

# 環境変異原研究

**Environmental  
Mutagen  
Research**

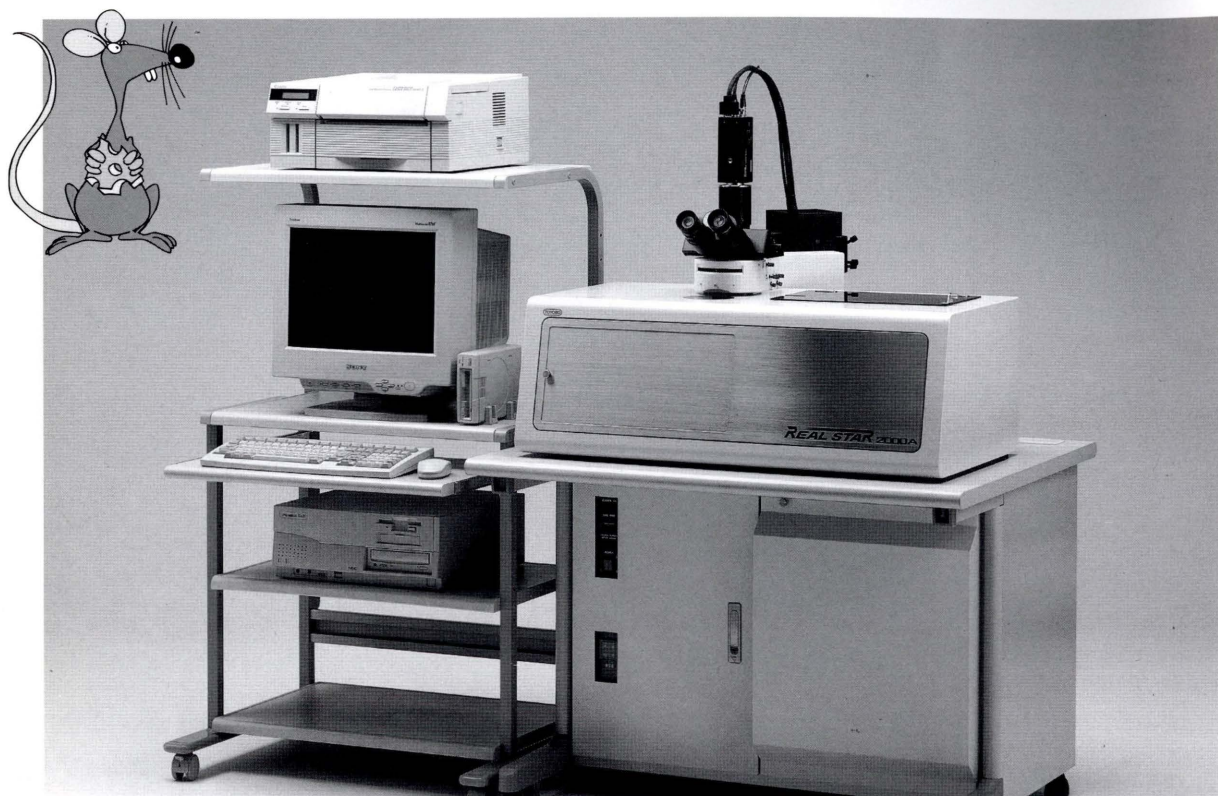
**Vol.21 No.1 1999**



## 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みスライドグラス)



### 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グラス貼合わせ位置を印刷)とグリッドなしタイプがございます。

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

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

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 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

テクニカルライン TEL 06-6348-3888 (開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00 土、日、祝を除く)  
FAX 06-6348-3833 e-mail: techosk@bio.toyobo.co.jp

Environ. Mutagen Res., 21: 1-10(1999)

総説

## 茶カテキン類の抗変異原性および抗発がん性(I)

黒田 行昭<sup>1,2</sup>, 原 征彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立遺伝学研究所 〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111

<sup>2</sup>三井農林(株)食品総合研究所 〒426-0133 静岡県藤枝市宮原 223-1

### Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea catechins (I)

Yukiaki Kuroda<sup>1,2</sup> and Yukihiro Hara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Genetics

1111 yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan

<sup>2</sup>Food Research Institute, Mitsui Norin Co., Ltd  
223-1 Miyabara, Fujieda, Shizuoka 426-0133, Japan

### Summary

Tea is a most popular beverage, consumed by over two thirds of the world's population. Tea is processed differently in different parts of the world to give green (20%), black (78%) or oolong tea (2%). Green tea is consumed mostly in Japan and China. The antimutagenic and anticarcinogenic activities of green tea are extensively examined. The chemical components of green and black tea are polyphenols, which include (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and theaflavins (TFs). This article reviews the epidemiological and experimental studies on the antimutagenicity and anticarcinogenicity of tea extracts and tea polyphenols. In Japan, an epidemiological study showed an inverse relationship between habitual green tea drinking and the standardized mortality rates for cancer. Some cohort studies on Chanoyu (Japanese tea ceremony) women teachers also showed that their mortality rates including deaths caused by malignant neoplasms were surprisingly low. The antimutagenic activity of tea extracts and polyphenols including ECG and EGCG against various mutagens has been demonstrated in microbial systems (*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*), mammalian cell systems and *in vivo* animal tests. The anticarcinogenic activity of tea polyphenols has been shown in experimental animals such as rats and mice, in transplantable tumors, in carcinogen-induced tumors in digestive organs and mammary glands, and in hepatocarcinomas.

This article is a Japanese edition of the review article published in Mutation Research (Kuroda and Hara, 1998) with the permission of Elsevier Science Publishers B. V.

Keywords: green tea, black tea, tea polyphenols, antimutagenesis, anticarcinogenesis

### <略号>

2AA; 2-aminoanthracene

9AA; 9-aminoacridine

2AF; 2-aminofluorene

AFB<sub>1</sub>; aflatoxin B<sub>1</sub>

AOM; azoxymethane

B[a]P; benzo [a] pyrene

B[a]P diol epoxide; 7β, 8α-dihydroxy-

9α, 10α-epoxy-7, 8, 9, 10-tetra-

hydrobenzo [a] pyrene

DBE; 1, 2-dibromoethane

DEN; N-diethyl-nitrosamine

DMBA; 7, 12-dimethyl benzantracene

受付: 1998年10月9日

受理: 1998年11月4日

©日本環境変異原学会



DMH ; 1, 2-dimethyl hydrazine  
 EMS ; ethyl methanesulfonate  
 Glu-P-1 ; 2-amino-6-methyl dipyrdo [1, 2-*a* : 3', 2'-*d*] imidazole  
 HCA ; heterocyclic amines  
 IQ ; 2-amino-3-methylimidazo- [4, 5-*f*] quinoline  
 20MC ; 20-methylcholanthrene  
 MNNG ; *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine  
 NDEA ; *N*-nitrosodiethylamine

NMBA ; *N*-nitrosomethylbenzylamine  
*N*-OH-PhIP ; *N*-hydroxy PhIP  
*N*-OH-Trp-P-2 ; 3-hydroxy amino Trp-P-2  
 NP ; 2-nitropropane  
 4NQO ; 4-nitroquinoline 1-oxide  
 PhIP ; 2-amino-1-methyl-6-phenyl imid-azo [4, 5-*p*] pyridine  
 Trp-P-1 ; 2-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido [4,3-*b*] indole  
 Trp-P-2 ; 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido [4, 3-*b*] indole

## 緒 言

茶(*Camellia sinensis*)は、その起源は中国南部地方に発祥したといわれ、全世界人口のおよそ3分2以上の人々の飲物として使用されている。中国の人々は紀元前3,000年頃には早くも茶を医療用に用い、6世紀の終り頃までにすでに一般的な飲料として用いていた。

茶は多くの薬理的な作用があるばかりでなく、飲料としても好まれる。緑茶は世界で生産される茶の約20%で、ウーロン茶は約2%、残りは紅茶である。緑茶は日本および中国で最も多く消費され、この場合は最初に熱い蒸気で葉に含まれる酵素類を不活化し、葉のポリフェノール類の酸化を防ぐ。紅茶は葉を発酵させてカテキン類を酸化させ、カテキン類の2量体であるテアフラビンおよびデアルビジンの量をふやす。ウーロン茶は茶を部分的に酸化させたものである。

茶のポリフェノールは強力なラジカルを減少させたり除去する作用がある。それらは発がん過程における種々のプロモーターのラジカルや、放射線や光線に照射される過程で生じるラジカルを無毒化する作用をもつ。茶のポリフェノールは消化管内で亜硝酸を還元することにより、強い発がん作用のあるニトロソ化合物の生成を抑制する。茶のポリフェノールは、その他酵素作用やウイルスを不活化する作用があり、ウイルスによって起こる発がんを予防すると考えられる。茶ポリフェノールによる発がん抑制については、菅沼ら(1997)の報告もあるが、ここでは、茶のポリフェノールの抗変異原性および抗発がん作用について、最近10年間位の間に行われた疫学調査、および微生物、培養細胞、実験動物などを使った結果について総説した。原著は本論文著者による Mutation Research (Kuroda and Hara, 1999)に掲載されたものを、Elsevier Science Publishers B.V.の許可を得て、日本語版としてここに掲載した。

## 1. 茶ポリフェノール

茶の品種の差違や環境要因の影響、処理の方法、栽培法の変遷などによって、茶の葉に含まれる化学物質の成

分が異なってくる。処理しない茶の化学組成を Table 1 に示した(Graham, 1983 ; Stagg and Millin, 1975)。

茶に含まれる最も重要な化学物質はポリフェノール、いわゆるカテキンとカフェインで、これらは大きな薬学的な意義をもっている。ポリフェノールは乾燥した葉の中に30—35%程度含まれ、これが飲料としての茶の質を決定する。このポリフェノールの量は、遺伝的要因と気候や日光の照射、降雨、温度、施肥、葉の古さなどの環境要因に依存している。

これらのポリフェノールの中でフラボノールはカテキンの部類に入り、茶葉の細胞の細胞質の空胞に存在する。これらは水に溶けやすく渋味をもった無色の物質である。緑茶や紅茶の粗抽出物の中のポリフェノールの含量は Table 2 に示した(Wang et al., 1994)。そしてこれらの化学構造は Fig. 1 に示した。

この中で EGCG は緑茶の葉の中のエピカテキンの中で最大の含量をもち、EGC や EC、ECG がこれに続く。紅茶では、TF、TFA、TFB、TFDG などのテアフラビンが多量に含まれている。ガレートをもつフラボノイドは茶葉の月日が経つに従って減少し、飲料としての質の低下に深く関連している。

## 2. 抗発がん性の疫学的研究

過去30年間、日本人の最大死因は第1位が脳卒中(高血圧)、第2位が「がん」(悪性新生物)、第3位が心臓疾患であったが、1985年以降は「がん」が日本人の死因の第1位を占めるようになった。1995年には日本人の約28%は「がん」で死亡した。厚生省(1969-1982)や日本癌学会(1981)によって発表された日本人の「がん」死亡の統計では、静岡県での男性および女性の「がん」(とくに「胃がん」)による死亡率は日本人のすべてのがんによる死亡率よりも遙かに低いことを示している。日本学術審議会(National Research Council)の食物と健康委員会(Committee on Diet and Health, 1989)や、世界保健機構(WHO)の国際がん研究機関(IARC)より出しているモノグラフ(1991)によると、これまでの茶とがんについての疫学的研究では、必ずしも一致した結果が得られ

Table 1 Chemical components of unprocessed tea (Graham, 1983 ; Stagg and Millin, 1975)

Chemicals	% of dry wt.	Chemicals	% of dry wt.
Carbohydrate	30	Proteins (4 % free amino acids)	20
Sugars	4	Lipids	2
Starch	2	Polyphenols	3
Pectins	11	Caffeine	5
Pentosans		Minerals (ash)	7
Crude fiber	13	Enzymes, flavor chemicals (volatile), vitamins, chlorophyll and other pigments (cellulose, lignin)	

Table 2 Catechins in green tea and black tea (Wang et al., 1994)

Catechins	Green tea (μg/ml)	Black tea (μg/ml)
Catechins	1,064	300
(+) catechin (C)	21	20
(+) galliccatechin (GC)		
Epicatechins		
(-)-epicatechin (EC)	98	37
(-)-epicatechin-3-gallate (ECG)	90	73
(-)-epigallocatechin (EGC)	411	42
(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	444	128
Theaflavins	0	64
Theaflavin (TF)	0	22
Theaflavin gallate A (TFA)	0	20
Theaflavin gallate B (TFB)	0	13
Theaflavin digallate (TFDG)	0	9
Thearubigins		
Procyanidine (PC)	3	
Procyanidin gallate (PCG)		
Proderfinidine (PD)		
Proderfinidine gallate (PDG)		

ていない。Kinlen et al.(1988)はロンドンにおける症例・対照研究で、茶の消費と胃がんの減少とが正の相関関係があることを報告している。また、Stocks(1970)は20ヵ国を含む初期の研究で、男女ともに茶の消費と胃がんの減少とが有意義に正の相関関係があることを示している。

わが国においては、Tajima and Tominaga(1985)が、名古屋において紅茶および緑茶の飲用が胃がんおよび大腸がんの危険度を増大しないことを報告している。また北九州における胃がんとの症例・対照研究では、緑茶をより頻繁に、または大量に飲む人は、胃がんにかかる危険度がより低い傾向があることを示している(Kono et al., 1988)。最近、茶の飲用とヒトの発がん危険度の関係について、いくつかの総説が発表されている(Yang and Wang, 1993 ; Katiyar and Mukhtar, 1996)。茶の飲用と膀胱や尿道、肺、大腸、直腸、食道、腎臓、肝臓、肺臓、鼻咽頭、脾臓、胃、子宮などの種々の臓器における発がんに関する適切な疫学的研究についての概説がな

されている。Gao et al.(1994)は症例・対照研究で、中国の上海市内では緑茶を飲むことによって、食道がんの危険度が減少することを示している。いくつかの症例・対照の研究では、普通の温度(35—47℃)では茶を飲む量と食道がんの発生率とは何の関係もないが、非常に高温(55—67℃)の茶の飲用は、食道がんの危険度を2倍—3倍に上昇させることと関連があることを示している(Cook・Mozaffari et al., 1979 ; De Long et al., 1974)。

Oguni et al.(1988, 1989)は、Fig. 2 に示した静岡県の75の市町村におけるがんによる死亡率を調査した。静岡県中西部の中川根町、本川根町、川根町は3川根町(3K町)といわれ、緑茶を主生産物とする地方である。この地方のあらゆる臓器のがんや胃がんの標準化した死亡率(SMR)を調べたところ、男女ともに日本人のこれらのがんの平均死亡率より著しく低いことを見出した。これと対照的に、太平洋に面した大須賀町(O町)や伊豆半島にあるいくつかの小さな町村では高いSMR値を示した。3K町における習慣的な緑茶を飲む量はO町よりも著し



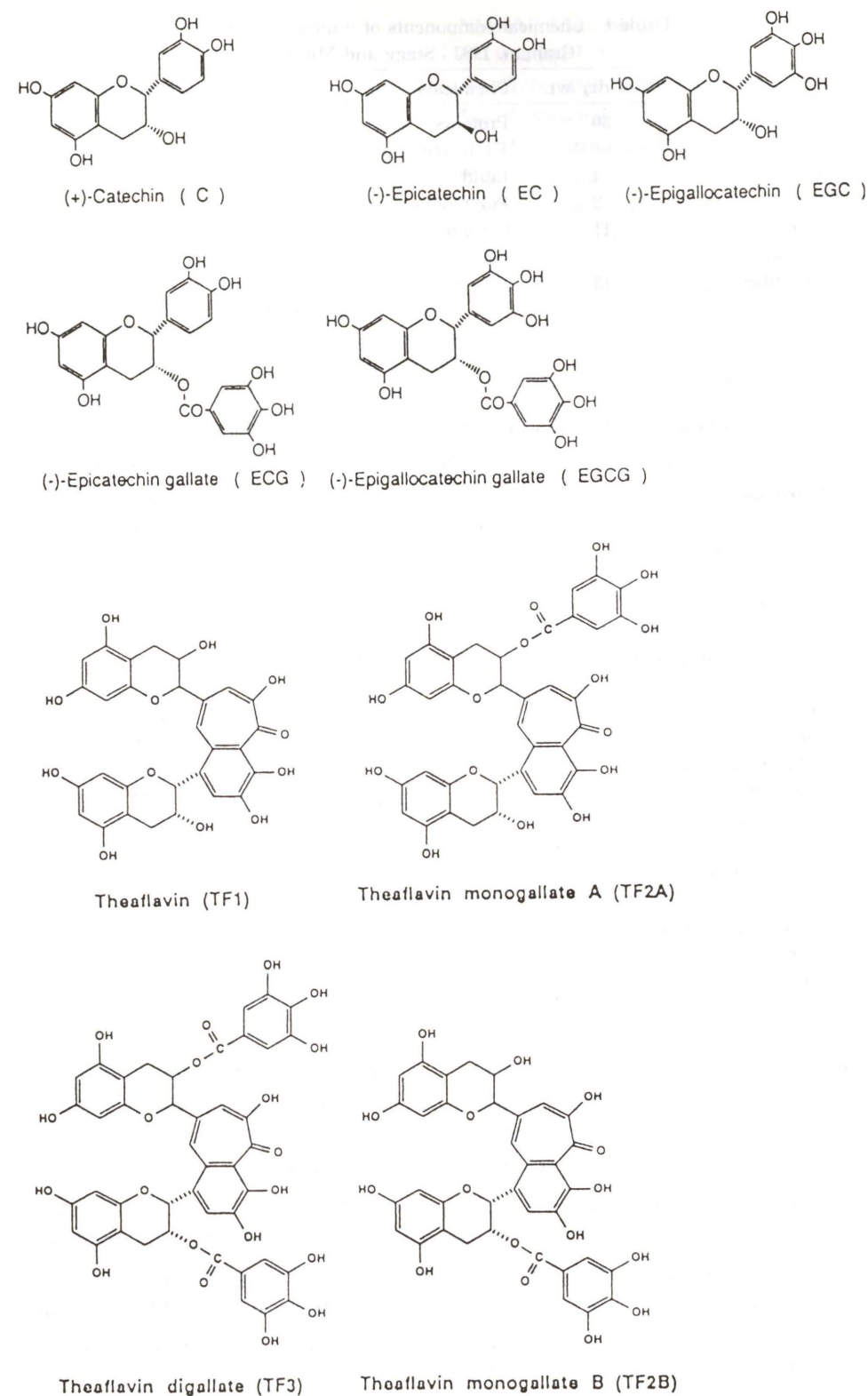


Fig. 1 Chemical structures of polyphenols in tea

く多い。緑茶生産量の最も多い地域として知られている中川根町の胃がんに対する SMR の値は男性が 20.8 で、女性が 29.2 であった。胃がんの全国平均の SMR 値 100 と比較すると、中川根町の SMR 値は、その 1/5—1/3 であった。さらに 3 川根町と大須賀町では緑茶の 1 日に飲

む頻度で比較した結果、3 川根町における緑茶の 1 日あたり飲む頻度は大須賀町よりも高かった。

Sadakata et al.(1992)は茶の湯(茶道)で活動している指導者(師範)についてのコホート研究を行い、緑茶の飲用と寿命の関係を調べている。対象とした茶道の師範

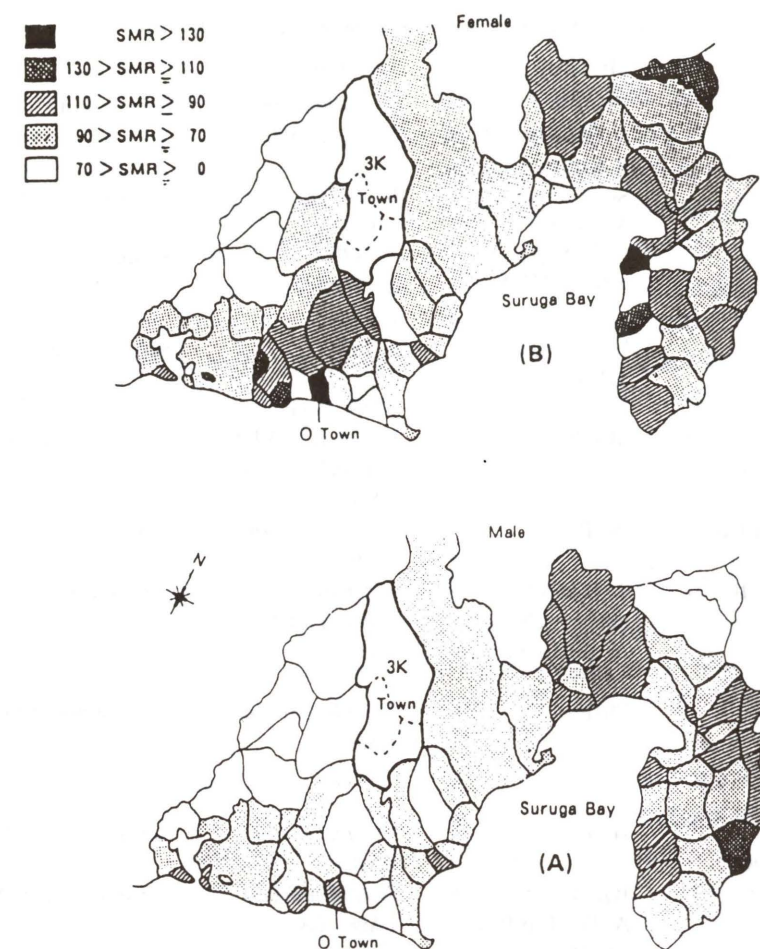


Fig. 2 Map of mortality ratio for stomach cancer in Shizuoka Prefecture, Japan (Oguni et al., 1989)

Table 3 Standardized mortality rates (SMRs) in Chajin in Tokyo (Sadakata et al., 1992)

	Standard population (1985)	
	Japanese women	Women in Tokyo
Number of expected deaths	512.4	493.9
Number of observed deaths	280	280
SMR	0.55 (0.487—0.630) <sup>a,*</sup>	0.57 (0.505—0.642) <sup>*</sup>

<sup>a</sup>Values in parentheses indicate 95 % confidence interval

<sup>\*</sup>P<0.05

は、東京在住の 50 歳以上の女性師範に限定し 1980 年 1 月 1 日に茶道の裏千家に師範として登録されている人とした。この名簿は 1988 年 12 月 31 日までの 9 年間にわたって、毎年更新された。この期間に死亡者があった場合は、死亡証明書によってその死因が確認された。各年の中間点ですべての死亡と名簿からの削除があったと仮定して、9 年間における各年齢における延べ人数の観察値が計算された。そして、この延べ人数から推定される死亡数を全日本人女性の年齢別死亡率および東京在住の女性の年齢別死亡数によって、1985 年の生存推計を用いて計算した。このコホート研究に登録された対象者の数はすべてで 3,380 人であった。この中で 280 人が死亡し、

435 人が名簿から削除された。調査期間の終了時における人・年の総数は 26,326 人であった。茶道師範の SMR についてのコホート研究の結果は Table 3 に示した。日本人全女性、および東京に在住する女性から推定される死亡者の数は、それぞれ 512.4 人および 493.9 人で、これらの期待値から算定される SMR の値はそれぞれ 0.55(95 % 信頼限界：0.487—0.620)および 0.57(95 % 信頼限界：0.505—0.642)であった。

死亡した茶道師範の中で 167 人(59.6 %)は、その死因が死亡証明書によって確認されており、これら確認された場合についての悪性新生物(がん)、脳血管傷害、心臓疾患、その他による死亡者はそれぞれ 55 人(32.2 %), 41



Table 4 Studies on antimutagenicity of tea polyphenols

Tea polyphenols	Mutagens	Test systems	Reference
ECG, EGCG	Trp-P-2	<i>S. typhimurim</i>	Okuda et al. (1984)
	N-OH-Trp-P-2	TA98, TA100	
EGCG	B[a]P diol oxide	"	"
EGCG	Spontaneous mutations	<i>B. subtilis</i>	Kada et al. (1985)
		NIG1125	
Tannic acid	UV, 4NQO	<i>E. coli</i>	Shimoi et al. (1985)
	$\gamma$ -rays, MNNG	B/rWP2	
		WP2s	
GC, ECG	UV, 4NQO	<i>E. coli</i>	Shimoi et al. (1986)
EGC, EGCG	MNNG	B/r WP2	
		WP2s, ZA159	
Green and black tea extracts	MNNG	<i>E. coli</i> B/r WP2	Jain et al. (1989)
		<i>S. typhimurium</i>	
		TA100	
Black and green tea extracts	PhIP	<i>S. typhimurium</i>	Apostolides et al. (1996)
		TA98	
Polyphenons 60, 100, B	Aryl-and heterocyclic amines	<i>S. typhimurium</i>	Weisburger et al. (1996)
	AFB <sub>1</sub> B[a]P, DBE, 2-NP	TA98, TA100	
		TA1535	
Galic acid, methyl gallate, catechins, TF, tanic acid	PhIP	<i>S. typhimurium</i>	Apostolides et al. (1997)
		TA98	
Black tea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>S. typhimurium</i>	Shiraki et al. (1994)
TF, TF2A, TFDG		TA104	
Black tea extract	IQ, B[a]P	<i>S. typhimurium</i>	Shiraki et al. (1994)
	AFB <sub>1</sub> , Trp-P-1, Glu-P-1	TA98, TA100	
ECG, EGCG	4NQO, EMS	Chinese hamster V79 cells	Kuroda (1996)
		6TG <sup>+</sup> mutation	
Green tea extract	AFB <sub>1</sub>	Rat bone marrow cells, chromosome aberrations	Ito et al. (1989)
Green tea extracts	IQ, Glu-P-1, B[a]P, DMBA, 2AF, 2AA, 9AA, MNNG	<i>S. typhimurium</i>	Bu-Abbas et al. (1994)
		TA98	

人(24.6%), 35人(21.0%)および36人(21.6%)であった。このコホート研究では、茶道師範の死亡率は日本人全女性および東京在住の女性の死亡率に比べて驚くほど低いことが示され、緑茶がこのようないくつかの死亡につながる病気に対して予防要因となっている可能性を示している。

沖縄においては長い間、肺がんによる死亡率が、日本国内の47都道府県(人口100,000人あたり男性30.3人および女性7.9人)に比して、高い肺がん死亡率(同男性38.2人および女性10.2人)を示してきた。

Ohno et al.(1995)は1988年、沖縄において茶の飲用

と肺がん危険率との関係について症例・対照研究を行った結果、とくに女性では沖縄茶(部分的発酵茶)の飲用が多いほど、肺がんの危険度が低いことがわかった。女性について、毎日1—4杯、5—9杯および10杯以上の沖縄茶を飲む人の肺がん危険度の比率は、それぞれ0.77、0.77および0.38であった。

### 3. 抗変異原性

#### 1) 微生物系

茶のポリフェノールの抗変異原性の多くは、微生物や哺乳動物の *in vitro* および *in vivo* の系で、広範な研究

が行われている。ここに総説したこれらの研究はTable 4に示した。

Trp-P-2やN-OH-Trp-P-2の変異原性に対する茶カテキン ECG および EGCG の抑制作用は、まず最初、サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA 98 および TA 100 にラット S 9 mix を添加または無添加で、1984年 Okuda et al.によって見出された。EGCG は TA 100 の系統で S 9 mix 無添加でも B [a] P の変異原性に対して強い抑制作用があることを示した。

Kada et al.(1985)は微生物の系で、日常の食品や香料、薬品などを含む植物や動物の成分の天然物抗変異原性について、系統的なスクリーニングの研究を行い、日本の緑茶のホモジネートが枯草菌 *Bacillus subtilis* (*met his mut-1*)の NIG 1125 系統で、DNA 合成酵素 III の変異による自然突然変異に対して高い抗変異原性をもつことを見出した。Kada et al.はその抗変異原性の活性本体を化学的に決定することを試み、12 g の緑茶の粗抽出物から 0.85 g の EC、1.44 g の EGC、1.24 g の ECG および 4.87 g の EGCG を得た。上記 4 つのカテキンでの抗変異原性を調べた結果、EGCG のみが NIG 1125 系統で生物抗変異原性が示された。

Shimoi et al.(1985)は大腸菌 B/r WP 2、および修復欠損系統 WP 2 s、ZA 159 を使って、紫外線または  $\gamma$  線の放射線照射と 4 NQO または MNNG の化学物質処理によって誘発される突然変異に対して、抗変異原作用があり、また医療用に使用できる植物を見出すために、150 種類の植物についてスクリーニングを行った。この結果、紫外線または 4 NQO によって大腸菌 B/r WP 2 に誘発される突然変異が、タンニン酸によって抑制されることを見出した。この紫外線誘発の突然変異に対するタンニン酸の抑制作用は、DNA の修復能力をもつ WP 2 系統では顕著であるが、除去修復能力のない WP 2 s や ZA 159 系統ではみられなかった。

これらの結果から、タンニン酸は DNA 傷害の修復酵素を活性化するか、DNA との相互作用によって除去修復を高めていることを示している。大腸菌の DNA 修復能力の異なる系統での紫外線(254 nm)で誘発される突然変異に対して、生物抗変異原性をもつタンニン酸以外の植物フェノール成分をスクリーニングする過程で、Shimoi et al.(1986)は GC、ECG、EGC、EGCG が突然変異の誘発を抑え、カフェイン酸やクロロゲニック酸、ケルセチンなどはその作用がないことを見出した。

これらの結果に対して Jain et al.(1989)は緑茶および紅茶の抽出物は、大腸菌 WP 2 系統において、MNNG の突然変異作用を減少させることを報告している。MNNG と茶抽出物を細胞に作用させる前にあらかじめ保温すると、MNNG の変異原性を 39—45 %減少させた。他方、MNNG 処理の後で茶抽出物の処理を行っても、MNNG の変異原性は減少させることができなかった。MNNG

と緑茶や紅茶の EC、ECG、EGC、ガーリック酸、タンニン酸、*n*-プロピルガラートとを一緒に保温すると、MNNG の変異原性は減少した。これらの結果は、茶の抽出物が MNNG そのものか、その活性化体と消変異原的(desmutagenic)に作用し合っているが、MNNG による DNA 傷害を生物的抗変異原的に修復するように働いてはいないことを示唆している。

タンパク質を多く含む食物、とくに肉や魚を調理する過程では、多くの複素環アミン類(HCAs)が形成される。約 19 の HCAs が分離され、その構造が決定された(Buecher et al., 1988; Adamson et al., 1995)。これらの HCAs の中で、PhIP(CASNo. 10650-23-5)は、その主な生成物の 1 つである。これは調理しない牛肉のものと重量の約 15 ppb 存在する。そしてその濃度は、調理の仕方によって変化する。この PhIP は、油でいためた牛肉のすべての遺伝毒性物質の 75 %を占め、また全変異原性の 18 %を占める(Felton et al., 1986)。

Apostolides and Weisburger(1995)および Apostolides et al.(1996)は、標準の緑茶および紅茶抽出物は  $\alpha$ -ナフトフラビンとフェノーバーピタルで誘発したラット肝の S 9 分画を加えたサルモネラ TA 98 テストで、PhIP によって誘発される突然変異を抑制することを報告している。溶媒による抽出法によって、茶の抽出物からポリフェノールを精製した。紅茶のポリフェノールは、緑茶のポリフェノールよりも突然変異をより強く抑制した。ポリフェノールを多量に含む茶の系統の成育と選抜が、南アフリカで行われた。PhIP の 2 つの濃度で生じた細菌の突然変異の濃度依存的な抑制効果が、調べたすべての茶抽出物に見出された。

Weisburger et al.(1996)は、緑茶のポリフェノール類としてポリフェノン 60 および 100、紅茶のポリフェノン B(Hara, 1994)について、1 セットの遺伝毒性のある発がん物質に対する影響を調べた。そしてこれらのすべての化学物質の変異原性を全般的に抑制するかどうか、または化学物質の種類や構造との関係で、選択的な抑制作用があるかどうかをサルモネラの TA 98、TA 100 および TA 1535 を用いて調べた。すべてラット肝 S 9 分画を含む系で、ポリフェノール類は AFB<sub>1</sub>、B[a]P、DBE の多くのアリールおよび複素環アミンの変異原性を強く抑制し、2-ニトロプロパンの変異原性を選択的に抑制した。

ハムスターの S 9 分画を生化学的活性化のために必要とする 2 つのニトロソアミン類に対しては、強い抑制作用を示した。1-ニトロピレンや、直接作用する(S 9 なし)2-クロロ・4-メチルチオ酪酸に対しては抑制作用がなかった。これらの結果から、ポリフェノール類は種々のタイプの発がん剤の突然変異性を著しく減少させることを示している。

茶および他の材料から得られたいくつかの純粹のポリ



フェノール化合物について、サルモネラの TA 98 に S 9 分画を加えた系で、PhIP による突然変異の抑制について調べられている (Apostolides et al., 1997)。カテキンとそのガラートエステルとして C, EC, EGC, ECG および EGCG, テアフラビンとして TF, TFA, TFB, TFDG, およびグルコース (タンニン酸) は、10  $\mu$ M PhIP の変異原性に対して 80—250  $\mu$ M の濃度で低い IC<sub>50</sub> を示した。一方、メチルガラートやガーリック酸はこの濃度範囲では抑制作用を示さなかった。その IC<sub>50</sub> の値はガラートエステルの分子量に対して逆の比例関係を示した。またテアフラビンの混合分画では非常に低い IC<sub>50</sub> の値を示した。PhIP の変異原性に対するガラート化カテキンおよびテアフラビンの抑制は、前発がん物質 PhIP が最終発がん物質 N-OH-PhIP への代謝活性化の抑制作用によるものである (Buonarati and Felton, 1990; Hayatsu et al., 1992; Boobis et al., 1994; Kato and Yamazoe, 1994)。

紅茶のテアフラビンの抗変異原性および抗酸化作用については、サルモネラ TA 104 系統を使用して報告されている (Shiraki et al., 1994)。TF, TF 2 A, TFB および TFDG など使用されたすべてのテアフラビンは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって誘発される突然変異を抑制し、また t-ブチルヒドロ過酸化物によって誘発されるウサギ赤血球のゴーストの過酸化を抑制した。また、テアフラビンはラット肝のミクロゾーム系によって起される S 9 のリビドの過酸化の過程で、抗酸化作用を示した。

#### 2) 哺乳動物細胞系

培養哺乳類細胞で、Kuroda (1996) は ECG および EGCG がチャイニーズ・ハムスター V 79 細胞で 4 NQO によって誘発される 6-チオグアニン (6 TG) 抵抗性の突然変異に対して抑制作用をもつことを見出した。カテキン類のこの抗変異原活性は、細胞を 4 NQO で処理した後、突然変異発現時間の間カテキンで後処理した場合にのみ見出され、4 NQO とカテキン類とを同時に処理した場合にはみられなかった。カテキン類のこの生物学的抗変異原性は、EMS で誘発される突然変異では見出されなかった。このことはカテキン類の抗変異原性は、カテキンが生物学的抗変異原または抑制因子として細胞内で作用していることを示唆するものである。

#### 3) *in vivo* の実験動物系

緑茶の熱湯抽出物はラットの骨髓細胞で AFB<sub>1</sub> を注射する 24 時間前に緑茶抽出物を与えると、AFB<sub>1</sub> で誘発した染色体異常を抑制する (Ito et al., 1989)。AFB<sub>1</sub> 注射の 2 時間前、または 2 時間後に緑茶の抽出物を与えたラットには、緑茶の抑制作用はみられなかった。この AFB<sub>1</sub> 誘発の染色体異常に対する緑茶抽出物の抑制効果は、緑茶抽出物の量に比例し、AFB<sub>1</sub> 注射の 24 時間また

は 2 時間前、0.1—2 g/kg の紅茶やコーヒーを与えた場合には抑制作用がみられなかった。

#### 4. 抗発がん性

茶のポリフェノールの抗発がん性は、ラットやマウスを使って発がん剤によって誘発される種々のがんについて報告されている。

##### 1) 移植性腫瘍

Hara et al. (1989) は 20 MC 誘発のラット固型腫瘍やマウスの肉腫 180、マウスのエールリッヒ固型腫瘍などの移植性腫瘍の増殖に対して、緑茶から抽出した EGCG や粗カテキン類の効果を調べた。この結果、EGCG および粗カテキン類は、これらの腫瘍を皮下移植した後、腹水または皮下に投与することによって、抑制効果のあることを示した。腫瘍を移植する前に粗カテキンを経口投与すると、腫瘍を移植した後の腹腔内投与の効果を高めることがわかった。EGCG および粗カテキン類は、増殖している腫瘍細胞に直接作用するよりも、免疫系の機構を活性化することによって、動物の移植性腫瘍の増殖を抑制している可能性を示した。

##### 2) 消化器官のがん

Wang et al. (1995) は、ラットの NMBA 誘発の食道がんに対して、カフェインを除いた緑茶や紅茶、標準緑茶の抑制効果を示した。抑制作用は茶を NMBA 処理中や、処理後に与えた時に効果があり、茶の成分は食道がん生成過程のイニシエーションおよびイニシエーション後の過程を抑制する。カフェインを除去した紅茶も、脱カフェインの緑茶と同じような抑制作用を示した。緑茶抽出物とカテキン類、とくに EGCG は、マウスやラットの消化器官における発がん物質誘発のがんの増殖を抑制した。Han and Xu (1990) は、中国茶がラットで NMBA 誘発の食道がんの形成を抑制することを見出している。

A/J マウスに飲み水として緑茶を煎じた液を与えると、1 週間に一度 8 週間にわたって経口で NDEA を与えて誘発された前胃がんの増殖が抑えられた (Wang et al., 1992 a, 1992 b; Yamane et al., 1995)。MNNG で誘発されたラットの腺胃がんについては、Yamane et al. (1995) が EGCG による抑制作用を報告している。DMH を 1 週間に一度マウスに皮下注射して生じた大腸がんは、緑茶のカテキンまたは EGCG を 1 週に 5 回、23 週間にわたって胃に緑茶カテキンまたは EGCG を灌流させることによって抑制される (Pingzhang et al., 1994)。そのほか NDEA や B [a] P で前処理したマウスに緑茶の煎じたものを与えると、悪性の前胃がん (扁平上皮がん) をもつマウスの数を減少させることが見出されている (Katiyar et al., 1993 a; 1993 b)。

また、数種の抗発がん性の化合物は、悪性細胞のアポ

トーシス (プログラムされた細胞死) を活性化させることが知られている (Lotan, 1995; Piazza et al., 1995)。Hibasami et al. (1998) は、ヒト胃がん由来の KATO III 細胞を緑茶カテキン (GTC) 抽出物または EGCG で処理すると、増殖が抑制され、アポトーシスを誘導することを見出した。KATO 細胞を 1 mM の EGCG または 0.5 mg/ml の GTC 抽出物で 2 日間処理すると、アポトーシスによる断片化が示された。

Weisburger et al. (1997) は F 344 の雄のラットに、AOM の皮下注射を行って生じた大腸の異常島のフォーカスが飲料水の代わりに、1.25 % 茶または茶とミルクの溶液を与えると減少することを示している。

##### 3) 乳がん

乳がんについては、DMBA によって誘発されたラットの乳がんが、GTC を含む餌を与えることによって抑制され、生存率が有意に高くなることが示されている (Hirose et al., 1994)。魚を調理した際に生ずる最も多くの複素環アミンの一つである PhIP はすでに述べたように、サルモネラの TA 98 に強い変異原性を示し、F 344 の雌ラットの乳腺や大腸にがんを誘発する。1 % GTC を含む餌を与えたラットの生存率は、対照の正常の餌を与えたラットよりも高い。乳腺の腺がんの出現頻度は、ラットの餌に GTC を加えることによって減少した (Hirose et al., 1995)。

Weisburger et al. (1997) は、SD ラットの雌に DMBA を与えて誘発した乳がんの増殖率や体積が、発がん剤の投与 1 週間前から飲み水の代わりに 12.5 % の茶を与えると、減少することを報告している。茶とミルクを与えたラットでは、IQ によって誘発されるがんの増殖性は増大したが、がんの容積は減少した。高脂肪の餌で飼育したラットに DMBA を与えて乳がんを生じさせる実験で、2 % の茶を飲ませることによって乳がんが抑制された。これは、DMBA によって誘発される乳がんのプロモーションを茶が抑制したことを示している (Rogers et al., 1998)。

##### 4) 肝がん

肝がんに対する GTC の抑制作用についてもいくつかの報告がある。ラットの餌に緑茶の葉を与えると、DEN で誘発される肝がんや (Li, 1991)、AFB<sub>1</sub> によって誘発される  $\gamma$ -グルタニル・トランスベクチダーゼ陽性の肝のフォーカスの形成が抑制された (Chen et al., 1987)。また、緑茶抽出物は酸素の遊離ラジカルによる肝細胞の致死の誘発や、肝細胞の DNA 合成などが抑制されることを示している (Klauning, 1992)。

マウスの自然誘発の肝がんの増殖や、ヒト肝がん細胞系の増殖が、飲み水の中に EGCG を 0.05 % または 0.1 % の濃度で加えることによって抑制される (Nishida et

al., 1994)。Matsumoto et al. (1996) は F 344 の雄マウスに、DEN を腹腔内注射することによって生じた肝がんが、飲み水に 0.05 % または 0.1 % の EC, EGC, ECG, EGCG や紅茶抽出物、ウーロン茶抽出物を 6 週間与えることによって抑制されることが、グルタチオン S-トランスフェラーゼの胎盤型 (GST-P) 陽性のフォーカスの数や面積を測定することによって明らかにした。また、飲み水として与えた緑茶は、ラットの AFB<sub>1</sub> 誘発の GST-P 陽性の肝細胞を抑制し、肝臓のアフラトキンを非発がん性物質に代謝させる能力を促進した (Qin et al., 1997)。

#### 参考文献

- Adamson, R. H., J. A. Gustafsson, N. Ito, M. Nagao, T. Sugimura, K. Wakabayashi and Y. Yamazoe (1995) : Proc. 23rd Inter. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund, Princeton Sci. Publ. Princeton, N. J., pp. 260-267.
- Apostolides, Z. and J. H. Weisburger (1995) Mutat. Res., 326, 219-225.
- Apostolides, Z., D. A. Balentine, M. E. Harbowy and J. H. Weisburger (1996) Mutat. Res., 359, 159-163.
- Apostolides, Z., D. A., Balentine, M. E. Harbowy, Y. Hara and J. H. Weisburger (1997) Mutat. Res., 389, 167-172.
- Bu-abbas, A., M. N. Clifford, R. Walker and C. Ioannides (1974) Carcinogenesis, 15, 2575-2579.
- Boobis, A. R., A. M. Lynch, S. Murray, R. de la Torre, A. Solans, M. Farre, J. Segura, N. J. Gooderham and D. S. Davies (1994) Cancer Res., 54, 89-94.
- Buecher, G., M. G. Knize, I. F. Nes and J. S. Felton (1988) Carcinogenesis, 9, 247-253.
- Buonarati, M. H. and J. S. Felton (1990) Carcinogenesis, 11, 1133-1138.
- Chen, Z. Y., R. Q. Yan, G. A. Qin et al. (1987) Chung Hua Chung Liu Tsa Chin (Chinese J. Cancer), 9, 109-111.
- Committee on Diet and Health, Food and Nutrition Board (1989) Commission on Life Science, Nutrition Research Council, Diet and Health, National Academy Press, Washington DC, pp. 465-508.
- Cook-Mozaffari, P. J., F. Azordegan, N. E. Day, A. Resicand, C. Sabai and B. Aramesh (1979) Brit. J. Cancer, 39, 293-309.
- De Long, U. W., N. Breslow, J. G. Hong, W. Sridharan and K. Shanmugaratnam (1974) Int. J. Cancer, 13, 291-303.
- Felton, J. S., M. G. Knize, N. H. Shen, P. R. Lewis, B. D. Anderson, J. Happe and F. T. Hatch (1986) Carcinogenesis, 7, 1081-1086.
- Gao, Y. T., J. K. McLaughlin, W. J. Blot, B. T. Ji, Q. Dai and F. Fraumeni (1994) J. Nat. Cancer Inst., 86, 855-858.
- Graham, H. (1983) Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Edition, Vol. 22, A. Wiley Inter. Science Publications, John Wiley and Sons, New York, pp. 628-644.
- Han, C. and Y. Xu (1990) Biomed. Environ. Sci., 3, 35-42.
- Hara, Y., S. Matsuzaki and K. Nakamura (1989) J. Japan. Soc. Nutr. Food Sci, 42, 39-45.
- Hara, Y. (1994) C. T. Ho, T. Osawa, M. T. Huang and T. R. Rosen (Eds.) Food Phytochemicals for Cancer Prevention II. Teas, Spices and Herbs, ACS Symp. Series 547, Washin-



gton DC, pp. 34-50.  
 Hayatsu, H., N. Inada, T. Katsutani, S. Arimoto, T. Negishi, K. Mori, T. Okuda, and I. Sakata (1992) *Prev. Med.*, 21, 370-376.  
 Hibasami, H., T. Komiya, Y. Achiwa, K. Ohnishi, T. Kojima, K. Nakanishi, K. Akashi and Y. Hara (1998) *Oncol. Rep.*, 5, 527-529.  
 Hirose, M., T. Hoshiya, K. Akagi, M. Futakuchi and N. Ito (1994) *Cancer Lett.*, 83, 149-156.  
 Hirose, M., K. Akagi, R. Hasegawa, R. M. Yaono, T. Satoh, Y. Hara, K. Wakabayashi and N. Ito (1995) *Carcinogenesis*, 16, 217-221.  
 Ito, Y., S. Ohnishi and K. Fujie (1989) *Mutat. Res.*, 222, 253-261.  
 Jain, A. K., K. Shimoi, Y. Nakamura, T. Kada, Y. Hara and I. Tomita (1989) *Mutat. Res.*, 210, 1-8.  
 Kada, T., K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki and Y. Hara (1985) *Mutat. Res.*, 150, 127-132.  
 Katiyar, S.-K., R. Agarwal and M. T. Zaim and H. Mukhtar (1993a) *Carcinogenesis*, 14, 849-855.  
 Katiyar, S. K., R. Agarwal and H. Mukhtar (1993b) *Cancer Lett.*, 73, 167-172.  
 Katiyar, S. K. and H. Mukhtar (1996) *Int. J. Oncol.*, 8, 221-238.  
 Kato, R. and Y. Yamazoe (1994) *Drug Metab. Rev.*, 26, 413-429.  
 厚生省(1969-1982) : Japan vital statistics studies. Kosei-Tokei-Kyokai.  
 Kinlen, L. J., A. N. Willows, P. Guldblatt and J. Yudkin (1988) *Brit. J. Cancer*, 58, 397-401.  
 Klauning, J. E. (1992) *Prev. Med.*, 21, 510-519.  
 Kono, S., M. Ikeda, S. Tokudome and T. Nomura (1988) *Japan J. Cancer Res.*, 79, 1067-1074.  
 Kuroda, Y. (1996) *Mutat. Res.*, 361, 179-186.  
 Kuroda, Y. and Y. Hara (1999) *Mutat. Res.*, 436, 69-97.  
 Li, Y. (1991) *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih (Chinese J. Cancer)*, 13, 193-195.  
 Lotan, R. (1995) *J. Nat. Cancer Inst.*, 87, 1655-1657.  
 Matsumoto, N., T. Kohri, K. Okushio and Y. Hara (1996) *Japan. J. Cancer Res.*, 87, 1034-1038.  
 日本癌学会(1981) *Cancer mortality and morbidity statistics, Japan and the world.* Japan Scientific Societies Press.  
 Nishida, H., M. Omori, Y. Fukutomi, M. Ninomiya, S. Nishiwaki, M. Suganuma, H. Moriwaki and Y. Muto (1994) *Japan. J. Cancer Res.*, 85, 221-225.  
 Oguni, I., K. Nasu, S. Yamamoto and T. Nomura (1988) *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1879-1880.  
 Oguni, I., K. Nasu, S. Kanaya, Y. Ota, S. Yamamoto and T. Nomura (1989) *Japan. J. Nutrition*, 47, 93-102.  
 Ohno, Y., K. Wakai, K. Genka, K. Ohmine, T. Kawamura, A. Tamakoshi, R. Aoki, M. Senda, Y. Hayashi, K. Nagao, S.

Fukuma and K. Aoki (1995) *Japan. J. Cancer Res.*, 86, 1027-1034.  
 Okuda, T., K. Mori and H. Hayatsu (1984) : *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 3755-3758.  
 Piazza, G. A., A. L. Rahm, M. Krutzsch, G. Sperl, N. S. Paranka, P. H. Gross, K. Brendel, R. W. Burt, D. S. Alberts and R. Pamukcu (1995) *Cancer Res.*, 55, 3110-3116.  
 Pingzhang, Y., Z. Jinying, C. Chujun, Y. Hara, Z. Qingfan and L. Zhengguo (1994) *Cancer Lett.*, 79, 33-38.  
 Qin, G., P. Gopalan-Hriczky, J. Su, Y. Ning and P. D. Lottiker (1997) *Cancer Lett.*, 112, 149-154.  
 Rogers, A. E., L. J. Hafer, Y. S. Iskander and S. Yang (1998) *Carcinogenesis*, 16, 217-221.  
 Sadakata, S., A. Fukao and S. Hisamachi (1992) *Tohoku J. Exp. Med.*, 166, 475-477.  
 Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita and T. Kada (1985) *Mutat. Res.*, 149, 17-23.  
 Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara and T. Kada (1986) *Mutat. Res.*, 173, 239-244.  
 Shiraki, M., Y. Hara, T. Osawa, H. Kumon, T. Nakayama and S. Kawakishi (1994) *Mutat. Res.*, 323, 29-34.  
 Stagg, G. V. and D. J. Millin (1975) *J. Sci. Food Agric.* 26 : 1439-1499.  
 Stocks, P. (1970) *Brit. J. Cancer*, 24, 215-225.  
 菅沼雅美, 岡部幸子, 藤本博太 (1997) *Environ. Mutagen Res.*, 19, 193-198.  
 Tajima, K. and S. Tominaga (1985) *J. Cancer Res.*, 76, 705-716.  
 Wang, Z. Y., J.-Y. Hong, M.-T. Huang, K. R. Reuhl, A. H. Conney and C. S. Yang (1992a) *Cancer Res.*, 52, 1943-1947.  
 Wang, Z.-Y., R. Agarwal, W. A. Khan and H. Mukhtar (1992b) *Carcinogenesis*, 13, 1491-1494.  
 Wang, Z.-Y., M.-T. Huang, Y.-R. Lou, J.-G. Xie, K. R. Reuhl, H. L. Newmark, C. C.-T. Ho, C. S. Yang and A. H. Conney (1994) *Cancer Res.*, 54, 3428-3435.  
 Wang, Z.-Y., L.-D. Wang, M.-J. Lee, C.-T. Ho, M.-T. Huang, A. H. Conney and C. S. Yang (1995) *Carcinogenesis*, 16, 2143-2148.  
 Weisburger, J. H., Y. Hara, L. Dolan, F.-Q. Luo, B. Pittman and E. Zang (1996) *Mutat. Res.*, 371, 57-63.  
 Weisburger, J. H., A. Rivenson, K. Garr and C. Aliaga (1997) *Cancer Lett.*, 114, 1-5.  
 World Health Organization (1991) *International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, IARC Press, Lyon, vol. 51, pp. 201-271.  
 Yamane, T., T. Tokuhashi, K. Kuwata, K. Oya, M. Inagake, Y. Kitao, M. Suganuma and H. Fujiki (1995) *Cancer Res.*, 55, 2081-2084.  
 Yang, C. S. and Z.-Y. Wang (1993) *J. Nat. Cancer Inst.*, 85, 1038-1049.

*Environ. Mutagen Res.*, 21 : 11 - 21 (1999)

## 環境のストレスによって誘導される非相同的組換え —DNA の切断と再結合の分子機構—

小方 康至, 池田 日出男

東京大学医科学研究所・生物物理化学研究部 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

### Illegitimate recombination induced by environmental stress : Molecular mechanism of DNA break and re-joining

Yasuyuki Ogata and Hideo Ikeda

Department of Molecular Biology, Institute of Medical Science, University of Tokyo,  
Sirokanedai 4-6-1, Minato-ku, Tokyo 108-8639

#### Summary

Illegitimate recombination (Nonhomologous recombination) occurs between nonhomologous sequences or short homologous sequences at two different sites of DNA (s), and results in chromosome rearrangements including deletion, duplication, insertion, or translocation. We have developed an *in vitro* system for elucidating the molecular basis of illegitimate recombination using an *in vitro* packaging mixture for phage  $\lambda$  DNA that consists of lysates of induced lysogens of *E. coli*, and found that the recombination is catalyzed by DNA gyrase, *E. coli* DNA topoisomerase II, and does not require short homology. Subsequently, we developed an *in vivo* assay system for the quantitative analysis of illegitimate recombination during the formation of specialized transducing  $\lambda$ bio phage in *E. coli*, and found that the short-homology-independent illegitimate recombination (SHIIR) also occurs *in vivo* in oxolinic acid (an inhibitor for DNA gyrase A subunit)-treated *E. coli* cells and in temperature-sensitive *gyrA* mutants. On the basis of these results, we proposed that SHIIR is mediated by subunit exchange between DNA gyrase. On the other hand, short-homology-dependent illegitimate recombination (SHDIR) was enhanced by ultraviolet (UV) light-irradiation. With regard to the manner in which UV light-irradiation induces SHDIR, we proposed a model in which DNA double-strand breaks (DSBs) occur dependent upon UV light-related DNA damage. We searched for factors which participates in the process, and found that UV light-induced illegitimate recombination is dependent on RecJ protein and suppressed by RecQ protein. To examine the mechanism of illegitimate recombination in eukaryotes, we developed a plasmid system for quantitative analysis of deletion formation in *S. cerevisiae*, and found that Rad50, Mre11, Xrs2 proteins are involved in this process. Moreover, Hdf1 protein, a yeast homologue of Ku70, and its interacting factor, Sir4 protein are responsible for the end-joining process, thereby suggesting that Hdf1 protein and silencing factors alter broken DNA ends to create an inactivated chromatin structure, which is necessary for the re-joining of DNA ends.

**Keywords :** illegitimate recombination, short-homology-dependent and -independent, type II DNA topoisomerase,  $\lambda$ bio transducing phage, silencing factors

受付 : 1999 年 1 月 22 日

受理 : 1999 年 1 月 26 日

©日本環境変異原学会



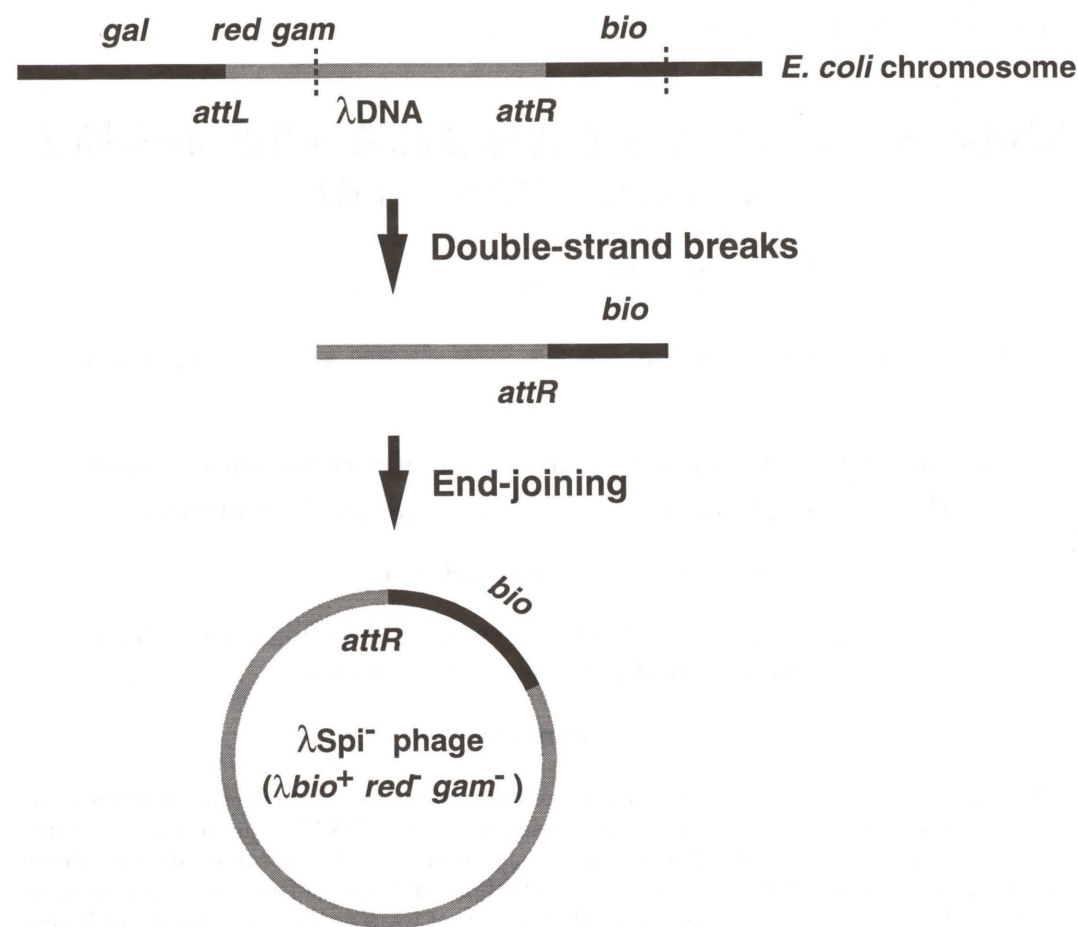


Fig. 1 Illegitimate recombination that occurs during formation of  $\lambda$ bio transducing phages. Most of  $\lambda$ bio phages have defects in the *red-gam* region of  $\lambda$  DNA, and these phages can form plaques on a lawn of *E. coli* P2 lysogen (*Spi*<sup>-</sup> phenotype).

## 緒言

最近、さまざまな遺伝子疾患が、その原因遺伝子の欠失(deletion)や重複(duplication)、挿入(insertion)、転座(translocation)、逆位(inversion)などといった染色体異常によって引き起こされることがわかってきた。例えば、骨格筋の変性や壊死を引き起こす性染色体劣性筋ジストロフィー症の場合、その多くは、原因遺伝子であるDMD(duchenne muscular dystrophy)遺伝子の欠失や重複によるものである。また、以前より腫瘍細胞においては染色体異常が観察されることが知られていたが、慢性骨髄性白血病(CML=chronic myelogenous leukemia)の原因遺伝子が、第9番染色体と第22番染色体の相互転座により形成されるBCR-ABL融合遺伝子であることが見出されて以来、主に造血器腫瘍と肉腫において、数多くの融合遺伝子が報告され、さらに、非腺性遺伝性大腸癌(HNPCC=hereditary nonpolyposis colorectal cancer)の原因遺伝子が、大腸菌においてDNA複製の際に誤って取り込まれた塩基や、鋳型DNAの一部が複製されずに生じた欠失を修復する「ミスマッ

チ修復」に必要な遺伝子であるmutS遺伝子やmutM遺伝子のホモログであることが明らかにされるにいたり、癌化もまた、染色体異常が原因で起こることがわかってきた。

私たちは、このような染色体異常の原因となる「非相同的組換え」が、紫外線や活性酸素などの環境のストレスによって亢進されることを見出し(Ikeda et al., 1995; Onda et al., 1999)、その分子機構の解明を試みている。本論文において私たちは、まず始めに、このような環境のストレスによって誘導される非相同的組換えの分子機構について報告する。

## 1. 非相同的組換えとは何か

「非相同的組換え」とは、DNA上の異なるふたつの部位において、相同性のない塩基配列や、高々数bpの短い相同性のある塩基配列の間で起こる組換えであり、長い相同性のある塩基配列の間で起こる「相同的組換え(homologous recombination)」とは対照的であるという意味で非相同的組換え(nonhomologous recombination)と呼ばれる。

非相同的組換えは、「非正統的組換え(illegitimate recombination)」とも呼ばれるが、そもそもこの言葉は、本来、バクテリアに溶原化した $\lambda$ ファージが誘発される際にごくまれに形成される、そのゲノムの一部が $\lambda$ ファージ由来の、もう一部がバクテリア由来のDNAからなる特殊なファージの形成過程において起こる組換えを指して用いられた言葉である(Fig. 1)<sup>a</sup>。

後にFranklin(1966)は、バクテリアの染色体における欠失や、上で述べた特殊形質導入ファージの形成のように、ごくまれで、でたらめ(haphazard)な“genetic event”を“unusual recombination”と呼び、これが“normal recombination”(すなわち相同的組換え)とは異なり、いわゆるrec遺伝子の機能に依存しないことを示した。これにより、非相同的組換えと相同的組換えとは、基質となるふたつのDNA鎖の塩基配列の相同性の必要性のみならず、その反応の分子機構もまた異なっていることが明らかになった。

## 2. 染色体異常と非相同的組換え

ヒトにおける染色体異常の研究は、染色体の観察技術の向上によってもたらされた。今世紀初頭に議論となった、ヒトの染色体数に関する論争(48説が正しいか47説が正しいかを巡る対立)は、培養細胞を材料として用いたり、いわゆる「押しつぶし法」を適用したりすることによって、従来のパラフィン切片法により観察されていた染色体像よりも明確な染色体像を顕微鏡下に観察することができるようになり、その決着をみたが(Tjio and Levan, 1956)、続く1958年、Fordらが同様な方法でTurner症候群の患者(外見的には女性であるが、小児様の発育不全を示し、しばしば翼状頸や外反肘を伴う)の染色体数が45で、X染色体を1個しか有していないことを示すにいたり、ヒトの染色体異常の研究は隆盛を迎えた。

その後、1960年代には、ヒトの末梢血を採取して、そのなかに含まれるリンパ球を培養し、その染色体を観察する方法が開発され、このことは、種々の先天性疾患の原因となる染色体異常の発見を促し、さらには、正常人の染色体の観察による、染色体の多型や転座染色体の発見をもたらし、さらに進んで、1970年代には、染色体を綿状の濃淡のバンドに染め分けるさまざまな分染法が広く行われるようになり、これらの分染法は、形態学的に類似している染色体の識別や同定を可能にするのみならず、染色体異常の異常部位の同定、すなわち切断部位や再結合部位の特定を可能にした。

さらに、近年の分子生物学的手法の発展は、これまで顕微鏡下に観察された染色体異常の塩基配列レベルでの

解析を可能にしたが、これによって、ヒトにおいて観察される染色体異常の構造が、バクテリアやファージにおいて観察される非相同的組換えの産物の構造と共通していることが明らかになった。したがって、バクテリアやファージにおける非相同的組換えの分子機構の解明が、ヒトの染色体異常の発生機構の解明に貢献することが考えられるようになった。

## 3. 非相同的組換えの分子機構の解明の試み—II型のDNAトポアイソメラーゼ(大腸菌DNAジャイレース)によって触媒される非相同的組換えの発見—

DNA複製や転写など、他のDNA関連反応に比べ、非相同的組換えの分子機構の解明が立ち遅れていたのは、Franklin(1966)が述べたように、この反応が、ごく「まれ」で、「でたらめ」に起こるものであるため、検出が困難であったからである。すなわち、反応の起こる頻度が非常に低い上に、この反応が、基質となるふたつのDNA鎖の塩基配列に長い相同性を必要とせず、DNA上のありとあらゆる部位で起こるため、均一な反応産物が得られなかったのである。

それに対して池田ら(1981)は、すでに確立されていた $\lambda$ ファージのin vitroパッケージ系を利用し、in vitroにおいて非相同的組換えを再現することに成功した。 $\lambda$ ファージのin vitroパッケージ系とは、 $\lambda$ ファージ粒子のin vitro再構成系のことであり、大腸菌に溶原化している $\lambda$ ファージを誘発させることによって調製した細胞粗抽出液(溶菌液)を用い、外から加えた $\lambda$ DNAを蛋白の殻( $\lambda$ プロヘッドと尾部)にパッケージさせ、感染能力のあるファージ粒子を得るというものである。池田ら(1981)は、細胞粗抽出液に、 $\lambda$ DNAとは相同性のないプラスミドpBR322を加えると、 $\lambda$ DNAの一部が欠失し、そこにpBR322が挿入されたような構造を持つDNA、まさしく“hybrid genetic structure”(Campbell, 1962)をゲノムとするファージが形成されることに気づいたのである。

この反応を触媒する酵素がDNAジャイレース(大腸菌DNAトポアイソメラーゼII)であることを明らかにしたのが、以下の実験である。池田ら(1981)は、この系において、DNAジャイレースの阻害剤の一種であるオキシソリン酸を反応液に加えることによって、組換えが促進されることを見出した。当時はオキシソリン酸の標的はDNAジャイレースのふたつのサブユニットのひとつであるGyrA蛋白と考えられていたので(その後、DNAト

<sup>a</sup> このファージを用いれば、バクテリアの遺伝子を他のバクテリアに導入することができることから、このようなファージは「特殊形質導入ファージ」と呼ばれる。なお、Campbell(1962)は、このようなファージのゲノムを、いみじくも“hybrid genetic structure”と呼んだ。



ポアイソメレースIVの発見によって、オキシリン酸がこの酵素をも標的とする薬剤であることが明らかになった (Kato et al., 1992)), オキシリン酸は GyrA 蛋白に作用することによって非相対的組換え反応を促進させていることが考えられた。実際、オキシリン酸やそのプロトタ

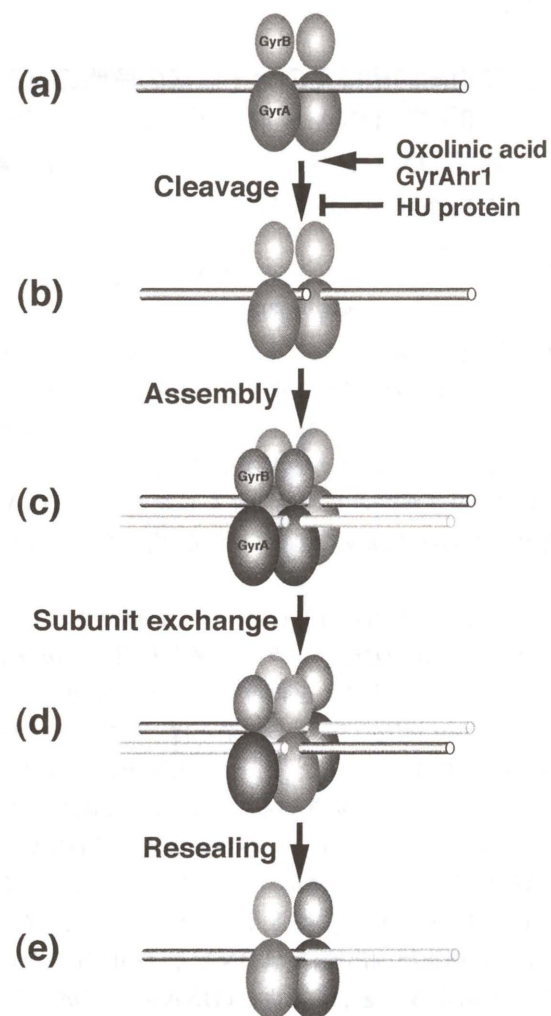


Fig. 2 DNA gyrase subunit exchange model for illegitimate recombination (Ikeda et al., 1982). A DNA gyrase cleaves DNA (b), and the gyrase-DNA complex, cleavable complex, assembles with another complex, forming the tetrameric structure (c). The dissociation of the tetrameric form results in subunit exchange that leads to the exchange of DNA strands (d).

<sup>b</sup> ATP 存在下において、基質がより弛緩しているときは、リンキング数を減少させることによって負のスーパーコイルを導入し、逆に基質がより負にスーパーコイルしているときは、リンキング数を増大させることによって DNA を弛緩させる (Kataoka et al., 1996). その際、反応の飽和点は反応温度に依存して変化し、より低温ではより負にスーパーコイルし、より高温ではより弛緩することが示されている (Kataoka et al., 1996). この性質は、熱刺激を与えたときの大腸菌細胞の DNA のスーパーコイル数の変化を説明するものである (Ogata et al., 1994).

イプであるナリジキシン酸に耐性を示す *gyrA* 遺伝子の変異株 (*nalA* 26) から細胞粗抽出液を調製した場合には、オキシリン酸によって組換えは促進されなかった。その後、DNA ジャイレースのもうひとつのサブユニットである GyrB 蛋白の阻害剤の一種であるクマイシンによって組換えが阻害されることが示され、この過程が DNA ジャイレースそれ自体によって触媒されることが示唆された。

実際、精製された DNA ジャイレースを反応液に加えることによって組換えが促進されること (Ikeda et al., 1984 a), およびオキシリン酸存在下での組換え産物を解析した結果、DNA ジャイレースによる DNA の切断部位とオキシリン酸によって誘導される非相対的組換えの反応産物の組換え部位がよく一致していること (Ikeda et al., 1984 b) が明らかになるにいたり、この反応が DNA ジャイレースによって触媒されることが示された。

DNA ジャイレースは、一方の DNA 鎖に二重鎖切断を導入し、その間をもう一方の DNA 鎖を通過させ、切断した DNA 末端を再び結合させることによって、DNA のリンキング数を増減させる活性を持つことから<sup>b</sup>、DNA ジャイレースによって触媒される非相対的組換え反応の分子機構として、池田ら (1982) は、二重鎖切断が導入された DNA 鎖と DNA ジャイレースが結合した中間産物、いわゆる「クリーパブル・コンプレックス」が独立にふたつ存在し、両者が互いに接近、結合した後、再び解離する際、サブユニットの交換が起こり、結果としてそれぞれのサブユニットに結合していた DNA 鎖の交換が起こることによって組換えが起こると考え、このモデルを「DNA ジャイレース・サブユニット交換モデル」と呼んだ (Fig. 2). オキシリン酸は二重鎖切断が導入された DNA 鎖の再結合の過程を阻害することにより、このようなクリーパブル・コンプレックスを蓄積させることが示されているので、DNA ジャイレースによる組換え反応におけるオキシリン酸の促進的効果は、まさしくこのクリーパブル・コンプレックスの数を増加させることにあると説明することができる。

#### 4. II 型の DNA トポアイソメレースによって触媒される、相同配列を必要としない非相対的組換えが *in vivo* において起こることの証拠—非相対的組換えを定量的に検出する *in vivo* アッセイ・システムの確立と癌治療の現場からの報告—

これまで報告されてきた、バクテリアの染色体やプラスミドなど、*in vivo* において検出される非相対的組換えは、すべて、塩基配列に短い (4–10 bp) 相同性のある DNA 鎖の間で起こっていたものであった (Farabaugh et al., 1978; Studier et al., 1979; Pribnow et al., 1981; Albertini et al., 1982; Jones et al., 1982; Marvo et al., 1983; Lopez et al., 1984; Yi et al., 1988; Kumagai and Ikeda, 1991). それに対し、上で述べた *in vitro* において大腸菌 DNA ジャイレースによって触媒され、オキシリン酸によって促進される非相対的組換えは、相同性のない (1–3 bp) DNA 鎖の間で起こっていた (Naito et al., 1984). したがって、DNA ジャイレースによって触媒される非相対的組換えは、これまでに知られていないものであるか、*in vivo* においては実際には起こらない反応である可能性が考えられた。

そこで、池田ら (1995) は *in vivo* において非相対的組換えを定量的に検出するアッセイ・システム ( $\lambda$  Spi<sup>-</sup> アッセイ) の確立を試みた。その原理は、溶原化している  $\lambda$  ファージが誘発される際に非相対的組換えによって形成される  $\lambda$  bio 特殊形質導入ファージを選択し、総ファージ数に対する  $\lambda$  bio 特殊形質導入ファージ数の割合を求め、その値をもって非相対的組換えの頻度と定義する、というものである (Fig. 1).  $\lambda$  bio 特殊形質導入ファージ ( $\lambda$  Spi<sup>-</sup> ファージ) とは、 $\lambda$  DNA の一部と大腸菌染色体 DNA の一部 (*bio* 遺伝子を遺伝マーカーとして持つ) からなるハイブリッド DNA をゲノムとするファージを意味し、そのほとんどは、 $\lambda$  DNA の *attL* 近傍にマップされる *red* 遺伝子と *gam* 遺伝子との両方を欠失している ( $\lambda$  bio<sup>+</sup> *red*<sup>-</sup> *gam*<sup>-</sup>). このような変異ファージは、野生型ファージが感染することのできない P2 ファージ溶原菌 (WL 95) にも感染することができるため、WL 95 の菌液を塗った寒天培地上にプラークを形成することができる。また、ここで用いている  $\lambda$  ファージ ( $\lambda$  cI857) は、cI リプレッサーが温度感受性になっているため、溶原菌を熱処理すれば容易に  $\lambda$  ファージを誘発させることができる (熱誘発). かくして、熱誘発により集積したファージを用い、P2 ファージが溶原化していない大腸菌 (Ymel) を指示菌としてプラークを形成させ、その数を計測することによって総ファージ数を算出する一方、WL 95 を指示菌としてプラークを形成させ、 $\lambda$  Spi<sup>-</sup> ファージ数を算出し、両者の比を求め、 $\lambda$  Spi<sup>-</sup> ファージ

の出現頻度とした。

このようなシステムを用いて、*in vivo* における非相対的組換えに対するオキシリン酸の効果を検討したところ、オキシリン酸によって組換えが促進されることがわかった (Shimizu et al., 1995). しかも、このとき組換えの産物を解析すると、短い相同性 (平均 8 bp) のある DNA 鎖の間で起こっているものの他に、*in vitro* において DNA ジャイレースによって触媒され、オキシリン酸によって促進される非相対的組換え同様、相同性のない (平均 1 bp) DNA 鎖の間で起こっているものが存在していた。さらに、オキシリン酸やナリジキシン酸に耐性を示す *gyrA* 変異株 (*nalA* 26) では、オキシリン酸による組換えの促進は観察されなかった。したがって、DNA ジャイレースによる非相対的組換えは、*in vivo* においても実際に起こる反応であり、これまで知られていなかった新しいタイプの組換えであることが示された。

最近、ミニ F プラスミドをベクターとして用いたプラスミド・シャッフリング法 (Kato and Ikeda, 1996) により分離した *gyrA* 遺伝子の温度感受性変異株のなかにオキシリン酸非存在下で  $\lambda$  Spi<sup>-</sup> ファージの出現頻度が上昇するものが複数存在することが見出された (Shimizu et al., 1997; Ashizawa et al., unpublished). これらの変異株は高温において DNA に二重鎖切断を導入することはできても、再結合させることのできない株であった (Ashizawa et al., unpublished). さらに、変異 *gyrA* 遺伝子の遺伝子産物を精製し、それらの蛋白の DNA スーパーコイル活性の測定を試みたところ、変異 GyrA 蛋白の反応産物のなかに、野生型 GyrA 蛋白の反応産物には観察されない、直鎖状 DNA が検出された (Ashizawa et al., unpublished). これらの結果は、先に述べた「DNA ジャイレース・サブユニット交換モデル」を支持するものであって、変異 GyrA 蛋白が存在する、あるいは野生型 GyrA 蛋白の活性が、オキシリン酸存在下など、ある条件下で変化するなどして、DNA に二重鎖切断が導入されても再結合されないような状態が続いたとき、DNA ジャイレースによる組換えが誘導されるものと思われる (Fig. 2).

DNA ジャイレースの DNA スーパーコイル活性を促進させる蛋白性因子としては、ヒストン様蛋白のひとつである HU (真核 HMG のファンクショナル・アナログ) (Yang and Ames, 1990) や、分子シャペロン的一种である熱ショック蛋白 DnaK (真核 hsp 70 ホモログ) (Ogata et al., 1996) が存在するが、HU 蛋白の欠失変異株では DNA ジャイレース依存の非相対的組換えが亢進することがわかり (Shanado et al., 1998), DNA ジャイレースによって触媒される組換えが *in vivo* において実際に起こっていることが確かめられるとともに、その分子機構が解明されつつある。

このような組換えは、T4 ファージの DNA トポアイ



ソメレース (Ikeda et al., 1986) や真核の DNA トポアイソメレース II (Bae et al., 1988) でも触媒されることから、この反応はウイルスはおろか原核から真核にいたるまで高度に保存されているものであることが考えられる。実際、DNA トポアイソメレース II を標的とする制癌剤の投与により、副作用として急性白血病 (ALs = acute leukemias) が誘発されることが知られているが、このような急性白血病患者のリンパ球では、第 11 番染色体のある領域 (11 q 23) が切断され、他のさまざまな染色体領域と結合したような相互転座が頻りに観察される。このとき、この領域に存在する *MLL* 遺伝子 (*ALL1* 遺伝子) の構造を解析すると、その切断部位の近傍には DNA トポアイソメレース II の結合部位が存在していることがわかった (Negrini et al., 1993; Gu et al., 1994)。したがって、II 型の DNA トポアイソメレースによって触媒され、その阻害剤によって促進される非相同的組換えが、ヒトの体内でも起こっていることが認知されるようになった。これなどはいわば、大腸菌からヒトにいたるまで共通に起こる疾患の例といえるだろう。

## 5. 紫外線や変異原物質、活性酸素など、環境のストレスによって誘導される、短い相同配列を必要とする非相同的組換え

先に述べた DNA ジャイレースによって触媒される非相同的組換えは、その阻害剤であるオキシリニン酸によって促進されることから、ある意味では環境のストレスによって誘導される非相同的組換えと考えることができる (オキシリニン酸は熱ショック応答や SOS 応答などのストレス応答を誘導する薬剤であることが知られている)。私たちは、特殊形質導入ファージの形成時に起こる非相同的組換えを検出する *in vivo* アッセイ・システムの確立の過程において、紫外線など、他の環境のストレスもまた非相同的組換えを誘導することを発見した (Ikeda et al., 1995)。ただし、この場合は、DNA ジャイレースによって触媒される非相同的組換えとは異なり、短い相同配列を必要とする組換えであった (Yamaguchi et al., 1995)。したがって、非相同的組換えには、II 型の DNA トポアイソメレースによって触媒され、その阻害剤によって促進される、相同配列を必要としないタイプと、紫外線などの環境のストレスによって誘導される、分子機構が明らかではない、短い相同配列を必要とするタイプとが存在することが明らかになった。

紫外線によって誘導される非相同的組換えの発見の経緯は、以下の通りである。λSpi<sup>-</sup> アッセイにおいては、λファージを増殖させるために熱誘発を採用しているが、これは、ここで用いている λファージ (λ *cI857*) の *cI* リプレッサーが温度感受性であるためである。λファージを誘発させる方法としては、他にも紫外線照射に

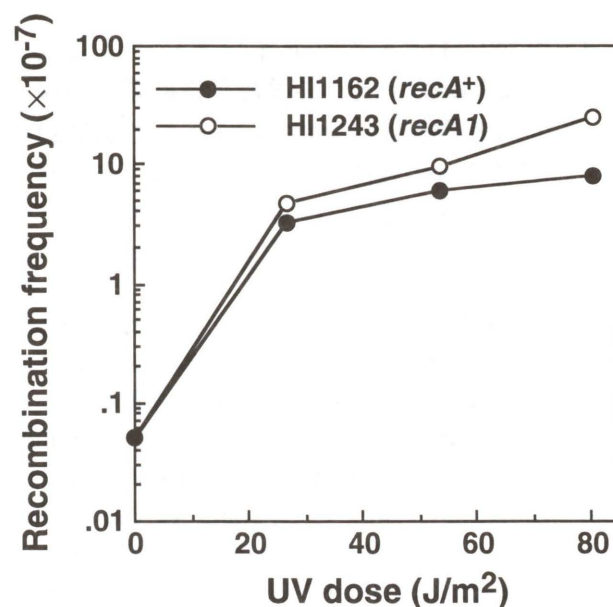


Fig. 3 Stimulation of illegitimate recombination by UV light-irradiation (Ikeda et al., 1995). *E. coli* HII162 (as 594 except λ *cI857* ind<sup>-</sup>) or HII243 (as HII162 except *recA1*) was grown to 2×10<sup>8</sup> cells/ml at 30°C in λYP broth, and the culture was irradiated to UV light for various periods in a glass dish. Induction of the prophage was carried out by incubation at 42°C for 15 min, and the culture was then incubated at 37°C for 2 hr. The number of plaques on Ym1 was defined as the concentration of total phages and the number of plaques on P2 lysogen WL95 was defined as the concentration of Spi<sup>-</sup>phages. The frequency of illegitimate recombination was defined as the ratio of the concentration of Spi<sup>-</sup>phage to the concentration of total phages.

よって誘発させる方法があるが、ここで用いている λファージの *ind* 遺伝子は変異を持つため、紫外線照射によって λファージを誘発させることはできない。一方、*cI* 遺伝子と *ind* 遺伝子とが野生型である λファージを溶原化ファージとして採用し、紫外線照射によって λファージを誘発させ、特殊形質導入ファージの出現頻度を測定したところ、その頻度は、熱処理によって λファージを誘発させるアッセイ・システムによって測定された特殊形質導入ファージの出現頻度に比べ、非常に高い値を示すことに気づいた。

これらふたつのアッセイ・システムの違いは、λファージの誘発のさせ方だけなので、紫外線照射の効果は、λファージの誘発のみならず、組換えそのものの促進にもあるのではないかと考えた。もし、そうであるならば、熱処理によって λファージを誘発させるアッセイ・システムにおいても、紫外線を照射すれば組換えの頻度が高くなるはずである。実際、このアッセイ・システムにおいて、照射した紫外線の線量に依存して組換えの頻度が上昇し、その値は、紫外線照射によって λファージを誘発させるアッセイ・システムによって測定された値とほ

ぼ同じ値を示すことがわかった (Fig. 3; Ikeda et al., 1995)。この紫外線照射によって誘導される非相同的組換えは、*recA* 遺伝子の変異株でも同様に観察されるので、*RecA* 機能に依存する相同的組換えの副産物を検出しているものではないし、*RecA* プロテアーゼを必要とする SOS 応答の結果、起こる反応でもない。

それでは、どうして紫外線照射によって組換えが促進されるのかが問題となるが、紫外線照射によって DNA にチミンダイマーなどの損傷が生じ、その除去修復の過程で誤った塩基が取り込まれることにより、変異が生じることが知られているので、紫外線が持つ、変異を誘発するという性質が、組換えに寄与している可能性が考えられた。もしそうであるならば、紫外線に限らず変異を誘発するものであるならば、すべから組換えを誘導すべきである。実際、強力な変異誘発剤であるニトロソグアニジンやアフマトキシン B<sub>1</sub> によって非相同的組換えの頻度が上昇することがわかった (Ikeda et al., 1995)。したがって、この過程には、DNA の損傷が必要であることが示唆された。

同じことは活性酸素についてもいえる。大腸菌を過酸化水素水で処理すると、λSpi<sup>-</sup> アッセイにおいて、非相同的組換えの頻度が上昇することがわかった (Onda et al., 1999)。活性酸素によって生じる DNA 損傷としては、8-オキシグアニンが知られているが、その修復に関与する *mutM* 遺伝子の欠失変異株では、組換えの頻度がさらに上昇するので、活性酸素によって誘導される非相同的組換えもまた、DNA の損傷によって引き起こされるものと思われる。

## 6. 環境のストレスによって誘導される、短い相同性を必要とする非相同的組換えの分子機構の解明

それでは環境のストレスによって誘導される非相同的組換えはどのような分子機構で起こるのだろうか。λSpi<sup>-</sup> アッセイにおいて検出される非相同的組換えは、λDNA の欠失と大腸菌染色体 DNA の挿入である。欠失には、ふたつの異なる分子機構が存在し、ひとつは鋳型となる DNA の一部が複製されず、娘 DNA 鎖からその部分が消失することによって起こるものである。欠失が起こった部位には、しばしば順方向の反復配列が認められることから、このような配列を鋳型に持つとき、DNA ポリメラーゼのスリップが起こるのであろうと考えられている。

もうひとつの欠失の分子機構は、その部位が切り出されることによって起こるものである。λSpi<sup>-</sup> アッセイは、いわば λDNA の異常な切り出しを検出するものであり、したがって、ここで起こる欠失は切り出しによるものである。切り出しによる欠失の最初の段階は、

λDNA と大腸菌染色体 DNA とにそれぞれ二重鎖切断が導入されることなので (Fig. 1)、私たちは、紫外線照射によって組換えが亢進されるのは、紫外線によってこのような二重鎖切断が促進されるからではないかと考えた。

しかしながら、紫外線は γ 線などとは異なり、DNA に直接的に二重鎖切断を導入することはないことが、精製された T7 ファージの DNA を用いた *in vitro* における実験によって示されている (Smith and Hanawalt, 1969)。それに対して、除去修復や組換え修復のできない大腸菌の変異株に紫外線を照射した後、さらに大腸菌をインキュベーションした場合には、染色体の崩壊が起こり、低分子量の DNA 断片が観察されることが報告されているので (Wang and Smith, 1986)、*in vivo* においては紫外線によって DNA 二重鎖切断が誘導されることが考えられる。

すでに紫外線照射によって生じた DNA の損傷部位では複製フォークの進行が停滞することが知られているので (Rupp and Howard-Flanders, 1968)、私たちは、その際、鋳型となった DNA 鎖が一本鎖となるため、切断を受けやすくなるのではないかと考えた。とりわけ、紫外線照射によって誘導される非相同的組換えの産物を解析すると、高頻度に組み換えが起こる部位 (ホット・スポット) の近傍には、またしても順向き反復配列が存在していたので (Yamaguchi et al., 1995)、鋳型 DNA 鎖に生じた損傷部位で複製フォークの進行にブレーキがかかり、その近傍に存在する順向き反復配列でスリップし、鋳型 DNA 鎖が湾曲することによって生じた一本鎖 DNA のループを、そのような構造を特異的に認識し、切断するヌクレアーゼが切断することによって二重鎖切断が形成されるのだらうと考えた (Fig. 4; Yamaguchi et al., 1995)。さらに、その後の解析により、ホット・スポット領域には、約 140 bp の逆向きの反復配列が存在していることがわかった。逆向き反復配列を持つ一本鎖 DNA は、ステム・ループやクルシフォーム構造のような特殊な二次構造を形成することが知られているので、鋳型 DNA 鎖の損傷部位で複製フォークが停滞したとき、このような二次構造が形成され、任意の箇所切断を受け、二重鎖切断が形成されることが考えられる。いずれにせよ、私たちのモデルは、複製フォークの進行が損傷部位で停滞することを前提としているので、紫外線照射によって誘導される DNA 二重鎖切断に DNA 複製の伸長反応が必要か否かを検証しなければならない。間接的な証拠としては、*dnaB* 遺伝子の温度感受性変異株では紫外線照射後の非相同的組換えの頻度が低下する (Yamashita et al., unpublished) ことが挙げられよう。この場合、*dnaB* 遺伝子の DNA 複製の開始段階の変異株 (スロー・ストップ・フェノタイプを示す) では効果はなく、伸長段階の変異株 (クイック・ストップ・フェノタ



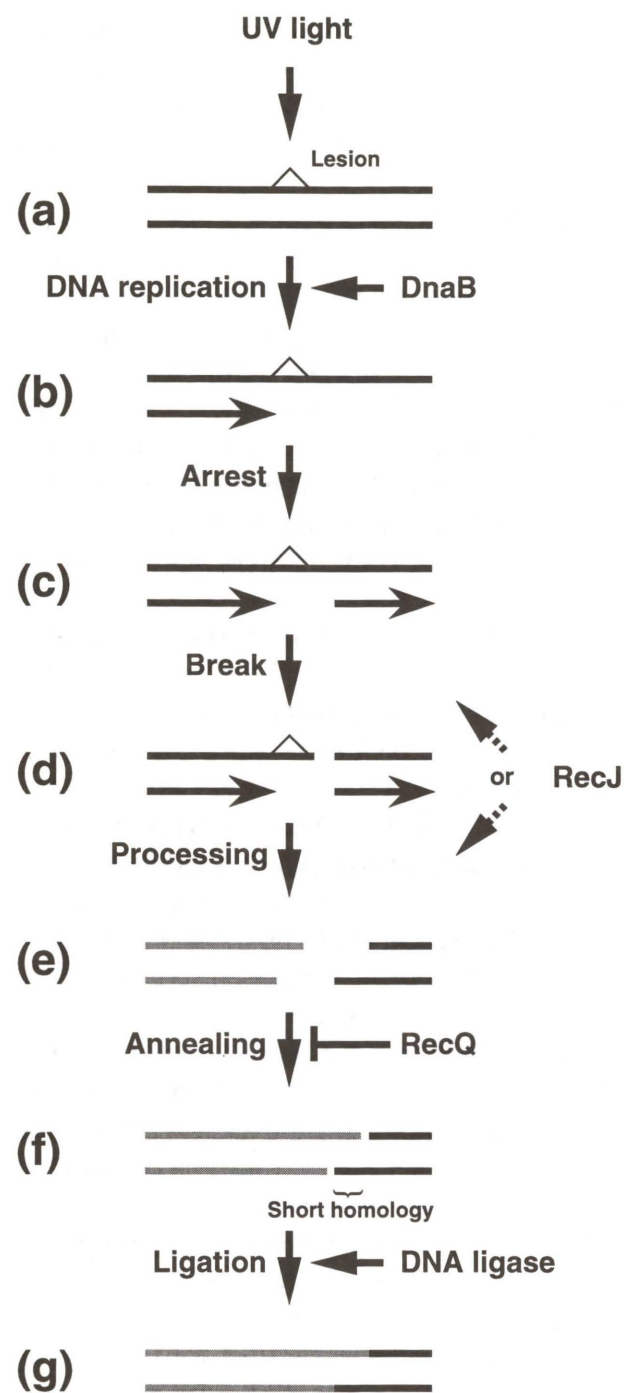


Fig. 4 A proposed mechanism of UV light-irradiation-induced illegitimate recombination. A lesion is induced by UV light-irradiation (a), and DNA replication occurs with the damaged DNA as a template (b). The progression of replication fork arrests at the lesion (c), and the template DNA is broken enzymatically (single-strand break), resulting in the formation of double-strand break (d). The ends of DNA is processed (e), annealed (f) and ligated (g). DnaB protein is involved in the step of the progression of replication forks, and RecJ protein participates in either the step of the formation of double-strand breaks (d) or the processing of DNA ends (e). Annealing is dependent on short homology (f), and this step is suppressed by RecQ protein. Ligation is carried out by DNA ligase.

イブを示す)で効果があるので、少なくとも紫外線照射によって誘導される非相同的組み換えにはDNA複製の伸長反応が必要である。DNA複製の伸長反応はDNA二重鎖切断の形成過程に寄与しているのかも知れない(Fig. 4)。

次に、紫外線照射によって誘導される非相同的組換えの分子機構を解明するために、この過程に関与するさまざまな因子を遺伝学的に同定することを試みた。その際、相同的組換えに関与する遺伝子の中に、非相同的組換えにも関与する遺伝子が存在する可能性を考え、*rec* 変異株のなかに紫外線照射後、組換えの頻度が上昇しないようなものが存在するかどうかを検討した。その結果、相同的組換えの *RecF* 経路や *RecE* 経路に関与する *recJ* 遺伝子の破壊株では、紫外線を照射しても組換えが促進されないことが示された(Ukita and Ikeda, 1996)。さらに、*recJ* 破壊株において低頻度ながらも起こる組換えの産物を解析したところ、この株では、野生株において観察される組換えのホット・スポットが検出されることがわかった。したがって、*recJ* 遺伝子が紫外線照射後にホット・スポットで起こる非相同的組換えに必要なことが示された。精製された *RecJ* 蛋白は、一本鎖DNAを5'末端から3'末端の方向に分解するDNAエキソヌクレアーゼ活性を持つので(Lovett and Kolodner, 1989)、非相同的組換えにおける *RecJ* 蛋白の役割として、紫外線照射によって切断を受けたDNA鎖の末端を分解することにより、短い相同配列を持つDNA鎖との結合を促進させている可能性が考えられた(*RecJ* 蛋白がDNA二重鎖切断の形成後に働くとする仮説)(Fig. 4; Ukita and Ikeda, 1996)。一方、*RecJ* 蛋白が紫外線照射後のDNA二重鎖切断の過程に寄与する可能性も考えられるので(*RecJ* 蛋白がDNA二重鎖切断の形成過程に働くとする仮説)、現在この仮説を検証している(Fig. 4)。

一方、*recJ* 遺伝子と同様に相同的組換えの *RecF* 経路や *RecE* 経路に関与する *recQ* 遺伝子の破壊株では、*recJ* 破壊株とは逆に、紫外線照射後、組換えが野生株以上に亢進することが示された(Hanada et al., 1997)。ただし、この株では、紫外線非照射時でも組換えが高頻度で起こるので、*RecQ* 蛋白は、紫外線照射の有無に関わらず、非相同的組換えを抑制していることがわかった。精製された *RecQ* 蛋白は、二本鎖DNAを3'末端から5'末端の方向に解離するDNAヘリケース活性を持つので、この過程における *RecQ* 蛋白の役割として、*RecQ* 蛋白が、短い相同性を持つDNA鎖同士の結合を抑制していることが考えられる(Fig. 4; Hanada et al., 1997)。最近、癌が多発するブルーム症候群や早老病として知られるウェルナー症候群の原因遺伝子が *recQ* 遺伝子のホモログであることが明らかにされたが、ひとつの可能性として、癌化や老化は、非相同的組換えが抑制されず、

染色体異常が多発することによって起こるのかも知れない。

この他、この過程に関与する因子として、DNAの折り曲げに働く *Fis* 蛋白や *IHF* 蛋白(Shanado et al., 1997)などが見出されており、今後はこれら遺伝学的に同定された蛋白を精製し、紫外線照射によって誘導される非相同的組換えを *in vitro* において再構成することによって、それぞれの蛋白の役割を明らかにしていきたいと考えている。

## 7. 真核生物における非相同的組換えの分子機構の解明

大腸菌を材料として用いて明らかにしてきた非相同的組換えの分子機構が、真核生物にも共通であるか、また異なる分子機構が存在するかを明らかにすることは、染色体異常、ひいては遺伝子疾患や癌化、老化など、高次の生命現象を理解するうえで重要である。そこで、塚本ら(1996a)は、酵母を材料として用い、プラスミドにおける非相同的組換えを定量的に検出する *in vivo* アッセイ・システムを確立した。その原理は、カナバニンとシクロヘキサミドというふたつの薬剤に耐性を示す酵母に、それぞれの薬剤に対する感受性をもたらしふたつの遺伝子(*CAN1* 遺伝子と *CYH2* 遺伝子)を隣り合わせに持つプラスミド(YCpL2)を導入して(このプラスミドを持つ酵母はカナバニンとシクロヘキサミドを含む寒天培地にはコロニーを形成することはできない)、これらふたつの遺伝子を同時に欠失したようなプラスミドを持つ酵母(このようなプラスミドを持つ酵母はカナバニンとシクロヘキサミドを含む寒天培地に再びコロニーを形成することができるようになる)を選択し、その出現頻度をもって非相同的組換えの頻度と定義するというものである。こうして検出された欠失は、両末端のDNA鎖の間に短い相同性(1-5 bp)が存在したことから、短い相同配列を必要とするタイプの非相同的組換えにより起こったものであることがわかった。

次に、この過程に関与する因子を同定することを目的として、大腸菌における紫外線照射後の非相同的組換えに対して *rec* 変異の効果を検討したように、酵母における相同的組換えや胞子形成時の減数分裂の際に起こる相同的組換えに必要な遺伝子の変異の効果を検討した。その結果、この過程に *RAD50*, *RAD52*, *MRE11*, および *XRS2* 遺伝子が関与していることが示された(Tsukamoto et al., 1996a)。これらの遺伝子の役割を明らかにするため、組換えの検出に用いた YCpL2 プラスミドにセントロメア(動原体)をふたつ持たせたプラスミドを構築した(Tsukamoto et al., 1997a)。このプラスミドを酵母に導入すると、細胞分裂の際にそれぞれのセントロメアが両極に引っ張られるためにDNA二重鎖切断が2ヵ所で起こり、組換えが誘導されるので、非相同的組

換えの最初の段階であるDNA二重鎖切断は必要ではなく、最後の段階であるDNA末端の結合(エンド・ジョイニング)のみを検出することができる。その結果、*RAD52* 遺伝子以外はエンド・ジョイニングの過程に寄与していることが明らかになった(Tsukamoto et al., 1997a)。Mre 11 蛋白は一本鎖DNAを3'末端から5'末端の方向に分解するDNAエキソヌクレアーゼ活性を持ち(Paull and Gellert, 1998)、かつ Rad 50 蛋白と Xrs 2 蛋白とで三者複合体を形成すること(Johzuka and Ogawa, 1995)が知られているので、これらの蛋白は、切断を受けて生じたDNA末端を分解し、一本鎖DNAを露出させることによってエンド・ジョイニングを促進させていることが考えられる。一方、Rad 52 蛋白は相同的組換えに関与するので、この蛋白は、相同的組換えにより、二量体のプラスミドを形成させ、ふたつのセントロメアを持つプラスミドを生じさせることにより、間接的に非相同的組換えに寄与するのかも知れない。

この他にも、塚本ら(1996b)は、免疫グロブリン遺伝子の再編成時に起こる V(D)J 組換えに関与する Ku 70 蛋白の酵母ホモログ(Hdf 1)が非相同的組換えに関与していること、とりわけ、ふたつのセントロメアを持つ YCpL2 の組換えに関与することから、この蛋白がエンド・ジョイニングの過程に関与することを見出した。Ku 蛋白はDNA末端に結合する性質を持つことから、この蛋白は、DNA末端同士を接近させることによってエンド・ジョイニングを促進させていることが考えられる。さらに、Hdf 1 蛋白と相互作用する因子として同定した Sir 4 蛋白や、Sir 4 蛋白とともに働く Sir 2 蛋白と Sir 3 蛋白もまた、エンド・ジョイニングに関与することが明らかになった(Tsukamoto et al., 1997b)。Hdf 1 蛋白が、Sir 2, Sir 3, および Sir 4 蛋白やヒストンと複合体を形成してテロメア領域などを不活化させること(サイレンシング)を考慮すると、DNAが切断を受けたとき、Hdf 1 蛋白がこれらサイレンシング因子とともにDNA末端を不活化し、エンド・ジョイニングを促進させている可能性が考えられる(Fig. 5; Tsukamoto and Ikeda, 1998)。しかしながら、サイレンシング因子の役割については、サイレンシング因子が接合型決定遺伝子の発現を抑制することによって間接的にエンド・ジョイニングに関与しているという説(Åström et al., 1999; J. Harber, 私信)もあり、現在、検討中である。

また、大腸菌 *RecQ* 蛋白同様、その酵母ホモログである Sgs 1 蛋白もまた、非相同的組換えを抑制していることがわかった(Yamagata et al., 1998)。先に述べたように、ウェルナー症候群やブルーム症候群の原因遺伝子(それぞれ *WRN*, および *BLM*)の産物は *RecQ* ホモログなので、それぞれが Sgs 1 蛋白の代わりに働き得るかどうかを検証したところ、*sgs1* 遺伝子を破壊し、その代わりに野生型の *WRN*, および *BLM* 遺伝子を挿入した酵母で



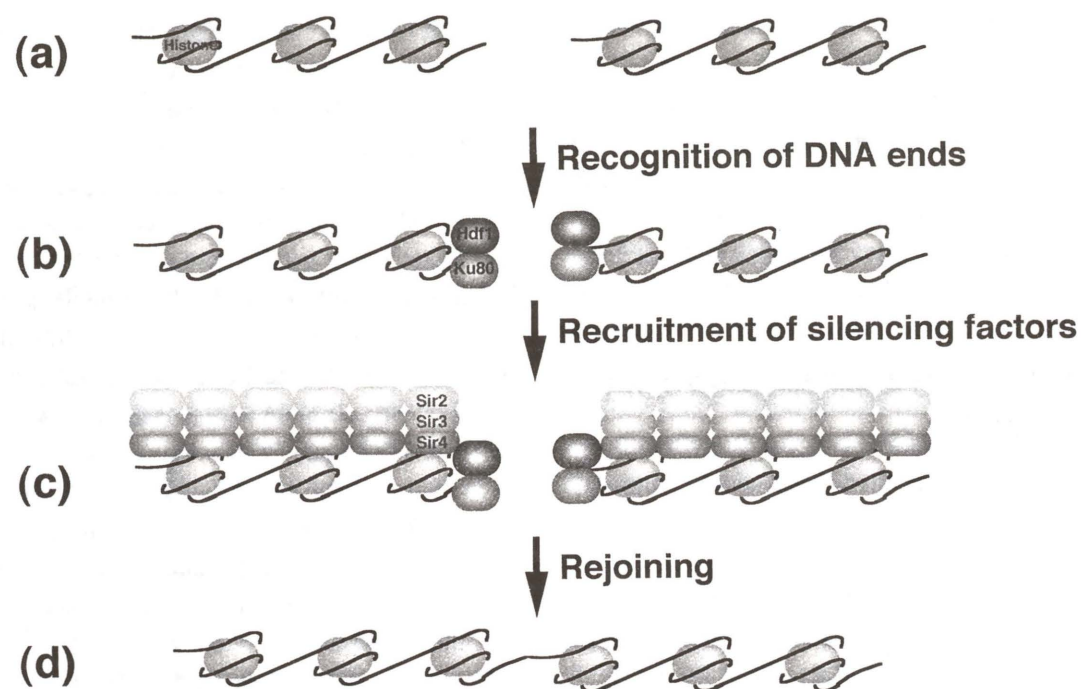


Fig. 5 A putative model for DNA end-joining (Tsukamoto et al., 1997b; Tsukamoto and Ikeda, 1998). Hdf1 protein and Ku80 homologue bind to broken DNA ends (b) and then recruit silencing factors (c), resulting in formation of heterochromatin-like structure, which is necessary for rejoining of the DNA ends (d).

は、非相同的組換えの頻度は上昇しなかった。したがって、WRN 蛋白や BLM 蛋白が非相同的組換えを抑制していることが明らかになった。ウェルナー症候群やブルーム症候群の患者の細胞では、染色体の不安定性が観察されるが、その原因は WRN 蛋白や BLM 蛋白の組換え抑制機能の欠損にあることが考えられる。

## 結 語

大腸菌や酵母など、単細胞生物を材料として、遺伝学的、ならびに生化学的手法を用いることにより、非相同的組換えの分子機構の一端を明らかにすることができた。その結果として、ヒトにおいて観察される染色体異常の発生機構を説明することが可能となり、ひいてはヒトの遺伝子疾患や癌化、老化といった高次の生命現象までも、私たちが解明した非相同的組換えの分子機構により推察することができるようになった。

とりわけ、私たちが見出した環境のストレスにより誘導される非相同的組換えの研究は、最近、問題となっている環境汚染によるヒトの疾患を理解するうえで重要となるであろう。

## 参 考 文 献

- Albertini, A. M., M., Hofer, M. P. Calos and J. H. Miller (1982) *Cell*, 29, 319-328.  
Åström, S. H., S. M. Okamura, and J. Rine (1999) *Nature*, 397, 310.

- Bae, Y.-S., I. Kawasaki, H. Ikeda and L. F. Liu (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2076-2080.  
Campbell, A. M. (1962) *Adv. Genet.*, 11, 101-146.  
Farabaugh, R. J., U. Schmeissner, M. Hofer and J. H. Miller (1978) *J. Mol. Biol.*, 126, 847-863.  
Franklin, N. C. (1966) *Genetics*, 55, 699-707.  
Gu, Y., T. Nakamura, S. A. Schichman, R. Prasad, O. Canaani, H. Saito, C. M. Croce and E. Canaani (1994) *Cancer Res.*, 54, 2326-2330.  
Hanada, K., T. Ukita, Y. Kohno, K. Saito, J. Kato and H. Ikeda (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3860-3865.  
Ikeda, H., K. Moriya and T. Matsumoto (1981) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45, 399-408.  
Ikeda, H., K. Aoki and A. Naito (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3724-3728.  
Ikeda, H. and M. Shiozaki (1984a) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 49, 401-409.  
Ikeda, H., I. Kawasaki and M. Gellert (1984b) *Mol. Gen. Genet.*, 196, 546-549.  
Ikeda, H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 922-926.  
Ikeda, H., H. Shimizu, T. Ukita and M. Kumagai (1995) *Adv. Biophys.*, 31, 197-208.  
Johzuka, K. and H. Ogawa (1995) *Genetics*, 139, 1521-1532.  
Kataoka, K., T. Mizushima, Y. Ogata, T. Miki and K. Sekimizu (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 24806-24810.  
Kato, J. and H. Ikeda (1996) *Gene*, 170, 141-142.  
Kato, J., H. Suzuki and H. Ikeda (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 25676-25684.  
Kumagai, M. and H. Ikeda (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 230, 60-64.  
Lopez, P., M. Espinosa, B. Greenberg and S. A. Lacks (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5189-5193.

- Lovett, S. T. and R. D. Kolodner (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2627-2631.  
Marvo, S. L., S. R. King and S. R. Jaskunas (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2452-2456.  
Naito, A., S. Naito and H. Ikeda (1984) *Mol. Gen. Genet.*, 193, 238-243.  
Negrini, M., C. A. Felix, C. Martin, B. J. Lange, T. Nakamura, E. Canaani and C. M. Croce (1993) *Cancer Res.*, 53, 4489-4492.  
Ogata, Y., T. Mizushima, K. Kataoka, T. Miki and K. Sekimizu (1994) *Mol. Gen. Genet.*, 244, 451-455.  
Ogata, Y., T. Mizushima, K. Kataoka, K. Kita, T. Miki and K. Sekimizu (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 29407-29414.  
Onda, M., K. Hanada, H. Kawachi and H. Ikeda (1999) *Genetics*, 151, 439-446.  
Paull, T. T. and M. Gellert (1998) *Mol. Cell*, 1, 969-979.  
Pribnow, D., D. C. Sigurdson, L. Gold, B. S. Singer, C. Napoli, J. Brosius, T. J. Dull and H. F. Noller (1981) *J. Mol. Biol.*, 149, 337-376.  
Rupp, W. D. and P. Howard-Flanders (1968) *J. Mol. Biol.*, 31, 291-304.  
Shanado, Y., J. Kato and H. Ikeda (1997) *J. Bacteriol.*, 179, 4239-4245.  
Shanado, Y., J. Kato and H. Ikeda (1998) *Genes Cells*, 3, 511-520.

- Shimizu, H., H. Yamaguchi and H. Ikeda (1995) *Genetics*, 140, 889-896.  
Shimizu, H., H. Yamaguchi, Y. Ashizawa, Y. Kohno, M. Asami, J. Kato and H. Ikeda (1997) *J. Mol. Biol.*, 266, 297-305.  
Smith, K. C. and P. C. Hanawalt (1969) *Molecular Photobiology*, Academic Press, New York.  
Tjio, J. H. and A. Levan (1956) *Hereditas*, 42, 1-6.  
Tsukamoto, Y., J. Kato and H. Ikeda (1996a) *Nucleic Acids Res.*, 24, 2067-2072.  
Tsukamoto, Y., J. Kato and H. Ikeda (1996b) *Genetics*, 142, 383-391.  
Tsukamoto, Y., J. Kato, and H. Ikeda (1997a) *Mol. Gen. Genet.*, 255, 543-547.  
Tsukamoto, Y., J. Kato and H. Ikeda (1997b) *Nature*, 388, 900-903.  
Tsukamoto, Y. and H. Ikeda (1998) *Genes Cells*, 3, 135-144.  
Ukita, Y. and H. Ikeda (1996) *J. Bacteriol.*, 178, 2362-2367.  
Wang, T.-C. and K. C. Smith (1986) *Mutation Res.*, 165, 39-44.  
Yamagata, K., J. Kato, A. Shimamoto, M. Goto, Y. Furuichi and H. Ikeda (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8733-8738.  
Yamaguchi, H. T., Yamashita, H. Shimizu and H. Ikeda (1995) *Mol. Gen. Genet.*, 248, 637-643.



# 塩素処理水中に検出される消毒副生成物の 変異原性とその構造活性相関

加藤 美津子<sup>1</sup>, 齋藤 治子<sup>1</sup>, 磯田 信一<sup>1</sup>, 中澤 裕之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>横浜市衛生研究所 環境衛生課 〒235-0012 神奈川県横浜市磯子区滝頭 1-2-17

<sup>2</sup>星薬科大学 薬品分析化学教室 〒142-0063 東京都品川区荏原 1-4-41

## Structure-activity relationships of halogenated by-products detected in chlorinated water and related mutagenic activities

Mitsuko Kato<sup>1</sup>, Haruko Saito<sup>1</sup>, Shin-ichi Isoda<sup>1</sup> and Hiroyuki Nakazawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Inspection and Research in Environmental Hygiene,  
Kanagawa Yokohama City Institute of Health  
1-2-17 Takigashira, Isogo-ku, Yokohama 235-0012, Japan

<sup>2</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science,  
Hoshi University, 1-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-0063, Japan

### Summary

Chlorinated by-products such as trihalomethanes were identified in drinking water and swimming pool water, because of chlorination for disinfection. It is now accepted that many kinds of by-products : e.g., chlorinated acetic acids, acetones, and acetonitriles, are formed by the reaction of chlorine and organic compounds naturally present in water. And a small amounts of brominated by-products were identified in chlorinated raw water containing bromine.

Then, mutagenic activity of 20 halogenated by-products : viz., mono-, di-, tri-haloacetic acids, haloacetonitriles, and haloacetone which were detected in chlorinated water, were assayed using the Ames test with *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains. In addition, any correlation between structure and mutagenic activity was investigated.

The TA98 mutagenicity testing of monohalogenated compounds showed few positives. However, it was considered that these compounds have cell toxicity to TA98 and TA100. Monobrominated compounds were cytotoxic at doses of 2 to 40-fold lower than monochlorinated compounds.

The mutagenic activity of most dihalogenated by-products displayed positive. It was shown that the mutagenic activity of brominated compounds was greater than chlorinated compounds. With chloroacetones, it appeared that their mutagenic activity was determined by the bond position of the chlorine atoms rather than their number.

The mutagenic activity was altered by various functional groups. In the case of TA100 without S9 mix, the mutagenic activity of -CN compounds was the greatest, then  $\text{>C=O}>\text{-COOH}$  in that order.

MX and BMX displayed extremely potent mutagenic activity in this studied. There was a difference of positive dose range with the presence and absence of S9 mix, in case of MX and BMX mutagenicity testing.

**Keywords :** mutagenic activity, chlorinated by-products, MX, BMX, structure-activity

受付 : 1998 年 5 月 19 日

受理 : 1998 年 9 月 10 日

©日本環境変異原学会



## 緒 言

現在、水道水やプール水中に生存する微生物による感染症を防ぐために添加される塩素と、水中の微量な有機物質が反応して生成する消毒副生成物の健康影響が注目されている。Bellar ら(1974)および Rook (1974)が水道水中から消毒副生成物を検出して以来、多くの報告が出され、最近ではプール水中の消毒副生成物の検出についても報告されている(杉野ら, 1993; Erdinger et al., 1990; 磯田ら, 1995; 健名ら, 1991)。これらによると、trihalomethane 等の揮発性消毒副生成物の他、haloacetic acid, haloacetonitrile, haloacetone 等の水溶性消毒副生成物が生成されるといわれている。さらに、水道水中およびプール水中からは強変異原物質の MX が検出されている(Meier et al., 1987 a; Hemming et al., 1986; 齋藤ら, 1995)。また、塩素消毒によって生成する消毒副生成物としては、原水中にブロムイオンが存在すると、クロル化合物の他にブロム化合物も生成し、その生成量はブロムイオンの濃度に相関するといわれている(惣名ら, 1992)。

消毒副生成物のうち、chloroform については、発がん性があることが National Cancer Institute(1976)から報告されている。しかし、haloacetic acid および haloacetonitrile 等の消毒副生成物の発がん性に関する報告例は少ない(Bull, 1985; Herren-Freund, 1987; Waskell, 1978)。変異原性についても、*Salmonella typhimurium* TA 100 系についての報告例はあるが(Meier et al., 1985; Merrick et al., 1987; Horth, 1989)、TA 98 系については少ない(Mortelmans et al., 1986)。

一方、化合物は置換基の位置や数、種類によって変異原性に差があることが報告されており(Sterner et al., 1987; Henshler et al., 1977)、消毒副生成物についてもいくつかの報告がされている(Ishiguro et al., 1988; Tuppurainen, 1994; LaLonde et al., 1991)。

そこで、haloacetic acid, haloacetonitrile, haloacetone 等、水溶性の消毒副生成物について、Ames 法による変異原性試験を *Salmonella typhimurium* TA 98 および TA 100 菌株を用いて系統的に行い、変異原活性値とその構造の関係について検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 試薬および試薬の調製

変異原性試験に使用した試薬は、次の通りである。また今回検討した消毒副生成物 20 化合物を Table 1 に示した。

- 1) 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acryl-amide (AF-2; CAS No. 3688-53-7): 和光純薬工業(株): 特級
- 2) 2-aminoanthracene (2-AA; CAS No. 613-13-

8): 和光純薬工業(株): 特級

3) dimethylsulfoxide (DMSO; CAS No. 67-68-

5): 和光純薬工業(株): 生化学用

4) nutrient broth No. 2 (N. B. No. 2): Oxoid Co. Ltd.

5) Ames 試験培地: クリメディア AM-N; オリエンタル酵母(株)

6) S9: キッコーマン(株): phenobarbital および 5,6-benzoflavone の腹腔内投与による酵素誘導ラット肝ホモジネート

7) cofactor: Cofactor- I オリエンタル酵母(株)

8) S9 mix: cofactor 水溶液に対し、S9 濃度を 10 % になるように用時調製した。

9) biotin (以下 Bio): 和光純薬工業(株): 特級

10) histidine (以下 His): 和光純薬工業(株): 特級

11) sodium chloride: 和光純薬工業(株): 特級

12) bacto agar: Difco Laboratories

13) top agar: bacto agar および sodium chloride に精製水を加え、高圧蒸気滅菌後用時 Bio および His 水溶液を加えて調製した。

### 2. 変異原性試験

変異原性試験は、労働省の労働安全衛生法による変異原性試験(1995)に準じた。試験菌株は、*Salmonella typhimurium* TA 98 および TA 100 (日本バイオアッセイ研究センター由来)を使用し、preincubation 法で、S9 mix 無添加(直接法、以下-S9)および添加(間接法、以下+S9)の両条件で行った。

陽性対照として TA 98—S9 および TA 100—S9 では AF-2 をそれぞれ 0.1 および 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  添加し、TA 98+S9 および TA 100+S9 では 2-AA をそれぞれ 0.5 および 1.0  $\mu\text{g}/\text{plate}$  添加した。

前培養は、培地に nutrient broth No. 2 を使用し、30 ml 三角フラスコを用いた S 字振盪式で行った。

変異原性の判定は労働安全衛生法に準じて、溶媒対照に対して 2 倍以上の復帰コロニー(単位は revertants, 以下 rev.)が出現したときを試験陽性とし、かつ、量一反応性がある場合、変異原性陽性とした。上述の条件に当てはまらない場合はすべて変異原性陰性とした。

また各試験ごとに、溶媒対照および陽性対照における変異コロニー数の許容範囲を確認した。

## 結 果

Haloacetic acid 類の変異原性試験結果を Table 2 に示した。TA 98 系では、—S9 および +S9 の条件において作用濃度段階の公比を 1.25 にしても菌の生育阻害は認められ、変異原性試験陽性とはならなかった。変異原性陰性と判定した。TA 100+S9 においても、dibromoacetic acid を除いて TA 98 の場合と同様に生育

Table 1 Characters of 20 chemicals for Ames test studied

Chemicals*	Molecular formula	Molecular weight	Supplier	Purity	CAS No.
・ Haloacetic acids					
Monochloroacetic acid	CH <sub>2</sub> ClCOOH	94.5	Aldrich Chemical Co. Inc.	99%	1979-11-8
Dichloroacetic acid	Cl <sub>2</sub> CHCOOH	128.94	Wako pure chemical Industries, Ltd.	98%	79-43-6
Trichloroacetic acid	Cl <sub>3</sub> CCOOH	163.39	Wako pure chemical Industries, Ltd.	98%	1976-3-9
Monobromoacetic acid	BrCH <sub>2</sub> COOH	138.95	Wako pure chemical Industries, Ltd.	98%	1979-8-3
Dibromoacetic acid	Br <sub>2</sub> CHCOOH	217.86	Wako pure chemical Industries, Ltd.	98%	631-64-1
・ Haloacetonitriles					
Monochloroacetonitrile	ClCH <sub>2</sub> CN	75.5	Kanto Chemical Co., Inc.	>98.0%	107-14-2
Dichloroacetonitrile	Cl <sub>2</sub> CHCN	109.94	Aldrich Chemical Co. Inc.	98%	79-43-6
Trichloroacetonitrile	Cl <sub>3</sub> CCN	144.39	Wako pure chemical Industries, Ltd.	98%	1976-3-9
Monobromoacetonitrile	BrCH <sub>2</sub> CN	119.95	ACROS Organics	97%	590-17-0
Dibromoacetonitrile	Br <sub>2</sub> CHCN	198.86	Merk KGaA	98%	3252-43-5
・ Haloacetones					
Monochloroacetone	ClCH <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub>	92.52	Kanto Chemical Co., Inc.	95%	302-17-0
1,1-Dichloroacetone	Cl <sub>2</sub> CHCOCH <sub>3</sub>	126.97	Kanto Chemical Co., Inc.	97%	77439-76-0
1,3-Dichloroacetone	ClCH <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub> Cl	126.97	Kanto Chemical Co., Inc.	98%	10178-30
1,1,1-Trichloroacetone	Cl <sub>3</sub> CCOCH <sub>3</sub>	161.41	Tokyo Chemical Industry Co Ltd.	95%	918-00-3
1,1,3-Trichloroacetone	Cl <sub>2</sub> CHCOCH <sub>2</sub> Cl	161.41	Aldrich Chemical Co., Inc.	90%	921-03-9
Monobromoacetone	BrCH <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub>	136.98	Wako pure chemical Industries, Ltd.	80%	598-31-2
・ MX and BMX					
MX <sup>a</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	217.44	Wako pure chemical Industries, Ltd.	98%	77439-76-0
BMX-1 <sup>b</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> BrCl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	261.89	Salford ultrafine chemicals & research Ltd.	99%	132059-51-9
BMX-2 <sup>c</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>2</sub> ClO <sub>3</sub>	306.34	Salford ultrafine chemicals & research Ltd.	99%	132059-52-0
BMX-3 <sup>d</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	350.79	Salford ultrafine chemicals & research Ltd.	100%	132059-53-1

\* Each of chemicals was prepared the maximum concentration of 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$  by dimethylsulfoxide (DMSO) except MX and BMX. Each of MX and BMX was dissolved in DMSO at maximum of 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ .

<sup>a</sup> MX: 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone, <sup>b</sup> BMX-1: 3-chloro-4-(bromochloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone, <sup>c</sup> BMX-2: 3-chloro-4-(dibromomethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone, <sup>d</sup> BMX-3: 3-bromo-4-(dibromomethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone

阻害は認められたが、変異原性は陰性となった。TA 100—S9 においては、monochloroacetic acid および trichloroacetic acid は試験陽性となったが、量一反応性が認められなかった。変異原性陰性と判定した。変異原性陽性となった化合物は、monobromoacetic acid で変異原活性値は 430 rev./ $\mu\text{mol}$  を示した。Dibromoacetic acid, dichloroacetic acid は変異原性が示唆されたが、活性値は低値であった。

Haloacetonitrile 類の試験結果を Table 3 に示した。Monochloro-および mono-bromoacetonitrile は、すべての条件下で菌の生育阻害は認められたが、変異原性は陰性であった。Dihaloacetonitrile は TA 98+S9 を除いて変異原性陽性と判定した。今回試験した haloacetonitrile 類の中では dibromoacetonitrile が最も高い変異原活性値を示し、TA 100+S9 においては 1000 rev./ $\mu\text{mol}$  であった。

TA 98—S9 において変異原性陽性と判定した 3 物質の変異原活性値を比較すると、dibromoacetonitrile が最も高く、trichloroacetonitrile がこれに続いた。Dichloro-acetonitrile は低い活性値であった。

Haloacetone 類の試験結果を Table 4 に示した。表に示したように monobromoacetone は、すべての条件下で変異原性陰性であった。Monochloroacetone は TA 98—S9 で、1,1-dichloroacetone は TA 98—S9 および TA 100—S9, +S9 で、1,1,1-trichloroacetone はすべての条件で変異原性陽性と判定したが、変異原活性値は非常に低い値であった。今回試験したすべての chloroacetone 類が、TA 98—S9 において変異原性陽性と判定したが、変異原活性値は 1,3-dichloroacetone が最も高く、2500 rev./ $\mu\text{mol}$  を示し、次いで 1,1,3-trichloroacetone の 1200 rev./ $\mu\text{mol}$  であった。TA 100 の場合も同様であり、—S9 および +S9 の条件において



Table 2 Mutagenic activity of haloacetic acids

Chemicals	revertants/ $\mu$ mol			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Monochloroacetic acid	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>a</sup>
Dichloroacetic acid	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	18	- <sup>a</sup>
Trichloroacetic acid	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>a</sup>
Monobromoacetic acid	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	430	- <sup>a</sup>
Dibromoacetic acid	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	96	72

- : Negative mutagenicity

<sup>a</sup> Negative response and recognized killing<sup>b</sup> Although revertant colonies increased 2-fold or higher above the spontaneous revertant colonies as a positive mutagenicity, it was not linear of a dose-response curve

Table 3 Mutagenic activity of haloacetonitriles

Chemicals	revertants/ $\mu$ mol			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Monochloroacetonitrile	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Dichloroacetonitrile	12	- <sup>b</sup>	140	150
Trichloroacetonitrile	140	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Monobromoacetonitrile	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Dibromoacetonitrile	280	- <sup>a</sup>	780	1000

- : Negative mutagenicity

<sup>a</sup> Negative response and recognized killing<sup>b</sup> Although revertant colonies increased 2-fold or higher above the spontaneous revertant colonies as a positive mutagenicity, it was not linear of a dose-response curve

1,3-dichloroacetone の変異原活性値が最も高く、-S9 では 30000 rev./ $\mu$ mol, +S9 では 2900 rev./ $\mu$ mol の変異原活性値を示した。次いで 1,1,3-trichloroacetone の 16000 rev./ $\mu$ mol および 2400 rev./ $\mu$ mol であった。TA 100 の条件においては、1,3-と 1,1-dichloroacetone, また 1,1,3-と 1,1,1-trichloroacetone の間で、変異原活性値に大きな差が認められた。

MX および BMX 類は Table 5 に示すように、いずれの条件においても高い変異原活性値を示した。その中でも TA 100-S9 において最も高く、活性値は BMX-2 の 15000 rev./nmol から BMX-1 の 7600 rev./nmol の範囲にあった。TA 98 および TA 100 の+S9 においては、-S9 と比較して 1/40-1/70 および 1/80-1/190 の活性値を示した。

## 考 察

Chloroacetic acid 類の変異原性については、McCann ら (1975) および 鶴川 ら (1988) が TA 98+S9, -S9 および TA 100+S9, -S9 の条件で試験し、変異原性陰性と報告している。筆者らのデータでも dichloroacetic acid の TA 100-S9 においては変異原性が示

Table 4 Mutagenic activity of haloacetones

Chemicals	revertants/ $\mu$ mol			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Monochloroacetone	59	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
1,1-Dichloroacetone	19	- <sup>b</sup>	110	120
1,3-Dichloroacetone	2500	240	30000	2900
1,1,1-Trichloroacetone	8	5	72	39
1,1,3-Trichloroacetone	1200	270	16000	2400
Monobromoacetone	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>

- : Negative mutagenicity

<sup>a</sup> Negative response and recognized killing<sup>b</sup> Although revertant colonies increased 2-fold or higher above the spontaneous revertant colonies as a positive mutagenicity, it was not linear of a dose-response curve

Table 5 Mutagenic activity of MX and BMX

Chemicals	revertants/nmol			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
MX	1100	28	13000	80
BMX-1	940	20	7600	92
BMX-2	1500	21	15000	80
BMX-3	1200	27	11000	77

Impurities in chemicals were not found on our GC-MS (resolution : 10000) analysis

Table 6 Minimum dose of haloacetic acids at killing point

Chemicals	$\mu$ g/plate			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Monochloroacetic acid	4000	2600	3200	3200
Dichloroacetic acid	4000	4000	+	4000
Trichloroacetic acid	4000	4000	3200	3200
Monobromoacetic acid	250	1000	+	500
Dibromoacetic acid	4000	4000	+	+

+ : Data were not showed, because of positive mutagenicity

唆されたが低い値であり、他の化合物は変異原性陰性であったことから、ほぼ一致した結果が得られた。Bromoacetic acid 類のうち、monobromoacetic acid は TA 100-S9 の条件で変異原性陽性となったことから、直接型の塩基対置換型変異原性物質であると考えられた。

Haloacetic acid 類の場合、作用濃度段階の公比を小さくしたが、変異原性試験陽性を示すことなく生育阻害を起こした。このことは変異原性に比較して菌の細胞に対する毒性が強いと考えられた。そこで今回の試験で生育阻害を起こした haloacetic acid 類の各作用濃度を Table 6 に示した。Monobromoacetic acid は最も低濃度の 250-1000  $\mu$ g/plate で生育阻害を起こし、次いで monochloroacetic acid は 2600-4000  $\mu$ g/plate で生育

Table 7 Minimum dose of haloacetonitriles at killing point

Chemicals	$\mu$ g/plate			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Monochloroacetonitrile	2500	5000	2500	5000
Dichloroacetonitrile	+	2500	+	+
Trichloroacetonitrile	+	840	840	1700
Monobromoacetonitrile	60	250	130	250
Dibromoacetonitrile	+	200	+	+

+ : Data were not showed, because of positive mutagenicity

阻害を起こした。Giller ら (1997) は、fluctuation 法で試験を行った結果、haloacetic acid 類の中で monobromoacetic acid の毒性が強いと報告しているが、今回の筆者らの結果と一致した。また、trichloroacetic acid などは蛋白凝固作用があるため、これが生育阻害を起こした一因であるとも考えられる。

Monohaloacetonitrile についても、作用濃度段階の公比を小さくしたにもかかわらず、今回試験したすべての条件下で生育阻害を起こした。このことから、菌の細胞に対して毒性があることが示唆された。変異原性陰性を示した各 haloacetonitrile についての生育阻害作用濃度を Table 7 に示した。monochloroacetonitrile の-S9 条件下での生育阻害を示した作用濃度は、monobromoacetonitrile の 20-40 倍、+S9 では 20 倍であったことから、monobromoacetonitrile の方が菌の細胞に対する毒性は強いと考えられた。また、monochloroacetonitrile は、+S9 における生育阻害濃度が-S9 の場合の 2 倍となった。Monobromoacetonitrile でも同様に 2-5 倍であったことから、これらの物質は S9 mix で代謝されることにより菌の細胞に対する毒性が弱まる傾向にあると考えられた。

Curieux ら (1995) は、fluctuation 法で chloroacetonitrile 類の変異原性強度を比較検討しているが、その結果は TA 100 の場合、-S9 および+S9 において、変異原性が強い順に dichloro-, trichloro-, monochloroacetonitrile と報告しているが、dichloroacetonitrile の変異原活性値が最も高かったという点では筆者等の結果と一致した。生育阻害作用は、monochloro-よりも trichloroacetonitrile の方が強かった。

これらの結果から、dihaloacetonitrile は変異原性を示し、monohaloacetonitrile は変異原性よりも菌の細胞に対する毒性を示す傾向にあることが明らかとなった。

また、dibromoacetonitrile は塩基対置換型の変異原性物質であることが示唆された。

Dichloroacetone および trichloroacetone については、同一の炭素に塩素原子が複数結合するよりも、1 位、3 位の炭素に結合する構造の方が変異原活性値が高くなることが示された。Merrick ら (1987) および Curieux ら

Table 8 Minimum dose of haloacetones at killing point

Chemicals	$\mu$ g/plate			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Monochloroacetone	+	250	130	250
1,1-Dichloroacetone	+	2500	+	+
Monobromoacetone	13	50	25	100

+ : Data were not showed, because of positive mutagenicity

(1994) は、1,1-および 1,3-dichloroacetone の TA 100-S9 の変異原性について比較している。これによると 1, 3-dichloroacetone は 1,1-dichloroacetone の約 100-300 倍の変異原性があると報告しており、筆者らの結果とはほぼ同様であった。また、ジクロル体の方がトリクロル体よりも変異原活性値が高かった。

Haloacetone 類では、1,3-dichloroacetone および 1,1, 3-trichloroacetone において、直接型のフレームシフト型および塩基対置換型の変異原性物質であることが示された。

一方 Table 8 に示すように、monohaloacetone では、変異原性よりも菌の細胞に対する毒性の方が強く現れ、モノブロム体はモノクロル体よりも低濃度で生育阻害を起こした。MX および BMX 類の変異原性については、haloacetonitrile 類や haloacetone 類にみられたように、結合しているハロゲンの種類による変異原活性値に顕著な差はなかった。MX は TA 100-S9 の変異原性に関する報告が数多く、Backlund ら (1989), Ishiguro ら (1988) および Kronberg ら (1988) の報告ではそれぞれ、6300, 5600, 5600 rev./nmol であった。この値は Meier ら (1987 a) が報告した 13000 rev./nmol の約半分の値であった。しかし、最近の Suzuki ら (1995) および木苗 ら (1998) の報告では、それぞれ 12000 rev./nmol および 13000 rev./nmol と Meier らの値と同等であった。筆者らの結果は Meier らの値とよく一致した。各報告における変異原活性値の差については、Meier ら (1987 b) が Bio-His top agar の pH による MX の変異原活性値の変化について検討した結果、MX の変異原活性値は pH 7 では 14000 rev./nmol, pH 8 では 5600 rev./nmol と報告している。筆者らの用いた Bio-His top agar の pH は 7.4 であり、変異原活性値も 13000 rev./nmol で Meier らの行った pH 7 の場合と同等の結果となった。上述の 3 報告について Bio-His top agar の pH は報告されていないが、このような変異原活性値の差の一因として、Bio-His top agar の pH が関与していると考えられた。

一方、TA 98 および TA 100 の+S9 条件下で行った Tikkanen ら (1990) は、変異原性陰性と報告している。し



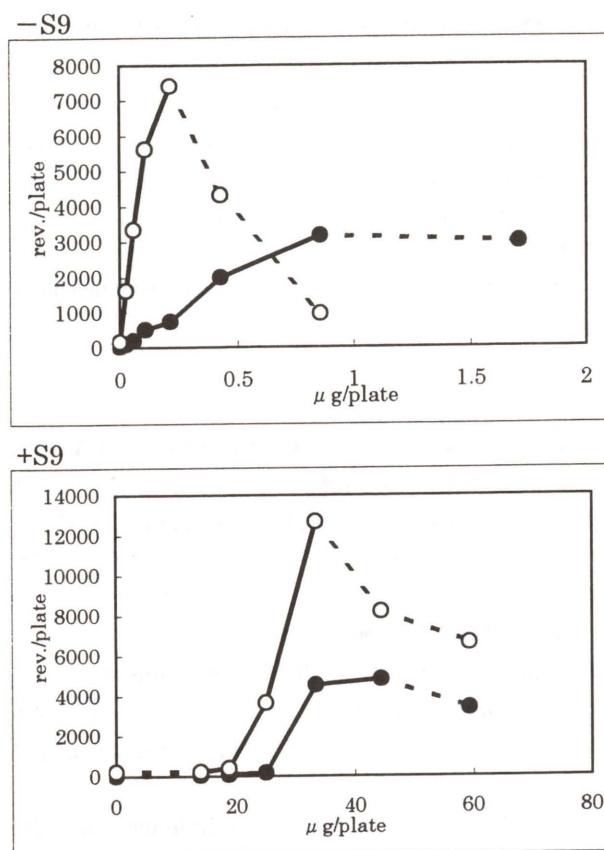


Fig. 1 Dose-response curve of MX on Ames test using *Salmonella typhimurium* TA98 strain (●) and TA100 strain (○). Solid line shows positive and dotted line shows negative or killing

かし、筆者らの結果はTA 98においては20–28 rev./nmol, TA 100では80–92 rev./nmolの変異原活性値を示した。この結果の違いは、最高作用濃度の設定に関係していると考えられる。Tikkanenらは最高作用濃度を0.03 μg/plateにしており、筆者らは250 μg/plateを最高濃度とした。MXにおける作用濃度と変異コロニー数の変化をFig. 1に示したが、+S9では20–45 μg/plateで試験陽性となり、-S9では0.03–0.8 μg/plateで試験陽性を示した。

BMX類の変異原性については、Suzukiら(1995)がTA 100–S9のみのデータを報告しているが、これらの報告とはほぼ同様の結果を得た。

また、各官能基における変異原活性値の変化について、変異原性陽性となった化合物の多いジクロル化合物で比較してみると、TA 100–S9の場合では-CN基の変異原活性値が最も高く、次いで>C=O基、-COOH基の順となった。一般に電子吸引性は、-CN基が最も強く、>C=O基、-COOH基の順であることから、このことがTA 100のDNAに対する反応性に差が現れたことの一因とも考えられる。また同一の官能基をもつ化合物では、ブロム体の方がクロル体よりも変異原活性値が高かった。このことは、ハロゲンの電子吸引性の因子が関係し

ていることが予測される。電子吸引性の強度と変異原活性値の関係については今後の検討課題である。

TA 98では、変異原活性値と官能基の間に一定の関係はみられなかった。ジクロル体においては-CN基と>C=O基は同レベルの変異原活性値を示し、また両者とも菌の細胞に対する毒性も同様な強さであった。モノクロル体、モノブロム体ともに>C=O基をもつ方が、-CN基および-COOH基よりも菌の細胞に対する毒性が強かった。

## 結 語

塩素処理水から検出される水溶性消毒副生成物20物質の変異原性とその構造活性相関についてAmes法で検討した結果、次のことがわかった。

1) 消毒副生成物20化合物中、TA 98菌株に対しては12化合物、TA 100菌株では13化合物に変異原性陽性が示された。今回試験した消毒副生成物では、直接型の塩基対置換型変異原性を示す化合物が多かった。

2) モノハロゲン化合物は、変異原性が示されてもその活性値は低い値であったが、菌の細胞に対する毒性があり、特にモノブロム体はモノクロル体に比べ低濃度で生育阻害が示された。

3) ジハロゲン化合物は変異原性陽性となった化合物が多く、その変異原活性値はジブロム体の方がジクロル体よりも高いことが示された。

4) 変異原性陽性となったchloroacetone類の変異原活性値は、クロル原子の置換数よりもクロル原子の結合位置に影響されることが示唆された。

5) 官能基の種類によって変異原活性値に差が現れ、ジクロル化合物におけるTA 100の変異原活性値は-S9の場合、活性値の高い順に-CN基、>C=O基、-COOH基であった。

6) MXおよびBMXのTA 98およびTA 100の変異原活性値は高値を示し、MXとBMXの変異原活性値に大きな差はみられなかった。

消毒副生成物は総じてTA 100–S9において最も高い変異原活性値を示した。一方、塩素消毒した水の変異原活性値もTA 100–S9において最も高い値を示すことから、今後はこれら消毒副生成物の塩素消毒水中の濃度を測定し、その寄与率について検討していきたい。

## 参考文献

- Backlund, P., E. Wondergem, K. Voogd and A. De Jong (1989) Mutagenic activity and presence of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone (MX) in chlorinated raw and drinking waters in the Netherlands, *Sci. Total Environ.*, 84, 273-282.
- Bellar, T. A., J. J. Lichtenberg and R. C. Kromer (1974) Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters, *J. Am. Water Works Assoc.*, 66, 703-706.

- Bull, R. J. (1985) Carcinogenic and mutagenic properties of chemicals in drinking water, *Sci. Total Environ.*, 47, 385-413.
- Curieux, F. Le, S. Giller, L. Gauthier, F. Erb and D. Marzin (1994) Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test, *Mutat. Res.*, 341, 1-15.
- Curieux, F. Le, S. Giller, L. Gauthier, F. Erb and D. Marzin (1995) Study of the genotoxic activity of six halogenated acetoneitlres, using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test, *Mutat. Res.*, 341, 289-302.
- Erdinger, L. and H. G. Stonntag (1990) Schwerfluechtige halogenorganische verbindungen als nebenprodukte der schwimmbadwasseraufbereitung, *Forum Staedte-Hygiene*, 41, 185-188.
- Giller, S., F. Le Curieux, F. Erb and D. Marzin (1997) Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water, *Mutagenesis*, 12, 321-328.
- Hemming, J., B. Holbom, M. Reunanen and R. Kornberg (1986) Determination of the strong mutagen in chlorinated drinking and humic waters, *Chemosphere*, 15, 549-556.
- Henshler, D. and G. Bonse (1977) Metabolic activation of chlorinated ethylenes: dependence of mutagenic effect on electrophilic reactivity of the metabolically formed epoxides, *Arch. Toxicol.* 39, 7-12.
- Herren-Freund, S. L. (1987) The carcinogenicity of trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid, mouse liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 90, 183-189.
- Horth, H. (1989) Identification of mutagens in drinking water, *Aqua*, 38, 80-100.
- Ishiguro, Y., J. Santodonato and M. W. Neal (1988) Mutagenic potency of chlorofranones and related compounds in *Salmonella*, *Environ. Mol. Mutagen.*, 11, 225-234.
- 磯田信一, 伊藤英幸, 菅谷なえ子, 長岡 登 (1995) 屋内プールの衛生学的検討—プール水中の消毒副生成物について—, *日本薬学会第115回年会講演要旨集*, 3: 200.
- 木苗直秀, 谷所達幸, 今村希美, 古郡三千代, 下位香代子, 西川秋佳, 高橋道人 (1998) 水道水中の強力な変異原物質MXの二段階発癌性, 第32回日本水環境学会年会講演集, pp. 105.
- Kronberg, L. and T. Vartiainen (1988) Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone and of its geometric isomer E-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxo-butenic acid in chlorine treated tap waters, *Mutat. Res.*, 206, 177-182.
- 健名智子, 高柳信孝, 井山洋子, 斎藤尚仁 (1991) 室内プール水中の低分子有機ハロゲン化合物について, *富山県衛生研究所年報*, 14: 202-204.
- LaLonde, R. T., G. P. Cook, H. Perakyla and L. Bu (1991) Structure-activity relationships of bacterial mutagens related to 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone: an emphasis on the effect of stepwise removal of chlorine from the dichloromethyl group, *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 540-545.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and Ames B. N. (1975)

- Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 5135-5139.
- Meier, J. R., H. P. Ringhand, W. E. Coleman, J. W. Munch, R. P. Streicher, W. H. Kaylor and K. M. Schenck (1985) Identification of mutagenic compounds formed during chlorination of humic acid, *Mutat. Res.*, 157, 111-122.
- Meier, J. R., R. B. Knohl, W. E. Coleman, H. P. Ringhand, J. W. Munch, W. H. Kaylor, R. P. Streicher and F. C. Kopfler (1987a) Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solutions, *Mutat. Res.*, 189, 363-373.
- Meier, J. R., W. F. Blazak and R. B. Knohl (1987b) Mutagenic and clastogenic properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone: a potent bacterial mutagen in drinking water, *Environ. Mol. Mutagen.*, 10, 411-424.
- Merrick, B. A., C. L. Smallwood, J. R. Meier, D. L. McKean, W. H. Kaylor and L. W. Condie (1987) Chemical reactivity, cytotoxicity, and mutagenicity of chloropropanones, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 91, 46-54.
- Mortelmans, K., S. Haworth, T. Lowlor, W. Speck, B. Tainer and E. Zeiger (1986) *Salmonella* mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals, *Environ. Mutagen.*, 8, Suppl., 7, 1-119.
- National Cancer Institute (1976) Report on carcinogenesis bioassay of chloroform, Carcinogenesis Program, Division of Cancer Cause and Prevention, Bethesda, MD.
- Rook, J. J. (1974) Formation of haloforms during chlorination of natural waters, *Water Treat. Exam.*, 23, 234-243.
- 齋藤治子, 磯田信一, 加藤美津子, 長岡 登 (1995) 屋内プール水の変異原性, *環境変異原研究*, 17: 169-177.
- Sterner, O., R. E. Carter and L. M. Nilsson (1987) Structure-activity relationships for unsaturated dialdehydes I. The mutagenic activity of 18 compounds in the *Salmonella*/microsome assay, *Mutat. Res.*, 188, 169-174.
- Suzuki, N. and J. Nakanishi (1995) Brominated analogues of MX (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone) in chlorinated drinking water, *Chemosphere*, 30, 1557-1564.
- 惣名史一, 相沢貴子, 眞柄泰基 (1992) 塩素処理副生成物の測定法と実態調査, 第43回全国水道研究発表会抄録, pp. 702-704.
- 杉野邦雄, 堀本能之, 高津章子 (1993) 水道水, 水泳プール水中のhaloacetic acid類の分析, *環境化学*, 3: 496-497.
- Tikkanen, L. and L. Kronberg (1990) Genotoxic effects of various chlorinated butenoic acids identified in chlorinated drinking water, *Mutat. Res.*, 24, 109-116.
- Tuppurainen, K. (1994) QSAR approach to molecular mutagenicity. A survey and case study: MX compounds, *J. Mol. Struct.*, 306, 49-56.
- 鶴川昌弘, 中村清一, 宮野啓一, 布浦雅子 (1988) 水中有機物の検索に関する研究(第4報)—水道水中のハロゲン化合物の分析—, *大阪府立公衛研所報*, 26: 63-70.
- Waskell, L. (1978) A study of the mutagenicity of anesthetics and their metabolites, *Mutat. Res.*, 57, 141-153.



# 塩素処理した下水細菌培養液中に生成する変異原物質

伊藤 伸一<sup>1</sup>, 畝本 力<sup>2</sup>

<sup>1</sup>神奈川県衛生研究所 〒241-0815 横浜市旭区中尾 1-1-1

<sup>2</sup>千葉大学薬学部 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33

## Mutagens in chlorinated culture solution of sewage bacteria

Shin-Ichi Itoh<sup>1</sup>, Tsutomu Unemoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory,  
1-1-1 Nakao, Asahi-ku, Yokohama 241-0815, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University,  
1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi 263-8522, Japan

### Summary

When sewage bacteria were grown with glucose as a sole source of carbon and energy, precursors of direct mutagenic substances were produced in the culture solution. The culture solution showed no significant mutagenic activity by itself. However after chlorination, it exhibited dose-related mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* TA100 without S9 mix. About 80 % of the mutagenic precursors were recovered in the precipitate fraction obtained by centrifugation for 20 min at 12000×g. The mutagenic substances in the chlorinated culture solution were adsorbed to a solid phase extraction column (Excelpak SPE-GLF cartridge) and were effectively eluted with ethyl acetate. We could detect the formation of glyoxal and methylglyoxal in the chlorinated culture solution, but the amounts of these aldehydes were too small to consider as major mutagens. Further studies are required to identify the major mutagens.

**Keywords :** sewage bacteria, chlorination, direct mutagen, glyoxal, methylglyoxal

### 緒 言

1974 年, Rook は水道水の塩素処理過程で水中の有機物と塩素とが反応して, trihalomethane (THM) が生成されることを報告した (Rook, 1974). それ以来, 水道の浄水処理で塩素を用いている国々では, 「水道水の安全性」が大きな社会的関心を呼び, 今日にいたっている. 特に, 日本においては, 大都市近郊の重要な水道水源になっている河川や湖沼の水質が, 年々悪化の一途をたどっており, また水道水源の上流域に下水処理場の放流水等が流入しているケースも多く見受けられる現状から, 早急な対策が望まれている.

THM は発ガン性が疑われている揮発性物質で, 主な

前駆物質は, フミン物質と考えられている (Rook, 1974, 1976 ; Stevens et al., 1976 ; Oliver and Lawrence, 1979 ; Oliver and Visser, 1980). 我々は, THM 前駆物質として下水細菌の代謝物質に着目して研究を行い, 下水細菌が水中の有機物を栄養源として, THM 生成能がきわめて高い acetoacetic acid (CAS No.3483-11-2) を生成することを報告した (Itoh et al., 1985).

一方, 有機物を塩素処理した場合, 揮発性物質ばかりでなく難揮発性物質も生成され, むしろ, 後者の中にも有害性の大きな物質, 例えば変異原物質等が存在すると指摘されてきた (Loper, 1980 ; Fallon and Fliermans, 1980 ; Hemming et al., 1981 ; Kronberg and Vartiainen, 1988 ; Vartiainen and Liimatainen, 1986). 北米や北欧では, 水道水中の主要な変異原物質として 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5 H)-furanone (MX, CAS No.77439-76-0) が同定されている. 日本でも MX が水道水中に検出されており, MX の

受付 : 1998 年 11 月 11 日

受理 : 1998 年 12 月 3 日

©日本環境変異原学会



寄与率が最高で36%だったという報告(Kinae et al., 1992)もある。しかしながら、MX だけでは全変異原活性を説明できず、MX 以外の変異原物質の存在が示唆されている(Suzuki and Nakanishi, 1990; 下位および富田, 1991)が、現在までのところ MX 以外に原因物質の解明は進んでいない。

福井らは、活性汚泥処理排水の塩素処理により変異原物質が生成されることを報告し、その前駆物質として微生物の代謝物質に注目している(Fukui et al., 1990, 1992)。我々も先の acetoacetic acid の研究から、下水細菌の培養液の塩素処理液中に難揮発性の変異原物質が存在するであろうと予想してモデル実験を行い、その処理液中に塩基置換型の直接変異原物質が生成されることを認めたので報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 試薬

#### 1) 下水細菌培養用試薬類

BOD 測定用植種菌剤は POLYBAC corporation 製の POLYSEED-US、エネルギー源のブドウ糖は Difco 製の BACTO-DEXTROSE を用いた。

#### 2) 塩素処理用試薬類

次亜塩素酸ナトリウム溶液は和光純薬工業製の食品添加物用、塩酸は和光純薬工業製の精密分析用を用いた。

#### 3) 変異原物質の分離用試薬類

固相抽出カラムは、スチレンジビニルベンゼン共重合体とポリメタクリレートとを担体として用いた横河アナリティカルシステムズ製のエクセルパック SPE-GLF (SPE-GLF)、チオ硫酸ナトリウムおよび亜硫酸ナトリウムは、和光純薬工業製の特級試薬を用いた。また残留農薬試験用の ethyl acetate および dichloromethane は、和光純薬工業製を用いた。

#### 4) 変異原性試験用試薬類

寒天は、平板用が和光純薬工業製の細菌培地用、上層寒天用が Difco 製の BACTO-AGAR を用いた。dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS No.67-68-5) は、同仁化学研究所製の蛍光分析用純溶媒(ルミナゾール)を用いた。S9 mix 調製用 Cofactor-I はオリエンタル酵母工業製、S9 はキッコーマン製のものを用いた。また、陽性対照物質は、和光純薬工業製の 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2, CAS No.3688-53-7) を用いた。

#### 5) Aldehyde 類の GC/MS 分析用試薬類

Glyoxal (CAS No.107-22-2) は東京化成工業製、methylglyoxal (CAS No.78-98-8) は Aldrich chemical company 製を用いた。o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxyl-amine hydrochloride (PFBOA, CAS No.57981-02-9) は和光純薬工業製の水質分析用を用いた。また PFBOA 誘導体標準試薬は林純薬工業製の PFBOA glyoxalaldoxime (syn), (syn/syn), (syn/anti), (anti/

anti) および PFBOA methylglyoxalaldoxime (syn), (anti), (syn/syn), (syn/anti), (anti/syn), (anti/anti) を用いた。

### 2. 試料の調製

#### 1) 微生物源

BOD 測定用植種菌剤の POLYSEED-US を下水細菌として用いた。培養試験開始日に、POLYSEED-US 1 カプセルを BOD 希釈水 500 ml に溶かし、60 分間激しく攪拌培養したものの上澄液を微生物源とした。

#### 2) 培養

3 l の褐色培養びんに、BOD 希釈水 2 l と微生物源 16 ml を投入し、これに唯一のエネルギー源としてブドウ糖 40 mg (培養液中の濃度: 20 mg/l) を添加して、25°C の恒温室で攪拌培養した。また、これと並行してブドウ糖を除いた空試験についても同様の培養操作を行った。

#### 3) 塩素処理

培養液 2 l に、塩素濃度が 100 mg/l または所定濃度になるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し、1 N 塩酸で pH 7.0 に調整後、ただちに密栓して 25°C の恒温室で、24 時間反応させた。これを塩素処理試料とした。

#### 4) 変異原物質の分離

塩素処理試料 2 l にチオ硫酸ナトリウム(または亜硫酸ナトリウム)を加えて残留塩素を除去した後、塩酸を添加して pH 2.0 とした。これを SPE-GLF カートリッジ内に通水した。流速は 20 ml/min とし、試料 1 l に対してカートリッジを 1 本用いた。吸着物の溶出には、カートリッジ 1 本当たり ethyl acetate 5 ml を用いた。抽出物は、窒素ガスを吹き付けて溶媒を留去した後、密栓し変異原性試験または aldehyde 類の GC/MS 分析に供するまで -30°C の冷凍庫内に保存した。

#### 5) 菌体の分離

2. 2) の下水細菌培養液を 12000×g で 20 分間遠心処理し、菌体成分の沈殿区分とそうでない上澄区分とに分離した。

### 3. 変異原性試験

菌株は、*Salmonella typhimurium* TA 100 および TA 98 株を用い、プレインキュベーション法(Yahagi et al., 1977)により変異原性試験を行った。

試験前日、乾固した試料を冷凍庫から取り出し、室温に戻した後、所定量の dichloromethane を加えて溶解した。この dichloromethane 溶液の必要量をプレインキュベーション用の小試験管に分注して、希釈列を作成し、冷蔵室内に一晩放置して dichloromethane を留去した。試験当日、この小試験管に DMSO 0.1 ml を添加して試料を溶解した中に、ラット肝 S9 mix または 0.1 M りん酸緩衝液 0.5 ml、試験菌液 0.1 ml を混合した。ただちに 37°C で 20 分間振とう培養後、軟寒天 2 ml を加

えて平板上に播き、37°C で 64 時間培養後に、コロニーを計数した。なお、培養時間については、あらかじめ 48 時間と 64 時間との間でコロニー数が増減しないことを確かめておいた。

変異原性の有無は、復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数の 2 倍以上あり、かつ用量-反応関係がある場合を陽性と判定した。なお、変異原活性は、用量-反応曲線が直線的な部分に、最小自乗法を適用して直線回帰式を求め、試料水 1 l 当たりの復帰コロニー数に換算した値で示した。

### 4. Aldehyde 類の GC/MS 分析

Aldehyde 類の glyoxal および methylglyoxal は、誘導剤として PFBOA を用いた GC/MS 法(Yamada and Somiya, 1989; Harimoto et al., 1997)で測定した。

試験当日、乾固した試料を冷凍庫から取り出し、室温に戻した後、蒸留水 5 ml を加え、超音波洗浄器を用いて内容物を水によく溶解、分散させた。この試料水に 0.1 % PFBOA 溶液を 0.3 ml 添加して、冷暗所で 24 時間反応させた。反応後、塩化ナトリウム 2 g、40 % 硫酸溶液 0.1 ml および hexane 1.0 ml を加え 5 分間振とうした。遠心分離後、hexane 層を分取し、これを GC/MS 分析用の試料とした。なお、glyoxal および methylglyoxal の PFBOA 誘導体は、それぞれ一量体と二量体が存在し、さらに幾何異性体も存在する。したがって、glyoxal および methylglyoxal の定量に当たっては、各異性体ごとに作成した検量線から求めた各異性体量を合算して求めた。

GC/MS 条件は以下の通りである。

<GC 条件>

- ① ガスクロマトグラフ: HEWLETT PACKARD (HP) 社製 5890 シリーズ II Plus
- ② カラム: HP 社製 HP-5 Trace Analysis (長さ 30 m × 内径 0.25 mm, 膜厚 0.1 μm)
- ③ オープン温度: 50°C (1 min) → 10°C/min → 100°C (0 min) → 3°C/min → 180°C (0 min) → 30°C/min → 250°C (0 min)
- ④ 注入口温度: 250°C
- ⑤ 注入法: スプリットレス法 (1 μl)
- ⑥ キャリヤーガス: ヘリウム (12 psi (50°C), 定流量モード)

<MS 条件>

- ① 質量分析計: HP 社製 5972 A
- ② インターフェース温度: 280°C
- ③ イオン化法: EI 法 (70 eV)
- ④ 検出器: イオン選択検出器 (SIM モード)

### 5. TOC (全有機炭素) の分析

塩素処理を行う前の下水細菌培養液 50 ml をパイア

Table 1 Mutagenicity of chlorinated and non-chlorinated sewage bacteria culture in two *S. typhimurium* strains

Test strain	Mutagenic activity (net revertants/l) <sup>a</sup>	
	Chlorination	Non-chlorination
TA100 (-S9 mix)	7300	—
TA100 (+S9 mix)	—	—
TA98 (-S9 mix)	—	—
TA98 (+S9 mix)	—	—

<sup>a</sup>Spontaneous revertants per plate (n=2) were TA100 (-S9 mix): 94, TA100 (+S9 mix): 103, TA98 (-S9 mix): 19, TA98 (+S9 mix): 33.

—: negative response

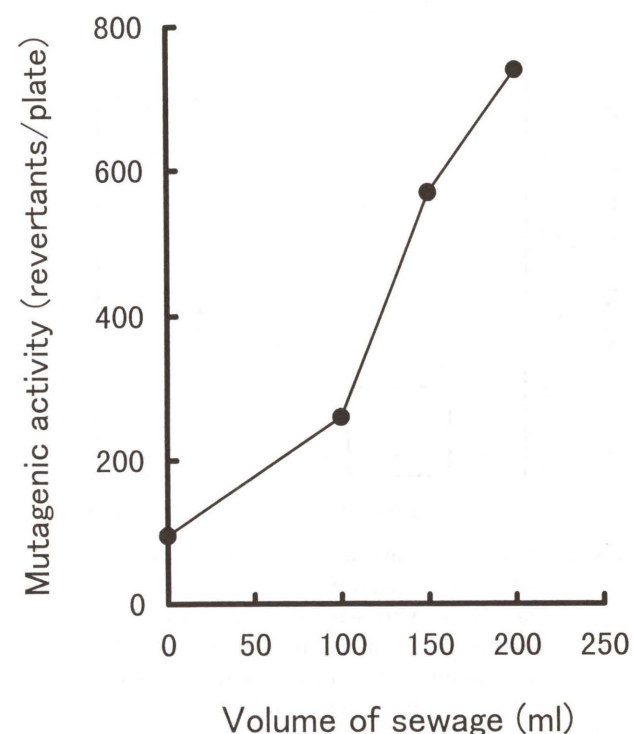


Fig. 1 Dose-response curve of chlorinated sewage bacteria culture in *S. typhimurium* TA100 without S9 mix

ルビンに取り、2 N 塩酸を 6 滴添加し、冷蔵庫で保存した。TOC 分析直前に冷蔵庫から取り出した試料を、島津製作所製 TOC-5000 A にセットし、高純度空気を通気して IC (無機炭素) を除去した後、TOC を測定した。

## 結果と考察

### 1. 塩素処理した下水細菌培養液の変異原性

ブドウ糖 (20 mg/l) を栄養源として、下水細菌を 2 日間攪拌培養した後に、その培養液を塩素処理 (塩素濃度 100 mg/l) し、固相抽出を行った。Table 1 および Fig. 1 は、この固相抽出により得られた試料について、*Salmonella typhimurium* TA 100 および TA 98 株に対する変異原性試験を行った結果である。なお、今回の一連の研究においては、独立した 2 回以上の実験を行い再現



性を確認した。Table 1 に示したように、この試料は、S9 mix 非存在下で TA 100 株に対して特異的に変異原活性を示す塩基置換型の強い変異原物質であることが明らかになった。なお、陰性例はすべて「-」とした。Fig. 1 は用量-反応関係を示した例である。200 ml 相当量までの濃度範囲で用量-反応関係が認められた。

Fig. 2 は、この変異原物質の前駆体が下水細菌により生成される細胞内物質なのか細胞外物質なのかを検討した結果である。前記 2.5) 項により調製された沈殿区分と上澄区分の試料について、それぞれ別々に塩素処理し、変異原性試験を行った。Fig. 2 に示したように、沈殿区分の変異原活性は上澄区分の約 4 倍の値を示した。このことから、変異原活性を示す主たる前駆体は、細菌の細胞

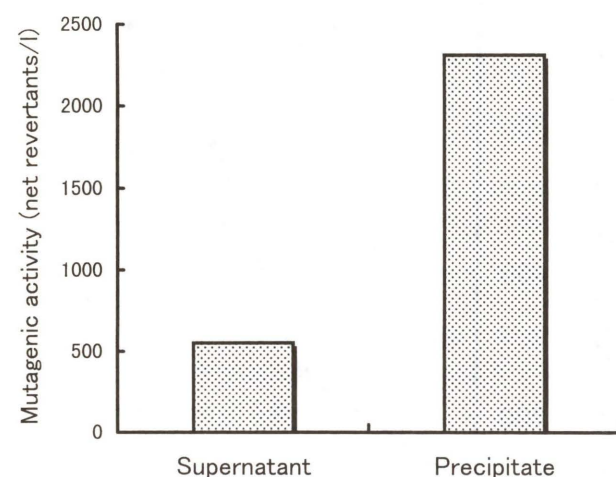


Fig. 2 Recovery of mutagenic precursors in the supernatant and precipitate fractions of the sewage bacteria culture. After separation of the two fractions by centrifugation for 20 min at 12000×g, each fraction was chlorinated and then mutagenic activity was determined in *S. typhimurium* TA100 without S9 mix

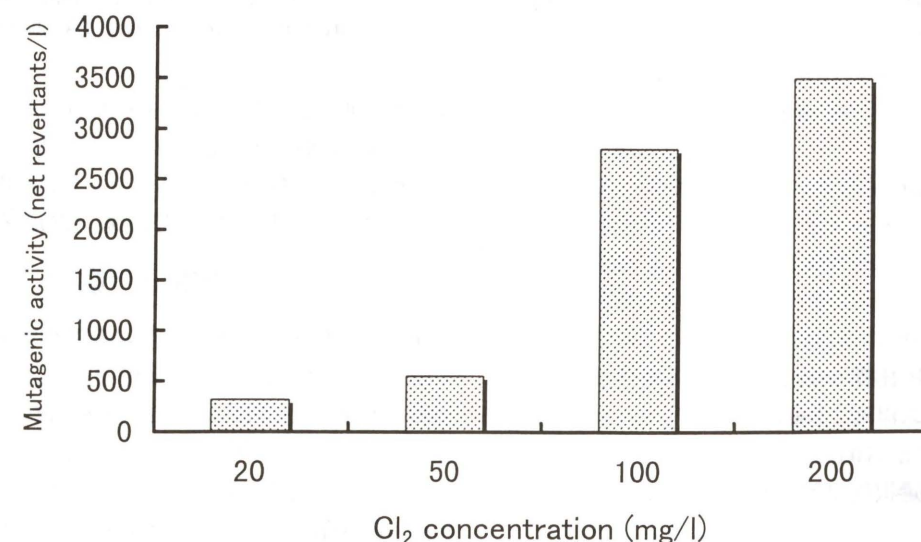


Fig. 3 Effect of chlorine concentration on the formation of mutagenic substances from sewage bacteria culture

内物質である可能性が示唆された。

## 2. 変異原活性に及ぼす塩素濃度の影響

Fig. 3 は、培養 2 日の下水細菌培養液に塩素濃度が 20, 50, 100, 200 mg/l になるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて塩素処理したときの変異原性試験の結果である。試料 1 l 当たりの純復帰コロニー数は、塩素濃度が高くなるに従って増大する傾向が認められた。また、ここで示された変異原物質は、この濃度範囲内では塩素により分解されにくい構造を持つものであると考えられるが、各塩素濃度条件で生成された変異原物質が、同じものなのかどうかは定かでない。なお、以後の本研究における塩素処理条件は、100 mg/l とすることにした。

## 3. 固相抽出時における溶出溶媒の検討

培養 2 日の下水細菌培養液の塩素処理液 8 l を 2 l ずつ 4 等分し、別々の固相カートリッジに通水した後、カートリッジに吸着した物質を methanol, acetone, dichloromethane または ethyl acetate で溶出させた。各溶媒を留去した試料について TA 100 株に対する変異原活性を S9 mix 条件で検討したところ、Fig. 4 に示した結果を得た。いずれの溶媒を用いた場合でも、変異原活性が認められたが、特に ethyl acetate で溶出した試料が 13000 rev./l ときわめて高い変異原活性を示し、この変異原の主たる原因物質が、ethyl acetate により特異的に溶出される中極性物質であることが示唆された。また、この試料の保存安定性を検討したところ、抽出溶媒を留去した状態で、冷凍保存 (-30°C) すれば約 14 日間安定であった。したがって固相抽出の抽出溶媒は ethyl acetate を用いることにした。

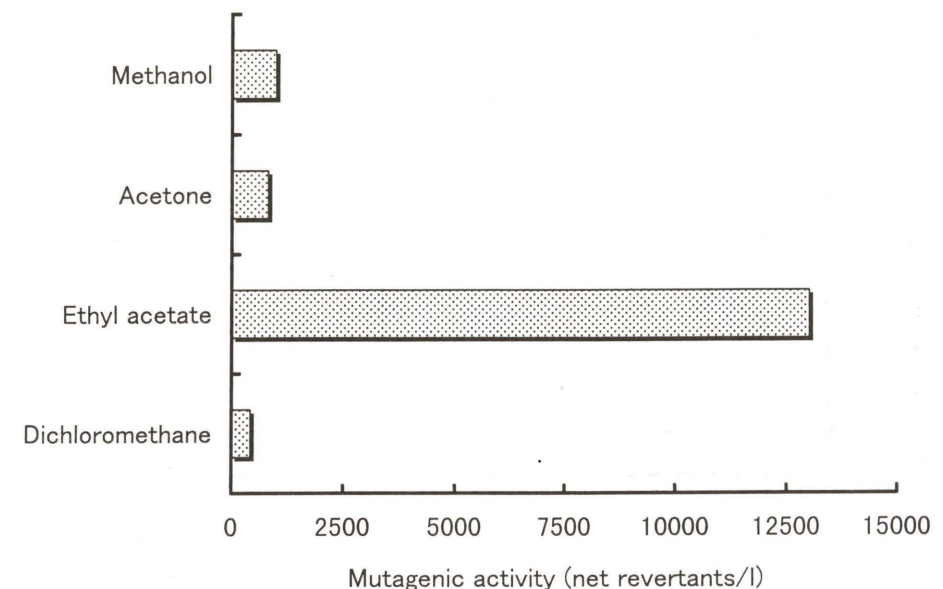


Fig. 4 Effect of solvent on the extraction of mutagenic substances from SPE-GLF cartridge

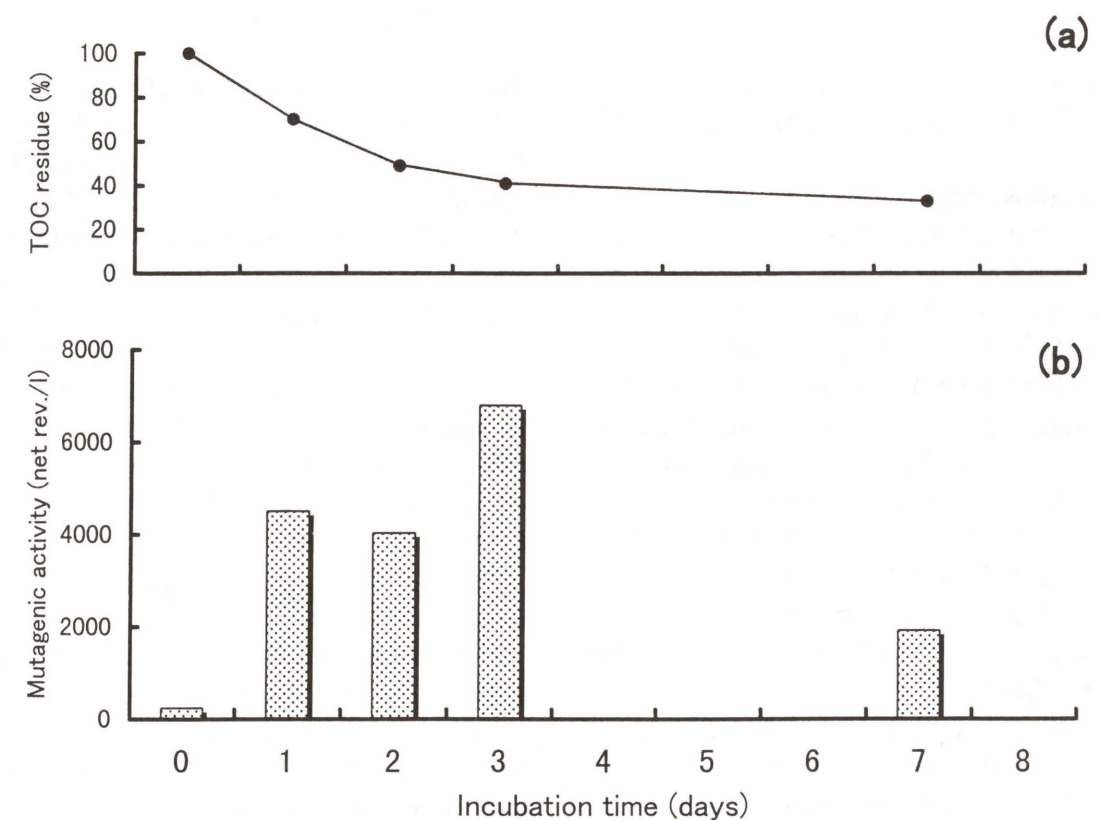


Fig. 5 Time courses of the residue of total organic carbon (TOC) in the culture of sewage bacteria (a) and the formation of mutagenic substances after chlorination of the culture (b)

## 4. 変異原物質生成に及ぼす培養時間の影響

培養時間が、0, 1, 2, 3, 7 日の下水細菌培養液をそれぞれ塩素処理し、その変異原活性から培養過程における変異原前駆物質の生成パターンを検討した。Fig. 5 はその結果である。なお、下水細菌の増殖過程は、TOC の残存率曲線から推測した。

変異原活性は、培養 0 日に比べて培養 1-3 日で約 20-30 倍と、TOC の減少とともに値の増加傾向が認められたことから、この変異原前駆物質は下水細菌の増殖に伴って生成されたものと考えられる。一方、培養 7 日も TOC は 33.4% 残存しており、変異原活性も培養 3 日の 28.3% を示していたことから、この変異原前駆物質



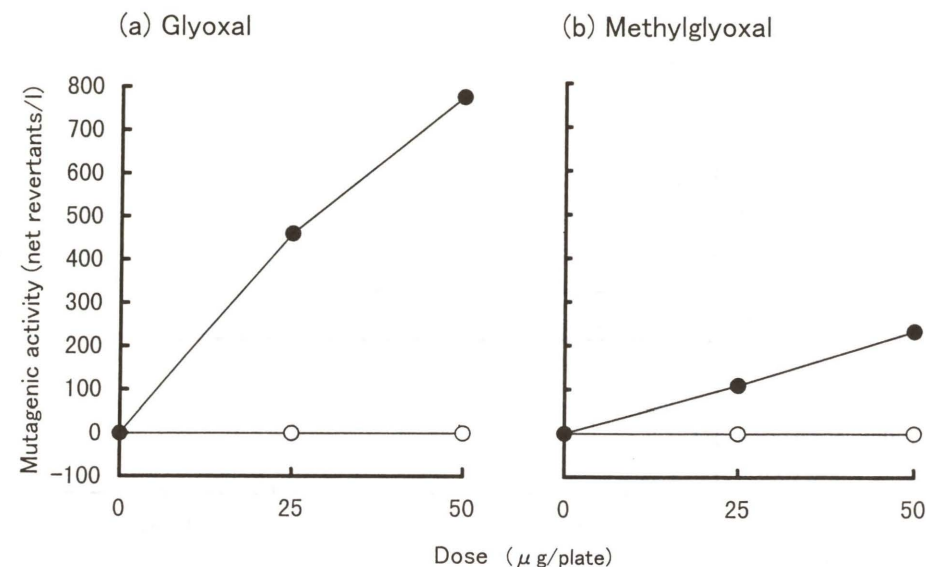


Fig. 6 Mutagenic activity of glyoxal (a) and methylglyoxal (b) in *S. typhimurium* TA98 (○) and TA100 (●) without S9 mix

は、比較的分解されにくい代謝物質か、あるいは常に下水細菌により生成される代謝物質と考えられる。

#### 5. 変異原物質の検討

福井らは活性汚泥処理排水の塩素処理によって生成される変異原物質を検討したところ、その主な変異原物質は Hemming らが報告 (Hemming et al., 1981) したフミン物質を塩素処理した際に生成される MX とは異なる物質で、排水中の有機酸類や carbonyl 化合物が前駆物質である可能性を示唆している (Fukui et al., 1990, 1992)。また福井らは、前駆物質として carbonyl 基を有する代謝物質のケト酸類の塩素処理生成物について変異原活性を調べたが、生活排水の塩素処理液中の変異原活性量を十分に説明できるケト酸類を見出していない。一方、我々が今回報告した変異原物質も実験条件等から判断して、福井らが追跡している変異原物質にきわめて近い物質と考えられる。

一般に塩素処理を行うと塩素の酸化作用によって、水中の有機物から aldehyde 類が生成されることが知られている。そこで、今回我々は前駆物質の同定に先立って、まず変異原物質としての aldehyde 類について検討を行った。低分子の aldehyde 類の中で変異原性を示すものは、formaldehyde, glyoxal および methylglyoxal が知られており、特に glyoxal および methylglyoxal は高い変異原活性を示すと報告されている (上野ら, 1995) 点に注目した。Fig. 6 は、glyoxal および methylglyoxal の *S. typhimurium* TA 100 および TA 98 株に対する変異原性試験の結果である。両物質とも塩基置換型の直接変異原性を示すことが確認された。

Fig. 7 は下水細菌培養液の塩素処理液中に生成される

glyoxal および methylglyoxal の GC/MS 分析の結果である。培養 1 日の下水細菌培養液を塩素処理し、固相抽出により回収した glyoxal および methylglyoxal を PFBOA 誘導体化し、GC/MS で分析したところ、試料中に glyoxal および methylglyoxal の PFBOA 誘導体の存在を認めた。しかしながら Table 2 に示したように、glyoxal および methylglyoxal の生成量はきわめて微量であった。Fig. 6 の結果から、両物質の総変異原活性に対する寄与率は 0.1% 以下と計算され、glyoxal および methylglyoxal が主たる原因物質ではないことは明らかであった。今回の一連の検討では、MX の存在を調べていない。したがって、今後 MX を含めて主要な原因物質をさらに追求する必要がある。

#### 結 語

下水細菌培養液を塩素処理したところ、処理液中に塩基置換型の強い直接変異原性を示す変異物質の存在が認められた。この変異原物質は、下水細菌の一部の細胞内物質が塩素処理されることにより生成され、固相抽出時に ethyl acetate によって特異的に溶出される中極性物質と考えられた。

この変異原物質として、塩素処理によって生成される aldehyde 類に着目し検討を行ったところ、塩素処理液中に高い変異原性を示すことで知られている glyoxal および methylglyoxal の存在を認めた。しかしながら、その生成量から推定される寄与率はきわめて小さく、他の変異原物質の関与が強く示唆された。

以上のように、遺伝毒性を持たない下水細菌の一部の細胞内物質が、塩素処理されることにより遺伝毒性を持った物質に変化するという現象は、安全な飲料水を供給

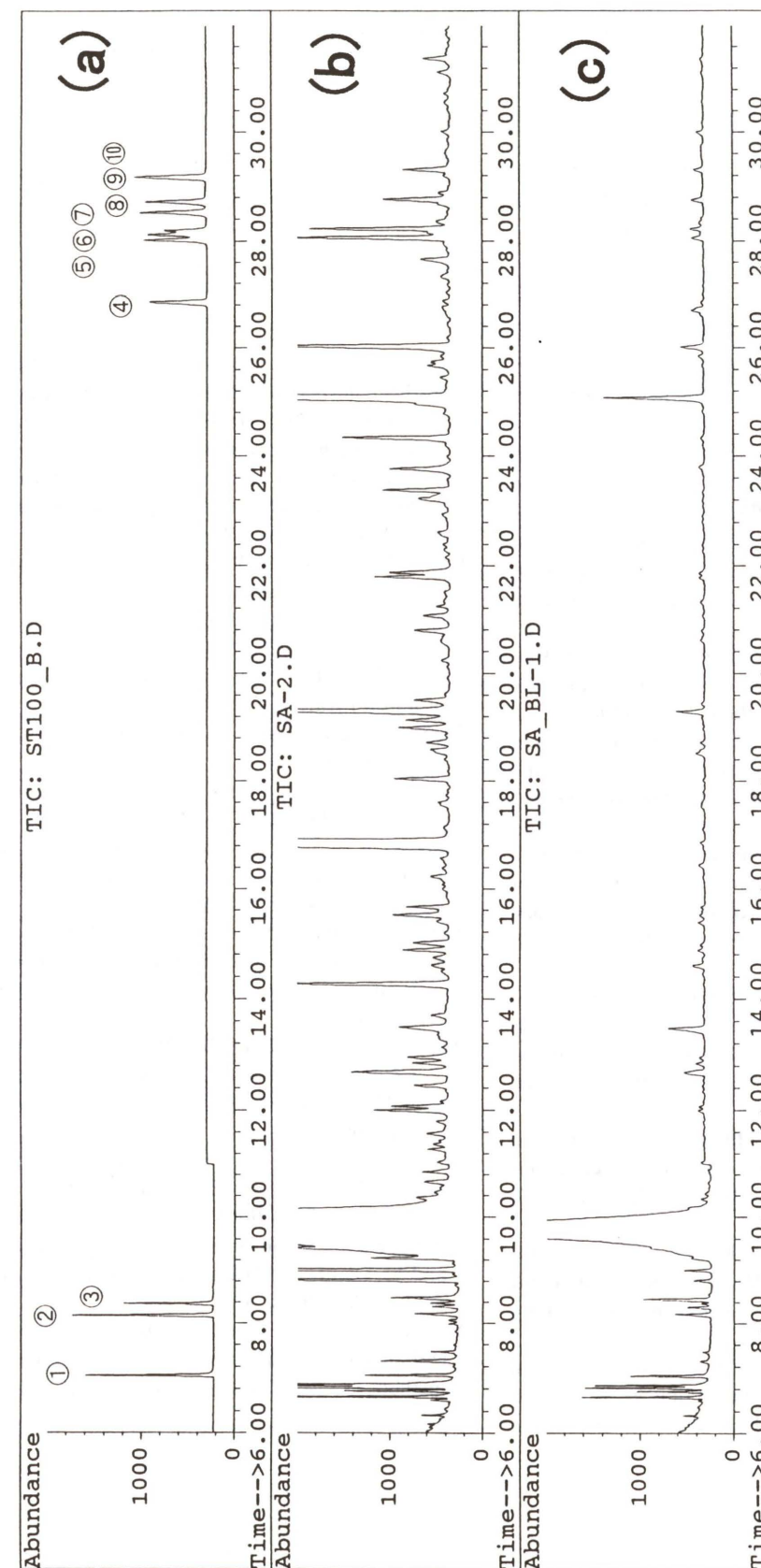


Fig. 7 Formation of glyoxal and methylglyoxal by the chlorination of sewage bacteria culture  
(a) : ion chromatograms of PFBOA derivative standards, (b) : PFBOA derivatives in the chlorinated culture, (c) : PFBOA derivatives in the chlorinated culture without glucose. Glucose was used as a sole source of carbon and energy.  
Number ① : PFBOA glyoxalaldoxime (syn), ② : PFBOA methylglyoxalaldoxime (syn), ③ : PFBOA methylglyoxalaldoxime (anti), ④ : PFBOA methylglyoxalaldoxime (anti/anti), ⑤ : PFBOA glyoxalaldoxime (syn/anti), ⑥ : PFBOA glyoxalaldoxime (syn/syn), ⑦ : PFBOA glyoxalaldoxime (anti/syn), ⑧ : PFBOA methylglyoxalaldoxime (anti/syn), ⑨ : PFBOA methylglyoxalaldoxime (anti/anti), ⑩ : PFBOA methylglyoxalaldoxime (syn/syn)



Table 2 Contribution of mutagenic activity of identified compounds to the total mutagenic activity

Compound	Amount (ng/l)	Mutagenic activity <sup>a</sup> (net revertans/l)	Contribution ratio (%)
Glyoxal	10.6	<1	<0.1
Methylglyoxal	5.8	<1	<0.1
Sum of identified compounds		<1	<0.1
Total activity of ethly acetate extraction		2490	100

<sup>a</sup>The amount of mutagenic activity derived from glyoxal or methylglyoxal was estimated from the calibration curve of Fig. 6

する立場にある水道にとって、きわめて重大な問題であり、原因となる物質の同定および生成機構の解明は、急務と考える。

### 参考文献

- Fallon, R. D. and C. B. Fliermans (1980) Formation of non-volatile mutagen by water chlorination: persistence and relationship to molecular weight of organic materials in water, *Chemosphere*, 9, 385-391.
- Fukui, S., Y. Yoshimura, S. Ogawa and Y. Hanazaki (1990) Formation of non-volatile potent mutagens in domestic sewage by chlorination, *Chemosphere*, 21, 705-716.
- Fukui, S., S. Ogawa, H. Kita, Y. Hanazaki and H. Kami (1992) 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in chlorinated domestic sewage, *Chemosphere*, 24, 927-934.
- Harimoto, T., S. Shindo and H. Yamada (1997) The determination of glyoxal and methylglyoxal in water: study of reaction between glyoxal/methylglyoxal and o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine, *Proceedings of 13th ozone world congress*, 105-108.
- Hemming, J., B. Holombom, M. Reunanen and L. Kronberg (1981) Determination of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in the chlorinated drinking and humic waters, *Chemosphere*, 15, 549-556.
- Itoh, S., S. Naito and T. Unemoto (1985) Acetoacetic acid as a potential tri-halomethane precursor in the biodegradation intermediates produced by sewage bacteria, *Water Res.*, 19, 1305-1309.
- Kinae, N. C. Sugiyama, Y. Nasuda, K. Goto, K. Tokumoto, M. Furugori and K. Shimoi (1992) Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water, *Wat. Sci. Tech.*, 25, 333-340.
- Kronberg, L. and T. Vartiainen (1988) Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomer E-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxo-butenic acid in chlorine-treated tap water, *Mutat. Res.*, 206, 177-182.
- Loper, J. C. (1980) Mutagenic effects of organic compounds in drinking water, *Mutat. Res.*, 76, 241-268.
- Oliver, B. G. and J. Lawrence (1979) Haloforms in drinking water: a study of precursors and precursor removal, *J. Am. Wat. Wks. Ass.*, 71, 161-163.
- Oliver, B. G. and S. A. Visser (1980) Chloroform production from the chlorination of aquatic humic material: the effect of molecular weight, environment and season, *Water Res.*, 14, 1137-1141.
- Rook, J.J. (1974) Formation of haloforms during chlorination of natural waters, *J. Wat. Treat. Exam.*, 23, 234-243.
- Rook, J.J. (1976) Haloforms in drinking water, *J. Am. Wat. Wks. Ass.*, 68, 168-172.
- 下位香代子, 富田 勲 (1991) 生活環境中の変異原及び抗変異原, 衛生化学, 37: 149-178.
- Stevens, A. A., C. J. Slocum, D. R. Seeger and G. G. Robeck (1976) Chlorination of organics in drinking water, *J. Am. Wat. Wks. Ass.*, 68, 615-620.
- Suzuki, N. and J. Nakanishi (1990) The determination of strong mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in drinking water in Japan, *Chemosphere*, 21, 387-392.
- 上野 仁, 中室克彦, 佐谷戸安好 (1995) オゾン処理生成物としてのグリオキサル誘導体の代謝分解性, ラット肝細胞に対するDNA損傷性および浄水処理過程における消長, 水環境学会誌, 18: 961-968.
- Vartiainen, T. and A. Liimatainen (1986) High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland, *Mutat. Res.*, 167, 29-34.
- Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*, *Mutat. Res.*, 48, 121-130.
- Yamada, H. and I. Somiya (1989) The determination of carbonyl compounds in ozonated water by the PFBOA method, *Ozone Sci. & Eng.*, 11, 127-141.

## Muta<sup>TM</sup>Mouse *lacZ* 導入遺伝子の塩基配列

筒井 美枝<sup>1</sup>, 築館 一男<sup>1</sup>, 羽倉 昌志<sup>2</sup>

<sup>1</sup>エーザイ(株)安全性研究所 筑波安全性研究室 〒300-2635 茨城県つくば市東光台 5-1-3

<sup>2</sup>エーザイ(株)安全性研究所 川島安全性研究部 〒501-6195 岐阜県羽島郡川島町竹早町 1

### Sequence of the *lacZ* transgene of the Muta<sup>TM</sup>Mouse

Yoshie Tsutsui<sup>1</sup>, Kazuo Tsukidate<sup>1</sup>, Atsushi Hakura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Drug Safety Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.

1-3 Tokodai, 5-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-2635

<sup>2</sup>Drug Safety Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.

1 Takehaya, Kawashima-cho, Hashima, Gifu 501-6195

### Summary

The nucleotide sequence of the *lacZ* transgene of the *lacZ* transgenic mouse strain (Muta<sup>TM</sup> Mouse, 40.6) has been determined. The *lacZ* transgene has 15 base-pair (bp) of an insertion of 5'-AA TTC CCG GGG ATC C-3' between the 25th and 26th nucleotides of the complete original *E. coli lacZ* gene demonstrated on the Big Blue Website of the internet, which is based on the report of Kalnins et al. (1983), resulting in 3087 bp. The *lacZ* transgene also carries mutations of three base-pair substitutions of A to G at the 312th, T to C at the 573rd, and C to A at the 3024th bp of the original *E. coli lacZ* gene. The nucleotide number of the transgene determined in this study is inconsistent with the 3126 bp and 3096 bp as reported by Gossen et al. (1989), and by Vijg and Douglas (1996), respectively.

**Keywords:** Muta<sup>TM</sup>Mouse, *lacZ* transgenic mouse, *lacZ* gene, DNA sequence

### 緒 言

トランスジェニックマウスを用いる *in vivo* 突然変異検出系は、臓器特異的に遺伝子突然変異を検出するのに有用な系であることが認識されつつある (Gossen et al., 1989; Kohler et al., 1991; Gorelick and Mirsalis, 1996; Heddle and Swiger, 1996; Hakura et al., 1998). 大腸菌 *lacZ* 遺伝子のリプレッサー遺伝子である *lacI* 遺伝子が標的遺伝子として組み込まれた Big Blue<sup>TM</sup> (Kohler et al., 1991), あるいは大腸菌の  $\beta$ -galactosidase の構造遺伝子である *lacZ* 遺伝子が組み込まれた Muta<sup>TM</sup> Mouse (Gossen et al., 1989) などを含め、現在いくつかの系統のトランスジェニックマウスが開発されている。

40.6 系 Muta<sup>TM</sup> Mouse には、*E. coli* 由来の *lacZ* 遺伝子がすべての細胞に約 80 コピーずつ導入されていると報告されている (Gossen et al., 1989). *lacZ* 遺伝子は全長約 3 kbp で塩基配列を調べるにはやや長いものの、回収した変異プラークの塩基配列の解析をすることにより、突然変異の分析を行うことが可能である。

そこで私たちは、変異体の塩基配列の解析を行うための基礎データとして、Muta<sup>TM</sup> Mouse に導入されている *lacZ* 導入遺伝子のオリジナルの塩基配列の解析を行った。その結果、*lacZ* 導入遺伝子には Kalnins ら (1983) によって報告されている大腸菌 *lacZ* 遺伝子に 15 塩基対が挿入されていることに加えて、点突然変異が 3 ヶ所で起きていることを確認した。

### 実験材料および方法

#### 1. 材 料

雄性 Muta<sup>TM</sup> Mouse (40.6 系) は、Hazleton Research Products 社 (Denver, PA) から購入し、7 週齢で 1996

受付: 1998 年 9 月 25 日

受理: 1998 年 11 月 9 日

©日本環境変異原学会



Table 1 Oligonucleotides used for *lacZ* amplification and sequencing

Primer	Sequence	Location <sup>a</sup>
gt10Fw <sup>b</sup>	5'-GAC TGC TGG GTA GTC CCC ACC TTT-3'	
gt10Rv <sup>b</sup>	5'-TGG CTT ATG ATT TCT TCC AGG GTA-3'	
P1 <sup>c</sup>	5'-GGC GAG CGA TAC ACC GCA TCC-3'	2634-2654
P2 <sup>d</sup>	5'-TGC TGT TGA CTG TAG CGG CTG-3'	2895-2915
P3 <sup>d</sup>	5'-GGA TGC GGT GTA TCG CTC GCC-3'	2634-2654
P4 <sup>d</sup>	5'-CGC CAA TCC ACA TCT GTG-3'	2315-2332
P5 <sup>d</sup>	5'-CGC GTT CGG TTG CAC TAC GC-3'	2114-2133
P6 <sup>d</sup>	5'-TGG ATG CGG CGT GCG GTC-3'	1846-1863
P7 <sup>d</sup>	5'-CTT CAT CCA CGC GCG CGT AC-3'	1524-1543
P8 <sup>d</sup>	5'-CGC CGG TAG CCA GCG CGG-3'	1306-1323
P9 <sup>d</sup>	5'-AGC GTG CCG TCG GCG GTG T-3'	965-983
P10 <sup>d</sup>	5'-ATG CCG CTC ATC CGC CAC-3'	624-641
P11 <sup>d</sup>	5'-GTG TAG ATG GGC GCA TCG-3'	303-320
P13 <sup>c</sup>	5'-AAT GTG TGG AAT TGT GAG-3'	-47 to -30
P14 <sup>c</sup>	5'-TAC ACG CTG TGC GAC CGC-3'	1213-1230
P15 <sup>c</sup>	5'-AGG CCA GAC GCG AAT TAT-3'	426-443
P16 <sup>c</sup>	5'-CCA GCG GCA CCG CGC CTT-3'	821-838
P17 <sup>c</sup>	5'-TTG CGA ATA CGC CCA CGC-3'	1623-1640
P18 <sup>c</sup>	5'-CTC TGG ATG TCG CTC CAC-3'	2024-2041
P19 <sup>c</sup>	5'-CAC AGA TGT GGA TTG GCG-3'	2315-2332

<sup>a</sup> The A in the AGT at the start of the *lacZ* coding sequence (5'-3') is given nucleotide position 1

<sup>b</sup> Primers used for *lacZ* amplification

<sup>c</sup> Primers used for sequencing the leading DNA strand

<sup>d</sup> Primers used for sequencing the lagging DNA strand

年2月8日に入手した。

2例の Muta<sup>TM</sup>Mouse の肝臓由来ファージおよび4例のマウスから無作為に拾った前胃、脾臓、大腸および腺胃由来のファージについて調べた。

## 2. 方法

### 1) *lacZ* 導入遺伝子の増幅

15 mM MgCl<sub>2</sub> を添加した Expand HF buffer (Boehringer Mannheim) を 5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP-mixture (宝酒造) を 4  $\mu$ l, 10 mM プライマー (gt 10 Fw および gt 10 Rv, Table 1) をそれぞれ 1  $\mu$ l, 7  $\mu$ M TaqStart<sup>TM</sup> 抗体 (Clontech Laboratories) を 0.5  $\mu$ l, Expand<sup>TM</sup> Long Terminator PCR System (Boehringer Mannheim) を 0.5  $\mu$ l および滅菌蒸留水 34  $\mu$ l を混合した溶液の 23  $\mu$ l と Muta<sup>TM</sup>Mouse の臓器から回収し、変異体でないことを確認した精製  $\lambda$ gt 10 *lacZ* ファージ溶液 2  $\mu$ l とを混合し、Perkin Elmer Gene Amp PCR system 9600 (Perkin Elmer) を用いて 94°C 3 分後、94°C 30 秒、68°C 3 分を 35 サイクルさせるプログラムで約 3 kbp の *lacZ* 導入遺伝子を増幅させた。得られた *lacZ* 導入遺伝子は QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) を用いて精製した。

### 2) DNA 解析

DNA 解析のため、増幅した約 3 kbp の *lacZ* 導入遺伝子 DNA を 8  $\mu$ l と、4  $\mu$ l の適当なプライマー (Table 1) および dRhodamine terminator cycle sequencing

ready reaction kit (Applied Biosystems) を 8  $\mu$ l 混合し、TAKARA PCR thermal Cycler MP (TP 3000: 宝酒造) を用いて、96°C 3 分後、96°C 30 秒、50°C 15 秒、60°C 4 分を 25 サイクル、60°C 7 分のプログラムで PCR を行った。MicroSpin S-200 HR (Pharmacia) を用いて精製し、乾燥させた PCR 産物を loading buffer 6  $\mu$ l に溶解した。この DNA 溶液約 2  $\mu$ l を 3% ポリアクリルアミドゲルに添加し、ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 DNA Sequencer (ABI) を用いて、泳動電圧 1680 V で 10 時間電気泳動した。塩基配列は ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 collection sequencing analysis Ver. 3.0 (ABI) および、Genetyx Ver. 8.0 (Software Development) で解析した。

相補鎖の塩基配列についても同様に解析を行い確認した。

## 結果および考察

Fig. 1 に Muta<sup>TM</sup> Mouse (40.6 系) に導入されていた *lacZ* 導入遺伝子についての塩基配列を示した。ここではヌクレオチド番号付けを、開始コドン 5'-ATG-3' の A から開始した。

その結果、*lacZ* 導入遺伝子は、Kalnins ら (1983) の報告と彼らの報告をもとにしたインターネットの The Big Blue Website (<http://darwin.ceh.uvic.ca/bigblue/lacZ-seq.htm>) で報告されている大腸菌 *lacZ* 遺伝子 (総塩基数: 3072 bp) 中の 25 番目と 26 番目の間に 5'-AA TTC CCG GGG ATC C-3' の 15 bp の塩基が挿入さ

	M	T	M	I	T	D	S	L	E	F	P	G	I	P	V	V	L	Q	R
1	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	GAT	TCA	CTG	GAA	TTC	CCG	GGG	ATC	CCC	GTC	GTT	TTA	CAA	CGT
58	R	D	W	E	N	P	G	V	T	Q	L	N	R	L	A	A	H	P	P
	CGT	GAC	TGG	GAA	AAC	CCT	GGC	GTT	ACC	CAA	CTT	AAT	CGC	CTT	GCA	GCA	CAT	CCC	CCT
115	F	A	S	W	R	N	S	E	E	A	R	T	D	R	P	S	Q	Q	L
	TTC	GCC	AGC	TGG	CGT	AAT	AGC	GAA	GAG	GCC	CGC	ACC	GAT	CGC	CCT	TCC	CAA	CAG	TTG
172	R	S	L	N	G	E	W	R	F	A	W	F	P	A	P	E	A	V	P
	CGC	AGC	CTG	AAT	GGC	GAA	TGG	CGC	TTT	GCC	TGG	TTT	CCG	GCA	CCA	GAA	GCG	GTG	CCG
229	E	S	W	L	E	C	D	L	P	E	A	D	T	V	V	P	S	N	
	GAA	AGC	TGG	CTG	GAG	TGC	GAT	CTT	CCT	GAG	GCC	GAT	ACT	GTC	GTC	GTC	CCC	TCA	AAC
286	W	Q	M	H	G	Y	D	A	P	I	Y	T	N	V	T	Y	P	I	T
	TGG	CAG	ATG	CAC	GGT	TAC	GAT	GCG	CCC	ATC	TAC	ACC	AAC	GTG	ACC	TAT	CCC	ATT	ACG
343	V	N	P	P	F	V	P	T	E	N	P	T	G	C	Y	S	L	T	F
	GTC	AAT	CCG	CCG	TTT	GTT	CCC	ACG	GAG	AAT	CCG	ACG	GGT	TGT	TAC	TCG	CTC	ACA	TTT
400	N	V	D	E	S	W	L	Q	E	G	Q	T	R	I	I	F	D	G	V
	AAT	GTT	GAT	GAA	AGC	TGG	CTA	CAG	GAA	GGC	CAG	ACG	CGA	ATT	ATT	TTT	GAT	GGC	GTT
457	N	S	A	F	H	L	W	C	N	G	R	W	V	G	Y	G	Q	D	S
	AAC	TCG	GCG	TTT	CAT	CTG	TGG	TGC	AAC	GGG	CGC	TGG	GTC	GGT	TAC	GGC	CAG	GAC	AGT
514	R	L	P	S	E	F	D	L	S	A	F	L	R	A	G	E	N	R	L
	CGT	TTG	CCG	TCT	GAA	TTT	GAC	CTG	AGC	GCA	TTT	TTA	CGC	GCC	GGA	GAA	AAC	CGC	CTC
571	A	V	M	V	L	R	W	S	D	G	S	Y	L	E	D	Q	D	M	W
	GCG	GTG	ATG	GTG	CTG	CGC	TGG	AGT	GAC	GGC	AGT	TAT	CTG	GAA	GAT	CAG	GAT	ATG	TGG
628	R	M	S	G	I	F	R	D	V	S	L	L	H	K	P	T	T	Q	I
	CGG	ATG	AGC	GGC	ATT	TTC	CGT	GAC	GTC	TCG	TTG	CTG	CAT	AAA	CCG	ACT	ACA	CAA	ATC
685	S	D	F	H	V	A	T	R	F	N	D	D	F	S	R	A	V	L	E
	AGC	GAT	TTC	CAT	GTT	GCC	ACT	CGC	TTT	AAT	GAT	GAT	TTC	AGC	CGC	GCT	GTA	CTG	GAG
742	A	E	V	Q	M	C	G	E	L	R	D	Y	L	R	V	T	V	S	L
	GCT	GAA	GTT	CAG	ATG	TGC	GGC	GAG	TTG	CGT	GAC	TAC	CTA	CCG	GTA	ACA	GTT	TCT	TTA
799	W	Q	G	E	T	Q	V	A	S	G	T	A	P	F	G	G	E	I	I
	TGG	CAG	GGT	GAA	ACG	CAG	GTC	GCC	AGC	GGC	ACC	GCG	CCT	TTC	GGC	GGT	GAA	ATT	ATC
856	D	E	R	G	G	Y	A	D	R	V	T	L	R	L	N	V	E	N	P
	GAT	GAG	CGT	GGT	GGT	TAT	GCC	GAT	CGC	GTC	ACA	CTA	CGT	CTG	AAC	GTC	GAA	AAC	CCG
913	K	L	W	S	A	E	I	P	N	L	Y	R	A	V	E	L	H	T	
	AAA	CTG	TGG	AGC	GCC	GAA	ATC	CCG	AAT	CTC	TAT	CGT	GCG	GTG	GTT	GAA	CTG	CAC	ACC
970	A	D	G	T	L	I	E	A	E	A	C	D	V	G	F	R	E	V	R
	GCC	GAC	GGC	ACG	CTG	ATT	GAA	GCA	GAA	GCC	TGC	GAT	GTC	GGT	TTC	CGC	GAG	GTG	CCG
1027	E	I	N	G	L	L	L	L	N	G	K	P	L	L	I	R	G	V	N
	ATT	GAA	AAT	GGT	CTG	CTG	CTG	CTG	AAC	GGC	AAG	CCG	TTG	CTG	ATT	CGA	GGC	GTT	AAC
1084	R	H	E	H	H	P	L	H	G	Q	V	M	D	E	Q	T	M	V	Q
	CGT	CAC	GAG	CAT	CAT	CCT	CTG	CAT	GGT	CAG	GTC	ATG	GAT	GAG	CAG	ACG	ATG	GTG	CAG
1141	D	I	L	L	M	K	Q	N	N	F	N	A	V	R	C	S	H	Y	P
	GAT	ATC	CTG	CTG	ATG	AAG	CAG	AAC	AAC	TTT	AAC	GCC	GTG	CGC	TGT	TCG	CAT	TAT	CCG
1198	N	H	P	L	W	Y	T	L	C	D	R	Y	G	L	Y	V	V	D	E
	AAC	CAT	CCG	CTG	TGG	TAC	ACG	CTG	TGC	GAC	CGC	TAC	GGC	CTG	TAT	GTG	GTG	GAT	GAA
1255	A	N	I	E	T	H	G	M	V	P	M	N	R	L	T	D	D	P	R
	GCC	AAT	ATT	GAA	ACC	CAC	GGC	ATG	GTG	CCA	ATG	AAT	CGT	CTG	ACC	GAT	GAT	CCG	CCG
1312	W	L	P	A	M	S	E	R	V	T	R	M	V	Q	R	D	R	N	H
	TGG	CTA	CCG	GCG	ATG	AGC	GAA	CGC	GTA	ACG	CGA	ATG	GTG	CAG	CGC	GAT	CGT	AAT	CAC
1369	P	S	V	I	I	W	S	L	G	N	E	S	G	H	G	A	N	H	D
	CCG	AGT	GTG	ATC	ATC	TGG	TCG	CTG	GGG	AAT	GAA	TCA	GGC	CAC	GGC	GCT	AAT	CAC	GAC
1426	A	L	Y	R	W	I	K	S	V	D	P	S	R	P	V	Q	Y	E	G
	GCG	CTG	TAT	CGC	TGG	ATC	AAA	TCT	GTC	GAT	CCT	TCC	CGC	CCG	GTG	CAG	TAT	GAA	GGC
1483	G	G	A	D	T	A	T	D	I	I	C	P	M	Y	A	R	V	D	
	GGC	GGA	GCC	GAC	ACC	ACG	GCC	ACC	GAT	ATT	ATT	TGC	CCG	ATG	TAC	GCG	GCG	GTG	GAT
1540	E	D	Q	P	F	P	A	V	P	K	W	S	I	K	K	W	L	S	L
	GAA	GAC	CAG	CCC	TTC	CCG	GCT	GTG	CCG	AAA	TGG	TCC	ATC	AAA	AAA	TGG	CTT	TCG	CTA
1597	P	G	E	T	R	P	L	I	L	C	E	Y	A	H	A	M	G	N	S
	CCT	GGA	GAG	ACG	CGC	CCG	CTG	ATC	CTT	TGC	GAA	TAC	GCC	CAC	GCG	ATG	GGT	AAC	AGT
1654	L	G	G	F	A	K	Y	W	Q	A	F	R	Q	Y	P	R	L	Q	G
	CTT	GGC	GGT	TTC	GCT	AAA	TAC	TGG	CAG	CGC	TTT	CGT	CAG	TAT	CCC	CGT	TTA	CAG	GGC
1711	G	F	V	W	D	W	V	D	Q	S	L	I	K	Y	D	E	N	G	N
	GGC	TTC	GTC	TGG	GAC	TGG	GTG	GAT	CAG	TCG	CTG	ATT	AAA	TAT	GAT	GAA	AAC	GGC	AAC
1768	P	W	S	A	Y	G	G	D	F	G	D	T	P	N	D	R	Q	F	C
	CCG	TGG	TCG	GCT	TAC	GGC	GGT	GAT	TTT	GGC	GAT	ACT	CCG	AAC	GAT	CGC	CAG	TTC	TGT
1825	M	N	G	L	V	F	A	D	R	T	P	H	P	A	L	T	E	A	K
	ATG	AAC	GGT	CTG	GTC	TTT	GCC	AGC	CGC	ACG	CCG	CAT	CCA	GCG	CTG	ACG	GAA	GCA	AAA
1882	H	Q	Q	Q	F	F	Q	F	R	L	S	G	Q	T	I	E	V	T	S
	CAC	CAG	CAG	CAG	TTT	TTC	CAG	TTC	CGT	TTA	TCC	GGG	CAA	ACC	ATC	GAA	GTG	ACC	AGC
1939	E	Y	L	F	R	H	S	D	N	E	L	L	H	W	M	V	A	L	D
	GAA	TAC	CTG	TTC	CGT	CAT	AGC	GAT	AAC	GAG	CTC	CTG	CAC	TGG	ATG	GTG	GCG	CTG	GAT
1996	G	K	P	L	A	S	G	E	V	P	L	D	V	A	P	Q	G	K	Q
	GGT	AAG	CCG	CTG	GCA	AGC	GGT	GAA	GTG	CCT	CTG	GAT	GTC	GCT	CCA	CAA	GGT	AAA	CAG
2053	L	I	E	L	P	E	L	P	Q	P	E	S	A	G	Q	L	W	L	T
	TTG	ATT	GAA	CTG	CCT	GAA	CTA	CCG	CAG	CCG	GAG	AGC	GCC	GGG	CAA	CTC	TGG	CTC	ACA
2110	V	R	V	V	Q	P	N	A	T	A	W	S	E	A	G	H	I	S	A
	GTA	CGC	GTA	GTG	CAA	CCG	AAC	GCG	ACC	GCA	TGG	TCA	GAA	GCC	GGG	CAC	ATC	AGC	GCC
2167	W	Q	Q	W	R	L	A	E	N	L	S	V	T	L	P	A	A	S	H
	TGG	CAG	CAG	TGG	CGT	CTG	GCG	GAA	AAC	CTC	AGT	GTG	ACG	CTC	CCC	GCC	GCG	TCC	CAC
2224	A	I	P	H	L	T	T	S	E	M	D	F	C	I	E	G	N	K	
	GCC	ATC	CCG	CAT	CTG	ACC	ACC	AGC	GAA	ATG	GAT	TTT	TGC	ATC	GAG	CTG	GGT	AAT	AAG
	R	W	Q	F	N	R	Q	S	G	F	L	S	Q	M	W	I	G	D	K



2281 CGT TGG CAA TTT AAC CGC CAG TCA GGC TTT CTT TCA CAG ATG TGG ATT GGC GAT AAA  
 K Q L L T P L R D Q F T R A P L D N D  
 2338 AAA CAA CTG CTG ACG CCG CTG CGC GAT CAG TTC ACC CGT GCA CCG CTG GAT AAC GAC  
 I G V S E A T R I D P N A W V E R W K  
 2395 ATT GGC GTA AGT GAA GCG ACC CGC ATT GAC CCT AAC GCC TGG GTC GAA CGC TGG AAG  
 A A G H Y Q A E A A L L Q C T A D T L  
 2452 GCG GCG GGC CAT TAC CAG GCC GAA GCA GCG TTG TTG CAG TGC ACG GCA GAT ACA CTT  
 A D A V L I T T A H A W Q H Q G K T L  
 2509 GCT GAT GCG GTG CTG ATT ACG ACC GCT CAC GCG TGG CAG CAT CAG GGG AAA ACC TTA  
 F I S R K T Y R I D G S G Q M A I T V  
 2566 TTT ATC AGC CGG AAA ACC TAC CGG ATT GAT GGT AGT GGT CAA ATG GCG ATT ACC GTT  
 D V E V A S D T P H P A R I G L N C Q  
 2623 GAT GTT GAA GTG GCG AGC GAT ACA CCG CAT CCG GCG CGG ATT GGC CTG AAC TGC CAG  
 L A Q V A E R V N W L G L G P Q E N Y  
 2680 CTG GCG CAG GTA GCA GAG CCG GTA AAC TGG CTC GGA TTA GGG CCG CAA GAA AAC TAT  
 P D R L T A A C F D R W D L P L S D M  
 2737 CCC GAC CGC CTT ACT GCC GCC TGT TTT GAC CGC TGG GAT CTG CCA TTG TCA GAC ATG  
 Y T P Y V F P S E N G L R C G T R E L  
 2794 TAT ACC CCG TAC GTC TTC CCG AGC GAA AAC GGT CTG CGC TGC GGG ACG CGC GAA TTG  
 N Y G P H Q W R G D F Q F N I S R Y S  
 2851 AAT TAT GGC CCA CAC CAG TGG CGC GGC GAC TTC CAG TTC AAC ATC AGC CGC TAC AGT  
 Q Q L M E T S H L L H A E E G T  
 2908 CAA CAG CAA CTG ATG GAA ACC AGC CAT CGC CAT CTG CTG CAC GCG GAA GAA GGC ACA  
 W L N I D G F H M G I G G D D S Q S P  
 2965 TGG CTG AAT ATC GAC GGT TTC CAT ATG GGG ATT GGT GGC GAC TCC TGG AGC CCG  
 S V S A E L Q L S A G R Y H Y Q L N W  
 3022 TCA GTA TCG GCG GAA TTA CAG CTG AGC GCC GGT CGC TAC CAT TAC CAG TTG GTC TGG  
 C Q K \*\*\*  
 3079 TGT CAA AAA TAA

Fig. 1 Nucleotide sequence of the *lacZ* transgene of the Muta<sup>TM</sup>Mouse (strain 40.6) and of its product  $\beta$ -galactosidase. The A in the AGT at the start of the *lacZ* coding sequence (5'-3') is given nucleotide position 1. The nucleotide number of the *lacZ* transgene is 3087 base-pair (bp)s, which includes an insertion of 15 bp between 25th and 26th nucleotides of the complete original *E. coli lacZ* gene demonstrated on the Big Blue Website of the Internet, which is based on the report of Kalnins et al. (EMBO J., 2, 593-597, 1983). The *lacZ* transgene also carries three base-pair substitution mutation of A to G at the 312th, T to C at the 573rd, and C to A at the 3024th of the original *E. coli lacZ* gene. These mutations are indicated by square boxes

れており、総塩基数は3087 bpであった。また、*lacZ* 導入遺伝子は大腸菌 *lacZ* 遺伝子の312番目のAがGに、573番目のTがCに、さらに3024番目のCがAに置換していた(Fig. 1)。なお、312番目および573番目の塩基置換により、アミノ酸変化は生じなかったが、3024番目の塩基置換により、フェニルアラニンからロイシンへのアミノ酸変化が起きていた。調べたファージは2例のMuta<sup>TM</sup>Mouseの肝臓由来のものおよび4例のマウスから無作為に拾った前胃、脾臓、大腸および膵胃由来のものであり、これらのファージの*lacZ* 導入遺伝子はすべて同じ塩基配列であったことから、この塩基配列はMuta<sup>TM</sup>Mouseの1例のみに認められた事象ではないと考えられる。これらの塩基置換変異は、初代のMuta<sup>TM</sup>Mouseが持っていた可能性以外に継代の過程で変異(3ヵ所の塩基置換)が蓄積した可能性も考えられる。

Muta<sup>TM</sup>Mouseに組み込まれている大腸菌由来*lacZ* 導入遺伝子は $\lambda$ phage由来ベクターである $\lambda$ gt 10の*EcoRI* siteの間に組み込まれており、その総塩基数は3126 bpであるとのGossenらの報告(1989)や、3096 bpであるとのVijgとDouglasの報告(1996)もある。これらの文献には塩基配列の詳細が記述されていないため、総塩基数が私たちとの結果と一致しない理由については不明である。

しかし、Muta<sup>TM</sup>Mouse(40.6系)に導入されていた大

腸菌*lacZ* 導入遺伝子はオリジナルの大腸菌*lacZ* 遺伝子の塩基配列とは異なっているものの、明らかな $\beta$ -galactosidase活性を示していたことから*in vivo*突然変異検出系におけるレポーター遺伝子として機能するには特に問題はないものと考えられる。

## 謝 辞

エーザイ(株)筑波研究所の相根康司氏に種々の有益な技術的助言を得たことに対して感謝します。

## 参考文献

- Gorelick, N.J. and J.C. Mirsalis (1996) A strategy for the application of transgenic rodent mutagenesis assays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 434-442.
- Gossen, J.A., W.J.F. de Leeuw, C.H.T. Tan, P. H. M. Lohman, F. Berends, D. L. Knook, E. C. Zwarthoff and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: A model for studying mutations *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7971-7975.
- Hakura, A., Y. Tsutsui, J. Sonoda, J. Kai, T. Imade, M. Shimada, Y. Sugihara and T. Mikami (1998) Comparison between *in vivo* mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[a]pyrene in the *lacZ* transgenic mouse (Muta<sup>TM</sup>Mouse), *Mutat. Res.*, 309, 123-130.
- Heddle, J. A. and R. R. Swiger (1996) Risk estimation from somatic mutation assays, *Mutat. Res.*, 365, 107-117.
- Kalnins, A., K. Otto, U. Rüher and B. Müller-Hill (1983)

Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*, *EMBO J.*, 2, 593-597.

Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, J. A. Sorge, D. L. Putman and J. M. Short (1991) Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lacI* gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 88, 7958-7962.

Vijg, J. and G.R. Douglas (1996) Bacteriophage lamda and plasmid *lacZ* transgenic mice for studying mutations *in vivo*, In: G.P. Pfeifer (Ed), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, Plenum Press, New York, pp.391-410.



本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデル DNA 損傷と変異機構」(企画: 根岸和雄, 早津彦哉)で発表された (座長: 須藤鎮世)

## DNA 付加体, 突然変異と発がん

長尾 美奈子<sup>1</sup>, 牛島 俊和<sup>2</sup>, 大河内 江里子<sup>2</sup>, 落合 雅子<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学応用生物科学部 〒156-0054 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1-1

<sup>2</sup>国立がんセンター研究所発がん研究部, <sup>3</sup>同 生化学部 〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

### Relationships between DNA adduct levels, mutant frequency and carcinogenicity

Minako Nagao<sup>1</sup>, Toshikazu Ushijima<sup>2</sup>, Eriko Okochi<sup>2</sup>  
and Masako Ochiai<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Nutrition and Health, Department of Biosciences, Tokyo University of Agriculture  
1-1-1, Sakuragaoka, Setagayaku, Tokyo, 156-0054

<sup>2</sup>Carcinogenesis Division and <sup>3</sup>Biochemistry Division,  
National Cancer Center Research Institute  
1-1, Tsukiji 5, Chuo-ku, Tokyo 104-0045

### Summary

Relationships between DNA adduct levels, mutant frequency and carcinogenicity were studied using a food mutagen/carcinogen, MeIQ, to which humans are exposed on a daily basis. There was no direct correlation between adduct levels and mutant frequencies in various organs (heart, liver, colon, forestomach and bone marrow) of Big Blue mice (C57BL/6N) after administration of MeIQ for 12 weeks at a concentration of 300 ppm in diet. Further, we found no direct correlation between mutant frequency and carcinogenicity in various organs in the same animals (which are sensitive to colon carcinogenesis) after feeding of MeIQ for 92 weeks; mutant frequency was highest in the colon among the 5 organs examined, but cancer incidence was highest in the liver. In the colon, mutations occurring in the stem cells of crypts are considered to be amplified 200-300 fold, however, no such amplification is present in the liver. The kinetics of mutant cell-turnover seems to be different in different tissues. This may be an important factor for the absence of a direct correlation between mutant frequency and carcinogenicity.

(This paper, chaired by Shizuyo Sutou, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

**Keywords:** ヘテロサイクリックアミン, 遺伝子毒性発がん物, DNA-付加体, <sup>32</sup>P-ポストラベル法, MeIQ, *in vivo* 突然変異, AαC, IQ, MeIQx, 突然変異スペクトル, *Apc*, *p53*, PhIP

### 緒 言

遺伝子毒性発がん物質 (genotoxic carcinogen) によ

る発がんの過程では, まず DNA 付加体が生成され, その一部は突然変異として固定される. その変異によりがん遺伝子等の活性化が起こり, また, がん抑制遺伝子等の不活性化が起こると, 細胞は腫瘍形成能を獲得する. したがって, 突然変異頻度は, DNA 付加体レベルより発がん標的臓器との相関が高い, すなわち突然変異頻度の高い臓器こそが発がん標的臓器であろうと誰しも容易に想

受付: 1998 年 9 月 17 日

受理: 1998 年 11 月 28 日

©日本環境変異原学会



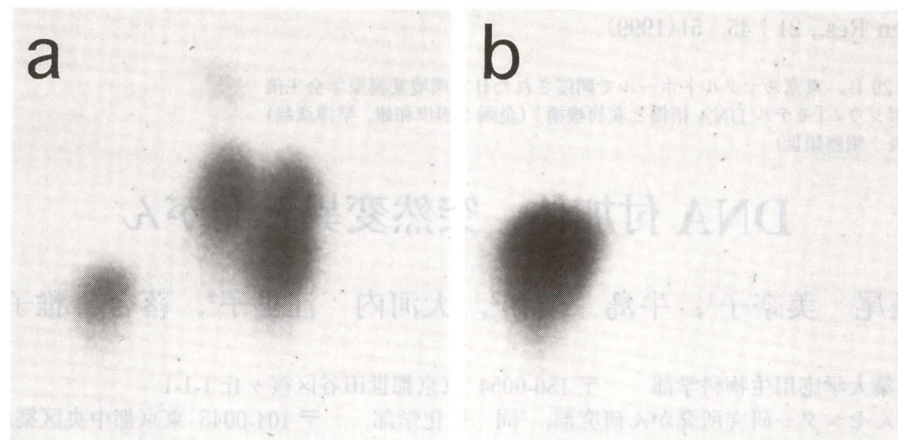


Fig. 1  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル改良法(1)によるグアニン-MeIQ 付加体の検出  
a: 従来用いられている intensification 法 b: Intensification 法で得られたものをさらに NP-1 と PDE-I で消化する改良法-I で得られたスポット

像するが、事実は異なる。

ヒトがほとんど毎日摂取しているヘテロサイクリックアミン(HCA)について、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の改良を行い、それを用いて各臓器における付加体レベルを解析し、*in vivo* 突然変異頻度との相関を検討した。DNA 付加体レベルより突然変異頻度の方が発がんより良い相関を示すことを期待したが、事実はそれほど簡単ではない事が本実験を通して明らかになった。各臓器によって細胞増殖、細胞回転のカイネティクスは異なるうえ、さらに発がんの過程はいろいろな遺伝的要因によって修飾を受けるので簡単ではない。我々の行った Big Blue マウス(♀; C57 BL/6 N)を用いた解析を中心に、この問題に関連する最新の情報を含めて紹介する。

### 1. $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の改良

$^{32}\text{P}$ -ポストラベル法は Randerath ら(1985)により開発され、約 15 年を経過するが、bulky な構造をもつ化合物の形成する DNA 付加体を解析するには便利な方法である。ただし、原法では付加体ヌクレオチドがモノヌクレオチドに完全に分解されないという欠点がある。我々はこの点に改良を加えた(Tada et al., 1994; Ochiai et al., 1998)。HCA の 1 つである 2-アミノ-3,4-ジメチルイミダゾ [4,5-f] キノリン(MeIQ)を Big Blue マウス(C57 BL/6 N)に、餌に 300 ppm 混ぜて投与し、各臓器から DNA を抽出し、マイクロコッカスヌクレアーゼ(MCN)と脾臓ホスホジエステラーゼ(PDE-II)で DNA を消化し、intensification 法に従い、 $\text{T}_4$  ポリヌクレオチドキナーゼ( $\text{T}_4$ -PNK)でリン酸化した後、TLC で解析すると Fig. 1 に示すように多数の付加体が検出される。 $\text{T}_4$ -PNK でリン酸化したものをさらに、ヌクレアーゼ P1(NP-1) 1.6 U, pH 5.3-6 で処理した後、蛇毒ホスホジエステラーゼ(PDE-I, 30 mU) pH 8-9 でインキュベートし、TLC を行くと、1 つのスポットになる (Fig.

1 b)。NP-1 はホスファターゼ活性をもつので、さらに PDE-I で処理すると付加体をもつオリゴヌクレオチドは 5'-モノヌクレオチドになる。得られたスポットは  $N^2$  (Guanin-8-yl)-MeIQ-5'-リン酸であった。なお、改良法による付加体の回収率は原法の 90 % 以上であった。MeIQ を 12 週間投与した後、肝臓、心臓、前胃、骨髄および大腸における付加体を上記改良法で解析した結果、いずれも 1 スポットを与えた。すなわち、臓器間で付加体の形に差はなかった。しかし、原法の回収率は約 50 % であった点には留意する必要がある。

本改良法(改良法 I)は 2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ [4,5-b] ピリジン(PhIP)および 2-アミノ-3,8-ジメチルイミダゾ [4,5-f] キノキサリン(MeIQx)にも有用である(Fukutome et al., 1994; Totsuka et al., 1996)。2-アミノ-3-メチルイミダゾ [4,5-f] キノリン(IQ)に応用する場合には、NP-1 処理の前に PNK (30 U/13  $\mu\text{l}$ ) pH 5.7 で処理する必要がある(改良法 II)。これは IQ がグアニン-C8 付加体の他グアニン- $N^2$  付加体を生成し(その他少量の第 3 の付加体ができる)、その 3'-リン酸が NP-1 に抵抗性なためである(Ochiai et al., 1999)。

付加体の形が複数ある場合は、その形によって修復速度が異なる場合がある。ただし大腸粘膜など細胞の回転の速い臓器では細胞回転による除去が大きく効いて、がん化するポテンシャルをもつと考えられる細胞、例えば幹細胞(stem cells)における修復の付加体に対する特異性の解析は、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法では不可能であろう。

MeIQ を 12 週間連続投与した時の DNA 付加体レベルの経時変化を Fig. 2 に示す。細胞回転の遅い、またはほとんどない肝臓および心臓では 12 週まで直線的に増加する。それに対し細胞回転の速い大腸、骨髄、前胃では 1-4 週間でプラトーに達する。

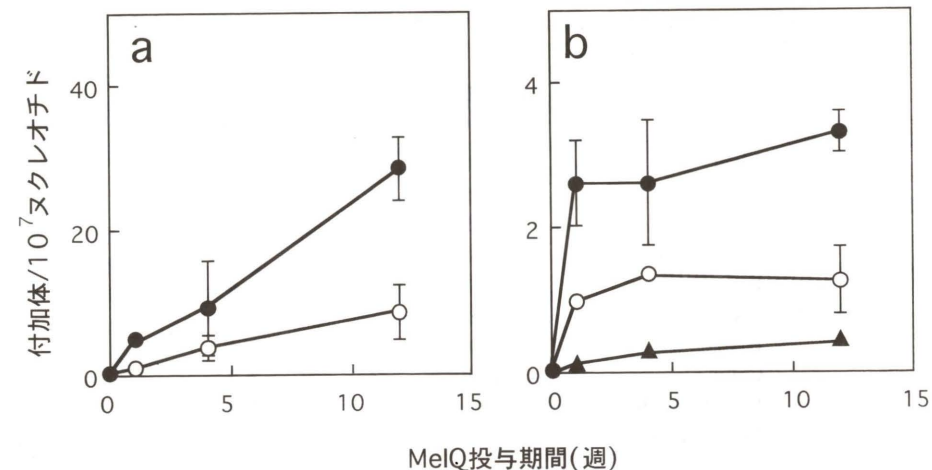


Fig. 2 種々臓器における MeIQ-DNA 付加体生成の経時変化  
a. 肝(●), 心(○) b. 大腸(●), 前胃(○), 骨髄(▲) (Ochiai et al., 1998)

Table 1 MeIQ 投与により Big Blue マウスの種々の臓器において誘発された *lacI* 突然変異の経時変化

臓器	化合物	突然変異頻度 $\times 10^6$		
		MeIQ 投与期間(週)		
		1	4	12
Liver	None	20.7		30.6
	MeIQ	21.2	31.0	142
Heart	None	15.8		29.1
	MeIQ	26.4		20.8
Colon	None	13.2		29.2
	MeIQ	155	289	1105
Forestomach	None	32.8		38.2
	MeIQ	25.6	32.0	97.6
Bone marrow	None	9.8		18.9
	MeIQ	39.5	75.9	109

MeIQ は 300 ppm の濃度で CE-2 に混ぜて投与(Suzuki et al., 1996)

### 2. DNA 付加体レベルと *in vivo* 突然変異の相関

Big Blue マウスは *lacI-lacZ* オペロンを含む  $\lambda$  シャトルベクターを第 4 番染色体上に約 40 コピーもち、誘発された変異を青色の  $\lambda$  ファージプラークとして検出できる系である。Big Blue マウスに MeIQ を投与した時の、1, 4, 12 週における突然変異頻度を Table 1 に示す。1 週における肝臓での DNA 付加体レベルは大腸のそれより高い。したがって、突然変異頻度は DNA 付加体レベルには一義的に比例しない事は明らかである(Ochiai et al., 1998)。細胞回転の速い骨髄および大腸ではすでに 1 週で変異フェージの数の増加が認められるのに対し、肝臓では 12 週になってはじめて有意な増加が認められる。

Table 2 に種々の臓器の 12 週における DNA 付加体

レベルと突然変異頻度を示す。細胞増殖のほとんどない心臓では突然変異頻度の増加は認められない。骨髄における付加体レベルは肝臓の約 1/70 であるにも拘らず、肝臓と同じレベルの変異が誘発されていた。突然変異頻度は付加体レベルと細胞増殖の両因子が大きく関与することが示唆される。同一臓器における異なった化合物に由来する DNA 付加体レベルと突然変異頻度の関係を比較した Davis ら(1996)の結果を Table 3 に示す。付加体レベルと突然変異頻度に直線的相関関係はない。A $\alpha$ C は付加体当りの変異原性が比較的弱い。MeIQx および A $\alpha$ C の主な DNA 付加体はグアニン C8 である(IQ については前述)。したがって、変異原性の強さは DNA 塩基のどの部位が修飾されたかによって決まるといふよりは、付加体全体の構造によって決まると思われる。

### 3. 突然変異頻度と発がん

Big Blue(C57 BL/6 N) マウスにおける突然変異頻度と発がんとの相関を Fig. 3 に示す。発がん実験は 300 ppm の MeIQ を含む餌を連続投与し、実験期間は 92 週である。85 % のマウスに肝細胞がんが認められたのに対し、最も変異頻度の高かった大腸においては 42 % に腺がんが認められたに過ぎない。肝臓とほぼ同じ変異頻度を示した骨髄には悪性化は認められなかった(Nagao et al., 1998)。Hakura ら(1998)は Muta マウス(Balb/c  $\times$  DBA/2) F1 に B[a]P を 25 mg/kg/day 5 日間胃内投与して、最終 B[a]P 投与 2 週間後に変異頻度を測定し、41 週の発がん実験で両者を比較した。変異頻度が最も高かったのは大腸で小腸、前胃、骨髄、脾がこれに次いだ。一方発がんの標的臓器は前胃であり、脾臓における悪性リンパ腫がこれに次いだ。以上のように突然変異頻度と発がん性に相関がないのは、MeIQ のみが特殊なのではなく、むしろほとんどの化合物で観察されるのではないだろうか。



Table 2 Big Blue マウス各臓器における DNA 付加体レベルと突然変異頻度の比較

化合物	臓器	<i>lacI</i> 突然変異頻度 (10 <sup>-6</sup> )	DNA 付加体レベル (付加体/10 <sup>7</sup> ヌクレオチド)
None	Liver	30.6	0
	Heart	29.1	0
	Colon	29.2	0
	Forestomach	38.2	0
	Bone marrow	18.9	0
MeIQ	Liver	142	28.3
	Heart	20.8	8.4
	Colon	1105	3.3
	Forestomach	97.6	1.3
	Bone marrow	109	0.4

300ppm MeIQ を含む餌を 12 週投与した。各群 3 匹ずつ用いた。ただし前胃に関しては 8 匹に投与し、4 匹からの前胃をプールし、2 サンプルを解析した (Ochiai et al., 1998)

Table 3 DNA 付加体レベルと突然変異の頻度：化合物による相違<sup>a</sup>

化合物	C57BL/6J <i>lacZ</i>	
	Adduct mol×10 <sup>7</sup> ヌクレオチド	MF×10 <sup>6</sup>
None		29.0±3.6
IQ	1.3±0.5	134.1±10.8
MeIQx	0.5±0.3	112.7±14.6
AαC	12.7±2.2	78.2±9.5

<sup>a</sup>Davis et al., 1996

Adduct : 24 hr after 10 daily doses (20mg/g, P.O.)

MF : 4 weeks after 10 daily doses (20mg/g, P.O.)

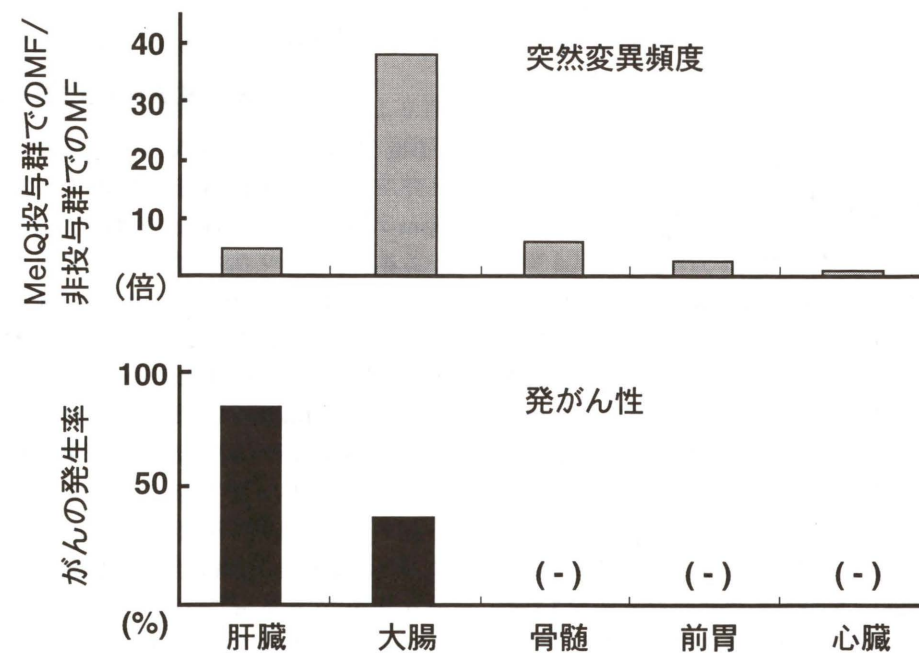


Fig. 3 MeIQ を投与した Big Blue マウス (C57BL/6N) における各臓器の突然変異頻度と発がん性 (Nagao et al., 1998)

Table 4 種々の細胞の種々の遺伝子における PhIP 誘発突然変異

遺伝子	宿主	サンプル数	突然変異の数 (%)			文献
			G : C 欠失	GGGA → GGA	その他	
<i>Apc</i>	ラット大腸癌	4	5 <sup>a</sup> (100)	5 <sup>a</sup> (100)		Kakiuchi et al., 1995
<i>lac I</i>	BBM (大腸)	115	30 ( 26)	8 ( 7)		Okonogi et al., 1997a
	BBR (大腸)	227	82 ( 36)	18 ( 8)		Okonogi et al., 1997b
<i>supF</i>	ヒト線維芽細胞	172	7 ( 4)	5 ( 3)		Endo et al., 1994
<i>Hprt</i>	ヒトリンパ芽球様細胞	55	5 ( 9)		5 ( 9) AAGGGGGC → AAGGGGC	Morgenthaler et al., 1995
<i>hprt</i>	チャイニーズハムスター線維芽細胞	40	5 (12.5)	4 ( 10)		Farsani et al., 1996

<sup>a</sup>: 1 つの腫瘍は 2 つの *Apc* 変異を持っていた

この相違の原因となっている因子には、いくつかあると想定されるが、突然変異しうるポテンシャルをもつ細胞の増殖カネティクスが各臓器によって異なることが重要な因子の 1 つである。肝細胞は増殖速度が遅く、変異した細胞は悪性化への変異を受けない限り、ゆっくり増殖する。さらに、肝では変異を受ける細胞と癌化のポテンシャルをもっている細胞との関係は良くわかっていない。

それに対し大腸では幹細胞は各陰窩当り 1 個ある。この細胞に突然変異が起これば、その陰窩にある 200—300 の細胞はすべて、その変異細胞で占められる。すなわち幹細胞に生じた変異は 200—300 倍に増幅されている。幹細胞以外の細胞に生じた変異は、発がん物質投与を休止している間に粘膜から消滅することが考えられる。発がんのポテンシャルを持っている細胞は幹細胞に限られるという説があるが、決定にはいたっていないと思われる。いずれにしても、突然変異頻度が何を表わしているかは各臓器によって著しく異なる。

次に重要な因子は、細胞が腫瘍化するのに必要な遺伝子変異の数である。これは組織ごとに異なると考えられる。さらに、発がんの過程を修飾する遺伝子の関与がある。例えば、がん抑制遺伝子に変異のある *Min* マウスも遺伝的背景が異なると腸管の腫瘍発生が顕著に抑えられる。これは *Mom* という分泌型ホスホリパーゼ A 2 (*PLA2s*) 遺伝子の発現レベルによる事が明らかにされている。その他、発がん感受性を制御している遺伝子は多数ある。

PhIP は F 344 ラット雄に大腸がんを誘発するが雌ラットには大腸がんを誘発せず、乳がんを誘発する。Big Blue ラット (F 344) 雌および雄に、発がん実験と同じ投与用法で餌に 400 ppm の PhIP を混ぜて投与 (ただし変異テストの場合は 60 日間投与し、1 週間後に解析) した場合、大腸粘膜における、突然変異頻度は雌雄で差がない (Okonogi et al., 1997 a)。PhIP による大腸の前がん病変ともいべき異常腺窩 (Aberrant Crypt Focus, ACF) の誘発は大腸がんと同様に雄で有意に増加する

が、雌では対照群よりわずかしこ増加しない。去勢雄ラットでは ACF の数は雌ラットと同程度に低下していた。すなわち突然変異誘発後の細胞の運命がホルモンにより修飾されていることが示唆された。

#### 4. 突然変異スペクトルと発がん

ここでは 2 つの問題をとりあげる。1 つは各化合物は、どの臓器でも同じ変異スペクトル (型と部位) を与えるか、各化合物はそれぞれ特異的な変異スペクトルを与えるか、動物の種が異なっても同じスペクトルを与えるかという問題である。第 2 は変異スペクトル解析により発がんリスク評価に関して重要な情報が得られるかという問題である。

1) の問題でまず各臓器で同じ変異スペクトルを与えるかという問題である。MeIQ は大腸、肝臓では主として G : C → T : A 変異を誘発し、G : C → A : T トランジションがこれに次ぐ。しかし骨髄では G : C → T : A, G : C → A : T, 一塩基対欠失、およびその他の複合した変異、の 4 種類がほぼ等頻度に誘発されていた。この変異スペクトルの差は細胞増殖速度に直接関わるものではないことは、大腸が肝臓と同じスペクトルであることから推定される。骨髄の DNA 修復系または DNA 複製系になんらかの特異性の存在が推定される。

次に PhIP, AαC および MeIQ の 3 つの HCA について、これらはいずれも主としてグアニン C 8-付加体を生成するのであるが、Big Blue マウス大腸における変異スペクトルを比較した。いずれの化合物でも G : C → T : A 変異が最も多く、全突然変異の約 50 % を占めた。それに続く変異としては、PhIP による G : C 欠失が約 30 % であることが特徴で、その他の化合物では G : C → A : T 変異がこれに次いだ。さらに詳しく検討すると、MeIQ は 5'-GC-3' に、PhIP は 5'-GGG-3' に、AαC は CGT に塩基置換変異が最も高頻度に観察された。一塩基欠失の頻度は MeIQ, PhIP, AαC で 8/92, 30/115 および 8/105 であり、PhIP で有意に高かった。さらに PhIP では 8 個が GGGA → GGA の変異であったのに対し、MeIQ では



1/92, AαCでは0/105でありGGGA→GGA変異はPhIPにきわめて特異的であることがわかった(Okonogi et al., 1997 b). すなわちグアニンC8-付加体を生成する化合物でも, その変異スペクトルはそれぞれの化合物に特異的であり, 化合物特定変異として使えるものがある事がわかった.

Big Blue ラット大腸粘膜では, PhIPにより誘発される変異は一塩基対欠失が最も高頻度でG:C→TA塩基置換がこれに次いだ. GGGA→GGAの変異は雌雄のラット大腸粘膜で同じように観察された. すなわち, PhIPによる大腸発がんの差異は, 突然変異頻度, 変異スペクトルいずれでも説明できないことがわかった(Okonogi et al., 1997 a).

ところで我々はPhIP誘発ラット大腸がんにおけるがん遺伝子およびがん抑制遺伝子変異を解析しているが, 50%の腫瘍にApc変異を見出した. そのすべてがGGGA→GGAの変異であり, この変異がPhIPの化合物特定変異としてヒト発がんにおけるPhIPの関与を説明する手がかりに使えるか否か検討の必要性があった. 幸いなことにTable 4に示すように, ヒト線維芽細胞, ヒトリンパ芽球, チャイニーズハムスター線維芽細胞におけるsupFおよびH(h)p<sub>rt</sub>遺伝子の変異が報告された. ヒトリンパ芽球Hp<sub>rt</sub>変異をのぞいてすべての系でGGGA→GGA変異が変異の3—10%で検出された. ヒトHp<sub>rt</sub>ではG:Cの欠失はすべてAAGGGGGGC→AAGGGGGCであった. チャイニーズハムスターのhp<sub>rt</sub>遺伝子には4つのGGGA配列があるが線維芽細胞における4つの変異はすべてそのうちの1ヵ所で起こっていた. その配列はヒトでは保存されていない. このように突然変異の特異性には一次構造が重要なことはもちろんである. しかし変異の起こりやすさには, 標的配列の周辺の一次構造あるいは2次, 3次構造が大きく関与していることが推定される(長尾美奈子, 1998). したがって, 化合物特定変異を異なる遺伝子に応用する場合には, この点を考慮する必要がある.

p53遺伝子は種々のヒトがんで変異を起こしており, Apcと同様にがん抑制遺伝子である. これまでに7000例以上の変異スペクトルが報告されているが, そのうち21例にGGGA→GGA変異があることがわかった. これらの変異がすべてPhIPにより誘発されたと仮定すると, そしてPhIP誘発突然変異の3—10%がGGGA→GGA変異であるとする, PhIPはヒトがんp53変異の3—10%に関わっていると算出される.

現在のところB[a]Pのようなヒトが暴露されているPhIP以外の発がん物質ではGGGA→GGA変異は報告されていない. また, AAFのように*in vitro* または大腸菌ではフレームシフトが優先的に起こるDNA付加体を形成するものでも, *in vivo* ではフレームシフトが起こらないと報告されている. もちろんその他どのような化

合物がPhIPと同じ化合物特定変異を持っているかが今後の問題であるが, 一応PhIPのヒト発がんにおけるリスクを考える手がかりができたと考えている.

## 結 語

HCAのようにほとんどのヒトがほとんど毎日食べている発がん物質で, それに対する代謝活性化能はヒトそれぞれ異なるし, さらにDNA付加体生成以後の過程で作用する因子の遺伝的背景もヒトそれぞれ異なる. このような環境発がん物質のヒト発がんにおける役割の解明はきわめて困難である. PhIPが幸い化合物特定変異とも呼ばれるべき変異を誘発することは幸いであった.

突然変異と発がんの関係は一見単純な問題に思えるが実はよくわかっていない事が多々ある. Big Blue動物やMutaマウス, lacZ—プラスミドマウス, その他Δgptマウスなどそれぞれ特徴がある. これらを使って環境変異原研究に新しい展開があることを願っている.

## 参 考 文 献

- Davis, C. D., E. J. Dacquel, A. J. Schut, S. S. Thorgeirsson and E. G. Snyderwine (1996) *In vivo* mutagenicity and DNA adduct levels of heterocyclic amines in Muta™ Mice and c-myc/lacZ double transgenic mice, *Mutat. Res.*, 356, 287-296.
- Endo, H., H. A. J. Schut and E. G. Snyderwine (1994) Mutagenic specificity of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-*f*] -quinoline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-*b*] -pyridine in the supF shuttle vector system, *Cancer Res.* 54, 3745-3751.
- Yadollahi-Farsani, M., N. J. Gooderham, D. S. Davies and A. R. Boobis (1996) Mutational spectra of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-*b*]pyridine (PhIP) at the Chinese hamster hp<sub>rt</sub> locus, *Carcinogenesis*, 17, 617-624.
- Fukutome, K., M. Ochiai, K., Wakabayashi, S. Watanabe, T. Sugimura and M. Nagao (1994) Detection of guanine-C8-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-*b*] pyridine adduct as a single spot on thin-layer chromatography by modification of the <sup>32</sup>P-postlabeling method, *Jpn J. Cancer Res.*, 85, 113-117.
- Hakura, A., Y. Tsutsui, J. Sonoda, J. Kai, T. Imade, M. Shimada, Y. Sugihara, and T. Mikami (1998) Comparison between *in vivo* mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[a]pyrene in the lacZ transgenic mouse (Muta™ Mouse). *Mutat. Res.*, 398, 123-130.
- Kakiuchi, H., M. Watanabe, T. Ushijima, M. Toyota, K. Imai, J. H. Weisburger, T. Sugimura and M. Nagao (1995) Specific 5'-GGGA-3'→5'-GGA-3' mutation of the Apc gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-*b*]pyridine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 910-914.
- Morgenthaler, P.-M.L. and D. Holzhäuser (1995) Analysis of mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in human lymphoblastoid cells, *Carcinogenesis*, 16, 713-718.
- Nagao, M., H. Fujita, M. Ochiai, K. Wakabayashi, T. Sofuni,

T. Matsushima, T. Sugimura and T. Ushijima (1998) No direct correlation between mutant frequencies and cancer incidence induced by MeIQ in various organs of Big Blue™ mice, *Mutat. Res.*, 400, 251-257.

長尾美奈子 (1998) 分子レベルからみた化学発癌研究の展望, *Mol. Medicine*, 35 : 708-716.

Ochiai, M., K. Ishida, T. Ushijima, T. Suzuki, T. Sofuni, T. Sugimura and M. Nagao (1998) DNA adduct level induced by 2-amino-3, 4-dimethylimidazo [4, 5-*f*] quinoline in Big Blue™ mice does not correlate with mutagenicity, *Mutagenesis*, 13, 381-384.

Ochiai, M., H. Nakagama, R. J. Turesky, T. Sugimura and M. Nagao (1999) A new modification of the <sup>32</sup>P-post-labeling method to recover IQ-DNA adduct as mononucleotides, *Mutagenesis*, in press.

Okonogi, H., G. R. Stuart, E. Okochi, T. Ushijima, T. Sugimura, B. W. Glickman and M. Nagao (1997a) Effects of gender and species on spectra of mutation induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-*b*] pyridine in the lacI transgene, *Mutat. Res.*, 395, 93-99.

Okonogi, H., T. Ushijima, X. B. Zhang, J. A. Heddle, T. Suzuki, T. Sofuni, J. S. Felton, J. D. Tucker, T. Sugimura and M. Nagao (1997b) Agreement of mutational character-

istics of heterocyclic amines in lacI of the Big Blue® mouse with those in tumor related genes in rodents, *Carcinogenesis*, 18, 745-748.

Randerath, E., H. P. Agrawal, J. A. Weaver, C. B. Bordelon and K. Randerath (1985) <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of DNA adducts persisting for up to 42 weeks in the skin, epidermis and dermis of mice treated topically with 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, 6, 1117-1126.

Suzuki, T., M. Hayashi, M. Ochiai, K. Wakabayashi, T. Ushijima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Sofuni (1996) Organ variation in the mutagenicity of MeIQ in Big Blue™ lacI transgenic mice, *Mutat. Res.*, 369, 45-49.

Tada, A., M. Ochiai, K. Wakabayashi, H. Nukaya, T. Sugimura and M. Nagao (1994) Identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-*f*]-quinoline (dG-C8-MeIQ) as a major adduct formed by MeIQ with nucleotides *in vitro* with DNA and *in vivo*. *Carcinogenesis*, 15, 1275-1278.

Totsuka, Y., K. Fukutome, M. Takahashi, S. Takahashi, A. Tada, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1996) Presence of N<sup>2</sup>-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3, 8-dimethylimidazo-[4, 5-*f*]quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues, *Carcinogenesis*, 17, 1029-1034.



## 農薬の変異原性データ集(1)

## はじめに

我が国における農薬の安全性についての規制は、農林水産省、環境庁、厚生省などが、それぞれ分担して行っている。その主なものとして、農薬取締法による登録制度と使用基準の公表(農水省)、登録保留基準の設定および水質汚濁防止法による環境規制(環境庁)、食品衛生法による残留基準の設定、水道法による基準、および、毒劇法による毒物劇物の指定(厚生省)等があげられよう。特に、農薬の毒性試験の情報としては、農薬の物性、急性毒性、亜急性毒性、変異原性、慢性毒性、発がん性、繁殖毒性、刺激性、感作性、その他の薬理作用などが含まれる。このうち、変異原性については、現行のガイドライン(昭和60年、1月)によって、1)微生物を用いる突然変異試験(Ames試験)、2)培養細胞を用いる細胞遺伝学的試験、および、3)枯草菌を用いるDNA修復試験(Rec-assay)などの*in vitro*試験系が要求されているが、必要に応じて、*in vivo*系のげっ歯類を用いる小核試験なども実施されている。

現在、我が国で使用されている農薬の種類はきわめて多く、化合物として300種近いと思われる。用途別には、殺虫剤、除草剤、殺菌剤、植物成長調整剤、殺鼠剤、抗ウイルス剤、土壌消毒剤、協力剤などに大別されるが、いずれもわれわれの衣食住に深い関連を持ち、近代社会の経済学的発展に大きく寄与してきた。しかしながら、近年、環境ホルモンの問題の浮上に伴い、今一度、それらのヒトに対する安全性が問われるようになった。

今回、本学会編集委員会の承認を得て、既存の農薬の変異原性に関する情報をまとめ、資料・情報に記載することとした。我が国では、すでに、農薬に関する毒性試験結果の詳細について、日本農薬学会誌にその概要が報告されている。これらのデータは、上市企業および団体から提供された貴重なデータである。今回、三井化学ライフサイエンス研究所・農薬グループのご協力を得て、これらのデータの中から変異原性を中心とする情報を抽出し、一定のフォーマットに編集してみた。当然のことながら変異活性の高い化合物は見当たらず、ほとんどのものが陰性である。また、化合物の構造式も記載することとしたが、これらは構造相関をみるためにも貴重な情報と考えている。ここでは110種類の化合物をあげたが、今後さらに、データを追加していく予定である。ご参考となれば幸いである。

## 略字、略号について

表中の記号の説明について下記する。

- Rec: 枯草菌を用いるDNA修復試験; Rec-assay
- Ames: 復帰突然変異試験; Ames test
- CA: 培養細胞を用いる染色体異常試験
- MN: げっ歯類を用いる小核試験
- CAR: 発がん性試験(ラット, マウス)
- TEG: 催奇形性試験(ラット, ウサギ)
- UDS: 不定期DNA合成試験
- MLA: マウスリンフォーマ突然変異試験
- DLT: マウスを用いる優性致死試験
- SCE: 姉妹染色分体交換試験
- HMA: 宿主経路試験
- HGPRT: 培養細胞を用いる突然変異試験
- S9: ラット肝S9を添加しない非代謝活性化系
- +S9: ラット肝S9による代謝活性化系
- 直: 染色体異常試験の直接法(非代謝活性化による連続処理法)
- ±S9: 非代謝活性化系, および, 代謝活性化系(染色体異常試験では短時間処理法)
- E-3: 10のべき乗をEで表現:  $\times 10^{-3}$
- 判定: -; 陰性
- ±; 疑陽性
- +: 陽性
- (+); 弱陽性
- S9: ラット肝ミクロゾーム分画
- ?; 文献に試験データの記載なし

なお、いくつかの農薬については、参考までに編者の手許にある染色体異常試験のデータを付け加えた。石館(1987)および(1988)はそれぞれ、染色体異常データ集(L. I. C.出版, 1987)および総説(Ishidate et al. *Mutat. Res.*, 195, 151-213, 1988)より引用した。その他の情報の詳細については、各項目の右肩に記載されている文献を参照されたい。

## 謝 辞

この度のデータの収集にあたり、ご理解を賜りました日本農薬学会誌編集委員会に厚く御礼申し上げます。また、データ集の作成のために貴重な時間をご提供下さいました、三井化学株式会社ライフサイエンス研究所の坂本修氏および江部洋史氏に心より感謝申し上げます。

(オリンパス光学工業株式会社 染色体研究センター (CRC) 石館 基 記)



# 1. Ametryn

Cas.No.: 834-12-8

文献No.: 18, S213-S217 (1993)

種類: 除草剤 商品名: ゲザパックス	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 100~10000 ug/well
分子量: 227.33 分配係数: 有機溶媒に易溶	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 100~5000 ug/plate 備考: TA1537, TA98株 1濃度土, 用量相関なし (野村総合研究所, 1979)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9 75~300 ug/ml/3hr, +S9 37.5~150 ug/ml/3hr, 37.5~150 ug/ml/24h 備考: CHO(ATCC CCL61系)細胞 (スイチバガイキョー社 1989); CHL細胞で (251 mg/ml) (石館, 1987)
2-methylthio-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

# 2. Ancyridol

Cas.No.: 12771-68-5

文献No.: 17, S151-S154 (1992)

種類: 植物成長調整剤 商品名: スリトーン	Rec: ? 抗菌性: ? Dose: -
分子量: 256.3 分配係数: 1.91(水 25℃):logP	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 250, 500, 1000, 2500, 5000 ug/plate 備考: 5000 ug/plateで抗菌性有り (リリー研究所, 1985)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 6hr (156.25~1250 ug/ml), 24-48hr (18.125~625 ug/ml) 備考: CHL細胞 (セーファームラボラトリス, 1990)
a-cyclopropyl-a-(4-methoxyphenyl)-5-pyrimidinemethanol	MN: ? 備考:
	その他: UDS -, MLA -, in vivoSCE - (リリー研究所 1985)
	CAR: ? TEG: -

# 3. Asulam

Cas.No.: 2302-17-2

文献No.: 15, 497-501 (1990)

種類: 除草剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~2000 ug/disk
分子量: 229.23 分配係数: 4.53 ±0.03(pKa)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 生育阻止を生じる濃度 備考: (残農研, 1977)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
N1-methoxycarbonylsulfanilamide	MN: ? 備考:
	その他: HMA -, 細胞形質転換 -, DLT -
	CAR: - TEG: -

# 4. Bacillus thuringiensis産生結晶毒素

Cas.No.: なし

文献No.: 14, 415-419 (1989)

種類: 微生物殺虫剤 商品名: トアロー水和剤CT	Rec: - 抗菌性: - Dose: 10~2000 ug/disk
分子量: 約135000 分配係数: 有機溶媒に不溶	Ames: ? (-S9) - (+S9) Dose: 1~1000 ug/plate 備考: TM677(8-AGs): 8-azaguanine感受性株, TA100(Smd): Streptomycin依存性株 (残農研, 1983)
蛋白質。アミノ酸の配列順序は未確定	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
δ-endotoxin	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

# 5. Benfuracarb

Cas.No.: 82560-54-1

文献No.: 14, 517-521 (1989)

種類: 殺虫剤 商品名: Oncol	Rec: - 抗菌性: ? Dose: ~10000 ug/disk
分子量: 410.5 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~5000 ug/plate 備考: (The Institute of Environmental Toxicology, 1982)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考: In vivo 染色体異常試験(CDラット) (Hazleton Laboratories, 1983)
Ethyl N-[2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yloxy]carbonyl(methyl)-aminothio-N-isopropyl-B-alanine	MN: - 備考: 5, 50 mg/kg (2回), CD-1マウス (Hazleton Laboratories, 1983)
	その他:
	CAR: - TEG: -

# 6. Benfuresate

Cas.No.: 68505-69-1

文献No.: 20, 229-237 (1995)

種類: 除草剤 商品名:	Rec: - (±S9) 抗菌性: ? Dose: 50~5000ug/plate
分子量: 分配係数: 2.41(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 50, 150, 500, 1500, 5000 ug/plate 備考: (HRC, 1991)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9 15, 75, 150 ug/plate, +S9 75, 375, 750 ug/plate (溶媒エタノール) 備考: ヒトリンパ球 (HRC, 1984)
2,3-Dihydro-3,3-dimethylbenzofuran-5-yl ethanesulfonate	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

# 7. Bensulfuron-methyl

Cas.No.: 83055-99-6

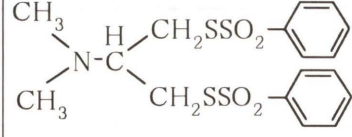
文献No.: 16, 343-347 (1991)

種類: 水田用除草剤 商品名: DPX-F 5384	Rec: - 抗菌性: - Dose: 20~5000 ug/disk
分子量: 410.4 分配係数: 2.45(pH1.5), 0.61(pH7):logP	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: Salmonella (0.01~10ug/plate), E. coli (10~1000 ug/plate) 備考: Salmonellaでの用量はかなり低い (残農研, 1981)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 1.0 E-4 M 備考: CHL細胞, 1用量のみ (残農研, 1985)
methyl-a-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoylsulfamoyl-O-toluate	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

# 8. Bensultap

Cas.No.: 17606-31-4

文献No.: 14, 523-529 (1989)

種類: 殺虫剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: - Dose: 0~10000 ug/disk
分子量: 431.63 分配係数: 192(logP, 25℃)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~5000 ug/plate 備考: (Institute of Environmental Toxicology, 1983)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
S,S'-2-dimethylaminotrimethylene di(benzenethiosulfonate)	MN: - 備考: 20, 200 mg/kg x 1, 10, 100 mg/kg x 5, CH3マウス (武田化学, 1980)
	その他: 前進突然変異試験 -, SCE -, DLT -, UDS -
	CAR: - TEG: -



## 9. Benthiazole

Cas.No.: 21564-17-0 文献No.: 12, 343-345 (1987)

種類: 種子消毒剤 商品名: カビサイド, プーサン	Rec: ± (+S9で-) 抗菌性: ? Dose: 100~400 ug/well
分子量: 238.35 分配係数:	Ames: - (-S9) + (+S9) Dose: 菌種により異なる 備考: E. coli(+S9) +, Salmonella - (野村総研, 1978, 1979))
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole	MN: ? 備考:
	その他: 代謝活性化の結果が Rec法 と Ames法で異なる (同一試験機関)
	CAR: ? TEG: ?

## 10. Benzofenap

Cas.No.: 82692-44-2 文献No.: 15, 125-129 (1990)

種類: 除草剤 商品名:	Rec: - (±S9) 抗菌性: ? Dose: 100~5000 ug/disk
分子量: 431.3 分配係数: 4.90E +4(Kow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 5~5000ug/plate 備考: Salmonella および E. coli (安評センター, 1981)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9 7~56 ug/ml, +S9 20~160 ug/ml 備考: CHL細胞 (安評センター, 1985)
2-[4-(2,4-dichloro-m-toluoxy)-1,3-dimethyl-pyrazol-5-yloxy]-4'-methylacetophenone	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

## 11. Bialaphos

Cas.No.: 71048-99-2 文献No.: 12, 347-351 (1987)

種類: 非選択性除草剤 商品名: 明治ハービエース	Rec: - 抗菌性: + (強) Dose: ~2000 ug/disk
分子量: 345.27 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~0.5 ug/plate (抗菌性のため 0.01 ug以下) 備考: (残農研, 1981)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9 ~10 mg/ml, +S9 ~43 mg/ml 備考: CHL細胞 (明治製菓, 1987)
Sodium salt of L-2-amino-4-[(hydroxy)(methyl)phosphinoyl]butyryl-L-alanyl-alanine	MN: ? 備考:
	その他: 突然変異誘発頻度試験 - (明治製菓, 1985)
	CAR: - TEG: -

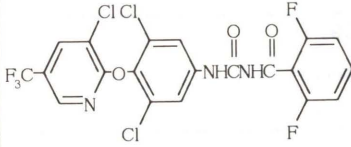
## 12. Buprofezin

Cas.No.: 69327-76-0 文献No.: 11, 655-657 (1986)

種類: 殺虫剤 商品名: アブロード	Rec: - 抗菌性: - Dose: 20~5000ug/plate
分子量: 305.44 分配係数: 4.3(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1980)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
2-tert-butylimino-3-isopropyl-5-phenyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-4-one	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: ?

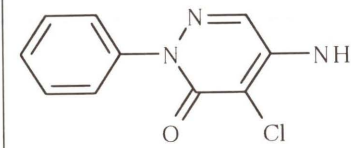
## 13. Chlorfluazuron

Cas.No.: 71422-67-8 文献No.: 20, 225-228 (1995)

種類: 殺虫剤 商品名: アタブロン	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 50~5000ug/disk
分子量: 540.66 分配係数: 5.8(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1986)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 3.3E-6 ~ 3.3E-4 M 備考: CHL細胞 (残農研, 1986)
1-[3,5-Dichloro-4-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy) phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

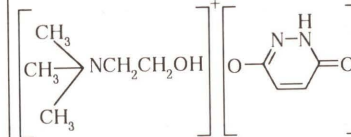
## 14. Chloridazon

Cas.No.: 1698-60-8 文献No.: 17, S171-S176 (1992)

種類: 除草剤 商品名: ピラミン, アリセツ®, レナバック	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 20~2000 ug/disk
分子量: 221.6 分配係数: 1.26(Kow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: -S9 (10~3000 ug/ml), +S9 (10~1000 ug/ml) 備考: (Institute of Environmental Toxicology, 1976)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9 (2.0, 4.0, 5.0 ug/ml), +S9 (1, 2, 4 ug/ml) 備考: Human lymphocytes (BASF, 1988)
1-Phenyl-4-amino-5-chloro-pyridazon-6	MN: ? 備考:
	その他: HMA - (Institute of Environmental Toxicology, 1976)
	CAR: - TEG: -

## 15. Choline salt of maleic hydrazide

Cas.No.: 123-33-1 文献No.: 12, 771-774 (1987)

種類: 萌芽抑制剤 商品名: エルノー	Rec: - 抗菌性: - Dose: -
分子量: 215.25 分配係数: 0.0142(Kow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: - 備考: (残農研, 1983)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
Choline salt of 1,2-dihydro-3,6-pyridazinedione	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

## 16. Cinosulfuron

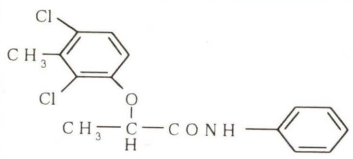
Cas.No.: 94593-91-6 文献No.: 17, S165-S169 (1992)

種類: 除草剤 商品名: セイラント粒剤(混剤)	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~6000 ug/disk
分子量: 413.41 分配係数: -1.0~-1.21(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~100 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (化検協, 1988)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: ~1000 ug/ml 備考: Human lymphocytes (チバガイキー, スイス, 1986)
1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-3-[2-(2-methoxyethoxy-phenylsulfonyl)]-urea	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -



## 17. Clomeprop

Cas.No.: 84496-56-0 文献No.: 16, 125-128 (1991)

種類: 水田用除草剤 商品名:	Rec: - (±S9) 抗菌性: - Dose: 206~3300 ug/disk (+S9では1/2量)
分子量: 324.2 分配係数: 4.8(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 206~6600 ug/plate 備考: (安評センター, 1986)
	CA (in vitro): ± (直) - (±S9) Dose: 41.3~330 ug/ml 備考: -S9: 構造異常 -, 倍数体 ± (安評センター, 1986)
(RS)-2-(2,4-dichloro-m-tolyloxy) propinamide	MN: - 備考: 120, 600, 3000 mg/kg (CD-1 マウス) (Life Science Research, 1989)
	その他:
	CAR: - TEG: -

## 18. Copper terephthalate

Cas.No.: なし 文献No.: 13, 621-624 (1988)

種類: 殺菌剤 商品名: ボルコン	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 50~10000 ug/disk
分子量: 281.7 分配係数: 3.7(Kow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (慶応大学・日本実験医学研究所, 1981; 野村総合研究所, 1981)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
テレフタル酸銅(II)三水合物	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

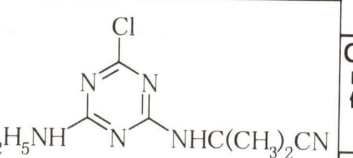
## 19. Copper(quinolin-8-olato)

Cas.No.: 10380-28-6 文献No.: 16, 563-567 (1991)

種類: 殺菌剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 1~50 ug/disk
分子量: 分配係数: 3.12(Kow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 0.1~10 ug/plate, 10 ug/plateで細菌の増加抑制 備考: (残農研, 1977)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 0.136 ug/ml (24hr), 0.08 (48hr), +S9: 9.6 (6hr) 備考: CHL細胞 (安評センター, 1985)
bis(quinolin-8-olato)copper(IUPAC)	MN: - 備考: 1400, 2800, 5600 mg/kg x 2 (CFYラット, 15匹) (HRC, 1978)
	その他:
	CAR: - TEG: -

## 20. Cyanazine

Cas.No.: 21725-46-2 文献No.: 11, 127-130 (1986)

種類: 畑地用除草剤 商品名: グラメックス(英名Bladex)	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~2 mg/disk
分子量: 分配係数: 5000(Kow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: -S9: ~3 mg/plate, +S9: ~1 mg/plate 備考: (残農研, 1978)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
2-(4-chloro-6-ethylamino-s-triazin-2-ylamino)-2-methylpropionitrile	MN: ? 備考:
	その他: HMA -, DLT -, 骨髓細胞に対する影響 -
	CAR: - TEG: -

## 21. Cycloprothrin

Cas.No.: 63935-38-6 文献No.: 16, 697-702 (1991)

種類: 殺虫剤 商品名: シクロサルル	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 0~2000ug/disk
分子量: 482.36 分配係数: 4.19(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1980)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 0, 82.5, 165, 330, 660 ug/ml; +S9: 0, 156, 313, 625, 1250 ug/ml 備考: CHL細胞 (残農研, 1985)
(RS)-a-cyano-3-phenoxybenzyl(RS)-2,2-dichloro-1-(4-ethoxyphenyl) cyclopropanecarboxylate	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

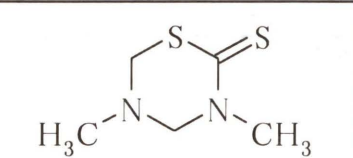
## 22. Cyproconazole

Cas.No.: 113096-99-4 文献No.: 22, 263-268 (1997)

種類: 殺菌剤 商品名: ALTO	Rec: - 抗菌性: ? Dose: ~10000 ug/disk
分子量: 291.78 分配係数: 2.91(logPow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: Salmonella: ~5000 ug/plate; E.col ~2000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537, TA1538 (Hazleton Biotechnologies, 1986); Institute of Environmental Toxicology, 1992)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: +S9: 45, 59.9, 99.9, 150, 200 ug/ml; -S9: 60.1, 100, 150, 200, 300 ug/ml 備考: CHO細胞 (Hazleton Washington, 1990)
(2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: 肝細胞腫(non-genotoxic) TEG: -

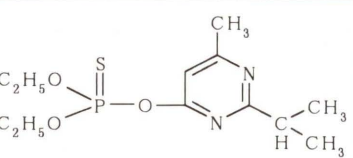
## 23. Dazomet

Cas.No.: 533-74-4 文献No.: 17, S327-S335 (1992)

種類: 土壌殺菌剤 商品名: Basamid MG, Gasturd MG	Rec: - (±S9) 抗菌性: ? Dose: 1~10000ug/plate
分子量: 162.3 分配係数: 1.14(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 1~200 ug/plate 備考: (Institute of Environmental Toxicology, 1977)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 0.002, 0.01, 0.05 ug/ml; +S9: 2.5, 12, 25 ug/ml 備考: Human lymphocytes (BASF, 1989)
Tetrahydro-3,5-dimethyl-2H-1,3,5-thiadiazine-2-thione	MN: ? 備考: In vivo 染色体異常試験で- (BASF, 1985)
	その他: HMA - (残農研, 1977)
	CAR: - TEG: -

## 24. Diazinon

Cas.No.: 333-41-5 文献No.: 14, 113-118 (1989)

種類: 殺虫剤 商品名: ダイアジノン	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 1, 5, 10, 25, 50, 100 ug/disk
分子量: 304.3 分配係数: 3.42(LogP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10, 100, 1000 または 200, 1000, 5000 ug/plate 備考: (残農研, 1976)
	CA (in vitro): - (直) ± (±S9) Dose: 5, 10, 20 ug/ml 備考: Human lymphocytes (Life Science Research, 1986); CHL細胞では+ (+S9) 100 ug/ml (石館, 1987)
O,O-diethyl O-(2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinil) phosphorothiate	MN: ? 備考:
	その他: HMA - (残農研, 1976), 大腸菌DNA損傷誘発試験 (+) (Life Sciencd Research, 1986)
	CAR: - TEG: -



## 25. Diclomezine

Cas.No.: 62865-36-5 文献No.: 13, 625-628 (1988)

種類: 殺菌剤 商品名: モンガード	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 100~3000ug/disk
分子量: 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 100, 300, 1000, 3000 ug/plate 備考: (秦野研, 1979)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 6, 30, 60 ug/ml 備考: CHO細胞 (HRC, 1986)
6-(3,5-dichloro-4-methylphenyl)-3(2H)-pyridazinone	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: -

## 26. Dienochlor

Cas.No.: 2227-17-0 文献No.: 15, 511-514 (1990)

種類: 殺ダニ剤 商品名: ペンタック水和剤	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 0.1~10 ug/disk
分子量: 474.6 分配係数:	Ames: ± (-S9) ± (+S9) Dose: 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 ug/plate 備考: TA100 ± (-S9: 5-10 ug/plate; +S9: 500 ug/plate) (残農研, 1980)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
Perchloro-1,1'-bicyclopenta-2,4-diene	MN: ? 備考: In vivo 染色体異常試験で-(26, 86.7, 260 mg/kg) ICR マウス (Litton Bionetics, 1979)
	その他:
	CAR: ? TEG: -

## 27. Diflubenzuron

Cas.No.: 35367-38-5 文献No.: 17, S159-S164 (1992)

種類: 殺虫剤 商品名: 兼商デミリン水和剤	Rec: - 抗菌性: - Dose: 20 ~ 2000 ug/disk
分子量: 310.7 分配係数: 3.7(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1978; Western Regional Research Center, 1979)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 100~250 ug/ml 備考: CHO細胞 (Hazleton Biotechnology, 1986)
1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea	MN: - 備考: 15, 150, 1500 mg/kg x 2 (Swiss-Websterマウス) (Western Regional Research Center, 1979)
	その他: MLA -
	CAR: - TEG: -

## 28. Dimepiperate

Cas.No.: 61432-55-1 文献No.: 14, 109-112 (1989)

種類: 水田用除草剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: - Dose: 20~2000ug/disk
分子量: 263.4 分配係数: 有機溶媒に易溶	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1980)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
S-1-methyl-1-phenylethyl piperidine-1-carbothioate	MN: - 備考: 40, 200, 1000mg/kg CDF1マウス (Life Science Research, 1984)
	その他:
	CAR: - TEG: -

## 29. Dimethyldithio carbamate

Cas.No.: 15521-65-0 文献No.: 17, S25-S27 (1992)

種類: 殺菌剤 商品名: サンケル	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 20~2000 ug/disk
分子量: 299.1 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 備考: (残農研, 1978)
	CA (in vitro): - (直) + (±S9) Dose: 50%増殖抑制濃度: 直接法 0.035ug/ml, 代謝活性化法 313 ug/ml以上 (調製限界) 備考: (安科研, 1988)
Nickel dimethyldithiocarbamate	MN: - 備考: 5回連続投与(ICRマウス) (残農研, 1980)
	その他:
	CAR: ? TEG: -

## 30. Diphacinone

Cas.No.: 82-66-6 文献No.: 17, S319-S321 (1992)

種類: 殺鼠剤 商品名: ヤソジオン	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 0.5~1000 ug/disk
分子量: 340.4 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: TA1535, WP2uvrA: 0.5~1000 ug/plate, 他 4株: 0.1~500 ug/plate 備考: (日本バイオリサーチセンター, 1983)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
2-diphenylacetyl-1,3-indandione	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: ?

## 31. Dithiopyr

Cas.No.: 97886-45-8 文献No.: 18, S91-S97 (1993)

種類: 除草剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 200~20000 ug/disk
分子量: 401.4 分配係数: 5.625E4(Kov)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1986; SRI International, 1987)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 0.01~1.0 mM 備考: CHL細胞 (残農研, 1986)
S,S-Dimethylester-2-(difluoromethyl)-4-(2-methylpropyl)-6-(trifluoromethyl)-3,5-pyridinedicarbothioic acid	MN: ? 備考:
	その他: HGPRT突然変異試験 - (モンサント, 1987); UDS試験 - (SRI International, 1987)
	CAR: - TEG: -

## 32. Esprocarb

Cas.No.: 85785-20-2 文献No.: 15, 117-120 (1990)

種類: 水田用除草剤 商品名: フジグラス	Rec: - 抗菌性: -? Dose: 2000~26000 ug/disk
分子量: 265.45 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 50~5000 ug/plate 備考: (マック研究所, 1985)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 18~72 ug/ml 備考: CHL細胞 (マック研究所, 1985)
S-benzyl 1,2-dimethylpropyl (ethyl) thiocarbamate	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -



## 33. Ethychlozate

Cas.No.: 27512-72-7 文献No.: 11,137-138 (1986)

種類: 植物成長調整剤 商品名: フィガロン乳剤	Rec: — 抗菌性: ? Dose: ~2000 ug/disk
分子量: 238.6 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: ~500 mg/plate 備考:
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
ethyl 5-chloro-3(1H)-indazolyl acetate	MN: ? 備考:
	その他: HMA —
	CAR: — TEG: —

## 34. Etofenprox

Cas.No.: 80844-07-1 文献No.: 14, 505-509 (1989)

種類: 殺虫剤 商品名: トレボン	Rec: — 抗菌性: — Dose: 100~20000 ug/disk
分子量: 376.49 分配係数: 7.05(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 0~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1985)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: -S9: 1.0E-6~3.3E-4M (24, 48hr), +S9: 1.0E-6~3.3E-4 (9, 18hr) 備考: CHL細胞 (残農研, 1985)
2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl ether	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: — TEG: —

## 35. Extract of mixture

Cas.No.: なし 文献No.: 17, S253-S254 (1992)

種類: 植物成長調整剤 商品名: アルムグリーン	Rec: — 抗菌性: — Dose: 30~10000 ug/disk
分子量: 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (新日本化学, 1990)
構造式なし	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 0.375, 0.75, 1.5 mg/ml 備考: CHL細胞 (新日本化学, 1990)
オウバク・クジン・オウゴン・カッコン・タイソウ・ダイオウ・ショウキョウ・センチュウ・トウキ・カンゾウ・テンビ・トウガラシ抽出物 3.5%	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: ?

## 36. Fenitrothion

Cas.No.: 133-36-5 文献No.: 13, 401-405 (1988)

種類: 殺虫剤 商品名: スミチオン	Rec: — 抗菌性: — Dose: 0.26~26 mg/disk
分子量: 277.23 分配係数:	Ames: — (-S9) + (+S9) Dose: 10 ~ 5000 ug/plate 備考: TA100(+S9): ±(約140 revertants/nmol), (TA100株の nitroreductaseによる代謝物?) (住友化学, 1983)
	CA (in vitro): + (直) + (±S9) Dose: 備考: CHL細胞(直: 50 ug/ml; ±S9: 100 ug/ml) (石館, 1987)
O,O-dimethyl-O-(3-methyl-4-nitrophenyl)-thiophosphate	MN: — 備考: 20, 400, 800 mg/kg (ICRマウス) —; In vivo 染色体異常試験 — (住友化学, 1982)
	その他: 体細胞突然変異試験(V79細胞) —; DLT —, SCE —
	CAR: — TEG: —

## 37. Fenoxaprop-ethyl

Cas.No.: 66441-23-4 文献No.: 17, S17-S23 (1992)

種類: 除草剤 商品名:	Rec: ? 抗菌性: ? Dose:
分子量: 361.8 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 4000~5000 ug/plate 備考: (ヘキスト, 1982)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 1~1000 ug/ml 備考: Human lymphocytes (Institute di Ricerche Biomediche, 1982)
ethyl 2-(4-(6-chloro-2-benzoxazolyl oxy)-phenoxy)-propanoate	MN: — 備考: 18, 180, 1800 mg/kg x2 (NMRマウス)(ヘキスト, 1984)
	その他: UDS — (Institute di Ricerche Biomediche, 1982)
	CAR: — TEG: —

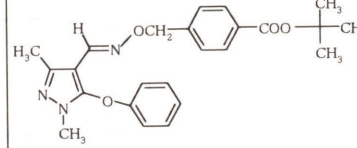
## 38. Fenoxycarb

Cas.No.: 79127-80-3 文献No.: 16, 709-712 (1991)

種類: 殺虫剤 商品名: インセガー	Rec: — 抗菌性: — Dose: 0~10000 ug/disk
分子量: 301.34 分配係数: 4.30(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 313, 625, 1250, 2500, 5000 ug/plate 備考: (化検協, 1988)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: -S9: 0.4, 2.0, 4.0 ug/ml; +S9: 0, 1.0, 5.0, 10.0 ug/ml 備考: Human lymphocytes (チューリッヒ大学およびエフ・ホフマン・ラ・ロシュ, 1982)
エチル=2-(4-フェノキシフェニル)エチルカルバマート	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: — TEG: —

## 39. Fenpyroximate

Cas.No.: 134098-61-6 文献No.: 17, S261-S267 (1992)

種類: 殺ダニ剤 商品名: ダニトロン	Rec: — 抗菌性: — Dose: 10~500 ug/disk
分子量: 421.5 分配係数: 5.01(logP, 20°C)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 50~5000 ug/plate 備考: (Life Science Research, 1989)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 1.25~20 ug/ml 備考: Human lymphocytes (Life Science Reserch, 1989)
tert-butyl (E)-a-(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-yl)methyleneamino-oxy-p-toluate	MN: — 備考: 80, 400, 2000mg/kg x 1 (CD-1マウス), 2000ppmで骨髄増殖抑制 (LSR, 1989)
	その他: 体細胞突然変異(V79) —, UDS —
	CAR: — TEG: —

## 40. Ferimzone

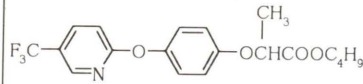
Cas.No.: 89269-64-7 文献No.: 19, S151-S157 (1994)

種類: 殺菌剤 商品名:	Rec: — (±S9) 抗菌性: ? Dose: 0~1000ug/disk
分子量: 254.34 分配係数: 2.89(logP):25°C	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 0, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (残農研, 1986)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: -S9: ~200 ug/ml (24hr), ~50 ug/ml (48hr), +S9: ~200 ug/ml 備考: CHL細胞 (化検協, 1987)
(Z)-2'-Methylacetophenone 4,6-dimethylpyrimidin-2-ylhydrazone	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: — TEG: —



## 41. Fluazifop-butyl

Cas.No.: 69806-50-4 文献No.: 15, 305-310 (1990)

種類: 除草剤 商品名: Onecide	Rec: - (±S9) 抗菌性: ? Dose: -
分子量: 383 分配係数: 4.17(logP), 2.11(fluazifop)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 245.216 備考: (Institute of Environmental Toxicology, 1982)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: - 備考: -
Butyl (RS)-2-[4-(5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy)propionate	MN: ? 備考: In vivo 染色体異常試験で+ (Inveresk Research International, 1980)
	その他: DLT - (Inveresk Research International, 1980)
	CAR: - TEG: +? (ラット、ウサギ)

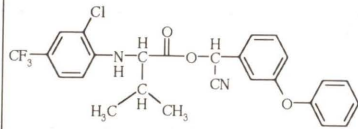
## 42. Flutolanil

Cas.No.: 66332-96-5 文献No.: 13, 153-156 (1988)

種類: 殺菌剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: - Dose: 20 ~ 10000 ug/disk
分子量: 323.3 分配係数: 3.7(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10 ~ 25000 ug/plate 備考: (残農研, 1980)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: - 備考: -
a,a,a-trifluoro-3'-isopropoxy-O-toluanilide	MN: ? 備考: -
	その他: -
	CAR: - TEG: ?

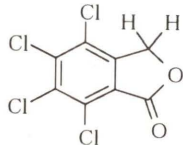
## 43. Fluvalinate

Cas.No.: 文献No.: 15, 121-124 (1990)

種類: 殺虫・殺ダニ剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: - Dose: 100 ~ 10000 ug/disk
分子量: 502.9 分配係数: 5.52(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10 ~ 5000 ug/plate 備考: (残農研, 1984)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 3.3E-6M ~ 3.3E-4M 備考: CHL細胞 (残農研, 1985)
(RS)-a-cyano-3-phenoxybenzyl N-(2-chloro-a,a,a-trifluoro-p-tolyl)-D-valinate	MN: ? 備考: -
	その他: -
	CAR: - TEG: -

## 44. Fthalide

Cas.No.: 27355-22-2 文献No.: 15, 311-314 (1990)

種類: 殺菌剤 商品名: ラブサイド	Rec: - 抗菌性: - Dose: 2 ~ 200 ug/disk
分子量: 271.92 分配係数: 3.0(LogP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10 ~ 1000 ug/plate 備考: (残農研, 1976)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9 3.3E-4 ~ 2.0E-5M, +S9 3.3E-3 ~ 8.0E-5M 備考: CHL細胞 (残農研, 1988)
4,5,6-トリクロロフタルド	MN: ? 備考: -
	その他: HMA - (残農研, 1976)
	CAR: - TEG: -

## 45. Glyphosate-trimesium

Cas.No.: 81591-81-3 文献No.: 15, 629-633 (1990)

種類: 非選択性除草剤 商品名: タッチダウン	Rec: - 抗菌性: - Dose: 10 ~ 5000 ug/disk
分子量: 245.216 分配係数: 2.6E-5(Kow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 1.6 ~ 5000 ug/plate 備考: (ICI, 1988)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: - 備考: in vivo 染色体異常試験で- (ストウファー・ケミカル・カンパニー, 1982)
trimethylsulfonium N-(phosphonomethyl)glycinate	MN: - 備考: CD-1 マウス, 雄: 700, 900, 1100, 雌: 400, 600, 800 mg/kg(X1) p.o. (ストウファー, 1986)
	その他: MLA(ICI 1988) -, 形質転換試験 - (ストウファー・ケミカル・カンパニー, 1982)
	CAR: - TEG: -

## 46. Imazapyr

Cas.No.: 81510-83-0 文献No.: 22, 360-364 (1997)

種類: 除草剤 商品名: ARSENAL, CHOPPER	Rec: - 抗菌性: - Dose: 270 ~ 26600 ug/disk
分子量: 320.4 分配係数: 1.3 as the acid tech	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~5000 ug/plate 備考: (泰野研, 1982)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 50, 170, 500, 1700 ug/ml(-S9: 3, 8, 12hr; +S9: 2-1, 2-6, 2-10 hr) 備考: CHO細胞 (Hazleton Laboratories America, 1984)
(RS)-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)nicotinate	MN: ? 備考: -
	その他: -
	CAR: ? TEG: -

## 47. Imazosulfuron

Cas.No.: 122548-33-8 文献No.: 20, 381-386 (1995)

種類: 除草剤 商品名:	Rec: - (±S9) 抗菌性: - Dose: 600ug/disk(胞子法)
分子量: 412.83 分配係数: 0.05(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (化検協, 1988)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: ~500 ug/ml 備考: CHL細胞, 直接法±(500 ug/ml)だが, 再試験で-; ±S9で- (500 ug/ml, 細胞毒性なし) (化検協, 1988)
1-(2-Chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)sulfonyl-3-(4,6-dimethoxy pyrimidin-2-yl)urea	MN: - 備考: -
	その他: -
	CAR: - TEG: -

## 48. Imibenconazole

Cas.No.: 86598-92-7 文献No.: 20, 373-379 (1995)

種類: 果樹園芸用殺菌剤 商品名: マネージ	Rec: - (±S9) 抗菌性: - Dose: ~5000 ug/ml (胞子法)
分子量: 411.7 分配係数: 4.94(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 312.5 ~ 5000 ug/plate 備考: (HRC, 1988)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 0.3 ~ 24 ug/ml, +S9: 0.5 ~ 50 ug/ml 備考: CHO-K1-BH4細胞 (HRC, 1988)
4-Chlorobenzyl N-2,4-dichlorophenyl-1H-1,2,4-triazol-1-ylthioacetimidate	MN: - 備考: BDF1 マウス, 1250, 2500, 5000 mg/kg X1, p.o. (残農研, 1991)
	その他: -
	CAR: - TEG: -



## 49. Inabenfide

Cas.No.: 82211-24-3 文献No.: 13,391-394 (1988)

種類: 植物成長調整剤 商品名: セリタド(SERITARD)	Rec: — 抗菌性: ? Dose: 0~2000ug/disk
分子量: 338.79 分配係数: 1345(Kow)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: ~10000 ug/plate 備考: (残農研, 1982)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: -S9: ~200 ug/ml, +S9: ~100 ug/ml 備考: DON細胞 (中外製薬, 1985, 1986)
4'-chloro-2'-(a-hydroxybenzyl)isonicotinamide	MN: ? 備考:
	その他:
CAR: ?	TEG: —

## 50. Ioxynil(Japan)

Cas.No.: 3861-47-0 文献No.: 16,349-353 (1991)

種類: 除草剤 商品名: アクチノール	Rec: — 抗菌性: ? Dose: ~2000ug/disk
分子量: 497.13 分配係数: 4.5(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: ~1000 ug/plate 備考: 残農研(1976)
	CA (in vitro): — (直) ± (±S9) Dose: -S9 ~60uM, +S9 ~1000 uM 備考: +S9: 倍数体 ± (1000 uM), 構造異常 ± (250 uM)、濃度依存性なし (環境保健生物研究センター, 1987)
3,5-diiodo-4-octanoyloxybenzonitrile	MN: — 備考: ICRマウス; 50-200mg/kg, i.p. × 1(72hr); 12.5-50mg/kg, i.p. × 4(24hr) (環境保健生物セ, 1988)
	その他: HMA — (残農研, 1976)
CAR: —	TEG: —

## 51. Isouron

Cas.No.: 55861-78-4 文献No.: 11,131-135 (1986)

種類: 除草剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: — Dose: 0~2000 ug/disk
分子量: 211.26 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 0~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1978)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
3-(5-tert-butyl-3-isoxazolyl)-1,1-dimethylurea	MN: ? 備考:
	その他: HMA —
CAR: —	TEG: —

## 52. Karbutilate

Cas.No.: 4849-32-5 文献No.: 11,307-309 (1986)

種類: 非農耕地用除草剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: — Dose: 0.1, 1, 2, 5 mg/disk
分子量: 279.34 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (秦野研, 1981)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
3-(3,3-Dimethylureido)phenyl tert-butylcarbamate	MN: ? 備考:
	その他:
CAR: ?	TEG: ?

## 53. MCPB ethyl

Cas.No.: 94-81-5 文献No.: 17, S39-S43 (1992)

種類: 除草剤, 落果防止剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: ? Dose: 0~100 ug/disk
分子量: 256.5 分配係数: 4.26(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 0, 10, 100, 1000, 10000 ug/plate 備考: (残農研, 1976)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 0, 2, 10, 20 ug/ml 備考: CHO-K1-BH4細胞 (HRC, 1986)
Ethyl 4-(2-methyl-4-chlorophenoxy)butyrate	MN: ? 備考:
	その他: HMA — (残農研, 1976)
CAR: —	TEG: —

## 54. Mefenacet

Cas.No.: 73250-68-7 文献No.: 13,633-637 (1988)

種類: 水田用除草剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: — Dose: 20~5000 ug/disk
分子量: 298.36 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: S9: (arochlor 1254mg/kg X1回投与ラット肝) (残農研, 1981)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
2-benzothiazol-2-yl-oxy-N-methylacetanilide	MN: — 備考: NMRIマウス(10000 mg/kg x1) p.o. (西ドイツバイエル社, 1983)
	その他: DLT (経口1回) — (西ドイツバイエル社, 1984)
CAR: ?	TEG: —

## 55. Mepiquat-chloride

Cas.No.: 24307-26-4 文献No.: 17, S269-S274 (1992)

種類: 植物成長調整剤 商品名: PIX, FRASTAR LC	Rec: — (±S9) 抗菌性: — Dose: 1242~39740 ug/plate
分子量: 149.7 分配係数: 2.83(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 156.3~5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (日本曹達, 1989)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 2000, 3000, 4000, 5000 ug/ml 備考: CHO細胞 (Hazleton Biotechnologies, 1987)
1,1-Dimethylpiperidinium chloride	MN: ? 備考:
	その他: UDS — ; DLT —
CAR: —	TEG: —

## 56. Methyl Isothiocyanate

Cas.No.: 556-61-6 文献No.: 15,297-304 (1990)

種類: 土壌消毒剤 商品名: Ditraxex, Trapexide	Rec: — 抗菌性: ? Dose:
分子量: 73.12 分配係数: 10.5(Kow)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 備考: (Institute of Environmental Toxicology, 1978)
	CA (in vitro): + (直) + (±S9) Dose: -S9: 0.1, 0.5, 1 ug/ml, +S9: 0.25, 0.75, 2.5 ug/ml 備考: V79細胞で (Technische Hochschule Darmstadt, 1984), Human lymphocyte で (Cytotest Cell Research GmbH & Co., 1988)
Methyl isothiocyanate	MN: — 備考: CD-1マウス(110 mg/kg, p.o.) (HRC, 1985)
	その他: HGPRT —, UDS試験 —, SCE —
CAR: —	TEG: —



## 57. Metolachlor

Cas.No.: 51218-45-2 文献No.: 14, 103-107 (1989)

種類: 畑作用選択性除草剤 商品名: ゲザトップD水和剤	Rec: — 抗菌性: ? Dose: 0~5000ug/disk
分子量: 283.8 分配係数: 3.45(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: ~5000 ug/plate 備考: (野村生物科学研究所, 1986)
	CA (in vitro): (+)(直) — (±S9) Dose: -S9: ~1.2 mM (6hr), ~0.6mM (24hr), ~0.3mM (48hr), +S9: ~2.4 mM (6hr) 備考: CHL細胞 (野村生物科学研究所, 1986)
2-chloro-2'-ethyl-N-(2-methoxy-1-methylethyl)-6'-methylacetanilide	MN: — 備考: チャイニース・ハムスター, 1250, 2500, 5000 mg/kg X 2, p.o. (チハガイキ・スイス, 1984)
	その他: DNA修復試験 (ヒト腺癌細胞) -, DLT - (チハガイキ・スイス, 1984)
	CAR: — TEG: —

## 58. Metribuzin

Cas.No.: 21087-64-9 文献No.: 12, 127-129 (1987)

種類: 畑作用除草剤 商品名: センコル	Rec: — 抗菌性: —?
分子量: 214.3 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1978)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
4-amino-6-tert-butyl-3-methylthio-1,2,4-triazin-5(4H)-one	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: —

## 59. Metsulfuronmethyl

Cas.No.: 74223-64-6 文献No.: 19, S147-S150 (1994)

種類: 除草剤 商品名: デュボンサーベルDF	Rec: — 抗菌性: ? Dose: 100~4000ug/disk
分子量: 381.4 分配係数: -1.745(logP):pH7	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: サルモネラ(-S9) 0.078-20 ug/plate; (+S9) 0.313-40 ug/plate, 大腸菌 313-5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (残農研, 1991)
	CA (in vitro): + (直) + (±S9) Dose: 0.13~7.90 mM 備考: CHO細胞, 細胞毒性の認められた濃度で+ (デュボン・ハスケル研究所 1983).
Methyl 2-[3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)ureidosulfonyl] benzoate	MN: ? 備考: In vivo染色体異常試験で-, 500-5000 mg/kg x 1, p.o. (ヘーゼルトン, 1983)
	その他:
	CAR: ? TEG: —

## 60. Miltiomyacin

Cas.No.: 67527-71-3 文献No.: 19, S135-S140 (1994)

種類: 非食用作物用殺菌剤 商品名:	Rec: — (±S9) 抗菌性: —?
分子量: 514.5 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 ug/plate 備考: (残農研, 1980)
	CA (in vitro): + (直) + (±S9) Dose: 備考: CHL細胞, 直接法: 377 ug/ml (24hr)+, 代謝活性化法: 283 ug/ml +, 566 ug/ml ± (化核協, 1989)
(2R,4R)-2-[(2R,5S,6S)-2-(4-amino-1,2-dihydro-5-hydroxymethyl-2-oxopyrimidin-1-yl)-5,6-dihydro-5-L-serylamino-2H-pyran-6-yl]-5-guanidino-2,4-dihydroxyvaleric acid	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: —

## 61. Molinate

Cas.No.: 2212-67-1 文献No.: 15, 113-115 (1990)

種類: 除草剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: — Dose: 200~20000ug/disk
分子量: 187.3 分配係数: 2.88(LogP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 10~3000 ug/plate 備考: (残農研, 1977)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
S-ethyl hexahydro-1H-azepine-1-carbothioate	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: — TEG: —

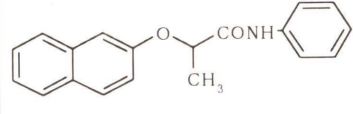
## 62. Moranter tertrate

Cas.No.: 26155-31-7 文献No.: 17, S323-S325 (1992)

種類: 殺線虫剤 商品名: グリーンガード, ガート・イト	Rec: — 抗菌性: ? Dose: 50~20000ug/disk
分子量: 370.43 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 50~20000 ug/plate 備考: (横浜市立大学, 1982)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
Trans-1,4,5,6-tetrahydro-1-methyl-2-[2-(3-methyl-2-thienyl)vinyl] pyrimidine tartrate	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: —

## 63. Naproanilide

Cas.No.: 7784-40-9 文献No.: 12, 563-566 (1987)

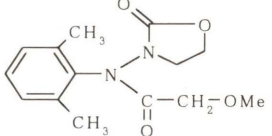
種類: 水田用除草剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: — Dose: ~20mg/disk
分子量: 291.3 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: ~500 ug/plate 備考: 残農研(1976)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
a-(B-naphthoxy)propionanilide	MN: ? 備考:
	その他: HMA — (残農研, 1976)
	CAR: ? TEG: —

## 64. Nitenpyram

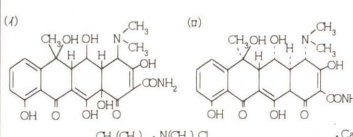
Cas.No.: 120738-89-8 文献No.: 23, 73-77 (1998)

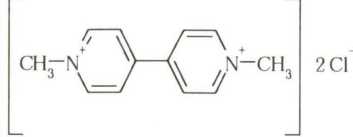
種類: 殺虫剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: — Dose: 0~10000 μg/disk
分子量: 270.7 分配係数: -0.64 (logP, 25°C)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 313, 625, 1250, 2500, 5000 μg/plate 備考: (化核協, 1990)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 675, 1350, 2700 μg/ml 備考: CHL細胞 (化核協, 1990)
(E)-N-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-ethyl-N'-methyl-2-nitrovinyliden ediamide	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: — TEG: —

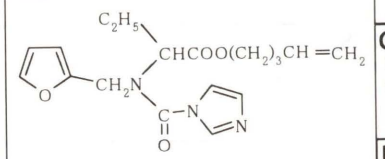


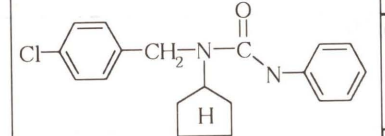
65. Oxadixyl	
Cas.No.: 77732-09-3 文献No.: 13, 639-643 (1988)	
種類: 殺菌剤 商品名: サンドファン	Rec: (+) 抗菌性: (+) 312.5 ug/disk (M45) Dose: 156.25~10000 ug/disk
分子量: 278.3 分配係数:	Ames: (+)(-S9) - (+S9) Dose: 156.25, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 ug/plate 備考: TA1537 + (化検協 1985), - (スイス・サンド社, 1979)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: (1250 ~ 2500 ug/ml), +S9: (250 ~ 2000 ug/ml) 備考: CHO細胞 (Hazleton Biotechnologies Co., 1985)
	MN: - 備考: CD-1マウス: 雄 29.06, 232.5 mg/kg, 雌 19.53, 156.2 X 2 (リットン・ハイオネティクス, 1981)
	その他: UDS - (リットン・ハイオネティクス, 1981)
	CAR: - TEG: -

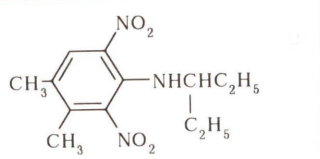
66. Oxydeprophos	
Cas.No.: 2674-91-1 文献No.: 17, S309-S313 (1992)	
種類: 殺虫剤 商品名: エストックス乳剤	Rec: (+)(3mm) 抗菌性: - Dose: 1~50%水溶液 (0.02 ml)
分子量: 260.3 分配係数: -0.43(logP)	Ames: (+)(-S9) (+) (+S9) Dose: 10~5000, 1000~40000 ug/plate 備考: E. coli, TA100(5000 ug/plate以上) で+ (残農研, 1978)
	CA (in vitro): + (直) + (±S9) Dose: -S9: 500~2000 ug/ml(24hr), 250~1000 ug/ml(48hr), +S9: 650~2600 ug/ml 備考: CHL細胞, 直: 1000~2000 (24hr), 1000 ug/ml(48hr); +S9: 2600ug/mlで構造異常+ (化検協, 1989)
	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

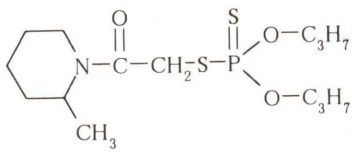
67. Oxytetracycline	
Cas.No.: 79-57-2 文献No.: 17, S255-S259 (1992)	
種類: 殺菌剤 商品名: マイコシールド	Rec: - 抗菌性: + Dose: 2~2000 ug/disk
分子量: 694.26, 500 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 0.05~100 ug/plate 備考: (残農研, 1978)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 3.75~60 ug/ml; +S9: 7.81~125 ug/ml 備考: V79細胞 (ファイザー製薬, 1988)
	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

68. Paraquat	
Cas.No.: 1910-42-5 文献No.: 13, 157-162 (1988)	
種類: 非選択性除草剤 商品名: パラコート	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 20~500ug/disk
分子量: 257 分配係数: 非極性溶媒に不溶	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 0.5~500 ug/plate 備考: (Institute of Environmental Toxicology)
	CA (in vitro): + (直) ? (±S9) Dose: 備考: Don細胞 + (-S9: 770ug/ml) (石館, 1988), CHL細胞 + (-S9: 25 ug/ml, 48hr) (石館, 1987)
	MN: ? 備考:
	その他: HMA - (Institute of Environmental Toxicology)
	CAR: - TEG: -

69. Pefurazoate	
Cas.No.: 101903-30-4 文献No.: 16, 703-707 (1991)	
種類: 稲種粉消毒剤 商品名: ヘルシード水和剤	Rec: - 抗菌性: - Dose: 78~10000 ug/disk
分子量: 345.4 分配係数: 3.00(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 78, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (安科研, 1988)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 30, 60, 120 ug/ml (24, 48hr); +S9: 60, 120, 240 ug/ml (6hr) 備考: CHL細胞 (三菱化成安科研, 1988), in vivo(SD)も行ない (HRC 1988)
	MN: - 備考: ICRマウス 171, 342, 683 mg/kg, および 342 mg/kg x 4 (三菱化成安科研, 1988)
	その他:
	CAR: ? TEG: -

70. Pencycuron	
Cas.No.: 66063-05-6 文献No.: 13, 163-166 (1988)	
種類: 殺菌剤 商品名: モンセラン	Rec: - 抗菌性: - Dose: 20~500ug/disc
分子量: 328.84 分配係数: 4.82(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1981)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
	MN: - 備考: NMRIマウス 1000, 2000 mg/kg X 2 (ハイル, 1981)
	その他: DLT - (ハイル, 1982)
	CAR: - TEG: -

71. Pendimethalin	
Cas.No.: 40487-42-1 文献No.: 11, 663-665 (1986)	
種類: 除草剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~2mg/disk
分子量: 281.3 分配係数:	Ames: (+)(-S9) - (+S9) Dose: 備考: 高濃度でのみコロニー数の増加 (残農研, 1976)
	CA (in vitro): - (直) ? (±S9) Dose: 0.1~30 ug/ml 備考: Don細胞 (残農研, 1977)
	MN: - 備考: 300, 1000 mg/kg x 1, p.o.; 100, 300 mg/kg x 5, p.o. (残農研, 1977)
	その他: DLT -
	CAR: ? TEG: -

72. Piperophos	
Cas.No.: 24151-93-7 文献No.: 16, 713-717 (1991)	
種類: 水田用除草剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~20000 ug/disk
分子量: 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~5000ug/plate 備考: (残農研, 1978)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
	MN: ? 備考:
	その他: HMAを行ない (スタンフォード・リサーチ・インスティテュート, 1975)
	CAR: - TEG: -



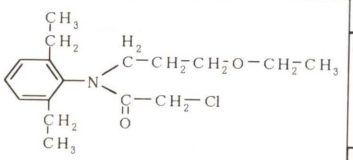
## 73. Polynactin complex

Cas.No.: 39285-04-6 文献No.: 15, 623-628 (1990)

種類: 殺ダニ剤 商品名: マイトサイジンB乳剤、トルビラン乳剤 分子量: 分配係数:	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 0~1000 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 1, 10, 50, 100, 500, 5000 ug/plate 備考: (スタンフォード研究所, 1977)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: ~3.13 ug/ml, +S9: ~1.56 ug/ml 備考: CHL/IU細胞 (中外製薬, 1989)
Dinactin; R1, R3=Ethyl R2, R4=Methyl Trinactin; R1, R2, R3=Ethyl R4=Methyl Tetranactin; R1, R2, R3, R4=Ethyl	MN: ? 備考:
マクロライド系抗生物質、シナクチン、トリナクチン、テトラナクチンの3成分を含む	その他: HMA - (残農研, 1977)
	CAR: - TEG: -

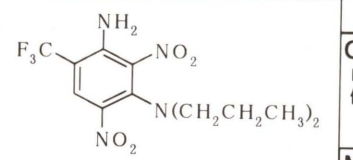
## 74. Pretilachlor

Cas.No.: 51218-49-6 文献No.: 11, 139-142 (1986)

種類: 水田用除草剤 商品名: 分子量: 311.85 分配係数:	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~20mg/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~5 mg/plate 備考: (残農研, 1980)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
2-chloro-2',6'-diethyl-N-(2-propoxyethyl)-acetanilide	MN: - 備考: マウス 500, 1000, 2000 mg/kg, p.o. (野村生物科学研究所, 1985)
	その他:
	CAR: - TEG: -

## 75. Prodiamine

Cas.No.: 29091-21-2 文献No.: 19, S141-S145 (1994)

種類: 除草剤 商品名: Kusablock 分子量: 350.3 分配係数:	Rec: - (±S9) 抗菌性: ? Dose: ~4400 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: サルモネラ ~10000 ug/plate; 大腸菌 ~5000 ug/plate 備考: (Microbiological Associates Inc., 1985; BML Inc., 1990)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 4, 8, 15, 30, 60 ug/ml 備考: CHO細胞 (Microbiological Associates Inc., 1985)
5-Dipropylamino-a,a,a-trifluoro-4,6-dinitro-o-toluidine	MN: ? 備考:
	その他: UDS - (Microbiological Associates Inc., 1985)
	CAR: ? TEG: -

## 76. Product of aspergillus

Cas.No.: なし 文献No.: 18, S99-S100 (1993)

種類: 抗植物ウイルス剤 商品名: アグリガード水溶剤 分子量: 分配係数: 有機溶媒に不溶	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~2000 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 ug/ml 備考: ヒスチンの混在のため、サルモネラ TM677株 (ストレプトマイシン依存性) 使用 (残農研 1984)
構造式なし	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: ?

## 77. Profenofos

Cas.No.: 41198-08-7 文献No.: 12, 781-784 (1987)

種類: 殺虫剤 商品名: 分子量: 373.63 分配係数: 4.75(logP)	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~25000 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~5000 ug/plate 備考: (野村総合研究所, 1979)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate	MN: ? 備考:
	その他: DLT - (チバガイギー・スイス, 1974)
	CAR: - TEG: -

## 78. Propaphos

Cas.No.: 7292-16-2 文献No.: 14, 511-515 (1989)

種類: 殺虫剤 商品名: カヤフォス粉剤, カヤフォス粒剤 分子量: 304.3 分配係数: 3.67(logP)	Rec: - 抗菌性: - Dose: 1, 5, 10, 25, 50, 100 ug/ml Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 0, 10, 100, 1000 ug/plate 備考: (残農研, 1976)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 2.4, 12, 24 ug/ml; +S9: 10, 50, 100 ug/ml 備考: CHO-K1-BH4細胞 (HRC, 1986)
O,O-dipropyl-O-(4-methyltiophenyl) phosphate	MN: ? 備考:
	その他: HMAを行い (残農研 1976)
	CAR: - TEG: -

## 79. Prothiofos

Cas.No.: 34643-46-4 文献No.: 15, 641-645 (1990)

種類: 殺虫剤 商品名: 分子量: 345.24 分配係数: 4.92(logP)	Rec: - 抗菌性: - Dose: 1~100% v/v Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1978)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 100 ~ 500 ug/ml; +S9: 30 ~ 300 ug/ml 備考: Human lymphocytes (-S9, 500 ug/ml, 細胞毒性) (ハ'エル・西ドイツ, 1988)
O-2,4-dichlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorodithioate	MN: ? 備考:
	その他: DLT -
	CAR: - TEG: -

## 80. Pyraclofos

Cas.No.: 77458-01-6 文献No.: 15, 635-640 (1990)

種類: 殺虫剤 商品名: 分子量: 360.8 分配係数: 3.77(logP)	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 500~20000 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (残農研, 1986)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 3.3 E -6 ~ 3.3 E -4 M 備考: CHL細胞 +S9: 12, 18hr; -S9: 24, 48hr (残農研, 1987)
(RS)-[O-1-(4-chlorophenyl)pyrazol-4-yl O-ethyl S-propylphosphorothioate]	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -



## 81. Pyrazoxyfen

Cas.No.: 71561-11-0 文献No.: 13, 167-169 (1988)

種類: 水田用除草剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: — Dose: 50~5000 ug/disk
分子量: 403.27 分配係数: 3.69(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 10~10000 ug/plate 備考: (残農研, 1984)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
2-[4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,3-dimethylpyrazol-5-yloxy] acetophenone	MN: ? 備考:
	その他:
CAR: —	TEG: —

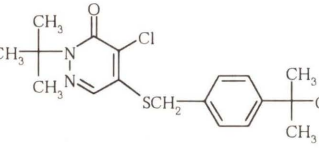
## 82. Pyributicarb

Cas.No.: 88678-67-5 文献No.: 15, 503-506 (1990)

種類: 水田用除草剤 商品名: オリザガード( +プロモブチド)	Rec: — (+S9) 抗菌性: — Dose: 100~5000 ug/disk
分子量: 330.44 分配係数: 5.18(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 10, 100, 500, 1000, 5000 ug/plate 備考: (残農研, 1985)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 3.3 E-7 (24, 48hr)~1 E-4 M (9, 18hr) 備考: CHL細胞 (残農研, 1986)
O-3-tert-butylphenyl 6-methoxy-2-pyridyl(methyl)thiocarbamate	MN: ? 備考:
	その他:
CAR: —	TEG: —

## 83. Pyridaben

Cas.No.: 96489-71-3 文献No.: 19, S243-S251 (1994)

種類: 殺虫剤・殺ダニ剤 商品名: Sanmite	Rec: — (±S9) 抗菌性: ? Dose:
分子量: 364.9 分配係数: 6.37(logP, 23°C)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (Life Science Research, 1988)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 備考: CHL細胞 (日産化学, 1988)
2-tert-butyl-5-(4-tert-butyl-benzylthio)-4-chloropyridazin-3(2H)-one	MN: — 備考: (日産化学, 1988)
	その他: 体細胞突然変異試験 — (Life Science Research, 1988)
CAR: —	TEG: —

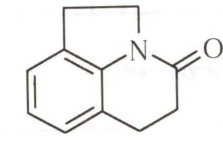
## 84. Pyrifenox

Cas.No.: 88283-41-4 文献No.: 16, 355-359 (1991)

種類: 殺菌剤 商品名: ポジグロール	Rec: — 抗菌性: ? Dose: ~1000 ug/disk
分子量: 265.17 分配係数: 2.51(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 ug/plate 備考: TA1535, TA1537, TA100, TA98, 大腸菌 (日本ロシ研究所, 1987)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: -S9: 12, 60, 120 ug/ml, +S9: 10.5, 52.5, 105 ug/ml 備考: Human lymphocytes, キヤツを含めると僅かに増加 (HRC, 1983)
2',4'-dichloro-2-(3-pyridyl)acetophenone(EZ)-O-methyloxime	MN: ? 備考:
	その他:
CAR: —	TEG: —

## 85. Pyroquilon

Cas.No.: 57369-32-1 文献No.: 11, 659-661 (1986)

種類: 水田用殺菌剤 商品名:	Rec: — 抗菌性: — Dose: ~2000ug/disk
分子量: 173.22 分配係数: オクタノール 70g/l(20°C)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: ~10000 ug/plate 備考: (残農研, 1982)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
1,2,5,6-tetrahydropyrrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-one	MN: ? 備考:
	その他:
CAR: —	TEG: —

## 86. Quinalphos

Cas.No.: 13593-03-8 文献No.: 16, 337-342 (1991)

種類: 殺虫剤 商品名: エカラック Ekalux	Rec: — 抗菌性: — Dose: 0, 500, 1000, 5000, 10000ug/disk
分子量: 298.3 分配係数:	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 ug/plate 備考: (Biosafety Research Center, Food, Drugs, and Pesticides, 1981 ; HRC, 1980)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考: in vivo染色体異常試験 — (HRC, 1980)
O,O-diethyl O-quinoxalin-2-yl phosphorothioate	MN: — 備考: ICRマウス 0, 2.5, 8, 25 mg/kg x 2 (Sandoz Ltd., 1979)
	その他:
CAR: —	TEG: —

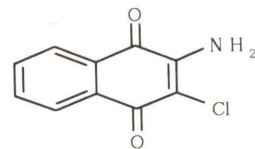
## 87. Quinclorac

Cas.No.: 84087-01-4 文献No.: 15, 647-651 (1990)

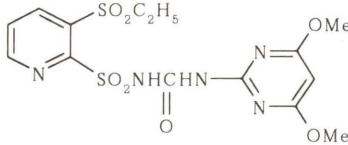
種類: 除草剤 商品名: FACET WP	Rec: — (±S9) 抗菌性: -S9(10000 ug/plate) + Dose: 1~10000ug/plate
分子量: 242.1 分配係数: -1.164(pH7 22°C):logP	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 20~5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (BASF, 1988)
	CA (in vitro): + (直) + (±S9) Dose: -S9: 250, 500, 1000 ug/ml; +S9: 500, 1000, 2000 ug/ml 備考: Human lymphocytes (細胞毒性あり) (BASF, 1986), in vivo染色体異常試験 (Chinese hamster)で — (~8000 mg/kg) (BASF, 1988)
3,7-Dichloroquinoline-8-carboxylic acid	MN: — 備考: NMRI マウス 500, 1000, 2000 mg/kg X 1 (0.5% CMC) (BASF, 1986)
	その他:
CAR: —	TEG: —

## 88. Quinoclamlin

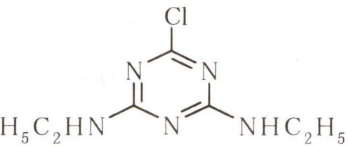
Cas.No.: 2797-51-5 文献No.: 18, S19-S24 (1993)

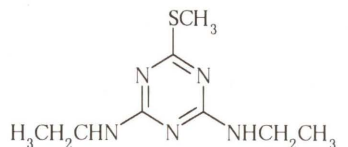
種類: 除草剤 商品名: Mogeton	Rec: — 抗菌性: ? Dose: 0.1~20ug/disk
分子量: 207.62 分配係数: 1.53(logP)	Ames: — (-S9) — (+S9) Dose: 0.1~500 ug/plate 備考: Institute of Environmental Toxicology(1978)
	CA (in vitro): — (直) + (±S9) Dose: -S9: 1.125~9 ug/ml; +S9: 2.25~18 ug/ml 備考: Human lymphocytes 2つのdonor由来の片方で + (9, 18 ug/ml, +S9) (Toxicol Laboratories Ltd, 1987)
2-amino-3-chloro-1,4-naphthoquinone	MN: — 備考: LACA系マウス 125, 250, 500 mg/kg ip (Tox. Lab. Ltd, 1987)
	その他:
CAR: —	TEG: —

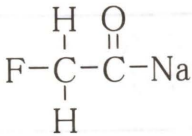


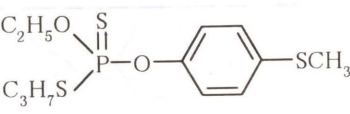
89. Rimsulfuron	Cas.No.: 文献No.: 22, 356—359 (1997)
種類: 除草剤 商品名: リムスルフロン	Rec : — 抗菌性: — Dose : 70~2220 $\mu$ g/disk
分子量: 431.4 分配係数: 0.0344(logPow, 25°C, pH7)	Ames : — (-S9) — (+S9) Dose : サルモネラ ~2000 $\mu$ g/plate, 大腸菌 ~5000 $\mu$ g/plate 備考: (残農研, 1994)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 100~1300 $\mu$ g/ml 備考: Human lymphocytes (米国デュポン社ハスケル研究所, 1989)
1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-(3-ethylsulfonyl-2-pyridylsulfonyl) urea	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: —

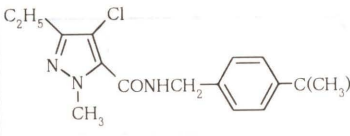
90. Shiitake water	Cas.No.: 1078040—58—2 文献No.: 17, S275—S276 (1992)
種類: 抗ウイルス剤 商品名: レンテミン	Rec : — 抗菌性: — Dose : ~1000 $\mu$ g/disk
分子量: 分配係数:	Ames : (+) (-S9) (+) (+S9) Dose : 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 $\mu$ g/plate 備考: TA100 (5000 $\mu$ g) 弱陽性 (ヒスチジンに関係なし), プレインキュベーション法 — (残農研, 1979)
構造式なし	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
シイタケ菌糸体抽出液	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: ?

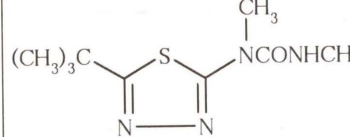
91. Simazine	Cas.No.: 122—34—9 文献No.: 15, 315—318 (1990)
種類: 除草剤 商品名: シマジン	Rec : — 抗菌性: ? Dose : 100~10000 $\mu$ g/well
分子量: 201.66 分配係数: 1.96(logP)	Ames : — (-S9) — (+S9) Dose : 50~10000 $\mu$ g/plate 備考: (野村総合研究所, 1979)
	CA (in vitro): — (直) — (±S9) Dose: 6.25~100 $\mu$ g/ml 備考: Human lymphocytes (「チハガイキ」・スイス, 1988); CHL細胞 — (45 $\mu$ g/ml) (石館, 1987)
2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-s-triazine	MN: ? 備考:
	その他: HMA— (スタンフォード・リサーチ, 1977)
	CAR: ? TEG: —

92. Simetryn	Cas.No.: 1014—70—6 文献No.: 17, S315—S318 (1992)
種類: 水田用除草剤 商品名: ギーボン	Rec : — 抗菌性: ? Dose : 100~10000 $\mu$ g/Well
分子量: 213.3 分配係数: 2.60(logP)	Ames : — (-S9) — (+S9) Dose : 50~5000 $\mu$ g/plate 備考: (野村総合研究所, 1979)
	CA (in vitro): — (直) ? (±S9) Dose: 備考: CHL細胞 (-S9: 250 $\mu$ g/ml) (石館, 1987)
2-methyltio-4,6-bis(ethylamino)-s-triazine	MN: ? 備考: in vivo染色体異常試験で — (「チハガイキ」・スイス, 1981)
	その他:
	CAR: — TEG: —

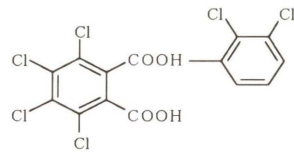
93. Sodium fluoroacetate	Cas.No.: 62—74—8 文献No.: 18, S157—S159 (1993)
種類: 殺鼠剤 商品名:	Rec : ? 抗菌性: ? Dose :
分子量: 100 分配係数:	Ames : — (-S9) — (+S9) Dose : 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu$ g/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537(プレインキュベーション法)(日本バイオリサーチセンター, 1988)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
Sodium Monofluoroacetate	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: ?

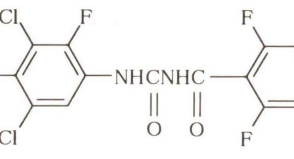
94. Sulprofos	Cas.No.: 35400—43—2 文献No.: 12, 775—779 (1987)
種類: 殺虫剤 商品名:	Rec : — 抗菌性: — Dose : 1~100 % (DMSO) $\times$ 0.02 ml/disk
分子量: 322.43 分配係数: 4.9(logP)	Ames : — (-S9) — (+S9) Dose : 10~5000 $\mu$ g/plate 備考: (残農研, 1980)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
O-ethyl O-(4-methylthiophenyl) S-propyl phosphorodithioate	MN: ? 備考:
	その他: DLT — (バリエル, 1975)
	CAR: — TEG: —


95. Tebufenpyrad	Cas.No.: 119168—77—3 文献No.: 20, 555—558 (1995)
種類: 殺ダニ剤 商品名:	Rec : — 抗菌性: ? Dose : 200~10000 $\mu$ g/disk
分子量: 333.9 分配係数: 5.04(logP)	Ames : — (-S9) — (+S9) Dose : 50~5000 $\mu$ g/plate 備考: (Life Science Research, 1990)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:
N-(4-tert-Butylbenzyl)-4-chloro-3-ethyl-1-methylpyrazole-5-carboxamide	MN: — 備考: 75, 150, 300 mg/kg x 1 (CD-1マウス) (Life Science Research, 1990)
	その他:
	CAR: — TEG: —

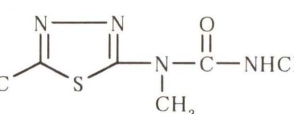
96. Tebuthiuron	Cas.No.: 34014—18—1 文献No.: 17, S35—S38 (1992)
種類: 非農耕地用除草剤 商品名:	Rec : — (±S9) 抗菌性: ? Dose : 20~5000 $\mu$ g/disk
分子量: 228.32 分配係数: 61(Kow)	Ames : — (-S9) — (+S9) Dose : 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 $\mu$ g/plate 備考: (残農研, 1983)
	CA (in vitro)(+)(直) (+)(±S9) Dose: -S9: 1500~2100 $\mu$ g/ml; +S9: 1350~1550 $\mu$ g/ml 備考: CHO細胞, -S9: 1950 $\mu$ g/ml; +S9: 1550 $\mu$ g/ml で (+) (リリ一研究所, 1989)
1-(5-tert-butyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-1,3-dimethylurea	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: — TEG: —

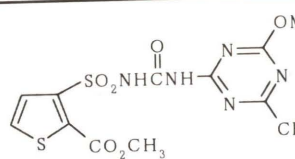


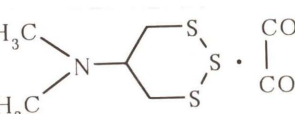
97. <b>Tecloftalam</b>	Cas.No.: 76280-91-6 文献No.: 13, 629-632 (1988)
種類: 殺菌剤 商品名: シラハゲンS 分子量: 447.9 分配係数: 2.17(logP)	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 1000, 3000, 10000 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 300, 1000, 3000, 10000 ug/plate 備考: (秦野研, 1979)
 <p>3,4,5,6-tetrachloro-N-(2,3-dichlorophenyl)-phthalamic acid</p>	<p>CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 100, 200, 400uM(6, 12, 24hr) 備考: Don細胞 (野村生物化学研究所, 1985)</p> <p>MN: ? 備考:</p> <p>その他:</p> <p>CAR: ? TEG: -</p>

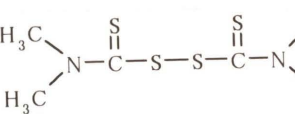
98. <b>Teflubenzuron</b>	Cas.No.: 83121-18-0 文献No.: 18, S15-S18 (1993)
種類: 殺虫剤 商品名: 分子量: 381.1 分配係数: 4.56(logP)	Rec: - 抗菌性: - Dose: 50~5000 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~5000 ug/plate 備考: (残農研, 1986)
 <p>1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea</p>	<p>CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 3.3 E-7 M ~ 3.3 E-4 M 備考: CHL細胞 (残農研, 1986)</p> <p>MN: ? 備考:</p> <p>その他:</p> <p>CAR: ? TEG: -</p>

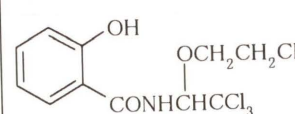
99. <b>Thallium sulfate</b>	Cas.No.: 10031-59-1 文献No.: 18, S209-S211 (1993)
種類: 殺菌剤 商品名: タリウム「大塚」, メリーネコ6号, メリーネコタリウム 分子量: 504.85 分配係数:	Rec: ? 抗菌性: ? Dose: Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 備考: 菌の発育阻害 (312.5 μg/plate以上) (日本ハイオリサーチセンター, 1988)
 <p>thallium sulfate</p>	<p>CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:</p> <p>MN: ? 備考:</p> <p>その他:</p> <p>CAR: ? TEG: ?</p>

100. <b>Thiazafluron</b>	Cas.No.: 25366-23-8 文献No.: 18, S225-S228 (1993)
種類: 除草剤 商品名: 分子量: 240.2 分配係数:	Rec: - 抗菌性: - Dose: ~15000 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~5000 ug/plate 備考: (野村総研, 1980)
 <p>1,3-dimethyl-1-(5-trifluoromethyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl) urea</p>	<p>CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 625.0 (18hr), 312.5 (42hr), +S9: 1250.0 (3-15, 39 hr) 備考: CHO細胞 (チハガイキ・スイス, 1990)</p> <p>MN: ? 備考:</p> <p>その他:</p> <p>CAR: ? TEG: -</p>

101. <b>Thifensulfuron-methyl</b>	Cas.No.: 79277-67-1 文献No.: 18, S219-S223 (1993)
種類: 除草剤 商品名: DPX-M6316 分子量: 387.4 分配係数: 0.027(Kow, pH7)	Rec: - 抗菌性: - Dose: 100~4000 ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: E.coli (200-5000 ug/plate); Salmonella (0.5-5000 ug/plate) 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (残農研, 1990)
 <p>methyl 3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-2-thenoate</p>	<p>CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: ~2.8 mg/ml 備考: Human lymphocytes (米国デューボン・ハスケル研究所, 1987)</p> <p>MN: ? 備考:</p> <p>その他:</p> <p>CAR: - TEG: -</p>

102. <b>Thiocyclam</b>	Cas.No.: 31895-22-4 文献No.: 12, 339-342 (1987)
種類: 殺虫剤 商品名: エビセクト 分子量: 271.4 分配係数:	Rec: - 抗菌性: + Dose: 100-2000ug/disk Ames: (+)(-S9) (+)(+S9) Dose: 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 ug/plate 備考: WP2hcr + (残農研, 1979)
 <p>5-dimethylamino-1,2,3-trithiane hydrogenoxalate</p>	<p>CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:</p> <p>MN: - 備考: ddYマウス(10.7, 21.4, 42.7, 85.3 mg/kg X 2, p.o. (0.5% CMC-Na) (野村総研, 1982)</p> <p>その他:</p> <p>CAR: - TEG: ?</p>

103. <b>Thiuram</b>	Cas.No.: 137-26-8 文献No.: 15, 507-510 (1990)
種類: 殺菌剤 商品名: グリーンチオノック(80%) 分子量: 240.43 分配係数: 9.3(50°C):Kow?	Rec: (+)(~1.0 ug) 抗菌性: ? Dose: 0.1~10ug/disk Ames: (+)(-S9) (+)(+S9) Dose: 1~1000 ug/plate 備考: (残農研, 1978)
 <p>Bis(dimethylthiocarbamoyl)disulfide</p>	<p>CA (in vitro): - (直) ? (±S9) Dose: 30, 60 ug/ml 備考: CHL細胞 +S9? (国立衛試, 1989)</p> <p>MN: - 備考: BDF1マウス (550, 1100, 2200 mg/kg) (残農研, 1987)</p> <p>その他:</p> <p>CAR: - TEG: -</p>

104. <b>Trichlamide</b>	Cas.No.: 70193-21-4 文献No.: 13, 395-399 (1988)
種類: 土壌殺菌剤 商品名: ハタクリン粉剤 分子量: 340.65 分配係数: 28500(Kow, 25°C)	Rec: - 抗菌性: - Dose: 2~20000ug/disk Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: サルモネラ (0~500 ug/plate), 大腸菌 (0~5000 ug/plate) 備考: (残農研, 1981)
 <p>N-(1-butoxy-2,2,2-trichloroethyl) salicylamide</p>	<p>CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: 備考:</p> <p>MN: ? 備考:</p> <p>その他:</p> <p>CAR: - TEG: -</p>



## 105. Tricyclazole

Cas.No.: 41814-78-2 文献No.: 14, 407-413 (1989)

種類: 殺菌剤 商品名: BEAM	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 20~20000 ug/disk
分子量: 189.24 分配係数: 25.0(Kow)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 10~50000 ug/plate 備考: (Institute of Environmental Toxicology, 1978)
	CA (in vitro): - (直) + (±S9) Dose: -S9: 12.5~280 ug/plate, +S9: 12.5~50 ug/plate 備考: CHL使用, -S9: IC50の3倍で+, +S9: IC50以下で+ (Chemical Inspection and Testing Institute, 1987)
5-methyl-1,2,4-triazole(3,4-b)benzothiazole	MN: - 備考: CD-1マウス(100, 200, 300 mg/kg X 1) (Lilly Research Laboratories, 1988)
	その他: in vivo SCE - (Lilly Research Laboratories, 1981)
	CAR: - TEG: -

## 106. Trifluralin

Cas.No.: 1582-09-8 文献No.: 16, 557-561 (1991)

種類: 除草剤 商品名: トリファノサイド	Rec: - 抗菌性: ? Dose: ~2000ug/disk
分子量: 335.33 分配係数: 6.0(logP)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: ~3000 ug/plate 備考: (残農研, 1977)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: -S9: 30 ug/ml, +S9: 100 ug/ml 備考: CHO細胞 (リリー研究所, 1989)
a,a,a-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidin	MN: ? 備考:
	その他: MLA -, HMA -, SCE -, DLT-
	CAR: 膀胱腫瘍 (ラット, 腎結石) TEG: -

## 107. Trinexapac-ethyl

Cas.No.: &lt;未決定&gt; 文献No.: 22, 351-355 (1997)

種類: 植物生長調節剤 商品名: トリネキサパックエチル	Rec: ? 抗菌性: ? Dose: -
分子量: 252.3 分配係数: 1.60(logPow,pH5.3)	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 313, 625, 1250, 2500, 5000 μg/plate 備考: (残農研, 1994)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/ml 備考: Human lymphocytes (チバガイギー社, 1989)
4-(cyclopropyl-α-hydroxy-methylene)-3,5-dioxocyclohexanecarboxylic acid ethyl ester	MN: - 備考: 700, 1500, 3000 mg/kg X 1 (16, 24, 48 hr)
	その他: 体細胞突然変異 (V79細胞 HGPRT) -, MLA -, Human fibroblast DNA修復試験 -, ラット肝UDS -
	CAR: ? TEG: -

## 108. Validamycin A

Cas.No.: 37248-47-8 文献No.: 17, S29-S34 (1992)

種類: 殺菌剤 商品名:	Rec: - 抗菌性: ? Dose: 20~2000 ug/disk
分子量: 497.5 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: S9 -: 10~1000 ug/plate, +S9: 10~3000 ug/plate 備考: (残農研, 1977)
	CA (in vitro): - (直) - (±S9) Dose: 1250, 2500, 5000 ug/ml (-S9: 24, 48hr, +S9: 18hr) 備考: CHL細胞 (化検協, 1988)
1L-(1,3,4/2,6)-2,3-dihydroxy-6-hydroxymethyl-4-[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-hydroxymethylcyclohex-2-enylamino]cyclohexyl B-D-glucopyranoside	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -

## 109. Warfarin

Cas.No.: 81-81-2 文献No.: 18, S163-S166 (1993)

種類: 殺鼠剤 商品名: ラデミン, ローダン, ヤソミン, メリーネコ 他	Rec: ? 抗菌性: ? Dose: -
分子量: 308.32 分配係数:	Ames: - (-S9) - (+S9) Dose: 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 ug/plate 備考: TA100, TA98, TA1535, TA1537 (フラインキューション法) (日本バイオリサーチセンター, 1987)
	CA (in vitro): ? (直) ? (±S9) Dose: - 備考:
3-(a-acetonylbenzyl)-4-hydroxycoumarin	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: ? TEG: ?

## 110. Ziram

Cas.No.: 137-30-4 文献No.: 17, S155-S158 (1992)

種類: 殺菌剤 商品名: パルノックス水和剤(ジラム 50%, チウラム 30%)	Rec: + (7mm) 抗菌性: - Dose: -
分子量: 305.8 分配係数: 3.4(水50°C):Kow?	Ames: (+)(-S9) (+)(+S9) Dose: - 備考: TA100株 (残農研, 1987)
	CA (in vitro): + (直) + (±S9) Dose: -S9: 0.38~3.06 ug/ml, +S9: 0.76~12.23 ug/ml 備考: 異常出現頻度: -S9: 1.5~50.5% (再試 85.0%), +S9: ~49.0% (再試 ~25%) (残農研, 1988)
Zinc dimethyldithiocarbamate	MN: ? 備考:
	その他:
	CAR: - TEG: -



変異原性関連ホームページアドレスリスト

インターネットの利用により，多くの情報を容易に入手できるようになってきた．以下に，各国の環境変異原学会，研究機関，雑誌，データベースサイトなど，変異原性試験に関連したホームページのアドレスを掲載する．各ホームページには，さらに関連サイトへのリンクが張られている場合があるので，上手に活用されたい．（日本グラクソ(株) 森田 健 記）

変異原性関連ホームページアドレスリスト	
ホームページ	URL アドレス*
各環境変異原学会	
日本環境変異原学会 JEMS・MMS 研究会 EEMS (European Environmental Mutagen Society) EMS (Environmental Mutagen Society) IAEMS (International Association of Environmental Mutagen Societies) UKEMS (UK Environmental Mutagen Society) ANZEMS (Australia & New Zealand EMS) ヨーロッパ諸国の EMS ホームページ集	<a href="http://dgm2alpha.nihs.go.jp/jems">http://dgm2alpha.nihs.go.jp/jems</a> <a href="http://member.nifty.ne.jp/atsushi_hyogo/mms/">http://member.nifty.ne.jp/atsushi_hyogo/mms/</a> <a href="http://www.tno.nl/~eems/">http://www.tno.nl/~eems/</a> (新アドレス <a href="http://193.51.164.11/eems/index.htm">http://193.51.164.11/eems/index.htm</a> ) <a href="http://www.ornl.gov/TechResources/ems/hmepg.html">http://www.ornl.gov/TechResources/ems/hmepg.html</a> <a href="http://www.iaems.nl/">http://www.iaems.nl/</a>  <a href="http://www.swan.ac.uk/cget/newuk1.htm">http://www.swan.ac.uk/cget/newuk1.htm</a> <a href="http://www.latrobe.edu.au/www/microbio/ANZEMS.html">http://www.latrobe.edu.au/www/microbio/ANZEMS.html</a> <a href="http://www.tno.nl/~eems/eems3.htm">http://www.tno.nl/~eems/eems3.htm</a>
雑誌関連	
Carcinogenesis Electric Journals & News letters Mutagenesis Mutation Research Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis The Molecular Carcinogenesis Usaco 雑誌リンク 日経バイオテクノロジー	<a href="http://www.oup.co.uk/carcin/">http://www.oup.co.uk/carcin/</a> <a href="http://gort.ucsd.edu/newjour/">http://gort.ucsd.edu/newjour/</a> <a href="http://www.oup.co.uk/jnls/list/mutagen/abstinde/">http://www.oup.co.uk/jnls/list/mutagen/abstinde/</a> <a href="http://www1.elsevier.com/journals/mutres/menu.htm">http://www1.elsevier.com/journals/mutres/menu.htm</a> <a href="http://www.interscience.wiley.com/jpages/0270-3211/">http://www.interscience.wiley.com/jpages/0270-3211/</a> <a href="http://www.icr.ac.uk/molcarc/molcarc.html">http://www.icr.ac.uk/molcarc/molcarc.html</a> <a href="http://www.usaco.co.jp/links.htm">http://www.usaco.co.jp/links.htm</a> <a href="http://biotech.nikkeibp.co.jp/BIO.shtml">http://biotech.nikkeibp.co.jp/BIO.shtml</a>
研究機関	
IARC (International Agency for Research on Cancer) NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) NIH (National Institute of Health) NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) Oak Ridge National Laboratory US Environmental Protection Agency US FDA (Food and Drug Administration) WHO Home Page Leiden University 国立がんセンター	<a href="http://www.iarc.fr/">http://www.iarc.fr/</a> <a href="http://www.niehs.nih.gov/">http://www.niehs.nih.gov/</a> <a href="http://www.nih.gov/">http://www.nih.gov/</a> <a href="http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html">http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html</a>  <a href="http://www.ornl.gov">http://www.ornl.gov</a> <a href="http://www.epa.gov/">http://www.epa.gov/</a> <a href="http://www.fda.gov/default.html">http://www.fda.gov/default.html</a> <a href="http://www.who.ch/">http://www.who.ch/</a> <a href="http://www.medfac.leidenuniv.nl/RadGen/">http://www.medfac.leidenuniv.nl/RadGen/</a> <a href="http://www.info.ncc.go.jp/">http://www.info.ncc.go.jp/</a>







# 日本環境変異原学会

役員名簿(平成10年度)

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

賞等選考委員

祖父尼俊雄  
田中 憲穂  
森 秀樹  
清水 英祐  
太田 敏博  
葛西 宏  
鎌滝 哲也

編集委員

(委員長)須藤 鎮世  
降旗 千恵  
荒木 明宏  
森田 健  
鈴木 勇司  
松岡 厚子  
矢嶋 信浩

企画委員

菊川 清見  
布柴 達男  
望月 正隆  
長尾美奈子  
島田 弘康  
林 真

評議員名簿(平成10~11年度)

(五十音順)

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

## 日本環境変異原学会入会申込書

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の署名を添えて申し込みます。

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

\_\_\_\_\_の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。

指導教官

(署名)

日付

印

入会申込書の送付先: 〒170-0003 東京都豊島区駒込1-44-2 芥川ビル  
財団法人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。陰性データも受けける。

「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。陰性データも受けける。「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,最新の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付加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りは招待寄稿の場合も含め,すべて著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申し込み書に50部単位で申し込むこと。

論文原稿の送付先

〒170-0003

東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル

インテルナ出版

日本環境変異原学会誌編集係

Tel. 03-3944-2591

Fax. 03-3947-8073

最終稿の送付先,その他編集についての問い合わせ先

〒305-8566

茨城県つくば市東1-1

生命工学工業技術研究所

日本環境変異原学会 編集委員長

須藤 鎮世

Tel. 0298-54-6502

Fax. 0298-54-6095

E-mail sutou@nibh.go.jp



## 環境変異原研究 執筆規定

- 用語は日本語または英語とする。
- 原稿は原則としてワープロを用い、左横書きで作成する。  
 日本語の原稿：  
 原稿はA4判用紙に1行約40字、1頁30～31行で印字する(刷り上がりの約1/2頁に相当する)。ただし、要約は英文(300語以内)とする。また、別に英文の題名、著者名(フルネーム)、所属機関名ならびに所在地を付ける。  
 英文の原稿：  
 原稿はA4判用紙にダブルスペースで印字する。1頁25～27行を標準とする。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。
- 論文の記述は、第1頁は表題、著者名、所属および所在地、第2頁は英文の要約(Summary)およびキーワード(英文5語以内、固有名詞や遺伝子名などで大文字の使用が必要な場合を除き、原則として小文字表記とする)、第3頁以下、緒言(Introduction)、実験材料および方法(Materials and Methods)、結果(Results)、考察(Discussion)または結果および考察、結語(Conclusion)、謝辞(Acknowledgments)、参考文献(References)、表、図の説明および図の順序とする。ただし、総説の記述は、第3頁以下、緒言、1. ...., 2. ...., 結語、謝辞、参考文献、表、図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明文はすべて英文とする。
- 学名、遺伝子記号などはイタリックとし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
- 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、化学物質のCAS登録番号を記載する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる(文頭の場合は大文字)。
- 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
- 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
- 句読点はカンマ(,)およびピリオド(.)とする。
- 表、図(写真)は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号Fig. 1, 2...を付し、原則として英文の説明文を別紙に添える。
- 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面にFig. 1, 2...および上下を鉛筆書きし、A4判の台紙に一枚ずつ軽く糊付けする。台紙の下部に

Fig. (一連番号)を付す。

- 表は上部に一連の番号Table 1, 2...と原則として英文の説明を記入すること(文頭のみ大文字)。表には縦罫を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するときに表示の語句の右肩にa, b, c...を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
- 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
- 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名はChemical Abstractsの記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁(単行本の一部引用の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁)の順とする。単行本そのものを引用する場合は、編者名あるいは著者名、年号、書名、発行所、発行地の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。

Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-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.

Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D. C.

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, 外村品(編), *染色体異常*, 朝倉書店, 東京, pp. 107-113.

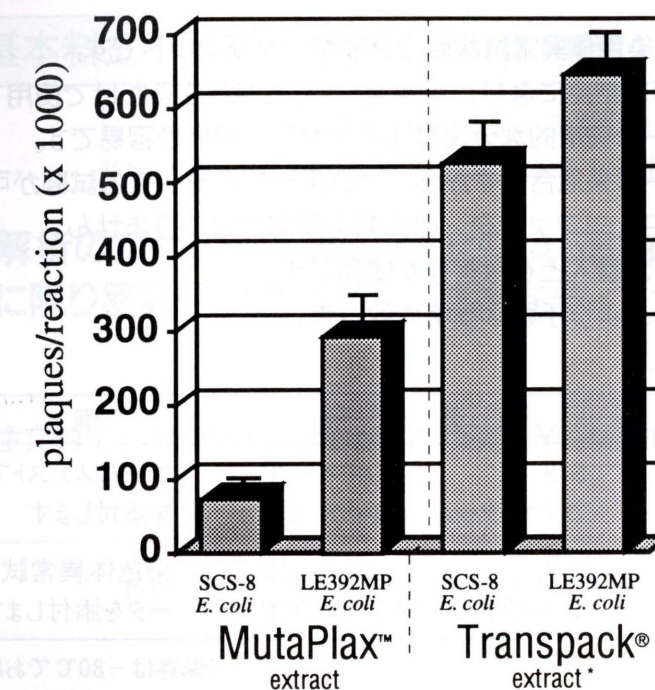
松影昭夫(編)(1996)DNA複製、修復と発癌, 羊土社, 東京.

改訂(1998年9月, 下線部)

一部追記(1999年1月)

# Make No Mistake!

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



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

Now available to researchers using Muta™ Mouse  
with proof of Muta Mouse purchase.

\* U.S. Patent No. 5,188,957  
 ♦ Using SCS-8 *E. coli* host cells

Big Blue® and Transpack® are registered trademarks of Stratagene  
 Muta™ Mouse is a trademark of HRP Inc.  
 MutaPlax™ is a trademark of Epicentre Technologies Corp.



**STRATAGENE®**

pioneering the future of in vivo mutation research

お問い合わせ先:

**KASHO 加商株式会社**  
 ライフサイエンスグループ

〒103-0024 東京都中央区日本橋2丁目14番9号  
 電話 03-3276-7676 FAX.03-3276-7626  
 E-mail: Tsumoru\_Miyano@kasho.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

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

製 品 名	包 装 単 位	備 考
エームテスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml×10本 コファクターA 9ml×10本	エームテストでのデータ を添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 2ml×3本 コファクターC 4.7ml×3本	染色体異常試験でのデ ータを添付します

(保存は-80℃でお願い致します)

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

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

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

製造元

 **オリエンタル酵母工業株式会社**  
飼料・バイオ事業部

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

販売元

 **和光純薬工業株式会社**

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
電話 (06) 6203-3741 (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)

AI-C

トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に！

## DNAシーケンシング受託サービス

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

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

基本料金：¥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引致します！  
(サンプルの本数や状態に応じて別途お見積もり致します。)

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

《累計注文数》 1run~50runまで 定価 ¥12,000 → 15% off → ¥10,200/run

51run~100runまで 定価 ¥12,000 → 20% off → ¥9,600/run

101run~ 定価 ¥12,000 → 25% off → ¥9,000/run

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

1runからでも ¥7,200/run 40% off

突然変異部位の解析も別途料金にて承ります！

サンプルは、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シーケンシングも承っておりますので、お気軽にご相談下さい。

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](mailto:acgt@bio.ai-c.co.jp)



# KIKKOMAN S-9

このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

## 変異原性試験用 凍結S-9

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

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

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

### ●活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

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

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

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

※ Salmonella typhimurium

## エームス試験用凍結S-9MIX

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

●包装単位：10ml×8本、5ml×4本

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

## 染色体異常試験用凍結S-9MIX

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

●包装単位：3.5ml×3本

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



-S-9 Mix



+S-9 Mix

**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(6338)1518 FAX.06(6338)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

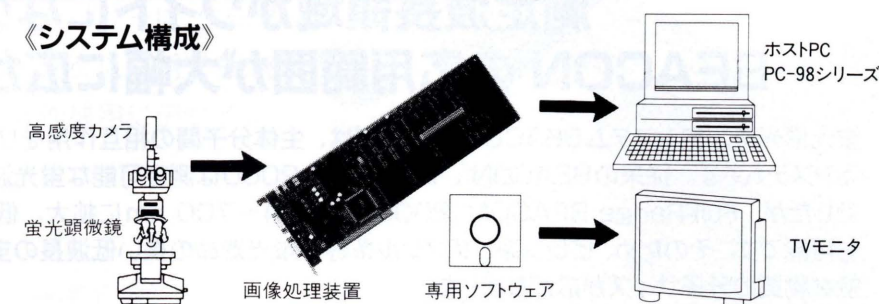
SCG試験に必要なデータを計測します。

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

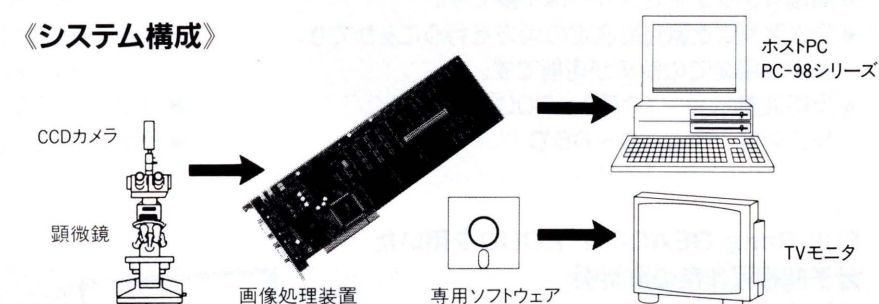
UDS試験に必要なデータを計測します。

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数及び、NETグレイ数の計測が行なえます。

### 《計測内容》

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

### 《システム構成》



## 小核画像解析システム

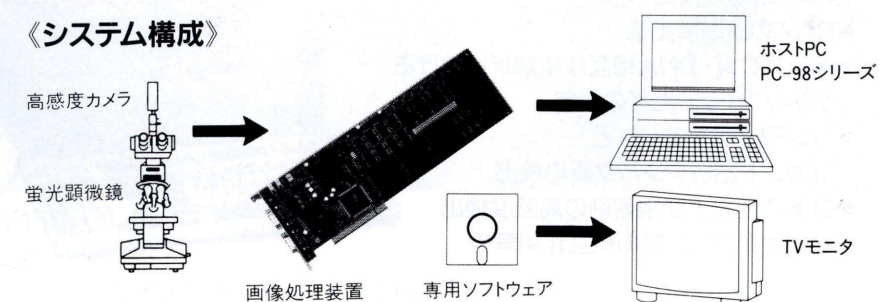
小核試験に必要なデータを計測します。

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》



特許出願中

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®**

**ケイオー電子工業株式会社**

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



# TaKaRa

BIOMEDICALS

蛍光偏光度測定システム

## Full-Range BEACON® 2000

Bio  
Engineering  
Research

測定波長領域がワイドになり、  
BEACON®の応用範囲が大幅に広がりました。

蛍光偏光度測定システムBEACON®シリーズは、生体分子間の相互作用をリアルタイムで測定・解析できるシステムです。従来のBEACON®、BEACON® 2000は測定可能な蛍光波長領域が360~700 nmでしたが、Full-Range BEACON® 2000では254~700 nmに拡大。低波長領域の蛍光色素の測定も可能です。そのため、ピレン系、ダンシル系等の蛍光寿命の長い低波長の蛍光物質も使用でき、解析可能な物質の分子サイズが広がりました。

### 特長

- 固定化や、反応後の抽出分離、洗浄操作を必要としないホモジニアス系での解析が可能です。
- 高価なチップやセンサーは不要です。
- 蛍光度測定と偏光度測定の両方を行うことができ、多様な用途での解析が可能です。
- 反応液量 : 100~500  $\mu$ l
- 反応温度 : 6~65℃

### 仕様

- 測定波長領域 : 254~700 nm
- 感度 :  $10^{-11}$  M (蛍光偏光度測定)  
 $10^{-13}$  M (蛍光度測定)
- 光源 : 高出力クォーツハロゲンランプ  
水銀ランプ
- 寸法 : 53 (W)  $\times$  38 (D)  $\times$  24 (H) cm
- 重量 : 17.9 kg

### Full-Range BEACON® 2000を用いた 分子間相互作用の解析例

- エストロゲンレセプター-リガンド間の相互作用解析 (non-RI)
- non-RIでのイムノアッセイ
- 核酸ハイブリダイゼーション
- PCR産物の検出・定量
- DNAの高感度定量
- タンパク質-DNA相互作用解析におけるゲルシフトアッセイの代用
- リン酸化ペプチドなど  
リガンド結合タンパク質の検出
- 酵素活性および阻害剤の高感度検出
- 糖鎖とタンパク質の相互作用解析



Full-Range  
BEACON® 2000

宝酒造株式会社

東京 バイオ販売課 TEL.03-3271-8553 FAX.03-3271-7282  
大阪 バイオ販売課 TEL.077-565-6979 FAX.077-565-6978

TaKaRa テクニカルサポートライン

TaKaRa製品の技術的なご質問に専門の係がお答えさせていただきます。  
TEL.077-543-6116 FAX.077-543-1977

Now on the Web.

<http://www.takara.co.jp/>

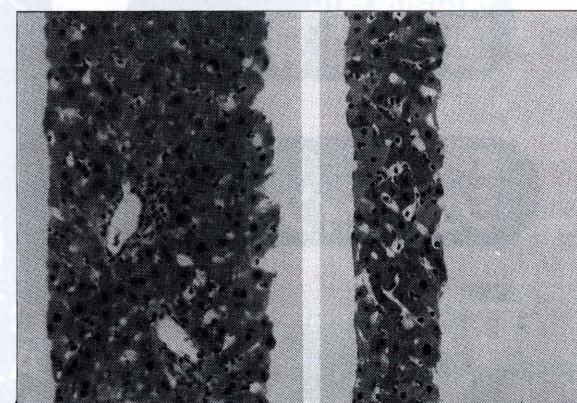
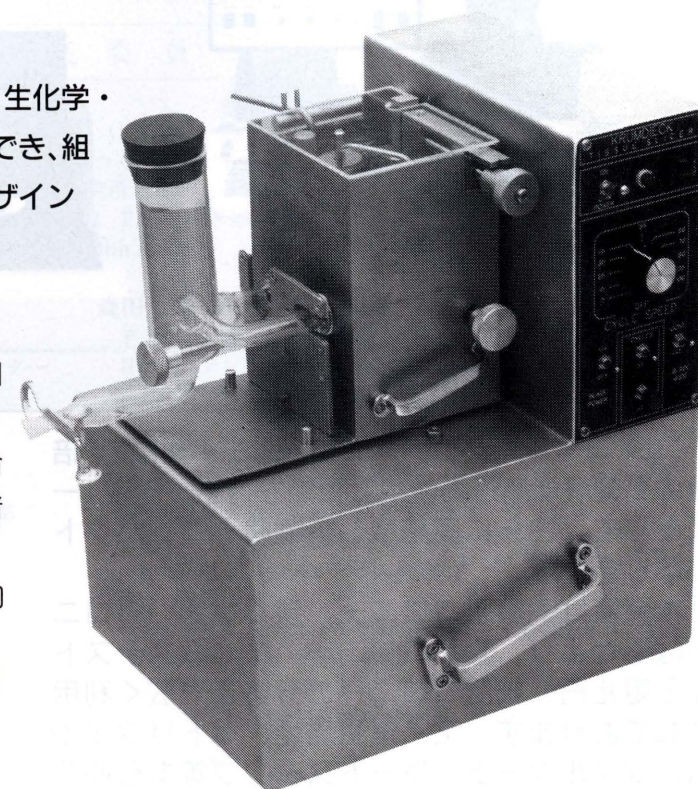
Z039

# THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

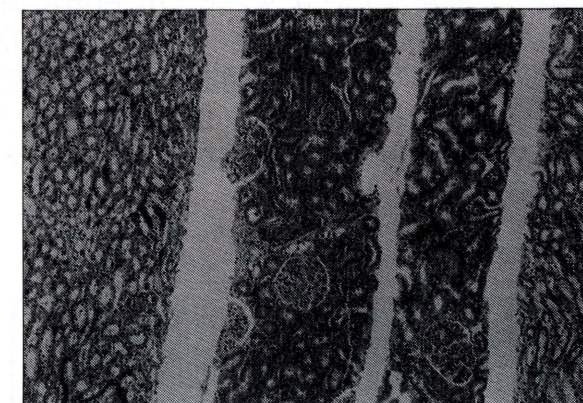
## 生きた組織の無菌スライスができます。

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

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



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

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



販売元

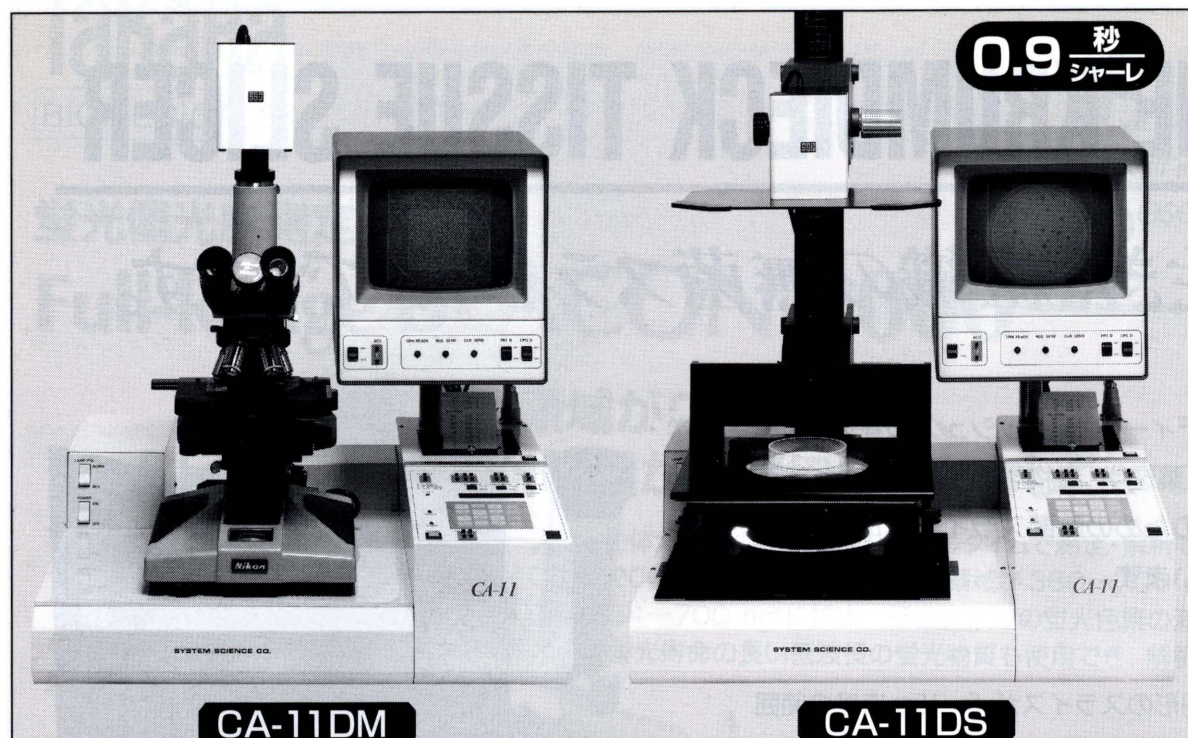
ショーシンEM株式会社

〒444-0241 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14(ショーシンビル)

TEL. (0564) 54-1231番(代表)

FAX. (0564) 54-3207番

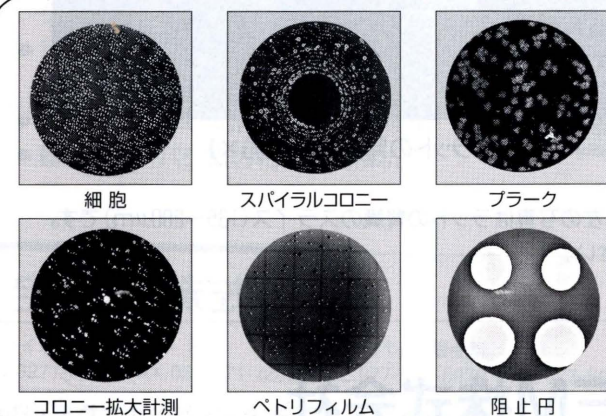




コロニーアナライザーシリーズが、通常の2倍速の高分解能高速画像積算機能を持ち、Dシリーズとして、さらに高感度、低価格、コンパクトになりました。

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

※依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

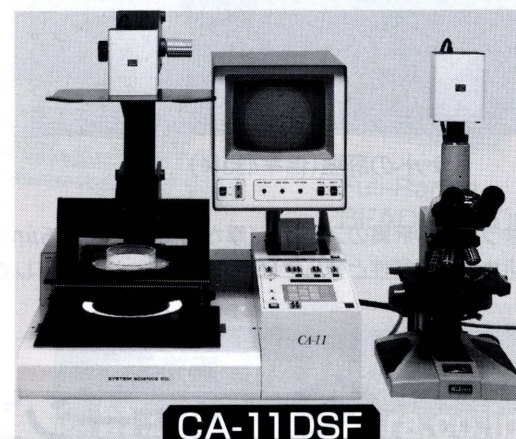


阻止円計測  
コロニー分離計測

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



高速画像積算機能を持ったDシリーズ

コロニーアナライザー  
CA-11Dシリーズ

#### 編集後記

本号では、総説2編、シンポジウム特集1編、一般論文・短報3編および資料・情報2編が寄稿され、多彩な内容となりました。ご協力に感謝いたします。学会は会則の改定に取り組み、更なる飛躍を目指しています。学会の発展には本誌の充実が不可欠です。皆様からの投稿をお待ちしています。

担当編集委員 森田 健

#### 編集委員

須藤 鎮世 (委員長) (1998-)

〒305-8566 茨城県つくば市東1-1

生命工学工業技術研究所

Tel: 0298-54-6502 Fax: 0298-54-6095

E-mail: sutou@nibh.go.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: 03-5449-5625 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.ne.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

E-mail: suzuki@jikei.ac.jp

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

松岡 厚子 (1999-)

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

Tel: 03-3700-1141 Fax: 03-3700-2348

E-mail: matsuo@nihs.go.jp

矢嶋 信浩 (1999-)

〒329-0512 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林519

雪印乳業株式会社・生物科学研究所

Tel: 0285-52-1322 Fax: 0285-53-1314

E-mail: fvbd7044@mb.infoweb.ne.jp

#### 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21巻 第1号 1999年

平成11年2月21日 印刷

平成11年2月28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

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)



## 目 次

### 総 説

- 茶カテキン類の抗変異原性および抗発がん性(I) .....黒田行昭, 原 征彦 1
- 環境のストレスによって誘導される非相同的組換え  
—DNA の切断と再結合の分子機構— .....小方康至, 池田日出男 11

### 一般論文

- 塩素処理水中に検出される消毒副生成物の  
変異原性とその構造活性相関.....加藤美津子, 齋藤治子, 磯田信一, 中澤裕之 23
- 塩素処理した下水細菌培養液中に生成する変異原物質.....伊藤伸一, 畝本 力 31

### 短 報

- Muta<sup>TM</sup> Mouse *lacZ* 導入遺伝子の塩基配列 .....筒井美枝, 築館一男, 羽倉昌志 39

### 第9回公開シンポジウム

#### モデル DNA 損傷と変異機構

- DNA 付加体, 突然変異と発がん .....長尾美奈子, 牛島俊和, 大河内江里子, 落合雅子 45

### 資料・情報

- 農薬の変異原性データ集(1).....石館 基 53
- 変異原性関連ホームページアドレスリスト.....森田 健 83

### 付 記

日本環境変異原学会 会則

平成10年度 役員名簿

10 ~ 11 年度 評議員名簿

10 入会申込書

11 学生会員申込書

環境変異原研究

投稿規定

執筆規定