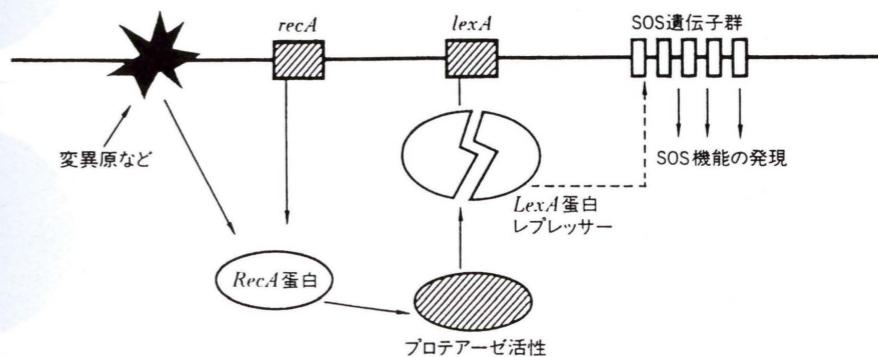
Amesテストでは不可能なヒスチジンを含んだ物質でもテスト可能。食品、尿、血液、粗抽出液等の検体にも適用できます。

☆高感度！ Ames法と相關

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

- 单一試験菌株: 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に簡単な操作が可能です。
- 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-9Mix 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

〒370-0021 群馬県高崎市西横手町 351-1

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

TEL.027-353-1411(代) FAX. 027-353-1770

KIKKOMAN S-9

このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

変異原性試験用凍結S-9

S-9調製法

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

保存

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

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

* Salmonella typhimurium

エームス試験用凍結S-9MIX

特長

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

●包装単位：10ml × 8本、5ml × 4本

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



染色体異常試験用凍結S-9MIX

特長

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

●包装単位：3.5ml × 3本

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

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

変異原性試験画像解析支援システム

各種変異原性試験をサポートする画像解析システムをご用意しております。

SCG画像解析システム

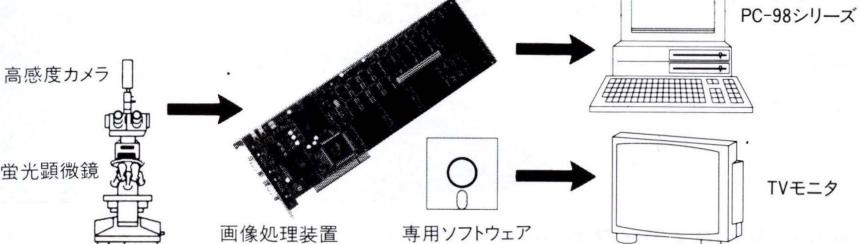
SCG試験に必要なデータを計測します。

高感度カメラの使用及び画像強調処理により細胞の不鮮明な箇所も計測が可能です。

《計測内容》

- Tail Length
- Shape Factor
- Nuclear Diameter
- Tail Intensity
- DNA Migration
- Ratio
- Tail Moment

《システム構成》



UDS画像解析システム

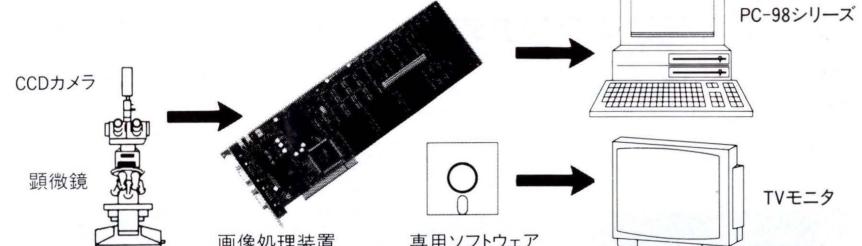
UDS試験に必要なデータを計測します。

フィルタ処理により画像強調を行ない、核と細胞質の各エリア内グレイン数及びNETグレイン数の計測が行なえます。

《計測内容》

- 核グレイン数(1エリア)
- 細胞質グレイン数(3エリア)
- NETグレイン数

《システム構成》



小核画像解析システム

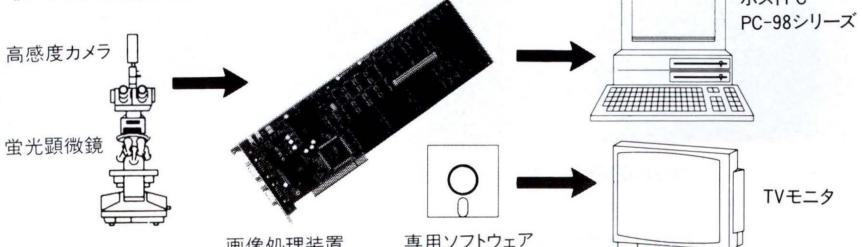
小核試験に必要なデータを計測します。

フルカラー画像解析装置に取込まれた画面内の核を抽出し、小核、主核のカウントやサイズを解析できます。

《計測内容》

- 小核カウント
- 小核サイズ
- 主核カウント
- 主核サイズ

《システム構成》



実績が保証します!

開発製造元 (社)日本システムハウス協会会員

ImageTech®

ケイオ一電子工業株式会社

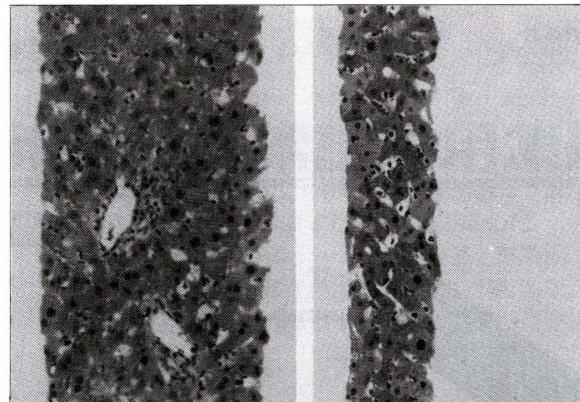
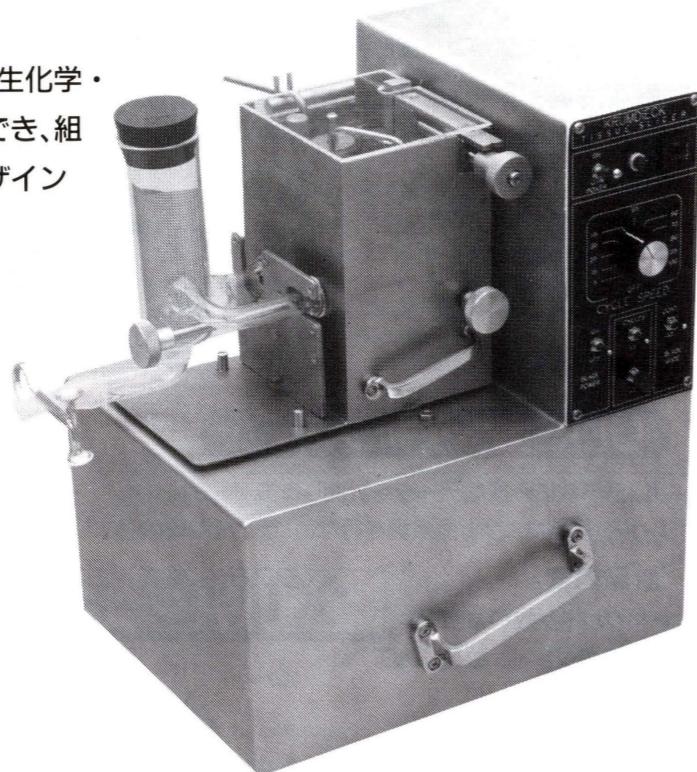
〒567-0828 大阪府茨木市舟木町5番12号 TEL.0726-34-1022
FAX.0726-34-1018

THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

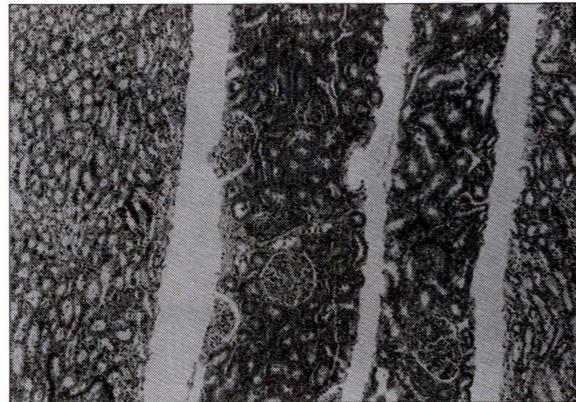
生きた組織の無菌スライスができます。

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

- 薄い円形のスライスが、5~15mm直径の範囲で作成できます。
- ボタンを押すだけで、2~3秒に一枚の割合で(最高スピードの場合)作成でき、初心者でも取扱いは簡単です。
- スライスは再現性良く、バラツキもなく60~1000μmの厚さで作成されます。



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

右の写真はラットの肝臓のスライス(厚さ60μmおよび135μm)で、左の写真はラットの腎臓のスライス(135~200μm)です。どちらも切片面の平行性と美しさ(ダメージがない)に注目して下さい。



販売元
ショーシンEM株式会社

〒444-0241 愛知県岡崎市赤浜町戸西1番地14(ショーシンビル)
TEL. (0564) 54-1231番(代表)
FAX. (0564) 54-3207番

全自动培地作成システム

FULLY AUTOMATED MEDIA PREPARATION SYSTEM



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

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。
- X2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)。

種火のいらない電子着火式ブンゼンバーナー

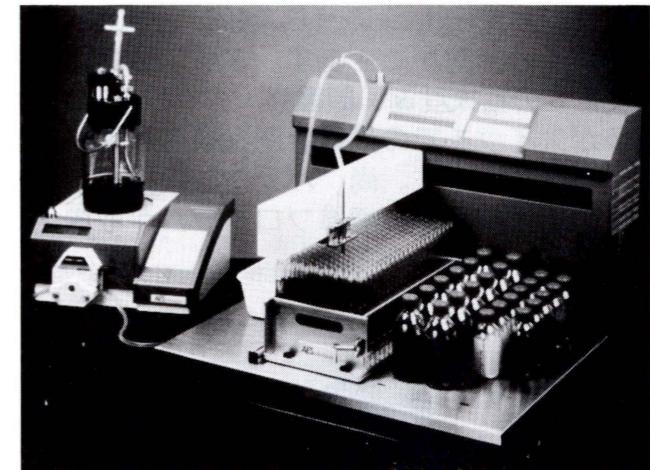
ガスプロфиー



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

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(シリジン、ポンプ、ペリスタルティックポンプ等)でも楽に使用することができる。どんな液体サンプルもスピードと正確さで手をわざわざす分注することができる。



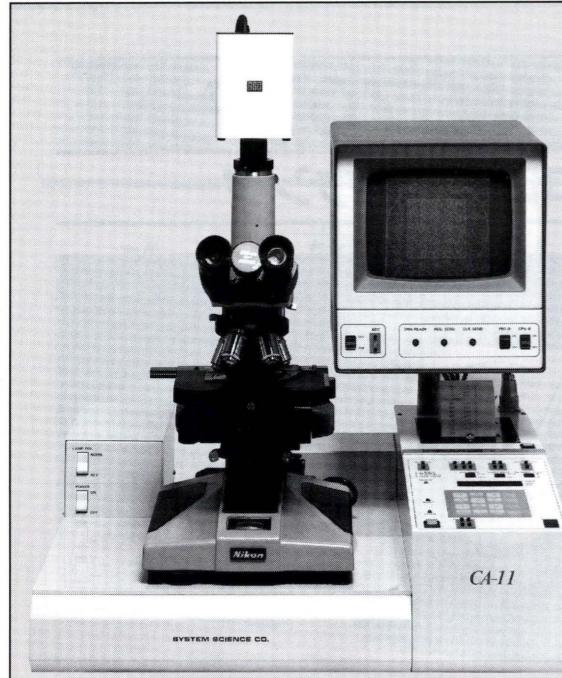
フランス・AES Laboratoire総代理店

株式会社 東京エム・アイ商会

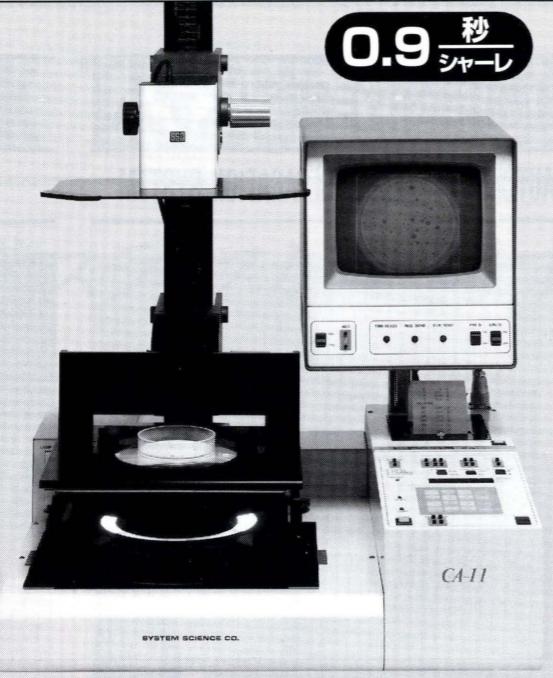
〒104-0033 東京都中央区新川2-7-1

TEL (03) 3551-7873

FAX (03) 3551-7318



CA-11DM



CA-11DS

高速画像積算機能を持つたDシリーズ

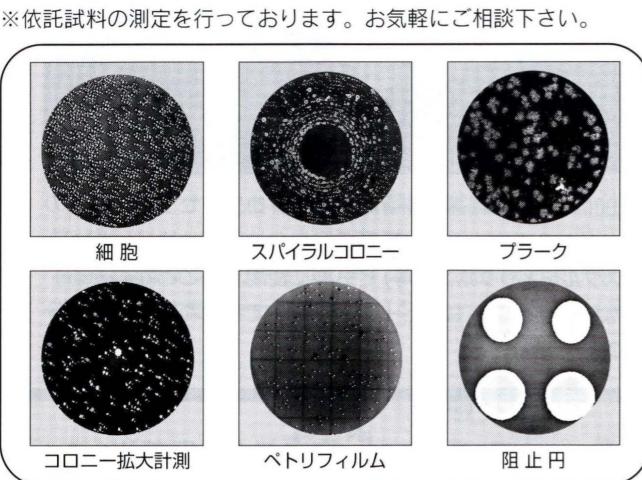
コロニー・アナライザ・シリーズ
CA-11DSF

阻止円計測
コロニー分離計測

自動エリア
スパイラルコロニー

検出感度強化
画像積算機能

試料の均一化
シェーディング補正



製造発売元

SSC 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)

編集後記

本号は、26回大会（秦野）の特集号ですが、一般論文2編、短報1編の投稿もあり、またシンポジウムご講演の諸先生のご協力を得て原稿がたくさん集まりました。次号の20巻3号は今年5月のシンポジウム特集号となりますが、本号で掲載できませんでした26回大会でご講演された諸先生の論文も掲載いたします。一般論文もふるってご投稿ください。担当編集委員 荒木 明宏

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: shimoii@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
Tel: 03-3475-4621 Fax: 03-3403-1738

環境変異原研究 第20巻 第2号 1998年

平成10年7月15日 印刷
平成10年7月21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

Effect of hyperthermia on the micronucleus induction in mice	S. Asanami and K. Shimono	71
大腸菌 WP 2 <i>uvrA</i> 株を用いた突然変異スペクトル解析系の開発	太田敏博, 赤沼三恵, 石原啓美, 北 陽子, 島村万紀,	75
	川口泰史, 時下進一, 志賀靖弘, 山形秀夫	

短 報

NDA, a red-pigment derived from ascorbic acid, induced micronuclei in mouse bone marrow hematopoietic cells	M. Nonaka, M. Mitsuiki, T. Kodama and H. Omura	83
---	--	----

受賞講演

学術賞		
染色体異常を指標としたがん原性物質検出法の開発と評価.....	石館 基	85
研究奨励賞		
ニトロアレーンの構造・変異活性相関およびヒト暴露の実態.....	世良暢之	97

第 26 回大会シンポジウム

生殖細胞変異研究の新しい動向

Identification and characterization of genetic risk from germ cell mutagens	I.-D. Adler	107
メダカ特定座位突然変異一発生過程での生殖細胞突然変異の検出一.....	島田敦子, 嶋 昭絵	113
雄マウスの変異原処理による F ₁ 奇形と自然発生奇形	長尾哲二, 藤川和男	119
ヒト精子を用いた染色体突然変異原性試験の最近の状況.....	上口勇次郎	123
癌原性物質検出系としてのセルトランスクォーメーション試験の現状		
はじめに：癌原性物質検出系としての細胞形質転換試験の現状.....	梅田 誠, 土屋敏行	129
The use of Syrian hamster embryo transformation results for assessing the carcinogenic potential of chemicals		
R. A. LeBoeuf, K. A. Kerckaert, M. J. Aardema, D. P. Gibson and R. J. Isfort	131	
シリアン・ハムスター胎仔 (SHE) 細胞による非変異原性がん原物質のがん化機構の解析	筒井健機	137
BALB/c 3 T 3 細胞を用いる形質転換試験の改良.....	土屋敏行, 梅田 誠	149

付 記

日本環境変異原学会入会申し込み書

投稿規定

執筆規定