

環境変異原研究

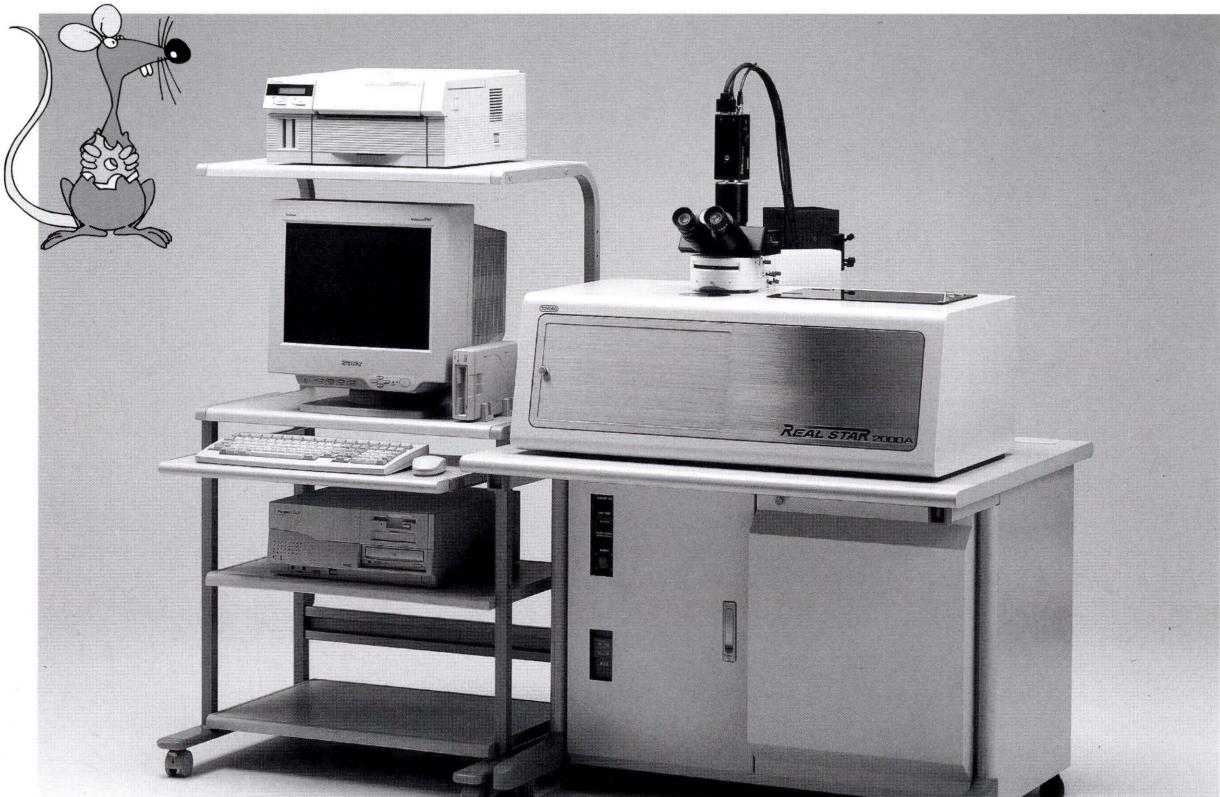
Environmental
Mutagen
Research

Vol.21 No.2 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

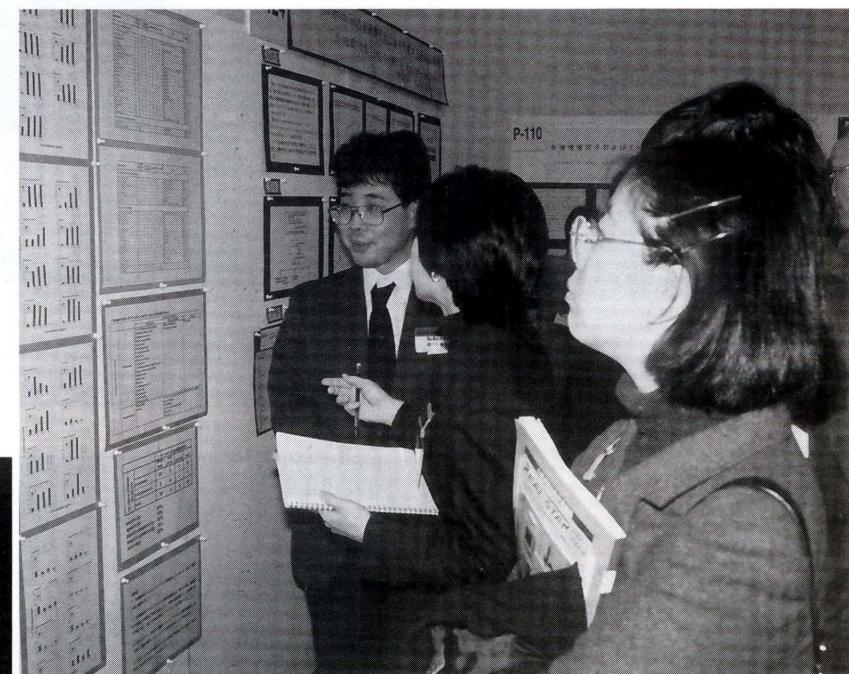
1. スライドグラスに既にアクリジンオレンジが塗布されています。
2. 専用の塗布装置を用いているため、均一な塗布が施されています。
3. グリッドありタイプ(末梢血滴下位置及びカバーグラス貼合せ位置を印刷)とグリッドなしタイプがございます。

日本環境変異原学会 第27回大会

1998年 大阪大会 会場風景

研究所部
子校所

佐山黒大
々田田西
木雅行克
有已昭成
先生先生
先生先生



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



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

DMH ; 1,2-dimethyl hydrazine
EMS ; ethyl methanesulfonate
ENNG ; <i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
Glu-P-1 ; 2-amino-6-methyl dipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazole
IQ ; 2-amino-3-methylimidazo-[4,5- <i>f</i>]quinoline
MNNG ; <i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
MNU ; <i>N</i> -methyl nitrosourea
NDEA ; <i>N</i> -nitrosodiethylamine

NDMA ; <i>N</i> -nitrosodimethylamine
4NQO ; 4-nitroquinoline 1-oxide
PAH ; polycyclic aromatic hydrocarbon
PB ; phenobabital
PhIP ; 2-amino-1-methyl-6-phenyl imidazo[4,5- <i>p</i>] pyridine
TPA ; 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate
(その他)
MMPS ; metalloproteinase
6TG ; 6-thioguanine

緒 言

最近、茶カテキン類の抗変異原性・抗発がん性についてはかなり広範な研究が行われている。本総説の第I報(環境変異原研究第21巻1号掲載)において、緑茶および紅茶の成分であるカテキン、EC、ECG、EGC、EGCG、TFsなどの化学組成や抗発がん性の疫学的研究、抗変異原性の実験的研究、抗発がん性の中で移植性腫瘍や消化器官、乳腺、肝などのがんに対する抗発がん作用について述べた。本第II報においては、これら茶カテキン類の抗発がん性の中で肺、皮膚、多臓器などのがんや白血病、プロモーション、転移などに対する抗がん作用について述べ、さらに抗変異原性や抗発がん性の機構、さらにカテキン類の将来展望などについて述べる。

1. 抗発がん性

1) 肺がん

肺がんに関しては、Katiyar et al.(1993a, 1993b)がA/JマウスでNDEAやB[a]Pで誘発される肺がんに対して、緑茶が抑制作用をもつことを見出した。Komori et al.(1993)も緑茶のポリフェノールが肺がんの誘発を抑制することを報告している。

2) 皮膚がん

皮膚がんについては、マウスに茶を加えた飲み水を与えることによってがんを抑制することが、いくつかの研究によって示されている。UVB(紫外線B)の10日間の照射でイニシエーションを起させ、TPAを25週間与えてプロモーションを起させたマウスや、DMBAでイニシエーションを起させ、TPAまたは紫外線Bでプロモーションを起させたマウスの皮膚がんが、緑茶の水抽出物によって抑制されたことが報告されている(Wang et al., 1992, 1994)。DMBAでイニシエーションを受け、UVBでプロモーションされたマウスの皮膚がんに対しては、紅茶も緑茶と同様に抑制作用のあることが示されている(Wang et al., 1994)。

マウスにUVB照射後13週間の間に生じる良性のがん(ケラトカルシノーマ)および扁平上皮がんが、紅茶を11週間飲ませることによって抑制された。この実験で

は、紅茶によってこれらのがんの増殖が抑えられ、良性および悪性の皮膚がんのアポトーシスを誘導し、がんの数と容積が減少した(Lu et al., 1997)。カフェインを除いた紅茶と緑茶もまた、DMBAでイニシエーションをし、UVBでプロモーションして誘発したマウスの皮膚がんに対して、著しい抑制作用を示した(Wang et al., 1994)。

3) 多臓器発がん

Hirose et al.(1993)は多臓器発がんモデル(Ito et al., 1988)を用いて、餌として与えたGTCやポリフェノールの効果をしらべている。F344系統の雄ラットにDENまたはMNUの腹腔内投与、またはDMHの皮下注射と、飲み水としてBBNまたはDHPNを与え、このラットに餌として1.0%または0.1%のGTCを与えた。

5つの発がん剤を単独に与えたラットは、小腸、大腸、肺臓、肝臓、腎臓などの多臓器に腺腫、がん腫、過形成などを誘発した。ラット1頭あたりの小腸のがん(腺腫およびがん腫)の数は1%GTCを与えることによって有意に減少した。他方において肝発がんの指標としてのグルタチオンS-トランスフェラーゼ(胎盤型陽性肝フォーカスの平方根当たりの数は1%GTCまたは0.1%GTCによって少しではあるが有意に増加した。

4) 白血病

発がん抑制物質の投与が、がん細胞のアポトーシスによる細胞死を引起すという報告がいくつかある(Jiang et al., 1995; Piazza et al., 1995)。Hibasami et al.(1996)はヒトのリンパ性白血病Molt 4 B細胞をGTC、EGC、EGCGおよび柿抽出物(PS)で処理すると、細胞増殖の阻害とアポトーシスの誘導を起すを見出した。アポトーシスを誘導された細胞は、DNAがオリゴヌクレオソームの大きさの断片に分解される特徴があり、この現象はカテキンやPSの濃度および処理時間に依存して起る。

5) がんのプロモーション

正常細胞が悪性のがん細胞に変化する発がんの過程には、イニシエーション、プロモーション、およびプログレッションを含む多段階がある。Yoshizawa et al.(1987)は、この多段階発がん過程で、テレオシンによ

るプロモーションが、EGCGによって抑制されることを見出した。Fujita et al.(1989)はENNGによるマウスの十二指腸の発がんのモデル系を使って、胃・腸管における発がんプロモーションが、EGCGによって抑制されることを見出している。

AOMまたはMNNGによって誘発される小腸や腺胃、胃、腸管系のがんが、EGCGや緑茶ポリフェノールによって抑制されることが報告されている(Yamane et al., 1991; 1995; 1996)。AOM投与後、飲み水中に0.01%または0.1%の緑茶ポリフェノール分画を含む水を与えたラットではがんの出現率やがんの1頭あたりの平均数が、それぞれ38.1%と47.6%、および0.6と0.7であり、AOMのみを与えた対照のラットでの77.3%および1.5に比べて著しく低かった。したがって、緑茶のポリフェノールは、AOM誘発の大腸がんのプロモーションの段階を抑制したものと思われる。

背中の皮膚にDMBAを投与したCD-1系統のメスのマウスに、1週間後からプロモーター作用のあるテレオシンを繰り返し与えた場合には、53%のマウスにがんが誘発された。このテレオシン処理の前に、皮膚の同じ場所に、EGCGを処理した場合には、がんの出現率は13%であった。EGCGの処理により、マウス1頭当たりのがんの平均数は2.1から0.1に減少した(Fujiki et al., 1990)。

6) がんの転移

悪性がん細胞の特徴は、無限の増殖性と正常組織中の浸潤、体内の遠く離れた場所の他の組織や臓器への転移活性などがある。がん細胞の転移は、もとの場所からのがん細胞の離脱、血流に乗って標的組織や臓器への移動、標的組織や臓器への浸潤、そこでのがん細胞の増殖などを含むいくつかの段階を経て起る。

もとの場所からのがん細胞の離脱は、恐らくがん細胞から分泌されると考えられるウロキナーゼやコラーゲナーゼのようないくつかのタンパク分解酵素によって行われる。がん細胞が標的組織や臓器に浸潤する段階では、いくつかのタンパク質分解酵素が作用するものと思われる。Sazuka et al.(1997)は紅茶の成分であるTFやTFDGが、マウスのLewis肺がん細胞LL2-Lu3のin vitro浸潤アッセイ系で、化学走性チャンバーフィルターを使用して、細胞の浸潤を抑制することを見出した。がん細胞が、その浸潤や転移の際に関与すると考えられるMMP-2(66キロダルトンのゲラチナーゼA)およびMMP-9(92キロダルトンのゲラチナーゼB)を含むマトリックス、メタロプロテイナーゼ(MMPs)を分泌することがゼラチンサイモグラフによって示された。TFやTFDG、EGCGは、LL2-Lu3がん細胞の培養液から得られたMMPs(IV型コラーゲナーゼ)を阻害した。これらのことからTF、TFDGおよびEGCGは、LL2-Lu3細胞のIV型コラーゲナーゼ活性を抑制することによって、

がん細胞の浸潤を抑えることが示唆された。

LL2-Lu3細胞を皮下に移植すると、3週間後には肺に多くの結節が生ずる。緑茶を経口投与すると、この結節の数が有意に減少した(Isemura et al., 1997)。マトリゲルの化学走性細胞チャンバー・フィルターのついた人工的に作成した基質膜を用いて、がん細胞の通過をしらべた。緑茶の煎じた液およびその成分であるECG、EGCG、TFDGおよびテトラガロイル・グルコースのようなカテキン類は、細胞の通過を抑制した。親和性クロマトグラフによって、活性のあるコラーゲナーゼやゲラチナーゼが、セファローズ4B上に固定されたEGCGによって結合されていることがわかった。

ヒトのがんもまた細胞が浸潤し、転移を起すためにはタンパク分解酵素を必要とする。これらの酵素の1つがウロキナーゼ(uPA)である。uPAの抑制はまたマウスでがんの大きさを減少させ、がんの完全な衰退をも惹起する(Jankun et al., 1997a)。EGCGはuPAに結合して、uPAの触媒三分子のヒスチジン57とセリン195をブロックし、uPAの陽に帶電したループからアルギニン35の方に伸長する(Jankun et al., 1997b)。EGCGのこのような位置づけは、uPAの基質を認識し、酵素活性を抑制することでuPAの活性を抑制するであろう。茶一杯は50mg EGCGを含み、お茶好きのヒトは毎日10杯のお茶を飲むという。

2. 抗変異原性および抗発がん性の機構

1) 抗変異原性

発がん過程にはすでに述べたように“多段階説”と呼ばれるいくつかの段階がある。Fig.1は正常細胞が悪性細胞になりがんを形成する過程を模式的に示したものである。発がんの第一段階はDNAや染色体に突然変異が生ずることで“イニシエーション”と呼ばれる。第二段階は“プロモーション”と呼ばれ、細胞膜や細胞質における酵素活性や代謝の変化が生じ、異常な細胞増殖が起る。第三の段階は“プログレッション”と呼ばれ、悪性化した細胞が増殖し、周囲の正常組織や臓器の中に浸潤してゆく。抗発がん作用をもつ化学物質はその特別な作用によって、この発がんのそれぞれ特別な段階に作用する。

Wattenberg(1983)は抗発がん物質を、その発がん過程での作用機構によって次の3つのカテゴリーに分類した。

- (1) 前駆体物質から変異原や発がん物質が形成されるのを抑制する物質
- (2) 発がん物質が特別な細胞に到達するのを抑制したり、特別な物質と反応するのを抑制したりする物質(遮断因子と呼ぶ)。
- (3) 発がん物質にさらされた細胞の中で、悪性の性質を発現するのを抑制する物質(抑制物質とい

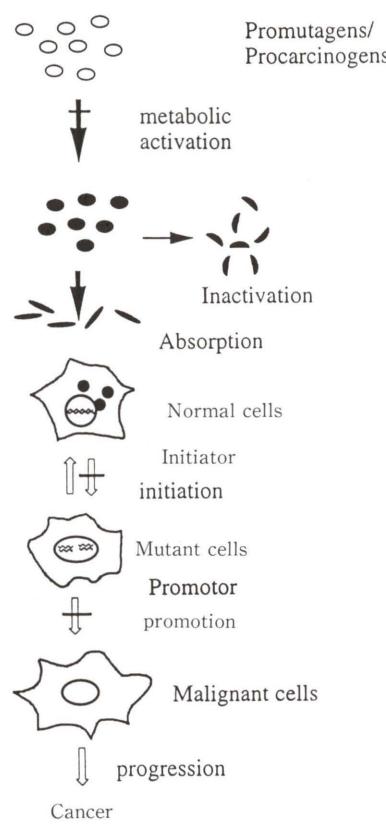


Fig. 1 Multistep carcinogenesis and its inhibition by tea polyphenols

う).

Ramel et al., (1986)は、遺伝毒性の阻害物質がその阻害作用を現す時期を基本にして、次のように分類することを提唱した。

- (1) 変異原物質を不活性化したり、遺伝毒性のある化合物に形成されるのを防ぐ物質
- (2) 遮断因子、ラジカル除去物質
- (3) DNA 修復に作用する因子、抑制物質

突然変異や発がんの抑制物質は突然変異やがんに向かって進行する連続した段階の中のいくつかの過程を阻害したり、変化させたりする作用をもつ。このような考え方方に基づいて、DeFlora and Ramel(1988)は抗変異原物質や抗発がん物質の抑制機構について、現在の知見をもとに暫定的な分類を行っている。

茶のポリフェノールは突然変異や発がん過程の多くの段階や、がん細胞の浸潤や転移などの種々の過程を阻害、抑制する作用をもっている。Table 1は茶ポリフェノールが消変異原(desmutagen)として細胞外で作用すると同時に、生物的抗変異原(bioantimutagen)として細胞内で作用し、またイニシエーションを受けた細胞のプロモーションやがん細胞の転移を抑制する機構を示している。

a. 細胞外の抑制作用(消変異原作用)

Jain et al.(1989)は、緑茶および紅茶の抽出物が大腸

菌 WP 2 系統で、MNNG の変異原性を消変異原的な作用で抑制することを示した。茶の抽出物は MNNG 誘発の突然変異を緑茶の前処理または同時処理によって抑制したが、後処理によっては抑制作用を示さなかった。このことは茶抽出物は MNNG またはその活性体に直接作用することを示唆する。茶のカテキンがこのような消変異原として作用し、生物的抗変異原としては作用しないことを示した数少ない報告である。カテキン類のこのような作用の特性は、使用した変異原物質やその検出系の特徴に基づくものであろう。

b. 細胞内抑制作用(生物的抗変異原作用)

(1) 代謝の修飾

B[a]P や AFB₁, 2 AF, コールタールのメタノール抽出物によって誘発されるサルモネラ TA 100 および TA 98 のラット肝ミクロソーム活性化系存在下での復帰突然変異に対して、GTC は抑制作用を示した(Wang et al., 1988)。PAH や AFB₁ のような前がん原物質が、その変異原活性や発がん作用を現すには、チトクローム P-450 に依存性の酵素による代謝活性化を必要とする。高い反応性をもつ電子親和性のある代謝産物は、その変異原性や発がん性を発揮するために、標的組織の中でタンパク質や DNA のような高分子物質と結合することが知られている。この実験では GTC は肝臓および表皮のミクロソーム中のアリル・カーボンヒドロキシラーゼ(AHH)活性を阻害することがわかった。さらに GTC は [³H]B[a]P がこれら組織酵素を介して DNA と結合するのを阻害した。これらの結果は GTC の抗変異原活性の一部は、PAH のチトクローム P-450 依存性の代謝活性化の阻害に関係しており、GTC が PAH-DNA 結合を阻害するものと考えられる。

カテキンは NADPH-チトクローム C 還元酵素の競合的阻害物質である(Steele et al., 1985)。Apostolides et al.(1996)によって示されたように、S 9 分画を含むサルモネラの TA 98 検出系で、紅茶および緑茶の抽出物やポリフェノールによる PhIP の変異原性の抑制は、Steele et al.(1985)によって報告された変異原性の抑制と類似している。というのは紅茶も緑茶もカテキン類やカテキン化合物を含んでいて、緑茶から精製した化合物 S 9 酵素を阻害することが示されたからである。緑茶の水抽出物は、ヒトが茶を飲む際と同じ方法で調整される。すなわち、緑茶の葉(10 g)に熱湯(400 mL)を加え 10 分間放置して、濾過して 2.5% (w/v) の煎じ物が得られる。これはサルモネラの TA 98 で、S 9 活性化したヘテロサイクリックアミンや IQ, Glu-P-1 の変異原性を著しく、また濃度に依存して減少する(Bu-Abbas et al., 1994)。また、緑茶抽出物は S 9 活性化 PAH や B[a]P, DMBA の変異原性に対しても抑制作用がある。ニトロソピペリジンおよびニトロソピロリジンという 2 つのニトロソアミンの変異原性も S 9 分画を加えた活性化系で、茶の水抽出

Table 1 Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis by tea polyphenols

Classification	Tea polyphenols	Mechanisms of carcinogenesis	References
1. Inhibition of mutagens and carcinogens acting extracellularly (Desmutagenesis)	Tea extract	Interaction with MNNG	Jain et al. (1989)
2. Inhibition of mutagens and carcinogens acting intracellularly (Bio-antimutagenesis)			
2.1. Modulation of metabolism	GTP	Inhibition of cytochrome P-450-dependent metabolic activation	Wang et al. (1988)
2.1.1. Inhibition of the activation of promutagens	Cytochrome P-Catechins	Inhibition of the S9 enzymes	Steele et al. (1985)
2.1.2. Induction of the detoxifying mechanism	Green tea extract	Interaction with promutagens	Bu-Abbas et. al. (1994)
	Tea	Induction of glutathione	Prestera et al. (1993)
	EC, EGC	Induction of phase II enzymes	Matsumoto et al. (1996)
	ECG, EGCG	Reduction of cytochrome P-450 and increase in phase II enzymes	Weisburger et al. (1997)
2.1.3. Detoxification by alteration of metabolic enzymes	Tea		
2.2. Blocking or suppression	ECG, EGCG	Blocking or suppression	Kuroda (1996)
2.2.1. Blocking of reactive molecules		Reduction of hydroxyl radicals	Ebata et al. (1998)
2.2.2. Scavenging of reactive oxygen species	C, EC, ECG, EGCG	Inhibition of DNA cleavage	Shiraki et al. (1994)
	Theaflavins	Antioxidant activities	Yamane et al. (1996)
	Green tea and black tea polyphenols	Inhibition of catalytic cytochrome P450	Matsumoto et al. (1996)
2.3. Modulation of DNA replication or repair	EGCG	Interaction with DNA polymerase III	Kada et al. (1985)
2.3.1. Increasing of the fidelity of DNA replication		Influence on the excision-repair system	Shimoi et al. (1986)
2.3.1. Favoring of the repair of DNA damage	ECG, EGC, EGCG	Inhibition of tumor promotion	Yoshizawa et al. (1987)
3. Inhibition by acting on initiated or neoplastic cells	EGCG	Inhibition of matrix enzymes	Fujita et al. (1989)
4. Inhibition of invasion and metastasis	Catechins and TF	Inhibition of matrix enzymes	Fujiki et al. (1990)
	Green tea infusion	Inhibition of urokinase	Sazuka et al. (1997)
	EGCG	Induction of DNA fragmentation	Isemura et al. (1997)
5. Induction of apoptosis	EGC, EGCG		Jankun et al. (1997b)
			Hibasami et al. (1996)

物によって著しく抑制される。また、2 AF や 2 AA のような前変異原物質は茶の抽出物によってその変異性は抑制される。直接作用する変異原物質 9 AA や MNNG の変異原性も、また緑茶抽出物によって抑制されるが、その作用は間接作用の変異原に比べると作用は弱い。

Bu-Abbas et al. (1994) は、緑茶抽出物がメトキシレゾルフィンやエトキシレゾルフィン、ペイントキシレゾルフィンの *O*-脱アルキル化に著しい濃度依存性の減少を起させることを見出した。NADPH 依存性のチトクローム C の減少に対する同様な抑制作用も報告している。彼らは緑茶の水抽出物は、種々の重要な食品や環境中の変異原に対して強い抗変異原性をもっていることを結論づけた。そして 2 つの機構が、これに関与することを示唆した。第一の機構は種々の前変異原物質の反応性遺伝毒性物質と茶の水抽出物中に存在する親核性物質との間の直接の相互作用である。第二のさらに重要な機構としては、前変異原物質のチトクローム P-450 依存性生物活性化の阻害作用である。チトクローム P-450 活性の阻害は少なくとも一部は、NADPH からチトクロームへの電子の流れの損耗によるかも知れない。

茶の飲用はラット肝の有害物質代謝酵素の活性を上昇させる。位相 I および位相 II の両方の酵素は、紅茶または緑茶の煎じた液を 6 週間ラットに与えることによって誘導される (Sohn et al., 1994)。茶を飲むことによってグルタチオンのレベルを上昇させ (Prestera et al., 1993), 癌がん物質の反応活性物質の解毒を効果的に起させる。茶の抗がん作用については、他の生物化学的な機構も考えられていて、たとえば DNA 修復の誘導や活性化された癌がん物質との結合などである (Steele et al., 1985; Hayatsu et al., 1992; Yang and Wang, 1993)。普通の茶の摂取 (1 日に 5 杯または約 11 g の茶の抽出物摂取) は容易であり、ある種のヒトのがんの危険性を減少させる有効な方法である (Apostolidis et al., 1996)。

ラットの肝がんに対するカテキンや緑茶抽出物、ウーロン茶抽出物の抑制作用について、EC, EGC, ECG, EGCG や他の茶抽出物 (0.05 % または 0.1 %) の抑制作用については、肝臓の前悪性腫瘍のグルタチオン S 転移酵素の胎盤型 (GSTP) 陽性フォーカスの数や大きさを有意に減少させることができ (Matsumoto et al., 1996)。この研究では、いくつかの抑制機構が提出されている。第一はラット肝臓では 8-ヒトロキシグアニンの形成と GSTP 陽性フォーカスとの間に相関関係があること (Kato et al., 1996), 茶のカテキンは強い抗酸化作用があること (Matsuzaki and Hara, 1985; Nanjo et al., 1993)。したがって、茶のカテキン類の抑制作用はその抗酸化作用に関連があることである。第二は緑茶のカテキン類はラット肝臓で Glu-P-1 によって誘導される GSTP 陽性フォーカスを減少させるが、NDMA で誘導されるフォーカスの形成には影響がないことが報告され

ている。したがって茶の抑制作用は位相 I および II の酵素の修復が関連していて、茶カテキン類が直接 GSTP 陽性フォーカスの成長を抑制するものでないと考えている。茶のカテキン類はチトクローム P-450 の溶媒作用を阻害し (Wang et al., 1988), 位相 II の解毒酵素を誘導する (Kahan et al., 1992)。このようにして DEN や PB によって誘導される肝臓の前悪性腫瘍の傷害はカテキン類による代謝酵素の修飾に関係していると考えられる。

DMBA や AOM のようなある種の癌がん物質は、生化学的な活性化を必要とする。茶は乳腺がんの誘発を抑制し、DMBA や AOM によって誘導された大腸の異常クリプトのフォーカス形成を抑制する (Weisburger et al., 1997)。AOM での実験は茶の溶液が癌がん物質投与の間与えられた。長期間にわたる茶の飲用は、ある代謝酵素を変化させ、とくにチトクローム P-450 の 1A1 や 1A2, 2B1 を誘導するが、他のチトクローム P-450 アイソザイムには影響を与えない (Katiyar and Mukutar, 1996; Sohn et al., 1994)。DMBA の反応性のある親電子体がチトクローム P-450 の 1A1 によって一部生成されるが、これらはグルクロニル転移酵素によって解毒される。したがって、茶の効果はこのような肝臓酵素の変化によって説明される。

(2) 遮断(blocking)と抑制(suppression)

哺乳類細胞の培養系では、ECG および EGCG はチャイニーズハムスターの V79 細胞で 4NQO によって誘導される 6TG 抵抗性の突然変異を抑制した。このカテキン類による抗変異原性はカテキン類を 4NQO を作用させた後に処理した場合にのみ示され、4NQO とカテキン類を同時処理した場合には抑制作用が示されなかった (Kuroda, 1996)。

このことは、カテキン類の抗変異原性が細胞内で生物学的抗変異原性をもつ遮断因子または抑制因子として働いていることを示唆している。これらのカテキン類は EMS によって誘導される突然変異に対しては生物学的抗変異原活性を示さない。4NQO は紫外線に類似する物質として知られており、この結果は大腸菌 B/r WP 2 で紫外線誘導の突然変異に対して ECG および EGCG が抗変異原性をもつという結果と一致している。

C や GC, EC, ECG, EGCG などの緑茶のカテキン類は、S9 を加えたサルモネラ TA 100 を用いて、NDMA 誘導の突然変異を抑制した (Ebata et al., 1998)。カテコール型およびガレート型のカテキン類による NDMA 誘導の突然変異の抑制は約 30 % および 100 % であった。550 mV 以下の酸化される電位におけるこれらカテキン類の転移される電子の数は、カテコール型のカテキン類では約 2 個程度であり、ガレート型のカテキン類については 5 個程度である。これらの結果から NDMA 誘導の突然変異に対するカテキン類の抑制作用は、カテキン類によって生じた水酸化ラジカルの還元によって惹起され

ることを示している。

紅茶のカテキンである TF 類については、これらが過酸化水素によって誘導される DNA 単鎖切断や突然変異の生成を抑制することが示されている (Shiraki et al., 1994)。TF 類は、赤血球膜ゴーストとミクロソーム系において、試験管内脂質の過酸化を抑制する。植物のカテキン類は Cu²⁺ の存在下で、DNA 鎮切断を誘導する (Yamada et al., 1985)。生きた細胞中の金属イオンの量を考えると、ヘモタンパク質中の Fe²⁺ のようなタンパク結合型の金属イオンは、H₂O₂ からの活性種の形成に対して、触媒作用があると考えられる。最近 H₂O₂ とチトクローム C の組合せで、脂質の過酸化や DNA 類の切断が誘導されることが見出されている (Radi et al., 1991; Nakayama et al., 1993a)。TF 類はチトクローム C の存在下で H₂O₂ によって誘導される DNA 切断を抑制するので、TF 類が細胞内で抗酸化物質として働いていることが期待される。

TF 類の中で、TFDG は 2 個のガレート基をもち、赤血球ゴーストの系で強い抗酸化作用を示す。TF はガリック酸をもたないで、ミクロソーム系や H₂O₂ によって生じる DNA 切断に弱い抑制作用しかもたない。これらの結果から、ガレート基は TF 類が抗酸化作用や抗変異原作用を発現するのに重要なものであって、ラジカルの除去に働いているものと考えられる。

多くの研究室での研究で、緑茶および紅茶のカテキン類が種々のがんに対して抑制作用をもつことが示された。Fisher ラットにおけるアゾキシメタンによって誘導された大腸がんの発生に関して、癌がん物質の皮下投与 1 週間後に、0.01 % または 0.1 % の緑茶を飲み水に加えて 10 週間与えた場合に、がんの発生を抑制した (Yamane et al., 1991)。しかし、他の研究では 1 % 緑茶ポリフェノールの投与で、ラットの大腸がんの発生を抑制しなかった (Ito et al., 1992)。胃に緑茶浸出液を与えると C 57 BL のマウスの大腸クリプト細胞で、DMH (20 μg/kg) による小核やアポトーシスの形成に対して顕著な抑制効果があった (Zao et al., 1992)。胃の環流によって緑茶のカテキン類を与えたマウスでは、DMH によるがんの数や大きさは著しく減少した (Pingzhang et al., 1994)。緑茶のカテキン類を与えたマウスの過酸化酵素デスマニターゼ (SOD) の活性は、DMH で処理したマウスよりもずっと高い。これらの結果は、マウスにおける緑茶のカテキンによる癌がんの抑制は、緑茶のカテキンの抗酸化作用によるものであることを示している。緑茶の抗酸化作用をもつ成分は細胞の遊離第 2 鉄および第 1 鉄イオンのレベルを減少させ、反応性のある酵素ラジカルの発生を抑え、過酸化陰イオンラジカルや水酸化ラジカルを除去し、脂質の過酸化連鎖反応を阻止する (Liu and Castonguay, 1991; Bhiman and Frenkel, 1991)。さらに緑茶のカテキン類はニトロサミン反応に対しても抑

制作用があり (Bhiman and Frenkel, 1991), 最終発がん物質を補足し (Knan et al., 1988), 細胞増殖に関連する諸活性を抑制する (Ruch et al., 1989)。

(3) DNA の修飾

種々の抗変異原や抗癌がん物質の中で、変異原物質が標的細胞の表面に達する前に作用する物質がある。このような化学物質は変異原に対して細胞外で作用する物質として Kada et al. (1982) によって “Desmutagen” (消変異原) と名付けられた。これに対して細胞内で作用する他の化学物質は “Bioantimutagen” (生物的抗変異原) と呼ばれる。野菜類に含まれる L-アスコルビン酸 (ビタミン C) や α-トコフェロール (ビタミン E), 植物纖維などは消変異原作用がある。これまでに発表された論文に記載された茶のカテキン類の多くの抗変異原活性や抗癌がん作用は、生物的抗変異原作用が多い。

枯草菌 *met his mut-1* の NIG 1125 系統で、EGCG によって自然突然変異が減少するが、これは変化した DNA 合成酵素 III などエラーをもつ DNA 複製機能が EGCG によって抑制されることによるものである (Kada et al., 1985)。EGCG は DNA 複製の忠実度に関する経路に作用すると考えられる。カテキン類はタンパク質と親和性をもっているので、EGCG が DNA 合成酵素 III と特別に相互作用して、DNA 複製の忠実度の改善に作用していることも考えられ興味深い。

Shimoi et al. (1986) の実験では、大腸菌 B/r WP 2 でガリック酸や、ECG, EGC および EGCG が紫外線 C (254 nm) 誘導の突然変異を減少させた。ピロガロール基をもつこれらの化合物は紫外線 AB (295–400 nm) 誘導の突然変異に対しても有効であるが、MNNG 誘導の突然変異に対してはほとんど効果がない。この生物的抗変異原性は、DNA 切り出し修復欠損系統 WP 2 s および ZA 159 系統ではみられない。これらの結果から、ピロガロール基をもつカテキン類は大腸菌 B/r の切り出し修復系に作用していると思われる。

SKH-1 マウスに緑茶を飲ませると、UVB で誘導される皮膚がんの誘導頻度とがん容積が有意に減少する (Liu et al., 1998)。この UVB で誘導された皮膚がん細胞を集めて、がん抑制遺伝子 *p53* に生じた突然変異をしらべるために、PCR によって增幅した *p53* 遺伝子のエクソン 5–8 について、単鎖構造の多型および直接の塩基配列がしらべられている。この結果 UVB を照射して緑茶を飲ませたマウスに生じたがんは、UVB 照射だけのマウスのがんと比較して、*p53* の遺伝子について異なるエクソン内の突然変異分布をしていることがわかった。緑茶カテキンと紅茶 TF は、肺がん LL 2-Lu 3 細胞の浸潤を抑制する (Sazuka et al., 1997)。LL 2-Lu 3 細胞は、基質メタロタンパク分解酵素 (MMPs) を生産する。これは MMP-2 および MMP-9 を含み、がん細胞の浸潤や転移に関与すると考えられる。これらの基質メタ

ロタンパク分解酵素のIV型コラゲナーゼ活性は、茶カテキン類のEGCGやTFによって抑制されるが、(+)-カテキンによっては抑制されなかった。このことはこのようながん細胞の浸潤とコラーゲナーゼの阻害とは、関連していることを示唆している。

c. 転移の抑制

ガレート基のないTFによる細胞浸潤やコラーゲナーゼ活性の抑制は興味深い。おそらく、EGCGおよびTFはフェノール水酸基と同様な立体構造をもっていると考えられる。

マウスの肺がんLL2-Lu3細胞の*in vitro*浸潤および*in vivo*の転移に対して、緑茶の煎じたものは自然転移系において、がん細胞の肺コロニーの数を減少させた(Isemura et al., 1997)。この研究では、抑制効果は緑茶の煎じたものや、ガレート基を含むカテキン類でのみ示され、活性と抑制作用との関係を示唆する。TFDGやテトラガロイルグルコースのようなガレート基を含む他の化合物もまたLL2-Lu3細胞の浸潤に対する阻害作用を示した。フェノールアルコールの集合によってできた立体構造が、この抑制作用に関与するのかも知れない。これらの化合物はLL2-Lu3細胞のコラーゲナーゼに対して抑制作用を示すので、浸潤の抑制はこれらコラーゲナーゼの阻害の結果生ずるのかも知れない。親和性クロマトグラフの結果、EGCGとコラーゲナーゼとの直接結合が、この酵素の不活性化を惹起することを示唆している。EGCGによるがん細胞の浸潤の阻害についての同様な機構が考えられる(Jankun et al., 1997a)。がん細胞の浸潤を誘導し、転移を起すように働くタンパク質分解酵素の1つはウロキナーゼであった(Jankun et al., 1997b)。

d. 新しい機能の誘発

新しい作用機構をもつ抗発がん性物質として、がん細胞のアポトーシス死を誘導するいくつかの抗がん物質が報告されている。イソフラボン(Yanagihara et al., 1993)や、エーテル結合グリセロフォスホリピド(Piomede et al., 1994)、エヌティン抗がん抗生物質C1027(Jiang et al., 1995)、スリ・ダックサルファイドやサルファン(Piazza et al., 1995)のような抗がん性物質の投与が、がん細胞のアポトーシスによる死を惹起する。Hibasami et al.(1996)は、EGCおよびEGCGが0.1 mMおよび0.3 mMの濃度で、ヒトのリンパ性白血病Molt 4B細胞の増殖を完全に抑制し、ECおよびECGはこの細胞の増殖を抑制するのにはより高濃度が必要であることを報告している。アポトーシスによって生じたDNAの断片化は、EGCおよびEGCGによって誘導されるが、ECおよびECGによっては誘導されなかった。これらの研究で健康で正常な細胞に変化を起すことなく、がん細胞にアポトーシスを誘導するという戦略が、新しい治療技術の将来の発展に向かっての主なゴールであることを示唆している。

3. 茶カテキン類の将来展望

緑茶およびその成分であるカテキン類は強力な抗酸化作用があり、これが過酸化物や水酸化ラジカルを減少させる。茶のカテキン類の抗変異原性や抗発がん作用は大部分はその抗酸化性によるものであり、これが細胞外で活性のある発がん物質を不活性化し、活性のない発がん物質の活性化を抑制(消変異原性)、細胞内ではある酵素の活性を上昇させ、チトクロームP-450を誘発し、結果として発がん物質の活性を抑制する。

茶カテキン類が原変異原物質の活性化を抑制したり、変異原や発がん物質を不活性化したり、反応性分子を遮断したり、除去したり、DNAの複製や修復を修飾したり、プロモーションを阻害したり、がん細胞の浸潤や転移を阻害したりする機構については次第に明らかになりつつある。しかしこのような機構の多くのものはまだ示唆または推測の段階のものも多い。茶カテキン類の作用機構についての直接因果関係の証拠が明らかになることが望まれる。

実験動物を使った茶のポリフェノール類の抗変異原性についての実験で、茶のカテキンの摂取が種々の臓器や組織におけるがんの発生を抑制した。しかし、種々の臓器や組織におけるカテキンの分布や、その移動、排泄などについてはまだ明らかでない。

Hackett et al.(1983)は、3人のボランティアの人達に2gの(+) [¹⁴C] カテキンを摂取させ、その血液および尿中の代謝的変化をしらべた。標識したカテキンの約55%は、摂取後2時間以内に尿中に排泄された。尿中の代謝産物は(+) -カテキンと3'-O-メチル(+) -カテキンのグルクロン酸および硫酸抱合体であった。これらの代謝産物は摂取したカテキンの約3/4であった。

Matsumoto et al.(1991)は、ラットを使って胃や小腸、大腸のような消化管の中のカテキンの動向をしらべるために、臓器や組織に吸収された茶カテキンの量をしらべた。経口摂取したEGCGは胃から小腸へは数時間で移動し、大腸へは8時間後に移った。糞便中のカテキン量は次第に増加した。カテキンのある部分は腸内細菌によって代謝され、カテキンの約20%は消化器官によって吸収されると思われる。動物や人間での生体内の種々の臓器や組織中の茶のカテキンの変化についてのこのようないくつかの結果は、本論文でも一部取り上げている。将来、もっと紅茶のカテキン類の作用について広範な研究

が必要であろう。

茶カテキン類の有益な作用についてのさらに確実で決定的な解答が、人間の集団を用いた研究から得られるべきである。茶のカテキン類による抗変異原性と抗発がん性の機構は、異なったがんや、異なった集団などによって相違するので、茶の摂取が選定された状態においてのみ、発がんに対する影響を評価することが重要と思われる。したがって、イヌや哺乳動物を使った実験や、限られた人間の集団についての臨床実験が、正確な定量的、定性的技術を使って将来必要であろうと思われる。

この総説では、主として茶のポリフェノールの抗変異原性および抗発がん性について述べたが、茶のカテキン粗抽出物は、その他ヒトの健康に有益な多くの機能をもっている。たとえば、血圧上昇の抑制(谷口ら, 1988)、血糖値の降下(田中・岡村, 1989)、コレステロール値や脂質の上昇抑制(Muramatsu et al., 1986; 福与ら, 1986)などである。またヒトの高血圧のモデル動物である本態性高血圧ラット(SHR)で茶の粗カテキンを飲ませると、アングiotensin I 転換酵素を阻害することによって、血圧の上昇を抑制した(原ら, 1987; 岩田ら, 1987)。また、粗カテキンはSHRラットで脳溢血による死亡を抑制した(原・外岡, 1990)。カテキンの粗抽出物は、澱粉や蔗糖を与えてブドウ糖値を上昇させた雄のWistarラットの血圧上昇を抑制した。カテキンによるこのブドウ糖やインスリン値の降下は、消化管におけるα-アミラーゼやシュクラーゼの阻害によるものである(Matsuimoto et al., 1993)。

茶カテキンは食中毒細菌や植物病原性細菌(原・石上, 1980; Fukai et al., 1991)、虫歯菌(Hattori et al., 1990)などに対して抗菌性があり、EGCGやTFなどのカテキン類は、インフルエンザウイルスの細胞への吸着を阻止して感染を防ぐ(Nakayama et al., 1990, 1993)。このことは茶がインフルエンザウイルスの細胞への吸着の有用な予防効果をもつことを示している。緑茶のカテキン、ECG、EGCG、TF、TFA、TFB、TFDGは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対して、細胞のDNA、RNA合成酵素には影響しないでウイルスの逆転写活性を強く抑制することが示されている(Nakane et al., 1993)。

茶のカテキン類は水によく溶け、その粗抽出物は種々の食品や飲料に組込むことができる。茶のカテキン類を含む種々の食品や飲料は、人間の健康にとって、がんへの危険度を低下させ、種々の正常機能を保持し、健全な生理状態を維持するのに有用であると思われる。

謝 辞

本総説はMutation Research(Kuroda and Hara, 1998)にReview articleとして掲載したものを、Elsevier Science Publishers社の許可をいただいて本誌の和文総説としたものである。英文原稿に対するご助言

をいただいたカンサス大学微生物教室Delbert M. Shankel博士、およびMutation Research誌のReviewの編集主幹David M. DeMarini博士に深甚なる感謝の意を表します。また、原稿作成にご助力いただいた高田佑子様に感謝いたします。

参考文献

- Apostolides, Z., D. A. Balentine, M. E. Harbowy, and J. H. Weisburger (1996) Mutation Res., 359, 159-163.
Bhiman, R. and K. Frenkel (1991) Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 32, 126.
Bu-Abbas, A., M. N. Cliford, R. Walker and C. Ioannides (1994) Carcinogenesis, 15, 2575-2579.
De Flora, S. and C. Ramel (1988) Mutation Res., 202, 285-306.
Diomede, L., B. Piovani, F. Re, P. Principle, F. Colotta, E. J. Modest and M. Salmona (1994) Int. J. Cancer, 57, 645-649.
Ebata, J., N. Fukagai and H. Furukawa (1998) Environ. Mutagen Res., 20, 45-50.
Fujiki, H., M. Suganuma, H. Suguri, K. Takagi, S. Yoshikawa, A. Ootsuyama, H. Tanooka, Y. Okuda, M. Kobayashi and T. Sugimura (1990) Y. Kuroda, D. M. Shankel and M. D. Waters (eds.), Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II, Prenum Press, New York and London, pp. 205-212.
Fujita, Y., T. Yamane, M. Tanaka, K. Kuwata, J. Okuzumi, T. Takahashi, H. Fujiki and T. Okuda (1989) Japan. J. Cancer Res., 80, 503-505.
Fukai, K., T. Ishigami and Y. Hara (1991) Agric. Biol. Chem., 55, 1895-1897.
福井真弓、原 征彦、村松敬一郎(1986)栄食誌, 39, 495-500.
Hackett, A. M., L. A. Griffiths, A. Broillet and M. Wermeille (1983) Xenobiotica, 13, 279-286.
Han, C. and Y. Xu (1990) Biomed. Environ. Sci., 3, 35-42.
原 征彦、松崎妙子、鈴木道夫(1987)日農化, 61, 803-808.
原 征彦、石上 正(1980)日食工誌, 36, 969-999.
原 征彦、外岡史子(1990)栄食誌, 43, 345-348.
Hattori, M., I. T. Kusumoto, T. Namba, T. Ishigami and Y. Hara (1990) Chem. Pharm. Bull., 38, 717-720.
Hayatsu, H., N. Inaba, T. Kakutani, S. Arimoto, T. Negishi, K. Mori, T. Okuda and I. Sakata (1992) Prevent. Med., 21, 370-376.
Hibasami, H., Y. Achiwa, T. Fujikawa and T. Komiya (1996) Anticancer Res., 16, 1943-1946.
Hirose, M., T. Hoshiya, K. Akagi., S. Takahashi, Y. Hara and N. Ito (1993) Carcinogenesis, 14, 1549-1553.
Isemura, M., M. Sazuka, H. Iwazawa, T. Nakayama, T. Noro, Y. Nakayama and Y. Hara (1997) H. Ohigushi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, T. Yoshikawa, (eds.) Food Factors for Cancer Prevention, Springer, pp. 134-137.
Ito, N., K. Imaida, H. Tsuda, M. A. Shibata, T. Aoki and J. L. V. de Camargo (1988) Japan. J. Cancer Res., 79, 413-417.
Ito, N., M. Hirose and T. Shirai (1992) M. T. Huang, C. T. Ho and C. Y. Lee (eds) Phenolic Compounds in Foods and Health II, Antioxidant and Cancer Prevention, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 269-281.
岩田多子、稻山貴代、三輪里美、川口一夫(1987)栄食誌, 40, 469-477.
Jain, A. K., K. Shimoji, Y. Nakamura, T. Kada, Y. Hara and I. Tomita (1989) Mutation Res., 210, 1-8.

- Jankun J, R. W. Keck, E. Skrzypczak-Jankun, R. Swiercz (1997a) *Cancer Res.*, 57, 559-563.
- Jankun, J., S. H. selman and s. Swiercz (1997b) *Nature*, 387, 561.
- Jiang, B., D. D. Li and Y. S. Zhen (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 208, 238-244.
- Kada, T., T. Inoue, M. Namiki and E. J. Klekowski, Jr. (1982) *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger Scientific, p. 134.
- Kahan, S. G., S. K. Katiyar, R. Agarwal and H. Mukhtar (1992) *Cancer Res.*, 52, 4050-4052.
- Katiyar, S. K., R. Agarwal, M. T. Zamand, H. Mukhtar (1993a) *Carcinogenesis*, 14, 849-855.
- Katiyar, S. K., R. Agarwal, H. Mukhtar (1993b) *Cancer Lett.*, 73, 167-172.
- Katiyar, S. K. and H. Mukhtar (1996) *Int. J. Oncol.*, 8, 221-238.
- Kato, T., R. Hasegawa, D. Nakae, M. Hirose, M. Yaono, L. Cui, Y. Kobayashi, Y. Konishi, N. Ito and T. Shirai (1996) *Japan J. Cancer Res.*, 87, 127-133.
- Komori, A., J. Yatsunami, S. Okabe, K. Hara, M. Saganuma, S. J. Kim, H. Fujiki (1993) *Japan. J. Clin. Oncol.*, 23, 186-190.
- Kuroda, Y. (1996) *Mutation Res.*, 361, 179-186.
- Kuroda, Y. and Y. Hara (1999a) *Mutat. Res.*, 436, 69-97.
- Kuroda, Y. and Y. Hara (1999b) *Environ. Mutagen Res.*, 21, 1-10.
- Liu, L. and A. Castonguay (1991) *Carcinogenesis*, 12, 1203-1208.
- Liu, Q., Y. Wang, K.-A. Crist, Z. Y. Wang, Y. R. Lou, M. T. Huang, A. H. Conney and M. You (1998) *Carcinogenesis*, 19, 1257-1262.
- Lu, Y. P., Y. R. Lou, J. G. Xie, P. Yen, M. T. Huang and A. H. Conney (1997) *Carcinogenesis*, 18, 2163-2169.
- Matsumoto, N., F. Tono-oka, A. Ishigaki, K. Okashio and Y. Hara (1991) *Proc. Internat. Symp. Tea Sci.*, pp. 253-257.
- Matsumoto, N., F. Ishigaki, A. Ishigaki, H. Iwashina and Y. Hara (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 525-527.
- Matsumoto, N., T. Kohri, K. Okushio and Y. Hara (1996) *Japan J. Cancer Res.*, 87, 1034-1038.
- Matsuzaki, T. and Y. Hara (1985) *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 59, 129-134.
- Muramatsu, K., M. Fukuyo and Y. Hara (1986) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32, 613-622.
- Nakane, H., Y. Hara and K. Ono (1993) C.-T. Ho, T. Osawa, M.-T. Huang and R. T. Rosen (eds.). *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 56-64.
- Nakayama, M., M. Toda, S. Okubo and T. Shimamura (1990) *Lett. Appl. Microbiol.*, 11, 38-40.
- Nakayama, T., T. Kuro, M. Hiramitsu, T. Osawa and S. Kawakishi (1993a) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 174-176.
- Nakayama, T., K. Suzuki, M. Toda, S. Okubo, Y. Hara and T. Shimamura (1993b) *Antiviral Res.*, 21, 289-299.
- Nanjo, F., M. Honda, K. Okushio, N. Matsumoto, F. Ishigaki, T. Ishigami and Y. Hara (1993) *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 1156-1159.
- Nishida, H., M. Omori, Y. Fukutomi, M. Ninomiya, N. Nishiwaki, M. Saganuma, H. Moriwaki and Y. Muto (1994) *Japan. J. Cancer Res.*, 85, 221-225.
- Piazza, C. 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.
- 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.
- Prester, T. Y. Zhang, S. R. Spencer, C. A. Wilczak and P. Talalay (1993) *Adv. Enzyme Regul.*, 33, 281-296.
- Qin, G., P. Gopalan-Kriczky, J. Su, Y. Ning, P. D. Lotlikar (1997) *Cancer Lett.*, 112, 149-154.
- Radi, R., J. F. Turrens and B. A. Freeman (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 118-125.
- Ramel, C., U. K. Alekperou, B. N. Ames, T. Kada and L. W. Wattenberg (1986) *Mutation Res.*, 168, 47-65.
- Ruch, R. J., S. J. Cheng and J. E. Klaunig (1989) *Carcinogenesis*, 10, 1003-1008.
- Sazuka, M., H. Imazawa, Y. Shoji, T. Mita, Y. Hara and M. Isemura (1997) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1504-1506.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara and T. Kada (1986) *Mutation Res.*, 173, 239-244.
- Shiraki, M., Y. Hara, T. Osawa, H. Kumon, T. Nakayama and S. Kawakishi (1994) *Mutation Res.*, 323, 29-34.
- Sohn, O. S., A. Surace, E. S. Fiala, J. Richie, S. Colosimo, E. Zang, Steele, C. M., M. Lalies and C. Ioannides (1985) *Cancer Res.*, 45, 3573-3577.
- Sohn, O. S., A. Surace, E. S. Fiala, J. P. Richie, S. Colosimo, E. Zang and J. H. Weisburger (1994) *Xenobiotica*, 24, 119-127.
- 田中信子・岡村 浩(1989)日本家政誌, 40, 587-592.
- 谷口 繁・宮下善旦(1988)薬学雑誌, 108, 77-81.
- Wang, Z. Y., M. Das, D. R. Bickers and H. Mukhtar (1988) *Drug. Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, 16, 98-103.
- Wang, Z. Y., M. T. Huang, T. Ferraro, C.-Q. Wong, Y.-R. Lou, K. Reuhl, M. Iatropoulos, C. S. Yang and A. H. Conney (1992) *Cancer Res.*, 52, 1162-1170.
- Wang, Z. Y., M.-T. Huang, Y.-R. Lou, J.-G. Xie, K. R. Reuhl, H. L. Newmark, C.-T. Ho, C. S. Yang and A. H. Conney (1994) *Cancer Res.*, 54, 3428-3435.
- Wattenberg, L. W. (1983) *Cancer Res.*, Suppl., 43, 2448-2453.
- Weisburger, J. H., A. Rivenson, K. Garr and C. Aliaga (1997) *Cancer Lett.*, 114, 1-5.
- Yamada, K. S. Shirahata, H. Murakami, K. Nishiyama, K. Shinohara and H. Omura (1985) *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1423-1428.
- Yamane, T., S. Hagiwara, M. Tateichi, S. Kachi, M. Kim, J. Okuzumi, Y. Kitao, M. Inagaki, K. Kuwata and T. Takahashi (1991) *Japan. J. Cancer Res.*, 82, 1336-1339.
- Yamane, T., T. Tokuhashi, K. Kuwata, K. Oya, M. Inagaki, Y. Kitao, M. Saganuma and H. Fujiki (1995) *Cancer Res.*, 55, 2081-2084.
- Yamane, T., H. Nakatani, N. Kikuoka, H. Matsumoto, Y. Iwata, Y. Kitano, K. Oya and T. Takahashi (1996) *Cancer*, 77, 1662-1667.
- Yanagihara, K., A. Ito, T. Tuge and M. Numoto (1993) *Cancer Res.*, 53, 5815-5821.
- Yang, C. S. and Z. Y. Wang (1993) *J. Nat. Cancer Inst.*, 85, 1038-1049.
- Yoshizawa, S., T. Horiuchi, H. Fujiki, T. Yoshida, T. Okuda and T. Sugimura (1987) *Phytotherapy Res.*, 1, 44-47.
- Zao, J. Y., O. F. Zhu and S. J. Cheng et al. (1992) *Acta Nutr. Sin.*, 14, 255-259.

Environ. Mutagen Res., 21 : 95 - 102(1999)

Excision-repair activity of green tea extracts in 4NQO-induced mutations of cultured Chinese hamster V79 cells

Mamiko Miyajima¹, Yukihiko Hara² and Yukiaki Kuroda^{2,3}

¹Laboratory of Cell Biology, Department of Environmental Health Science, Azabu University, Fuchinobe, Sagamihara, Kanagawa 229-0006

²Food Research Institute, Mitsui Norin Co., Miyabara, Fujieda, Shizuoka 426-0133

³National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan

Summary

Hot-water extracts of green tea (*Camellia sinensis*) were examined for their antimutagenic actions on 6-thioguanin (6TG)-resistant mutations (HGPRT⁺) induced by 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) and ethyl methanesulfonate (EMS) in cultured Chinese hamster V79 cells. Green tea extracts (Polyphenols) reduced 4NQO-induced 6TG-resistant mutations to about one third or a half, when cells were post-treated with the green tea extracts after 4NQO treatment in the mutation expression time.

On the other hand, the extracts were not effective in reducing EMS-induced mutations. Further studies were carried out to examine the effect of green tea extracts on 4NQO-induced DNA strand breaks in the excision repair process by using the fluorometric analysis of DNA unwinding (FADU) methods. The amount of DNA strand breaks in V79 cells, increased by treatment with 4NQO in incubation of cells in arabinofuranosyl cytosine and hydroxyurea (araC-HU) medium. The repair of DNA strand breaks was found when cells were incubated in araC-HU medium containing green tea extract after 4NQO exposure. These results indicate that the green tea extracts (possibly catechins) stimulated the repair process of nucleotide excision by removing the DNA adducts produced by 4NQO, and reduced the frequency of 6TG-resistant mutations in V79 cells.

Keywords : excision-repair activity, antimutagenicity, green tea extracts, Chinese hamster V79 cells

Introduction

It has been found by way of various test systems that many chemicals present in our environment have mutagenic activity. On the other hand, it has been shown that many plants contain some components with strong antimutagenic and anticarcinogenic activity. The first demonstration of the antimutagenic activity of vegetables was made by Kada et al. (1978) by using the histidine reversion test with Ame's strain of *Salmonella typhimurium* TA98 strain with metabolic activation of liver homogenate (S9) obtained from polychlorinated

biphenyl (PCB)-treated rats. They found that some vegetables reduced markedly the frequency of reverse mutations induced by tryptophan pyrolysis (Trp-P).

Most of the antimutagenicity studies on tea polyphenols have been carried out by microbial test systems using *S. typhimurium*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Recently, the antimutagenic activity of tea polyphenols against 4NQO was reported in cultured Chinese hamster cells (Kuroda, 1996). The antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols has been extensively investigated in epidemiological studies, short-term mutagenicity tests, and experimental animals (Reviews : Yang and Wang, 1993 ; Katiyar and Mukhtar, 1996 ; Kuroda and Hara, 1999). The cultured mammalian cell systems may be more useful and advantageous for

received : February 3, 1999

accepted : March 10, 1999

© Environmental Mutagen Society of Japan

Table 1 Components of hot-water extracts of green tea (polyphenols)

Components	Percentage of components (%)		
	Polyphenon G	Polyphenon 30	Polyphenon 60
(-)-epigallocatechin (EGC)	8.90	13.00	21.00
(-)-epicatechin (EC)	4.90	3.80	7.30
(-)-epigallocatechin gallate (EGCg)	17.30	15.00	29.20
(-)-epicatechin gallate (ECg)	4.40	3.50	7.90
Total Polyphenols	35.50	35.30	65.40
Caffeine	5.40	5.90	8.30

the evaluation of carcinogenicity of chemicals which are non-mutagenic in microbial systems, since the mutagenicities of some carcinogens, which are not detected by microbial systems can be detected by cultured mammalian cell systems. Furthermore treatment times with mutagens and antimutagens may be strictly controlled, providing some useful informations for understanding the mechanisms of antimutagenesis.

In the present study, the antimutagenic activity of the hot-water extracts of green tea on 6TG-resistant mutations induced by 4NQO, a chemical producing DNA-adducts, and EMS, an alkylating agent, was examined using cultured Chinese hamster V79 cells. Further studies also were carried out to elucidate the mechanisms of antimutagenesis of hot-water extracts of green tea by using the fluorometric analysis of DNA unwinding (FADU) method (Birnboim and Jevcak, 1981; Matsuda et al., 1993) to determine 4NQO-induced DNA strand breaks.

Materials and Methods

1. Cells and culture

The cells were cloned from a single cell colony of the original V79 strain and maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM: Nissui Seiyaku Co., Tokyo) supplemented with 10% fetal bovine serum (CSL Limited, Australia) in 60-mm petri dishes (Sumilon MS-11600, Sumitomo Bakelite Co., Tokyo) under a controlled atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 38°C. The cells were mycoplasma free, gave a colony-forming ability of more than 80% under the above culture conditions.

The cells are grown in a large mass, distributed in many small ampules, and frozen at -80°C. Before use, cells are thawed to 38°C, suspended in fresh medium and cultured in HAT medium (10⁻⁴ M hypoxanthine, 4×10⁻⁷ M amethopterine and 1.6×10⁻⁵ M thymidine) at 38°C for 24 h, to remove the pre-existing hypoxanthine-guanine-phosphorybosyl-transferase (HGPRT) deficient (6TG-resistant) cells in the population. The cells at exponential growth phase in monolayer were dis-

sociated by treatment with 0.25% trypsin (Difco, Detroit, MI, 1:250) solution, and centrifuged at 1,500 rpm for 2 min. The cells were resuspended in the culture medium and used for experiments.

2. Chemicals

The chemicals used for inducing mutations were 4NQO and EMS (Wako Pure Chem. Ind., Osaka). The extracts of green tea were produced in Food Research Inst. Mitsui Norin Co., Shizuoka, and used to examine the inhibitory effect on mutations induced by above two chemicals. Polyphenon G, Polyphenon 30, and Polyphenon 60, which are different extracts by hot-water, filtration, and condensation, respectively, of green tea. Therefore, Polyphenon G contains the similar components of boiling water in which green tea leaves are decocted and used for usual drinking, Polyphenon 30 is a filtrate of Polyphenon G, and Polyphenon 60 is condensed to contain more than 60% of total polyphenols. Table 1 shows the amounts of each polyphenols, (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) and (-)-epicatechin gallate (ECg) contained in these Polyphenons. 6TG (Wako Pure Chem. Ind., Osaka) was used for selecting 6TG-resistant mutant colonies. The solutions dissolving these chemicals were sterilized by filtration through a millipore filter with 0.45 μm pore size, diluted, and used for treatments of cells at various concentrations.

The amount of single-strand breaks in DNA produced by 4NQO was determined using the FADU method, in which cells were exposed to 4NQO, followed by incubation in araC-HU medium, MEM medium containing 10% serum, 10×10⁻⁶ M arabinofuranosyl cytosine (AraC: Wako Pure Chem. Ind., Osaka) and 2×10⁻³ M hydroxyurea (HU: Sigma Chem. Co., USA) (Dunn and Regan, 1979; Snyder et al., 1981).

Compositions of solutions used for the FADU method were as follows (Matsuda et al., 1993). Solution A: 9 M urea (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto), 10⁻² M NaOH, 2.5×10⁻³ M

cyclohexanediamine-tetraacetate, and 0.1% SDS. Solution B: diluent of solution A in 0.2 N NaOH at the ratio of volume 8.5:11.5. Solution C: 1 M glucose, 14×10⁻⁴ M mercaptoethanol (these chemicals were purchased from Wako Pure Chem. Ind., Osaka). Solution D: 2 μg/ml ethidium bromide (Sigma Chem. Co., USA) and 13×10⁻⁴ M NaOH.

3. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity effect of chemicals was examined by determining the colony-forming ability of cells, as described previously (Kuroda et al., 1985).

The inocula of 3×10² cells in 5 ml of normal medium in three 60-mm petri dishes were incubated at 38°C for 24 h. The cells were rinsed 2 times with Hanks' salt solution (Nissui Seiyaku Co., Tokyo) and treated with mutagens (4NQO or EMS) at various concentrations at 38°C for 3 h in the presence or absence of green tea extracts (Polyphenons). The cells were then rinsed 2 times with Hanks' salt solution, and incubated in normal medium. In additional experiments, cells were incubated for 24 h in normal medium, rinsed 2 times with Hanks' salt solution, treated with mutagens for 3 h and incubated in normal medium with Polyphenons at 38°C for 6 days.

The colonies formed were fixed in absolute methyl alcohol and stained with May-Grünwald Giemsa and Giemsa (Merck, Darmstadt). The number of colonies containing more than 50 cells was scored under a binocular microscope. And the colony-forming ability was calculated from the average number of colonies formed as a percentage of the number of cells initially inoculated. The effects of chemicals on cell survival are expressed as surviving fractions of the colony-forming ability of untreated control cultures.

4. Mutagenicity assay

The activities of mutagens (4NQO or EMS) and antimutagens (green tea extracts) were determined by the replating method (Chu and Malling, 1968; Fox, 1975; Kuroda et al., 1985).

The inocula of 2×10⁵ cells in 10 ml of normal medium in 90-mm petri dishes (Sumilon MS-13900, Sumitomo Bakelite Co., Ltd) were incubated at 38°C for 24 h, rinsed 2 times with Hanks' salt solution, and treated with mutagens with or without Polyphenons. The cells are again rinsed 2 times with Hanks' salt solution and incubated in normal medium or medium with Polyphenons at 38°C for an expression time of 6 days. Then the cells were dissociated by treatment with 0.25% trypsin solution, centrifuged, and 2×10⁵ cells were replated each

in five 90-mm petri dishes in medium containing 1 μg/ml 6TG and incubated at 38°C for 10 days.

In parallel experiments, inocula of 3×10² cells each in three 60-mm dishes were incubated in normal medium. After incubation for 6 days, the colonies formed were fixed, stained and scored. The observed numbers of 6TG-resistant mutant colonies were corrected for the decrease in the colony-forming ability of replated cells in normal medium. The number of induced mutants was calculated by subtracting the number of colonies in untreated control cultures from those in treated cultures. The induced mutation frequency was expressed as the number of induced mutants per 10⁵ colony-forming cells.

5. Fluorometric analysis of DNA unwinding (FADU)

The fluorescent dye, ethidium bromide, binds selectively to double-stranded DNA in the presence of single-stranded DNA, when short duplex region in "single-stranded" DNA molecules are destabilized by alkali (Morgan et al., 1975). The FADU method used under this condition may be applicable to crude extracts of mammalian cells. Under this condition, the dye would show fluorescent enhancement preferentially with double-stranded DNA with little interference by RNA and other cell components or single-stranded DNA.

The inocula of 1.1×10⁶ cells in 10 ml of normal medium in 90-mm petri dishes were incubated at 38°C for 24 h, rinsed 2 times with Hanks' salt solution, and treated with mutagens. The procedure was the same as described in the cytotoxicity assay. After treatment with mutagen, the cells were again rinsed 2 times with Hanks' salt solution and incubated for 3 h in araC-HU medium with or without tea extract. The accumulation of DNA single-strand breaks produced by 4NQO were detected by using this method followed by incubation in araC-HU medium (Dunn and Regan, 1979; Snyder et al., 1981). Then the cells were dissociated by treatment with 0.25% trypsin solution, centrifuged, and suspended in 1.5 ml of Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Nissui Seiyaku Co., Tokyo). Aliquots of the cell suspension (0.2 ml) were distributed to disposable tubes (Corning, NY), designated T, P, or B containing 2 tubes in each group.

To each tube 0.2 ml of solution A was added, and the tubes were held at 0°C to allow the reaction to proceed for 10 min. During this time, cell lysis and chromatin disruption occurs. To tubes P and B, 0.2 ml of solution B was added very gently without mixing, especially in tubes P. During the subsequent

Table 2 Effect of Polyphenon G on survival of V79 cells

Concentrations of Polyphenon G ¹	No. of cells inoculated	No. of colonies formed	Aver. no. of colonies	Colony-forming activity (%)	Surviving fraction
0	300	257,264,256	259	86.3	1.00
1	300	262,267,250	260	86.6	1.00
5	300	266,251,242	253	84.3	0.98
8	300	110,107,109	109	36.2	0.42
9	300	108,103,106	106	35.2	0.41
10	300	25,34,29	29	9.8	0.11
12	300	18,28,17	23	7.7	0.09
15	300	0,0,0	0	0	0

¹ Cells were treated with Polyphenon G for 6 days

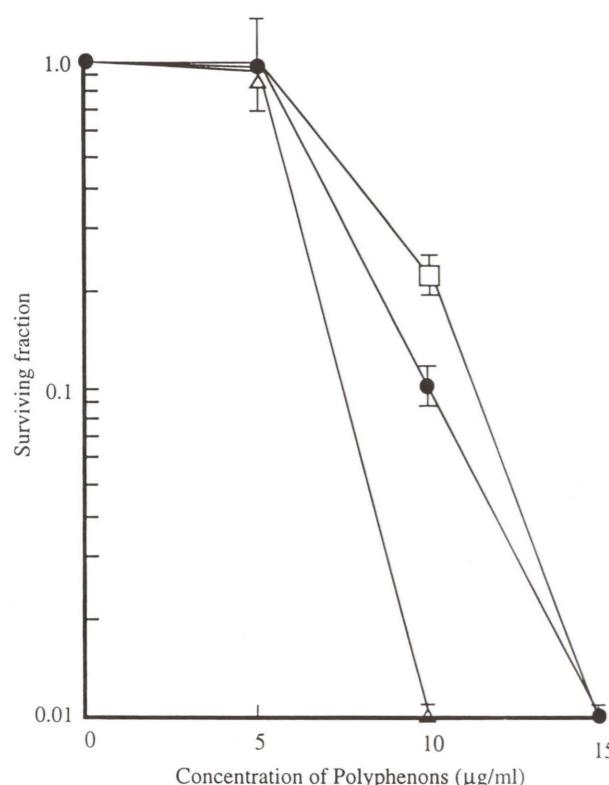


Fig. 1 Effects of Polyphenons on survival of V79 cells. ●: Continuous treatment with Polyphenon G for 6 days. □: Continuous treatment with Polyphenon 30 for 6 days. △: Continuous treatment with Polyphenon 60 for 6 days

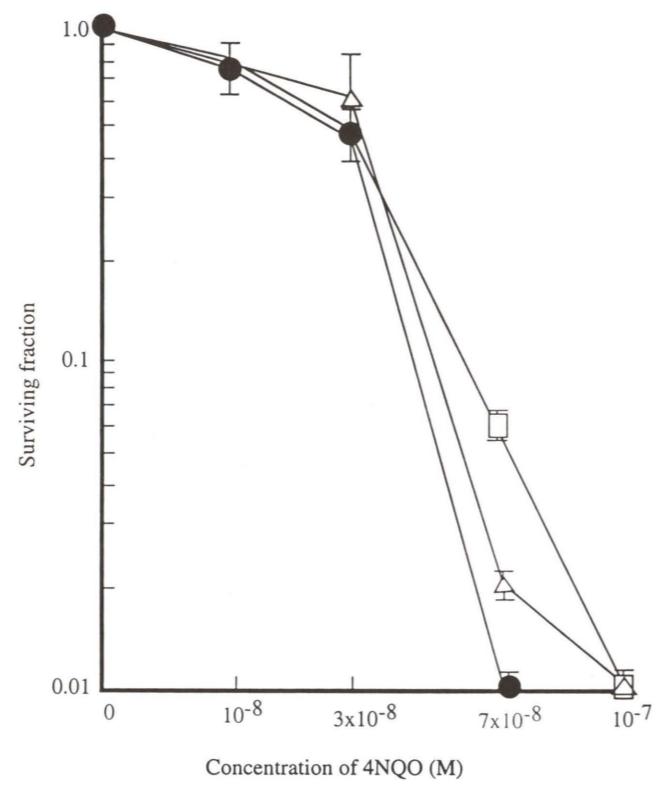


Fig. 2 Effect of Polyphenon G on survival of V79 cells treated with 4NQO. ●: Single treatment with 4NQO. □: Single treatment with 4NQO for 3 h. □: Simultaneous treatment with 4NQO and Polyphenon G (5 μg/ml) for 3 h. △: Treatment with 4NQO for 3 h and post-incubation with Polyphenon G (5 μg/ml) for 6 days

incubation at 0°C for 30 min, alkali solution diffused into the viscous lysate to give a final pH of approximately 12.8 (measured at 23°C). In the tubes B the cell extract was first sonicated lightly and then treated with alkali solution under conditions producing complete unwinding of low-molecular-weight double-stranded DNA at 50°C for 60 min.

Denaturation was stopped by addition of 0.4 ml solution C. This lowered pH in the mixture to about 11.0 (measured at 23°C). The tubes T differ from tubes P in the way in which solution C for neutralization was added before the alkaline solution B.

Therefore the DNA was never exposed to denaturing pH conditions. Also the lysates in tubes T and P were sonicated briefly to render them homogeneous and they in all tubes were diluted with 1.5 ml of solution D. Their fluorescence was read at room temperature by a spectrophotometer (Model EP-770, Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokyo) under the conditions of exciter wavelength 537 nm and emission wavelength 593 nm.

The extent of DNA unwinding after a given time of exposure of cell extracts to alkali solution was calculated by the fluorescent values of tubes T, P,

Table 3 Effect of 4NQO on 6TG-resistant mutations in V79 cells

Concentrations of 4NQO (M) ^a	No. of cells replated ^b	No. of 6TG ^r colonies	Average no. of 6TG ^r colonies	Corrected no. of 6TG ^r colonies ^c	Induced mutation frequency per 10 ⁵ survivors
0	2×10 ⁵	11,7,6,9,7	8.0	9.1	4.6
10 ⁻⁸	2×10 ⁵	3,7,3,3,5	4.2	4.3	2.2
3×10 ⁻⁸	2×10 ⁵	24,28,44,32,32	32	35	17.5
7×10 ⁻⁸	2×10 ⁵	74,85,71,70,74	75	98	49.0
10 ⁻⁷	2×10 ⁵	153,161,148,144,154	152	166	83.0

^a Cells were treated with 4NQO for 3 h in Hanks' salt solution

^b Cells were replated after expression time of 6 days in normal medium

^c Number of 6TG^r colonies were corrected by the colony-forming activity of replated cells in normal medium

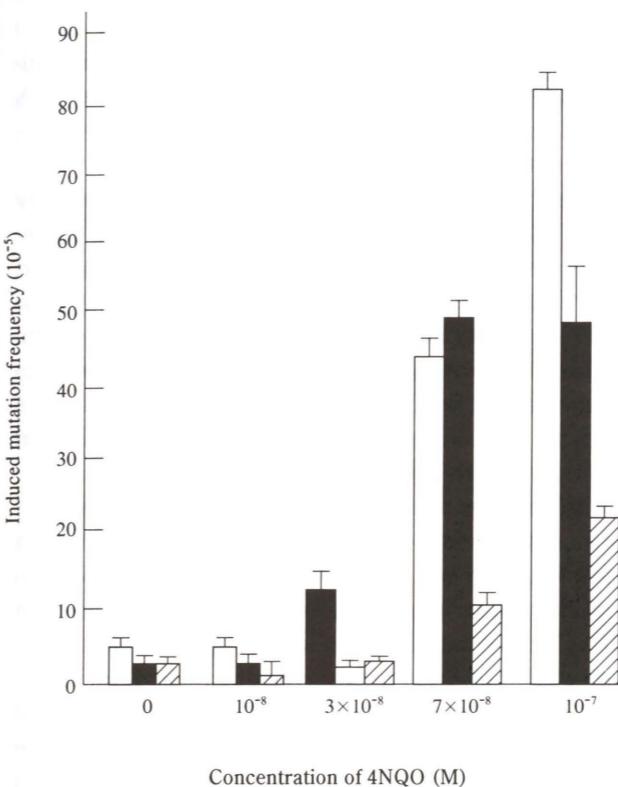


Fig. 3 Effect of different treatments with Polyphenon G on 6TG-resistant mutations induced by 4NQO in V79 cells. □: Single treatment with 4NQO for 3 h. ■: Simultaneous treatment with 4NQO and Polyphenon G (5 μg/ml) for 3 h. ▨: Treatment with 4NQO for 3 h and post-incubation with Polyphenon G (5 μg/ml) for 6 days. ▨: Treatment with 4NQO for 3 h and post-incubation with Polyphenon 30 (5 μg/ml) for 6 days. ■: Treatment with 4NQO for 3 h and post-incubation with Polyphenon 60 (2 μg/ml) for 6 days

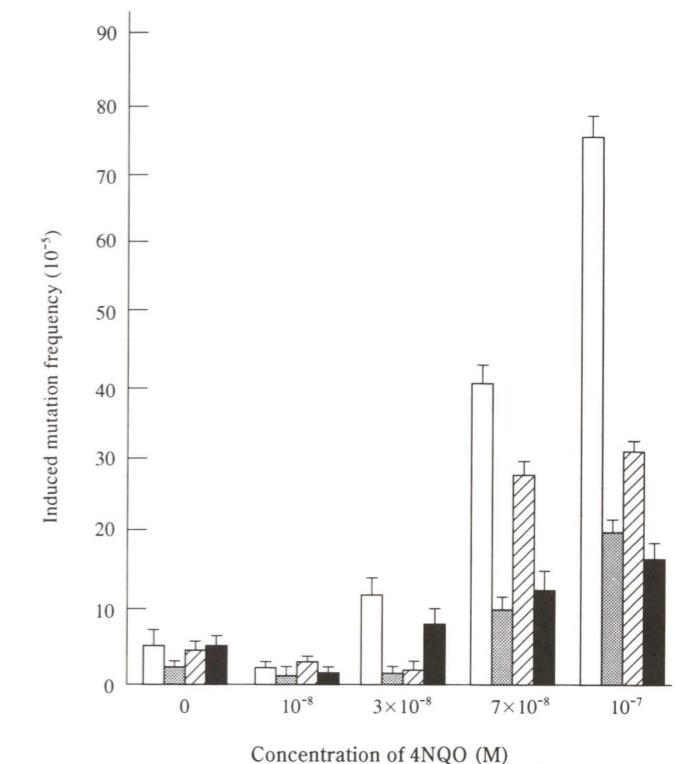


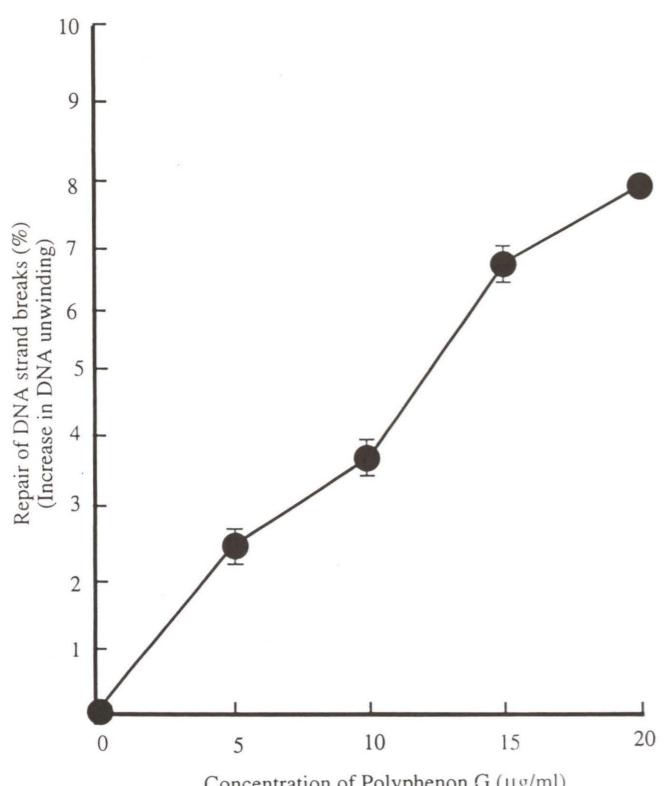
Fig. 4 Effects of post-treatments with three Polyphenons G, 30 and 60 on 6TG-resistant mutations induced by 4NQO in V79 cells. □: Single treatment with 4NQO for 3 h. ■: Simultaneous treatment with 4NQO and Polyphenon G (5 μg/ml) for 3 h. ▨: Treatment with 4NQO for 3 h and post-incubation with Polyphenon G (5 μg/ml) for 6 days. ▨: Treatment with 4NQO for 3 h and post-incubation with Polyphenon 30 (5 μg/ml) for 6 days. ■: Treatment with 4NQO for 3 h and post-incubation with Polyphenon 60 (2 μg/ml) for 6 days

Results

The green tea extracts showed a relatively strong cytotoxicity at high concentrations in Chinese hamster V79 cells, when cells were treated for 6 days continuously (Table 2). The extracts, however, did not induce 6TG-resistant mutations. As shown in Fig. 1, green tea extracts, Polyphenons G, 30, and 60 at concentrations of less than 5 μg/ml had no detectable effects on survival of V79 cells. In following

Table 4 4NQO-induced DNA strand breaks determined by Ethidium bromide binding

Concentrations of 4NQO (M)	Unwinding double stand DNA (tube P)	Other components than double strand DNA (tube B)	Double strand DNA and other components (tube T)	P-B/T-B ¹ (×100%)	% decrease in remaining double strand DNA
0	0.101	0.070	0.111	75.6	
7×10 ⁻⁸	0.108	0.072	0.120	75.0	0.6
10 ⁻⁷	0.115	0.077	0.130	71.7	3.9
5×10 ⁻⁷	0.103	0.072	0.118	67.7	7.9
8×10 ⁻⁷	0.107	0.075	0.125	64.0	11.6
10 ⁻⁶	0.105	0.071	0.126	61.8	13.8

¹ Rates of remaining double strand DNAFig. 5 Effects of Polyphenon G on the DNA strand breaks in V79 cells, when cells were treated with 8×10⁻⁸ M 4NQO for 3 h, followed by incubation for 3 h in araC-HU medium with Polyphenon G

experiments, 5 μg/ml Polyphenon G and 30, 2 μg/ml Polyphenon 60 were used to examine their antimutagenicity against mutations induced by 4NQO or EMS.

The concentration of 6TG used for selecting 6TG-resistant mutant colonies was determined by examining the effect of 6TG on survival of V79 cells. At a concentration of 1 μg/ml of 6TG, all inoculated cells died and did not survive. In the following mutagenicity assay, 1 μg/ml 6TG was used. Fig. 2 shows the effects of Polyphenon G on 4NQO-induced cytotoxicity in various treatments. The 50% lethal dose (LD₅₀) of 4NQO was 2.4×10⁻⁸ M for

single treatment with 4NQO, 3.4×10⁻⁸ M for simultaneous treatment with 4NQO and Polyphenon G. A little increase was observed in survival of cells post-treated with Polyphenon G.

As shown in Table 3 and Fig. 3, 4NQO markedly induced 6TG-resistant mutations in a dose-dependent manner, Polyphenon G slightly reduced mutations induced by 4NQO in simultaneous treatment, and markedly reduced 4NQO-induced mutations in post-treatment. Induced mutation frequencies in post-treatment with Polyphenon G reduced to about one third, compared with those in treatment with 4NQO alone.

Fig. 4 shows the effects of three Polyphenons used in post-treatment on 4NQO-induced 6TG-resistant mutations. Polyphenon G and 60 reduced 4NQO-induced mutations to about one third. Polyphenon 30 reduced mutations to a half. The different inhibitory action of Polyphenons may be due to the difference in concentrations of EGCg and ECg involved in each green tea extract, as shown in Table 1. On the other hand, these Polyphenons were not effective in reducing 6TG-resistant mutations induced by EMS (data not shown).

The dose-dependent increase in DNA strand breaks in V79 cells, which were treated with 4NQO for 3 h, followed by incubation for 3 h in araC-HU medium, was shown in Table 4. The DNA strand breaks which are expressed as decrease in remaining double strand DNA increased as the concentrations of 4NQO increased. Fig. 5 shows the repair activity of Polyphenon G for DNA strand breaks in V79 cells, which were treated with 8×10⁻⁸ M 4NQO for 3 h, followed by incubation for 3 h in araC-HU medium with Polyphenon G. The repair activity of Polyphenon G was calculated by the determination of increase in unwinding DNA to single strands. It was observed that Polyphenon G at concentrations of 5 μg/ml to 20 μg/ml increased the amount of unwinding DNA, indicating the repair of DNA damages by Polyphenon G.

Discussion

During past two decades, a number of reports have been made on carcinogenesis and mutagenesis induced by various environmental chemicals. On the other hand, it was also reported that the extracts of various vegetables and fruits had antimutagenic and anticarcinogenic activity in various organisms.

It was shown by Kada et al. (1985) that the extracts of green tea had the high bio-antimutagenic activity in *B. subtilis* NIG 1125. They isolated four catechins such as EC, EGC, ECg, and EGCg and found that only EGCg reduced the frequency of spontaneous mutations due to altered DNA polymerase III in a mutator strain of *B. subtilis* NIG 1125.

Shimoi et al. (1985) also screened green tea components with bio-antimutagenic activity in *E. coli* B/r WP2, and found that gallic acid, ECg, EGC, and EGCg, reduced UV-induced mutations, but caffeic acid, chlorogenic acid and quercetin did not. These catechins had also little effect on mutations induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG). This antimutagenic effect of catechins was not found in the DNA excision-repair-deficient strains, WP2s and ZA159.

In the present study, the frequency of 6TG-resistant mutations induced by chemicals was examined in the mammalian cultured cells. In mammalian cells, the 6TG-resistant mutations are usually produced by loss or reduction in HGPRT activity. It was reported by Lindahl (1982) and Nakatsuru et al. (1989) that mammalian cells have repair systems for alkylated DNA damages. The V79 cells treated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea eliminated 7-methylguanine and 3-methyladenine from their DNA by a repair process, but were unable to excise or repair *O*⁶-methylguanine or methyl phosphotriesters (Warren et al., 1979). The DNA adduct formation was detected with the induction of mutations at two gene loci in Chinese hamster CHO cells after exposure to EMS (Fortini et al., 1993). The extent of ethylation at the *N*⁷ and *O*⁶ positions of guanine and at the *N*³ site of adenine was measured and the possible relations to 6TG-resistant and ouabain (OUA)-resistant mutations were examined. They found a good correlation between the level of methylations at *O*⁶ guanine and the mutation frequency at the HGPRT gene after treatment with ethylating agents.

In the present study the green tea extracts had no significant effects in reducing cytotoxic activity of 4NQO, they markedly reduced 4NQO-induced mutations in their post-treatment. Polyphenon G, showed a slight reduction in 4NQO-induced mutations in simultaneous treatment with both chemicals. These results support the findings by Shimoi et

green tea extracts did not contribute the repair process for mutagenic damages such as ethylated DNA lesions induced by EMS. In comparison with the surviving fractions of cells treated with single exposures to EMS, simultaneous treatment with EMS and Polyphenon G were markedly increased cytotoxic activity of EMS (data not shown). This indicates that Polyphenon G may enhance the EMS-induced sublethal damages.

4NQO used as another mutagen was first reported by Nakahara et al. (1957). It induced cancers in various tissues, particularly in the lung, pancreas and stomach (Mori and Yasuno, 1961; Hayashi and Hasegawa, 1971; Mori, 1967). 4NQO also induces principally 3 stable adducts: two different guanine adducts and one adenine adduct (Tada and Tada, 1976).

They showed that 4NQO binds covalently to guanine and adenine residues in cellular DNA, producing two guanine adducts and one adenine adducts. Among these adducts, *N*-(guanine-8-yl)-4AQO, 3-(guanine-*N*²-yl)-4AQO, and 3-(adenine-*N*⁶-yl)-4AQO have been identified. These 4NQO-purine adducts are excised in wild type *E. coli* and were not excised in excision-repair deficient strain (*uvrA*) or xeroderma pigmentosum cells, which can not excise pyrimidine dimers (Ikenaga et al., 1975; 1977).

From these UV-mimetic characteristics of 4NQO, it seems likely that 4NQO-induced DNA damages may be subjected to excision of damaged nucleotides, such as pyrimidine dimers. van Loon et al. (1991) reported that γ -rays-induced 2.5×10^{-10} single strand breaks/Gy/dalton in human blood cells. This single strand breaks may correspond to 10^{-7} base pair breaks/Gy/dalton. UV produce 15×10^{-7} pyrimidine dimer/J/m². However, only 0.67 single strand breaks/J/m² was detected in UV-irradiated human WI-38 VA13 cells (Matsuda et al., 1993).

The amounts of DNA breaks induced by γ -rays and chemical carcinogens may be estimated from those of corresponding DNA breaks induced by UV. 4NQO induced 2.5 single strand breaks of γ -ray equivalence, Gy, 3 h after treatment with 4NQO at a concentration of 0.2 mg/l (=10⁻⁶ M) in WI-38 VA13 cells. This indicates that UV-induced pyrimidine dimers which are excision-repaired for 3 h after UV-irradiation, are 4.5% of total DNA damages produced.

In the present study, although green tea extracts had no significant effects in reducing cytotoxic activity of 4NQO, they markedly reduced 4NQO-induced mutations in their post-treatment. Polyphenon G, showed a slight reduction in 4NQO-induced mutations in simultaneous treatment with both chemicals. These results support the findings by Shimoi et

al (1985) that green tea catechins were effective only in reducing UV-induced mutations in *E. coli* B/r WP2, but not effective in DNA excision repair deficient strains, WP2s and ZA159.

The results obtained in the present study suggest that the green tea extracts may stimulate the repair process of the DNA damages induced by 4NQO. Further experiment was carried out by the FADU method for elucidating the repair activity of green tea extracts to 4NQO-induced damages. It was found that the activity to induce the strand breaks as one of the repair process increased by incubation of cells in araC-HU medium with Polyphenon G after exposure to 4NQO. This indicated that green tea extracts may contribute some repair process of 4NQO-induced DNA damages in Chinese hamster V79 cells.

References

- Birnboim, H. C. and J. J. Jevcak (1981) Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation, *Cancer Res.*, 41, 1889-1892.
- Chu, E. H. Y. and H. V. Malling (1968) Mammalian cell genetics, II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells *in vitro*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 61, 1306-1312.
- Dunn, W. C. and J. D. Regan (1979) Inhibition of DNA excision repair in human cells by arabinofuranosyl cytosine: effect on normal and xeroderma pigmentosum cells, *Molec. Pharmacol.*, 15, 367-374.
- Fortini, P., A. Calcagnile, A. Di Muccio, A. Bignami and E. Dogliotti (1993) Quantitative relationship between ethylated DNA bases and gene mutation at two loci in CHO cells, *Environ. Molec. Mutagen.*, 21, 154-159.
- Fox, M. (1975) Factors affecting the quantitation of dose-response curves for mutation induction in V79 Chinese hamster cells after exposure to chemical and physical mutagen, *Mutation Res.*, 29, 449-466.
- Hayashi, Y. and T. Hasegawa (1971) Experimental pancreatic tumor in rats after intravenous injection of 4NQO, *Gann*, 62, 329-330.
- Ikenaga, M., H. Ichikawa-Ryo, and S. Kondo (1975) The major cause of inactivation and mutation by 4NQO in *E. coli*: excisable 4NQO-purine adducts, *J. Mol. Biol.*, 92, 341-356.
- Ikenaga, M., H. Takebe, and Y. Ishii (1977) Excision repair of DNA base damage in human cells treated with the chemical carcinogen 4-NQO, *Mutation Res.*, 43, 415-427.
- Kada, T., K. Morita and T. Inoue (1978) Antimutagenic action of vegetable factors on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate, *Mutation Res.*, 53, 351-353.
- Kada, T., K. Kaneko, T. Matsuzaki and Y. Hara (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor, *Mutation Res.*, 150, 127-132.
- Katiyar, S. and H. Mukhtar (1996) Tea in chemoprevention of cancer, Epidemiological and experimental studies (Review), *Internat. J. Oncol.*, 8, 221-238.
- Kuroda, Y., A. Yokoyama and T. Kada (1985) Assays for the induction of mutations to 6TG-resistance in Chinese hamster V79 cells in culture, Evaluation of short-term tests for carcinogens, World Health Organization, Elsevier, Amsterdam, pp. 537-542.
- Kuroda, Y. (1996) Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells, *Mutation Res.*, 361, 179-186.
- Kuroda, Y. and Y. Hara (1999) Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols, *Mutation Res.*, 436, 69-97.
- Lindahl, T. (1982) DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 61-87.
- Matsuda, T., T. Yagi, H. Takebe, and S. Matsui (1993) FADU assay for evaluation of DNA damage caused by environmental micropollutants, *Proc. Environ. Engineer. Res.*, 30, 227-234.
- Mori, K. and A. Yasuno (1961) Induction of pulmonary tumors in mice by subcutaneous injection of 4NQO, *Gann*, 52, 149-153.
- Mori, K. (1967) Carcinoma of the glandular stomach of mice by instillation of 4NQO, *Gann*, 58, 389-393.
- Morgan, A. R. and D. E. Pulleyblank (1974) Native and denatured DNA, cross-linked and palindromic DNA and circular covalently-closed DNA analysed by a sensitive fluorometric procedure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61, 346-353.
- Nakahara, W., F. Fukuoka and T. Sugimura (1957) Carcinogenic action of 4NQO, *Gann*, 48, 129-137.
- Nakatsuru, Y., K. Aoki and T. Ishikawa (1989) Age and strain dependence of *O⁶*-methylguanine-DNA methyltransferase activity in mice, *Mutation Res.*, 219, 51-56.
- Snyder, R. D., W. L. Carrier and J. D. Regan (1981) Application of arabinofuranosyl cytosine in the kinetic analysis and quantitation of DNA repair in human cells after UV irradiation, *Biophys. J. Biophys. Soc.*, 35, 339-350.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, T. Tomita and T. Kada (1985) Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *E. coli* B/r, *Mutation Res.*, 149, 17-23.
- Tada, M. and M. Tada (1976) Main binding sites of the carcinogen, 4NQO in nucleic acids, *Biochem. Biophys. Acta*, 454, 558-566.
- van Loon, A. A., B. H. Groenendijk, G. P. van der Schans, P. H. Lohman and R. A. Baan (1991) Detection of base damage in DNA in human blood exposed to ionizing radiation at biologically relevant doses, *Int. J. Radiat. Biol.*, 59, 651-660.
- Warren, W., A. R. Crathorn and K. V. Shooter (1979) The stability of methylated purines and methylphosphotriesters in the DNA of V79 cells after treatment with *N*-methyl-*N*-nitrosourea, *Biochem. Biophys. Acta*, 563, 82-88.
- Yang, C. S. and Z.-Y. Wang (1993) Tea and cancer, *J. Nat. Cancer Inst.*, 85, 1038-1049.

Environ. Mutagen Res., 21 : 103 - 107 (1999)

Short communication

Suppression of genotoxicity of X-rays in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epigallocatechin, and theaflavin digallate

Kazuaki Kawai¹, Kazuo Fujikawa² and Hideyuki Furukawa¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University, Nagoya 468-8503, Japan

²Atomic Energy Research Institute, Kinki University, Higashiosaka 577-8502, Japan

Summary

Larval *Drosophila melanogaster* heterozygous for the somatic cell marker mutation *mwh* were fed on medium containing green tea catechins (-)-epigallocatechin gallate (EGCg), (-)-epigallocatechin (EGC), or theaflavin digallate (Tdg) or on catechin-free medium and irradiated with X-rays; after emergence as adult flies, the wings were inspected for mutant clones expressing the phenotype of the marker. The EGCg-, EGC-, and Tdg-treated groups all showed a clear reduction in the yields of X-ray-induced mutant clones compared with the untreated groups. Since the size distributions of mutant clones were not affected by the presence of the catechins, we conclude that EGCg, EGC, and Tdg have a radioprotective effect at the chromosomal level in somatic cells of *D. melanogaster* under the conditions applied.

Keywords : *Drosophila melanogaster*, X-rays, (-)-epigallocatechin gallate (EGCg), (-)-epigallocatechin (EGC), theaflavin digallate (Tdg)

Introduction

Since the pioneer work by Okuda et al. (1984), intensive studies have been conducted on the antigenotoxicity of catechins, major components of green tea (Kada et al., 1985; Shimoi et al., 1986; Wang et al., 1989; Jain et al., 1989; Hayatsu et al., 1992; Yen and Chen, 1996; Aiza et al., 1996; Kurada, 1996; Han, 1997; Apostolides et al., 1997). It is now well recognized that *in vitro*, (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) and other catechins have a high activity as suppressors of mutagenic and clastogenic effects of carcinogens. A suppressive effect of EGCg on X-ray-induced oncogenic transformation in a murine cell line has also been reported (Komatsu et al., 1997). However, our knowledge on the antigenotoxicity of catechins in whole-body systems is still limited. *In vivo* studies would be valuable, however, in view of a realistic evaluation of the

health effects of green tea ingestion in relation to a possible cancer prevention as was suggested by epidemiological studies (Oguni et al., 1989; Imai et al., 1997).

Negishi et al. (1992) reported that, in *Drosophila melanogaster* somatic cells, the major catechin EGCg showed a clear suppressive effect on the genotoxicity of a wide spectrum of carcinogens. In the present study, we tested EGCg and two other catechins, namely, (-)-epigallocatechin (EGC) and theaflavin digallate (Tdg), for their antigenotoxic effects against X-ray damage using the *Drosophila* wing-spot test. With this test system, we analyze the yield and the size of mutant somatic clones resulting from mitotic recombination and other mutational events induced by X-rays in the cells of the wing discs of irradiated larvae (Ayaki et al., 1990). We define an agent as antigenotoxic if it decreases the yield without affecting the size distribution of mutant clones. Here, we report that all the catechins had an antigenotoxic effect against damage induction by X-rays in somatic cells of *D. melanogaster*.

received : September 30, 1998

accepted : February 17, 1999

© Environmental Mutagen Society of Japan

Materials and Methods

1. Catechins

(-)-Epigallocatechin gallate (EGCg, >98 %, CAS no. 989-51-5), (-)-epigallocatechin (EGC, >98 %, CAS no. 970-74-1) and theaflavin digallate (Tdg, >98 %, CAS no. 33377-72-9) were kindly supplied by Dr. Y. Hara, Food Research Laboratories, Mitsui-Norin Co. Ltd., Shizuoka, Japan. Immediately before use, they were dissolved in distilled water. The concentrations of the solutions used were 44 μ mol/l for EGCg, 345 μ mol/l for EGC and 115 μ mol/l for Tdg.

2. Tester flies

Four-day old virgin females of *D. melanogaster* with genotype *mwh* *ju* ; *spa*^{pol} were mated to 3-4 day old Oregon-R wild-type males and allowed to lay eggs for 4 hrs in vials containing standard Drosophila medium. F₁ progeny from this mating are heterozygous for the recessive wing-cell marker mutation *multiple wing-hairs* (*mwh*). The progeny were sampled as second instar larvae 48±2 hrs after oviposition and used as testers for induction of somatic mutation and recombination.

3. Treatments with catechins and X-rays

The heterozygous larvae were transferred to 30mm×110mm polycarbonate vials containing 1.2g of Drosophila Instant Medium (Formula 4-24; Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, USA) hydrated with 4ml of EGCg, EGC, or Tdg solution or with 4ml of distilled water. Hereafter, presence or absence of catechins in the medium are shown by the symbols + or -, respectively. For example, EGCg (+) or catechin (-) designate the presence of EGCg in the medium or the absence of all kinds of catechins, respectively.

Two days after the onset of feeding with a catechin, the larvae were transferred to 60mm×15mm plastic dishes together with the medium and irradiated with X-rays. After irradiation, they were washed and transferred to vials containing fresh catechin (+) or catechin (-) medium, in which they were allowed to develop to adulthood.

For X-irradiation, a Hitachi X-ray generator was operated at 140 kV and 4 mA with 0.5mm Al filtration; the dose rate was 0.64 Gy/min as determined with a Victoreen ionisation dosimeter. The doses administered were 9 Gy or lower, because in a preliminary experiment, X-irradiation of larvae with doses below 10 Gy did not significantly reduce the survival to adulthood (data not shown).

4. Wing spot test

Hatched adult flies were preserved in 70 % ethanol. For screening, their wings were first rinsed in water for 5–10 min, and then mounted on glass slides using Faure's solution (Graf et al., 1984). The permanent wing preparations were microscopically examined at 400 \times magnification. Spots on the wing blade were detected as mutant clones expressing the phenotype of the *mwh* allele. They arise from mitotic recombination and other genetic events generated in wing disc cells during larval development. Mutant spots detected were classified into clone size classes of 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16 cells, and so on, according to the number of mutant cells they comprised.

Results

Table 1 summarizes the frequencies and clone size distributions of mutant spots recovered after X-irradiation of larvae heterozygous for the wing cell marker *mwh* that were raised in the presence or absence of a catechin. The size of the mutant spots in the irradiated series, either catechin (+) or (-), varied widely, e.g., from size class 1 to the class of 33-64 cells in the 3 Gy irradiation series of experiment #1. Two-sided contingency χ^2 tests at $P=0.05$ indicated that none of the size distributions in the catechin (+) series, except the Tdg (+) series irradiated with 6 Gy, differed significantly from that of the corresponding catechin (-) series. The significant result may be due to unknown fluctuations of the experimental conditions or may be due to a statistical type I error, as the distributions in the Tdg (+) series after irradiation at 3 and 9 Gy did not differ significantly from those in the catechin (-) series. Therefore, we relied on the totals of spots produced to evaluate the effects of the catechins.

As shown in Table 1, all the catechins tested reduced the yields of mutant spots induced by X-rays. Statistical assessment of the reductions by means of χ^2 tests carried out on the observed numbers of wing spots was significant for EGCg at all dose levels, at the 3 Gy and 9 Gy levels for EGC, and at the highest dose level of 9 Gy for Tdg, although a trend for reduction was always seen for all three catechins at each dose level.

The percentages of suppression by each of the catechins were calculated as

$$S (\%) = (1 - f_1/f_2) \times 100, (1)$$

where f_1 is the frequency of spots induced by X-rays in the catechin (+) series and f_2 the frequency in the catechin (-) series. As shown in Table 2, the S values at the three dose levels were about 30–40 %, 35–65 % and 30–35 % for EGCg, EGC and Tdg,

Table 1 Clone size and frequencies of *multiple wing hairs* (*mwh*) mutant spots detected after X-ray irradiation of *D. melanogaster* larvae heterozygous for the wing cell marker

Experi- ment	X-rays (Gy)	Catechins	No. of spots in each clone size class (1 through 257-512 cells) ^a						Total no. of spots	No. of wings	Frequency of spots per wing observed	(induced) ^b	
			1	2	3-4	5-8	9-16	17-32	33-64	65-128	128-256	257-512	
#1	0	none ^c	7	1	0	2	0	0	0	1	0	0	11
		EGCg ^d	6	8	1	0	0	0	0	0	0	0	15
	3	none ^c	29	15	24	36	31	12	1	0	0	0	148
		EGCg ^d	9	9	19	24	15	8	2	0	0	0	86
	6	none ^c	19	14	21	53	45	15	5	0	0	0	172
		EGCg ^d	9	8	13	18	29	13	6	1	0	0	97
	#2	none ^c	17	9	12	36	38	15	5	2	0	0	134
		EGCg ^d	8	6	14	34	40	19	2	1	0	0	124
		none ^c	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	5
		EGC ^e	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	7
		Tdg ^f	2	0	2	1	2	2	1	1	0	1	12
		none ^c	4	3	3	9	7	7	2	0	0	0	35
		EGCg ^e	1	1	2	5	7	7	0	1	0	0	24
	#3	Tdg ^f	2	0	8	6	7	8	3	0	0	0	34
		none ^c	0	2	5	10	19	15	11	2	0	0	64
		EGC ^e	2	2	8	9	14	17	11	2	3	0	68
		Tdg ^f	0	0	0	3	8	22	4	1	0	0	38
		none ^c	1	5	7	14	25	23	7	1	0	0	83
		EGC ^e	2	5	8	24	22	19	11	3	0	0	94
		Tdg ^f	3	5	6	21	29	30	12	1	1	0	108

^a Spots classified according to the number of mutant cells of each spot

^b Calculate as $f = f_i - f_o$, where f_i is the total frequency of spots observed per wing in the irradiated series, and f_o in the corresponding non-irradiated series

^c Catechin (-) series, not treated with catechin

^{d,e,f} Application of 44^e, 345^e and 115^f μ mol/l solutions in water, respectively

Reduction of frequency significant at $P \leq 0.05$, or ** significant at $P \leq 0.01$ in comparison with the catechin (-) series (one-sided χ^2 test for proportions, cf. Frei and Würgler, 1988)

respectively. Regression analyses showed that the overall reductions were in the range of 30–40 % and rather similar for the three catechins tested (Fig. 1 a–c, Table 2).

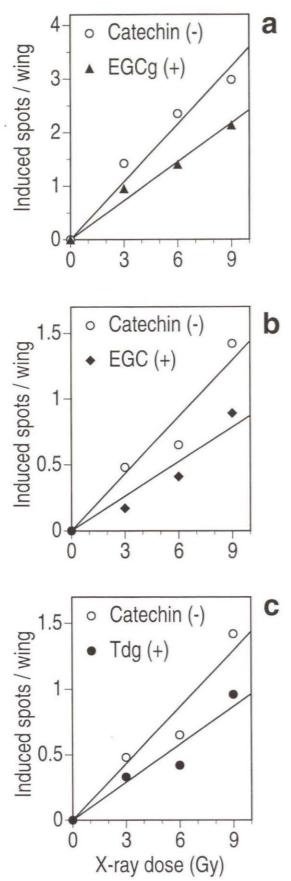


Fig. 1 a-c : X-ray induction of *multiple wing hairs* (*mwh*) mutant spots in wing disc cells of *Drosophila* larvae raised in the presence or absence of catechins in the food. Linear regression analyses (no-intercept model) of the spot frequency reductions resulting from radioprotection by catechins taken up by the irradiated larvae : (a) EGCg experiment #1, (b,c) EGC and Tdg experiment #2

Discussion

Oral administration of the green tea catechins EGCg, EGC, or Tdg to larval *D. melanogaster* heterozygous for the wing-cell marker mutation *mwh* caused a clear reduction in the yields of *mwh* spots induced by X-rays (Table 2). The size distributions of mutant spots did not show a difference that could be ascribed to the presence or absence of catechins in the X-ray experiments, suggesting that none of the catechins tested affected normal development of the wing discs in the larvae. The results support the conclusion that EGCg, EGC and Tdg antagonize the genetically damaging effects of X-rays under the present experimental conditions.

We may interpret the antagonistic effect of catechins as evidence for a radical scavenging activity of the catechins, as X-ray damage to cellular DNA is caused mainly by hydroxyl radicals and other radicals generated through radiolysis of intracellular water (see Kondo, 1972). In fact, biochemical studies have shown that EGCg and green tea extracts are highly active antioxidants (Matsuzaki and Hara, 1985; Wang et al., 1994; Yoshino et al., 1994; Shiraki et al., 1994; Yen and Chen, 1995). Furthermore, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO), as an effective scavenger of hydroxyl radicals, markedly reduced the induction of mutant wing spots by X-rays in *mwh* heterozygous flies (Kimura et al., 1998). Alternatively, although not exclusively, the observed effects may result from an enhanced repair capacity for X-ray induced chromosomal damage in the presence of a catechin. The finding, that EGCg can suppress genotoxicity of a wide variety of carcinogens in the wing-spot test system (Negishi et al., 1992), suggests that mechanism(s) other than antioxidant activity could be involved. Further experiments are needed to substantiate the idea of a radical scavenging mechanism

explaining the effects of catechins in X-irradiated somatic cells of *Drosophila*. Anyway, the present study has shown that green tea catechins can be radioprotective at the chromosome level in somatic cells *in vivo*.

Acknowledgement

We thank Dr. H. Frei (Institute of Toxicology, ETH and University of Zurich) for critical reading of the manuscript.

References

- Apostolides, Z., D.A. Balentine, M.E. Harbowy, Y. Hara and J.H. Weisburger (1997) Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters, *Mutat. Res.*, 389, 167-172.
- Ariza, M.E., A.S. Oberyszyn, F.M. Robertson and M.V. Williams (1996) Mutagenic potential of peripheral blood leukocytes : in vivo exposure to the carcinogen 7,12-dimethylbenz [a] anthracene, and the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol acetate followed by in vitro co-culture with AS52 cells, *Cancer Letters*, 106, 9-16.
- Ayaki, T., K. Fujikawa, H. Ryo, T. Itoh and S. Kondo (1990) Induced rates of mitotic crossing over and possible mitotic gene conversion per wing anlage cell in *Drosophila melanogaster* by X rays and fission neutrons, *Genetics*, 126, 157-166.
- Frei, H. and F.E. Würgler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result, *Mutat. Res.*, 203, 297-308.
- Graf, U., F.E. Würgler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall and P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environmental Mutagenesis*, 6, 153-188.
- Han, C. (1997) Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols, *Cancer Letters*, 114, 153-158.
- Hayatsu, H., N. Inada, T. Kakutani, S. Arimoto, T. Negishi, K. Mori, T. Okuda and I. Sakata (1992) Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate, *Preventive Medicine*, 21, 370-376.
- Imai, K., K. Suga and K. Nakachi (1997) Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population, *Preventive Medicine*, 26, 769-775.
- Jain, A.K., K. Shimoi, Y. Nakamura, T. Kada, Y. Hara and I. Tomita (1989) Crude tea extracts decrease the mutagenic activity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in vitro and in intragastric tract of rats, *Mutat. Res.*, 210, 1-8.
- Kada, T., K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki and Y. Hara (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens, *Mutat. Res.*, 150, 127-132.
- Kimura, Y., K. Kawai, K. Fujikawa and H. Furukawa (1998) Inhibitory effect of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide on genotoxicity of X-rays in *Drosophila*, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 44, 233-235.
- Komatsu, K., H. Tauchi, N. Yano, S. Endo, S. Matsuura, S. Shoji (1997) Inhibitory action of (-)-epigallocatechin gallate on radiation-induced mouse oncogenic transformation, *Cancer Lett.*, 112, 135-139.
- Kondo, S. (1972) Molecular Radiation Biology, Gakkai Shuppan Center, Tokyo, (in Japanese)
- Kuroda, Y. (1996) Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells, *Mutat. Res.*, 361, 179-186.
- Matsuzaki, T. and Y. Hara (1985) Antioxidative activity of tea leaf catechins, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 59, 129-134.
- Negishi, T., I. Sakata and H. Hayatsu (1992) Inhibitory effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on genotoxicities of various carcinogens in *Drosophila*, *Mutat. Res.*, 272, 275-276.
- Oguni, I., K. Nasu, S. Kanaya, Y. Ota, S. Yamamoto and T. Nomura (1989) Epidemiological and experimental studies on the antitumor activity by green tea extracts, *Jpn. J. Nutr.*, 47, 93-102.
- Okuda, T., K. Mori and H. Hayatsu (1984) Inhibitory effect of tannins on direct-acting mutagens, *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 3755-3758.
- Sachs, L. (1982) Applied Statistics, a Handbook of Techniques, Springer, New York, Heidelberg, Berlin.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara and T. Kada (1986) The pyrogallol related compounds reduce UV-induced mutations in *Escherichia coli* B/r WP2, *Mutat. Res.*, 173, 239-244.
- Shiraki, M., Y. Hara, T. Osawa, H. Kumon, T. Nakayama and S. Kawakishi (1994) Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea, *Mutat. Res.*, 323, 29-34.
- Wang, Z.Y., S.J. Cheng, Z.C. Zhou, M. Athar, W.A. Khan, D. R. Bickers and H. Mukhtar (1989) Antimutagenic activity of green tea polyphenols, *Mutat. Res.*, 223, 273-285.
- Yen, G.-C. and H.-Y. Chen (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 27-32.
- Yen, G.-C. and H.-Y. Chen (1996) Relationship between antimutagenic activity and major components of various teas, *Mutagenesis*, 11, 37-41.
- Yoshino, K., Y. Hara, M. Sano and I. Tomita (1994) Antioxidative effects of black tea theaflavins and thearubigin on lipid peroxidation of rat liver homogenates induced by *tert*-butyl hydroperoxide, *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 146-149.

Table 2 Suppressive effects of catechins on X-ray genotoxicity in wing disc cells of *Drosophila melanogaster*

Catechins	Percent of suppression ^a at			Linear regression lines forced through the origin ^b		Suppression (S) ^c	
	3Gy	6Gy	9Gy	Induced spots per wing/Gy	Slope $b_1 \pm s_{b_1}$	Slope $b_2 \pm s_{b_2}$	
EGCg(44μmol/l)	33	40	29	0.241±0.012	0.359±0.024	33±6	
EGC(345μmol/l)	65	37	37	0.087±0.009	0.144±0.013	40±8	
Tdg(115μmol/l)	31	35	32	0.096±0.010	0.144±0.013	33±9	

^a Percentages calculated according to equation (1) in the text.

^b Computed with program StatView, version 4.02, implemented on a Power Macintosh 7200/90 (see also Figs. 1a-c).

^c Calculus of error propagation for standard errors (SE) of ratios b_1/b_2 is based on the respective standard errors s_{b_1} and

s_{b_2} of the slopes b_1 and b_2 , i.e., $S\%(\pm SE) = 100 \times \left[1 - \frac{b_1}{b_2} \pm \frac{1}{b_2^2} \sqrt{b_1^2 s_{b_1}^2 + b_2^2 s_{b_2}^2} \right]$, following Fenner (1931, quoted by Sachs, 1982)

ラット骨髓および末梢血におけるMNUの誘発小核について

朝倉 省二¹, 杉原 忠一², 澤田 繁樹², 大門 弘彦²¹エーザイ株式会社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5-1-3²エーザイ株式会社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

Comparison of MNU-induced micronuclei between bone marrow and peripheral blood in the male rat

Shoji Asakura, Tadakazu Sugihara, Shigeki Sawada, Hirohiko Daimon

Tsukuba Drug Safety Research, Drug Safety Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.

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

Kawashima Drug Safety Research Department, Drug Safety Research Laboratories, Eisai Co, Ltd.

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

Summary

The present study was performed as part of the 9th collaborative trials of the CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) to evaluate the performance of the rat micronucleus test in detection of chromosomal damage. Rats were treated orally with a single dose of *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) at 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg/kg body wt. Femur bone marrow was obtained from the rats 24 and 48 hours after administration. Peripheral blood was collected from the tail of rats just before administration or 24, 48 and 72 hours after administration. In the assay using bone marrow, all animals treated with MNU showed statistically significant increases in micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPE) at both time points examined, and the frequencies of MNPE at 48 hours were higher than those at 24 hours. In the assay using peripheral blood, statistically significant increases in MNPE were observed at 48 and 72 hours, and the frequencies of MNPE at 48 hours were higher than those at 72 hours. Higher frequencies of MNPE in bone marrow were observed as compared with those of MNPE in peripheral blood at the same dose. We concluded that it is possible to use both bone marrow and peripheral blood in the rat micronucleus test. However, because of the relatively low number of MNPE found in rat peripheral blood, it is suggested that the use of the bone marrow or the examination of a large number of erythrocytes in peripheral blood may be necessary for standard test and for clear detection of weak chromosomal damage.

Keywords: rat, bone marrow, peripheral blood, micronucleus test, *N*-methyl-*N*-nitrosourea

緒 言

小核試験は、最も簡便で感度の良い *in vivo* 変異原性試験であり、医薬品において *in vivo* の変異原性評価の第一選択試験となる(医薬審第554号、「遺伝毒性試験」

受付: 1999年3月13日

受理: 1999年4月6日

©日本環境変異原学会

医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ」について, 1998)。一般に小核試験にはマウスが用いられてきたが、多くの安全性評価(単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、薬物動態試験等)はラットを用いて行われることから、ラットで小核試験を実施した方が総合的な安全性評価を効率的に実施することができる(薬審第444号、医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイドラインについて、1996)。しかし、ラットの末梢血を用いた小核試験の報告は多くなく、変異原性評価にお

いてラットの骨髄と同様の感受性があるかどうか明らかでなかった。これらの状況から、環境変異原学会の分科会の一つである哺乳動物変異原性試験研究分科会(MMS研究会)では、共同研究「ラットを用いる小核試験」を企画し、小核試験にラットを用いることが有用かどうかを検討することとした(Wakata et al., 1998)。

今回われわれは上記の共同研究に参加し、すでにマウスで小核誘発作用が確認されている発癌物質(Morita et al., 1997)で、ラットにおける小核誘発の報告がない *N*-methyl-*N*-nitrosoureaについて、ラットにおける小核誘発作用を検討した。また、骨髄とともに末梢血を用いる小核試験も行い、その結果を比較した。

実験材料および方法

1. 化合物

N-methyl-*N*-nitrosourea(MNU, CAS No. 684-93-5, 片山化学工業)は、注射用水に溶解した。陽性対照物質は cyclophosphamide(CP, CAS No. 6055-19-2, Sigma)を用い、注射用水に溶解した。

2. 動物および投与

日本チャールス・リバー(株)より F 344/Du Crj 雄ラットを導入し、2週間馴化した後、一群4-5匹ずつランダムに分け、8週齢で使用した。飼料および水は自由に摂取させた。骨髄を用いる小核試験ならびに末梢血を用いる小核試験はそれぞれ別の動物を用いた。

投与量を決めるため、MNUの経口投与の LD₅₀(180 mg/kg) (US Department of Health, Education Welfare, 1975)を参考に 25, 50, 75, 100, 150 および 200 mg/kgを単回経口投与し、致死量の把握試験を実施した結果、200 mg/kgで投与2日後に1/3例の死亡が認められた。150 mg/kgでは投与2日後に1/3例がチアノーゼ状態で尻尾からの末梢血の採取ができなかった。したがって、最高用量を100 mg/kgとし、以下公比2で4用量設定し小核試験に用いた。陰性対照は媒体(注射用水)を用い、陽性対照 CP の投与量は 20 mg/kg に設定した。投与容量は 1 mL/100 g とした。

3. 小核試験

陰性対照および MNU を投与した動物の標本採取時期は、骨髄を用いる場合は投与24, 48時間後に設定した。末梢血を用いる場合は投与直前(Pre), 投与24, 48 および 72 時間後に設定した。CP は骨髄が投与24時間後、末梢血が投与直前および投与48時間後に設定した。

骨髄を用いる場合は動物を頸椎脱臼で屠殺し、大腿骨を摘出した後、骨髄細胞の塗抹標本を作製した。末梢血を用いる場合は動物の尻尾から末梢血を採取し、塗抹標本を作製した。いずれの標本もメタノール固定し、0.007%アクリジンオレンジ液で染色した。

観察は蛍光顕微鏡(倍率: 1000倍)を用い、塗抹標本の赤血球細胞を観察した。骨髄標本では、幼若赤血球を1個体当たり2000個観察し、その際の小核を持つ細胞数を調べた。幼若赤血球比を求めるために成熟赤血球数も同時に調べた。末梢血標本ではすべての RNA 陽性赤血球を幼若赤血球として1個体当たり2000個観察し、その際の小核を持つ細胞数を調べた。さらに、赤血球細胞を1000個観察し、その際の幼若赤血球数も調べた。

4. 統計処理

各群間の有意差は、統計処理により示した。骨髄を用いる場合の検定の対照は溶媒を、末梢血を用いる場合の検定の対照は投与直前(Pre)とした。小核を持つ幼若赤血球の出現頻度は Fisher 直接確率検定を、幼若赤血球比は Steel 検定を行った。なお、陽性対照の幼若赤血球比について Wilcoxon 検定を行った。有意水準は両側検定で 5% および 1% で行った。

結果

Table 1 に骨髄の観察結果を示した。小核を持つ幼若赤血球の出現頻度は、投与24時間後から最低用量の 6.25 mg/kg 以上で有意な増加が認められた。48時間後では小核を持つ幼若赤血球の出現頻度がさらに増加した。幼若赤血球比は、投与24時間後で陰性対照群の 52.7% に対し、MNU 25 mg/kg 以上で有意な減少が認められた。投与48時間後で陰性対照群の 48.9% であったのに対し、最低用量の 6.25 mg/kg 以上で有意な減少が認められた。

Table 2 に末梢血の観察結果を示した。MNU の 100 mg/kg 投与群の1例で死亡が認められた。陰性対照群における幼若赤血球 2000 個当たりの小核を持つ細胞数は各個体当たり 0-3 個で各時間の頻度は 0.04-0.07 % であった。陰性対照群の幼若赤血球比は、3.60-3.98 % で時間による有意差は認められなかった。小核を持つ幼若赤血球の出現頻度は、投与直前(Pre)に対し、投与24時間後ではいずれの用量においても有意な増加は認められなかつたが、投与48時間後では最低用量の 6.25 mg/kg 以上で有意差が認められた。投与72時間後では、25 mg/kg 以上において有意な小核の誘発が認められたが、48時間後と比較すると明らかに低下した。MNU 100 mg/kg 投与群の投与72時間後における標本では、幼若赤血球の頻度が著しく低かったため、小核を持つ幼若赤血球の観察を行わなかった。幼若赤血球比の低下は、12.5 mg/kg 以上で有意に認められ、経時的に低下する傾向が認められた。

陽性対照の CP は骨髄、末梢血いずれも有意な小核誘発を示した。

Table 1 Micronucleus induction in bone marrow of rats treated with MNU

Compound	Dose (mg/kg)	Number of rats	MNPE per 2000 PE	%MNPE	%PE
			Individual animal data	Mean±SD	Mean±SD
<u>24 hours sampling time</u>					
Water(Negative control)	5	7,2,4,1,5	0.19±0.12	52.7±5.1	
MNU	6.25	5	12,12,9,7,12	0.52±0.12**	35.6±8.1
	12.5	5	9,10,7,10,14	0.50±0.13**	36.0±9.0
	25	5	22,18,13,16,17	0.86±0.16**	33.6±3.8 [#]
	50	5	23,20,21,27,24	1.15±0.14**	25.1±7.4 [#]
	100	5	18,21,14,10,11	0.74±0.23**	16.7±2.5 [#]
CP	20	5	27,23,25,28,24	1.27±0.10**	36.9±5.7 [§]
<u>48 hours sampling time</u>					
Water(Negative control)	5	1,0,1,1,3	0.06±0.05	48.9±5.1	
MNU	6.25	5	12,8,11,19,20	0.70±0.26**	35.3±7.0 [#]
	12.5	5	10,19,16,23,13	0.81±0.25**	28.8±6.2 [#]
	25	5	18,28,38,25,36	1.45±0.41**	22.8±2.8 [#]
	50	5	25,34,58,61,43	2.21±0.77**	22.2±2.3 [#]
	100	5	80,72,95,87,92	4.26±0.47**	5.1±2.4 [#]

MNPE : micronucleated polychromatic erythrocytes, PE : polychromatic erythrocytes

** : Significant difference compared to the water group, p<0.01 Fisher's exact test

[#] : Significant difference compared to the water group, 0.01<p<0.05 Steel's test

[§] : Significant difference compared to the water group, 0.01<p<0.05 Wilcoxon's rank sum test

Table 2 Micronucleus induction in peripheral blood of rats treated with MNU

Compound	Dose (mg/kg)	Sampling time	Number of rats	MNPE per 2000 PE	%MNPE	%PE
				Individual animal data	Mean±SD	Mean±SD
<u>Water(Negative control)</u>						
	Pre	5	1,2,0,2,1	0.06±0.04	3.88±1.16	
	24		3,0,1,2,1	0.07±0.06	3.98±0.81	
	48		1,0,1,1,1	0.04±0.02	3.60±0.84	
	72		2,1,0,0,1	0.04±0.04	3.68±0.36	
MNU	6.25	Pre	5	1,0,2,1,1	0.05±0.04	4.14±0.65
	24		0,0,2,2,1	0.05±0.05	3.86±0.69	
	48		4,7,5,10,6	0.32±0.12**	2.94±0.43	
	72		1,1,1,2,5	0.10±0.09	2.94±1.14	
	12.5	Pre	5	0,0,1,2,3	0.06±0.07	3.84±0.41
	24		2,1,2,1,2	0.08±0.03	3.06±0.30 [#]	
	48		13,8,8,11,7	0.47±0.13**	2.62±0.25 [#]	
	72		2,4,2,3,2	0.13±0.04	1.80±0.38 [#]	
	25	Pre	5	2,0,2,1,1	0.06±0.04	4.10±1.38
	24		3,2,1,2,0	0.08±0.06	3.32±0.61	
	48		16,10,11,7,12	0.56±0.16**	2.16±0.34 [#]	
	72		6,3,4,3,3	0.19±0.07*	1.18±0.44 [#]	
	50	Pre	5	1,0,0,0,1	0.02±0.03	4.38±0.74
	24		1,1,0,0,1	0.03±0.03	2.90±0.73 [#]	
	48		18,13,7,11,16	0.65±0.22**	1.18±0.16 [#]	
	72		5,5,9,9,8	0.36±0.10**	0.62±0.16 [#]	
	100	Pre	4	0,1,1,2	0.05±0.04	3.60±0.55
	24		0,0,1,0	0.01±0.03	3.35±0.44	
	48		29,7,4,- ^a	0.67±0.68**	0.37±0.12	
	72		- ^b , - ^b , - ^b , - ^a			
CP	20	Pre	5	2,1,1,1,2	0.07±0.03	4.18±0.75
	48		12,7,13,13,12	0.57±0.13**	1.26±0.35 [§]	

^a : dead, ^b : not observed because of cytotoxicity

MNPE : micronucleated polychromatic erythrocytes, PE : polychromatic erythrocytes

* : Significant difference compared to the Pre group, 0.01<p<0.05 Fisher's exact test

** : Significant difference compared to the Pre group, p<0.01 Fisher's exact test

[#] : Significant difference compared to the Pre group, 0.01<p<0.05 Steel's test

[§] : Significant difference compared to the Pre group, 0.01<p<0.05 Wilcoxon's rank sum test

考 察

第6回 CSGMT/JEMS・MMS共同研究において、MNUはマウスにおいて小核誘発作用があることを報告している(Morita et al., 1997)。今回の報告で、MNUはラットにおいても陰性対照群と比較して用量依存的に有意な小核誘発を示していることから、ラットもマウスと同様小核の評価は可能であると考えられる。

MNUによる骨髓と末梢血の小核誘発は、それぞれの陰性対照に比べ有意に高かったが、幼若赤血球2000個当たりの小核を持つ細胞数は骨髓が明らかに高かった。また、骨髓の小核誘発が時間依存的に増加したのに対し、末梢血は投与48時間をピークとする一過性の小核誘発を示した。これらの原因は、ラットでは脾臓による異常赤血球の除去があるためと考えられる(Wakata et al., 1998)。

MNUの発癌性試験は、90 mg/kgの単回経口ならびに腹腔内投与、および100ならびに200 ppmの連続飲水投与(20—42週間)で行われた報告がある(Leaver et al., 1969; Maekawa et al., 1985)。Maekawaら(1985)によって報告された飲水投与による発癌性試験の投与量は、ラットが1日約40 mL/kg飲水すると仮定すると、約4ならびに8 mg/kg/dayとなり、これらの用量で発癌性が認められている。今回われわれの実施した小核試験では最低用量の6.25 mg/kgでも小核誘発が認められており、この用量は発癌性試験の用量とほぼ同様である。したがって、MNUでは発癌性が認められる用量において、小核誘発作用、すなわち *in vivo* の変異原性が認められることが示された。

今回の結果から、単回投与におけるラットの小核は、骨髓と末梢血いずれにおいても検出可能と考えられる。しかし、末梢血において小核を持つ幼若赤血球の出現頻

度が骨髓より低く、その理由として、脾臓による小核細胞の除去があること、すべてのRNA陽性赤血球を幼若赤血球として観察したことが考えられる。弱い変異原物質の検出において明確な判定をするため、また未知の化合物のスクリーニングを行うためには、骨髓を用いるか、末梢血を用いる場合観察細胞数を増やしたり、超生体染色による幼若度を分離して観察する(Hayashi et al., 1990)などの対応が必要と考えられた。

参考文献

- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, M. Ishidate, Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.*, 245, 245-249.
Leaver, D.D., P.F. Swann, P.N. Magee (1969) The induction of tumours in the rat by a single oral dose of N-nitrosomethylurea, *Br. J. Cancer*, 23, 177-187.
Maekawa, A., C. Matsuoka, H. Onodera, H. Tanigawa, K. Furuta, T. Ogiu, K. Mitsumori, Y. Hayashi (1985) Organ-specific carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosourea in F344 and ACI/N rats, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 109, 178-182.
Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y. F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Suto, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni, M. Hayashi (1997) Evaluation of the micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Group 1, 2A and 2B): The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS, *Mutat. Res.*, 389, 3-122.
US Department of Health, Education Welfare (1975) : In: *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*, Washington DC, US Government Printing Office, p 1184.
Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awagi, K. Kondo, M. Hayashi (1998) Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS, *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 84-100.

Environ. Mutagen Res., 21: 113-114 (1999)

Special Lecture

This paper, in a session chaired by Yasutomo Kikuchi, was presented to the special lecture "Reproductive biology", organized by Yasutomo Kikuchi, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, on November 24-26, 1998.

Fertilization and the initiation of development in orthodox and unorthodox ways

Ryuzo Yanagimachi

Department of Anatomy and Reproductive Biology, University of Hawaii Medical School
Honolulu, Hawaii 96822, USA

1. Germ cells and somatic cells

Male and female germ cells (sperm and ova) are the bridge between one generation to the next. Without germ cells our own species, like others, will not continue to exist on the surface of the earth. "The child does not inherit its characters from parent body, but from the germ cells. As far as the heredity is concerned, the body is merely a carrier of germ-cells (Nussbaum-Weismann-Wilson)."

2. Mammalian reproduction in the orthodox way

The youngest germ cells (primordial germ cells) in mammals begin to appear at the top of the yolk sac of the developing embryo. They travel through the tissue by active amoebic movement to reach the presumptive gonads where they multiply and become oogonia in the female embryo and spermatogonia in the male embryo.

The number of the oogonia reaches the maximum during the fetal stage and declines sharply thereafter. In most mammals, oogonia stop multiplication and enter meiosis before fetuses reach term. All surviving oocytes remain at the prophase of the first meiotic division until shortly before ovulation. In other words, the oocytes released from the ovaries of a 35 years old woman, for example, were in the prophase of the first meiotic division for 35 years. A sharp decline in the fertility of women over 35 years old could be due to the gradual degradation of cytoplasmic components of the oocyte by metabolic by-products such as radical oxygen species.

Spermatogonia in the testis enter meiosis after puberty. Although spermatogonia keep multiplying throughout man's life, spermatogenic activity may decline with the advancement of man's age.

Fully grown female germ cells or the mature oocytes become fertilization-competent at the metaphase of the second meiotic division. In contrast, male germ cells become competent to fertilize only after they have completed meiosis, transformed into spermatozoa, and undergone epididymal maturation and capacitation within the female genital tract. Only capacitated spermatozoa are able to interact with oocyte's vestments and fuse with the oocytes only after the acrosome reaction. The processes and mechanisms by which spermatozoa become fertilization-competent have been studied extensively during the past three decades, but are not yet fully understood. Embryos reaching the blastocyst stage implant to uteri and continue to grow. Male and female germ cells as well as developing embryos are protected from mutagens. Reactive oxygen species which are constantly generated by normal oxidation metabolism must be scavenged, or they will harm cellular components (including DNAs) of germ cells and developing embryos. *P*-protein, a plasma membrane-bound multi-toxin transport protein, is very rich in the placenta and fetus. This protein may prevent drugs/mutagens from entering cells or extrude these substances from cells, thus protecting developing embryos and fetuses from undesirable environmental mutagens. These must be other yet-to-be discovered substances and mechanisms which protect germ cells and developing embryos/fetuses from initial and external mutagens.

received: February 1, 1999

accepted: February 7, 1999

© Environmental Mutagen Society of Japan

3. Development initiation in unorthodox ways

Under normal conditions, the fertilizing spermatozoon passes through the oocyte's vestments then fuses with the oocyte itself. Fertilization can be achieved by injecting a spermatozoon directly into an oocyte. This procedure, commonly called intracytoplasmic sperm injection or ICSI, has been used widely in human infertility clinics to overcome severe male infertility factors. The incidence of congenital malformation in newborns following ICSI is reported to be about the same as that following the conventional in vitro fertilization (IVF) or natural conception. Perhaps, ICSI embryos have higher incidences of genetic (chromosomal) abnormalities, but most of them must be aborted before or after implantation and do not reach term. Our study using BALB/c strain mouse revealed that the spermatozoa with grossly misshaped heads are not necessarily genetically abnormal (Burruel, V. et al. 1996). Human spermatozoa with grossly abnormal heads are not necessarily chromosomally abnormal (Lee, J.D. et al. 1996). We found that spermatozoa need not be motile and alive to fertilize oocytes by ICSI. Spermatozoa frozen without any cryoprotection and those freeze-dried are all dead in the conventional sense, but they can produce normal offspring by ICSI (Wakayama, T. et al. 1998, Wakayama, T. and R. Yanagimachi 1998a).

Testicular spermatozoa and round spermatids are normally unable to fertilize oocytes either *in vivo* or *in vitro*. When injected into oocytes, however, nuclei of these cells are able to participate in normal embryonic development (Ogura, A. et al. 1994, Kimura, Y. and R. Yanagimachi, 1995a). Even the nuclei of the primary and secondary spermatocytes are able to participate in embryonic development if they are allowed to complete their meiosis within maturing or mature oocytes (Kimura, Y. and R. Yanagimachi 1995b, Ogura, A. et al. 1998, Kimura, Y. et al. 1997). Under normal conditions, polar bodies are destined to degenerate. We found that as long as the polar bodies are "alive" (their plasma membranes are intact) they can be rescued from degeneration. Theoretically, four offspring can be produced using tetrad chromosomes in one primary oocyte (Wakayama, T. and R. Yanagimachi, 1998b).

Cloning is the production of genetically identical offspring using embryonic or adult somatic cells. As of today, cloning requires the cytoplasm of the oocyte or egg. First, a mature oocyte, a zygote or a

blastomere of an early (e.g. 2-cell) embryo is enucleated, then fused or injected with a donor cell (nucleus). It was not until very recent years that viable offspring were obtained using adult somatic cells: a sheep using a mammary gland cell (Wilmut, I. et al. 1998), mice using cumulus cells (Wakayama, T. et al. 1998) and cows using muscle cells (Vignon, X. et al. 1998). Whether donor cells must be at G0 phase of the cell cycle during fusion or injection is still the subject of debate. At present only a very small portion of reconstructed oocytes (less than 1%) reach term. The reasons for this must be clarified quickly.

References

- Burruel, V. et al.(1996) Normal mice develop from oocytes injected with spermatozoa with grossly misshaped heads. *Biol. Reprod.*, 55 : 709-714.
- Kimura, Y. and R. Yanagimachi (1995a) Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa and round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 121 : 2397-2405.
- Kimura, Y. and R. Yanagimachi (1995b) Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol. Reprod.*, 53 : 855-862.
- Kimura, Y. et al.(1998) Factors affecting meiotic and developmental competence of primary spermatocytes nuclei injected into mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 59 : 871-877.
- Lee, J.D. et al.(1996) Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Human Reprod.* 11 : 1942-1946.
- Ogura, A. et al.(1994) Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 7460-7462.
- Ogura, A. et al.(1998) Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 75611-5615.
- Vignon, X. et al.(1998) Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated mature oocytes fused with cultured somatic cells. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 321 : 735-745.
- Wakayama, T. et al.(1998) Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J. Reprod. Fert.*, 112 : 11-17.
- Wakayama, T. and R. Yanagimachi (1998a) Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotech.*, 16 : 639-641.
- Wakayama, T. and R. Yanagimachi, (1998b) The first polar body can be used for the production of normal offspring. *Biol. Reprod.*, 59 : 100-104.
- Wilmut, I. et al.(1998) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385 : 810-813.
- Wakayama, T. et al.(1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394 : 469-474.

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会で発表された1998年度学術賞受賞講演である(座長:大西克成)。

哺乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異の検出と抑制に関する研究

黒田 行昭

国立遺伝学研究所 〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111

Studies on detection and inhibition of gene mutations in cultured mammalian cells

Yukiaki Kuroda

National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan

Summary

The procedure for monitoring the accumulation of gene mutations in human embryonic lung was developed in 1970s. A detection procedure of chemical mutagen-induced gene mutation by using cultured mammalian cells was established by the author in Japan in 1974. The mutagenicity of AF2 (furylfuramide) and red dye 104 (phloxine) was detected as 8-azaguanine (8AG)-resistant mutations (HGPRT⁻) in human diploid cells. Furthermore, the use of cultured Chinese hamster V79 cells was found to be more useful for efficiently detecting the mutagenicity of "non-mutagenic" carcinogens such as benzene, safrole, acrylonitrile, etc., quantitatively and reproducibly. The mutagenicity of 8 "non-mutagenic" carcinogens was tested for the International Program on Chemical Safety (IPCS) in the Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens directed by WHO in 1983.

Human beings are usually exposed to more than two mutagens and/or carcinogens simultaneously in their environment. The combined effects of two chemicals, two alkylating agents such as EMS and MMS, and a mutagen and a non-mutagen such as EMS and cytosine arabinoside (Ara C) on induction of 6-thioguanine (6TG)-resistant mutations were examined by using V79 cells. A synergistic effect of EMS and MMS on mutation induction and an enhancing effect of Ara C on EMS-induced mutation were detected.

The antimutagenicity of vitamin C and its derivatives, dehydro-vitamin C and iso-vitamin C on EMS-induced mutation in V79 cells was examined. Vitamin C was more effective than the two vitamin derivatives and the inhibition of EMS-induced mutation by vitamin C was detected when cells were treated with EMS and vitamin C simultaneously or treated with a mixture of EMS and vitamin C incubated without cells. The antimutagenicity of green tea polyphenols, EGCG and ECG, was also detected for 4NQO-induced gene mutations by post treatment with polyphenols.

(This paper, in a session chaired by Yoshinari Ohnishi, is the lecture of The JEMS Award (1998) presented at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, held at the Melparque Osaka in Osaka, Japan, on November 24-26, 1998.)

Keywords : gene mutations, mammalian cells, non-mutagenic carcinogens, HGPRT⁻ antimutagenicity

受付: 1999年3月24日

受理: 1999年4月20日

©日本環境変異原学会

緒 言

ダイオキシン、環境ホルモンなど人間が作り出した環境化学物質が、今日ほど人間の生存や健康に深い関わりをもってきたことはない。1985年以来、「がん」が脳卒中や心疾患を追いついて、日本人の死因の第一位を占めるようになったが、そのがんの原因の70—80%は環境中の化学物質や放射線によることが示されている。

著者は1950年大学卒業後、大阪大学助手に採用された頃から、生物の体の中の細胞を人為的環境の中で培養し、生体内で起る多くの現象を、細胞のレベルで解析することに興味をもって研究を行ってきた。最初はショウジョウバエ細胞の体外培養技法の確立とそれを用いた発生分化や遺伝子発現の研究を行い、1960年頃より、ヒト、ハムスター、ニワトリなど高等動物の細胞を用いて、細胞の増殖や分化、がん化のメカニズムを細胞レベルで解析してきた。1970年代になって、環境化学物質の人間に対する影響が社会的問題として大きくクローズアップされ、AF2や赤色104号などの食品添加物の発がん性が注目され、ヒト、ハムスターなどの培養細胞を用いてHGPRT酵素欠損を指標とする遺伝子突然変異検出系を、わが国で初めて確立した。

1980年代には、この哺乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異検出系は、Amesの系などで変異原性が検出されない発がん物質の変異原性を検出することができ、また処理時間を厳密に制御できることから、2種以上の化学物質や変異原物質の複合効果を検出することができた。1990年頃より、この培養細胞の検出系を用いて、ビタミンCや緑茶のポリフェノール、魚油のDHAなどが遺伝子突然変異を抑制することを見出し、そのメカニズムの解明を行った。今回、はからずも本学会の学術賞を受賞することになったので、これまで著者を行ってきた培養

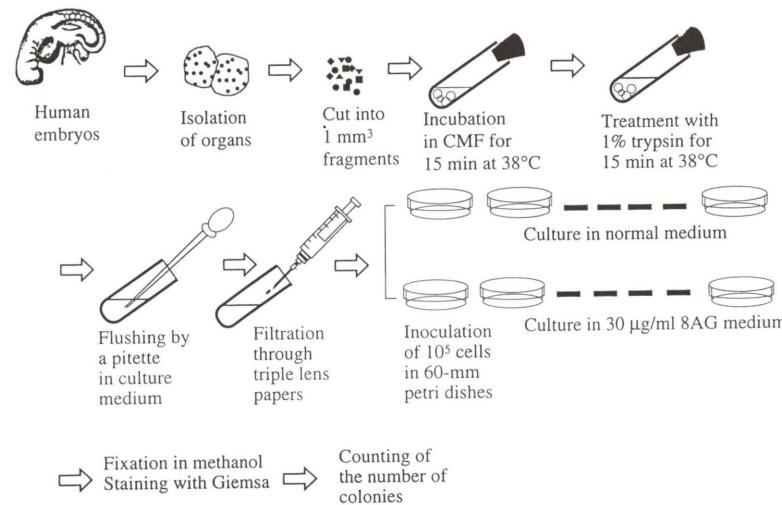


Fig. 1 Procedure to determine the frequency of 8AG-resistant mutations in clonal cultures of dissociated single cells of human embryonic organs

細胞系を用いた遺伝子突然変異の研究の経過と、その特性、変異原物質の複合効果、抑制物質の研究などについて述べる。

1. 培養細胞を用いた遺伝子突然変異検出系の確立

高等動物の体内で起っている現象や変化を知るために、組織や細胞を体外に取り出し、人為的環境条件の下で培養しようとする試みは、前世紀からの科学者の夢であった。1950年までの体外培養の研究は、血球やリンパ球などの単細胞以外では、組織片を中心とした培養が行われ、組織や臓器から細胞を遊離して、個々の細胞を独立した生物として扱う細胞培養が行われるようになったのは、1950年代に入ってからで、合成培養液の開発と細胞株の樹立が行われたことによる。安定な細胞株を合成培養液で培養することによって、きわめて再現性と定量性にすぐれた実験系が確立された。

1960年代になって、アメリカではPuckとMarcus(1955)がヒト子宮がん由来のHeLa細胞を用いて、コロニー形成法によって細胞の生存率を定量的に取り扱う手法を考案し、ElkindとSutton(1960)がチャイニーズ・ハムスターV79細胞でこの方法を用いてX線の影響をしらべていた。

わが国では、このようなアメリカを中心とした研究の流れに対応して、いち早く阪大の著者を中心とした研究グループがこの細胞培養の手法を取り入れて、HeLa細胞やマウスのL細胞を用いて発がん性化学物質マイトマイシンCの細胞増殖やDNA、RNA、タンパク合成などに対する影響を定量的に解析した(Kuroda and Furuyama, 1963)。

1970年代になって、環境化学物質のヒトへの影響が問題とされるようになり、三島市内の産院の協力を得て、

妊娠中絶したヒト胎児由来の正常二倍体細胞を用いて、8アザグアニン(8AG)抵抗性(HGPRT欠損)の突然変異の検出により、環境化学物質のモニタリングへの利用を試みた。この技法はFig.1に示したようにヒト胎児より摘出した肺組織から細胞を解離し、これを8AGを含む培養液で培養して、単一細胞から生じた8AG抵抗性細胞のコロニー形成率を測定し、胎児の肺組織内に存在

する突然変異細胞の頻度をしらべるものである。この結果、胎児の週齢の増加とともに8AG抵抗性細胞の出現頻度が直線的に上昇し(Fig.2)、一次関数で表したときの係数が、その地域における環境汚染度の指標になることを明らかにした。

このヒト胎児肺由来の正常二倍体細胞を用いて、8AG抵抗性を指標とした遺伝子突然変異の検出系を確立するとともに(Kuroda, 1974a,b), その頃トウフなどの防腐剤として厚生省で許可されていた食品添加物のAF2(フリルフラマイド)やこれも着色料として用いられていたタール系の赤色104号(フロキシン)などのヒト細胞に対する突然変異誘発性をしらべた結果、いずれもこれらの濃度に比例して突然変異を誘発することがわかった(Kuroda, 1975a,b)(Fig.3)。

さらに、安定した増殖性と染色体数が $2n=22$ というように、ヒトの正常二倍体細胞にくらべて突然変異の検出系としてはすぐれたチャイニーズ・ハムスターのV79細胞を用いて、8AG、6-チオグアニン(6TG)、ウツバイン抵抗性などの遺伝的マーカーの特性とその選択、前培養時間や変異原処理時間、突然変異発現時間などの検討、代謝共同(metabolic cooperation)の現象を避けるための再播種法の採用など、突然変異の検出に影響を与える諸要因について詳細な検討を行い、培養細胞を用いた遺伝子突然変異検出による変異原検出系の一般利用への道を開いた。

一般に放射線の生体に対する影響は、その線量率と照

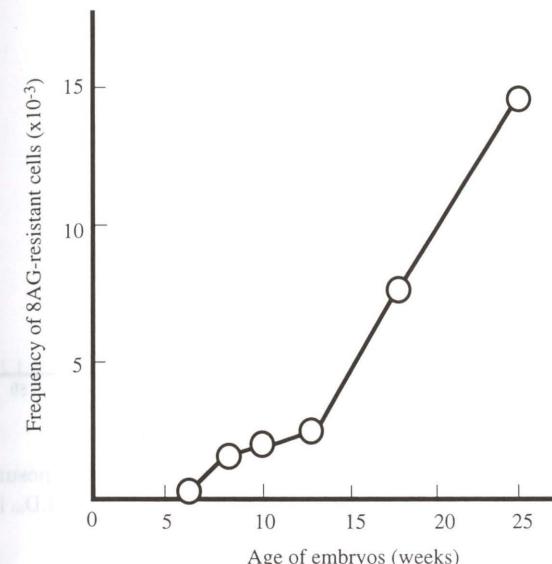


Fig. 2 The frequency of 8AG-resistant mutations in human embryonic lung cells at various gestation stages

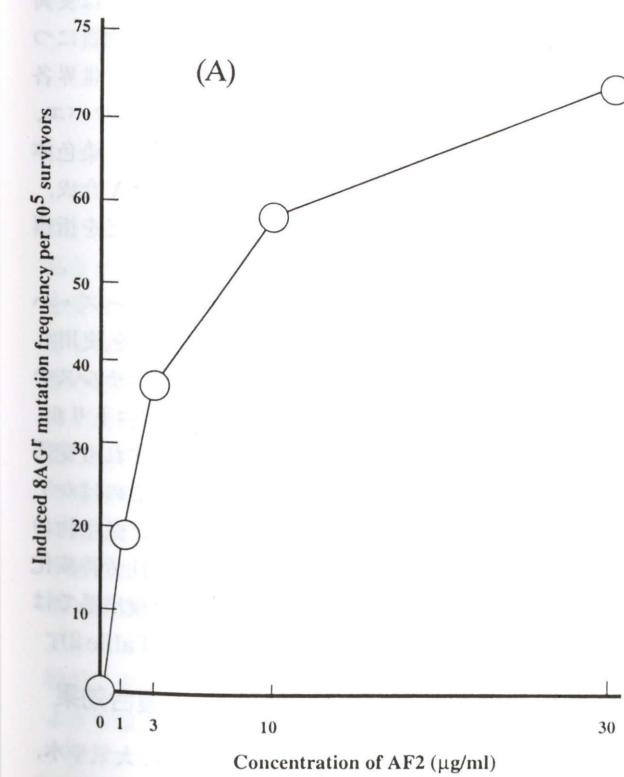
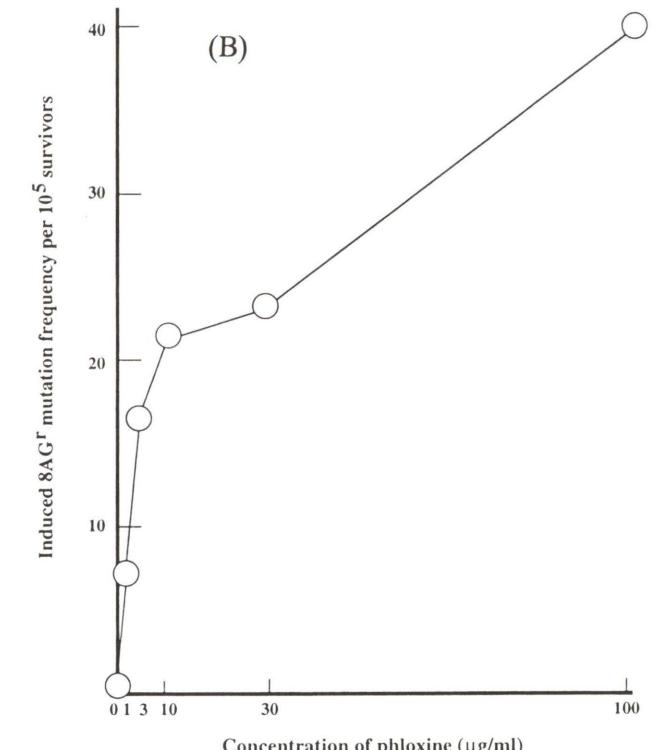


Fig. 3 Effects of AF2(A) and phloxine (B) on induction of 8AG-resistant mutations in human diploid cells



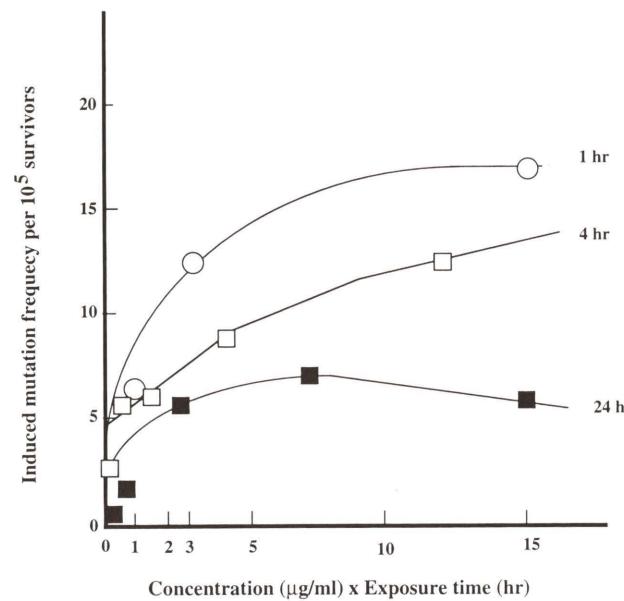


Fig. 4 Dose-rate effects of Trp-P-1 exposed at the same effective dose (concentration x exposure time) on induction of 8AG-resistant mutations in human diploid cells

射時間との積に比例する。しかし、同一線量の放射線を照射しても、高い線量率で短時間照射した方が、低い線量率で長時間照射するよりも効果が大きい(線量率効果といわれる)。哺乳類の培養細胞に対する化学物質の作用においても、その濃度と処理時間に関して、作用量が同じでも高い濃度で短時間処理した方が、低い濃度で長時間処理するよりも効果が大きいことを、ヒトの正常二倍体細胞やチャイニーズ・ハムスター細胞の生存率や突然変異の誘発などで明らかにした(Sugiura et al., 1978; Kuroda, 1985) (Fig. 4)。これは細胞の突然変異修復作用と変異原物質の培養液中の安定性が関与すると考えられ、化学物質のある濃度以下では無作用量が存在することがわかった(Fig. 5)。

2. 培養細胞を用いた非変異原性発がん物質の検出

Ames の系など微生物の系では、短時間に効率よく化学物質の変異原性を検出することができるが、その利用の範囲が広がったが、1980 年代中頃に、微生物の系では変異原性が検出されない発がん物質が数多く存在することがわかつた。たとえば、BHC や DDT のような塩化物や、ジメチルヒドラジンのような生体内の腸内細菌によって代謝活性化を必要とする化学物質、さらにジエチルスティブステロールやエチオエストラジオールのようなホルモン類、発がんのイニシエーターというよりはプロモーター作用をもつチオウレアやチオアセトアミドなどである。また、エチオニンのように細菌によって生産されるもの、サフロールやウレタンなど肝ミクロソーム以外による活性化が必要と思われる物質も Ames

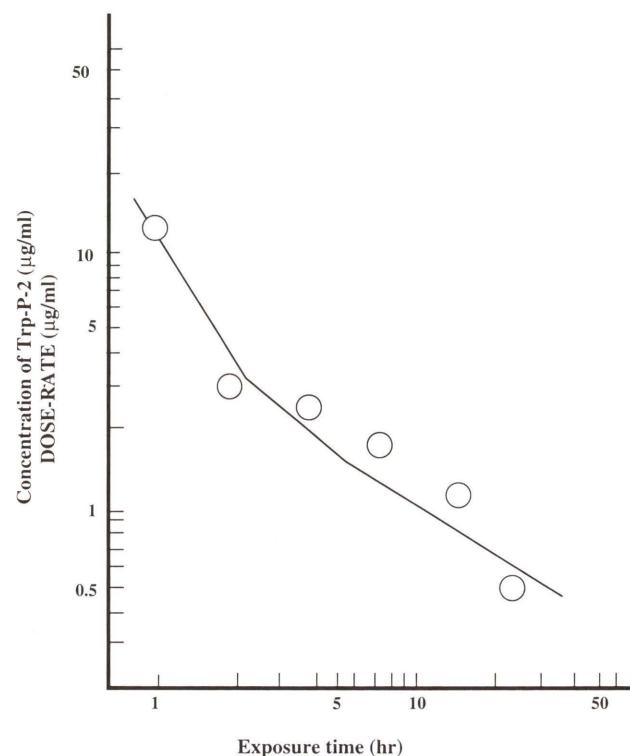


Fig. 5 Relation of concentration and exposure time of Trp-P-2 giving surviving fraction of LD₅₀ in human diploid cells

の系では変異原性が検出されなかった。

このような問題に対処するために、1983 年 WHO の「化学物質の遺伝毒性とがん原性の短期試験による安定性の国際プログラム(IPCS)」では、微生物の系では変異原性が疑わしいか、検出されない 8 種の発がん物質について、陰性対照の 2 種の非発がん物質を加えて、世界各国の 113 名の研究者に委嘱して酵母、ショウジョウバエ、培養細胞など真核生物を使った遺伝子突然変異、染色体異常、トランスフォーメーション、不定期 DNA 合成、DNA 単鎖切断、SCE、小核テスト、代謝協同などを指標として、その変異原性がしらべられた。

著者はこの国際協力事業に参加してチャイニーズ・ハムスター V 79 細胞の遺伝子突然変異検出系を使用して、ベンゼン、サフロール、トルイジン、ジエチルスチベスチロール、フェノバービタール、アクリルニトリル、ヘキサメチルホスホラミドなどについて、いずれも変異原性を見出した(Kuroda, 1985) (Table 1)。このほかアニリン、クロロアニリン、ニトロベンゼンなど微生物の系では変異原性が検出されない多くの発がん性芳香族化合物についても、培養細胞の遺伝子突然変異検出系ではその変異原性が検出された(Kuroda, 1986) (Table 2)。

3. 培養細胞を用いた変異原物質の複合効果

われわれ地球上に生息するすべての生物は、大気や水、土壤など周囲の生活環境からさまざまな影響を受ける

Table 1 Results of WHO international programme on evaluation of short-term tests for chemical carcinogens

Chemicals	Bacteria	Fungi	Insects	Cultured mammalian cells			
				Gene mutations	Chromosome aberrations	DNA damages	Transformations
Carcinogens							
Hexamethylphosphoramide	—	+	+	+	+	+	+
<i>o</i> -Toluidine	—	+	+	+	+	+	+
Benzene	—	+	+	±	+	+	+
Safrole	—	+	+	+	+	+	+
Acrylonitrile	—	+	+	+	+	+	+
Diethylhexylphthalate	—	+	+	+	+	+	+
Diethylstibestrol	—	+	—	—	+	+	+
Phenobarbital	±	+	—	+	+	—	±
Non-Carcinogens							
Benzoin	—	+	—	+	+	—	—
Caprolactam	—	±	+	—	+	—	+

Table 2 Comparison of 8AG-resistant mutations induced by chemicals in Chinese hamster V79 cells

Chemicals	S-9 Mix	LD ₅₀ (μM.hr/ml)	Induced mutation frequency (×10 ⁻⁵)	
			(μM.hr/ml)	(μg.hr/m)
Aniline	—	111	0.65	0.007
	+	66	0.19	0.002
<i>o</i> -Chloroaniline	—	20	0.12	0.001
<i>m</i> -Chloroaniline	—	16	0.26	0.002
<i>p</i> -chloroaniline	—	16	0.26	0.002
Nitrobenzene	—	21	0.12	0.001
Hexachlorobenzene	—	1.7	0.14	0.004
EMS	—	80	0.25	0.002
MNNG	—	4×10 ⁻⁷	80	0.54
Trp-P-1	—	0.05	46	0.22
	—	0.4	36	0.22
Trp-P-2	—	0.3	9.9	0.06
	+		373	2.27

し、とくにわれわれ人間は、食物や飲物、化粧品、医薬品など周囲を取り巻くあらゆる工業製品から多くの影響を受けている。これまで変異原・発がん物質などの影響をしらべる多くの研究は、その中の単一物質を取り上げ、その影響がしらべられてきた。これらの物質が 2 種またはそれ以上同時に存在するときには、どのような影響を受けるのであろうか。このような 2 種以上の変異原物質の複合効果をしらべるのに、培養時間や処理時間を的確に設定できる培養細胞系は適している。

エチルメタンスルホン酸(EMS)とメチルメタンスルホン酸(MMS)というようないずれも作用点の類似したアルキル化剤同士や、単独で変異原性のある EMS と単独では変異原性のないシトシンアラビノシド(Ara C)のような組合せで、その複合効果がどのように現れるかをチャイニーズ・ハムスター V 79 細胞を用いてしらべた。EMS と MMS のような作用点が類似していると考えら

れる物質は、同一の作用点に対する両物質の競合による相殺効果が予測されたが、実際は、両物質は競合抑制することなく、むしろ相乗的に変異原性を増大することがわかった(Kojima et al., 1992 b) (Fig. 6)。

また、Ara C と EMS との組合せでは単独では変異原性のない Ara C が EMS と同時作用させると、EMS の変異原性を高めることができた(Tachi-Shinkawa, et al., 1987)。

4. 培養細胞を用いた変異原抑制物質の研究

1978 年、国立遺伝学研究所の同僚であった故賀田恒夫博士が研究所近辺の八百屋で買い集めた野菜や果物を片端からジュースにし、Ames の TA 98 系統のヒスチジン要求性の復帰突然変異検出系を用いて、このジュースがトリプトファンの加水分解物のトリプト-*P*-1 の変異原性を抑制することを見出した(Kada, et al., 1978)。とくに、

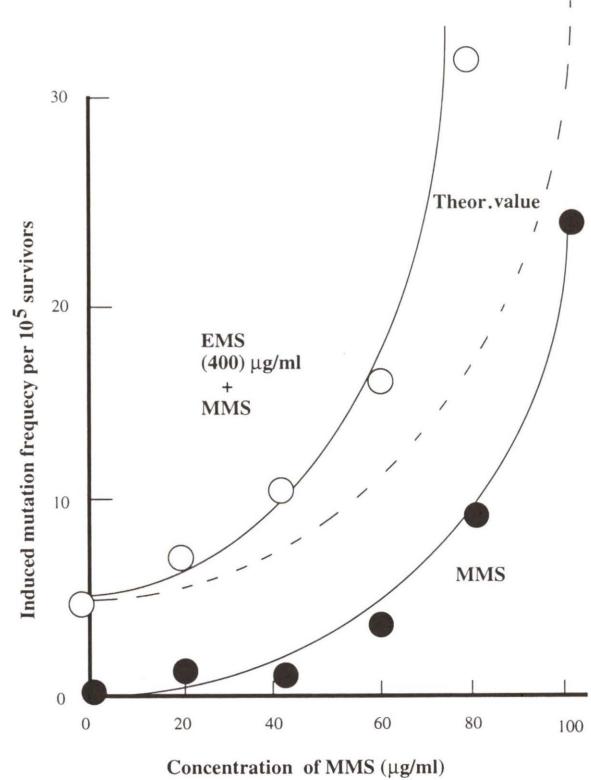


Fig. 6 Combined effects of EMS and MMS on 6TG-resistant mutation induction in Chinese hamster V79 cells

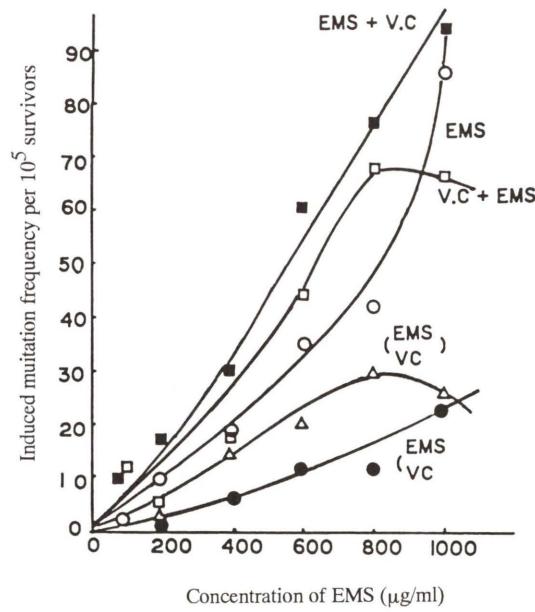


Fig. 7 Effects of vitamin C treated with different procedures on EMS-induced 6TG-resistant mutations in Chinese hamster V79 cells. V.C.+EMS, pretreatment with vitamin C; EMS, single treatment with EMS; VC, simultaneous treatment with both agents; EMS+V.C., post-treatment with vitamin C; EMS V.C., treatment with incubated mixture of EMS and V.C.

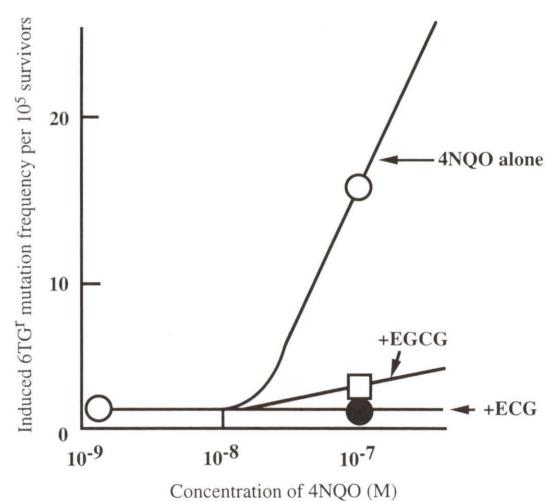


Fig. 8 Effects of ECG or EGCG (post-treatment) on 4NQO-induced 6TG-resistant mutations in Chinese hamster V79 cells

キャベツ、ダイコン、ショウガなどのジュースに変異原抑制作用が見出され、また、ブロッコリー、緑コショウ、ナス、リンゴ、ゴボウ、ワケギ、ショウガ、パイナップル、ハッカの葉などにも強い変異原抑制作用があることがわかった(Morita, et al. 1978)。

さらに、われわれが日常摂取する食物や飲物の中にも、突然変異や発がんを抑制する物質が数多く見出されるようになってきた。このような変異原抑制物質による抑制のメカニズムを明らかにするために、チャイニーズ・ハムスター V79 細胞を用いて、変異原物質と抑制物質との処理時間を変えたり、両物質をあらかじめ混合したもので細胞を処理したりすることによって、変異原抑制物質の作用機序をしらべた。

ビタミン C は緑茶やイチゴ、パイナップル、ミカンなどの果実や、キャベツ、ホウレンソウ、ピーマンなどの緑色野菜に多量に含まれ、壞血病に有効なビタミンとして知られている。しかし、それまで微生物でニトロソ化合物の抗変異原性や実験動物で発がん物質の作用を阻害するなどわずかな報告しかなかった。そこで著者らはチャイニーズ・ハムスター V79 細胞を用いて、EMS によって誘発される突然変異がビタミン C およびその誘導体であるデヒドロ・ビタミン C、イソ・ビタミン C などによってどのような影響を受けるかをしらべた。この結果、ビタミン C は変異原物質である EMS と同時処理したり、あらかじめ EMS と混合しておいたもので処理すると、EMS の変異原性を強く抑制することがわかった。ビタミン C は EMS に直接作用する消変異原(desmutagen)であることがわかった(Kuroda, 1986, 1990; Kojima, et al., 1992 a) (Fig. 7)。デヒドロ・ビタミン C やイソ・ビタミン C もビタミン C と一緒に変異原抑制作用を示したが、その効果はビタミン C より弱かった。

緑茶にはサルモネラ、大腸菌、枯草菌などで抗変異原

性を示す物質が含まれ、その有効物質として(-)エピガロカテキン・ガレート(EGCG)など 4 種類のポリフェノールが検出されている。これらの緑茶に含まれるポリフェノールとして EGCG および(-)エピカテキンガレート(ECG)について、チャイニーズ・ハムスター V79 細胞を用いて変異原抑制作用をしらべた。変異原物質として 4 NQO を用いた場合には、緑茶のポリフェノールは 4 NQO の後処理の場合にのみ抑制作用を示し、これらのポリフェノールは 4 NQO による DNA の損傷の修復に作用することがわかった(Kuroda, 1996) (Fig. 8)。EMS のようなアルキル化剤の変異原性に対しては、緑茶ポリフェノールは抑制効果がみられなかった。

緑茶ポリフェノールにはこのような変異原抑制作用のほか、最近はラットやマウスなど実験動物を使った発がん実験においても発がん抑制作用が報告され、食道や胃、大腸などの消化器のがんや乳腺、肝臓、肺臓、皮膚などのがんの発生を抑制し、さらにはがんの転移も抑制すること、人間を対象とした疫学的調査などでも緑茶ががん抑制に有効なことが報告されている。これらについては総説(Kuroda and Hara, 1999 a; 黒田・原, 1999 b)に述べたのでご参考を願いたい。

おわりに

哺乳類の培養細胞を用いた変異原物質の検出系は、微生物や昆虫、植物などの検出系と異なって、高等動物のもつ特性の一部を保持し、しかも定量性と再現性にすぐれた検出系といえるかも知れない。組織や臓器から単離した細胞は、1 個、1 個が独立した生物として扱える利点はあるが、生体内的組織や臓器はこのような細胞の単なる集合体ではなく、細胞それぞれに高度に分化した機能をもち、細胞相互の情報交換や物質交換を通じて生体としての高次構造を形作っている。

細胞レベルでの解析は、単純化された系として物質と生体との単純な反応を補足し、解析する手段としてはすぐれた系であるが、複雑な生体内的現象をすべて解明するためには、これからさらに多くの段階を昇らなければならない。生体内と同じ分化機能をもつ細胞系や細胞の組織の相互作用を考慮に入れた実験系なども考える必要があると思われる。

検出する変異原物質の方も、2 つ以上の変異原物質の複合効果として相加的なもの、相乗的なもの、相殺抑制的なものなど、そのメカニズムからの複合効果を主な変異原についていくつかのクラスに分類することができれば、未知の変異原の複合効果を類推するうえで有効であろう。また弱い変異原に長時間暴露されたときの慢性的影響や、変異原の発生毒性(癌形成性)などについても解明の糸口を探りたい。

謝 辞

本研究には、国立遺伝学研究所元所長 田島弥太郎博士、変異遺伝部教授 故賀田恒夫博士をはじめ同研究所、麻布大学の多くの研究者の方々のご指導、ご援助、ご協力をいただきました。ここに深甚の謝意を表します。

参考文献

- Elkind, M. M. and H. Sutton (1960) Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells, *Radiat. Res.*, 13, 556-593.
- Kada, T., K. Morita and T. Inoue (1978) Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate, *Mutation Res.*, 53, 351-353.
- Kojima, H., H. Konishi and Y. Kuroda (1992a) Effects of L-ascorbic acid on the mutagenicity of methyl methanesulfonate in cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 266, 85-91.
- Kojima, H., H. Konishi and Y. Kuroda (1992b) Combined mutagenicity of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in Chinese hamster V79 cells, *Mutation Res.*, 266, 171-180.
- Kuroda, Y. (1974a) Mutagenesis in human diploid cells. I. Effects of some mutagens and selective agent on cell survival, *Japan. J. Genet.*, 49, 379-387.
- Kuroda, Y. (1974b) Mutagenesis in human diploid cells. II. Chemical induction of 8-azaguanine-resistant mutations, *Japan. J. Genet.*, 49, 389-398.
- Kuroda, Y. (1975a) Mutagenesis in human diploid cells. III. Induction of 8-azaguanine-resistant mutations by furylfuramide, *Mutation Res.*, 30, 229-238.
- Kuroda, Y. (1975b) Mutagenesis in human diploid cells. IV. Induction of 8-azaguanine-resistant mutations by phloxine, a mutagenic dye, *Mutation Res.*, 30, 239-248.
- Kuroda, Y. (1984) Dose-rate effects of chemicals on mutation induction in mammalian cells in culture, In: Y. Tazima, S. Kondo and Y. Kuroda (Eds.), *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis*, Environ. Mutagen. Soc. Japan, Shizuoka, pp. 99-108.
- Kuroda, Y., A. Yokoyama and T. Kada (1985) Assays for the induction of mutations to 6-thioguanine resistance in Chinese hamster V79 cells in culture, In: J. Ashby et al. (Eds.) *Problems in Mutation Research, Evaluation of Short-term Tests for Carcinogenesis*, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, Oxford, New York, pp. 537-542.
- Kuroda, Y. (1986) Genetic and chemical factors affecting chemical mutagenesis in cultured mammalian cells. In: D. M. Shankel et al. (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, Plenum Press, New York and London, pp. 359-375.
- Kuroda, Y. (1990) Antimutagenic activity of vitamins in cultured mammalian cells. In: Y. Kuroda, et al. (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*, Plenum Press, New York and London, pp. 233-256.
- Kuroda, Y. (1996) Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells, *Mutation Res.*, 351, 179-186.
- Kuroda, Y. and J. Furuyama (1963) Physiological and biochemical studies on effect of mitomycin C on strain HeLa

- cells in cell culture, *Cancer Res.*, 23, 682-687.
- Kuroda, Y. and Y. Hara (1999a) Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols, *Mutation Res.*, 436, 69-97.
- 黒田行昭, 原 征彦(1999 b)茶カテキン類の抗変異原性および抗発がん性(I), *環境変異原研究* 21, 1-10.
- Morita, M., M. Hara and T. Kada (1978) Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids, *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1235-1238.
- Puick, T. T. and P. I. Marcus (1955) A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in

- tissue culture: the use of x-irradiated cells to supply conditioning factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 41, 432-437.
- Sugiura, K., M. Goto and Y. Kuroda (1978) Dose-rate effects of ethyl methane sulfonate on survival and mutation induction in cultured Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 51, 99-108.
- Tachi-Shinkawa, K., Y. Kuroda, K. Morimoto and A. Koizumi (1987) Enhancing effects of cytosine arabinoside on ethyl-methanesulfonate-induced 6-thioguanine resistance mutations in Chinese hamster V79 cells, *Mutation Res.*, 191, 34-40.

Environ. Mutagen Res., 21: 123-130 (1999)

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会で発表された1998年度研究奨励賞受賞講演である(座長:大西克成)。

遺伝子工学的手法を用いた アルキル化剤高感受性サルモネラ試験菌株の作製とその応用

山田 雅巳

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

New genetically engineered *Salmonella typhimurium* tester strains with super-sensitivity to mutagenic alkylating agents

Masami Yamada

National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Of the DNA lesions generated by methylating agents, a minor alkylation product *O*⁶-methylguanine is responsible for most of the mutations induced. To counteract such mutagenic effects, most organisms possess *O*⁶-methylguanine DNA methyltransferases (MT). This enzyme is ubiquitous in various organisms and has already been cloned from human, mouse, rat, and other species. It is reported that many cultured human cell lines are sensitive to alkylating agents compared to normal cells and in many cases such cell lines do not exhibit MT activity. Thus, the study of the role of MT may be important for cancer prevention. In this study, MT-deficient tester strains of *Salmonella typhimurium* were constructed using a newly developed preligation method. Since the new strains are highly sensitive only to alkylating agents, they will be useful to detect associated mutagenicity with high efficiency and to study the mechanism of mutagenesis induced by environmental alkylating agents.

(This paper, in a session chaired by Yoshinari Ohnishi, is the lecture of The JEMS Achievement Award (1998) presented at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, held at the Mierparque in Osaka, Japan, November 24-26, 1998.)

Keywords: *O*⁶-methylguanine DNA methyltransferase, Ames test, alkylating agents, gene disruption, mutagenicity

〈略号〉

CAS registry numbers	diethylnitrosamine (DEN), 55-18-5
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2), 3688-53-7	ethyl methanesulfonate (EMS), 62-50-0
4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), 56-57-5	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (ENNG), 63885-23-4
dimethylnitrosamine (DMN), 62-75-9	ethylnitrosourea (ENU), 759-73-9
methyl methanesulfonate (MMS), 66-27-3	<i>N</i> -propyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (PNNG), 13010-07-6
<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (MNNG), 70-25-7	<i>N</i> -butyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (BNNG), 13010-08-7
methylnitrosourea (MNU), 684-93-5	

受付: 1999年4月15日

受理: 1999年4月27日

©日本環境変異原学会

緒 言

環境変異原の研究では、化学物質のヒトDNAに対する作用を調べるために、バクテリア、哺乳類細胞、マウスなど、いろいろな生物が用いられてきている。その中で、エームス試験のように、微生物を用いる変異原性試験は、化学物質の安全性有害性の評価だけでなく、環境汚染物質のモニタリングにも用いられてきた。私は、こうした微生物変異原性試験法の特色をより高めることを目的に、遺伝子工学的にバクテリアの持つ修復酵素を破壊する手法で、それぞれの化学物質特異的に感受性を高めたサルモネラ・テスター株を作製してきている。アルキル化剤は、メチル基やエチル基などがDNAの塩基を直接修飾することにより、突然変異やDNA複製阻害による致死を引き起こすとして広く知られている。代表的なものをFig. 1に示す。細胞はそのような傷害を抑制するための防御手段としてO⁶-メチルグアニンDNAメチル転移酵素(MT)を持つ。この酵素は多くの生物種に存在し、ヒト、ラット、マウスなどからもすでにクローニングされている(Hayakawa et al., 1990; Rahden-Staron et al., 1991; Shiraishi et al., 1992)。ヒト癌由来細胞株の多くは、正常細胞に比べてアルキル化剤に対し感受性が高く、しかもほとんどMT活性のないことが報告されている(Sekiguchi et al., 1996; Becker et al., 1997; Mattern et al., 1998)。本研究では、まず特定の

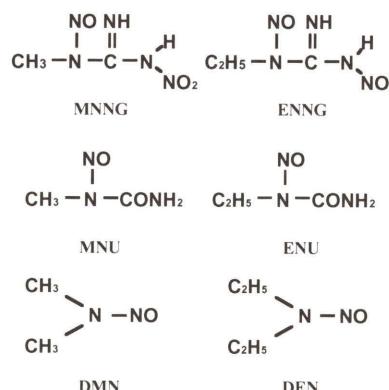


Fig. 1 Structure of methylating and ethylating agents. The name of each chemical is under its structure

遺伝子欠損株を作製するための手法を開発し、続いてエームス試験に用いられるサルモネラ株においてMTを欠損した株を作製した。このMT欠損株は、突然変異を引き起こすアルキル化剤を効率よく検出するため、試験菌株として有用であるのはもちろんのこと、バクテリアにおけるアルキル化DNA損傷の修復機構の解明にも役立っている。

1. アルキル化剤高感受性サルモネラ試験菌株の作製

1) ogt_{ST} 遺伝子のクローニング

S. typhimurium は、大腸菌と同様にMTを2種類持っている。Table 1に性質をまとめた。どちらも、構成アミノ酸の中の、特定のシステインが、メチル基の受容体となっているが、Adaにはこのシステインが2個あり、C末端側のシステインで突然変異を誘発するDNA付加体であるO⁶-MeG, O⁴-MeTから、また、N末端側のシステインでメチルホスホトリエステルから、それぞれメチル基を取ることにより修復を行っている。この反応は不可逆的であるため、酵素は1分子で1個の付加体しか修復できないといういささか効率の悪いシステムである。N末端側のシステインがメチル化されることにより、AdaはAda自身を含む一連の蛋白質の発現を誘導する能力が高くなり、蛋白量は誘導前の数百倍になる。効率の悪さを数で補っていることになろう。一方、Ogtは、AdaのC末端側半分とホモロジーがあり、メチルホスホトリエステルの修復が行えず、その発現が誘導されない点でAdaと性質を異にする。エームス試験に用いられているサルモネラ菌にも、adaやogtに相当する遺伝子が存在するものと予想されていたが、その実態は不明であった。しかし、Ada_{ST}(注: STは*Salmonella typhimurium*の頭文字を取ったもの)をコードする遺伝子がHakuraらによりクローニングされ、その塩基配列から推定分子量39 kDaの、大腸菌のadaと遺伝子レベルで70%の相同性を示すものであることが明らかにされた(Hakura et al., 1991)。本研究においては、まず、Rebeckら(1989)によりその存在が示唆されていた*S. typhimurium*のもう一つのMTをコードする遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した(Yamada et al., 1995)。クローニングは、adaおよびogtをともに欠損し

Table 1 Comparison of characteristics for two types of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferases

<i>E. coli</i>	Ada	Ogt
Molecular Weight	39 kDa	19 kDa
Expression	inducible	constitutive
Repaired adducts	O ⁶ -methylguanine	O ⁶ -methylguanine
	O ⁴ -methylthymine	O ⁴ -methylthymine
	methylphosphotriester	
<i>S. typhimurium</i>	Ada _{ST}	Ogt _{ST} (?)

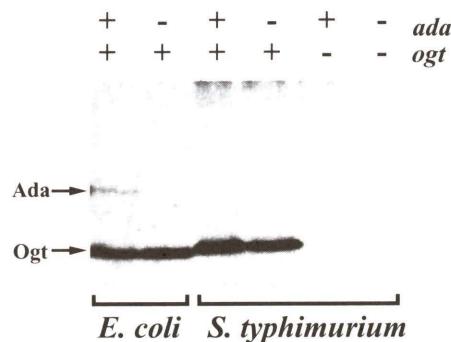


Fig. 2 Fluorography of crude cell extracts (100 μg of protein) following incubation with ³H-MNNU-treated DNA. The existence of ada and ogt genes in the crude extracts is indicated above each lane with + and -. The position for Ada and Ogt/Ogt_{ST} is indicated by an arrow. The detail of the procedure for sample preparation is described in the paper (Yamada et al., 1995)

た大腸菌KT233株(Takano et al., 1991)を宿主にして、*S. typhimurium*の遺伝子ライブラリー(Watanabe et al., 1987)を導入し、アルキル化剤であるMNNGを1.5 μg/mLの濃度で含む最少培地にまいて、出てきた耐性コロニーを調べることにより行った。耐性コロニーからプラスミドを抽出し、とれてきた候補の遺伝子の制限酵素地図がada_{ST}と同じものを除き、サザンハイブリダイゼーション(Southern, 1975)を行った結果、ada_{ST}遺伝子のプローブとハイブリ化したクローニングと、大腸菌のogt遺伝子のプローブとハイブリ化したクローニングの2種類に分かれた。後者のうち最も短い断片を持つプラスミドを使って塩基配列の決定を行った結果(GenBank accession number: U23465), DNAレベルで大腸菌のogt遺伝子と77%の相同性がある、推定アミノ酸171個、分子量19 kDaの蛋白質をコードするORFがとれた。³⁵Sラベルしたメチオニンを用いたMaxicells法(Sancar et al., 1979)によりこのORFのコードする蛋白質の分子量が大腸菌のOgtとほぼ同じ19 kDaであることを確認した(data not shown)、また、³Hの取り込み実験により、この蛋白が大腸菌のOgtとほぼ同じ分子量を示す、メチル基を自身に取り込む活性のある蛋白(=MT)であることを確認した(Fig. 2)。³Hラベルしたメチル基を取り込んだOgt_{ST}はわずかに大腸菌のOgtよりも移動度が遅く、Maxicellsの結果と一致した。

2) プレライゲーション法

大腸菌などのバクテリアにおいて染色体上で特定の遺伝子の欠損株を得ようとするときには、プラスミド上で薬剤耐性マーカーと置き換える、それを線状にしてエキソヌクレアーゼ活性を欠損した菌株に導入すると、線状DNAは分解されずに細胞質に存在して、染色体と相同

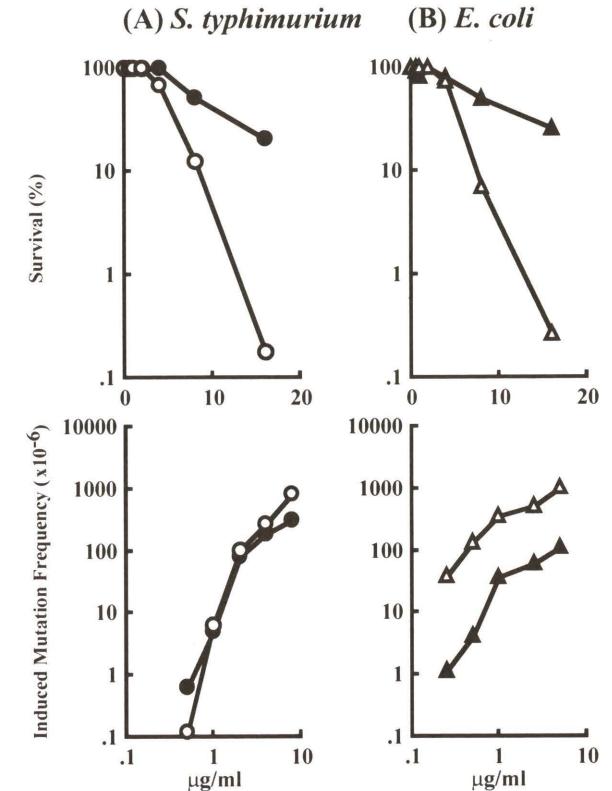


Fig. 3 Effects of deletions of the ada_{ST} or ada gene on the cell killing and mutagenesis induced by MNNG in *S. typhimurium* (A) and *E. coli* (B), respectively. Symbols: ●, TA1535 (ada_{ST}+) ; ○, YG7100 (ada_{ST}-) ; ▲, AB1157 (ada_{ST}+) ; △, GW7101 (ada_{ST}-)

的組換えを起すものが出てくる。その結果、染色体上の遺伝子が薬剤耐性マーカーを置き換わった形になるという手法を用いる。通常は、そのようにしてできた欠損株を供与菌にして、ファージを用いた形質導入で必要な遺伝的背景の菌株に(マーカーを指標に)欠失部分を含む染色体を移す手順が取られる。エームス試験に用いられる菌株は、化学物質の透過性を高めるために、外膜が削れて薄くなったものを用いているため、ファージが吸着できず、形質導入の方法が使えない。そこで、エームス試験菌株で直接欠失株を作製する方法として考案されたのが、プレライゲーション法である。この方法の原理は、プラスミド上で欠失させたい遺伝子を薬剤耐性マーカーと置き換えるところまでは同じだが、それを線状にしてエームス試験菌株に導入すれば、DNAはたちまちエキソヌクレアーゼによって分解されてしまうため、プラスミドの複製起点をのぞいて線状にし、ライゲーションしてからエームス試験菌株に直接導入する方法を採っている。複製起点を除いているのでライゲーション後にDNAが環状になってしまって、エキソヌクレアーゼに分解されなくなりプラスミドとして増幅することはない。また、ライゲーションでは線状にいくつもの断片がつながる可能性もあるが、その場合、分解に時間がかかるので、組

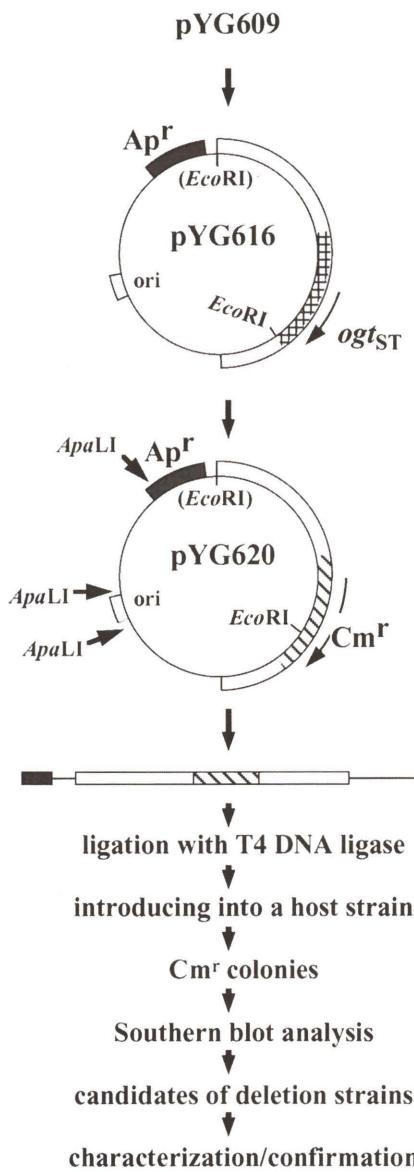


Fig. 4 Scheme for *ogt_{ST}* gene disruption in *S. typhimurium*. The details are written in the text. Symbols : Ap^r, ampicillin resistance gene ; ori, plasmid replication origin ; Cm^r, chloramphenicol resistance gene. The meshed pattern indicates the fragment containing *ogt_{ST}* gene, which is replaced with Cm^r gene. The hatched pattern indicates the replaced fragment containing Cm^r gene. The black box indicates Ap^r gene

換えがそれまでに起これば欠失株はできる。この方法は大腸菌にも応用できる。Ogt_{ST}の欠損株を例に具体的な手法をあとで述べるが、同じ手法で、誘発突然変異に関わる遺伝子 *umuDC_{ST}/samAB* の欠損株(Nohmi et al., 1992)、酸化的DNA損傷修復に関わる遺伝子 *mutM* の欠損株(Suzuki et al., 1997)、ニトロ還元酵素欠損株(Yamada et al., 1998)、O-アセチル転位酵素欠損株(Espinosa-Aguirre et al., 1999)などを作製し、それぞ

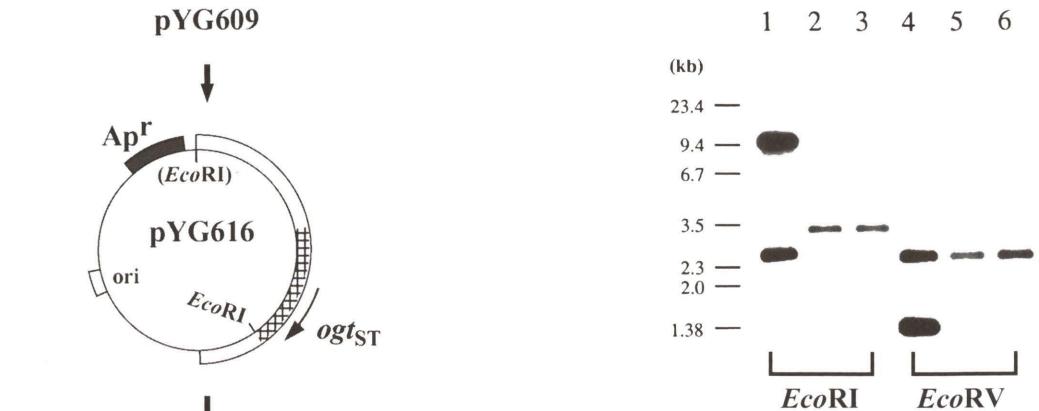


Fig. 5 Southern hybridization analyses of chromosomal DNAs of *S. typhimurium* TA1535, YG7104 and YG7108. Bacterial DNAs were digested with *Eco*RI or *Eco*RV and run on a 0.8% agarose gel. A 1.5-kb *Hind*III-*Hind*III DNA fragment containing the *ogt_{ST}* coding region was labeled with [α -³²P] dCTP and used as a probe. Lanes 1 and 4, TA1535; lanes 2 and 5, YG7104; lanes 3 and 6, YG7108

れ菌株の性質が報告されている。

3) *ada_{ST}* 欠損サルモネラ試験菌株の作製

大腸菌の場合、*ada*を欠損させた株が致死感受性、誘発突然変異率ともに野生株よりも高くなる(Jeggo, 1979, Fig. 3(B))。そこで、アルキル化剤に特異的に高感受性になる株を作製するために、Hakuraらによりクローニングされた*ada_{ST}*を用い、*S. typhimurium* TA 1535 株の染色体上でプレライゲーション法によりカナマイシン耐性遺伝子と置き換えて*ada_{ST}*欠損株を作製した(Yamada et al., 1993)。YG 7100 株と命名したこの株のMNNGに対する感受性を親株のTA 1535と比較するため、対数増殖期にある培養液1mLを数段階の濃度のMNNGで37°C、5分間処理した後、菌体を生理食塩水で2度洗って、10分の1量を最小培地に、希釈した液をLB培地に塗布し、生成コロニーを計数した。その結果、致死感受性は高くなっているが生存菌数当たりの誘発復帰株数の割合(=誘発突然変異率)にはほとんど変化がないことがわかった(Fig. 3(A))。このことは、サルモネラにおいては、*ada_{ST}*を欠損させてもまだメチル化剤によるDNA損傷を修復する系が働いていることを示唆する。つまり、大腸菌ではAdaが主たるMTとしてアルキル化DNA損傷の修復にあたっているが、サルモネラ菌ではAda_{ST}は致死にいたるDNA付加体の修復には働いても、突然変異に関係するDNA付加体の修復には大きな役割を示していないということである。このことは、Ada_{ST}が大腸菌のAdaと違い、3倍程度しか誘導がかからない(Hakura et al., 1991)こととも符合する。サルモネラ菌において、突然変異に関係するDNA付

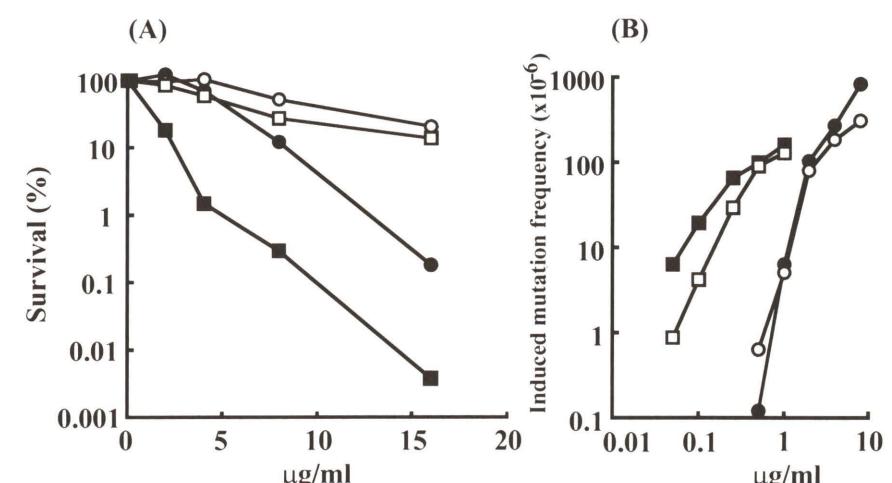


Fig. 6 Sensitivity of *ogt_{ST}*-deletion mutants to the lethal (A) and mutagenic (B) effects of MNNG. Symbols : ○, TA1535(*ada_{ST}*⁺, *ogt_{ST}*⁺) ; ●, YG7100(*Δada_{ST}*) ; □, YG7104(*Δogt_{ST}*) ; ■, YG7108(*Δada_{ST}**Δogt_{ST}*)

加体の修復を主として行っている酵素の候補としては、先にクローニングしたOgt_{ST}が考えられたので、次に*ogt_{ST}*を欠損した株を作製することにした。

4) *ogt_{ST}* 欠損サルモネラ試験菌株の作製

もう一方のMTであるOgt_{ST}をコードする遺伝子(*ogt_{ST}*)を、クロラムフェニコール耐性遺伝子(Cm^r)に置き換えたプラスミドpYG 620を作製した(Fig. 4)。制限酵素(ApaLI)処理で複製起点をのぞいた直線状の二本鎖DNA断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、T 4 DNAリガーゼで処理後、宿主であるTA 1535株および、YG 7100株にエレクトロポレーション法により導入した(Fig. 4)。それぞれのクロラムフェニコール耐性コロニーを分離し、サザンプロットにより*ogt_{ST}*遺伝子の欠損を確認した。TA 1535株の*ogt_{ST}*欠損株をYG 7104株、*ada_{ST}-ogt_{ST}*二重欠損株をYG 7108株と命名した。Fig. 5には、親株と欠損株のパターンを示す。Cm^rの遺伝子を置き換える前の*ogt_{ST}*を含むDNA断片には、*Eco*RIと*Eco*RVの切断部位が1ヶ所ずつ存在するが、置き換えたCm^rの遺伝子にはどちらもないため、親株のレーン(Fig. 5, Lanes 1,4)では切断された2本のバンドが検出されたのに対して、欠損株のレーン(Fig. 5, Lanes 2,3,5,6)では1本のバンドだけが検出されている。欠損株において、MTの活性が消失していることは³Hラベルしたメチル基の取り込み実験で確認された(Fig. 2)。

2. アルキル化剤高感受性サルモネラ試験菌株の性質

1) MT 欠損株のアルキル化剤に対する感受性

代表的なメチル化剤であるMNNGに対する感受性を、親株TA 1535と、MT欠損株(YG 7100, YG 7104, YG 7108)の計4株について検討した。方法は前出(1-3)

の通りである。*ada_{ST}*欠損株はアルキル化剤の致死作用に対しては高い感受性を示したが、野生株と同程度の突然変異誘発性しか示さなかった(Fig. 3(A), Fig. 6)。

YG 7104株は、致死感受性に関しては親株と同程度であったが、MNNGが親株に突然変異を起こさない用量で強い突然変異誘発性を示した(Fig. 6)。以上のことより、*ogt_{ST}*欠損株が低い用量で閾値を示さなくなったことから、*S. typhimurium*では主として*ogt_{ST}*のコードするMTがメチル化剤による突然変異の誘発を抑制していることが示唆された。

Table 2には作製した株の各種アルキル化剤に対する感受性を比較するため、単位量当たりの誘発復帰コロニー数を示した。エチル基以上に長くなると、YG 7104とYG 7108の間で差がほとんどなくなるが、メチル化剤の場合は、YG 7108の方が感受性が高い結果になっている(Yamada et al., 1997)。このことは、メチル基の修復にはAda_{ST}も関与していることを示唆していると考えられる。

2) 非アルキル化剤に対する感受性

TA 1535にpKM 101プラスミドを導入した株TA 100は、化学物質全般に対する感受性があがっている。YG 7104やYG 7108がそのように特異性を持たずき、さまざまな化合物に対して感受性の上がっている株ではないことを証明するために、代表的な変異原物質である、4-NQOとAF-2についてエームス試験を行った(Fig. 7)。この場合、親株はTA 100であり、YG 7104とYG 7108にそれぞれpKM 101を導入した株、YG 7112、YG 7113を用いている。いずれの株においても、化合物の変異原性は検出されているが、親株と欠損株のグラフが重なり、その感受性に差がないことが示された。このことから、作製した株は、アルキル化剤に特異的に感受

Table 2 Mutagenicity of various alkylating agents in strains lacking different MTs

Chemicals	Induced His ⁺ revertants per nmol or μ mol			
	TA1535 wild type	YG7100 Δada_{ST}	YG7104 Δogt_{ST}	YG7108 $\Delta ada_{ST}\Delta ogt_{ST}$
MNNG	61(1.0)	146(2.4)	717(12)	3839(63)
ENNG	0.1(1.0)		953(9530)	1030(10300)
PNNG	87(1.0)		4704(54)	3808(44)
BNNG	62(1.0)		1504(24)	1319(21)
MNU	2(1.0)	5(2.5)	17(8.5)	34(17)
ENU*	321(1.0)		9017(28)	9227(29)
MMS*	ND	ND	936	7619
EMS*	ND	ND	9439	11178

The mutagenicity test was performed with 5-9 doses. Chemicals were assayed with four strains in parallel. The number of induced His⁺ revertants per nmol or μ mol was calculated at every dose where the actual numbers of His⁺ revertants per plate were more than twice as many as those of spontaneous His⁺ revertants per plate; the highest value for each chemical and strain is indicated. The numbers in parentheses represent the relative values when the number of His⁺-induced revertants per nmol or μ mol of TA1535 is assigned as 1.0. In case the numbers of His⁺ revertants per plate at any dose did not exceed twice numbers of spontaneous revertants, ND is shown in place of the values.

* The number of His⁺ revertants per μ mol instead of nmol is indicated. The molecular weights of the chemicals are: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 147.09; N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 161.12; N-propyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 175; N-butyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 189; methylnitrosourea, 103.1; ethylnitrosourea, 117.1; methyl methanesulfonate, 110.1; ethyl methanesulfonate, 124.2

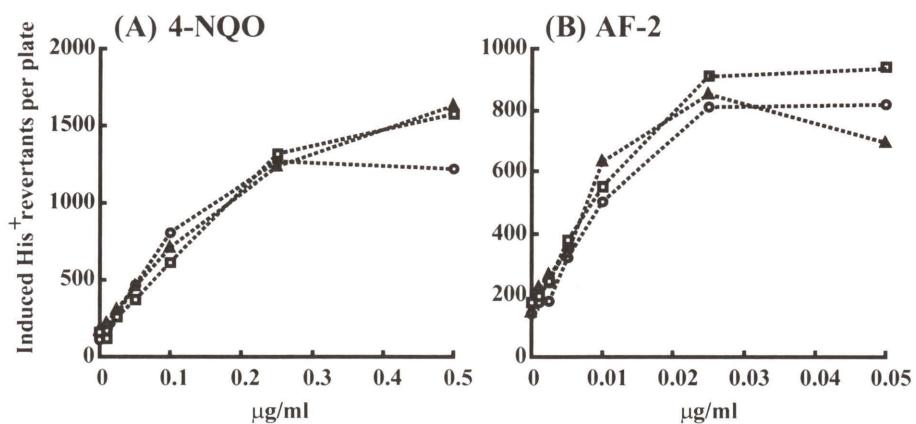


Fig. 7 The mutagenic response of *S. typhimurium* tester strains lacking different MTs against non-alkylating agents, 4-NQO (A) and AF-2 (B). Symbols: ○, TA1535; ▲, YG7104; □, YG7108

性が高くなっていることが示唆される。

3) 自然復帰突然変異頻度

欠損株において自然復帰突然変異頻度が野生株と比較してどの程度変化しているのかを調べるために、fluctuation testを行った(Fig. 8)。野生株TA 1535よりもYG 7104株で1.5倍、YG 7108株で2倍程度高い値を示した。また、YG 7100株とTA 1535株の間に差がないに対して、YG 7108株はYG 7104株よりも高い値を示していた。このことは、菌体内に潜在的なアルキル化剤、

特にメチル化剤によるDNA損傷があり、MTがそのような損傷に対応しているためと考えられる。

4) MT欠損株の応用例

ニトロソアミンは、食品中に存在することが知られている変異原で、S 9 mixにより代謝活性化を受けて変異原性を示す(Rao et al., 1979)。YG 7104株、YG 7108株とともにDMN、DENに対しても高い感受性を示し、pKM 101導入株TA 100に突然変異を起こさない用量(0.1-10 mg/plate)でも明らかな突然変異誘発性を示

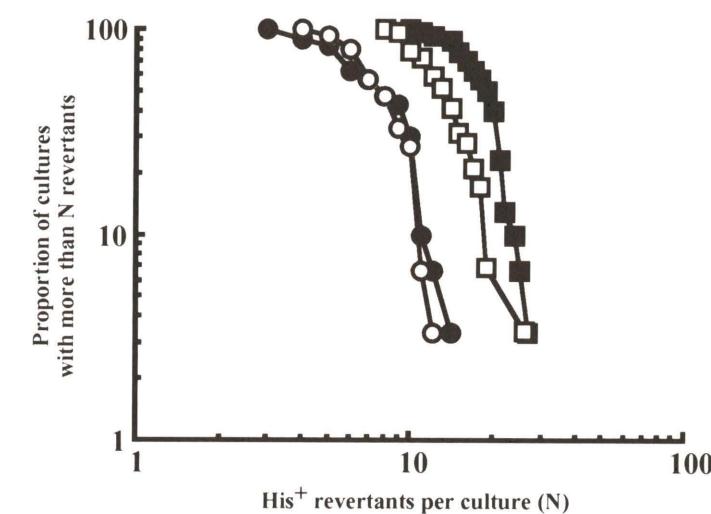


Fig. 8 Spontaneous mutation rates. The proportion of culture generating more than N revertants per plate versus the number of revertants per plate (N) was plotted. Symbols: ○, TA1535(ada_{ST}^+ , ogt_{ST}^+); ●, YG7100(Δada_{ST}); □, YG7104(Δogt_{ST}); ■, YG7108($\Delta ada_{ST}\Delta ogt_{ST}$)

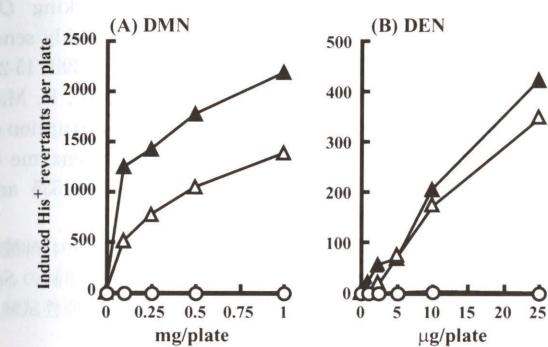


Fig. 9 The mutagenic response of *S. typhimurium* tester strains lacking different MTs against DMN (A) and DEN (B). Symbols: ○, TA1535; △, YG7104; ▲, YG7108

した(Fig. 9)。従来、プレインキュベーションを行わず直接平板にまくプレート法では検出できないとされていたが(Prival et al., 1979)、作製した株を用いた場合変異原性が検出できた(未発表データ)。従来のエームス試験菌株では用量を上げなければ、変異原性を検出できず、食品中に混入している微量を検出することは非常に困難であった。この高感受性菌を使えば、従来よりも少量のサンプルで検出可能になるものと思われる。このほか、作製した株の特異性を利用した村上ら(1994)のアルキルニトロソ尿素の作用機構に関する報告もある。できるだけ多くの研究者の研究に役立てていただけたらと思う。

結語

バクテリアにおける特定遺伝子の欠損株を作製する手法を開発し、応用としてアルキル化剤に特異的に高感受性を示す試験菌株を作製した。TA 1535株の ogt_{ST} 欠損

株であるYG 7104株、 ada_{ST} - ogt_{ST} 二重欠損株であるYG 7108株はともに、各種アルキル化剤に対して特異的に高感受性であるとともに、アルキル化DNA損傷の修復機構の解明に有用であることが示された。

謝辞

本研究を行うにあたり、能美健彦博士、祖父尼俊雄博士他、国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部のみなさまのご指導を仰ぐとともに、時に励まされ、助けられ、さまざまなことで大変お世話になりました。末筆ながらお礼申し上げます。これからも私は変異原に関する研究にとどまらず、自然現象の解明に携わっていくことになると思います。この受賞を励みに、今一度初心に返ってがんばりたいと考えております。

参考文献

- Becker, K., C.M. Gregel and B. Kaina (1997) The DNA repair protein O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase protects against skin tumor formation induced by antineoplastic chloroethylnitrosourea, *Cancer Res.*, 57, 3335-3338.
- Espinosa-Aguirre, J.J., M. Yamada, K. Matsui, M. Watanabe, T. Sofuni, and T. Nohmi (1999) New O -acetyltransferase-deficient Ames *Salmonella* strains generated by specific gene disruption, *Mutat. Res.*, 439, 159-169.
- Jeggo, P. (1979) Isolation and characterization of *Escherichia coli* K-12 mutants unable to induce the adaptive response to simple alkylating agents, *J. Bacteriol.*, 139, 783-791.
- Hakura, A., K. Morimoto, T. Sofuni and T. Nohmi (1991) Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium ada* gene, which encodes O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase, *J. Bacteriol.*, 173, 3663-3672.
- Hayakawa, H., G. Koike and M. Sekiguchi (1990) Expression and cloning of complementary DNA for a human enzyme that repairs O^6 -methylguanine in DNA, *J. Mol. Biol.*, 213,

- 739-747.
- Mattern, J., aU. Eichhorn, B. Kaina and M. Volm (1998) *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity and sensitivity to cyclophosphamide and cisplatin in human lung tumor xenografts*, Int. J. Cancer, 77, 919-922.
- Nohmi, T., M. Yamada, M. Watanabe, S.Y. Murayama and T. Sofuni (1992) Roles of *Salmonella typhimurium umuDC* and *samAB* in UV mutagenesis and UV sensitivity, J. Bacteriol., 174, 6948-6955.
- Prival M.J., V.D. King and A.T. Sheldon, Jr. (1979) The mutagenicity of dialkyl *nitrosamines* in the *Salmonella* plate assay, Environ. Mutagen., 1, 95-104.
- Rahden-Staron, I. and F. Laval (1991) cDNA cloning of the rat *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 597-602.
- Rao, T.K., J.A. Young, W. Lijinsky and J.L. Epler (1979) Mutagenicity of aliphatic nitrosamines in *Salmonella typhimurium*, Mutat. Res., 66, 1-7.
- Rebeck, G.W., C.M. Smith, D.L. Goad and L. Samson (1989) Characterization of the major DNA repair methyltransferase activity in unadapted *Escherichia coli* and identification of a similar activity in *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol., 171, 4563-4568.
- Sancar, A., A.M. Hack and W.D. Rupp (1979) Simple method for identification of plasmid-coded proteins, J. Bacteriol., 137, 692-693.
- Sekiguchi, M., Y. Nakabepu, K. Sakumi and T. Tuzuki (1996) DNA-repair methyltransferase as a molecular device for preventing mutation and cancer, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 122, 199-206.
- Shiraishi, A., K. Sakumi, Y. Nakatsu, H. Hayakawa and M. Sekiguchi (1992) Isolation and characterization of cDNA and genomic sequences for mouse *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*, Carcinogenesis, 13, 289-296.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol., 98, 503-517.
- Suzuki, M., K. Matsui, M. Yamada, H. Kasai, T. Sofuni and T. Nohmi (1997) Construction of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in 8-hydroxyguanine DNA glycosylase and their sensitivities to oxidative mutagens and nitro compounds, Mutat. Res., 393, 233-246.
- Takano, K., T. Nakamura and M. Sekiguchi (1991) Roles of two types of *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferases* in DNA repair, Mutat. Res., 254, 37-44.
- Watanabe, M., T. Nohmi and M. Ishidate, Jr. (1987) New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes, Biochem. Biophys. Res. Commun., 147, 974-979.
- Yamada, M., A. Hakura, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) New method for gene disruption in *Salmonella typhimurium*: construction of an *ada*-deletion derivative of *Salmonella typhimurium* TA1535, J. Bacteriol., 175, 5539-5547.
- Yamada, M., B. Sedgwick, T. Sofuni and T. Nohmi (1995) Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of *O⁶-methylguanine*, J. Bacteriol., 177, 1511-1519.
- Yamada, M., K. Matsui, T. Sofuni and T. Nohmi (1997) New tester strains of *Salmonella typhimurium* lacking *O⁶-methylguanine DNA methyltransferases* and highly sensitive to mutagenic alkylating agents, Mutat. Res., 381, 15-24.
- Yamada, M., J.J. Espinosa-Aguirre, M. Watanabe, K. Matsui, T. Sofuni, and T. Nohmi (1997) Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538, Mutat. Res., 375, 9-17.
- 村上博子, 伊藤 啓, 望月正隆, 山田雅巳, 能美健彦(1994)酢酸塩緩衝液によるN-ニトロアルキル尿素の変異原性抑制の *Salmonella typhimurium* YG71系を用いた解析, 変異原性試験, 3: 167-171.

Environ. Mutagen Res., 21: 131 - 140 (1999)

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会で発表された1998年研究奨励賞受賞講演である(座長:大西克成)。

コメットアッセイを用いたマウス多臓器DNA損傷の検出

佐々木 有

八戸工業高等専門学校物質工学科 〒039-1104 青森県八戸市田面木上野平16-1

Detection of mouse organ-specific genotoxicity by the comet assay

Yu F. Sasaki

Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology, Tamonoki Uwanotai 16-1, Hachinohe Aomori 039-1104, Japan

Summary

The genotoxicity of 206 chemicals selected from IARC groups 1, 2A, 2B, 3, and 4 and/or from the U.S. NTP carcinogenicity database was evaluated using the comet assay in mouse organs. Groups of four mice were treated once orally or intraperitoneally at the MTD and stomach, colon, liver, kidney, bladder, lung, brain, and bone marrow were sampled 3, 8, and/or 24 h after each treatment.

Out of 206 studied chemicals, 115 are Ames test-positive rodent carcinogens, 43 are Ames test-negative rodent carcinogens, and 30 are rodent non-carcinogens. High positive response ratio (107/115) for rodent genotoxic carcinogens and a high negative response ratio (24/29) for rodent non-carcinogens are shown in comet assay. For Ames test-negative carcinogens, the positive ratio is below 50 %. The organs exhibiting increased levels of DNA damage were not necessarily the target organs for carcinogenicity. It was rare, in contrast, for the target organs not to show DNA damage. Organ-specific genotoxicity, therefore, is necessary but not sufficient for the prediction of organ-specific carcinogenicity.

In the safety evaluation of chemicals, it is important to demonstrate whether or not Ames test-positive agents are genotoxic *in vivo*. Chemical carcinogens can be classified as genotoxic (Ames test-positive) or putative non-genotoxic (Ames test negative) carcinogens. The comet assay, which detects DNA lesions, is not suitable for identifying non-genotoxic carcinogens. The present study revealed a high positive response ratio for rodent genotoxic carcinogens and a high negative response ratio for rodent genotoxic non-carcinogens. These results suggest that the comet assay can be used to evaluate the *in vivo* genotoxicity of *in vitro* genotoxic chemicals.

(This paper, in a session chaired by yoshinari Ohnishi, is the lecturer of The JEMS Achievement Award (1998) presented at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, held at the Melparque Osaka in Osaka, Japan, November 24-26, 1998.)

Keywords: genotoxicity, mouse multiple organs, comet assay, IARC monographs, U.S. NTP carcinogenicity database

緒言

遺伝毒性試験は化学物質等によるDNA損傷を検出することを目的とし、癌原性の予測試験としての側面をもつ。現在、微生物を用いるAmes試験と哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験がもっとも汎用されている *in*

受付: 1999年3月15日

受理: 1999年5月10日

©日本環境変異原学会

Table 1 Positive and negative chemicals in the *in vivo* comet assay

Positive	Negative	
Alkylating agents 2-Methylaziridine, Mitomycin C, Thiotepa, Diepoxybutane, Epichlorohydrin, Propylene oxide, Styrene-7,8-oxide, β -Butyrolactone, β -Propiolactone, 1,3-Propane sultone, Chlorambucil, Cyclophosphamide, Melphalan, ENU, MNNG, <i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -butylamine, <i>N</i> -Nitrosodiethylamine, <i>N</i> -Nitrosodimethylamine, <i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -propylamine, <i>N</i> -Nitrosoethylmethylamine, <i>N</i> -Nitrosomorpholine, <i>N</i> -Nitrosopiperidine, <i>N</i> -Nitrosopyrrolidine, EMS, MMS, Busulfan, Diethylsulfate	Dimethylsulfate	Polycyclic hydrocarbons Benz [a] anthracene, Benzo [b] fluoranthene, Benzo [a] pyrene, 2,3-Benzofuran Benzo [e] pyrene, Dibenz [a,h] anthracene, DMBA, Pyrene, Thiabendazole
Amides (including thioamide and carbamate) Acetoamide, Acrylamide, Dimethylformamide, Ethylene thiourea, Thioacetamide, Urethane	8-Methylthiouracil	Other aliphatic compounds Acetaldehyde, Acrylonitrile, Ethyl acrylate, Dimethoate, 2-Nitropropane
Aromatic amines Benzidine, <i>N,N'</i> -Diacetylbenzidine, Dianisidine, 3,3'-Dichlorobenzidine, Tolidine, IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, 2AAF, Aniline, <i>o</i> -Anisidine, Auramine, <i>p</i> -Chloroaniline, <i>p</i> -Chloro- <i>o</i> -phenylenediamine, <i>p</i> -Chloro- <i>o</i> -toluidine, CI Basic Red 9, <i>p</i> -Cresidine, 2,4-Diaminoanisole, 4,4'-Diaminodiphenyl ether, 2,4-Diaminotoluene, 2,4-Dimethylaniline, MOCA, 4,4'-Methylenedianiline, 1-Naphthylamine, 2-Naphthylamine, Phenacetin, 4,4'-Thiodianiline, <i>o</i> -Toluidine	<i>p</i> -Chloro-1,4-phenylenediamine, 3-Chloro- <i>p</i> -toluidine, 2,5-Diaminotoluene, 2,6-Diaminotoluene, 2,4-Dimethoxyaniline, Disperse Blue 1, Fast Green FCF, Magenta, 4-Nitroanthranilic acid, 4-Nitro-1,2-phenylenediamine, 1,4-Phenylenediamine, <i>N</i> -Phenyl-1,4-phenylenediamine	Other aromatic compounds Benzene, Benzyl acetate, Benzyl alcohol, Biphenyl, BHA, BHT, Daunomycin, Phenol, <i>o</i> -Phenylphenol
Azo compounds Amaranth, <i>p</i> -Aminoazobenzene, <i>o</i> -Aminoazotoluene, Azobenzene, CI Direct Blue 15, CI Pigment Red 3, Dacarbazine, <i>p</i> -Dimethylaminoazobenzene, Direct Black 38, Direct Blue 6, Disperse Yellow 3, Orange I, Phenazopyridine, Ponceau SX, Ponceau 3R, Sudan I, Sudan III	CI Acid Red 114, Evans Blue, Oil Orange SS, Orange G, Sudan II, Sudan Red 7B, Trypan Blue	Other heterocyclic compounds Aflatoxin B1, Bleomycins, Fulfural, Phenobarbital sodium
Cyclic nitro compounds AF2, Metronidazole, 4NQO, Dinitropyrenes, 5-Nitroacenaphthen, Nitrofen, 2-Nitrofluorene, 1-Nitropyrene	Chloramphenicol	Others Potassium bromate, Tobacco smoke
Halides Captafol, Chlorodibromomrthane, Dichlorvos, Chloromethyl methyl ether, 1,3-Dibromo-3-chloropropane, 1,2-Dibromoethane, 1,2-Dichloroethane, Dichloromethane, 1,3-Dichloropropene, MX, <i>p</i> -Dichlorobenzene, 2,4-Dichlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol, Vinyl bromide	Aldirin, Carbon tetrachloride, Chlordene, Chloroform, 2-Chloroethanol, Dieldrin, Heptachlor, Hexachlorocyclohexane, Hexachloroethane Pentachloroethane, 1,1,1,2-Tetrachloroethane, 1,1,2,2-Tetrachloroethane, Tetrachloroethylene, Trichloroacetic acid, Trichloroethylene, <i>p,p'</i> -DDE, <i>p,p'</i> -DDT, <i>o</i> -Dichlorobenzene, Hexachlorobenzene, Pentachlorophenol, PCBs	<i>vitro</i> の試験系であり、マウスを用いる小核試験によって <i>in vivo</i> での遺伝毒性評価が一般的に行われている。小核試験は実験方法が比較的簡便な短期試験として確立されており、背景データが豊富なことから有用性の高い試験系である。しかしながら、小核試験は染色体異常の誘発を指標とするものであり、それゆえに観察対象は骨髄造血組織のような分裂性組織に限定される。そのため、 <i>in vitro</i> では陽性であるが小核試験で陰性である場合、被験物質が高い組織特異性を有し、観察対象である骨髄組織に到達していないために遺伝毒性が検出されないということも考えられる。このように、 <i>in vivo</i> での遺伝毒性評価においては毒性発現組織と観察対象組織の乖離は大きな問題であり、そのために骨髄造血組織以外の多臓器における遺伝毒性の検出が求められていた。
Holmones	Diethylstilbestrol, Hexoestrol, 17 β -Oestradiol, Teststeron	コメットアッセイは、DNA 鎮切断またはアルカリ感受性部位のような DNA 損傷をもつ DNA が強アルカリ下で変性・低分子化することを利用し、DNA 損傷を DNA の低分子化としてマイクロゲル電気泳動で検出する方法であり、その像が彗星のようにみえることからこのように呼ばれている (Singh et al. 1988)。この方法では DNA 損傷を DNA 複製による固定を経ずに検出することができるため、培養細胞のみならず非分裂性組織を含むあらゆる動物組織の DNA 損傷を検出できるものと期待してきた (Fairbairn et al., 1995)。しかしながら、コメットアッセイは培養細胞や血球細胞のような単細胞の DNA 損傷を検出する方法であるため、適切な動物組織の分散法が必須であった。
Hydrazine 1,1-Dimethylhydrazine, 1,2-Dimethylhydrazine, Hydrazine, Procarbazine	Beryllium sulfate, Cadmium chloride, Lead acetate, Nickel chloride	動物組織の DNA 損傷をコメットアッセイで検出するためには、従来、酵素処理などによる組織分散が試みられてきた (Schmeizer, et al., 1994; Monteith and Vanstone, 1995)。しかし、トリプシンやコラゲナーゼによる一般的な酵素分散法では、無処理の動物の組織において
Metalic compounds Cisplatin, Potassium chromate(VI), Sodium arsenite(III)		もほとんどすべての細胞で DNA が泳動されることで対照値が上昇し、必ずしもコメットアッセイには適したものではなかった。われわれは緩やかにホモジナイズして分離した核を用いることを試み、冷却・遮光下の核溶解と電気泳動の条件を工夫することによって、マウス、ラットの主要臓器で陰性対照の泳動長をほぼ零に、アルキル化剤投与の場合には十分に長い泳動長を得ることに成功した (Sasaki et al., 1997a)。この方法によって、IARC モノグラフおよび NTP 齧歯類癌原性データベース (Ashby and Tennant, 1991) に記載されている化合物を中心とする 206 種の遺伝毒性をマウス主要 8 脳器 (総胃粘膜、結腸粘膜、肝、腎、膀胱粘膜、肺、脳、骨髄) で検討してきた (Sasaki et al., 1997a-g, 1998a-d, 1999; Tsuda et al., 1998a, b)。ここでは、コメットアッセイで検出できる <i>in vivo</i> の遺伝毒性によって何がわかるのか、ということを考察する。

1. 遺伝毒性・癌原性の標的臓器

各群 4 匹の 7-10 週齢の ICR または ddY 系雄マウスを用い、単回の腹腔内または強制経口投与の 3, 8, 24 時間後に屠殺し、標本を作成した。核溶解を経て強アルカリ (pH > 13) に 10 分曝して DNA を変性させ、同じ強アルカリ電気泳動液中で 15 分間電気泳動 (25 V, 250-300 mA) した。核溶解から電気泳動の終了までの間を 0 °C に近い温度と遮光下で行うことが安定した結果を得るために特に重要であった。また、アルカリ変性および電気泳動の時間を長くすることで検出感度を上げることも報告されている (Vijayalakshmi et al., 1992)。そのような長時間のアルカリ処理では対照値が安定しないだけでなく、粘膜組織では核が拡散してしまったような像となることが多かった。

対象とした化合物は、その化学構造から 14 群に大別さ

Table 2 Comparison of genotoxicity targeting organs and carcinogenicity targeting organs in mice

Chemical structure	N ^a	Results of the comet assay ^b									
		+	S	C	L	K	Ub	Lu	Br	BM	Other
Alkylating agents	29	28(23)	26(6)	26(3)	20(7)	16(4)	23(1)	22(13)	9(1)	11(8)	(14)
N-Nitrosoamines, dialkyl type	9	9(9)	9(3)	9(1)	9(5)	7(2)	8(1)	9(6)	4(0)	1(1)	(2)
Alkylating agents excluding dialkyl nitrosoamines	20	19(17)	17(3)	17(2)	11(2)	9(2)	15(0)	13(7)	5(1)	10(7)	(12)
Aziridines	3	3(2)	2(0)	3(0)	1(0)	1(0)	3(1)	3(0)	1(0)	3(1)	(1)
Epoxides	4	4(4)	4(1)	3(0)	1(1)	2(0)	2(1)	3(0)	1(0)	3(0)	(3)
Lactones	3	3(3)	3(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	1(0)	1(1)	(3)
Mustards	3	3(3)	3(0)	3(0)	2(1)	0(0)	3(2)	0(0)	0(0)	0(3)	(2)
N-Nitroso compounds, monoalkyl type	2	2(2)	2(2)	2(2)	2(0)	2(1)	2(0)	2(1)	0(1)	1(1)	(1)
Sulfates	2	1(0)	1(0)	1(0)	0(0)	1(0)	1(0)	0(0)	1(0)	1(0)	(0)
Sulfonates	3	3(3)	2(0)	3(0)	2(0)	2(1)	2(0)	2(2)	2(0)	1(1)	(2)
Amides	7	6(6)	6(0)	6(0)	4(3)	3(0)	5(0)	5(2)	1(0)	3(2)	(1)
Aromatic amines	43	31(26)	17(2)	11(0)	27(21)	14(0)	18(2)	22(3)	23(0)	6(4)	(9)
Aromatic amines excluding heterocyclic amines	37	25(20)	12(0)	5(0)	21(16)	9(0)	18(2)	17(1)	17(0)	6(2)	(9)
Benzidine derivatives	5	5(3)	5(0)	3(0)	5(2)	4(0)	5(0)	5(0)	5(0)	5(1)	(0)
Heterocyclic amines	6	6(6)	5(2)	6(0)	6(5)	5(0)	0(0)	5(2)	6(0)	0(2)	(0)
Azo compounds	24	17(12)	11(0)	14(1)	12(8)	2(1)	7(4)	6(2)	5(0)	4(2)	(4)
Cyclic nitro compounds	9	7(7)	7(1)	7(0)	3(3)	3(0)	6(0)	3(3)	3(0)	1(2)	(4)
Heterocyclic nitro compounds	3	3(3)	3(1)	3(0)	2(0)	2(0)	3(0)	3(2)	2(0)	1(1)	(1)
Other nitro compounds	6	4(4)	4(0)	4(0)	1(3)	1(0)	3(0)	0(1)	1(0)	0(0)	(3)
Halides	35	14(29)	11(6)	12(1)	12(24)	10(1)	9(1)	11(6)	9(0)	5(4)	(6)
Aliphatic halides	26	11(23)	8(6)	10(1)	10(18)	9(1)	7(1)	10(5)	7(0)	4(3)	(5)
Aromatic halides ^d	9	3(6)	3(0)	2(0)	2(6)	1(0)	2(0)	1(1)	2(0)	1(1)	(1)
Genotoxic (Ames test-positive) halides ^d	12	11(9)	8(6)	10(1)	10(4)	9(0)	7(1)	10(4)	7(0)	4(2)	(5)
Non-genotoxic (Ames test-negative) halides ^d	22	3(19)	3(0)	2(0)	2(19)	1(1)	2(0)	1(2)	2(0)	1(2)	(1)
Hormones	4	0(3)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(0)
Hydrazines	4	4(4)	3(0)	4(0)	4(2)	2(0)	3(0)	3(3)	2(1)	2(2)	(4)
Metal compounds	7	3(7)	0(0)	1(0)	1(0)	0(1)	0(0)	2(4)	1(0)	0(0)	(1)
Polycyclic hydrocarbons	9	8(7)	8(2)	8(0)	3(2)	2(0)	8(1)	8(2)	2(0)	2(0)	(6)
Polycyclic aromatic hydrocarbons	7	7(6)	7(1)	7(0)	2(1)	1(0)	7(1)	7(1)	1(0)	1(0)	(6)
Polycyclic heterocyclic hydrocarbons	2	1(1)	1(1)	1(0)	1(1)	1(0)	1(0)	1(1)	1(0)	1(0)	(0)
Other aliphatic compounds	11	5(1)	5(1)	5(0)	3(0)	1(0)	4(0)	4(0)	3(0)	2(0)	(0)
Other aromatic compounds	12	9(6)	9(4)	7(0)	5(2)	2(0)	5(0)	4(2)	5(0)	2(1)	(2)
Other heterocyclic compounds	10	4(4)	3(0)	3(0)	3(4)	1(0)	3(0)	3(2)	1(0)	2(0)	(0)
Others	2	2(2)	1(0)	0(0)	2(0)	1(0)	0(0)	1(0)	0(0)	0(0)	(0)
Total	206	138(134)	108(22)	105(5)	99(76)	57(7)	91(9)	94(42)	64(2)	40(25)	(54)

^aNumber of chemicals studied in this study^bNumber of chemicals that were positive in each organ. Numbers in parentheses represent the number of carcinogens that targeted each organ. S : stomach, C : colon, L : liver, K : kidney, Ub : urinary bladder, Lu : lung, Br : brain, BM : bone marrow^cNumber of chemicals that were positive in at least one organ : Numbers in parentheses represent the number of mouse carcinogens^dp,p'-DDE is not included in genotoxic and non-genotoxic halides, because its Ames test-data are not cited in the references

れ、それについてコメットアッセイ陽性および陰性の化合物をTable 1に示した(少なくとも一つの臓器で陽性となったときに、その化合物はコメットアッセイ陽性とした)。また、各臓器における陽性化合物数、マウスの当該臓器を標的とする化合物数をTable 2に示す。アルキル化剤については、29種中 dimethyl sulfate を除く28種が8臓器中少なくとも1臓器でコメットアッセイ陽性であった。陽性率が50%以上の臓器は、胃(26/28)、結腸(26/28)、肝(20/28)、腎(16/28)、膀胱(23/28)、肺(22/28)であった。ここで対象としたアルキル化剤は化学構造から8群に細分されるが、ジアルキル型N-

nitrosoamineには遺伝毒性陽性臓器に際だった特徴が認められた。すなわち、ジアルキル型N-nitrosoamine 9種とそれを除く19種の陽性率は、それぞれ肝で9/9と11/19、肺で9/9と13/19、骨髄で1/9と10/18であった。ここに示されたジアルキル型N-nitrosoamineの肝と肺における高い陽性率は、それぞれに対する高い発癌率(マウス肝で5/6、肺で6/6)に一致する。他方、ジアルキル型N-nitrosoamineを除くアルキル化剤のマウス肝における発癌率は2/17に過ぎず、比較的発癌率が高い臓器は肺(7/17)、造血系(7/17)、その他(12/17)であった。

芳香族アミンは肝で高い遺伝毒性陽性率(27/31)を示

し、これは芳香族アミンの主要な発癌標的臓器は肝であること(21/26)と一致する。肝の他にコメットアッセイで比較的高い陽性率を示した臓器は胃(17/31)、結腸(14/31)、腎(11/31)、膀胱(18/31)、肺(22/31)、脳(23/31)である。しかし、これらのマウス臓器における発癌率は胃(2/26)、結腸(0/26)、腎(0/26)、膀胱(2/26)、肺(3/26)、脳(0/26)に過ぎなかった。一方、癌原性標的臓器であるにも拘わらず、遺伝毒性陰性となった臓器は、p-cresidineの肝、PhIP、4,4'-methylenedianiline、2,4-diaminotolueneの骨髄のみであった。

アゾ化合物は主に胃(11/17)、結腸(14/17)、肝(12/17)で遺伝毒性を示した。アゾ基の還元はアゾ化合物の遺伝毒性発現に必須であり、そのため、アゾ化合物の *in vitro* 遺伝毒性はアゾ還元系の存在の有無に大きく左右される。動物体内では、肝における NADPH 依存性アゾ還元酵素、および腸内細菌によってアゾ基は還元される。そのため、アゾ化合物の主な遺伝毒性発現臓器(消化管、肝)は、それらが還元代謝される臓器に一致する。しかしながら、発癌率は肝では8/12と高いのに対し、消化管系では1/12に過ぎない。

ハライド35種には、変異(Ames試験陽性)齧歯類癌原物質11種、非変異(Ames試験陰性)齧歯類癌原物質19種が含まれる。変異齧歯類癌原物質は captafol、chlorodibromomethane、chloromethyl methyl ether、1,2-dibromo-3 chloropropane、1,2-dibromoethane、1,2-dichloroethane、dichloromethane、1,3-dichloropropene、dichlorvos、MX、vinyl bromide であり、いずれもコメットアッセイで陽性を示した。これらの各臓器での陽性率は胃(8/11)、結腸(10/11)、肝(10/11)、腎(9/11)、膀胱(7/11)、肺(10/11)であり、これら6臓器の間に大きな相違は認められない。これらの主な癌原性標的臓器は胃、肝、肺であり、その発癌率は胃(6/9)、肝(4/9)、肺(4/9)である。一方、非変異癌原性ハライドは肝を特異的に癌原性標的臓器とするにも拘わらず(20/20)、肝でコメットアッセイ陽性であったものは、p-dichlorobenzeneと2,4,6-trichlorophenolの2種に過ぎなかった。なお、齧歯類非癌原物質である2,4-dichlorophenolは胃と結腸で陽性であった。

対象とした206種について、少なくとも1つの臓器でコメットアッセイ陽性となったものは138種であった。206種のうち、マウスで癌原性が報告されているものは134種、マウスあるいはラットの少なくとも一方で癌原性が示されているもの(齧歯類癌原物質)は163種である。なお、anilineはラットで癌原性であるにも拘わらずマウスでは非癌原性とされ(Ashby and Tennant, 1991)、28種についてはマウスで十分な癌原性データが報告されていない。コメットアッセイ陽性率が50%以上の臓器は、胃(108/138)、結腸(105/138)、肝(99/138)、膀胱(91/138)、肺(94/138)であり、骨髄ではもっとも低い(40/138)。しかし、癌原性陽性率が50%を越える臓器は肝(76/134)だけであり、肺で比較的高い陽性率(42/134)が認められたに過ぎない。結腸、膀胱ではコメットアッセイ陽性率が高いにも拘わらず、癌原性陽性率は5/134、9/134と比較的低い。そのため、コメットアッセイで検出される各臓器における遺伝毒性は癌原性に必ずしも一致せず、遺伝毒性は癌原性の必要条件であったとしても十分条件ではないことが示唆される(すなわち、遺伝毒性発現臓器は必ずしも癌原性標的臓器ではない)。

2. 構造相関性

アルキル化剤、アミド、芳香族アミン、アゾ化合物、芳香族ニトロ、ヒドラジン、縮合多環芳香族炭化水素は、それぞれ28/29、6/7、31/43、17/24、7/9、4/4、8/9と高い陽性率を示した(Table 2)。しかし、ハライド、ホルモン、金属化合物では14/35、0/4、3/7と陽性率は低い。陽性率の高い化合物群は、その化合物あるいは代謝物が化学構造的にDNAとの反応性を示す官能基を有している。陽性率が低いハライドに属する化合物であっても、コメットアッセイで陽性となったものには、活性ハロゲンやエポキシ化され得る炭素間二重結合のような直接あるいは間接にDNAとの反応性を示す官能基の存在が認められる。このことから、コメットアッセイの陽性結果と化合物(およびその代謝物)のDNAとの反応性の間に高い相関性が示唆される。

コメットアッセイではDNAのアルカリ変性を阻害するDNA架橋損傷は検出し難く、半切削後での不完全な修復後であれば検出されると予測される。培養細胞において、mitomycin C処理直後にはコメットアッセイ陰性であるが、回復時間経過後には陽性であり、bleomycin処理による陽性反応の抑制が示されている(Miyamae et al., 1997 a, b)。これらの結果は、以上予測が *in vitro* では正当であることを示している。本研究ではDNA架橋形成剤10種の *in vivo* 遺伝毒性をマウス8臓器で検討し、DNA架橋形成剤を除くアルキル化剤と比較した。アルキル化剤は胃(20/21)、結腸(19/21)、肝(18/21)、膀胱(17/21)、肺(19/21)でほぼ均等に高い陽性率を示した。しかし、DNA架橋形成剤は消化管粘膜で高い陽性率を示すものの(胃で8/10、結腸で10/10)、肝と肺ではそれぞれ3/10、4/10に過ぎなかった。いずれのDNA架橋形成剤も腹腔内投与であるにも拘わらず、消化管粘膜に特

Table 3 Results of the comet assay for IARC Group 1, 2A, 2B, 3, 4, and other chemicals

Chemical structure	Total ^a	IARC classification ^a					Others ^{a,b}	
		1	2A	2B	3	4	NC ^c	Others
Alkylating agents	28/29	5/5	7/8	16/16	0/0	0/0	0/0	0/0
N-Nitrosoamines, dialkyl type	9/9	0/0	2/2	7/7	0/0	0/0	0/0	0/0
Alkylating agents excluding dialkyl nitrosoamines	19/20	5/5	5/6	9/9	0/0	0/0	0/0	0/0
Aziridines	3/3	1/1	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0
Epoxides	4/4	0/0	2/2	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0
Lactones	3/3	0/0	0/0	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0
Mustards	3/3	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
N-Nitroso compounds, monoalkyl type	2/2	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Sulfates	1/2	0/0	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Sulfonates	3/3	1/1	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0
Amides	6/7	0/0	1/1	5/6	0/0	0/0	0/0	0/0
Aromatic amines	31/43	2/2	4/4	22/24	2/4	0/0	0/8	1/1
Aromatic amines excluding heterocyclic amines	25/37	2/2	3/3	17/19	2/4	0/0	0/8	1/1
Benzidine derivatives	5/5	1/1	0/0	4/4	0/0	0/0	0/0	0/0
Heterocyclic amines	6/6	0/0	1/1	5/5	0/0	0/0	0/0	0/0
Azo compounds	17/24	0/0	2/2	7/10	8/12	0/0	0/0	0/0
Cyclic nitro compounds	7/9	0/0	0/1	6/7	0/0	0/0	0/0	1/1
Heterocyclic nitro compounds	3/3	0/0	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0	1/1
Other nitro compounds	4/6	0/0	0/1	4/5	0/0	0/0	0/0	0/0
Halides	14/35	1/1	3/4	8/22	1/6	0/0	0/1	1/1
Aliphatic halides	11/26	1/1	3/4	5/14	1/5	0/0	0/1	1/1
Aromatic halides	3/9	0/0	0/0	3/8	0/1	0/0	0/0	0/0
Hormones	0/4	0/3	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Hydrazines	4/4	0/0	1/1	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0
Metal compounds	3/7	2/5	1/1	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Polycyclic hydrocarbons	8/9	0/0	3/3	1/2	2/2	0/0	1/1	1/1
Polycyclic aromatic hydrocarbons	7/7	0/0	3/3	1/1	2/2	0/0	0/0	1/1
Polycyclic heterocyclic hydrocarbons	1/2	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	1/1	0/0
Other aliphatic compounds	5/11	0/0	1/1	3/3	0/0	0/0	1/6	0/0
Other aromatic compounds	9/12	1/1	0/0	2/3	4/4	0/0	2/4	0/0
Other heterocyclic compounds	4/10	1/1	0/0	2/3	1/3	0/1	0/1	0/1
Others	2/2	1/1	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Total	138/206	13/19	23/27	76/101	18/31	0/1	3/20	4/6

^aNumbers of comet assay-positive chemicals/Numbers of chemicals assayed^bChemicals not cited in the IARC Monographs^cChemicals reported not to be carcinogenic to rodents

異的に高い陽性率を示すことは注目すべき特徴であると考えられる。

3. コメットアッセイの *in vivo* 遺伝毒性の検出力

本研究で対象とした化合物は主に IARC モノグラフおよび NTP データベースに記載された癌原物質である。Table 3 にヒトに対する癌原性との関連を示した。コメットアッセイの陽性率は、Group 1 の human carcinogen で 13/19, Group 2 A の probable human carcinogen で 23/27, Group 2 B の possible human carcinogen で 76/101, Group 3 の unclassified as human carcinogen で 18/31, Group 4 の human non-carcinogen で 0/1 であり、ヒトに対する発癌性の危険性が高いとされるグループほど高い陽性率を示した。同様の傾向はマウス小核試験でも報告されているものである

(Morita et al., 1997)。

一般に、癌原物質は変異癌原物質 (Ames 試験陽性) と非変異癌原物質 (Ames 試験陰性) に大別される。本研究で対象とした 206 化合物のうち、115 種は変異齧歯類癌原物質 (マウスに対する癌原性が報告されているものは 90 種), 43 種は非変異齧歯類癌原物質, 30 種は齧歯類非癌原物質である。変異癌原物質のコメットアッセイ陽性率は 107/115 である (Table 4)。陰性であったものは、dimethyl sulfate, Fast Green FCF, Disperse Blue 1, CI Acid Red 114, Evans Blue, Oil Orange SS, Trypan Blue, 1-nitropyrene である。齧歯類非癌原物質は IARC モノグラフに記載された 9 種 (2,5-diaminotoluene, Sudan Red 7 B, *o*-dichlorobenzene, 2,4-dichlorophenol, pentachlorophenol, phenol, caprolactam, 5-fluorouracil, 8-hydroquinoline) を含めた 29 種であり、そのうち、陽性であったものは 2,4-

Table 4 Results of the comet assay for genotoxic and non-genotoxic carcinogens and non-carcinogens

Chemical structure	Total ^a	Ames+		Ames+		Ames-		Ames+/-	
		M ^{a,b}	Ro ^{a,c}	Ro ^{a,d}	Ro NC ^{a,e}				
Alkylating agents	28/29	23/23	28/29	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
N-Nitrosoamines, dialkyl type	9/9	6/6	9/9	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Alkylating agents excluding dialkyl nitrosoamines	19/20	17/17	19/20	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Aziridines	3/3	2/2	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Epoxides	4/4	4/4	4/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Lactones	3/3	3/3	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Mustards	3/3	3/3	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
N-Nitroso compounds, monoalkyl type	2/2	2/2	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Sulfates	1/2	0/0	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Sulfonates	3/3	3/3	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Amides	6/7	3/2	3/4	3/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Aromatic amines	31/43	25/26	29/31	1/1	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
Aromatic amines excluding heterocyclic amines	25/37	19/20	23/25	1/1	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
Benzidine derivatives	5/5	3/3	5/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Heterocyclic amines	6/6	6/6	6/6	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Azo compounds	17/24	8/9	10/14	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Cyclic nitro compounds	7/9	6/7	7/8	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Heterocyclic nitro compounds	3/3	3/3	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Other nitro compounds	4/6	3/4	4/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Halides	14/35	9/9	11/11	2/19	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Aliphatic halides	11/26	9/9	11/11	0/14	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Aromatic halides	3/9	0/0	0/0	2/5	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3
Hormones	0/4	0/0	0/0	0/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Hydrazines	4/4	3/3	3/3	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Metal compounds	3/7	2/2	2/2	1/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Polycyclic hydrocarbons	8/9	6/6	6/6	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Polycyclic aromatic hydrocarbons	7/7	6/6	6/6	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Polycyclic heterocyclic hydrocarbons	1/2	0/0	0/0	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Other aliphatic compounds	5/11	0/0	0/0	0/3	1/1	1/1	1/6	1/6	1/6
Other aromatic compounds	9/12	1/1	1/1	5/6	0/0	0/0	2/4	2/4	2/4
Other heterocyclic compounds	4/10	2/2	3/3	0/1	0/1	0/1	0/4	0/4	0/4
Others	2/2	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Total	138/206	87/90	107/115	15/43	5/29	5/29	5/29	5/29	5/29

Table 5 Comparison of genotoxicity in the bone marrow detected by the comet assay and micronucleus test

Chemical structure	N ^a	Comet BM ^b	Comet BM ^c	Comet BM ^d	Comet BM ^e	MN ^f
		MN-	MN+	MN+	MN+	
Alkylating agents	28/29	11	2	9	10	19/20
N-Nitrosoamines, dialkyl type	9/9	1	2	0	2	2/9
Alkylating agents excluding dialkyl nitrosoamines	19/20	10	1	9	8	17/20
Aziridines	3/3	3	0	3	0	3/3
Epoxides	4/4	3	1	2	0	2/4
Lactones	3/3	1	0	1	1	2/3
Mustards	3/3	0	0	0	3	3/3
N-Nitroso compounds, monoalkyl type	2/2	1	0	1	1	2/2
Sulfates	1/2	1	0	1	1	2/2
Sulfonates	3/3	1	0	1	2	3/3
Amides	6/7	3	1	0	2	2/7
Aromatic amines	31/43	6	0	6	7	13/28
Aromatic amines excluding heterocyclic amines	25/31	6	0	6	5	11/23
Benzidine derivatives	5/5	5	0	5	0	5/5
Heterocyclic amines	6/6	0	0	0	2	3/5
Azo compounds	17/24	4	2	0	5	5/9
Cyclic nitro compounds	7/9	1	0	1	1	2/6
Heterocyclic nitro compounds	3/3	1	0	1	1	2/3
Other nitro compounds	4/6	0	0	0	0	0/3
Halides	14/35	5	3	1	1	2/16
Aliphatic halides	11/26	4	3	1	1	2/13
Aromatic halides	3/9	1	0	0	0	0/3
Hormones	0/4	0	0	0	1	1/4
Hydrazines	4/4	2	0	2	2	4/4
Metal compounds	3/7	0	0	0	3	3/7
Polycyclic hydrocarbons	8/9	2	0	2	2	4/6
Polycyclic aromatic hydrocarbons	7/7	1	0	1	2	3/5
Polycyclic heterocyclic hydrocarbons	1/2	1	0	1	0	1/1
Other aliphatic compounds	5/11	2	0	2	0	2/7
Other aromatic compounds	9/12	2	0	1	1	2/4
Other heterocyclic compounds	4/10	2	0	1	3	4/7
Others	2/2	0	0	0	1	1/2
Total	138/206	40	8	25	39	64/136

^aNumbers of chemicals positive in at least one organ in the comet assay/Numbers of chemicals assayed^bNumbers of chemicals positive in the bone marrow in the comet assay^cNumbers of chemicals positive in the bone marrow in the comet assay but negative in the micronucleus test^dNumbers of chemicals positive in the bone marrow in the comet assay and in the micronucleus test^eNumbers of chemicals negative in the bone marrow in the comet assay and positive in the micronucleus test^fNumbers of chemicals positive in the mouse micronucleus test/Numbers of chemicals with micronucleus data

(acetamide, acrylamide, thioacetamide, aniline, CI Pigment 3, *p*-dichlorobenzene, 2,4,6-trichlorophenol, procarbazine, ethyl acrylate, benzene, benzyl acetate, BHA, BHT, *o*-phenylphenol)である。このうち, thioacetamide, aniline, procarbazine, benzeneの4種はマウス小核試験において陽性が(Mavourin et al., 1990; Morita et al., 1997), BHTと*o*-phenylphenolは*in vivo*でDNA付加物を形成することが報告されている(IARC, 1986; Pathak and Roy, 1993)。

4. 他の*in vivo* 遺伝毒性試験との比較

マウス骨髄における遺伝毒性は小核試験によって広範

に検討され、豊富なデータが得られている。そこで、骨髄における遺伝毒性をコメットアッセイと小核試験の間で比較した(Table 5)。本研究で対象とした206化合物について、小核試験の陽性率は64/136であるのに対し、コメットアッセイの骨髄における陽性率は40/206と大幅に下回る。そのため、骨髄という単一の組織に限れば、小核試験の方が検出力は高く、コメットアッセイが広範な化合物の遺伝毒性を検出し得るとしても、骨髄という単一の臓器を対象としている限りはその特徴を十分に發揮できないといえる。小核試験陽性・コメットアッセイ骨髄陰性の化合物が39種である一方、小核試験陰性・コメットアッセイ骨髄陽性も8種あることから、両試験法では検出し得るもののが必ずしも一致していないことが示

唆される。

コメットアッセイはDNA初期損傷を検出するものであり、損傷を受けた細胞が癌化するためには本法では検出できないDNA損傷の固定、細胞増殖の亢進などの多くの過程が必要である。固定されたDNA損傷はトランスジェニックモデルで検出可能であり、細胞増殖の亢進はDNA複製の亢進としてRDS法で検出可能である。MeIQはコメットアッセイとトランスジェニックマウス突然変異試験の両者で結腸に強い陽性を示すにも拘わらず(Suzuki et al., 1996 a; Sasaki et al., 1998 a), マウス結腸はMeIQの癌原性標的臓器ではない(Sugimura et al., 1990)。N-nitrosodimethylamineはコメットアッセイ、トランスジェニックマウス突然変異試験、RDS法の3試験で癌原性標的臓器の一つである肺において陽性である(Suzuki et al., 1996 b)。コメットアッセイの陽性は、マウス個体のDNAに「最初の何か」が起こっていることを示唆する。小核試験、トランスジェニックマウス突然変異試験、RDS法など、DNA初期損傷に起因する「その後」を検出する*in vivo*の系の結果と併せて評価することで、より正確な癌原性の予知が可能になる可能性が考えられる。

結語

従来の*in vivo* 遺伝毒性試験は、骨髄小核試験法や肝UDS試験法のように、ある特定の臓器における遺伝毒性を検出するものであった。そのため、化学物質のリスク評価をする場合に、遺伝毒性試験での観察対象臓器と毒性発現の標的臓器との不一致が常に問題とされ、小核試験法については皮膚、肝、消化管など、従来対象としてこなかった臓器を用いた検出系の開発が試みられてきている。コメットアッセイで陽性の臓器は必ずしも発癌の標的臓器とはなり得ないことは事実であるが、変異癌原物質では発癌標的臓器であるにも拘わらずコメットアッセイで陰性となることはまれであった。したがって、ここで述べた多臓器コメットアッセイは、癌原物質の検出系としては感受性の高い試験系であると期待される。

小核試験やトランスジェニックマウス突然変異試験ではDNA損傷が染色体異常または遺伝子突然変異として固定されたものを検出しているのに対し、コメットアッセイはDNA初期損傷を検出するものである。DNA損傷のほとんどは修復されるか、あるいは細胞の死として取り除かれると考えられ、遺伝子突然変異としてトランスジェニックマウスの系で検出されるものはDNA初期損傷の一部分である。臓器特異的な遺伝毒性の有効なリスク評価のために多くの化合物で両試験系の結果の比較が待たれるところである。

謝辞

本研究は岩手大学の津田修治博士、北里大学の上野俊

治博士、斑目広郎博士(現・麻布大学)、東京薬科大学の太田敏博博士、残留農薬研究所の赤沼三恵博士の御協力のもとに、八戸工業高等専門学校物質工学科の平成7~10年度卒業研究生(関橋薰、村上道子、田中真紀子、泉山房子、西館絵美、佐賀彩子、石橋智子、赤坂真紀子、石田久美子、太田茂徳、河村昇理子、佐藤愛、西川夕紀子、藤川敬子)諸氏の努力に支えられて成り立ったものであります。ここに深く感謝いたします。また、コメットアッセイについてお教えいただいた藤沢薬品の宮前陽一氏、非変異癌原物質について多くを御教示いただいた三菱化学会の吉川邦衛博士、宇野芳文博士、文献収集でお世話になった武田薬品工業の山本好一博士、常に激励をいただいた日東電工の浅野哲秀氏、日本グラクソの森田健博士、残留農薬研究所元毒性部長の白須泰彦博士、静岡県立大学の木苗直秀博士に御礼申し上げます。本研究は公益信託土川記念哺乳動物研究助成基金による助成金によるもので同基金に深謝するとともに、マウスにおける遺伝毒性試験の基礎をお教え下さった故土川清先生の御靈前に本稿を捧げます。

参考文献

- Ames, B.N., M.K. Shigenaga and L.S. Gold (1993) DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis, Environ. Health Perspect., 101 (Suppl. 5), 35-44.
- Ashby, J. and R.W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, Mutation Res., 257, 229-306.
- Fairbairn, D.W., P.L. Olive and K.L. O'Neill (1995) The comet assay: a comprehensive review, Mutation Res., 339, 37-59.
- IARC (1986) Butylated hydroxytoluene, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenesis Risk of Chemicals to Man, Vol. 40, IARC, Lyon, (France), p. 161.
- Mavourin, K.H., D.H. Blakey, M.C. Cimino, M.F. Salamone MF and J.A. Heddle (1990) The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency GenTox Program, Mutation Res., 239, 29-80.
- Miyamae, Y., K. Zaizen, K. Ohara, Y. Mine and Y.F. Sasaki (1997a) Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay: 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens, Mutation Res., 393, 99-106.
- Miyamae, Y., K. Iwasaki, N. Kinae, S. Tsuda, M. Murakami, M. Tanaka and Y.F. Sasaki (1997b) Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single cell gel electrophoresis (SCG) assay: 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition, Mutation Res., 393, 107-113.
- Monteith, D.K. and J. Vanstone (1995) Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the induction of DNA damage, Mutation Res., 345,

- Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y.F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay to screen IARC carcinogens (group 1, 2A, and 2B), The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, Mutation Res., 389, 3-12.
- Pathak, D.N. and D. Roy (1993) *In vivo* genotoxicity of sodium o-phenylphenol : phenylbenzoquinone is one of the DNA-binding metabolite(s) of sodium o-phenylphenol, Mutation Res., 286, 309-319.
- Schmezer, P., C. Eckert, and U.M. Liegibel (1994) Tissue-specific induction of mutations by streptozotocin *in vivo*, Mutation Res., 307, 495-499.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice and E.L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. Cell. Res., 175, 184-191.
- Sasaki, Y.F., S. Tsuda, F. Izumiya and E. Nishidate (1997a) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, Mutation Res., 388, 33-44.
- Sasaki, Y.F., F. Izumiya, E. Nishidate, N. Matsusaka, and S. Tsuda (1997b) Detection of genotoxicity of rodent carcinogens targeting the liver by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow), Mutation Res., 391, 201-214.
- Sasaki, Y.F., F. Izumiya, E. Nishidate, N. Matsusaka, and S. Tsuda (1997c) Simple detection of genotoxicity of chemical mutagens by alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow), Mutation Res., 391, 215-230.
- Sasaki, Y.F., F. Izumiya, E. Nishidate, T. Ohta, T. Ono, N. Matsusaka and S. Tsuda (1997d) Simple detection of *in vivo* genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the alkaline single cell gel elecrophoresis assay, Mutation Res., 392, 251-259.
- Sasaki, Y.F., F. Izumiya, E. Nishidate, M. Watanabe-Akanuma, N. Kinae, N. Matsusaka and S. Tsuda (1997e) Detection of *in vivo* genotoxicity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2-[5H]-furanone (MX) by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs, Mutation Res., 393, 47-53.
- Sasaki, Y.F., A. Saga, M. Akasaka, E. Nishidate, M. Watanabe-Akanuma, T. Ohta, N. Matsusaka and Shuji Tsuda (1997f) *In vivo* genotoxicity of heterocyclic amines detected by alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs, Mutation Res., 395, 57-73.
- Sasaki, Y.F., A. Saga, M. Akasaka, K. Yosida, E. Nishidate, Y.Q. Su, N. Matsusaka and S. Tsuda (1997g) *In vivo* genotoxicity of ortho-phenylphenol, biphenyl and thiabendazole detected by alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs, Mutation Res., 395, 189-198.
- Sasaki, Y.F., E. Nishidate, Y.Q. Su, N. Matsusaka, S. Tsuda,

- N. Susa, Y. Furukawa and S. Ueno (1998a) Organ-specific genotoxicity of the potent rodent bladder carcinogens o-anisidine and p-cresidine, Mutation Res., 412, 155-60.
- Sasaki, Y.F., A. Saga, K. Yosida, Y.Q. Su, T. Ohta, N. Matsusaka and S. Tsuda (1998b) Colon-specific genotoxicity of heterocyclic amines detected by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay of multiple mouse organs, Mutation Res., 414, 9-14.
- Sasaki, Y.F., A. Saga, M. Akasaka, S. Ishibashi, K. Yosida, Y.Q. Su, N. Matsusaka and S. Tsuda (1998c) Organ-specific genotoxicity of the potent rodent colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and three hydrazine derivatives: Difference between intraperitoneal and oral gavage, Mutation Res., 415, 1-12.
- Sasaki Y.F., A. Saga, M. Akasaka, S. Ishibashi, K. Yoshida, Y.Q. Su, N. Matsusaka and S. Tsuda (1998d) Detection of *in vivo* genotoxicity of haloalkanes and haloalkenes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs, Mutation Res., 419, 13-20.
- Sasaki, Y.F., K. Fujikawa, K. Ishida, N. Kawamura, Y. Nishikawa, S. Ohta, M. Satoh, H. Madarame, S. Ueno, N. Susa, N. Matsusaka and S. Tsuda (1999) The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: Results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP, Mutation Res., 440, 1-18.
- Sugimura, T., S. Takayama, H. Ohgaki, K. Wakabayashi and M. Nagao (1990) Mutagens and carcinogens formed by cooking meat and fish: heterocyclic amines, in: P.A. Finot, H.U. Aeschbacher, R.F. Hurrell and R. Liardon (Eds.), *The Maillard Nutrition and Physiology*, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 323-334.
- Suzuki T., M. Hayashi, M. Ochiai, K. Wakabayashi, T. Ushijima, T. Sugimura, M. Nagao and T. Sofuni (1996a) Organ variation in the mutagenicity of MeIQ in Big Blue lacI transgenic mice, Mutation Res., 369, 45-49.
- Suzuki, T., T. Itoh T., M. Hayashi, Y. Nishikawa, S. Ikezaki, F. Furukawa, M. and T. Sofuni (1996b) Organ variation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue mice, Environ. Mol. Mutagen., 28, 348-53.
- Tennant, R.W. and E. Zeiger (1993) Genetic toxicology: current status of methods of carcinogen identification, Environ. Health Perspect., 100, 307-315.
- Tsuda, S., Y. Kosaka, N. Matsusaka and Y.F. Sasaki (1998a) Detection of pyrimethamine-induced DNA damage in mouse embryo and maternal organs by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay, Mutation Res., 415, 69-77.
- Tsuda S., Y. Kosaka, M. Murakami, H. Matsuo, N. Matsusaka, K. Taniguchi and Y.F. Sasaki (1998b) Detection of nivalenol genotoxicity in cultured cells and multiple mouse organs by the alkaline single-cell gel electrophoresis assay, Mutation Res., 1998 415, 191-200.
- Vijayalaxmi, R.R. Tice and G.H.S. Strauss (1992) Assessment of radiation-induced DNA damage in human lymphocytes using single cell gel electrophoresis technique, Mutation Res., 271, 243-252.

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「環境汚染変異原」(企画:平山晃久)で発表された(座長:平山晃久, 若林敬二)。

大気環境中におけるニトロアレーンの生成とその変異原性

久松 由東

国立公衆衛生院 〒108-8638 東京都港区白金台4-6-1

Formation of nitroarene in the atmosphere and its mutagenicity

Yoshiharu Hisamatsu

National Institute of Public Health
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8638

Summary

Combustion-generated particles are released into urban atmosphere containing gaseous pollutants such as NO_2 , SO_2 , HNO_3 , etc., and concurrently exposed to sunlight. In regard to nitroarene formation by reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with NO_2 , significant progress has been made in laboratory studies of the reaction rate, the products of the reaction of NO_2 with PAHs deposited on particles and their mutagenicity, and the effects of light in a simulated polluted atmosphere. These studies were briefly reviewed.

(This paper, in a session chaired by Teruhisa Hirayama and Keiji Wakabayashi, was presented to the symposium "Mutagenicity of environmental pollutants", organized by Teruhisa Hirayama, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Melparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbon, aromatic ketone, nitroarene, nitrogen dioxide

緒 言

大気浮遊粒子に存在する発がん物質である多環芳香族炭化水素は化石燃料、木材、プラスチック類などほとんどの有機物の燃焼過程で生成し、野焼きの煤煙や魚など食品の焼け焦げにも含まれている。大気環境から多環芳香族炭化水素が検出されたのは1952年にロンドンの大気からであり、それ以来分析が進められ世界主要都市の大気等あらゆる場所の大気に含まれている事が明らかにされてきた。多環芳香族炭化水素は低蒸気圧のものが多く、種々の発生源内部で、または発生源から高温のガス状で排出された後、共存する浮遊粒子上に凝縮する。こ

のような過程を経て多環芳香族炭化水素は粒子に付着し、大気中に拡散していくと考えられている。多環芳香族炭化水素については、癌研究の初期から発癌や代謝機構などに取り組まれているばかりでなく、分析方法、環境存在量、動態や反応性などについても研究が行われてきた。これらの研究から、多環芳香族炭化水素に関する多くの知見が得られており、それらの中で大気科学的に重要なことの一つは、大気中に排出され、気相および浮遊粒子に含まれる多環芳香族炭化水素が窒素酸化物と反応し、変異(癌)原物質を含む二次生成物質を生成することである。

1978年にカリフォルニア大学の Pitts らは benzo [a] pyrene や perylene を塗布したフィルターに痕跡量の HNO_3 を含む 1 ppm または 0.25 ppm の NO_2 を暴露させた反応生成物はサルモネラ菌株 TA 98(-S 9 mix) に対し強い変異原性を示し、ニトロ基を有する

nitrobenzo(a)pyrene 等が生成することを見出した(Pitts et al, 1978)。この生成したニトロ化合物は変異原性が強く、大気反応により生成することが示唆された。それ以来、環境変異原物質としてニトロ化合物に対する関心が高まり、環境試料に対する芳香族ニトロ化合物(ニトロアレン)の研究が活発に進められている。

大気環境中におけるニトロアレンの生成

初期の研究では、ガラス纖維製フィルターに塗布したbenzo [a] pyrene に痕跡量の HNO_3 と 0.25 ppm の NO_2 を含む空気を 8 時間暴露させると、約 20 % の benzo [a] pyrene が 6-nitrobenzo [a] pyrene と少量の 1-nitrobenzo [a] pyrene および 3-nitrobenzo [a] pyrene に変換した。この反応では究極変異原物質である benzo [a] pyrene が、究極変異原物質である 6-nitrobenzo [a] pyrene と直接変異原物質である 1-nitrobenzo [a] pyrene および 3-nitrobenzo [a] pyrene に変換したことになる。Pyrene と 1 ppm の NO_2 の 24 時間の暗反応では、痕跡量の硝酸が存在するとニトロ化反応の収率が 0.02 % から 2.85 % に増加した。同様に大気汚染物質である二酸化硫黄が共存すると、ニトロ化反応が促進されることが認められた。しかし、ガス状 HNO_3 が共存したときほどではなく、このガス状 HNO_3 や SO_2 がどのように作用するのか、明らかにされていない。

このような実験室レベルでのニトロ化反応が大気浮遊粒子の移流、拡散中に実際の大気環境中で起きるか、否かについても検討された。たとえば、米国大陸の Delaware から大西洋、Bermuda 島への大気浮遊粒子の流跡線解析と Bermuda 島内の局所発生源の影響の有無や、微小粒子中に共存する元素状炭素、Pb や Se を燃焼による排出の指標物質(トレーサー)と仮定して、トレーサーに対する多環芳香族炭化水素と芳香族ニトロ化合物の比を比べることにより移流、拡散等以外による濃度変化、すなわち移流中の反応による生成を解析するために芳香族基質誘導体の濃度変化を調べた。その結果、1-nitropyrene と hydroxypyrene の比は他の物質の比よりも高く、これは明らかに移流中の二次生成によるものとした(Gibson et al, 1986)。

一方、ディーゼルエンジン排出粒子や都市郊外で捕集した大気浮遊粒子の dichloromethane 抽出物から分取型高速液体クロマトグラフィーで芳香族ニトロ化合物を分離、分取し、キャピラリーカラムを用いて GC/MS で分析し、多くの芳香族ニトロ化合物が検出された。ディーゼルエンジン排出粒子から検出され、比較的多く含まれる nitrofluorene、nitrofluoranthene および nitropyrene について Table 1 に示す。また、大気浮遊粒子抽出物からも nitronaphthalene、nitrobiphenyl、nitrofluorene、nitropyrene や nitrofluoranthene など数種の芳香族ニトロ化合物が検

Table 1 Some nitroarenes identified in vehicle exhaust^a

2-nitrofluorene	1,8-Dinitropyrene
2,5-Dinitrofluorene	1-Nitrofluoranthene
2,7-Dinitrofluorene	3-Nitrofluoranthene
1-Nitropyrene	7-Nitrofluoranthene
1,3-Dinitropyrene	8-Nitrofluoranthene
1,6-Dinitropyrene	

^a : IARC monographs, 46, 43(1989), より一部抜粋

出されている。Nitrofluorene、nitropyrene および nitrofluoranthene の変異原性については、Table 2 に示すように、変異原性の強いものが多く、特にジニトロ体は強い。そこでニトロ化合物の生成反応について詳細な検討が加えられている。例えは、都市郊外で経時に捕集した大気浮遊粒子の dichloromethane 抽出物から検出された 1-および 2-nitropyrene と 2-および 3-nitrofluoranthene について Table 3 に示す。Table 3 からわかるように、1-nitropyrene と 2-nitrofluoranthene は日中および夜間に捕集された大気浮遊粒子に含まれているのに対し、2-nitropyrene は日中に捕集された粒子のみから検出されている(Pitts et al, 1985)。一方、Table 1 に示すように、2-nitropyrene と 2-nitrofluoranthene はディーゼルエンジン等自動車排出粒子抽出物から検出されていない、他の燃焼由来の排出粒子抽出物からも検出されていない。また、前記したように HNO_3 を含む NO_2 と pyrene や fluoranthene との暗反応でも検出されなかった。

そこで、大気中での速いニトロ化反応が推測されたため、OH ラジカル種と NO_2 の共存下(存在する化学種は OH, NO, NO_2 , HNO_3 , HONO である)、pyrene および fluoranthene との気相光反応を検討した結果、pyrene との反応では 2-nitropyrene と極微量の 1-nitropyrene が生成し、fluoranthene との反応では 2-nitrofluoranthene と少量の 7-および 8-nitrofluoranthene が生成した。これらの実験結果から、次のような反応機構(Fig. 1)が提案された(Pitts et al, 1985, Arey et al, 1986)。

すなわち、気相において、pyrene や fluoranthene に OH ラジカルが攻撃し、この反応は速いものと考えられ、ついで NO_2 の付加反応による 2-ニトロ誘導体が生成し、浮遊粒子表面に凝縮する。この pyrene や fluoranthene の OH 体に対する NO_2 の付加反応は、大気中の O_2 や NO_2 濃度に依存した競争反応である。

テフロンチャンバーを用いた実験では、上記の OH ラジカルによる開始反応で、2-, 7-および 8-nitrofluoranthene が 3 %, 1 %, 0.3 % の収率で、また 2-nitropyrene が 0.5 % の収率で生成した。

一方、木材の燃焼煙に NO_2 、 O_3 や $(\text{NO}_2 + \text{O}_3)$ 混合物を添加し暗反応を行うと、その反応生成物の変異原性は $(\text{NO}_2 + \text{O}_3)$ 混合物を添加した系において直接変異原性

Table 2 Mutagenicity of nitroarene for *Salmonella typhimurium* strain TA98, TA100, YG1021 and YG1024

Nitroarenes	Revertant/nmol (-S9mix)			
	TA98	TA100	YG1021	YG1024
2-Nitrofluorene	39	12	2,045	3,181
2,7-Dinitrofluorene	2,282	64		
1-Nitropyrene	74	124		
2-Nitrofluoranthene	930	781		
3-Nitrofluoranthene	4,668	2,156	4,670	57,000
7-Nitrofluoranthene	544	989		
8-Nitrofluoranthene	16,381	1,501		
3,4-Dinitrofluoranthene	4,117	3,270	8,200	52,000
3,7-Dinitrofluoranthene	123,224	24,820	157,000	6,600,000
3,9-Dinitrofluoranthene	103,660	20,790	104,000	1,190,000
1-Nitropyrene	467	119	470	2,870
2-Nitropyrene	2,225	742		
1,3-Dinitropyrene	85,850	30,048	22,700	1,190,000
1,6-Dinitropyrene	126,000	12,159	116,000	4,120,000
1,8-Dinitropyrene	257,000	55,420	131,000	4,780,000
3-Nitrobenzanthrone	208,000	29,700	129,000	6,290,000
9-Nitrobenzanthrone	84,000	3,270	26,100	490,000
11-Nitrobenzanthrone	6	6	10	46
3,9-Dinitrobenzanthrone	46,000	4,300	25,100	223,000
3,11-Dinitrobenzanthrone	3,000	360	3,110	12,200

Table 3 Concentration of nitro-PAH in ambient POM*

Collection time (h)	Recovery of 1- NO_2 -PY- d_9 (%)	Concentration (ng m ⁻³)		
		1- NO_2 -PY	2- NO_2 -PY	2- NO_2 -FL [†]
9/18/84 1200-1800	94	0.02	0.003	0.07
9/18/84 1800-2400	85	0.03	— [‡]	0.2
9/19/84 0000-0600	98	0.008	0.01	0.3
9/19/84 0600-1200	77	0.03	0.02	0.2

*TX40HI20WW, T60A20, and Quartz CH_2Cl_2 filter extracts combined

[†]Using response factor measured for 3- NO_2 -FL

[‡]None detected

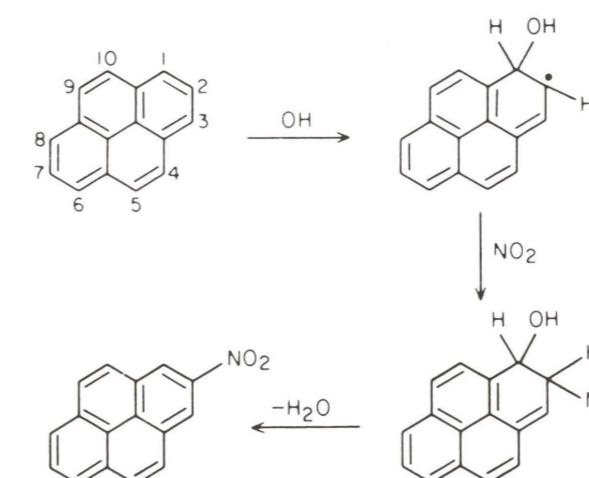
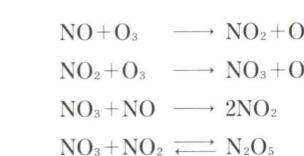


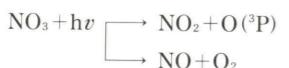
Fig. 1 Reaction mechanism of 2-nitropyrene

が最も高く、特に極性フラクションにおいて高い。このように直接変異原性が高くなっていることは、煙中に存在している pyrene, fluoranthene や他の多環芳香族炭化水素と N_2O_5 の反応によりニトロ誘導体が生成したためと報告している(Kamens et al, 1984)。

多環芳香族炭化水素と NO_2 の暗反応では反応が非常に遅く、また反応性も低い。そこで、下記に示すように、夜間に NO_2 と O_3 の反応によって生成する NO_3 ラジカルや N_2O_5 との反応について検討された。



NO_3 ラジカルは次のように光分解反応が速いので、日中の濃度は低い。



この $\text{N}_2\text{O}_5\text{-NO}_3\text{-NO}_2$ 系における fluoranthene の気相反応では 2-nitrofluoranthene が生成し、フィルター上に塗布した fluoranthene との気一固相不均一反応では 1-, 3-, 7- および 8-nitrofluoranthene が生成した。同様に pyrene との反応では 1-nitropyrene と少量の 4-nitropyrene が生成することが報告されている (Zielinska et al., 1986)。このチャンバー実験では 2-nitrofluoranthene が 24 % の高収率で生成している。この系における反応機構については NO_3 付加体を経る過程が提案されているが、十分な検討がなされていない。

このように大気浮遊粒子の有機溶媒抽出物がサルモネラ菌株 TA 98 (-S 9 mix) に対して高い変異原性を示すのは、多環芳香族炭化水素によるのではなく、多種類の強変異原性を示す物質を多く含むニトロアレーンによることが認められる。また、大気浮遊粒子に含まれるニトロアレーンは化石燃料等の種々の燃焼過程に伴って(一次)生成されるものと、大気中における二次生成物によるものであることがわかる。

一方、著者らは pyrene, fluoranthene や carbazole など数種の多環芳香族炭化水素類と NO_2 の反応について種々の条件下で検討してきた (Hisamatsu et al., 1986)。それらの中で、大気浮遊粒子の dichloromethane 等の有機溶媒抽出物を分取型 HPLC で分離、分取した画分の変異原性は極性のより強い物質を含有する画分の変異原性も高いことから、芳香族ケトン類の中で大気浮遊粒子に多く含まれる数種について NO_2 との光反応および $\text{N}_2\text{O}_5\text{-NO}_3\text{-NO}_2$ 系の暗反応について検討した。その結果、benzanthrone (7 H-benz [d,e] anthracene-7-one) と NO_2 の光反応および $\text{N}_2\text{O}_5\text{-NO}_3\text{-NO}_2$ 系の暗反応の反応生成物の変異原性は著しく強く、主生成物は 3-nitrobenzanthrone (3-nitro-7 H-benz [d,e] anthracene-7-one) であることを見出した (Enya et al., 1997)。合成した数種の nitrobenzanthrone の変異原性を Table 2 に示す。3-nitrobenzanthrone の変異原性は Table 2 に示すように、今までに報告されている変異原物質の中で 1,8-dinitropyrene と同様に著しく強く、モノニトロ体では最も強い。また 9-nitrobenzanthrone および 3,9-dinitrobenzanthrone もともに強い。Benzanthrone と NO_2 の光反応および $\text{N}_2\text{O}_5\text{-NO}_3\text{-NO}_2$ 系との暗反応の反応生成物の変異原性は暗反応生成物の変異原性の方が約 15 倍高い。光反応では Fig. 2 に示すように、2- および 3-nitrobenzanthrone が生成するのに対し暗反応では 3-nitrobenzanthrone のみ生成する。また光反応では SO_2 を添加すると、2- および 3-nitrobenzanthrone の生成が促進され、特に 2-nitrobenzanthrone の生成反応に大きく関与していることが認められる (Fig. 2)。本院屋上で捕集した大気浮遊粒子に含まれる 3-nitrobenzanthrone

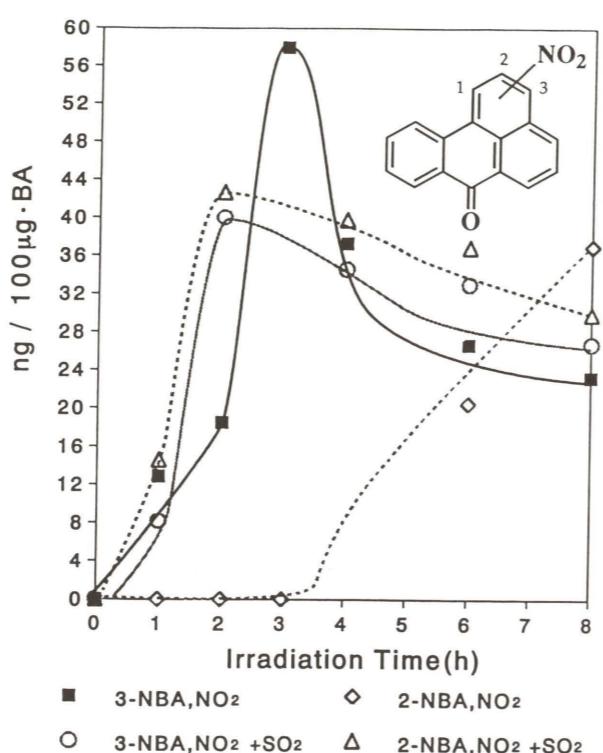


Fig. 2 Formation of 2- and 3-nitrobenzanthrone by photo-reaction of benzanthrone with nitrogen dioxide in the presence of sulfur dioxide
nitrobenzanthrone : NBA, benzanthrone : BA

の量は夜間に捕集した粒子の方が昼間の粒子より多いこと等を含め、大気浮遊粒子に存在する nitrobenzanthrone は前述した nitropyrene や nitrofluoranthene と同様に、化石燃料の燃焼過程で(一次)生成したものと、大気環境で(二次)生成したものによるものと考えられる。

さらに、大気浮遊粒子上での芳香族基質と窒素酸化物との反応には粒子に含まれる種々の金属酸化物が反応生成物の異性体分布に影響することは十分考慮しなければならない。また、金属酸化物粒子に塗布した fluoranthene と NO_2 の気一固相不均一光反応では 2-nitrofluoranthene が生成することや、ニトロ体の生成量、異性体分布および fluoranthene の減少速度が金属酸化物粒子の種類に大きく依存することが見出されている (Inazu et al., 1997)。

参考文献

- Arey, J., B. Zielinska, R. Atkinson, A.M. Winer, T. Ramdahl and J.N. Pitts, Jr. (1986) The formation of nitro-PAH from the gas-phase reactions of fluoranthene and pyrene with the OH radical in the presence of NO_x, Atmospheric Environment, 20, 2339-2346.
Enya, T., H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama and Y. Hisamatsu (1997) 3-nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen founded in

diesel exhaust and airborne particulates, Environ. Sci. Technol., 31, 2772-2776.

Gibson, T. L., P.E.K. Korsog and G.T. Wolff (1986) Evidence for the transformation of polycyclic organic matter in the atmosphere. Atmospheric Environment, 20(8), 1575-1578.

Hisamatsu, Y., T. Nishimura, K. Tanabe and Matsushita H. (1986) Mutagenicity of the photochemical reaction products of pyrene with nitrogen dioxide. Mutation Research, 172, 19-27.

Inazu, K., T. Kobayashi and Y. Hisamatsu (1997) Formation of 2-nitrofluoranthene in gas-solid heterogeneous photoreaction of fluoranthene supported on oxide particles in the presence of nitrogen dioxide, Chemosphere, 35, 607-622.

Kamens, R. M., G.D. Rives, J.M. Perry, D.A. Bell and L.D. Claxton (1984) Mutagenic changes in dilute wood smoke as it ages and reacts with ozone and nitrogen dioxide : an

outdoor chamber study, Environ. Sci. Technol., 18(7), 523-530.

Pitts., J. N., K.A.V. Cauwenbergh, D. Grosjean, J.P. Schmid, D.R. Fitz, W.L. Belser Jr., G.B. Knudson and P.M. Hynds (1978) Atmospheric reaction of polycyclic aromatic hydrocarbon : facile formation of mutagenic nitro derivatives, Science, 202, 515-519.

Pitts, Jr., J. N., J.A. Sweetman, Barbara Zielinska and Roger Atkinson (1985) Determination of 2-nitrofluoranthene and 2-nitropyrene in ambient particulate organic matter : Evidence for atmospheric reactions, Atmospheric Environment, 19(10), 1601-1608.

Zielinska, B., J. Arey, R. Atkinson, T. Ramdahl, A.M. Winer and J.N. Pitts, Jr. (1986) Reaction of dinitrogen pentoxide with fluoranthene, J. Am. Chem. Soc., 108, 4126-4132.

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「環境汚染変異原」(企画:平山晃久)で発表された(座長:平山晃久、若林敬二)。

発癌性/変異原性NPAHsの高感度検出法と大気内動態

早川 和一

金沢大学薬学部 〒920-0934 石川県金沢市宝町13-1

Carcinogenic/mutagenic nitroarenes: A sensitive determination method and atmospheric behaviors

Kazuichi Hayakawa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-0934, Japan

Summary

A sensitive determination method of carcinogenic/mutagenic nitroarenes using a high-performance liquid chromatograph (HPLC) equipped with a chemiluminescence detector (nitroarene analyzer) has been developed. After chemical reduction of nitroarenes to their corresponding aminoarenes by sodium hydrosulfide, this analyzer determined nitroarenes. The sensitivity was higher than that of HPLC with a fluorescence detector and GC/MS by a factor of about one hundred. By using this method, concentrations of nitroarenes in airborne and diesel exhaust particulates could be determined. Concentrations of 1,3-, 1,6- and 1,8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene in urban air showed two peaks, in the morning and evening, in parallel with traffic volume. The comparison of the four nitroarenes in diesel- and gasoline-engine and airborne particulates suggested that the main contributor was diesel-engine vehicles. When airborne particulates were collected with an Andersen air sampler, more than 2/3 of the total amount of the four nitroarenes was observed in the finest particulate fraction (smaller than 1.1 μm). When benzene-ethanol extract from diesel exhaust particulates was separated into five fractions by silica-gel column chromatography, direct-acting mutagenicity was mainly observed in two fractions eluted with dichloromethane and ethanol, respectively, and nitroarenes were mainly in the former fraction. In this fraction, calculated mutagenic contributions of the nitroarenes, 1,3-, 1,6- and 1,8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene, were over 50%.

(This paper, in a session chaired by Teruhisa Hirayama and Keiji Wakabayashi, was presented to the symposium "Mutagenicity of environmental pollutants", organized by Teruhisa Hirayama, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords: nitroarene, HPLC, chemiluminescence detection, airborne particulate, diesel-exhaust particulate, mutagenicity

緒 言

受付: 1999年3月18日
受理: 1999年4月8日
©日本環境変異原学会

都市域で肺癌が増加している。このため、肺癌の原因として、喫煙に加えて大気質の悪化との関連も指摘されている。大気中に存在する発癌性/変異原性物質としては、以前からベンゾ[a]ピレン(BaP)などの多環芳香族

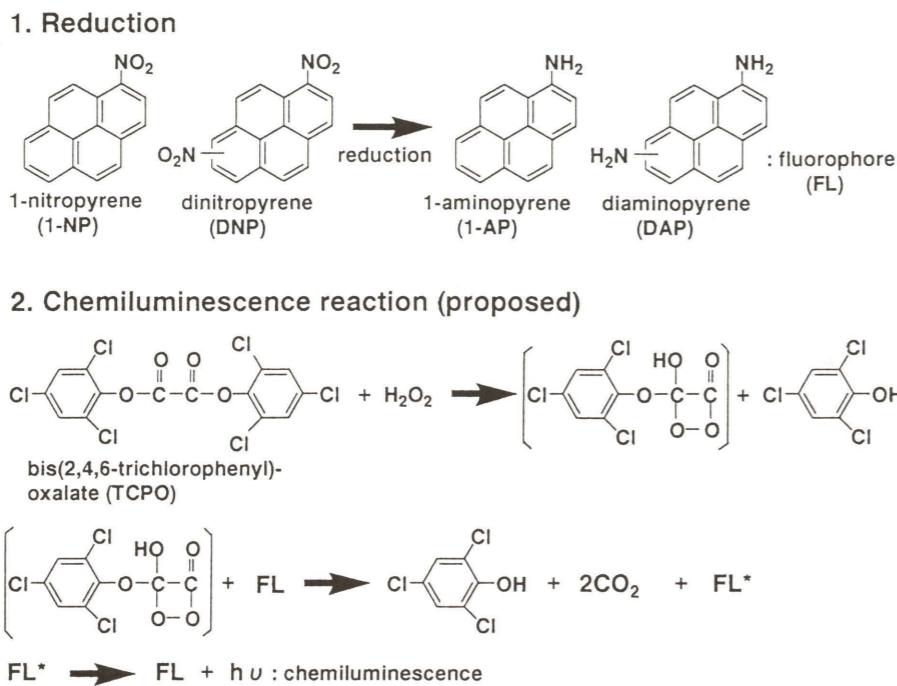


Fig. 1 Reduction and chemiluminescence reaction mechanisms of nitroarene

炭化水素(PAHs)が知られているが、さらにニトロ多環芳香族炭化水素(ニトロアレン、NPAHs)の存在も明らかにされた(Rosenkranz and Mermelstein, 1983; 常盤 1992)。NPAHsの中でも、特に1,3-ジニトロビレン(1,3-DNP), 1,6-DNP, 1,8-DNPや1-ニトロビレン(1-NP)などは、*S. typhimurium* TA 98株やYG 1024株を用いたAmes試験で強い直接変異原性を示す。これまでに報告されているNPAHsの分析法の中では、GC/MSと蛍光検出HPLCが最も高感度であり(Xu et al., 1981; 田辺ら, 1986)、環境試料への適用例も報告されている。しかし、上述のDNP類や1-NPの大気中濃度はBaPに比較するとはるかに低く、NPAHsの大気内挙動を詳細に追跡するためには、いずれの方法も感度不足であった。

NPAHsのニトロ基を還元すると対応するアミノアレン(APAHs)を生成し、さらにAPAHsは過シュウ酸エステル化学発光検出法に高い感受性を有する(Fig. 1)。最近著者らは、これを高速液体クロマトグラフ(HPLC)の検出に導入しNPAHsの高感度分析法を開発した。ついで、本法を都市大気粉じんに応用した結果、種々のNPAHsについて発生源や大気内挙動、変異原性への寄与などが次第に明らかになってきた。

1. NPAH分析法

上述のようにNPAHsは還元するとAPAHsに変換され、その蛍光特性はHPLCの検出に利用してきた。一方、蛍光物質の超高感度分析法として、過シュウ酸エステル化学発光検出HPLC法が開発され(Kobayashi

and Imai, 1980), カテコールアミンや種々の医薬品などの分析に応用された。この方法を用いると、APAHsは蛍光検出法より高感度化が可能である(Sigvardsson et al., 1984)。そこで著者らは、APAHsの分離が良好なODSカラム(分析カラム)の直後に、比較的安定で安価なビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレートと過酸化水素を導入して化学発光を検出するHPLCシステムを試作した。

後述するように、NPAHsからAPAHsへの還元にはいくつかの方法が知られている。このうち、すでに蛍光検出HPLC法の前処理としてNPAHsに水硫化ナトリウムを加える方法が報告されており(田辺ら, 1986)、著者らも同法を利用することとした。ついで、粉じんからNPAHsを抽出・精製する方法を検討した結果、ベンゼン/エタノールを加えて超音波を施すことにより短時間で効率よく抽出され、これを水酸化ナトリウム水溶液、硫酸水溶液、水で順次洗浄することにより精製されたことがわかった。そこで、粉じんのベンゼン/エタノール抽出液を減圧乾固後メタノールに再溶解し、これに水硫化ナトリウム溶液を加えて還流還元し、その反応液の一部をHPLCシステムに注入したが、1,3-, 1,6-, 1,8-ジアミノビレンや1-アミノビレンのピークは検出されないかきわめて小さく、NPAHsの検出感度は期待値よりもるかに悪かった。その原因を検索したところ、まずAPAHsは光に対してきわめて不安定で、蛍光灯を使用した実験室の操作でもすみやかに化学変化をきたした。さらに金属に対しても不安定で、HPLCシステムの接液部の金属やガラス器具の材質中に含まれる金属によ

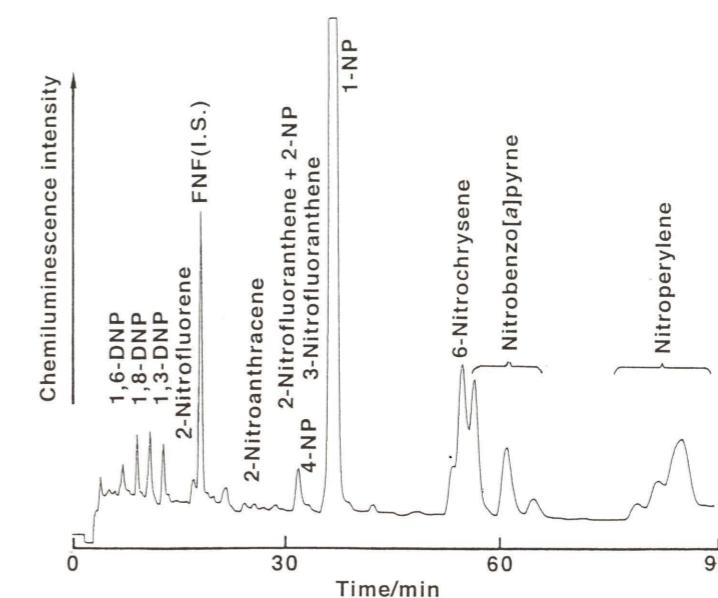


Fig. 2 Typical chromatogram of 1,3-, 1,6-, 1,8-DNPs and 1-NP in airborne particulates

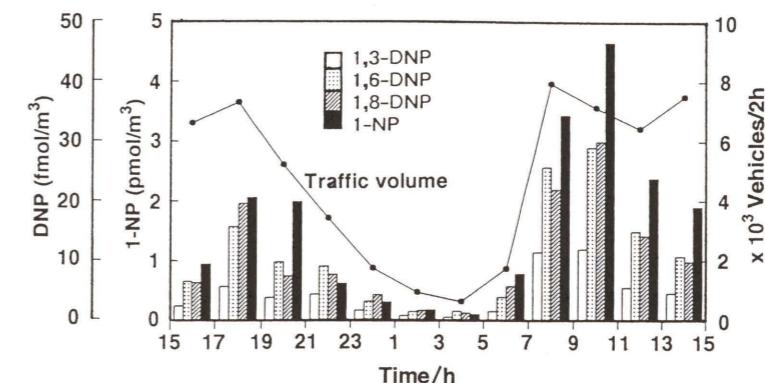


Fig. 3 Diurnal variations of 1,3-, 1,6-, 1,8-DNPs and 1-NP in urban air

っても容易に化学変化することがわかった。そこで、すべての装置や器具をアルミ箔で覆い、かつ実験室の蛍光灯を黄色灯に切り替えて前処理操作を行い、さらに還元処理後の試料溶液に安定化剤としてアスコルビン酸を添加した結果、上記APAHsのピーク強度は著しく増強した。いずれの検出下限もサブfmolレベルに達し、従来の蛍光検出HPLCやGC/MSより約2桁高感度になった(Hayakawa et al., 1991, 1992)。

上述の方法を用いると、わずか数ミリグラムの市街地大気粉じんからこれら4化合物の検出クロマトグラムを得ることができ、いずれも2-フルオロ-7-ニトロフルオレンを内標準物質として定量可能になった(Hayakawa et al., 1995a)。さらに、クロマトグラム上には、これら以外にもNPAHsと推定される多くのピークが出現しており、これまでに2-ニトロフルオランテンや2-ニトロビレン、4-ニトロビレン、6-ニトロクリセン、6-ニトロベンzo[*a*]ゾビレン、3-ニトロペリレンなどを同定した(Fig. 2)。

また、NPAHsは電気化学的、あるいは亜鉛やカドミウム、白金/ロジウムなどの金属を充填した長さ1cm程度のミニカラムでも定量的な還元が可能である。これらの導入により、水硫化ナトリウムによる還元操作を省略することができた(Imaizumi et al., 1990; Hayakawa et al., 1993)。

ところで、上述のベンゼン/エタノールを用いたNPAHs抽出法では、粉じんからBaPなどのPAHsも一緒に抽出される。PAHsはAPAHsよりODSカラムに対する保持が強いので、この違いを利用して両者を同時分析するシステムの構築を企てた。すなわち、PAHs分析用の蛍光検出HPLCシステムをミニODSカラムと高圧流路切り替えバルブを介して、上述したAPAHs分析用のHPLCシステムに接続すると、両者の同時分析が可能になった(村橋ら, 1994)。

2. 大気内動態と発生源

一般に大気粉じんは、ハイボリュームエーサンプラー

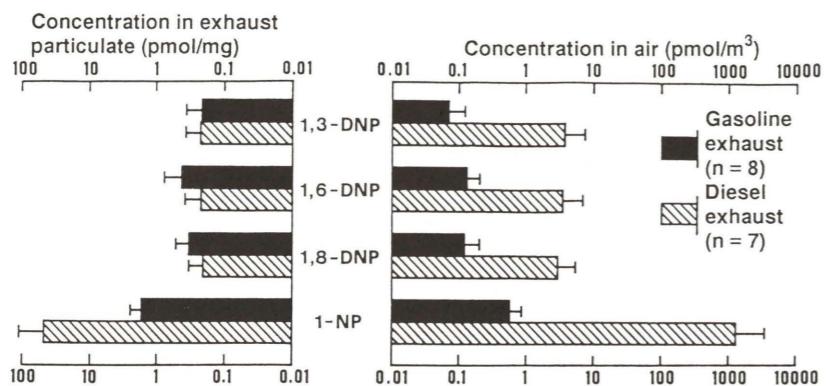


Fig. 4 A comparison of gasoline and diesel engine exhausts

ーを用いて大気を $0.5\text{--}1.5\text{ m}^3\text{min}^{-1}$ の速度で吸引することにより、石英製などのフィルター上に捕集される。Fig. 3 には、金沢市の市街地幹線道路脇にハイポリュームエアーサンプラーを設置し、2 h ごとにフィルターを交換しながら連続捕集した大気粉じんに本法を適用してNPAHs を分析した例を示した。1,3-, 1,6-, 1,8-DNP および 1-NP の大気中濃度には、いずれも朝から晩に高く深夜に低い日内変動が観察された。これらの濃度推移が、交通量と強く相関したことから、DNP 類や 1-NP の主要排出源が自動車であることが明らかになった(Hayakawa et al., 1995 a)。

次に、ディーゼル車とガソリン車の排ガス粉じん中のNPAHs を分析すると、両者のDNP 類の濃度には大差ないが、1-NP の濃度はディーゼル車排ガス粉じん中の方が著しく高かった。ディーゼル車はガソリン車に比較して粉じんの排出量がきわめて多いので、これを掛け合わせると、排気中ではいずれの化合物の濃度もディーゼル車の方が 1 衍から 3 衍以上高い (Fig. 4) (Hayakawa et al., 1994)。この組成の違いに基づいて上記地点における大気中のNPAHs 類の発生源を推定すると、自動車以外の発生源がないと仮定した場合、1,3-, 1,6-, 1,8-DNP の 80-90 %, 1-NP の 99 %以上はディーゼル車と試算され、NPAHs の都市大気汚染におけるディーゼル車の寄与はきわめて大きいことが明らかになった(Murahashi et al., 1995)。

また、2-ニトロフルオランテンや2-ニトロビレンが大気粉じんから検出されるがディーゼル粉じんからは検出されないことから、これらの大気中二次生成が示唆された(Murahashi and Hayakawa, 1997)。

3. 変異原性への寄与

微細粉じんほど肺への沈積率が高くなることから、変異原物質が存在する粉じんの大きさは肺癌との関連で重要である。著者らは、アンダーセンハイポリュームエアーサンプラーで大気粉じんを粒径別に 5 分画に分けて捕集し、本法と Ames 試験法を適用した。その結果、粉じ

んは最も細かな粒子($1.1\text{ }\mu\text{m}$ 以下)分画と最も大きな粒子($7\text{ }\mu\text{m}$ 以上)分画とに大きく 2 極分布したが、DNP 類、1-NP および直接変異原性はいずれも 2/3 以上が前者に集中していた(Hayakawa et al., 1995 b)。ディーゼル車排ガス粉じんは、主に $1.1\text{ }\mu\text{m}$ 以下の微細粒子であることを考え合わせると、これらの結果は、ディーゼル車から排出されたNPAHs は大気中で生体に影響を及ぼしやすい存在様態にあることを示している。

さらに著者らは、ディーゼル粉じん抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒: n-ヘキサン, n-ヘキサン/ジクロロメタン, ジクロロメタン, メタノール)を用いて分画し、それぞれについてNPAHs の定量と Ames 試験を行った (Fig. 5)。その結果、YG 1024 株を用いた場合の直接変異原性はジクロロメタン分画に 60 % あまり、メタノール分画に約 35 % と、ほとんどがこの 2 分画に存在していた。このうちジクロロメタン分画については、直接変異原性の 50 % 以上を 1,3-, 1,6-, 1,8-DNP と 1-NP の 4 化合物のみで占めることが明らかになった (Hayakawa et al., 1997)。これらのNPAHs 以外にも、最近強い直接変異原性を示す3-ニトロアントロンが大気中に存在することが報告された(Enya et al., 1997)。今後、NPAHs の同定・定量が進むにつれ、いぜん明らかになっていない他の分画に含まれる大気変異原性の本体が解明されるはずである。

結 語

以上の事実は、従来から研究してきた BaP などの多環芳香族炭化水素に加えて、NPAHs についても、大気環境の広域かつ詳細な実態調査と排出源対策が必要なことを示している。さらに、最近著者らは、いくつかの PAHs の水酸化体が環境ホルモンと同じ作用を有することを見出したが(早川ら, 1998)，そのヒト暴露量は少なくないと推定される。NPAHs と PAHs の生成や分解、大気内挙動は密接に関連しており、環境ホルモン作用発現の観点から、両者の新たな研究が必要と考えられる。

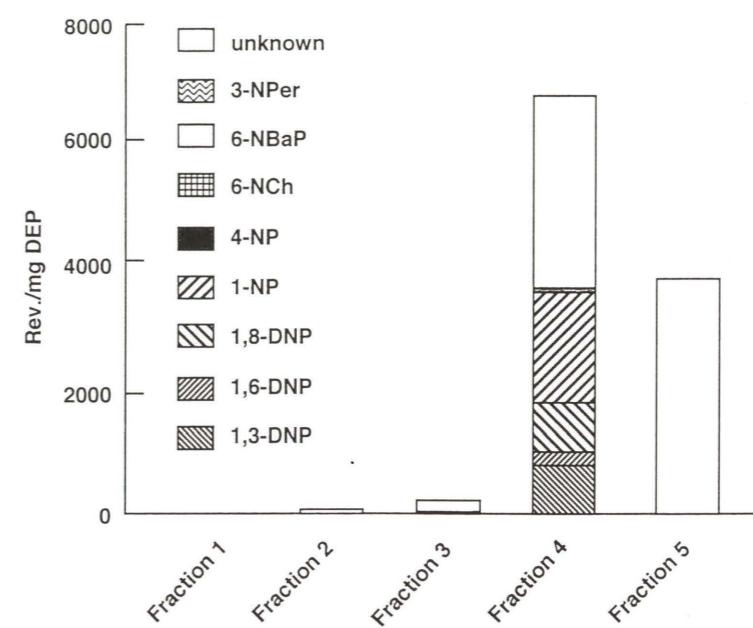


Fig. 5 Calculated contributions of NPAHs to the direct-acting mutagenicities in fractions of diesel-exhaust particulate extract obtained from silica gel column chromatography
Eluent: n-hexane (fractions 1 and 2), n-hexane/dichloromethane (fraction 3), dichloromethane (fraction 4), methanol (fraction 5). Direct-acting mutagenicity assay: Ames test using *S. typhimurium* YG1024 strain in the presence of S9mix

参考文献

- Enya, T., H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama, Y. Hisamatsu (1997) 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates, Environ. Sci. Technol., 31, 2772-2776.
Hayakawa, K., R. Kitamura, M. Butoh, N. Imaizumi, M. Miyazaki (1991) Determination of diamino- and aminopyrenes by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, Anal. Sci., 7, 573-577.
Hayakawa, K., M. Butoh, M. Miyazaki (1992) Determination of dinitro- and nitropyrenes in emission particulates from diesel and gasoline engine vehicles by liquid chromatography with chemiluminescence detection after precolumn reduction, Anal. Chim. Acta, 266, 251-256.
Hayakawa, K., N. Terai, K. Suzuki, P. G. Dinning, M. Yamada, M. Miyazaki (1993) Chromatographic determination method for 1-nitropyrene and its metabolites in biological samples with fluorescence detection after on-line reduction, Biomed. Chromatogr., 7, 262-266.
Hayakawa, K., M. Butoh, Y. Hirabayashi, M. Miyazaki (1994) Determination of 1,3-, 1-, 6-, 1-, 8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene in vehicle exhaust particulates, Jpn. J. Toxicol. Environ. Health, 40, 20-25.
Hayakawa, K., T. Murahashi, M. Butoh, M. Miyazaki (1995a) Determination of 1,3-, 1-, 6-, 1-, 8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene in urban air by high-performance liquid chromatography using chemiluminescence detection, Environ. Sci. Technol., 29, 928-932.
Hayakawa, K., Y. Kawaguchi, T. Murahashi, M. Miyazaki (1995b) Distributions of nitropyrenes and mutagenicity in airborne particulates collected with an Andersen sampler, Mutation Res., 348, 57-61.
Hayakawa, K., N. Terai, P. G. Dinning, K. Akutsu, Y. Iwamoto, R. Etoh, T. Murahashi (1996) An on-line reduction HPLC/chemiluminescence detection system for nitropolycyclic aromatic hydrocarbons and metabolites, Biomed. Chromatogr., 10, 346-350.
Hayakawa, K., A. Nakamura, N. Terai, R. Kizu, K. Ando (1997) Nitroarene concentrations and direct-acting mutagenicities in diesel exhaust particulates fractionated by silicagel column chromatography, Chem. Pharm. Bull., 45, 1820-1822.
早川和一, 石井克明, 中浜慶子, 正宗行人, 木津良一(1998)ディーゼル排ガス粉じん及び重油のエストロゲン様及びアンドロゲン様作用, 日本内分泌搅乱化学物質学会第一回研究発表会要旨集, p 81, 京都.
Imaizumi, N., K. Hayakawa, Y. Suzuki, M. Miyazaki (1990) Determination of nitrated pyrenes and their derivatives by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection after online electrochemical reduction, Biomed. Chromatogr., 4, 108-112.
Kobayashi, S. and K. Imai (1980) Determination of fluorescent Compounds by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, Anal. Chem., 52, 424-427.
村橋 育, 早川和一, 岩元ゆう子, 宮崎元一(1994)蛍光/化学発光検出高速液体クロマトグラフィーによる大気粉じん中の多環芳香族炭化水素及びそのニトロ誘導体の同時分析, 分析化学, 43, 1017-1019.
Murahashi, T., M. Miyazaki, R. Kakizawa, Y. Yamagishi, M. Kitamura, K. Hayakawa (1995) Diurnal concentrations of 1,3-, 1-, 6-, 1-, 8-dinitropyrenes, 1-nitropyrene and benzo[a]pyrene in air in downtown Kanazawa and the contribu-

- tion of diesel-engined vehicles, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 41, 328-333.
- Murahashi, T. and K. Hayakawa(1997) A sensitive method for the determination of 6-nitrochrysene, 2-nitrofluoranthene and 1-, 2-, and 4-nitropyrenes in airborne particulates using high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, 343, 251-257.
- Rosenkranz, H. and R. Mermelstein(1983) Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes All nitro-containing chemicals were not created equal, *Mutation Res.*, 114, 217-267.
- Sigvardson, K., J. M. Kennish, J. W. Birks(1984) Peroxyox-

- alate chemiluminescence detection of polycyclic aromatic amines in liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 56, 1096-1102.
- 田辺 潔, 松下秀鶴, 郭 錦堂, 今宮俊一郎(1986)高速液体クロマトグラフィーによる大気浮遊粉じん中の発がん性ニトロアレンの分析, *大気汚染学会誌*, 21, 535-544.
- 常盤 寛(1992)芳香族炭化水素ニトロ誘導体の変異原性, 発がん性とその危険度, *大気汚染学会誌*, 27, 73-84.
- Xu, X., J. P. Nachtman, S. M. Rappaport, E. T. Wei(1981) Identification of 2-nitrofluorene in diesel exhaust particulates, *J. Appl. Toxicol.*, 1, 196-198.

Environ. Mutagen Res., 21 : 153 - 157(1999)

シンポジウム I

本稿は1998年11月24-26日, メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「環境汚染変異原」(企画: 平山晃久)で発表された(座長: 平山晃久, 若林敬二)。

河川水中の変異原物質の検索

糠谷 東雄¹, 大江 武², 寺尾 良保³, 澤西 啓之⁴, 若林 敬二⁵

¹静岡県立大学薬学部, ³同 環境研究所 〒422-8526 静岡市谷田52-1

²京都女子大学 〒605-0926 京都市東山区今熊野北日吉町

⁴北陸大学薬学部 〒920-1181 金沢市金川町

⁵国立がんセンター研究所 〒104-0045 東京都中央区築地5丁目1-1

Search for mutagens in river water

Haruo Nukaya¹, Takeshi Ohe², Yoshiyasu Terao³, Hiroyuki Sawanishi⁴, Keiji Wakabayashi⁵

¹School of Pharmaceutical Sciences and ³Graduate School of Nutrition and Environmental Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526

²Department of Food and Nutrition Science, Kyoto Women's University
Kitahiyoshi-cho, Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto 605-0926

⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University
Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181

⁵Cancer Prevention Division, National Cancer Center Research Institute
1-1 Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0045

Summary

Water samples from the Nishitakase River in Kyoto, especially taken at sites below sewage plants, show significantly high mutagenicity in the Ames test. Two mutagenic compounds (I and II) were isolated by Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC on ODS column from material adsorbed to 27 kg of blue cotton. Based on the UV, mass and ¹H-NMR spectra of both (I) and (II), and X-ray crystallography data of a debrominated derivative of (I), the structures of (I) and (II) were determined to be 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-1) and 2-[2-(acetylamino)-4-[N-(2-cyanoethyl)ethylamino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-2), respectively. PBTA-1 and -2 were synthesized from azo dyes that had the corresponding substitutional groups by reduction and chlorination. Since all of the spectra of PBTA-1 and -2 coincided with those of (I) and (II), (I) and (II) were concluded to be PBTA-1 and -2, respectively. PBTA-1 and -2 were newly identified potent mutagens, which induced 3,000,000 and 3,200,000 revertants of *Salmonella typhimurium* YG1024 per microgram, respectively, in the presence of S9 mix. They may be produced from azo dyes during industrial processes in dyeing factories and treatment at sewage plants.

(This paper, in a session chaired by Teruhisa Hirayama and Keiji Wakabayashi, was presented to the symposium "Mutagenicity of environmental pollutants", organized by Teruhisa Hirayama, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

受付: 1999年3月11日

受理: 1999年3月17日

©日本環境変異原学会

緒 言

河川水の汚染は世界各国に共通した問題であり、特に遺伝毒性物質による汚染実態は十分に調査されていないのが現状である。我々は、簡便なブルーレーヨン法 (Sakamoto and Hayatsu, 1990) を用いて、3環以上の縮合芳香環を有する遺伝毒性物質を各地の河川水より採集し、サルモネラ菌に対する変異原性を調べた。その結果、すでに報告されているように (Maruoka et al., 1982; Nakamuro et al., 1989; Sakamoto et al., 1990; Sayato et al., 1993; Ohe et al., 1996), 京都の桂川と西高瀬川の河川水が他の河川水に比べ、サルモネラ菌 YG 1024 に対して S9 mix 存在下に際立って高い変異原性を示すことがわかった。西高瀬川および桂川は淀川の支流であり、大阪市周辺住民の生活用水は、この淀川より取水されていることより、西高瀬川および淀川に含まれる変異原物質の解明は重要であると考えられる。また、この変異原物質の発生源の特定、あるいは生物への影響、さらにその除去などについて検討していくためにも、原因物質の解明が不可欠である。そこで、西高瀬川河川水中の変異原物質の単離と構造解析を行った。

1. 河川水中の変異原物質の分離

変異原物質の分離の指標となる変異原性試験としては、S9 mix 存在下サルモネラ菌 YG 1024 株を用いた Ames 試験を採用した (Watanabe et al., 1990)。まず、予備的な分離を行った。高い変異原性を示す西高瀬川の下水処理場下流地点において (Fig. 1), ブルーレーヨン

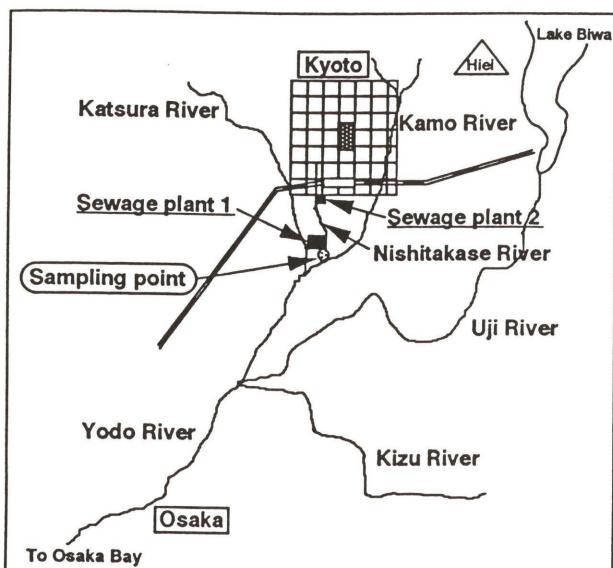


Fig. 1 Site of water sampling and location of sewage plants in the Nishitakase River

を用いて試料を採集し、HPLC を組み合わせた分離を行い、HPLC 上单一のピークを示す 5 種の変異原物質 (I ~ V) を単離した。これらの変異原性の回収率はブルーレーヨン抽出物全体の 67 % であり、特に変異原物質 (I) および (II) は、それぞれ 21 % および 17 % を占める物質であった。しかし、ここで得られた (I) および (II) はきわめて微量であり、UV スペクトルの測定ができたのみであった。そこで、構造解析に十分な量を得るべく大量抽出を行った。

変異原物質は河川水中に希薄な状態で溶解しているので、これを効率よく濃縮する方法としてブルーコットン法を採用した。次に、ブルーコットン吸着物を種々の分離剤のカラムにかけ、その分離効率を変異原性の回収率で検討した。その結果、Sephadex LH-20 と逆相の吸着剤である ODS がこの変異原物質の分離に効果的であることがわかった。そこで、これらを組み合わせて、分離・精製を行うことにした。

変異原物質の河川水からの分離法の概略を Fig. 2 に示した。3 kg のブルーコットンを河川水中に懸垂し、24 時間後に回収した。吸着部をメタノール-濃アンモニア水 (50:1) の混液で抽出し、抽出物のメタノール可溶部を Sephadex LH-20 カラムで分離した。Fig. 3 に溶出重量曲線を折れ線グラフで表わし、横軸は Kd 値で表示した。また、Kd=0.1 で分画した各フラクションの変異原性を破線で表わした。Kd=1 以前に全重量の 90 % に近い、変異原性のない成分が溶出し、変異原性は Kd=1 以降に、大きく 3 つの画分に分かれて観察された。先に述べた (I) および (II) は HPLC 分析の結果、高い変異原性を示した Kd=1.0~1.6 の画分に溶出し、(I) は Kd=1.0~1.3 に、(II) は Kd=1.3~1.6 に分布していた。これらの画分各々を、容量の少ない Sephadex LH-20 カラムで再度精製した結果、(I) は Kd=1.24~1.30 に、また、(II) は Kd=1.44~1.50 に濃縮された。これらの画分について、HPLC (ODS) による分取を行い、HPLC 上单一のピークを示す (I) および (II) を、ブルーコットン 3 kg より、それぞれ約 100 μ g と約 150 μ g 得た。以上の操作を 9 回繰り返し、最終的にそれぞれ 1.1 mg および 1.2 mg 得ることができた (Nukaya et al., 1997; Oguri et al., 1998)。

2. スペクトルによる変異原物質 (I) および (II) の構造解析

(I) および (II) の UV スペクトルを Fig. 4 に示したが、それぞれ 384 nm および 388 nm と長波長側に極大吸収があり、3 環以上の共役した構造が予想された。Fig. 5 に質量分析と 1 H-NMR の測定結果を示した。高分解能

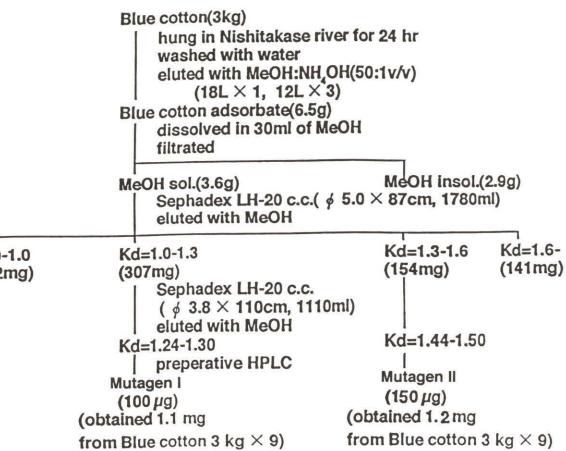


Fig. 2 Isolation procedure of mutagens from river water

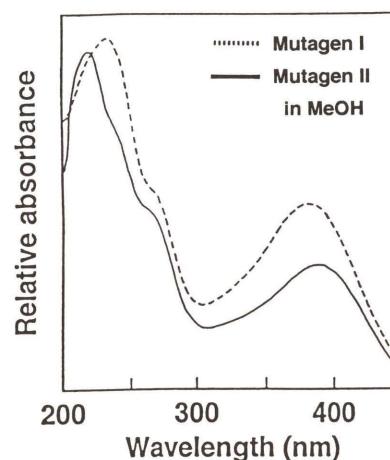


Fig. 3 Sephadex LH-20 chromatogram of blue cotton adsorbate and mutagenicity of each fraction (Kd value=0.1)

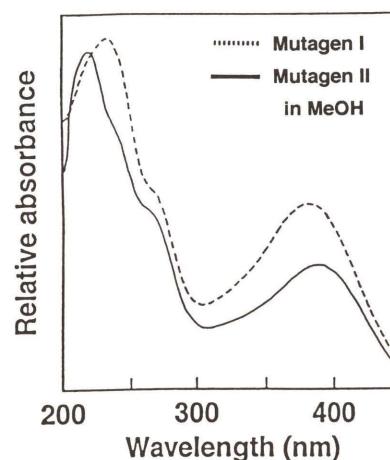


Fig. 4 UV absorption spectra of Mutagen I and II in methanol

質量分析より、(I) の分子式は $C_{21}H_{26}N_6O_4BrCl$ 、(II) は $C_{20}H_{21}N_7O_2BrCl$ であった。また、(I) はメトキシメチル基が切れたフラグメント ($M-45$)⁺ が、(II) はシアノメチル基が切れたフラグメント ($M-40$)⁺ がベースピークとして観測された。 1 H-NMR より、両者にはアセチルアミドの NH 基、3 つの芳香族プロトン、アミノ基、O-メチル基、アセチルアミドのアセチル基のシグナルが共通して観察された。加えて、(I) の 3.34 ppm (6 H, s) と 3.5 ppm (8 H, A_2B_2) のシグナルから 2 つの 2-メトキシエチル基が帰属され、(II) の 3.57 ppm と 2.61 ppm のシグナルはシアノエチル基、さらに、3.33 ppm と 1.20 ppm の積分比が 2 対 3 のシグナルはエチル基に帰属された。これらは質量分析のフラグメントピークと合わせ、3 級アミンのアルキル基と予想された。

また、(I) および (II) を分離する過程で、カラムクロマトにはさまざまな色のバンドが観察された。そこで、これらの構造についての情報を得るために、染料中の色素類の構造について調べると、アミノ基とクロルを除いて、(I) および (II) と同じ置換基を持ち、さらにニトロ

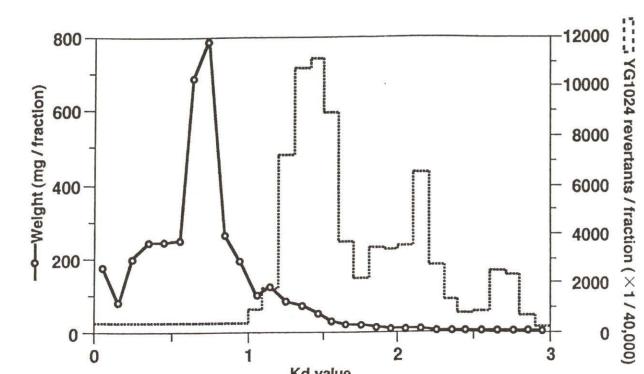


Fig. 5 UV absorption spectra of Mutagen I and II in methanol

基を持つアゾ色素が存在することを見出した。ニトロ基は還元されてアミノ基になり、オルト位にニトロ基を持つアゾベンゼンは、還元条件で環化して benzotriazole 環を形成することが報告されている (Hegarty, 1975; Boyer, 1981)。以上より、(I) の構造を 2-[2-(acetylamino)-4-bis[(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-1) と推定し、(II) の構造を 2-[2-(acetylamino)-4-[N-(2-cyanoethyl)ethylamino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-2) と推定した (Fig. 6)。一方、(I) および (II) の結晶化を試みたが、X 線結晶解析に適した結晶を得ることができなかった。しかし、(I) を還元し、脱プロム化した化合物について X 線結晶解析することに成功し、これらの推定構造の正しいことが裏付けられた (Nukaya et al., 1997; Oguri et al., 1998)。

3. 変異原物質 (I) および (II) の合成による構造証明

PBTA-1 は、PBTA-1 と同じ 4 種の置換基 [CH_3O , Br, AcNH, $(CH_3OCH_2CH_2)_2N$] および 2 位と 4 位に NO_2 基を持つアゾ染料 (AZO DYE-1) からの生成が予測された。また、染料工場では、sodium hydrosulfite などによる還元工程もある。したがって、色素が染色工程で還元され、環化して 2-phenylbenzotriazole を形成し、さらに、下水処理場で次亜塩素酸処理などにより塩素が導入されたと予想される (De Rose, 1975)。事実、Fig. 7 に示したように、このアゾ染料 (AZO DYE-1) を sodium hydrosulfite で還元し、ついで sodium hypochlorite を用いて塩素化を行ったところ、生成物の各種スペクトルデータは PBTA-1 の構造を支持し、同時に、(I) のそれらと完全に一致した (Shiozawa et al., 1998)。また、PBTA-2 も相当する置換基 [CH_3O , Br, AcNH, $CH_3CH_2(NCCH_2CH_2)N$] および 2 位と 4 位に NO_2 基を持つアゾ染料 (AZO DYE-2) を同様に還元し、

	Mutagen I	Mutagen II
MS(m/z)	540.086 C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₄ BrCl	505.063 C ₂₀ H ₂₁ N ₇ O ₂ BrCl
substituent group	δ_{H} (number of proton, multiplicity)	
-CH ₂ CH ₃	{ 1.20(3H, t, J=6.95Hz) 3.33(2H, q, J=6.95Hz)	
-CH ₂ CH ₂ CN	{ 2.61(2H, t, J=7.00Hz) 3.57(2H, t, J=7.00Hz)	
-OCH ₃ ×2	3.34(6H, S)	
-CH ₂ CH ₂ ×2	3.54 } (8H, m(A ₂ B ₂)) 3.57 }	
-COCH ₃	2.26(3H, s)	2.27(3H, s)
-OCH ₃	3.95(3H, s)	3.99(3H, s)
-NH ₂	4.35(2H, brs)	4.38(2H, brs)
ArH	7.22(1H, s)	7.23(1H, s)
ArH	7.78(1H, s)	7.83(1H, s)
ArH	8.28(1H, s)	8.27(1H, s)
-NHCOCH ₃	11.00(1H, brs)	11.08(1H, brs)

Fig. 5 Mass and ¹H-NMR data of Mutagen I and II

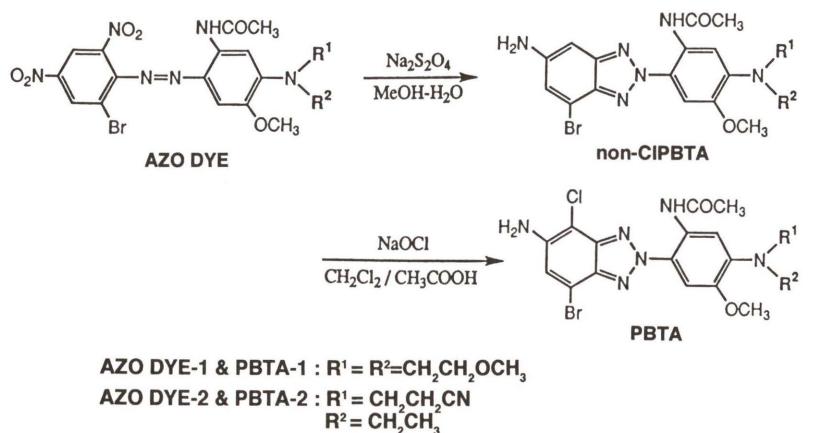
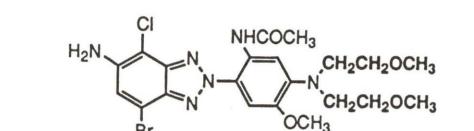


Fig. 7 Syntheses of PBTA-1 and -2 from azo dyes through reduction by hydrosulfite and chlorination by hypochlorite

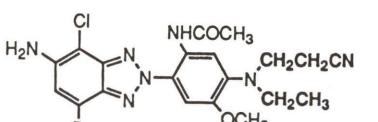
ついで塩素化することにより生成し、そのスペクトルデータは(II)と完全に一致した(Oguri et al., 1998)。以上の合成証明により、(I)および(II)の構造が、それぞれPBTA-1 および PBTA-2 であることが決定された。

4. PBTA-1 および PBTA-2 とその関連化合物の変異原性

PBTA-1 および-2、さらに原因物質と考えられるアゾ染料と生成中間体である non-CIPBTA の変異原性を Table 1 に示した。PBTA-1 のサルモネラ菌 TA 98 に対する変異原性は、S9 mix 存在下で、88,000 revertants/ μg 、YG 1024 に対しては 3,000,000 revertants/ μg となり強い活性を示した。PBTA-2 の変異原性は、TA 98 および YG 1024 に対し S9 mix 存在下で、1 μg 当たり



Mutagen I (PBTA-1)
2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole



Mutagen II (PBTA-2)
2-[2-(acetylamino)-4-[N-(2-cyanoethyl)-N-ethylamino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole

Fig. 6 Structures of Mutagen I and II

Table 1 Mutagenicity of PBTA-1 and -2, non-CIPBTA-1 and -2, and AZO DYE-1 and -2 in four *Salmonella* strains with S9 mix

Compound	Revertants/ μg			
	TA98	TA100	YG1024	YG1029
AZO DYE-1	150	16	1,800	200
non-CIPBTA-1	22,000	350	870,000	20,000
PBTA-1	88,000	630	3,000,000	36,000
AZO DYE-2	1,000	60	3,400	1,100
non-CIPBTA-2	37,000	510	1,200,000	36,000
PBTA-2	93,000	520	3,200,000	390,000

DYE-1 および -2 のように、2,4-dinitrophenylazo 骨格を有するアゾ染料は世界各地で用いられている。したがって、染色工場付近の河川水は、PBTA タイプの変異原物質で汚染されている可能性があり、本研究の成果は、これら変異原物質のヒトおよび環境に及ぼす影響、さらには PBTA タイプの変異原物質の生成の低減化方法を検討するうえに有益な基礎的研究資料になるものと考えられる。

謝 辞

本研究は厚生省がん研究助成金および環境庁委託研究費による援助を受けて行われた。

参考文献

- Boyer, D. H. (1981) Monocyclic triazoles and benzotriazoles, In : R. C. Elderfield (Ed), Heterocyclic Compounds, Vol. 7, John Wiley & Sons, New York, pp. 385-460.
 De Rose, M. (1975) The chlorination of indoles with aqueous sodium hypochlorite. Proof of the existence of an N-chloro intermediate, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 482-483.
 Hegarty, A. F. (1975) Ionic reactions involving hydrazo, azo and azoxy groups, In : S. Patai (Ed), The Chemistry of the Hydrazo, Azo and Azoxy Groups, Part 2, John Wiley & Sons, New York, pp. 644-723.
 Maruoka, S. and S. Yamanaka, (1982) Mutagenicity in

各々93,000 および 3,200,000 revertants/ μg であり、PBTA-1 のそれらとほぼ同じであった。また、アゾ染料にも弱い変異原性が認められ、これが環化して benzotriazole 骨格となった non-CIPBTA は大幅に活性が増加し、塩素化によって一層変異原性が増強された。これらは O-acetyltransferase 活性を高めた菌株で高い活性を示した。

結 語

PBTA-1 および -2 は、染料として使用されている AZO DYE-1 および -2 が染色工場での sodium hydrosulfite 等による還元処理を受けて benzotriazole 環に変換し、続いて下水処理場での sodium hypochlorite を用いた塩素処理を受ける過程で塩素化されて生成し、河川水に流入している可能性が示唆された。AZO

Salmonella typhimurium tester strains of XAD-2-ether extract, recovered from Katsura River water in Kyoto City, and its fractions, Mutat. Res., 102, 13-26.

Nakamuro, K., H. Ueno and Y. Sayoto (1989) Mutagenic activity of organic concentrates from municipal river water and sewage effluent after chlorination or ozonation, Water Sci. Technol., 21, 1895-1898.

Nukaya, H., J. Yamashita, K. Tsuji, Y. Terao, T. Ohe, H. Sawanishi, T. Katsuhara, K. Kiyokawa, M. Tezuka, A. Oguri, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1997) Isolation and chemical-structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakase River in Kyoto, Chem. Res. Toxicol., 10, 1061-1066.

Oguri, A., T. Shiozawa, Y. Terao, H. Nukaya, J. Yamashita, T. Ohe, H. Sawanishi, T. Katsuhara, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1998) Identification of a 2-phenylbenzotriazole(PBTA)-type mutagen, PBTA-2, in water from the Nishitakase River in Kyoto, Chem. Res. Toxicol., 11, 1195-1200.

Ohe, T. and H. Nukaya (1996) Genotoxic activity of 1-nitropyrene in water from the Yodo River, Japan. Sci. Total Environ., 181, 7-12.

Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo River System, Kyoto-Osaka. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44, 521-528.

Sayato, Y., K. Nakamuro, H. Ueno and R. Goto (1993) Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water, Mutat. Res., 300, 207-213.

Shiozawa, T., K. Muraoka, H. Nukaya, T. Ohe, H. Sawanishi, A. Oguri, K. Wakabayashi, T. Sugimura and Y. Terao (1998) Chemical synthesis of a novel aromatic amine mutagen isolated from water of the Nishitakase River in Kyoto, and possible route of its formation, Chem. Res. Toxicol., 11, 375-380.

Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1990) Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines : new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels, Mutat. Res., 234, 337-348.

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「環境汚染変異原」(企画:平山晃久)で発表された(座長:平山晃久、若林敬二)。

水環境中変異原物質の運命

中室 克彦

摂南大学薬学部 〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町45-1

Fate of mutagens in a water environment

Katsuhiko Nakamuro

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University
45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata 573-0101, Japan

Summary

In order to clarify the fate of mutagens in a water environment, mutagenic characteristics of water from a river basin of the Biwa Lake-Yodo river as a typical river was investigated. Potential pollutant-sources were sought for municipal stream waters, e.g., effluents of nightsoil and sewage treatment plants, road runoff and rain fall. XAD-2 resin and blue rayon were used to recover mutagens from the Yodo river. The Ames *Salmonella*/microsome assay with TA98, TA100 and YG strain series was used to test XAD-2 resin and blue rayon concentrates recovered from the river water; this revealed indirect mutagenicity toward TA98. Frameshift mutagens among directly mutagenic nitroarenes and indirectly mutagenic aminoarenes and heterocyclic amines may derive from potential pollutant-sources described above. The possible fate of mutagens in a water environment was discussed.

(This paper, in a session chaired by Teruhisa Hirayama and Keiji Wakabayashi, was presented to the symposium "Mutagenicity of environmental pollutants", organized by Teruhisa Hirayama, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords: water environment, mutagen, Ames assay, river water, nitroarenes, aminoarenes, heterocyclic amines

緒 言

近年、水域環境には複雑多岐にわたる微量有機汚染物質が含有し、これらの中には発癌性や変異原性を有するものも多く存在し、河川水や湖沼水等の水中に変異原物質の存在することが多く報告されるようになった(Maruoka et al., 1982; 富田ら, 1980; 浦野ら, 1987; 内海ら, 1985; 佐谷戸ら, 1993)。しかし、生物にとって必要

な元素である窒素やリンなどの生物圈における物質循環についてはよく知られているが、個々の化学物質をはじめ環境変異原物質に関する環境中挙動についてはほとんど明らかにされていない。そこで、環境変異原物質の水域環境における運命を明らかにする目的で一連の研究を実施している。すなわち、典型的な都市河川である琵琶湖-淀川水系をモデル河川として、これら河川水の変異原性およびこれら変異原性原因物質の解明、変異原性に寄与する汚染源として考えられる都市小河川、し尿や下水処理場放流水、道路排水および雨水などの変異原性、および淀川水系河川水の流下に伴う変異原性の消長に関して検討するとともに環境変異原物質の難分解性の

受付: 1999年3月17日

受理: 1999年4月8日

©日本環境変異原学会

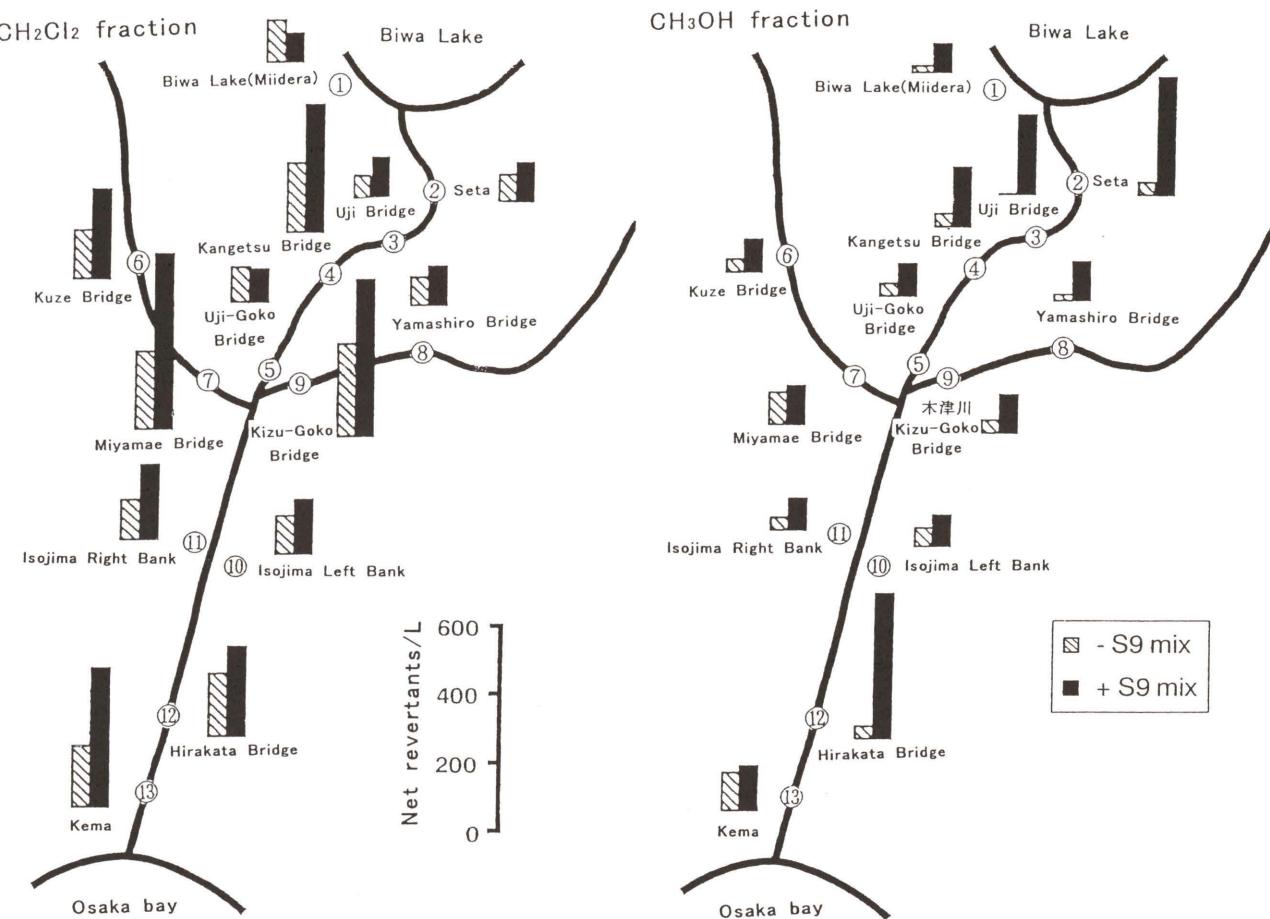


Fig. 1 Mutagenicity to TA98 (\pm S9mix) of XAD-2 resin column concentrates of river water from Yodo River basin

特性について追求し、水域環境中変異原物質の運命に関する基礎的研究を行った結果を総説する。

1. 淀川水系河川水の変異原性の特徴

淀川水系河川水の変異原性の特徴を把握するため、3回の異なる時期に13カ所の地点で採水した河川水をXAD-2樹脂カラム濃縮法によって得られたCH₂Cl₂とCH₃OH画分について、TA 98(\pm S9 mix), TA 100(\pm S9 mix)およびYG株などを用いたAmes *Salmonella*/microsome assayを行った。これら3回にわたる調査結果から、淀川水系河川水はフレームシフト型の直接および間接変異原性を示すとともに、淀川の流下過程において自浄作用を受け難いことを認めた。またこれら変異原性には比較的疎水性の有機物質が寄与する可能性を示した。これらの典型的な結果をFig. 1に示す。これらの事実は、淀川水系6地点の河川水のXAD-2樹脂カラム濃縮法(Nakamuro et al., 1989; Nakamuro et al., 1992; 佐谷戸ら; 1992)やブルーレイヨン懸垂法によって得られた濃縮物の変異原特性が同様の結果(佐谷戸ら, 1991; Sakamoto et al., 1990)を示していることからも支持される。

河川水のXAD-2樹脂カラム濃縮物の変異原性強度比

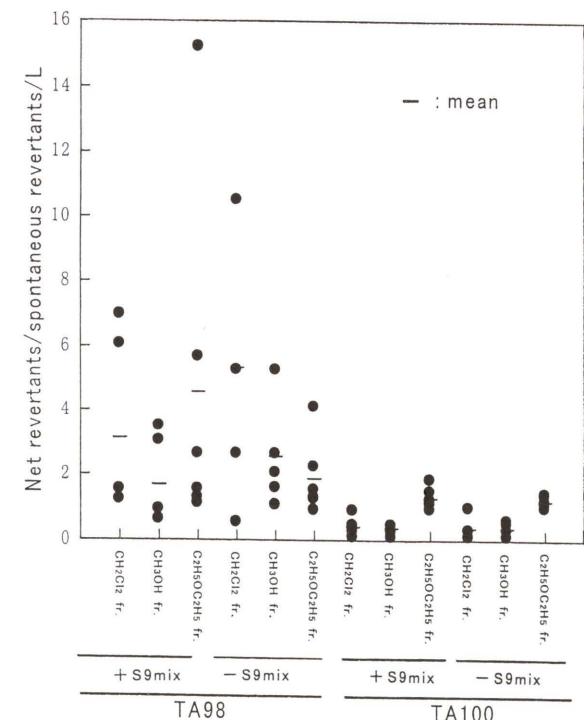


Fig. 2 Occurrence of mutagenicity of XAD-2 resin column concentrates from river water

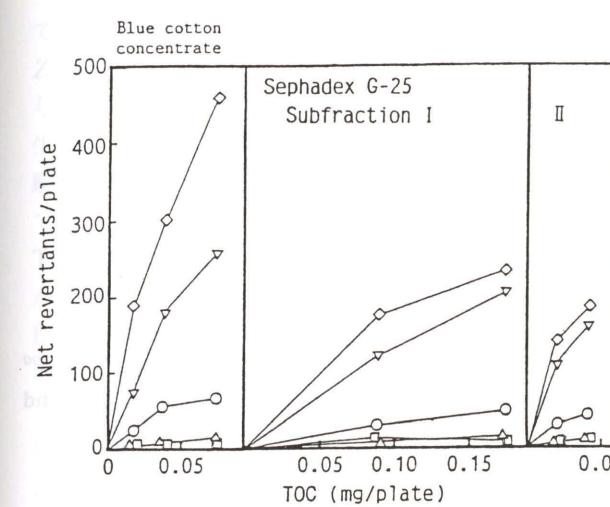


Fig. 3 Comparison of the mutagenic activities of blue cotton concentrate and subfractions I and II separated by Sephadex G-25 to TA98NR, TA98/1,8-DNP, YG1021 and YG1024 without S9 mix. ○: TA98, △: TA98NR, □: TA98/1,8-DNP, ▽: YG1021, ◇: YG1024. The numbers of spontaneous revertants per plate of 13 \pm 6 (TA98), 16 \pm 4 (TA98NR), 20 \pm 4 (TA98/1,8-DNP), 20 \pm 4 (YG1021) and 23 \pm 7 (YG1024) were subtracted

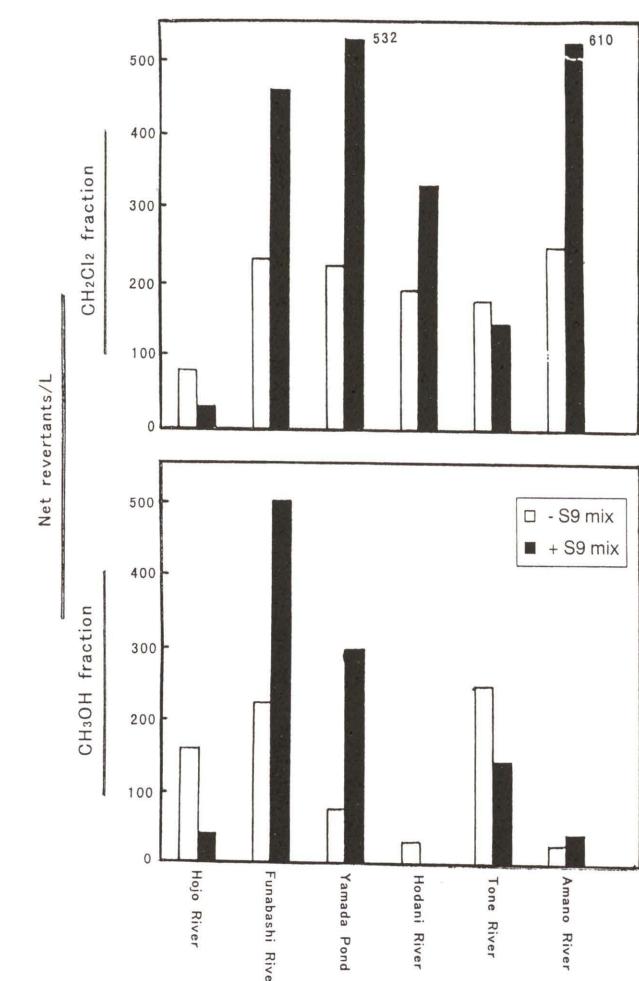


Fig. 5 Mutagenicity to TA98 \pm S9 mix of XAD-2 resin column concentrates of municipal stream water

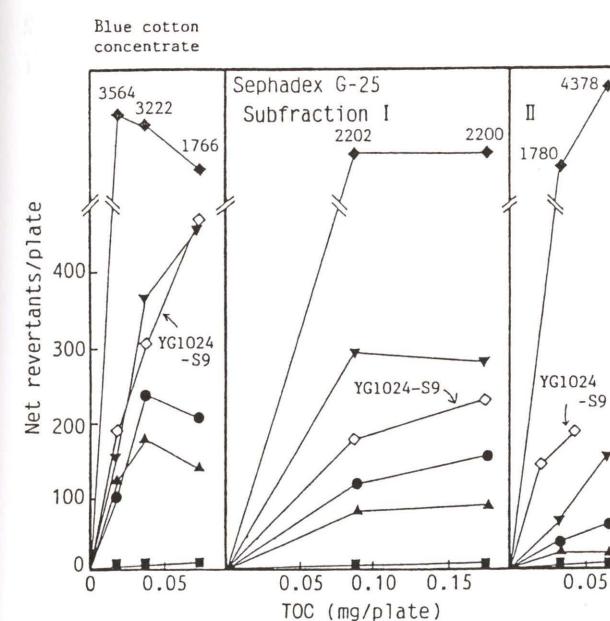


Fig. 4 Comparison of mutagenic activities of blue cotton concentrate and subfractions I and II separated by Sephadex G-25 to TA98NR, TA98/1,8-DNP, YG1021 and YG1024 with S9 mix. ●: TA98, ▲: TA98NR, ■: TA98/1,8-DNP, ▽: per plate of 22 \pm 7 (TA98), 22 \pm 5 (TA98NR), 24 \pm 5 (TA98/1,8-DNP), 23 \pm 6 (YG1021) and 30 \pm 3 (YG1024) were subtracted. The mutagenicity in YG1024 without S9 mix (◇) is also shown in each column

はFig. 2に示すごとく、ライン川、ミューズ川、マイン川やわが国の相模川および淀川水系河川水において、いずれもフレームシフト型の変異原性が検出されているこ

とは興味深い。

このように淀川水系河川水中に特徴的なフレームシフト型変異原物質が存在する可能性のあることから、これら変異原物質の性状把握を行った。ブルーレイヨンに選択的に多環芳香族炭化水素やヘテロサイクリックアミンなどが吸着することから、これら物質がフレームシフト型変異原性に寄与する可能性が考えられた(Sayato et al., 1990; Sayato et al., 1993)。

さらに、淀川水系河川水の変異原性に寄与する化合物を追求した。河川水のXAD-2樹脂カラム濃縮物につい

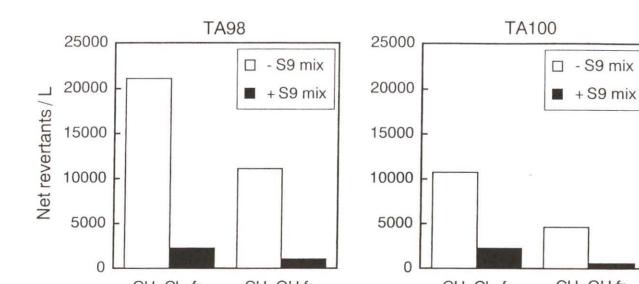


Fig. 6 Mutagenicity of XAD-2 resin column concentrates of effluent from nightsoil treatment plant

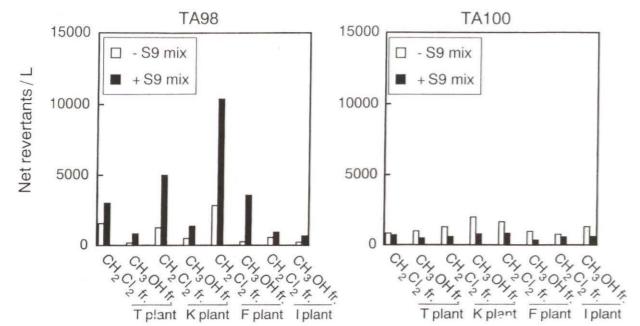


Fig. 7 Mutagenicity of XAD-2 resin column concentrates of effluent from municipal sewage treatment plant

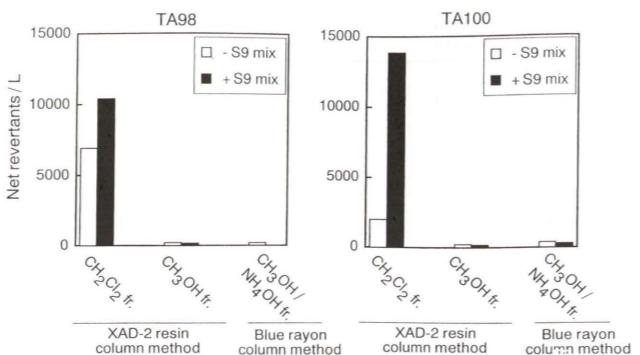


Fig. 8 Mutagenicity of XAD-2 resin column concentrates and Blue rayon column concentrates of road runoff

てニトロアレンやアミノアレン検出菌株を用いて検討した結果、Fig. 3 および Fig. 4 に示すとくニトロアレンやアミノアレンの寄与する可能性が示された。またこれら濃縮画分のODS-C18カラムを用いたHPLC分取画分のGC-MC分析による検索において、アズレン化合物、キノリン化合物、クリセン、ベンズ(a)アントラセン、シクロペタ(cd)ピレン、ベンズ(b)フルオランテンおよびアントラキノンなどが検出されていることからも明らかである(Sayato et al., 1993)。また、淀川水系河川水には著者らをはじめとする研究者によって、分析化学的に多環芳香族炭化水素(フルオランテン、ビレンなど)やヘテロサイクリックアミン(Trp-P-1, Trp-P-2, PBTA-1など)などがng/L- μ g/Lのオーダーで存在することが報告されている(大江, 1995; 長井ら, 1998; 加納ら, 1998; Nukaya et al., 1997)。そのため、河川水の変異原性には多環芳香族炭化水素やヘテロサイクリックアミンが一部寄与することが明らかになった。

2. 淀川水系河川水中変異原物質の汚染源

淀川水系河川水は特徴的なフレームシフト型の直接および間接変異原性を示すことから、これら変異原性の汚染源と考えられる都市小河川、し尿および下水処理場放流水、道路排水および雨水などの変異原性について検討を行った。

ポイント汚染源としての淀川水系河川水に流入するし尿および下水処理場放流水ならびに家庭雑排水や工場排水の占める割合の高い都市小河川が考えられる。そのため5つの淀川へ流入する枚方市内の都市型小河川水のXAD-2樹脂カラム濃縮物について検討した結果、CH₂Cl₂およびCH₃OH画分のいずれかにTA98±S9 mixに対して変異原性が認められた(Fig. 5)。し尿処理施設の放流水のXAD-2樹脂カラム濃縮法で得たCH₂Cl₂およびCH₃OH画分の変異原性は、いずれもTA98(-S9 mix)に対する高いフレームシフト型の直接変異原性が有意であった(Fig. 6)。また、下水処理場放流水の同様の検討では、フレームシフト型間接変異原性が有意に認め

られた(Fig. 7)。

また、ノンポイント汚染源と考えられる道路排水や雨水についてXAD-2樹脂カラム濃縮法およびブルーレイヨンカラム法で得られた濃縮物の変異原性試験を実施した。これらいずれの濃縮物もTA98に対してフレームシフト型変異原性を示し、とくに道路排水に強いことから、これら変異原性には多環芳香族炭化水素やヘテロサイクリックアミンが寄与する可能性が考えられた(Fig. 8)。このように琵琶湖-淀川水系河川水の考えられる汚染源の変異原性はいずれもフレームシフト型の変異原性を有することが明らかとなった。

3. 河川水中変異原物質の難生物分解性

河川水中の変異原物質は、淀川の流下過程において自浄作用を受け難いことを認めたことから、環境水中に存在する変異原物質は生物分解され難いと考えられた。そのため、都市域において汚染源として重要な下水処理場における下水処理水中の変異原物質の活性汚泥細菌による好気的分解挙動について検討した。すなわち、下水処理場の流入水、活性汚泥処理水、放流水などの処理過程水に関するXAD-2樹脂カラム濃縮画分のTA98+S9 mixに対する変異原性強度(net revertants/mg TOC)とBOD/TOC比の相関図の解析を行った結果(Fig. 9)から、流入水→活性汚泥処理→放流水と下水処理が進行するに従ってBOD/TOC比が小さくなるのに対して変異原性強度が増大する傾向を示した。

そのため、下水処理場放流水中の変異原物質は難分解性であることが考えられた。さらに、下水処理過程水中の変異原物質のHPLC/GC-MS分析による検索の結果、ニトロアレンやアミノアレンなどの芳香族化合物が検出されることから、これら変異原性には多環芳香族炭化水素類やヘテロサイクリックアミンなどの寄与することが考えられた。

そこで、下水中に含有する難分解性であると考えられるヘテロサイクリックアミンの生分解性に関する検討を行った。すなわち、典型的なヘテロサイクリックアミン

であるTrp-P-2の活性汚泥細菌のうちで代表的なZoogloea ramigera(Zoogloeaと略す)に対する増殖に与える影響を把握したところ、馴化しないとTrp-P-2を生分解しないことが明らかになったことから、Trp-P-2馴化Zoogloeaの作製を行った。約2ヵ月間の馴化操作で得られたTrp-P-2馴化Zoogloeaを用いて行ったTrp-P-2の生物分解の挙動に関する検討結果(Fig. 10)から、難生分解性の性質をもち強変異原性を有するTrp-P-2は馴化した活性汚泥細菌であるZoogloeaを用いなければ生分解されないことが判明した(勢川ら, 1994)。

このように強変異原性で難生物分解性を示す多環芳香族炭化水素やヘテロサイクリックアミンは、下水処理場において完全に処理されずに水域環境に排出されること

となる。これら変異原物質は、疎水性で環境中においては浮遊物質に吸着しやすいことなどの性質を有するため、さらに水域環境の底質に蓄積することが考えられる。

4. 環境水中変異原物質の運命

環境中変異原物質の運命としての環境内動態をFig. 11に示す。環境中変異原物質の重要な汚染源は、生活環境におけるヒトの生活や産業活動に伴って排出される家庭雑排水、工場排水およびし尿や下水処理場放流水などがあり、これら汚染源には多環芳香族炭化水素やヘテロサイクリックアミンなどの変異原物質の含有することが考えられる。一方、大気に排出される自動車排ガス由来の多環芳香族炭化水素は道路排水や雨水などを通じて水域環境に移動し、環境水の変異原性に寄与する。さらに、河川に流入したこれら変異原物質は生物分解を受け難く、しかもこれらの疎水性の理化学的性状から流下過程において河川底質および河川河口底質に蓄積することが考えられる。

結語

環境水中の変異原物質のうち構造式の判明している化合物は、多環芳香族炭化水素やヘテロサイクリックアミンなどでその数は少ない。しかし、本研究結果から変異原物質の大部分のものはブルーレイヨンに吸着する性質を持つ多環芳香族炭化水素やヘテロサイクリックアミンなどの化学物質であることが明らかになった。これらの変異原性を示す化合物のさらなる同定が待たれる。また、水域環境中変異原物質の多くは疎水性で、難分解性の性状を有するため大部分は浮遊物質に吸着し、沈殿して底質に蓄積されることが考えられる。そのため、今後環境変異原物質の底質における挙動および生態系における変

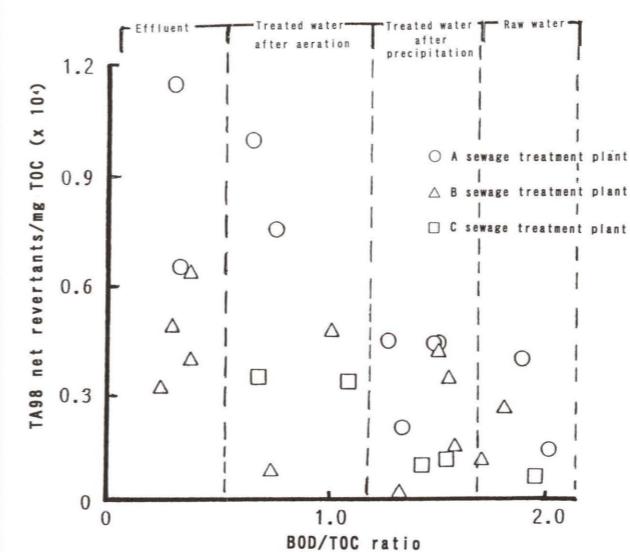


Fig. 9 Relationship between BOD/TOC ratio and mutagenic magnitude of TA98 against TOC of treated water in sewage treatment process

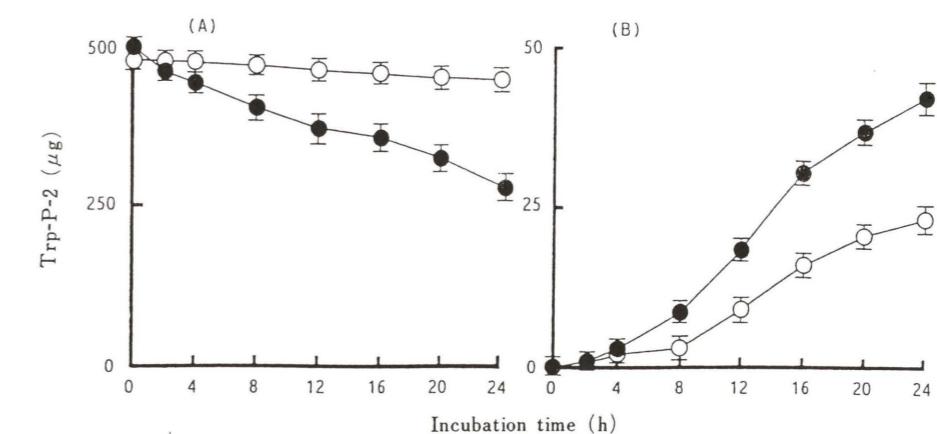


Fig. 10 Trp-P-2 contents in the medium (A) and the bacteria (B)

○: Zoogloea, ●: Zoogloea acclimated by Trp-P-2

Concentration of Trp-P-2: 5mg/l

Values are means \pm S.D. (n=3)

Trp-P-2 content in the medium without the bacteria was constant during the 24 h-incubation

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「環境汚染変異原」(企画:平山晃久)で発表された(座長:平山晃久、若林敬二)。

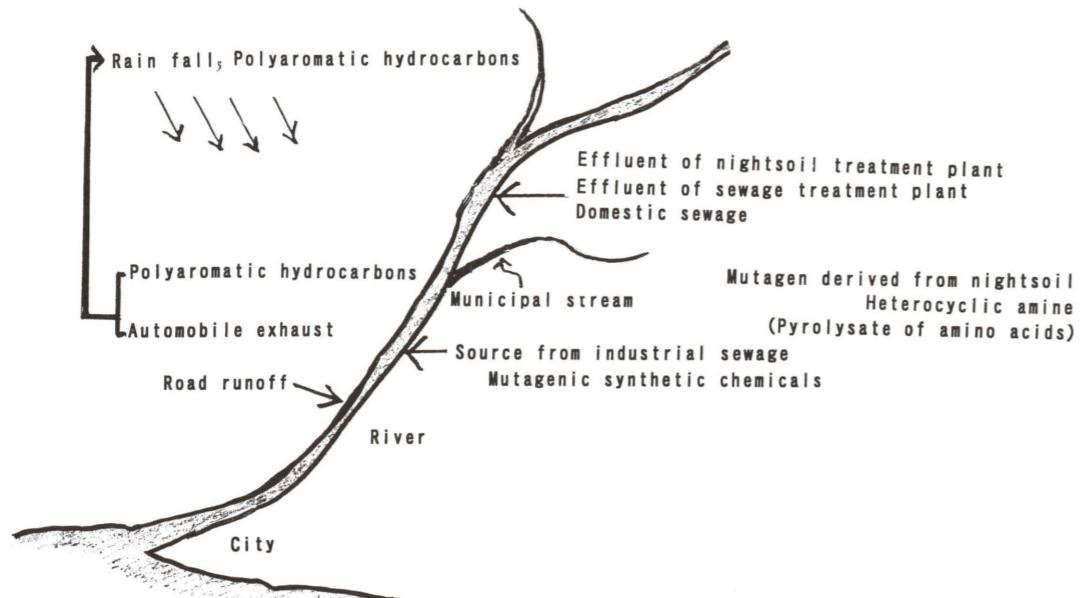


Fig. 11 Fate of mutagen in environment

異原物質の食物連鎖への移行を包括的にとらえる研究が期待される。

参考文献

- 加納芳直, 長井 章, 船坂鎌三, 中室克彦(1998)キャビラリーゾーン電気泳動による水中ヘテロサイクリックアミンの分析, 日本環境変異原学会第26回大会要旨集(Dec. 1997) p. 120.
- Maruoka, S. and S. Yamanaka(1982) Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* tester strains of XAD-2-ether extract, recovered from Katsura river water in Kyoto City, and its fr., Mutation Res., 102, 13-26.
- 長井 章, 加納芳直, 船坂鎌三, 中室克彦(1998)水中多環芳香族炭化水素類のブルーキチンカラムによる濃縮法の検討, 日本環境変異原学会第26回大会要旨集(Dec. 1997) p. 120.
- Nakamuro, K., Ueno, H. and Sayato, Y. (1989) Mutagenic activity of organic concentrates from municipal river water and sewage effluent after chlorination or ozonation, Wat. Sci. Tech., 21(12), 1895-1898.
- Nakamuro, K., Ueno, H. and Sayato, Y. (1992) Evaluation of mutagenicity of municipal river water concentrated using XAD resin column method, Wat. Sci. Tech., 25(11), 293-299.
- Nukaya, H., J. Yamashita, K. Tsuji, Y. Terao, T. Ohe, H. Sawanishi, T. Katsuhara, K. Kiyokawa, M. Tezuka, A. Oguri, T. Sugimura and K. Wakabayashi(1977) Isolation and chemical-structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakase River in Kyoto. Chem. Res. Toxicol., 10, 1061-1066.
- 大江 武(1995)O-アセチル転移酵素高生産株を用いた高感度umu テストによる河川水の遺伝毒性モニタリング, 環境変異原研究, 17, 237-246.
- Sakamoto, H. and H. Hayatsu(1990) A simple method for monitoring mutagenicity of water, Mutagen in Yodo river system, Kyoto-Osaka. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44, 521-528.
- Sayato, Y., Nakamuro, K., Ueno, H. and Goto, R. (1990) Mutagenicity of adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water, Mutation Res., 242, 313-317.
- 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野 仁, 丈達泰史, 後藤里花, 長谷川達也, 早津彦哉, 阪本 博(1991)水中変異原物質のブルーレイヨン及びXAD-2樹脂による前処理濃縮法の比較検討及び濃縮物の変異原特性, 衛生化学, 37(3), 197-204.
- 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野 仁(1992)都市河川水とその塩素およびオゾン処理水の変異原性に関する研究, 変異原性試験, 1(1), 18-27.
- Sayato, Y., Nakamuro, K., Ueno, H. and Goto, R. (1993) Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water, Mutation Res., 300, 207-213.
- 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野 仁(1993)Ames 試験による水質評価, 用水と廃水, 35(4), 311-319.
- 富田基郎, 真鍋 仁, 浜田 昭(1980)河川水およびその塩素処理水の変異原物質について—直接濃縮法による変異原物質濃縮の限界—, 水質汚濁研究, 3, 187-192.
- 内海英雄, 浜田 昭, 早津彦哉(1985)河川水中の変異原活性の流域および季節変動, 第19回水質汚濁学会講演集, 201-202.
- 浦野紘平, 篠目貴大(1987)多摩川河川水の変異原性, 第21回水質汚濁学会講演集, 249-250.

表層土壤の変異原性の実態

渡辺 徹志, 平山 晃久

京都薬科大学 〒607-8414 京都市山科区御陵中内町5

Mutagenic activity of surface soil

Tetsushi Watanabe and Teruhisa Hirayama

Kyoto Pharmaceutical University
5 Nakauticho Misasagi, Yamasina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

Summary

Twenty surface soil samples were collected at parks in Keihanshin area including Shiga, Kyoto, Nara, Osaka and Hyogo Prefectures, and organic extracts of the soil were examined by Ames test using *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. Most of the soil extracts showed mutagenicity toward TA98 with and without S9 mix, and several samples were mutagenic toward both TA98 and TA100. Organic extracts of soil from Sumiyoshi-ku and Minato-ku, Osaka City, and Higashinada-ku, Kobe City, showed strong mutagenicity in TA98 (12000-21000 revertants/g of soil) without S9 mix, and this activity was 10 times or more greater than that observed in the other soil samples. These results indicate that some sites are heavily contaminated with mutagens and that major mutagenic compounds contaminating surface soil might vary from site to site. In order to identify major mutagenic compounds in soil, 4.4 kg of surface soil was collected from the ground of a park in Sumiyoshi-ku, Osaka city. By Soxhlet extraction and repetitive separation using normal-phase and reversed-phase column chromatography, two mutagenic compounds (I and II) were isolated from the soil. These two compounds were identified as 1,6- and 1,8-dinitropyrene (DNP) isomers by comparing the mass and UV spectra and retention times of these compounds with those of authentic chemicals. In order to investigate the distribution of 1,3-, 1,6- and 1,8-DNP isomers in surface soil, we developed an efficient clean-up procedure and a sensitive quantification method using fluorescence detection. DNP isomers were detected in all soil samples from five parks in Osaka and neighboring cities and the amounts of DNP isomers in the soil samples were as follows: 1,3-DNP 0.04-2.65 ng/g, 1,6-DNP 0.07-3.07 ng/g, 1,8-DNP 0.45-3.66 ng/g. These results suggest that soils in Keihanshin area are largely contaminated with DNP isomers.

(This paper, in a session chaired by Teruhisa Hirayama and Keiji Wakabayashi, was presented to the symposium "Mutagenicity of environmental pollutants", organized by Teruhisa Hirayama, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Melparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords : surface soil, dinitropyrene, mutagenic activity

緒 言

大気中にはポイラ、焼却炉、自動車などからガス状物質あるいは粒子状物質として多種多様な化学物質が放

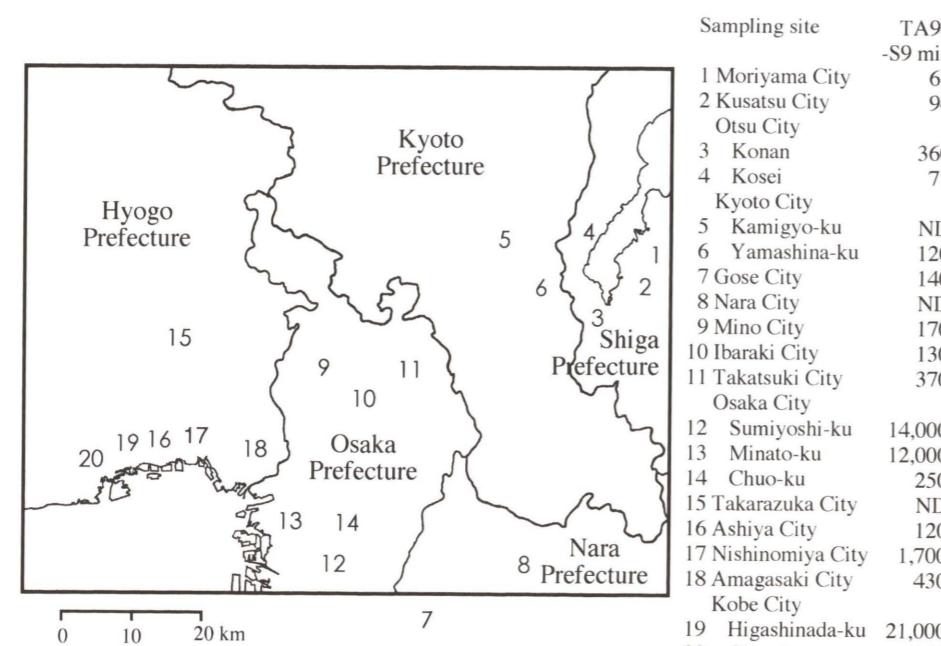


Fig. 1 Sampling sites of surface soil in Keihanshin area and mutagenicity of organic extracts of soil in *S. typhimurium* TA98 without S9 mix

出されており、それの中には多環芳香族炭化水素類や重金属類のような変異原・がん原物質も数多く含まれている。これら大気中に存在する浮遊粒子状物質などはやがて地表等に落下することから大気汚染の激しい地域では表層土壤の汚染度は高いと予想される。また浮遊粒子状物質の捕集に比べて表層土壤の採取が容易であることから、表層土壤の変異原性を調査することは変異原・がん原物質による環境汚染をモニタリングするうえで有効な手段であると考えられる。しかしこれまで土壤の変異原性に関しては、農薬などの使用や自動車排ガスによる汚染との関係から農耕地(Goggleman et al., 1982; Smith 1982; Brown et al., 1985)や幹線道路の道路端の土壤(西村ら 1984; 玉川ら 1985; Lim-Sylianco 1988; 荒谷ら 1992), あるいは工場関連施設や産業廃棄物処理場など高度に特定の化学物質によって汚染されている土壤(Brown et al., 1986; Donnelly et al., 1987; Jones et al., 1989; Donnelly et al., 1991; DeMarini et al., 1992; McDaniels et al., 1993)などについてそれぞれ数報の論文がある程度であり、公園などいわゆる一般住居地域の土壤(Knize et al., 1987)の変異原性に関する報告はほとんどなかった。著者らは変異原物質による環境汚染の実態を明らかにするため、1996年より京阪神地域を中心とした近畿地方の表層土壤の変異原性について調査してきた。その研究成果を含め表層土壤の変異原物質による汚染の実態について概説する。

1. 近畿地方の表層土壤の変異原性

表層土壤は1996年11月から1997年2月にかけて滋

賀県、京都府、奈良県、大阪府および兵庫県の公園等20ヶ所から採取し、それらのメタノール超音波抽出物についてサルモネラ菌TA 98株およびTA 100株に対する変異原性を試験した。TA 98株に対してほぼすべての土壤抽出物がS 9 mix存在下あるいは非存在下で変異原性を示したのに対し、TA 100株に対する活性はほとんどの抽出物でTA 98株より弱く、約3/4の試料がS 9 mix存在下でのみ明確な活性を示した。Fig. 1に表層土壤を採取した京阪神地域20ヶ所の採取地点とそれら土壤抽出物のTA 98株に対するS 9 mix非存在下での変異原活性を示した。表層土壤抽出物の変異原活性は試料の採取地域により大きな差がみられ、大阪市住吉区、港区、神戸市東灘区で採取した土壤抽出物では土砂1g当たり12000-21000 revertantsと他の地域の平均値と比較して10-100倍以上の高い活性を示した。

2. 土壤中の変異原物質の検索

土壤中に存在する変異原物質の構造を明らかにするため、変異原物質の単離を試みた(Watanabe et al., 1998)。試料は強い変異原性を示した大阪住吉区内の公園より採取し、土壤4.4 kgからアセトンを用いたソックスレー抽出により抽出物3.4 g(YG 1024 120 revertants/ μ g)を得た。抽出物をシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーで分画することにより、主変異原画分21 mg(YG 1024 9120 revertants/ μ g)を得た。この主変異原画分についてODS-カラムおよびシリカゲルカラムを用いたHPLC分取を繰り返すことにより主変異原物質IおよびIIを1 μ gおよび600 ng単離した。主変異原物質

IおよびIIは質量分析の結果(Fig. 2)から、dinitropyrene(DNP)類であると考えられ、フォトダイオードアレイ検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の結果、保持時間ならびにUVスペクトル(Fig. 3)の一致によりそれぞれ1,8-DNPおよび1,6-DNPと同定された(Fig. 4)。

Table 1に強い変異原性を示した大阪市住吉区、港区、西宮市、神戸市東灘区より採取した表層土壤抽出物のTA 98誘導体株に対する変異原性試験の結果を示す。各

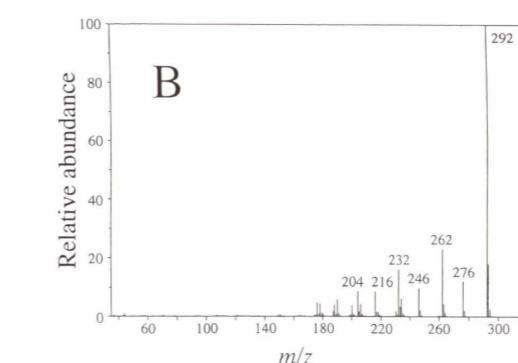
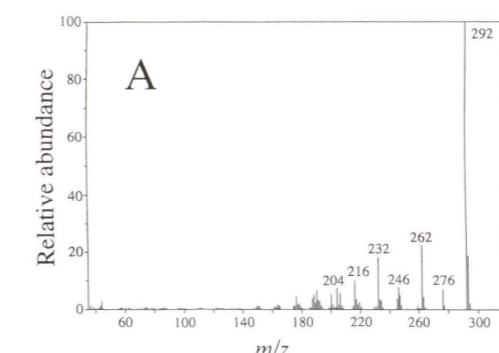


Fig. 2 Electron impact mass spectra of compound I (A) and compound II (B)

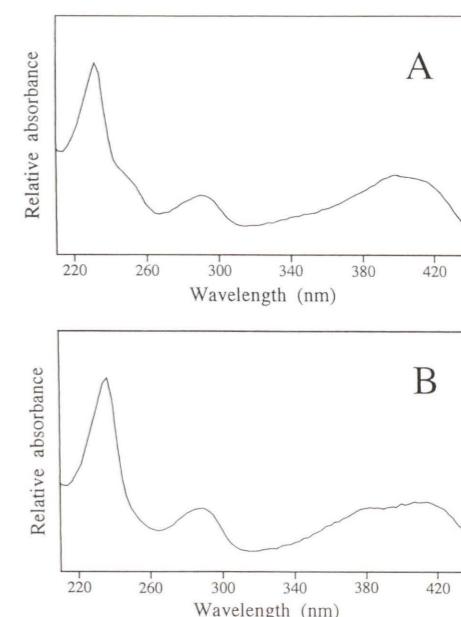


Fig. 3 UV absorption spectra of compound I (A) and compound II (B)

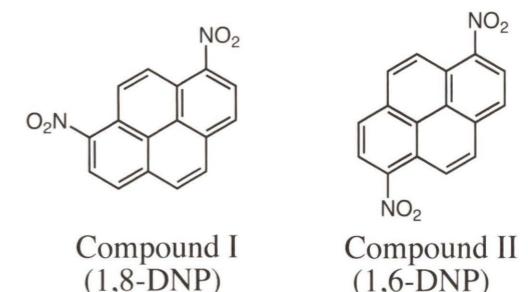


Fig. 4 Structures of compound I (1,8-DNP) and compound II (1,6-DNP)

Table 1 Yields and mutagenic characterization of organic extracts of soil from Osaka, Nishinomiya, and Kobe Cities

Sampling site	Sampling date	Yield ^a (mg)	His ⁺ revertants/g soil ^b			
			TA98	TA98NR	TA98/1,8-DNP _c	YG1021
Osaka city	Sumiyoshi-ku	December 16, 1996	9.7 (1.0) ^c	6700 (0.7)	4700 (0.1)	640 (3.0)
						20000 (22.7)
	Minato-ku	January 30, 1997	12.7 (1.0)	6000 (0.8)	4800 (0.1)	650 (3.1)
Nishinomiya city	January	30, 1997	12.5 (1.0)	1500 (0.8)	1200 (-)	ND ^d (2.1)
						3300 (24.6)
Kobe city	Higashinada-ku	January	16.6 (1.0)	10000 (0.7)	6900 (0.1)	700 (2.0)
						20000 (33.9)

^aThe organic extracts were obtained from 15 g of soil(<250 μ m) with an ultrasonic extractor

^bThe slope of the dose-response curve(revertants per gram of soil) was calculated by least-squares linear regression from the first linear portion of the dose-response curve

^cThe values in the parentheses show the ratio of mutagenicity in each strain and TA98

^dND means not detected

抽出物の TA 98 NR 株, TA 98/1,8-DNP₆ 株, YG 1021 株および YG 1024 株に対する変異原活性が TA 98 株に対する活性の 0.7–0.8, 0.1, 2–3 および約 20–40 倍と類似した比活性であったことから、大阪市住吉区以外の土壌も DNP 類を主変異原物質として含んでいると考えられた。

3. 土壌中の DNP 類の定量

大阪市住吉区の土壌についてさらに検討した結果、1,6-, 1,8-DNP 以外に 1,3-DNP も含まれていることがわかった。そこで DNP 類の土壌における分布と土壌の変異原性に対する寄与について明らかにするため、京阪

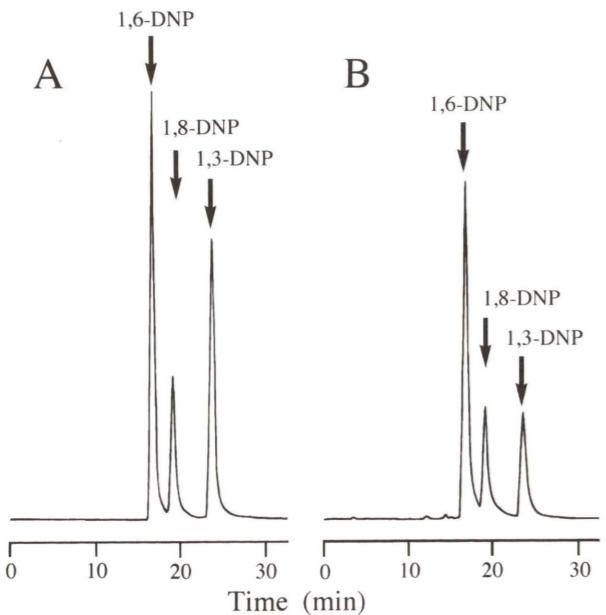


Fig. 5 HPLC profiles of DNP standards (A) and a purified fraction of soil extract (B). The extract was obtained from soil collected from the ground at Sumiyoshi-ku in Osaka City on April 19, 1997. The eluate was monitored by the fluorescence with excitation and emission wavelengths of 375 nm and 450 nm, respectively. The peak fractions corresponding to the retention times of catalyst reduced 1,3-, 1,6-and 1,8-DNP standards are indicated by arrows.

神地域などから採取した表層土壌について 1,3-, 1,6-および 1,8-DNP の定量を試みた (Watanabe et al., in press)。環境中の DNP 類の定量法としては大気粉塵や自動車排出ガスについてすでにいくつかの方法が開発されていたが、土壌抽出物はこれらの試料と比較してより複雑な混合物で妨害物質が多くそれらの定量法をそのまま適用することはできなかった。そのため以下のようない方法で定量した。すなわち土壌抽出物をシリカゲルカラムを用いて clean-up して得た DNP 画分をさらにポリメリックタイプならびにモノメリックタイプ 2 種類の ODS カラムを用いた HPLC 分取によってクリーンアップし、最終的に ODS カラムと還元 (白金/ロジウム) カラムを連結した HPLC に注入することにより DNP 類を diamino 体として蛍光を測定することとした。Fig. 5 に示すように DNP 類は良好に分離し、土砂抽出物についてもほとんど妨害なく定量することが可能であった。なお、土壌からの抽出過程を含めたクリーンアップ時の DNP 類の回収率は 94–97 % ときわめて良好であった。

土壤中の DNP 類の定量結果を Table 2 に示す。強い変異原性を示した大阪市住吉区の土壌中の DNP 類の濃度は約 2.5–3.5 ng/g であり、最も少ない松原市の土壌中からも 0.04–0.45 ng/g の濃度で DNP 類が検出された。またこれら DNP 類の土壌抽出物の TA 98 株における変異原性に対する寄与率はいずれの土壌でもおよそ 20–50 % 程度であった。以上の結果から表層土壌が広く DNP 類によって汚染されており、DNP 類は土壤中の主な変異原物質の一つであると考えられた。

4. 今後の課題

土壤中に高濃度で存在する DNP 類の発生源が何であるのか究明するとともに DNP 類の環境中での動態について調査する必要がある。一方、土壌抽出物の変異原性のすべてが DNP 類で説明できる訳ではないことから、土壤中に存在する未知の変異原物質の検索も行わなければならない。またこれまでの調査で表層土壌の変異原性が強い地域の存在が明らかになりつつあり、それらの汚染がそこで生活するヒトの健康や生態系に対してどのよ

うな影響を与えているか調査する必要がある。

謝 辞

本研究は環境庁委託研究費によって行われました。ここに記して感謝します。

参考文献

- 嵐谷奎一, 染谷 孝, 吉川正博, 児玉 泰 (1992) 道路堆積土砂中の多環芳香族炭化水素濃度と変異原活性, 大気汚染学会誌, 27, 190–197.
 Brown, K.W., K.C. Donnelly, J.C. Thomas, P. Davol and B.R. Scott (1985) Mutagenicity of three agricultural soils, Sci. Total Environ., 41, 173–186.
 Brown, K.W., K.C. Donnelly, J.C. Thomas, P. Davol and B.R. Scott (1986) Mutagenic activity of soils amended with two refinery wastes, Water, Air, Soil Pollut., 29, 1–13.
 Donnelly, K.C., P. Davol, K.W. Brown, M. Estiri and J.C. Thomas (1987) Mutagenic activity of two soils amended with a wood-preserving waste, Environ. Sci. Technol., 21, 57–64.
 Donnelly, K.C., K.W. Brown, C.S. Anderson and J.C. Thomas (1991) Bacterial mutagenicity and acute toxicity of solvent and aqueous extracts of soil samples from an abandoned chemical manufacturing site, Environ. Toxicol. Chem., 10, 1123–1131.
 Gogoleman, W. and P. Spitzauer (1982) Mutagenic activity in agricultural soils, In: H. Stich (Ed.), Carcinogens and Mutagens in the Environment Vol. 3, CRC Press, Orlando, FL, pp. 178–183.
 Jones, K.C. and R.A. Page (1989) Short-term mutagenicity bioassays applied to evaluating contaminated land, Chemosphere, 18, 2423–2432.
 Knize, M.G., B.T. Takemoto, P.R. Lewis and J.S. Felton (1987) The characterization of the mutagenic activity of soil, Mutat. Res., 192, 23–30.
 Lim-Sylianco, C.Y. (1988) Genotoxic studies of street soils in Quezon City, Philippines, Proc. ICMR Semin., 389–393.
 McDaniels, A.E., A.L. Reyes, L.J. Wymer, C.C. Rankin and G.N. Stelma, Jr. (1993) Genotoxic activity detected in soils from a hazardous waste site by the Ames test and an SOS colorimetric test, Environ. Mol. Mutagen., 22, 115–122.
 西村哲治, 後藤純雄, 加藤幸彦, 奥貫正美, 松下秀鶴 (1984) 東京都の土砂中の変異原性と BaP 含量, 大気汚染学会誌, 19, 228–238.
 Smith, J.W. (1982) Mutagenicity of extracts from agricultural soil in the Salmonella microsome test, Environ. Mutagen., 4, 369–370.
 玉川勝美, 高橋陽子, 三島靖子, 関 敏彦, 角田 行 (1985) 仙台市における道路堆積土砂の変異原性とベンゾ [a] ピレン含有量, 衛生化学, 31, 329–333.
 Watanabe T., S. Ishida, H. Minami, T. Kasai, S. Ogawa, K. Wakabayashi and T. Hirayama (1998) Identification of 1,6-and 1,8-dinitropyrene isomers as major mutagens in organic extracts of soil from Osaka, Japan, Chem. Res. Toxicol., 11, 1501–1507.
 Watanabe T., S. Ishida, M. Kishiji, Y. Takahashi, A. Furuta, T. Kasai, K. Wakabayashi and T. Hirayama (1999) HPLC/Fluorescence determination of dinitropyrenes in soil after column chromatographic clean-up and on-line reduction, J. Chromatogr., in press.

ダイオキシンの生体影響 —序論—

野村 大成

大阪大学大学院医学系研究科遺伝医学講座・放射線基礎医学 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

Introductory remarks on the *in vivo* effects of dioxins

Taisei Nomura

Department of Radiation Biology and Medical Genetics,
Graduate School of Medicine, Osaka University
2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

文明科学の進歩は、人類に多大の便宜と生活の向上をもたらし、正に我々はその榮華をほしいままにしている。しかし、この大いなる欲望の見返りに、母なる地球に多くの負担をかけることとなり、その創造力と消化力にも限界があることを知ることになった。一方、この大地に生まれ育ったすべての生命体は、これまでにさらされたことのない新しい環境や人工放射能、太陽紫外線、そしてダイオキシン等の新人為起源有害物質に曝露されることになり、その影響は、現在地球に住む我々自身のみならず、生殖細胞を通じて我々の子孫に伝達されることも懸念されている。

これら新人為起源有害物質のうちダイオキシンを中心にして、平成5年度より、文部省科学研究費重点領域研究「人間地球系」の計画研究「新人為起源有害物質」を発足させ、地球レベルでの情報収集と、最新の科学技術を用いて、放射線および人為起源有害物質の人体影響について総合的研究を行い、また平成9年度よりは、未来開拓研究推進事業「環境有害化学物質の人体影響評価技術の開発」により、SCIDマウスの改良によるヒト臓器・組織を用いた新たな実験法の開発、ダイオキシン類等の超微量迅速分析法の開発、微量有害汚染物質の影響評価と予防原則の経済学的分析を開始した。

本シンポジウムでは、「ダイオキシンの生体影響」についてオーガナイズするように求められているが、ダイオキシンの生体作用は、従来の環境変異原研究および、遺

伝学的研究とは性格を異にする部分が多く、明解な解答が得られていない。

今回は、この5年間に上記プロジェクトで得られた成果の中から特筆すべきものをいくつか選び出した。最初に、ダイオキシン類の迅速超微量検出法を開発し、人体の末梢血液20mlから微量のダイオキシン測定を可能にした摂南大学薬学部の宮田秀明教授に「ダイオキシン類の人体汚染の現状」について、続いて、ダイオキシンの生体作用には不明な点が多いが、比較的明確になってきた免疫細胞への作用の分子機構を東北大学加齢医学研究所の菊池英明助教授にお願いした。また、幸いなことに、国際癌研究機構J. M. Rice博士がダイオキシン類の発がん性についてのモノグラフを昨年(1997年)編集しているので、そのレビューをして頂くため、急遽招聘した。そして、ヒトにおいても最近問題となっている胎児毒性については、マウスを用いた永年の研究成果を「ダイオキシン類の発生毒性とその機序」と題して、広島大学医学部の安田峯生教授にお願いした。最後に、「ダイオキシンの遺伝的影響の問題点」については、旭川医科大学の上口勇次郎教授と大阪大学の石井裕助教授にヒト精子への作用、金沢医科大学総合医学研究所の井上雅雄講師にマウス精子への作用について講演して頂き、私がダイオキシンの継世代的影響についてこれまでの研究の経緯と問題点をまとめることにした。

受付: 1999年5月6日

受理: 1999年5月6日

©日本環境変異原学会

本稿は 1998 年 11 月 24-26 日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第 27 回大会のシンポジウム「ダイオキシンの生体影響」(企画: 野村大成) で発表された(座長: 野村大成、藤川和男)。

ダイオキシン類の人体汚染の現状

宮田 秀明

摂南大学薬学部 〒 573-0101 大阪府枚方市長尾峠町 45-1

Real situation of human exposure to dioxin analogues

Hideaki Miyata

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University
45-1 Nagaotoge-cho, Hirakara, Osaka 573-0101

Summary

All dioxin analogues composed of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and coplanar PCBs (Co-PCBs) are extremely toxic. Even at the environmental pollution level, there is evidence that they cause hormonal disturbance in women. It has also been pointed out that they can lead to immunosuppression and can alter gonadal functions in humans. Therefore, in recent years, various countries including Japan, U.S.A., Canada and European countries have actively taken measures to decrease environmental pollution levels of these chemicals.

Taking the above circumstances into consideration, and from a review of relevant articles published in Japan and elsewhere, this paper outlines the key biological and toxicological issues of this important area. The reports from this laboratory are also included in this review. In addition, risk assessment on recent human exposure to environmental dioxin analogues was carried out using a tolerable daily intake (TDI) approach. This paper also examines the rational for establishing the TDIs in Japan and in other countries.

(This paper, in a session chaired by Taisei Nomura and Kazuo Hujikawa, was presented to the symposium "Biological effects of dioxins", organized by Taisei Nomura, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords : dioxin analogues, pollution, tolerable daily intake, risk assessment

緒 言

昨今、「ダイオキシン」あるいは「ダイオキシン類」という言葉がマスコミ紙上を賑わせている。しかし、「ダイオキシン類」が正式な表現である。ダイオキシン類とはダイオキシン(ポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン, PCDDs), ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)およびコブ

受付: 1999 年 4 月 20 日
受理: 1999 年 5 月 2 日
©日本環境変異原学会

ラナー PCB(Co-PCBs)を含めた 3 種の化合物群の総称名である(Fig. 1 参照)。ただし、行政的には PCDD と PCDF をダイオキシン類と称して規制している。これらの化合物はいずれも塩素の置換位置や数の相違により多数の異性体が存在するが、現在、PCDD で 7 種、PCDF で 10 種および Co-PCB で 12 種の強毒性の異性体を対象として毒性評価が行われている。しかし、評価対象となる異性体間の毒性が最大 10 万倍も相違するため、最強毒性の 2,3,7,8-四塩化ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)に換算した 2,3,7,8-TCDD 毒性等価量(TEQ)を用いて影響評価が行われている。

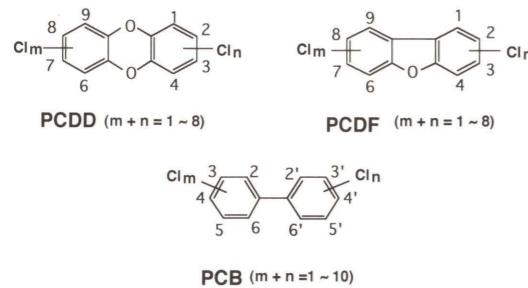


Fig. 1 Structures and numbering system of polychlorinated dibenz-p-dioxins(PCDDs), polychlorinated dibenzofurans(PCDFs) and co-planar PCBs(Co-PCBs)

ダイオキシン類はいずれも強毒性であり、現在の環境レベルの汚染で人体に生殖障害や免疫抑制などの影響を及ぼす可能性があるために、わが国はじめ欧米諸国において汚染軽減対策が進められている塩素系環境汚染物質である。これらの化合物は、一般環境中できわめて安定であり、土壤中で半量に分解される期間は約1年といわれている。発生源としては、ごみ、産業廃棄物および病院廃棄物の焼却施設、製鉄工場、非鉄工場、製紙工場、セラミック工場、セメント工場、自動車、塩化フェノール・塩化フェノールを中間原料とする化学工場、クリーニング工場、野焼きなど、実にさまざまなもののが諸外国の調査・研究で明らかにされている。

1. 耐容1日摂取量

ダイオキシン類は実にさまざまな障害を動物にもたらす。その障害は動物の種類によって異なるが、肝機能障害、腎臓機能障害、造血機能障害などの一般毒性、免疫機能障害、生殖機能障害、およびがんなどは共通して起こる。しかし、クロルアクネ、水腫、歯茎や爪のメラニン色素沈着、眼の脂漏などは、ヒトとサルで起こるが、ラットやマウスなどの齧歯類では認められない。したがって、サルはヒトに近い症状が起こる動物といえる。

これまでラットやマウスなどの齧歯類については実に多くの毒性研究が行われている。これらが総合的に考慮された結果、齧歯類に対して上記の障害を起こさない2,3,7,8-TCDDの投与量(無毒性量)は、1000 pg/kg/day (pg: 10^{-12} g)の超微量と判断されている。この無毒性量に基づいて、1996年6月、厚生省はPCDDとPCDFを対象とした耐容1日摂取量(Tolerable Daily Intake, TDI)を10 pgTEQ/kg/dayに設定した(Table 1)。すなわち、齧歯類の毒性データをヒトに適用するための不確実係数(安全係数)を100とし、無毒性量をこの不確実係数で割ることによりTDIの基準値が設定された。安全係数の見積もり方は各国で異なり、100-1000の範囲にある。したがって、それに伴ってTDIの基準値も1-10 pgTEQ/kg/dayと相違している。

Table 1 Standard values of tolerable daily intake(TDI) or Virtual safety dose (VSD) in various countries

Country or Organization	TDI or VSD (pgTEQ/kg/day)
Japan	10
Canada	10
WHO Europe office	1-4*
Netherlands	1
Sweden	5**
Germany	10
England	10
Italy	1
USA EPA	0.01***
USA California	0.007***
USA FDA	0.06***

*: Including Co-PCB

**: Actual 35 pgTEQ/kg/week

***: VDS

しかし、最近になり、ヒトに近縁種であるアカゲザルは齧歯類よりもダイオキシン類に対してはるかに敏感であることが重要視されてきた。不妊、流産などの生殖毒性は約10倍(Bowman et al., 1989)、子宮内膜症は約20倍も障害を受けやすい(Rier et al., 1993)。したがって、オランダはアカゲザルのデータを全面的に採用し、1998年、TDIを10 pg/kg/dayから1 pg/kg/dayに変更した(Table 1)。一方、WHOもわが国と同様に齧歯類のデータに基づいてTDIを10 pg/kg/dayとしていたが、1998年5月、アカゲザルのデータ、ホルモン擾乱作用およびその後の免疫抑制データなどを考慮して、TDIを1-4 pg/kg/dayに変更した。また、Co-PCBも規制対象物質としてダイオキシン類に含めることを決定した。これを受け、現在、わが国の厚生省および環境庁はダイオキシン類のリスク評価を再検討している。おそらくWHOに準じてTDIの基準値が変更される公算が強いものと思われる。

1996年、環境庁は環境行政を行うための指針値として、健康リスク評価指針値を5 pgTEQ/kg/dayに設定した。さらに、この値を指針値として、1997年、ダイオキシン類による健康影響を未然防止することを目的とした大気環境濃度の指針値を年平均0.8 pgTEQ/m³に決定している。一方、1977年、大気汚染防止法の政省令が一部改正され、TDIに基づいて廃棄物焼却施設や精鋼用電気炉における当面の排ガス基準値が設定された。

上記したように、現在、TDIの基準値の見直しが検討されているが、この中でTDIと健康リスク評価指針値は一本化されることになっている。したがって、TDIの基準値が変更された場合、上記した当面の排ガス基準値および大気環境濃度の指針値は、当然のことながら変更されることになる。

Table 2 Daily intake of dioxin analogues by adult at urban area in 1996

Route	Daily intake(pgTEQ/kg/day)			Ratio(%)
	PCDD+PCDF	Co-PCB	Sum	
Food(Kanto)	0.75	1.05	1.80	87.8
	0.70	1.19	1.89	88.4
	0.44	0.66	1.10	81.5
Air	0.195	0.0078	0.200	9.5-15.0
Water	0.00013	0.0013	0.0014	0.07-1.0
Soil	0.0448	Unknown	0.0448	2.1-3.3
Tokai(kanto)	0.99	1.06	2.05	100.0
	0.94	1.20	2.14	100.0
	0.68	0.67	1.35	100.0

米国の諸機関はダイオキシン類が遺伝毒性物質であり、その作用に「閾値なし」の立場をとり、多段階モデルを使用して 10^{-6} の発癌危険率の摂取量を実質安全量(VSD)とし、0.007-0.01 pg/kg/dayの値を設定しており(Table 1)，上記のTDIの値より100倍以上も低い。米国環境保護庁はこのVSDの値は提案値であるとしており、現在、発がん性以外に、非発がん性影響(生殖毒性、免疫抑制、ホルモン的作用など)も考慮し、最終的な基準値を設定するとしている。

2. 1日摂取量

1977-1990年当時、大都市在住者における食事、大気、飲料水および土壤を経由するPCDDとPCDFの1日摂取量は、体重1kg当たり3.72 pgTEQであり、この量はTDIの37%にすぎず、安全な範囲にある(宮田, 1997)。しかし、コプラナーPCBを含めた摂取量は12.4 pgTEQとなり、TDIを超過するものであった。しかし、1996年になると、食事経由のダイオキシン類摂取量が急減しており、コプラナーPCBsを合わせても約2 pgTEQにすぎない(Table 2)(宮田, 1999)。このような食事経由の極端な減少は、わが国の環境汚染が軽減したために起こったことではない。琵琶湖や大阪湾の底質コアにおける汚染濃度は1980年代に最高値を示し、そのまま横ばい傾向で現在まで続いている(Sakai et al., 1998)。1977-1990年に較べて1996年ではダイオキシン類摂取量が大きく減少している食事群は、魚介類、乳・乳製品、有色野菜、野菜・海草、果実である。これらの食事群を構成している食品の多くは、近年輸入食品が多くなっている(宮田, 1999)。一方、国産品を主体とする食事群の減少率は低い。このような結果から、ダイオキシン類の摂取量の減少は、輸入食品の増加が大きく関与していることが考えられる。近年、食料輸入率が増加しており、最近では輸入率が60%を越える状態が続いている。食事経由の主要なものは魚介類である。このような食料品の輸入率の増加とともに、魚介類についても汚染度の低いイカ、マグロ、エビなどの摂取割合が多くなっ

てきた。また、その他の食品についても、汚染度の低い開発途上国や、先進諸国であっても人口密度が低く、汚染度の軽度な国からの輸入量が増えており、従来よりも低濃度のものが多くなっていることが想定される。これらのことが食事経由の摂取量を大きく減少させる結果となっているものと判断される。

しかし、現在、急速な人口増(8000万人/年)、経済発展による発展途上国の食生活の変化(穀類食主体から肉食へ移行:穀物エネルギー換算で数倍に増加)、土壤の流損失、食糧生産の頭打ちなどが世界規模で起こっており(ブラン, 1998)、近い将来に地球規模で食糧枯渇の起こることが想定されている。したがって、わが国も食料輸入が困難になることは必須であり、結果的には自国の食料を多く摂取しなければならないことになる。1977-1990年の摂取量と較べた1996年の摂取量の急減とは、まさに逆の方向をたどることになる。こういう観点から、わが国の環境汚染軽減対策を可能な限り早急に進めることは、将来に向けての人体汚染を低減化するための必須の条件となる。

ドイツ、オランダなどの西欧諸国は経済発展に伴う大気汚染の影響は、北欧のスウェーデンのような遠隔地まで及び、湖沼が酸性化被害を受けていることは有名な事実である。同様なことは、今後、中国の急速な経済発展や工業発展に伴ってもたらされる可能性はきわめて高い。この場合、酸性雨だけではなく、ダイオキシン類の汚染被害も十分可能性がある。したがって、ダイオキシン類汚染の解決は今や一国の対策だけではなく、国際的な協力の下に汚染軽減対策を図る必要がある。そのため、中国に対してわが国の先進的な排ガス処理装置や技術を援助することや、また、環境汚染低減化の国際的意識を喚起することが、今後のダイオキシン類の汚染低減化にきわめて重要である。

3. 人体汚染

1) 一般者における汚染

ダイオキシン類は代謝されにくいために、人体内の生

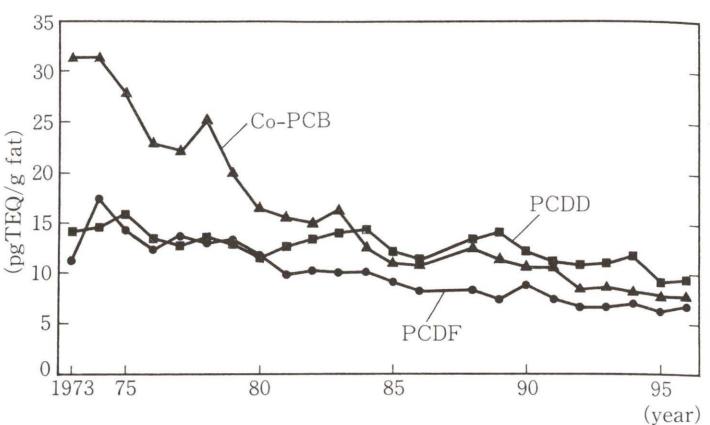


Fig. 2 Time trend of concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in breast milk

Table 3 Concentration of dioxin analogues in breast milk from various locations and daily intake by baby via breast milk

Location	Number	Concentration in breast milk (pgTEQ/g fat)			Daily intake by baby (pgTEQ/kg/day)	
		PCDD+PCDF	Co-PCB	SUM	PCDD+PCDF	PCDD+PCDF+Co-PCB
Akita	7	10.9	4.0	14.9	49.1	67.1
Sendai	7	11.4	5.2	16.6	51.3	74.7
Niigata	3	18.3	6.2	24.5	82.4	110.3
Hamamatsu	6	28.1	5.0	33.1	126.5	149.0
Yokohama	3	18.3	6.2	24.5	82.4	110.3
Fukuoka	15	15.0	18.0	33.0	67.5	148.5
Saitama	100	14.7	7.4	22.1	66.2	99.5

生物学的半減期はきわめて長く、血液中で4.1—11.3年、脂肪組織中で2.9—9.7年にもなる(宮田, 1997)。したがって、人体内蓄積濃度は加齢とともに増加する。しかし、女性においては出産後、体内蓄積のダイオキシン類は授乳により容易に排出される。1年間の授乳で体内蓄積量の約60%が乳児に移行することになる。同様なことはPCBでも明らかにされている。実例として、ドイツで血中(PCDD+PCDF)濃度が近似している2人の母親について、母乳保育と人工乳保育における乳児の蓄積濃度が明らかに相違することが報告されている(Abraham et al., 1994)。したがって、汚染影響上、最も問題視されるのが母乳経由による乳児の汚染である。

「1日摂取量」の項で述べたように、食事経由によるダイオキシン類の摂取量は輸入食品の増加により急減している。それを反映して、大阪府在住初産者の母乳中ダイオキシン類濃度は1973年から1996年にかけて経年的に減少している(Fig. 2)(堀, 1998)。PCDDsとPCDFsの合計濃度は、1970年代で最も高く、脂肪1g当たり約30pgTEQである。1996年では約15pgTEQと半減している。Co-PCBsはPCDDsやPCDFsに較べて、減少率がかなり大きい。1973年の31pgTEQに対して、1996年では8pgTEQと約4分の1にすぎない。このような汚染

推移は食事事情以外の環境要因もかかわるものと考えられる。日本をはじめ世界の多くの国は1970年代の初期にPCBsの生産、使用を中止した。その結果、環境庁の調査では、大阪湾、東京湾のスズキに残留するPCBsは、1970年代半ば以降80年代にかけて急減し、その後は横ばい状態で推移している(環境庁, 1991)。Co-PCBsはPCBsの一部の異性体であり、かつて使用されたPCBs製品中に約0.3—1%含まれている。したがって、このような環境中のPCBs濃度の低下が、Co-PCBsの主な人体汚染源である魚介類における汚染の低減化を加速したことでも、人体汚染が急減した理由の一つであると思われる。

しかし、上記のような状況にもかかわらず、最近における全国各地の母乳中(PCDDs+PCDFs)濃度(脂肪ベース)は14.9—33.1pgTEQ/kg/dayと高い(Table 3)(宮田, 1997)。この濃度を基に算出した母乳保育による乳児の1日摂取量は、出産1—2ヶ月間では49.1—126.5pgTEQ/kg/dayとなり、TDIの5—13倍に相当する。Co-PCBを含めるとTDIの7—15倍にもなる。また、TDIがWHOの基準値に準じて改正されると、超過率は17—37倍に達する。

このような摂取量は、各地の平均母乳濃度を基準にしたものである。しかし、最高母乳濃度を基準にすると、

Table 4 PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in human blood from various countries (pgTEQ/g fat)

Country Location	Japan* Ibaraki	Japan* Ibaraki	Japan Fukuoka	Japan Fukuoka	Japan Fukuoka	Germany Duisburg Simmerath
Year	1996	1996	1996	1993	1991-92	1996
Number	22	11	4	60	3	61
Sex	Man	Woman	Man	Woman	Unknown	Woman
Age	47(23-66)	54(30-72)	40-46	20(18-29)	Adult	31(25-35)
PCDDs	51(20-174)	81(6.5-440)	15	10(4.8-19)	14(11-15)	12(3.5-28)
PCDFs	17(1.4-46)	10(1.0-11)	14	7.1(2.9-12)	11(8-12)	11(5.0-24)
PCDDs+PCDFs	81(34-200)	149(22-463)	29	17(7.7-32)	24(20-27)	23(8.6-53)

Country Location	Germany	USA	USA Guam	Russia St. Petersburug	Vietnam North	Vietnam South
Year	1994	1996	1991-92	1980-91	1980-91	1980-91
Number	134	100**	10	60**	82	383
Sex	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
Age	40(22-69)	Adult	>40	>40	>40	>40
PCDDs	11(2.6-279)	20.1	21	11	7	26
PCDFs	8.5(11-26)	7.5	7	6	8	10
PCDDs+PCDFs	19(14-53)	27.6	28	17	15	36

Figures in the parenthesis show minimum to maximum

*: residents close to municipal solid waste incinerator

**: pooled sample

福岡県と埼玉県の乳児の摂取量は、225と360pgTEQ/kg/dayときわめて高い。一方、人工乳保育児に較べて母乳保育児はアトピー性疾患の発症率が高いと15,800人の思いだし調査報告もある(厚生省, 1995)。このように母乳汚染は深刻な状態であるが、一方では、母体からの有用な栄養素・免疫抗体の補給やスキンシップによる精神的発育の促進など利点もあり、母乳保育が推奨されている。しかし、その根拠となる科学的な研究成果はきわめて少ない。したがって、母乳と人工乳保育児について疫学調査を早急に実施し、それに基づいて母乳の安全性を科学的に判断する必要がある。甲状腺ホルモンのチロキシンは胎児の成長や脳細胞の発育に不可欠である。しかし、1996年、福岡県下に在住する一般者において、ダイオキシン類濃度が高い母親の新生児ほど、血中チロキシン濃度が低い傾向になること、および免疫細胞の構成比率がアトピー性皮膚疾患型のものに近づくことが報告された(Nagayama et al., 1996)。また、環境汚染レベルのダイオキシン添加飼料を投与することにより、アカゲザルに顕著な生殖障害や子宮内膜症が起こる(Bowman et al., 1989)。したがって、米国では500万人以上の女性の不妊症者がおり、その30—40%が子宮内膜症に起因していることから、その発症因子としてダイオキシン類の可能性が強く指摘されている。

2) 茨城県新利根村城取清掃工場の周辺地域における汚染
茨城県新利根村には焼却能力が15トン/日のバッチ式

焼却炉を4基有する城取清掃工場があり、1973年以来稼働している。しかし、1980年半ば以降の10年間は処理能力を超過したごみを処理するため、重油等の補助燃料が使用され強制的に焼却し、異臭を伴う黒煙を排出する燃焼不完全な焼却状態が続いている。このような特殊な焼却処理により清掃工場周辺の住民は、高濃度のダイオキシン類汚染を受けていることが明らかとなった(宮田ら, 1998)。

Table 4は、城取清掃工場周辺の住民(男性22人、女性11人)および世界各国の住民(Matsueda et al., 1996, Nagayama et al., 1995, Masuda et al., 1996, Dolgner et al., 1996, Papke et al., 1994, Shector et al., 1996, Shector et al., 1992)における血中のPCDDsとPCDFs濃度を示したものである。周辺住民における男性と女性の血清脂肪1g当たりのPCDDs濃度は、それぞれ20—174および6.5—440pgTEQであり、個人的にはかなり相違している。その平均値は、51および81pgTEQである。加齢とともにPCDDs濃度は増加することが指摘されているため、Table 4に示す福岡の青年女子(平均20歳)のデータを除外すると、先進諸国における一般成人の濃度は11—21pgTEQと判断される。この濃度と比較すると、周辺住民は男性で2.4—4.6倍、女性で3.9—7.4倍も重度に汚染されている。しかし、周辺住民の平均PCDFs濃度は男性で17pgTEQおよび女性で10pgTEQであり、先進諸国7.1—14pgTEQに較べて、男性で若干高く、女性ではほぼ同程度である。したがって、周辺住民はPCDDsに顕著な汚染を受けている。

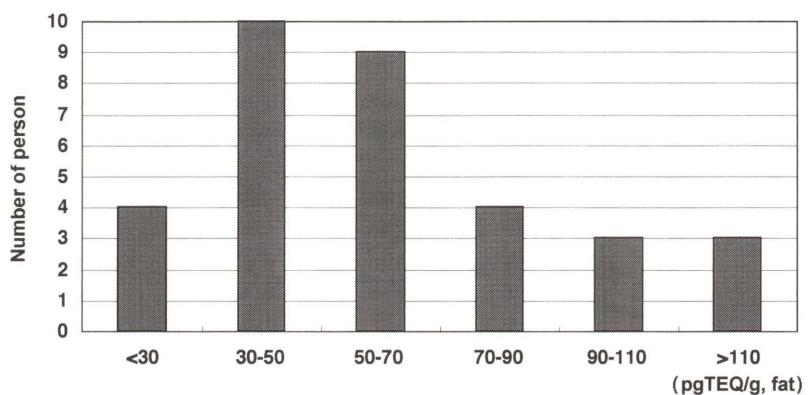


Fig. 3 Distribution of pollution level of PCDDs and PCDFs in residents close to municipal solid waste incinerator in Ibaragi prefecture

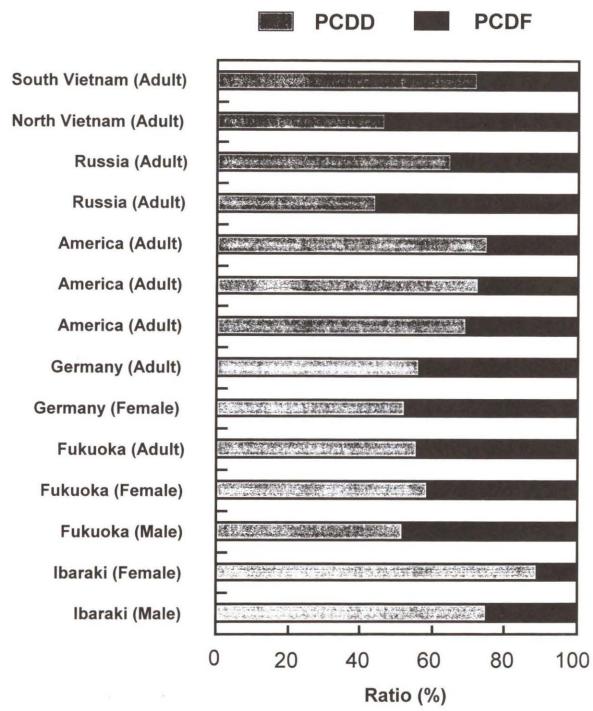


Fig. 4 Distribution of PCDDs and PCDFs in total TEQ level in blood samples from various countries

一方、PCDDs と PCDFs の合計濃度の平均値は周辺住民の男性で 81 pgTEQ と女性 149 pgTEQ となる。先進諸国における一般者の濃度は 19—28 pgTEQ、ロシアや北ベトナムは 15—18 pgTEQ である (Table 4) ことから、周辺住民の男性と女性の汚染濃度は、先進諸国の約 3—4 倍および約 5—8 倍、また、ロシアや北ベトナムの約 5 倍および 9 倍にもなる (Table 4)。Table 4 に示す結果から、先進諸国における一般者の最高汚染濃度は約 50 pgTEQ と判断される。今回調査した 33 人の中、一般者の最高濃度である 50 pgTEQ 以下の人数は 14 人、それを超過する人数は 19 人にもなる (Fig. 3)。このよう、こと高率の超過頻度からも周辺住民は高濃度の汚染を受けていたことが強調される。

参考文献

- Abraham, K., O. Papke, M. Ball, A. Lis and H. Helge (1994) Concentration of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in blood fat of a breast-fed and a formula-fed infant, *Organohalogen Compounds*, 21, 163-165.
 Bowman, R.E., S.L. Schantz, N.C.A. Weerasinghe and M.I. Luster (1989) Chronic dietary intake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) at 5 or 25 parts per

- million in the monkey, *Chemosphere*, 18, 243-252.
 Dolgner, R., U. Ranft, J. Abel and C. Vogel (1996) A comparison of polychlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans concentration patterns in outdoor air and human blood, *Organohalogen Compounds*, 30, 76-79.
 堀伸二郎 (1998) 汚染物質の食品を介した暴露、日本食品化学会第 9 回食品化学シンポジウム講演要旨集 (大阪), pp. 25-30.
 環境庁 (1991) 平成 2 年度版化学物質と環境, pp. 326-327.
 厚生省 (1995) 平成 4 年度アトピー性疾患実態調査報告書.
 Masuda, Y., A. Shector and O. Papke (1996) Concentration of PCBs, PCDDs and PCDFs in the blood of Yusho patients and toxic equivalent concentration, *Organohalogen Compounds*, 30, 146-149.
 Matsueda, T., H. Hirakawa, T. Iida and M. Nakamura (1996) Concentration of PCDDs/PCDFs and coplanar PCBs in human skin lipids obtained from underwear, *Organohalogen Compounds*, 30, 150-153.
 宮田秀明 (1997) ダイオキシン類の環境汚染とリスク評価、廃棄物学会誌, 8, 301-311.
 宮田秀明, 中尾晃幸, 青笹 治, 太田壯一 (1998) パッチ式一般固体廃棄物焼却炉周辺地域におけるダイオキシン類汚染実態の究明 (第 4 報), 環境科学会 1998 年会講演要旨集 (東京), pp. 18-19.
 宮田秀明 (1999) ダイオキシン、岩波書店, pp. 160-170.
 Nagayama, J., T. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda, H. Tsuji and K. Okumura (1996) Effects of lactational exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on lymphocyte subpopulations and thyroid functions in Japanese babies, *Organohalogen Compounds*, 30, 228-233.
 Nagayama, J., M. Nagayama, T. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda and T. Yanagawa (1995) Concentrations of chlorinated dioxins and related compounds in the blood and their genotoxicity in Japanese young women, *Organohalogen Compounds*, 25, 117-122.
 Papke, O., M. Ball, A. Liss and J. Wuthe (1994) PCDD/PCDFs in humans, Follow-up of background data for Germany, 1994, *Chemosphere*, 32, 575-582.
 Shector, A., O. Papke and P. Furust (1996) Is there a decrease in general population dioxin body burden? A review of German and American data, *Organohalogen Compounds*, 30, 57-60.
 ブラウン, L.R. (編著), 浜中裕徳 (監訳) (1998) 1998~99 地球白書、ダイヤモンド社.
 Rier, S.E., D.C. Martin, R.E. Bowman, W.P. Dmowski and I. L. Becker (1993) Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21, 433-441.
 Sakai, S-L., S. Deguchi, S. Urano, H. Takatsuki, K. Mugumi and T. Sato (1998) Time trend of PCDDs/PCDFs in sediments from Osaka Bay and Lake Biwa, *Organohalogen Compounds*, 39, 359-362.
 Shector, A., O. Papke, M. Ball, M. Grachev, A. Beim, V. Koptug, H.D. Cau and L.C. Dai (1992) Dioxin and dibenzofuran levels in human blood samples from Guam, Russia, Germany, Vietnam and the USA, *Chemosphere*, 25, 1129-1134.

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「ダイオキシンの生体影響」(企画:野村大成)で発表された(座長:野村大成、藤川和男)。

ダイオキシンの生体作用の分子機構

菊池 英明

東北大加齢医学研究所遺伝子機能研究分野 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町4-1

Molecular mechanism of dioxin toxicity

Hideaki Kikuchi

Tohoku University, Institute of Development, Aging and Cancer, Department of Molecular Genetics, 4-1 Seiryou-machi, aoba-ku, Sendai 980-8575

Summary

TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) is a prototype halogenated aromatic hydrocarbon, and it is considered to be one of the most potent toxicants ever studied. The adverse biological effects of TCDD seen in experimental animals include immune, reproductive, and developmental toxicity, carcinogenicity, wasting syndrome, chloracne, and lethality. In order to clarify the immunotoxicity of TCDD, we developed a cell culture system derived from human T cell leukemia, that provides unique advantages for studying the toxic responses and the molecular mechanisms underlying the action of TCDD. We proposed a hypothetical model to explain the multi-aspects of toxicity of TCDD. A ligand-independent Ah receptor-activation pathway may play an important role in some developmental stages. Therefore, exogenous ligands for Ah receptor such as TCDD may mimic the physiological signal transductions. The toxicity of TCDD may be caused by inducing abnormal signaling.

(This paper, in a session chaired by Taisei Nomura and Kazuo Fujikawa, was presented to the symposium "Biological effects of dioxins", organized by Taisei Nomura, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords: dioxin, Ah receptor, omeprazole, apoptosis, human T cell leukemia

緒 言

ダイオキシン類化合物の生体毒性は多様な側面を持っている。一般毒性としては、体重減少(消耗性症候群)、胸腺萎縮、肝臓代謝障害、心筋障害、性ホルモンや甲状腺ホルモン代謝ならびにコレステロール等脂質代謝への影響、皮膚症状としての塩素ざ瘡(クロロアクネ)、中枢神経症状などである(Huff et al., 1994)。また、これら

の一般毒性をさらに分類すると、口蓋裂や水腎症などの奇形性、発癌性、生殖毒性、免疫毒性などに分けられる(Table 1)。したがって、全体の作用機構の解明には、多くのことが明らかにされなければならない。ここでは、発癌の研究から進んできたダイオキシンの作用機構と、免疫毒性の作用機構に関して、主に我々の研究データを中心に解説する。

1. 発癌におけるダイオキシンの役割

ベンゾ[a]ピレンなどのアリルハイドロカーボンによる発癌の過程は、第一相反応と第二相反応過程に分けられる。第一相反応過程では、チトクローム P-450(CYP)に

受付: 1999年3月18日

受理: 1999年4月9日

©日本環境変異原学会

Table 1 Toxicity of dioxin compounds

- General toxicity, Wasting syndrome, Thymic atrophy, Affected functions of metabolism in liver, Cardiotoxicity, Effect on steroid hormone, thyroid hormone and lipid metabolism, Chloracne, Neurotoxicity
- Teratogenicity Cleft palate, Hydronephrosis
- Carcinogenicity Hyperplasia of hepatocytes, Hepatoma, Lung squamous cell carcinoma in rat
- Reproductive toxicity Endocrine disruption, Decreased fertility, Endometriosis
- Immunotoxicity Thymic atrophy, Impaired cellular immune response against infection of virus, bacteria, and parasite

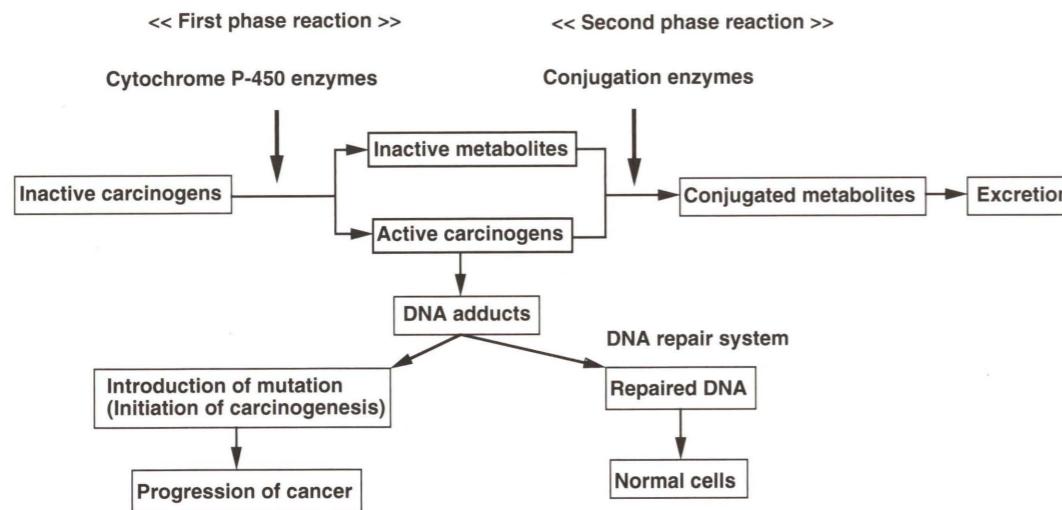


Fig. 1 Role of drug metabolizing enzymes in chemical carcinogenesis

より、化合物が水酸化反応を受け、第二相反応では硫酸抱合やグルクロン酸抱合反応により親水性の化合物になって排泄されるという解毒機構である(Fig. 1)。この第一相反応におけるチトクローム P-450 の分子種のうち特に CYP1A1 は広い基質を認識し、NADPH からの電子伝達系を介して酸素分子を化合物に付加する重要な役割を担っている。この CYP1A1 は、多くの組織で発現が誘導されるが、通常はほとんど発現していない(Nebert and Gonzalez, 1987)。CYP1A1 の誘導発現に関しては、多くの研究者によって Ah レセプター(ダイオキシン受容体)を介した機構が明らかにされてきた(Fig. 2) (Okey et al., 1994, Swanson and Bradfield, 1993)。体外から取り込まれたアリルハイドロカーボンは、細胞質で 90 kDa heat shock protein (HSP 90) と結合して不活性化されている Ah レセプターと結合することにより活性化され、核へ移行して Ah receptor nuclear translocator (ARNT) とヘテロダイマーを形成する。この活性型転写因子は、CYP1A1 遺伝子の調節領域にある

xenobiotics responsible element-1 (XRE-1) と結合することによって CYP1A1 の転写を活性化する。ダイオキシン類化合物のなかでも、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) が最も強力な、CYP1A1 の誘導物質であり Ah レセプターに対する親和性が高い物質として知られている。このことが、発癌の初期過程におけるダイオキシン類化合物の役割として明らかにされている重要な部分である。

ところが 1992 年以来、Ah レセプターとは結合しないが CYP1A1 を誘導発現する、ベンズイミダゾール構造を持つ化合物(Fig. 3)が報告されるようになってきた (Daujat et al., 1992)。さらに、これらの化合物による CYP1A1 の誘導は、ヒトの培養細胞に誘導発現するが、マウス培養細胞では誘導されないことを我々は見出した (Kikuchi et al., 1995)。Fig. 4 に示すように、ヒト肝癌細胞(HepG2)、ヒト大腸癌細胞(Caco-2)、ヒト乳癌細胞(MCF-7)には omeprazole によって CYP1A1 が誘導されるが、マウス肝癌細胞(Hepa-1)、マウス肝細胞由来

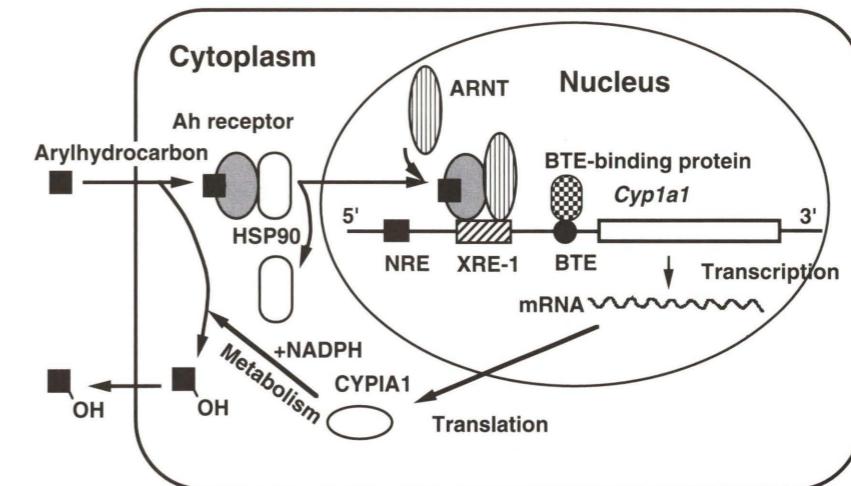


Fig. 2 Hypothetical model of CYP1A1 induction by Ah receptor

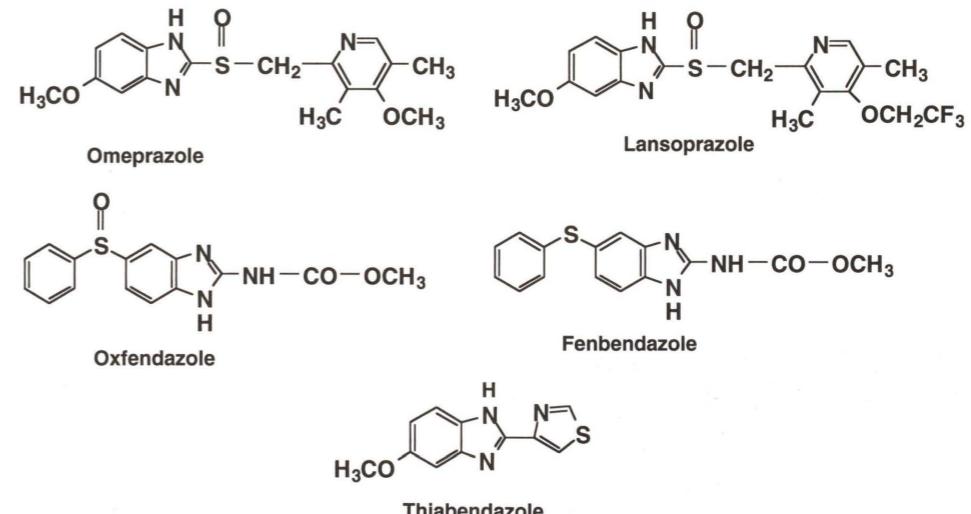


Fig. 3 Structures of benzimidazole compounds

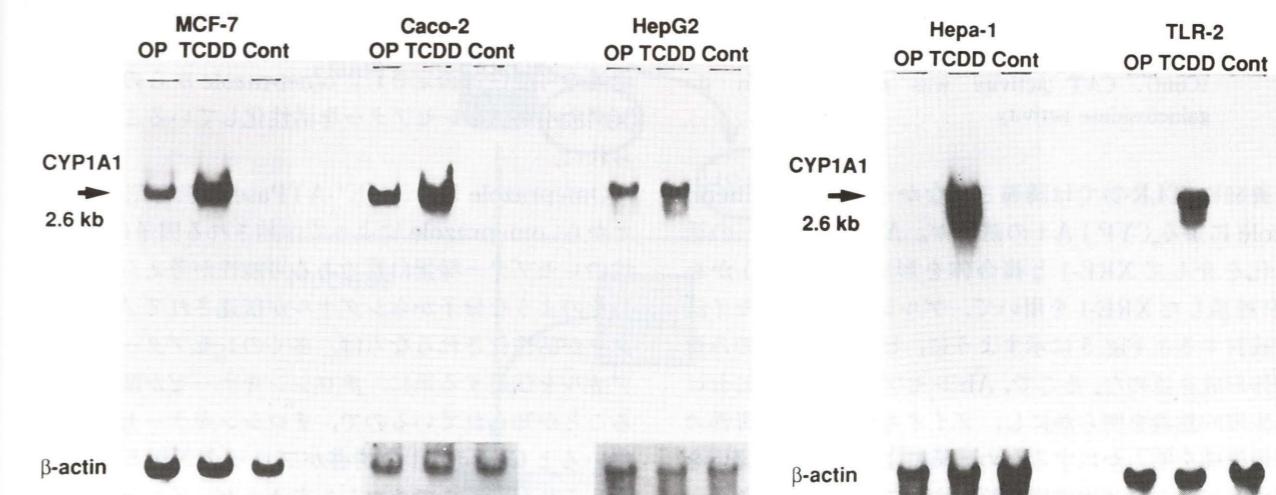


Fig. 4 Induction of CYP1A1 by omeprazole in human cells but not in mouse cells. Total RNA was isolated from MCF-7, Caco-2, HepG2, Hepa-1 and TLR-2, treated for 24 h with 2 nM of TCDD (TD) or 50 μM omeprazole (OP), or remained untreated in controls (Cont)

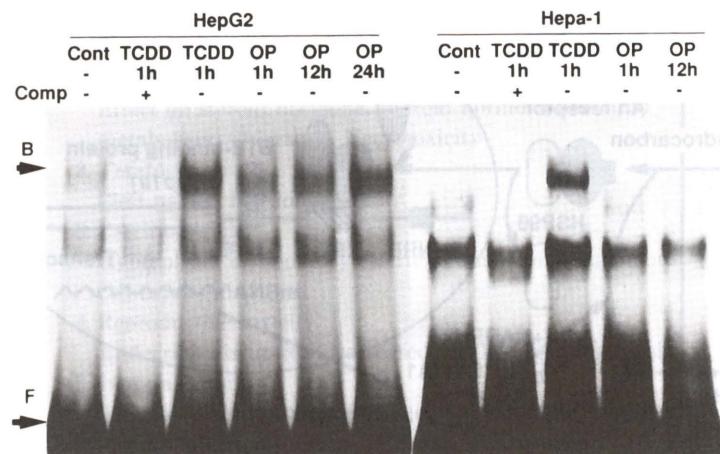


Fig. 5 Gel shift assay of omeprazole treated human and mouse cells. Nuclear extracts were prepared from HepG₂ cells or Hepa-1 cells grown without inducer (Cont), or with 2 nM TCDD for 1 h (TCDD), or with 100 μ M omeprazole (OP) for the various times indicated in the figure

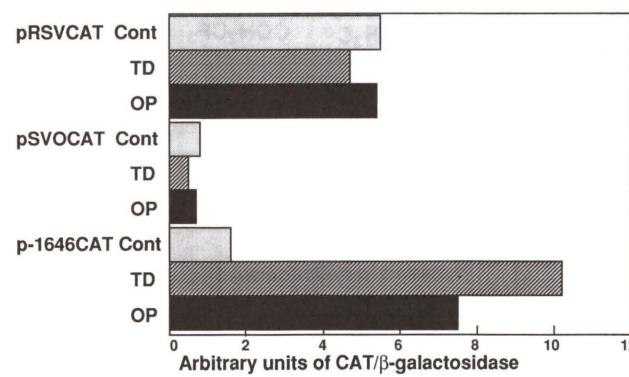


Fig. 6 Expression of CAT activity in HepG₂ cells transfected with mouse *Cyp1A1*-CAT fusion gene. HepG₂ cells (1×10^6) were transfected with 5 μ g of test plasmid and 1 μ g of pCAGGS-*lacZ*. The cells were treated for 24 h with 2 nM TCDD (TD), 50 μ M omeprazole (OP) or remained untreated in controls (Cont). CAT activity was normalized by β -galactosidase activity

培養細胞(TLR-2)では誘導されなかった。このomeprazoleによるCYP1A1の誘導が、Ahレセプターの活性化を介してXRE-1と複合体を形成するかどうかを³²P標識したXRE-1を用いて、ゲルシフト・アッセイ法で検討するとFig. 5に示すように、ヒトの細胞でのみ複合体形成を認めた。そこで、Ahレセプターの生体における生理的意義を明らかにし、ダイオキシンの生物毒性の作用機構を明らかにするため、種による誘導性の違いを利用して、その誘導機構を解明することを試してきた。

マウスとヒトにおけるomeprazoleによるCYP1A1の誘導性の違いとしてまず想定される理由は、1) CYP1A1の調節領域の配列の違い、2) Ahレセプターの構造上の違い、3) ヒトとマウスの細胞におけるomeprazoleの代謝産物が異なり、ヒト細胞における代

謝産物がAhレセプターのリガンドとなる、という可能性が考えられた。1)の可能性を検証するため、ヒト HepG₂細胞にマウスの調節領域を、chloramphenicol acetyltransferase (CAT)遺伝子につないだものをレポーターとしてトランスフェクトした。Fig. 6に示されるように、マウスの調節領域の配列は、ヒト HepG₂のなかで働くことが明らかになった。また、ヒト Ahレセプター遺伝子を、マウス Hepa-1細胞の Ahレセプターを欠損した変異細胞 CL-19に導入し発現させたところ、TCDDによる処理にのみ反応してCYP1A1を誘導したことから、2)の可能性も否定された。さらに、ヒト HepG₂細胞の培地にomeprazoleを加え、24時間培養したconditioned mediumを、マウス Hepa-1細胞の培地に加えた実験ではマウス Hepa-1細胞にはCYP1A1が誘導されなかった(Kikuchi et al., 1996)。これらのことから前述の可能性は否定され、omeprazoleからの何らかのシグナルがAhレセプターを活性化していると考えられた。

omeprazoleは、H⁺/K⁺-ATPaseの阻害剤であることから、omeprazoleによって作動される因子は、膜結合性のレセプター様蛋白質である可能性が考えられた。もしそのような分子からシグナルが伝達されてAhレセプターが活性化されるならば、多くのレセプターからのシグナルを伝達する系に、チロシンキナーゼが関与していることが知られているので、チロシンキナーゼ阻害剤を用いるとCYP1A1の誘導がブロックされる可能性が考えられた。そこでチロシンキナーゼ・インヒビターの効果を、ヒト HepG₂細胞を用いて、omeprazoleによる誘導とTCDDによるCYP1A1誘導の性質を比較した(Kikuchi et al., 1998)。チロシンキナーゼの阻害剤としてherbimycinを用いた実験では、omeprazoleによるCYP1A1の誘導は完全にブロックされたが、TCDDに

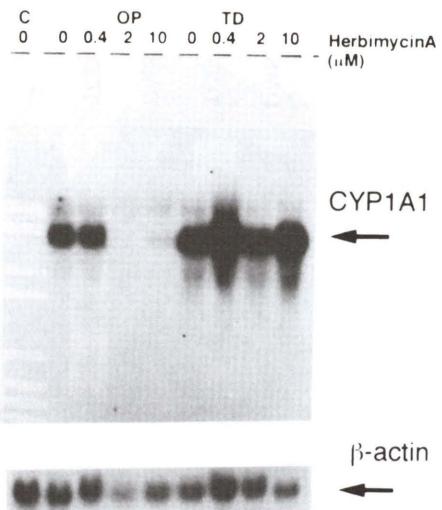


Fig. 7 Effect of herbimycin-A on the induction of CYP1A1. Total RNA was isolated from HepG₂ cells (approximately 1×10^6 cells) that had been treated for 2 h with herbimycin-A and then either treated for a further 24 h with 2 nM TCDD (TD) or 200 μ M omeprazole (OP) or left untreated as controls (Cont)

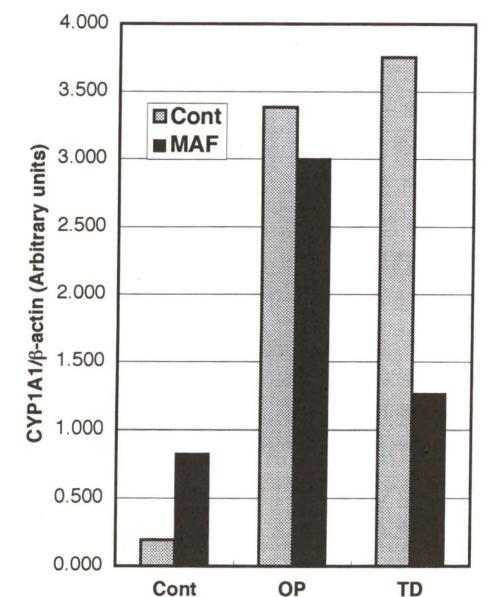


Fig. 8 Effect of 3'-methoxy-4'-aminoflavone (MAF) on CYP1A1 induction in HepG₂ cells. Total RNA was isolated from HepG₂ cells that had been treated for 2 h with 1 μ M MAF, and then either treated for a further 24 h with 200 μ M omeprazole (OP) or 4 nM TCDD (TD) or left untreated as controls (Cont)

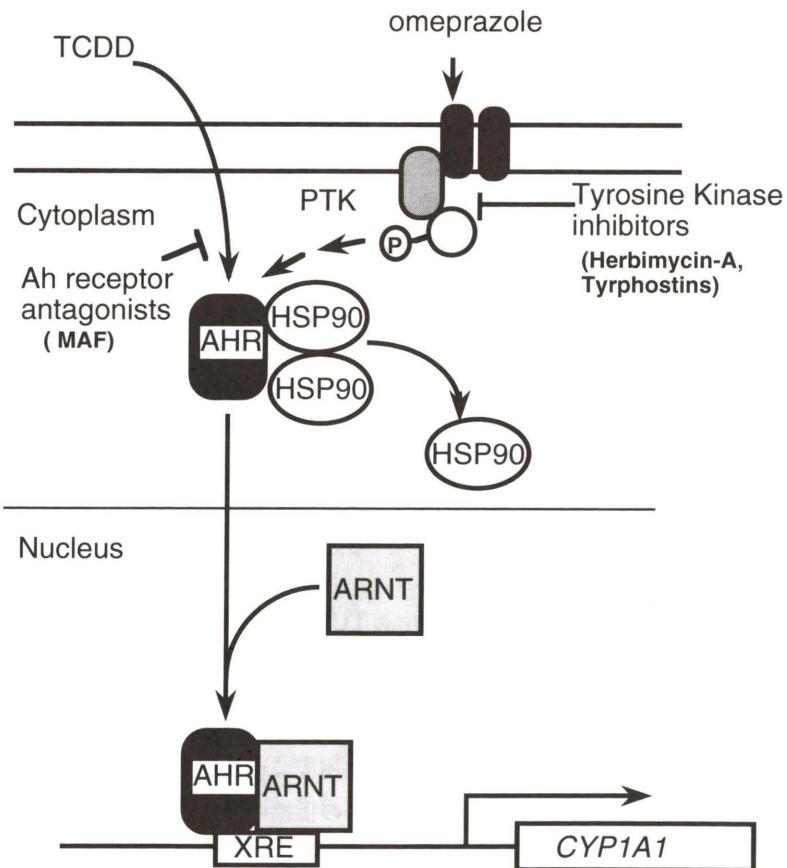


Fig. 9 Hypothetical model of CYP1A1-induction by omeprazole and TCDD

よる誘導はほとんどブロックされていないことが示された(Fig. 7)。

Ah レセプターのリガンドの構造誘導体の中に、Ah レセプターに結合するが、その後の活性化を阻害し、CYP 1 A 1 の転写活性を誘導できなくなる化合物、いわゆるアンタゴニストがある。もし、オメプラゾールによる CYP 1 A 1 の誘導がリガンド非依存性であるなら、アンタゴニストによる阻害を受けないと思われる。そこで、Safe らによって開発された 3'-methoxy-4'-aminoflavone (MAF) (Lu et al., 1995) を処理したヒト HepG 2 細胞を用いて、omeprazole による CYP 1 A 1 の誘導と、TCDD による誘導を比較した(Fig. 8)。Omeprazole による CYP 1 A 1 の誘導は、ほとんど影響を受けていないことが明らかとなった。これらのことから、TCDD による活性化の経路とリガンド非依存性のオメプラゾールによる活性化の経路が存在することが示唆された(Fig. 9)。

このようなオメプラゾールによる活性化経路の、生物学的な意味が何であるかはまだ不明であるが、Ah レセプターは転写因子であり、bHLH と PAS ドメインの構造を持つ一群の転写因子ファミリーの一つである。これらの因子の中で、リガンドの結合によって活性化されることが示されているのは、Ah レセプターしか知らない。したがって、本来の活性化経路はリガンド非依存性の経路であると考えることもできる。

このようなことから、オメプラゾールからのシグナル伝達系および Ah レセプターの活性化、そして標的遺伝子 CYP 1 A 1 の発現は、未知の生理機能を持っていることが推察される。ダイオキシン類化合物は、この伝達経路を非特異的に活性化することによってさまざまな生物毒性を示すことが考えられる。

2. ダイオキシンの免疫毒性

ダイオキシン類化合物の免疫毒性として注目されるようになったのは、ヨーロッパ北海の海棲哺乳動物の大量死がきっかけとなった。この直接的原因は、Phocine Distemper Virus の大規模感染であり、海洋汚染しているダイオキシン類化合物の摂取による免疫機能の低下がその誘因であろうと推定された。実際、バルティック海の汚染ニシンを摂取したラットの免疫機能の低下が報告された(Ross et al., 1996)。アザラシに関しても同様な報告がなされている(De Swart et al., 1995)。

また、前述したように、ダイオキシンの一般毒性として胸腺萎縮が観察されている。これは、胸腺において成熟段階にある幼若 T 細胞のアポトーシスが、免疫機能障害の原因となっている可能性が考えられる。また、McConkey らにより、ラット胸腺からの初代リンパ球細胞培養系で、ダイオキシンによるアポトーシスを報告している(McConkey et al., 1988)。さらに平峰らは、マ

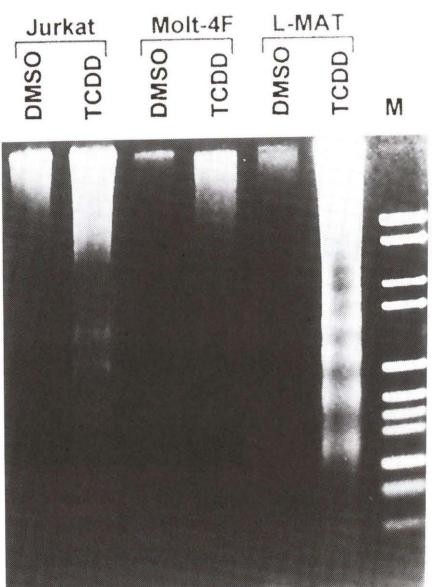


Fig. 10 Induction of apoptosis in response to TCDD. Apoptosis-associated DNA fragmentation in L-MAT, Jurkat, Molt-4 cells treated with 20 nM TCDD or with an equal volume of solvent DMSO (dimethylsulfoxide)

ウスを用いた実験により、成熟過程の CD 4⁺/CD 8⁺ のダブルポジティブ T 細胞が、ダイオキシンに感受性が高くなっていることを報告している(Hiramine et al., 1992)。しかしながら、ダイオキシンの毒性効果は種特異性が大きく、種間の急性毒性には 3 桁もの違いがあることが報告されているので、動物実験の結果をヒトへ外挿することはなかなか困難であると思われる。さらに、初代培養ではヒトの場合には胸腺組織の入手にも限界がある。これらの問題を解決するために、ヒト白血病 T 細胞株をモデル系として用いることを試みた。ヒト白血病 T 細胞株は表面抗原マーカーの検査から、成熟過程のさまざまな段階で癌化してきていることが予想されている。そこで、数多くのヒト白血病 T 細胞をダイオキシンに対する感受性で調べれば、ダイオキシン処理によってアポトーシスを起こしやすい細胞株が見出される可能性があると考えられた。

我々の研究所・発達病態分野で樹立されたものも含め、TCDD に対して感受性の高いヒト白血病 T 細胞株を検索した(Hossain et al., 1998)。その結果、Jurkat, Molt-4, L-MAT(Minegishi et al., 1995) の 3 つの細胞株が TCDD に対して感受性を示した。この細胞死が典型的なアポトーシスであるかどうかを調べるために、アポトーシスの指標の一つであるヌクレオソーム単位での DNA 断片化を、細胞から抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動を行って調べると、どの細胞もヌクレオソーム単位での DNA 断片化を認めた(Fig. 10)。最も TCDD に感受性が高い細胞は、L-MAT 細胞であったので、これ以降

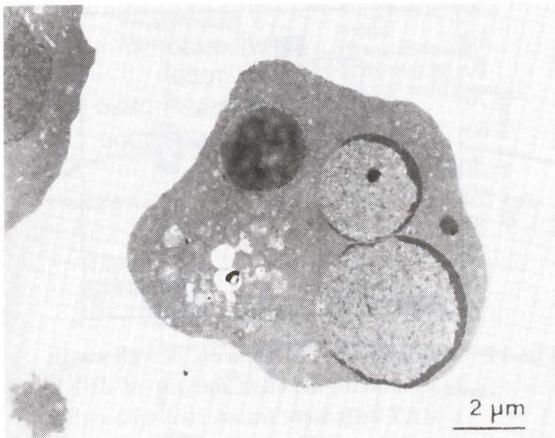


Fig. 11 Electron microscopic analysis of L-MAT cells. L-MAT cells were treated with 20 nM TCDD for 1 h (magnification 5000 \times)

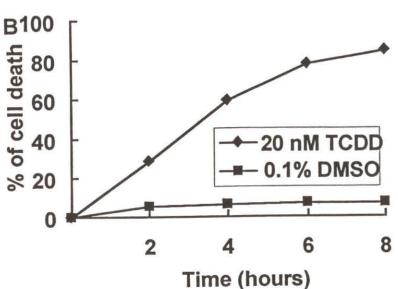
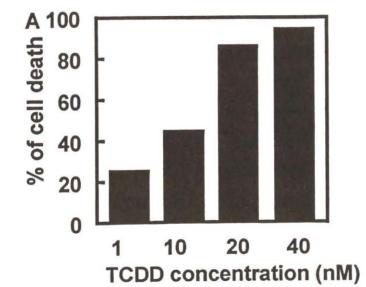


Fig. 12 Dose dependent increase of TCDD induced apoptosis in L-MAT cells. Cells were treated for 8 h. (A) Cells viability was associated by the trypan-blue exclusion method. (B) Kinetics of 20 nM TCDD induced apoptosis in L-MAT cells

は L-MAT 細胞を用いて解析を行った。アポトーシスのもう一つの指標である形態学的な観察を、Hoechst 33258 による核の染色で行うと TCDD 処理による核の断片化が顕著にみられた。さらに、paraformaldehyde で固定後の、電子顕微鏡による観察でも典型的なアポトーシス初期の像、クロマチンが核辺縁部に凝集して核がくびれ始めている像を観察した(Fig. 11)。TCDD 処理によるアポトーシスは、20 nM 程度でほぼ 90 % の細胞で起こり、処理後 6 時間以内に 80 % 以上の細胞が死んでいくかなり速いアポトーシスであることがわかった(Fig.



Fig. 13 Specificity of action of TCDD. L-MAT cells were treated for 4 h with TCDD (20 nM), TCDF (20 nM), β -NF (2 μ M), and DMSO (0.1%)

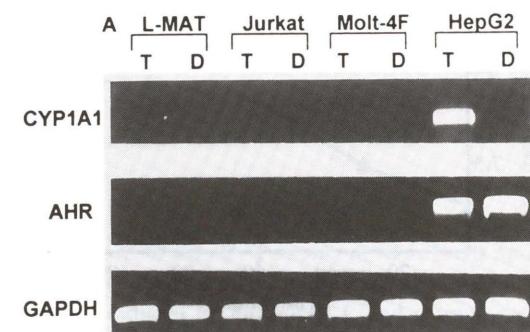


Fig. 14 RT-PCR analysis of mRNA from TCDD treated L-MAT, Molt-4, Jurkat and HepG2 cells with oligonucleotide primers specific for CYP1A1, Ah receptor (AHR), and GAPDH was used to optimize the PCR reactions. Cells were cultured in the presence or absence of 2 nM TCDD for 16 h. HepG₂ cells were used as a control. T denotes TCDD and D denotes DMSO

12).

L-MAT 細胞の TCDD 処理によるアポトーシスの性質を調べるために、Ah レセプターのリガンドとしてよく用いられる β -naphthoflavone (β -NF) と 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) を培地に加えてその効果をみると、細胞はアポトーシスを起こさず DNA の断片化も観察されなかった(Fig. 13)。この結果は、TCDD 処理による L-MAT 細胞のアポトーシスが、Ah レセプターを介して起こっている現象ではない可能性を示していた。そこで、Ah レセプターが発現しているかどうかを RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法によって調べた。Fig. 14 に示されるように、Jurkat, Molt-4, L-MAT 細胞のいずれにも Ah レセプターの発現も、CYP 1 A 1 の誘導も認められないが、ポジティブコントロールとして用いた HepG 2 細胞では Ah レセプターも発現し、TCDD 処理により CYP 1

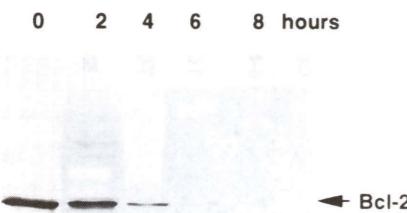


Fig. 15 Down regulation of Bcl-2 protein level by the treatment of TCDD in L-MAT cells. Cells were treated with 20 nM TCDD with different time as indicated. In each lane 100 μ g of protein was loaded. Bcl-2 was detected using anti-Bcl-2 antibody

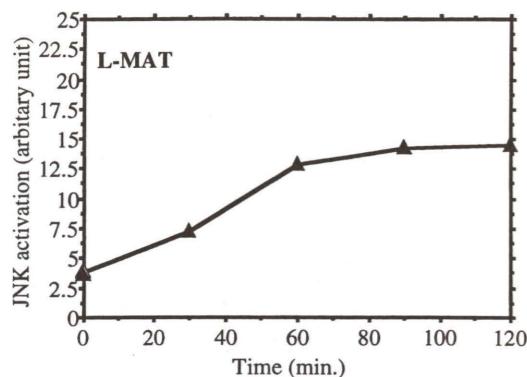


Fig. 16 JNK activation by TCDD in L-MAT cells. Cells were treated with 20 nM TCDD for different time period and collected for cell lysate preparation. JNK activities were measured by affinity purified the JNK using GST-cJun (1-79 aa) bound glutathione Sepharose beads. Kinase activities were measured in the presence of [γ -³²P] ATP

A1が誘導されていた。Ahレセプターがネガティブであったサンプルも、全体の反応工程がうまくいっていたことは、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のPCR反応がすべてのサンプルで同じようにシグナルが出てることから保証されている。したがって、ダイオキシン処理によるヒトT細胞白血病細胞L-MATのアポトーシスは、Ahレセプターを介さない細胞死であると考えられる。

それでは、ヒト白血病T細胞L-MATのアポトーシスはどのような経路でアポトーシスにいたるのであろうか。多くのアポトーシスにおいて、caspase (interleukin-1 β converting enzyme (ICE) or ICE-related proteases)の活性化が観察されているので(Nicholson et al., 1995), TCDD処理によるL-MAT細胞におけるアポトーシスにcaspaseが関与しているかどうかを、特異的阻害剤、carbobenzoxy- α -[(2,6-dichlorobenzoyl)

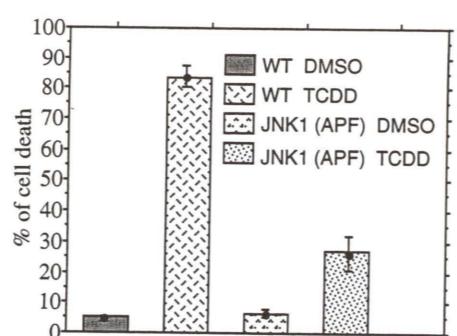


Fig. 17 Inhibition of TCDD-mediated cell death by dominant-negative mutant of JNK1. L-MAT cells were transfected with either β -galactosidase expressing vector, pCAGGS-lacZ or with pCAGGS-lacZ and dominant negative mutant of JNK1 containing vector, pcDNA3-Flag-JNK1 (APF) as indicated. After 48 h of transfection, cells were treated with 20 nM TCDD or DMSO (0.1%). Cells were stained with β -galactosidase antibody and Hoechst 33258 dye. β -galactosidase expressing cells (green) were checked for the nuclear degradation. WT: pCAGGS-lacZ vector only; JNK (APF): pCAGGS-lacZ and pcDNA3-Flag-JNK1 (APF)

oxy] methane (Z-Asp-CH2-DCB) (Mashima et al., 1995)を用いてその効果を、DNAの断片化をみる方法で検討するとアポトーシスが阻害されていることが明らかになった。また、アポトーシスを抑制している分子として同定されたBcl-2蛋白質は、ミトコンドリアに存在して物質の輸送に関与している膜蛋白質であるとされている。Bcl-2の作用は、カスパーゼの活性化に関与していることが明らかにされているチトクロームCを(Yang et al., 1997), ミトコンドリアの外に放出しないように維持していると考えられている(Cheng et al., 1997, Kroemer, 1997)。アポトーシスの過程で、多くの細胞系のBcl-2が減少することが報告されているので、TCDDによるL-MAT細胞のアポトーシスの場合におけるBcl-2の存在量をウエスタン法で定量すると、Fig. 15に示すようにTCDD処理の4-6時間後に減少していることが明らかになった。

神経細胞や造血細胞のモデル系においては、ストレスによるアポトーシスは、持続するJNK (c-Jun-N-terminal kinase, or SAPK; stress activated protein kinase)の活性の上昇を伴うことが報告されていたので(Verheij et al., 1996, Xia et al., 1995), TCDD処理によるL-MAT細胞のアポトーシスに関してもJNK活性を測定した。GST-cJun (glutathione-S-transferase cJun (1-79 amino acids)-fusion protein)を基質として検討すると、TCDD処理後90分まではJNK活性の最大の上昇が認められた(Fig. 16)。このJNKの活性上

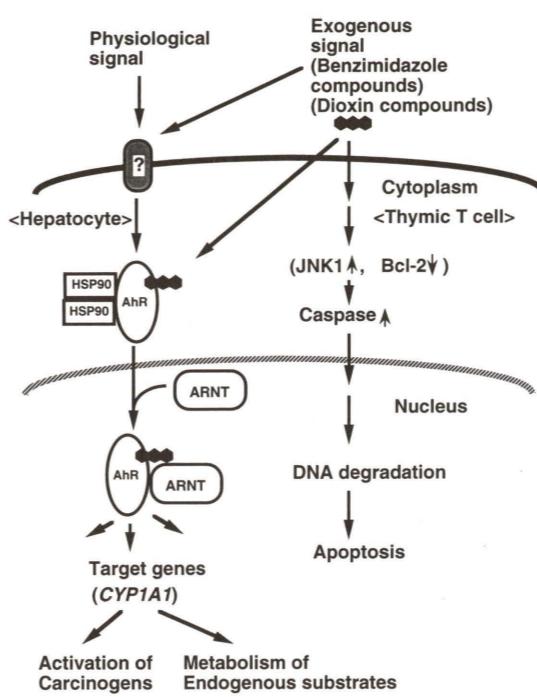


Fig. 18 Hypothetical model of CYP1A1 induction by omeprazole and T cell apoptosis by TCDD

昇が、アポトーシスにいたるシグナル伝達系に関与していることを確認するために、ドミナントネガティブに作用するJNK, pcDNA 3-Flag-JNK1 (APF) (Chen et al., 1996), をトランسفェクトしてその効果を調べた。Fig. 17に示されるように、ドミナントネガティブJNKの導入発現により、アポトーシスが有意に抑制されていることから、TCDDによるJNKの活性増大が、アポトーシスへのシグナル伝達系に関与していることを示唆している。

以上のことから、TCDDによるL-MAT細胞のアポトーシスには、Ahレセプター以外の分子が関与しており、そこからのシグナルがJNKを活性化し、あるいはミトコンドリアのBcl-2蛋白質の減少をもたらし、カスパーゼの活性化を引き起こすという一連の事象が含まれていると考えられる。

3. ダイオキシンの生体作用の分子機構

ダイオキシン類化合物の生体毒性を、Ahレセプターの関与する経路と、関与しない経路という観点からまとめるとFig. 18に示したようになると考えられる。ベンズイミダゾール化合物によって活性化されるAhレセプターの経路には内在性的シグナルが本来あって、発生の途上で何らかの役割を担っている可能性があり、外来性的のダイオキシン類化合物はAhレセプターのリガンド依存性活性化を引き起こすために生理的シグナルを乱してしまい、口蓋裂や水腎症などの奇形を生じさせるのかもしれない。また、T細胞の成熟過程にある胸腺では、ネ

ガティブセレクションが起こり得るCD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ のダブルポジティブ細胞があり、ダイオキシン類化合物はAhレセプター以外の分子に作用して、過剰なアポトーシスを起こしてしまうことが免疫毒性の原因と考えられる。しかしながら、内在性のシグナルとその作用を伝達する分子、Ahレセプターの活性化にいたるシグナル伝達系、あるいはダイオキシン類化合物が作用するT細胞における分子の同定など、ダイオキシン類化合物の生体毒性の全貌を解明するためには、多くの事が明らかにされなければならない。

謝 辞

ヒトT細胞白血病の細胞株を分与して頂いた、東北大医学加齢医学研究所・発達病態分野の土屋滋、峰岸正好両氏、電子顕微鏡写真の撮影および解析を行って頂いた当研究所・病態臓器構築分野の鍛治光司氏、国立仙台病院病理部の手塚文明氏、ドミナントネガティブJNK, pcDNA 3-Flag-JNK1 (APF)を分与して頂いたRoger J. Davis氏(University of Massachusetts, Howard Hughes Medical Institute)に感謝致します。

参考文献

- Chen, Y. R., X. Wang, D. Templeton, R. J. Davis and T. H. Tan (1996) The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation, Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation, *J Biol Chem*, 271, 31929-36.
- Cheng, E. H., D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno and J. M. Hardwick (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases, *Science*, 278, 1966-8.
- Daujat, M., B. Peryt, P. Lesca, G. Fourtanier, J. Domergue and P. Maurel (1992) Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, 188, 820-5.
- De Swart, R. L., P. S. Ross, H. H. Timmerman, H. W. Vos, P. J. Reijnders, J. G. Vos and A. D. Osterhaus (1995) Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on environmentally contaminated herring, *Clin Exp Immunol*, 101, 480-6.
- Hiramine, C., M. Koseto, T. Nakagawa and K. Hojo (1992) Enhancement of apoptotic cell death in mouse thymocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) *in vivo* and *in vitro*, *Environmental Science*, 5, 211-218.
- Hossain, A., S. Tsuchiya, M. Minegishi, M. Osada, S. Ikawa, F. A. Tezuka, M. Kaji, T. Konno, M. Watanabe and H. Kikuchi (1998) The Ah receptor is not involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated apoptosis in human leukemic T cell lines, *J Biol Chem*, 273, 19853-8.
- Huff, J., G. Lucier and A. Tritscher (1994) Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 34, 343-72.
- Kikuchi, H., A. Hossain, I. Sagami, S. Ikawa and M. Watanabe (1995) Different inducibility of cytochrome P-450 1A1 mRNA of human and mouse by omeprazole in culture

- cells, *Arch Biochem Biophys*, 316, 649-52.
- Kikuchi, H., A. Hossain, H. Yoshida and S. Kobayashi (1998) Induction of cytochrome P-450 1A1 by omeprazole in human HepG2 cells is protein tyrosine kinase-dependent and is not inhibited by alpha-naphthoflavone, *Arch Biochem Biophys*, 358, 351-8.
- Kikuchi, H., H. Kato, M. Mizuno, A. Hossain, S. Ikawa, J. Miyazaki and M. Watanabe (1996) Differences in inducibility of CYP1A1-mRNA by benzimidazole compounds between human and mouse cells: evidences of a human-specific signal transduction pathway for CYP1A1 induction, *Arch Biochem Biophys*, 334, 235-240.
- Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis, *Nat Med*, 3, 614-620.
- Lu, Y. F., M. Santostefano, B. D. Cunningham, M. D. Threadgill and S. Safe (1995) Identification of 3'-methoxy-4'-nitroflavone as a pure aryl hydrocarbon (Ah) receptor antagonist and evidence for more than one form of the nuclear Ah receptor in MCF-7 human breast cancer cells, *Arch Biochem Biophys*, 316, 470-477.
- Mashima, T., M. Naito, S. Kataoka, H. Kawai and T. Tsuru (1995) Aspartate-based inhibitor of interleukin-1 beta-converting enzyme prevents antitumor agent-induced apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 209, 907-915.
- McConkey, D. J., P. Hartzell, S. K. Duddy, H. Hakansson and S. Orrenius (1988) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by Ca^{2+} -mediated endonuclease activation, *Science*, 242, 256-259.
- Minegishi, M., N. Minegishi, T. Yanagisawa, S. Tsuchiya, H. Tezuka, M. Kaji, M. Nakamura, Y. Hayashi and T. Konno (1995) A human CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ T-cell receptor alpha beta $^{+}$ T leukemic cell line undergoing phytohemagglutinin-induced apoptosis, *Leuk Res*, 19, 433-442.
- Nebert, D. W. and F. J. Gonzalez (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation, *Annu Rev Biochem*, 56, 945-993.
- Nicholson, D. W., A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik et al. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [see comments], *Nature*, 376, 37-43.
- Okey, A. B., D. S. Riddick and P. A. Harper (1994) Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor, *Trends Pharmacol Sci*, 15, 226-232.
- Ross, P. S., H. Van Loveren, R. L. de Swart, H. van der Vliet, A. de Klerk, H. H. Timmerman, R. van Binnendijk, A. Brouwer, J. G. Vos and A. D. Osterhaus (1996) Host resistance to rat cytomegalovirus (RCMV) and immune function in adult PVG rats fed herring from the contaminated Baltic Sea, *Arch Toxicol*, 70, 661-671.
- Swanson, H. I. and C. A. Bradfield (1993) The AH-receptor: genetics, structure and function, *Pharmacogenetics*, 3, 213-230.
- Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and R. N. Kolesnick (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis, *Nature*, 380, 75-79.
- Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis and M. E. Greenberg (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science*, 270, 1326-1331.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones and X. Wang (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [see comments], *Science*, 275, 1129-1132.

Environ. Mutagen Res., 21 : 191 - 196(1999)

This paper, in a session chaired by Taisei Nomura and Kazuo Hujikawa, was presented to the symposium "Biological effects of dioxins", organized by Taisei Nomura, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, on November 24-26, 1998.

Carcinogenicity of Dioxins in Experimental Animals and Humans : Evaluations by the *IARC Monographs*

Jerry M. Rice

Unit of Carcinogen Identification and Evaluation
International Agency for Research on Cancer
150 cours Albert Thomas
69372 Lyon (Cedex 08), France

Summary

Of the 75 possible mono- and polychlorinated dioxins, only one has been well studied for carcinogenicity in experimental animals. The nonchlorinated parent compound, dibenzo-*para*-dioxin, has been thoroughly tested in both rats and mice, and is not carcinogenic in those species. The most toxic member of the polychlorinated dibenzo-*para*-dioxin (PCDD) family, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin (TCDD), has been extensively studied for carcinogenic activity in rodents and has been shown to be a nongenotoxic tumor promoter and carcinogen for multiple epithelial tissues in mice and rats, and also to induce mesenchymal tumors in mice. The tumor spectrum seen depends on the genetic background of the test animals and varies greatly from one species to another and from one inbred strain to another within a species. Because of its prolonged biological half-life (7.1 years in humans) and the equilibrium between serum levels and concentrations in body fat, accurate measurements of current serum levels of TCDD in workers can be extrapolated backwards in time to the levels that occurred soon after industrial and civil accidents that involved human exposure to large quantities of TCDD. Individuals can thus be accurately stratified into low, medium and high levels of exposure. Studies of four cohorts of workers involved in chlorophenoxy herbicide manufacture, three of which involved accidents that released large quantities of TCDD, have been most informative regarding cancer risk. All have shown a small but consistent dose-dependent increase in risk for all cancers combined. TCDD has been classified by the *IARC Monographs* as *carcinogenic to humans* (Group 1). On the basis of current data, all other PCDDs are *not classifiable as to carcinogenicity to humans* (Group 3).

Keywords : dioxins, TCDD, tumors, Ah receptor

Introduction

The polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins (PCDDs) are formed as byproducts in the industrial

received : April 2, 1999
accepted : April 6, 1999
© Environmental Mutagen Society of Japan

synthesis of chlorophenoxyacetic acid herbicides and some other chlorinated organic compounds, in certain other industrial processes, and during incomplete combustion of organic compounds in the presence of chlorine, including the incineration of municipal waste. Besides these human activities, PCDDs are also produced by uncontrollable natural biochemical processes (e.g., in sewage) and by

volcanic activity and forest fires. As a result of their continuing formation and their great thermal and chemical stability they are widely distributed in nature.

PCDDs have been reviewed three times by the *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (IARC 1977, 1987, 1997). In 1977, bioassays for carcinogenicity in animals were still incomplete, and there were no data on cancer in humans exposed to PCDDs; no evaluation was possible (IARC, 1977). In 1987, there were still no adequate data on humans, but sufficient data for carcinogenicity of TCDD to animals had accumulated, and TCDD was classified as *possibly carcinogenic to humans* (Group 2B). There were inadequate data in animals for PCDDs other than TCDD, and all PCDDs other than TCDD were judged *not classifiable as to carcinogenicity to humans* (Group 3) at that time (IARC, 1987). Most recently, in 1997, studies of workers exposed to TCDD in several industrial accidents decades before had progressed to the stage where there were limited data for excess cancer risk in these individuals, and TCDD was re-evaluated as *carcinogenic to humans* (Group 1) on the basis of limited data in humans, sufficient data in animals, and other relevant data supporting the role of the *Ah* receptor in the mechanism of carcinogenic action of this substance (IARC, 1997). All other PCDDs remained *not classifiable as to carcinogenicity to humans* (Group 3), as before, together with the non-chlorinated parent compound, dibenzo-*para*-dioxin, for which negative bioassays in rats and mice supplied data suggesting lack of carcinogenicity in experimental animals.

This paper summarizes the most important data considered by the 1997 IARC working group in reaching their evaluation of TCDD. These include bioassays for carcinogenicity to experimental animals; epidemiological data on cancer risk in exposed human populations; and other relevant data concerning mechanisms of carcinogenesis.

1. Long-term carcinogenicity bioassays of TCDD in experimental animals

Four long-term carcinogenicity studies, two in rats and two in mice, form the basis for the conclusion that there is sufficient evidence for carcinogenicity of TCDD to experimental animals. Results are summarized in Table 1 for rats and Table 2 for mice.

Sprague-Dawley rats were fed 0 (control), 0.001, 0.01, or 0.1 μg TCDD/kg body weight mixed in diet, daily for two years. Females developed a significant increased incidence of hepatocellular adenomas and carcinomas at the highest dose, and squamous cell

carcinomas of palate, nasal turbinates, and lung, also significant at the highest dose. A few squamous cell carcinomas of the tongue were also observed. Males had no increase in hepatocellular neoplasms, but did have significant incidences of squamous carcinomas of palate, nasal turbinates, and tongue at the highest dose, and one squamous cell carcinoma of the lung, also at the highest dose (Kociba et al., 1978).

The U.S. National Toxicology Program (NTP) conducted a study in Osborne-Mendel rats at slightly higher doses than those used in the Dow Chemical Company study: 0 (controls), 0.01, 0.05, or 0.5 μg /kg body weight was given by gavage twice weekly for 104 weeks. Females developed a significantly increased incidence of hepatocellular adenomas at the highest dose, and an increasing incidence of thyroid follicular cell adenomas that was statistically significant for a trend toward increasing incidence with increasing dose. Males similarly developed a trend toward significantly increasing incidences of hepatocellular adenomas and thyroid follicular cell adenomas with increasing dose. Males had a significantly increased incidence of thyroid adenomas at the highest dose (United States National Toxicology Program, 1982a). No squamous tumors of the oropharynx and respiratory tract like those observed in the previous study in Sprague-Dawley rats were observed in this study.

The NTP also conducted a study in which TCDD dissolved in acetone was painted on the skin of Swiss-Webster mice at a dose of 0.001 μg per mouse per application, three times weekly for 104 weeks. Fibrosarcomas of the subcutaneous connective tissues developed in mice of both sexes painted with acetone (solvent controls) and with TCDD dissolved in acetone, and were more frequent in TCDD-treated mice of both sexes than in solvent controls, significantly so in females (United States National Toxicology Program, 1982b). No squamous tumors of the skin developed, although such neoplasms would be expected in this kind of protocol.

Finally, the NTP conducted a gavage study of TCDD in B6C3F1 mice. Males were given 0 (control), 0.01, 0.05, or 0.5 μg /kg body weight orally, twice weekly for 104 weeks. Hepatocellular carcinomas were significantly increased at the highest dose. Alveolar carcinomas of the lung also occurred and there was a significant trend toward increasing incidence with increasing dose. Females were given higher doses: 0 (control), 0.04, 0.2, or 2.0 μg /kg body weight twice weekly for 104 weeks, and likewise developed hepatocellular carcinomas that showed a significant trend toward increasing inci-

Table 1 Results of major long-term carcinogenicity studies of TCDD in rats. Statistically significant increases in tumor incidence and the dose causing them are underlined

Sprague-Dawley Rats (Kociba et al., 1978)	
0 (control), 0.001, 0.01, <u>0.1</u> $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. in diet, daily, two years	
Males :	Hepatocellular neoplasms, no increase
	Squamous cell carcinoma : palate or nasal turbinates, 0, 0, 0, 4/50
	lung, 0, 0, 0, 1/50
	tongue, 0, 0, 0, <u>3/50</u>
Females :	Hepatocellular adenomas : 8/86, 3/50, 18/50, <u>23/49</u>
	Hepatocellular carcinomas : 1/86, 0/50, 2/50, <u>11/49</u>
	Special features : affects both squamous epithelium and hepatocytes
Osborne-Mendel Rats (United States National Toxicology Program, 1982a)	
0 (control), 0.01, 0.05, <u>0.5</u> $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. by gavage, twice weekly, 104 weeks	
Males :	Thyroid follicular adenomas : 1/69, 5/48, 6/50, <u>10/50</u> (trend, p = 0.006)
	Hepatocellular adenomas : 0/74, 0/50, 0/50, 3/50 (trend, p = 0.005)
Females :	Thyroid follicular adenomas : 3/73, 2/45, 1/49, 6/47 (trend, p = 0.022)
	Hepatocellular adenomas : 5/75, 1/49, 3/50, <u>12/49</u>

Table 2 Results of major long-term carcinogenicity studies of TCDD in mice. Statistically significant increases in tumor incidence and the dose causing them are underlined

Swiss-Webster Mice (United States National Toxicology Program, 1982b)	
Males :	0 (control), 0 (acetone), 0.001 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ in acetone on skin, three times weekly, 99 weeks
	Fibrosarcomas at site of application : 0, 3/42, 6/28
Females :	0 (control), 0 (acetone), <u>0.005</u> $\mu\text{g}/\text{mouse}$ in acetone on skin, three times weekly, 104 weeks
	Fibrosarcomas at site of application : 0, 2/41, <u>8/27</u>
	Special features : produces mesenchymal rather than squamous epithelial tumors
B6C3F1 Mice (United States National Toxicology Program, 1982a)	
Males :	0 (control), 0.01, 0.05, <u>0.5</u> $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. by gavage, twice weekly, 104 weeks
	Hepatocellular carcinomas : 8/73, 9/49, 8/49, <u>17/50</u> (trend, p = 0.002)
	Pulmonary alveolar adenomas/carcinomas : 10/71, 2/48, 4/48, 13/50 (trend, p = 0.04)
Females :	0 (control), 0.04, 0.2, <u>2.0</u> $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. by gavage, twice weekly, 104 weeks
	Hepatocellular carcinomas : 1/73, 2/50, 2/48, 6/47 (trend, p = 0.008)
	Thyroid follicular adenomas : 0/69, 3/50, 1/47, <u>5/46</u> (trend, p = 0.016)
	Lymphomas : 18/74, 11/50, 13/48, <u>20/47</u>
	Subcutaneous fibrosarcomas : 1/74, 1/50, 1/48, <u>5/47</u>
	Special features : affects both epithelial and mesenchymal tissues

dence with increasing dose. In addition, females had significantly increased incidences of thyroid follicular adenomas, lymphomas and subcutaneous fibrosarcomas at the highest dose (United States National Toxicology Program, 1982a).

An important feature of these studies is the reproducibility of the results with respect to organ sites affected. Hepatocellular tumors were consistently seen in both rats and mice fed TCDD, and

thyroid follicular cell tumors were seen in Osborne-Mendel rats of both sexes and in female B6C3F1 mice. Soft tissue sarcomas occurred in two strains of mice, after feeding in one case and skin painting in the other. In addition, other tumor sites were observed specifically in Sprague-Dawley rats and in B6C3F1 mice. These findings emphasize the importance of the genotype of the test animals as determinants of the tumor response observed.

Table 3 Standardized mortality ratios (SMR) for all cancers combined among workers exposed to TCDD in the BASF trichlorophenol manufacturing accident, Ludwigshafen, Germany, 1953

TCDD, $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight	Sub- jects	Deaths	SMR (95 % Confidence interval)
<0.1	108	8	0.8 (0.4-1.6)
0.1-0.99	66	8	1.2 (0.5-2.3)
1.0-1.99	47	8	1.4 (0.6-2.7)
>2.0	22	7	2.0 (0.8-4.0)

Test for linear trend, $p=0.05$

In addition to these bioassays, other less extensive long-term studies of carcinogenicity of TCDD in mice and one in hamsters have been published (summarized in IARC, 1997, Table 40).

2. Initiation/promotion studies with TCDD as promoter

A very extensive literature has developed on the activities of TCDD as a tumor promoter, which is summarized in *IARC Monographs*, Volume 69 (IARC, 1997). None of this information is essential to the weight of evidence for carcinogenicity of TCDD in experimental animals, but it does extend the catalog of tissues affected by TCDD and gives clues to its mechanism of carcinogenic action.

TCDD was tested for promoting activity in mouse skin initiated with N-methyl-N-nitroso-N'-nitroguanidine (MNNG) using strain HRS/J hairless mice as test animals and the classical skin tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) as a positive control (Poland et al., 1982). In these mice, but not in CD-1 or Swiss-Webster mice, TCDD effectively promoted development of cutaneous squamous papillomas initiated by a single cutaneous dose of 5 μmol MNNG given in acetone. No tumors developed in mice given TCDD alone. TCDD given as 30 ng in acetone twice weekly for 20 weeks was as effective a tumor promoter as 3 μg TPA given by the same protocol, eliciting tumor development in 15/19 mice with an average multiplicity of 1.6 papillomas per surviving mouse. In contrast to the NTP study in Swiss-Webster mice described above, no mesenchymal tumors were observed.

Numerous studies have demonstrated that in addition to its promoting effect on mouse epidermal squamous epithelium, TCDD is an effective promoter for hepatocellular neoplasms in several strains of both rats and mice initiated by any of a

large number of genotoxic carcinogens (summary in IARC, 1997, Table 41).

3. Epidemiologic evidence for increased risk of cancer in humans exposed to TCDD

Human beings are principally exposed to PCDDs including TCDD through the food chain, but occupations involving herbicide manufacture and application, especially in the past, have entailed much greater risk of exposure to large quantities of PCDDs, and industrial accidents have resulted in dramatic exposures of workers and residents of neighboring areas. Exposures to PCDDs have also occurred as a result of military use of contaminated herbicide preparations, notably in Vietnam. The most important studies for evaluation of the carcinogenicity of TCDD have involved four industrial cohorts (one each in the United States and the Netherlands, two in Germany) and one cohort of residents in a contaminated area at Seveso, Italy. Four of these cohorts have involved industrial accidents, in the United States (1949), Germany (1953), the Netherlands (1963), and Italy (1976). These five cohorts involve the highest exposures and the longest periods of observation of all epidemiological studies. In most of them, sub-cohorts with different levels of exposure and/or elapse of time since first exposure are identified and analyzed.

An increased risk for all cancers combined, on the order of 1.4, is identified in these studies, with a trend toward higher risk with increasing levels of exposure (IARC, 1997). An example is provided by the experience of workers exposed to TCDD in the trichlorophenol manufacturing accident in Germany in 1953 (Table 3). In this study it is the trend toward higher risk with increasing body burden of TCDD that is statistically significant. The small number of deaths within any sub-cohort and the small magni-

tude of the apparent increased risk for any sub-cohort precludes statistical significance of any one standardized mortality ratio by itself. Also, it is very unusual for all cancers combined, rather than one or a few target sites, to be associated with any exposure. This is the principal reason that the IARC working group considered the human data to be limited, rather than sufficient, evidence for a carcinogenic effect of TCDD in humans.

4. Other relevant data concerning mechanism(s) of carcinogenic action of TCDD

TCDD is not genotoxic. It is non-mutagenic to *Salmonella typhimurium* with or without metabolic activation. No DNA adducts are formed in mammalian cells exposed to TCDD, and there is no induction of unscheduled DNA synthesis (IARC, 1997). The mechanism of carcinogenic action of TCDD therefore must involve a mechanism other than genotoxicity.

TCDD binds avidly to the high-affinity form of the *Ah* (aryl hydrocarbon) receptor, which is widely distributed in body tissues. Transcription of many genes is induced via this receptor mechanism. It is not clear at this time which of these many genes is involved in the mechanism(s) of carcinogenesis by TCDD, or whether different patterns of abnormal gene expression are involved in tumor development in different tissues. Discussion of the biology and biochemistry of the *Ah* receptor is beyond the scope of this review, but the 1997 IARC working group considered the following arguments sufficiently persuasive to justify a higher classification of carcinogenic hazard to TCDD than would be justified solely on the bases of the available human and experimental animal evidence:

(1) TCDD is a multisite carcinogen in experimental animals that has been shown by several lines of evidence to act through a mechanism involving the *Ah* receptor;

(2) this receptor is highly conserved in an evolutionary sense and functions the same way in humans as in experimental animals;

(3) tissue concentrations are similar both in heavily exposed human populations in which an increased overall cancer risk was observed and in rats exposed to carcinogenic dosage regimens in bioassays.

Discussion

TCDD (and, by inference, other PCDDs) is unique among non-genotoxic carcinogens in its wide range of carcinogenic effects in many different

epithelial and mesenchymal tissues in rats and mice. This broad range of target tissues is consistent with the postulated role of the *Ah* receptor, which is widely distributed throughout the body, and is also consistent with the unusual association of TCDD exposure with increased human risk for all cancers combined, rather than one or a few specific target sites.

Background levels of TCDD in human tissues today are on the order of 2-3 ng/kg body fat, and have decreased by a factor of 3 to 5 since the late 1970s as a result of efforts to reduce controllable (man-made) production of PCDDs and their release into the environment. This is in sharp contrast to the extraordinarily high tissue levels measured in individuals who were involved in industrial accidents that released large quantities of TCDD into their immediate vicinity. Children in Seveso, Italy, who were aged 2-8 years at the time of the accident there in 1976 had recorded blood levels as high as 16,000-56,000 ng TCDD/kg blood lipid in samples taken in 1976 (Mocarelli et al., 1990).

In May, 1998, the World Health Organization recommended reducing human exposures to the lowest possible levels, and established a tolerable daily intake level of 1-4 pg/kg body weight, down from the previous level of 10 pg/kg body weight/day established in 1990.

References

- IARC (1977) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 15. Some Fumigants, the Herbicides 2,4-D and 2,4,5-T, Chlorinated Dibenzodioxins and Miscellaneous Industrial Chemicals, IARC, Lyon.
- IARC (1987) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, IARC, Lyon.
- IARC (1997) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 69. Polychlorinated Dibenzopara-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans, IARC, Lyon.
- Kociba, R.J., D.G. Keyes, J.E. Beyer, R.M. Carreon, C.E. Wade, D.A. Dittenber, R.P. Kalnins, L.E. Frauson, C.N. Park, S.D. Barnard, R.A. Hummel and C.G. Humiston (1978) Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46, 279-303.
- Mocarelli, P., D.G. Patterson Jr., A. Marocchi and L.L. Needham (1990) Pilot study (phase II) for determining polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD) and polychlorinated dibenzofuran (PCDF) levels in serum of Seveso, Italy residents collected at the time of exposure: future plans, *Chemosphere*, 20, 967-974.
- Poland, A., D. Palen and E. Glover (1982) Tumour promotion by TCDD in skin of HRS/J hairless mice, *Nature*, 300, 2171-2273.

United States National Toxicology Program (1982a) Carcinogenesis Bioassay of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (CAS No. 1746-01-6) in Osborne-Mendel Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Study), Technical Reports Series No. 209, DHEW Publication No.(NIH) 82-1765, Research Triangle Park, NC.

United States National Toxicology Program (1982b) Carcinogenesis Bioassay of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (CAS No. 1746-01-6) in Swiss-Webster Mice (Dermal Study), Technical Reports Series No. 201, DHEW Publication No.(NIH) 82-1757, Research Triangle Park, NC.

Environ. Mutagen Res., 21 : 197 - 200(1999)

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「ダイオキシンの生体影響」(企画:野村大成)で発表された(座長:野村大成、藤川和男)。

ダイオキシンのマウス生殖細胞への影響

井上 雅雄¹, 栗原 孝行¹, 上田 忠司², 野村 大成³

¹金沢医科大学・¹総合医学研究所, ²解剖学 〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1
³大阪大学医学部放射線基礎医学 〒565-0871 吹田市山田丘2-2

Effects of dioxin on mouse germ cells

Masao Inoue¹, Takayuki Kurihara¹, Tadashi Ueda² and Taisei Nomura³

¹Medical Research Institute and ²Department of Anatomy, Kanazawa Medical University Daigaku 1-1 Uchinada-machi, Kahoku-gun, Ishikawa 920-0293, Japan

³Department of Radiation Biology, Faculty of Medicine, Osaka University 2-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Summary

DNA damage induced in male germ cells by 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin (TCDD) and its repair were measured in C3H/HeN mice. Although about 1/25 of TCDD in the liver was found in the testis after the intraperitoneal injection, unscheduled DNA synthesis (UDS) and single-strand breaks were not detected at all stages of male germ cells. Chromosome aberrations in the M1 stage of spermatocytes were also not detected. After the direct injection of TCDD into the testis, amounts of TCDD bound to the sperm head were maximum at the 7th day after the injection, and minor UDS were detected at stages of spermatogonia, spermatocytes and early spermatids.

In contrast to the negligible DNA damage to the male germ cells, degeneration of endoplasmic reticulum and condensation of nuclei were commonly observed in the Sertoli cells (nursing cells of male germ cells) of TCDD-treated mice. Degeneration of Sertoli cells becomes more serious with the time elapsed after exposure, resulting in the indirect killing of male germ cells.

(This paper, in a session chaired by Taisei Nomura and Kazuo Hujikawa, was presented to the symposium "Biological effects of dioxins", organized by Taisei Nomura, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords : dioxin, DNA damage in mouse germ cells, degeneration of Sertoli cells

緒 言

ダイオキシンは今まで経験したことのない、人類が作り出した最も有害な化学物質といわれ、発癌、免疫抑制、胎児死亡、奇形、生殖毒性などのさまざまな影響を生

じ、さらに、その汚染は地球規模に及んでいることから深刻な問題となっている。

ベトナム戦争中にダイオキシンを含む枯れ葉剤散布地域に従軍した北ベトナム兵士の子供に奇形や流産が多発している事実(Nomura, 1994)、また、ダイオキシン(TCDD)を雄マウスの腹腔に処理し、無処理の雌マウスと交配して生まれた仔マウスに奇形や流産が生じている(梁ら, 1996)ことなどから、ダイオキシンは生殖細胞を介して子孫に影響(継世代の影響)を及ぼす可能性がある

Table 1 Various germ cell responses to TCDD in male mice

Assays	Germ cell stages ^a						
	ESG	LSG	ESC	LSC	EST	LST	SZ
Binding to sperm ^b	—	+	+	—	—	++	—
UDS ^c	—	—	—	—	—	—	—
SSB remaining in sperm DNA ^d	—	—	—	—	—	—	—
Chromosome aberrations in germ cells ^e	—	—	—	—	ND	ND	ND

^aESG, early spermatogonia; LSG, late spermatogonia; ESC, early spermatocyte; LSC, late spermatocyte; EST, early spermatid; LST, late spermatid; SZ, spermatozoa

^bResults of a testicular injection of TCDD of 0.02 µg

^cResults of an i. p. injection of TCDD of 100–300 µg/kg

^dResults of an i. p. injection of TCDD of 100 µg/kg. ND, not detected

ことが指摘されている。ところが、生殖細胞についての研究は、その形態学的变化や精子数の検索などが行われたにすぎず、DNA損傷とその修復や染色体分析に関する知見は乏しい。周知のごとく、ダイオキシン類はその汚染が地球的規模で広範囲に及んでいる現実と、さらに、継世代的影響は次世代にとどまらず以後の世代まで及ぶことから、われわれの子孫への影響が懸念されている。そこで、ダイオキシンは生殖細胞の遺伝子や染色体に損傷を与えるか否か、その損傷は修復されるか否かに的を絞り、以下の実験を試みた。

この実験に用いたマウスは C₅H/He の雄 10–16 週齢で、ダイオキシン類の中で最も毒性が強いといわれている 2,3,7,8-Tetrachloro dibenzo-p-dioxin (TCDD) をトウモロコシ油に溶解して用いた。

1. 精巣への到達と精子への結合

放射性 TCDD を雄マウスの腹腔に投与し、投与 12 時間後、肝臓、肺、精巣の一部を摘出した後、それぞれの臓器の単位重量当たりの放射活性を測定した。TCDD は肝臓へ最も到達し、到達量は腹腔投与量に依存して増加した。精巣には肝組織の約 4% しか到達しなかった。この結果は、以前経験した遺伝毒性物質メチルニトロソウレア (MNU) の 68% と比較すると、TCDD は精巣に到達しにくい物質であることを示唆する。Blood-testis barrier (Russell, 1990) が関係しているかも知れない。

放射性 TCDD を精巣に投与した後、経時的に精子を捕集し、精子頭部の放射活性を測定した。Table 1 (Binding to sperm) に示すように、TCDD の精子への結合は処理時後期精子細胞 (LST) に最も結合した。この結果は、強力な遺伝毒性物質 MNU の 4 倍であった。すなわち、TCDD はアルキル化物質以上に生殖細胞に結合することを意味する。精子への結合パターンは典型的な遺伝毒性物質メチルメタンスルホネート (MMS) に近い (Sega et al., 1983)。すなわち、TCDD の充分量が精子に結合すると F₁ に影響が生じることが予想される。

2. DNA 損傷とその修復および染色体異常

精巣に放射性チミジンを投与し、投与時 S 期のすべての精原細胞の DNA を放射能標識とした。放射性チミジンを投与後、5 日間隔で 1–50 日まで TCDD の 100 µg/kg を腹腔に投与し、副睾丸から標識精子を採取した。精子頭部を SDS-メルカプトエタノールで溶解し、5–20% アルカリ蔗糖密度勾配溶液で遠心分離後、35 フラクションに分けた。各フラクションの放射活性を測定し、DNA 分子量のマーカーに用いた T₄ ファージ DNA から精子 DNA の切断数を求めた。MMS の結果 (Inoue et al., 1993) と異なり、処理後採取したいずれの時期の精子においても DNA 切断はほとんど誘発されなかった (Table 1: SSB remaining in sperm DNA)。すなわち、100 µg/kg 腹腔投与では精子に DNA 鎮切断は残存しないことを意味する。ただし、100 µg/kg の TCDD の腹腔投与で 1 カ月間でマウスの約 1/3 が死亡した。

TCDD (50–200 µg/kg) を雄マウスの腹腔に投与した後、経時的に放射性チミジンをそれぞれの精巣に投与した。精巣から生殖細胞を捕集し、固定後、その塗抹オートラジオグラフィー標本を作製し、細胞核内の銀粒子を計数した。投与後 24 時間までのいずれの時間においても、いずれの分化段階の生殖細胞においても不定期 DNA 合成 (UDS) は誘発されなかった (Table 1: UDS)。この結果は、TCDD による精子の DNA 切断が生じなかったことと一致する。すなわち、アルキル化遺伝毒性物質と異なり (Inoue et al., 1993; 井上ら, 1996), TCDD では DNA 損傷が生じていないため、その修復も生じなかったことを示唆している。

マウス腹腔に TCDD を投与し、12 時間後、コルヒチンを投与した後、生殖細胞を採取し、低張、固定後、生殖細胞の染色体標本を作製した。Table 1 に示すように、TCDD の 300 µg/kg の処理においても検索したいずれの分裂期の細胞にも染色体異常は検出できなかった。さらに、TCDD (100, 200, 300 µg/kg) 投与後、3 日、8 日のいずれの時期においても染色体異常は検出できなかった。この結果は、DNA 損傷や DNA 修復の検索結果と

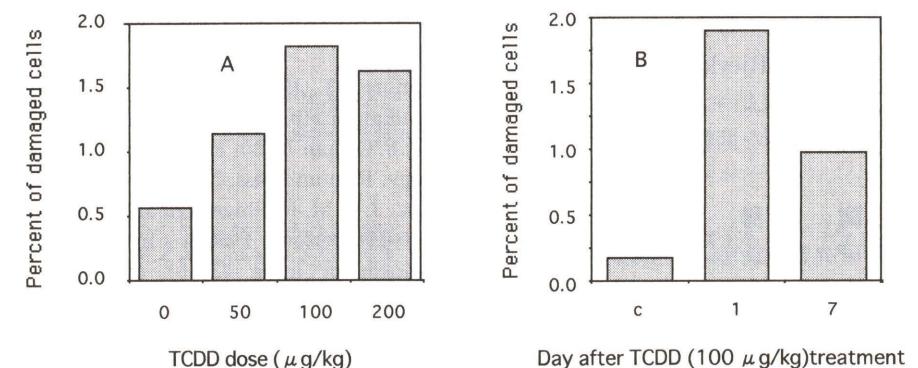


Fig. 1. Sensitivities of Sertoli cells to TCDD in male mice
A: effects of dose response, B: effects of post treatment

一致する。

3. 細胞障害

TCDD を雄マウスの腹腔に投与した後、24 時間後に肝臓および精巣を摘出した。摘出臓器をグルタールアルデヒドで固定した後、酸化オスミウムで再固定し、脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。1 µm の超薄切片を作製後、一部をウラニウム染色し、電子顕微鏡用標本を作製し、電子顕微鏡像から細胞内微細構造の変化を検索した。他方の切片を 1% トルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡標本を作製した。TCDD 投与群において、肝細胞は細胞内脂肪滴の増加や小胞体および核膜周囲腔の膨張などの顕著な細胞障害が認められた。生殖系細胞においては、小胞体の退化とその集合体と思われる像がセルトリ細胞に認められたが、生殖細胞には障害が認められなかった。Fig. 1 に障害を受けたセルトリ細胞を量量化した結果を示す。細胞障害を受けたセルトリ細胞数は TCDD 量と処理後の時間に依存した。生殖細胞はセルトリ細胞の障害後、徐々に障害を受け、数週間後には細胞の欠いた精細管が出現した。セルトリ細胞は生殖細胞の支持細胞で、栄養補給やホルモン伝達などを行い、生殖細胞の生存には必須な細胞である (Fritz, 1990)。この支持細胞が TCDD で障害を受けるため生殖細胞の減少が生じたと思われる。

考 察

放射線や発癌物質は動物の生殖細胞に作用し、突然変異や奇形・発癌など、さまざまな悪影響を子孫に及ぼすことが知られている。この機構は、生殖細胞の DNA に損傷ができる、その結果、突然変異が生じ、分化後、この突然変異を有した配偶子が受精することによるものと考えられている。事実、DNA 損傷やその修復は生殖細胞で検出され、遺伝子突然変異も F₁ で検出されている (井上ら, 1996)。この根拠に基づいて、マウスを用いて TCDD 処理による生殖細胞の DNA 損傷とその修復を検索した

が、それらを検出できなかった。しかし、用いた TCDD 量が限られたことや、DNA 損傷の検出にはアルカリ蔗糖密度勾配遠心法を用いたことなどから、さらに、TCDD 量を変えたり、DNA 切断には感度の良いといわれているアルカリ溶出法や Comet 法を用いると、陽性の結果が得られるかも知れない。TCDD はきわめて毒性が強い物質であるにも拘わらず、細胞 DNA に付加体 (DNA 損傷) を形成するという報告はない。しかし、体細胞の結果であるが、酸素ラジカルを誘導し、その結果、DNA 損傷の一種である 8-oxo guanine (Park et al., 1996) や DNA 切断 (Wahba et al., 1988) を誘発することが報告されている。また、TCDD によって染色体内組み換えが生じることも報告され (Schiestl et al., 1997)、生殖細胞の DNA 損傷→生殖細胞の突然変異→異常配偶子という、TCDD による継世代的影響の機構を検出できる可能性は残されている。

精巣への直接投与ではあるが、TCDD は精子に結合する。この結合度は強力な遺伝毒性物質 MNU より高い。TCDD は生殖細胞の DNA に損傷を与えなくても、精子に結合して卵まで運ばれ、受精卵中でその影響を発揮し、異常子孫が生まれる可能性がある。

ラットでの結果であるが、本報告と同様に、TCDD によってセルトリ細胞や生殖細胞の障害が生じることが報告されている (Rune et al., 1991)。さらに、TCDD は、精巣中の間質に存在し、精細管中の生殖細胞やセルトリ細胞と必須物質の伝達を行うライディヒ細胞にも作用し、生殖系全体に影響を及ぼすことが示唆されている (Johnson et al., 1994)。最近、セルトリ細胞にアポトーシスに関連する因子 Fas リガンド、生殖細胞に、このレセプター Fas が検出され (Lee et al., 1999)，これが、セルトリ細胞の損傷→生殖細胞数の減少に関連している可能性がある。これらの生殖系障害がいかなる機構で継世代的影響を及ぼすかは定かでない。しかし、生殖細胞の減少は精子の数の減少である。特に、TCDD を妊娠ラットに処理すると、きわめて低濃度で、その仔ラットの雄

の生殖系が障害を受け、さらに、母乳を通じても新生児ラットに同様な障害を受ける(Bjerke and Peterson, 1994)。精子数の減少は不妊と直結する。ダイオキシンの生殖系への影響はきわめて深刻な問題である。

謝 辞

本研究は文部省科学研究費補助金・重点領域研究・人間地球系「新人為起源有害物質の継世代的人体影響」の支援によって行われた。ここに深謝致します。また、研究の情報・支援を頂いた同・継世代班の方々に感謝申し上げます。

参考文献

- Bjerke, D. L. and R. E. Peterson (1994) Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats: different effects of *in utero* versus lactational exposure, *Toxicol Appl Pharmacol*, 127, 241-249.
- Fritz, I. B. (1990) Cell-cell interactions in the testis: A guide for the perplexed, In: J. W. Allen, B. A. Bridges et al. (Eds), *Banbury Report 34: Biology of mammalian germ cell mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 19-34.
- Inoue, M., T. Kurihara, M. Yamashita and K. Tatsumi (1993) Effects of treatment with methyl methanesulfonate during meiotic and postmeiotic stages and maturation of spermatozoa in mice, *Mutation Res.*, 294, 179-186.
- 井上雅雄, 宮越 稔, 栗原孝行(1996)継世代の影響とDNA修復の関連, *金沢医誌*, 20: 508-514.
- Johnson, L., C. E. Wilker, S. H. Safe, B. Scott, D. D. Dean and P. H. White(1994) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin reduces the number, size, and organelle content of Leydig cells in adult rat testes, *Toxicology* 25, 49-65.
- Lee, J., J. H. Richburg, E. B. Shipp, M. L. Meistrich and K. Boekelheide(1999) The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis, *Endocrinology*, 140, 852-858.
- Nomura, T. (1994) Male-mediated teratogenesis: Ionizing radiation/ethyl nitrosourea studies, In: D.R. Mattison and A.F. Olshan (Eds), *Male-Mediated Developmental Toxicology*, Plenum Press, New York, pp. 117-127.
- Park, J.Y., M. K. Shigenaga and B. N. Ames(1996) Induction of cytochrome P4501A₁ by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indole (3,2-b) carbazole is associated with oxidative DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2322-2327.
- Rune, G.M., P. de Souza, R. Krowke, H. J. Merker and D. Neubert(1991) Morphological and histochemical pattern of response in rat testes after administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Histol. Histopathol.*, 6, 459-467.
- Russell, L.D. (1990) Barriers to entry of substances into seminiferous tubules: Compatibility of morphological and physiological evidence, In: J. W. Allen, B. A. Bridges et al. (Eds), *Banbury Report 34: Biology of mammalian germ cell mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 3-17.
- 梁 治子, K. Yeliseeva, 中島裕夫, 黒川信夫, 野村大成(1996) ショウジョウバエおよびマウスを用いた環境有害物質の継世代的検出, *環境科学誌*, 9: 85-88.
- Schiestl, R. H., J. Aubrecht, W. Y. Yap, S. Kandikonda and S. Sidhom (1997) Polychlorinated and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induce intrachromosomal recombination *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, 57, 4378-4383.
- Sega, G. A. and J. G. Owens(1983) Methylation of DNA and protamine by methyl methanesulfonate in the germ cells of male mice, *Mutation Res.*, 111, 227-244.
- Wahba, Z.Z., T. A. Lawson, S. J. Stohs(1988) Induction of hepatic DNA single strand breaks in rats by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Cancer Lett.*, 39, 281-286.

Environ. Mutagen Res., 21: 201-205(1999)

シンポジウムII

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「ダイオキシンの生体影響」(企画:野村大成)で発表された(座長:野村大成, 藤川和男)。

ダイオキシンの遺伝的影響: ヒト精子染色体に及ぼす影響の観点から

上口 勇次郎¹, 石井 裕²

¹旭川医科大学生物学教室 〒078-8510 旭川市西神楽4線5号3-11

²大阪大学医学部放射線基礎医学講座 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2

Genetic effects of dioxin: from a viewpoint of the effects on human sperm chromosomes

Yojiro Kamiguchi¹ and Yutaka Ishii²

¹Department of Biological Sciences, Asahikawa Medical College
4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa 078-8510, Japan

²Department of Radiation Biology, Faculty of Medicine, Osaka University
2-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Summary

Using our interspecies *in vitro* fertilization system between human spermatozoa and zona-free hamster oocytes, we studied the cytogenetic effects of dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) on human spermatozoa. TCDD was dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) and diluted with BWW medium at the concentrations of 1.0-5.0 μ g/ml. Spermatozoa were treated *in vitro* with TCDD for 1-2 hours. Total numbers of 748,994 and 268 sperm-derived chromosome complements were karyotyped in the TCDD-treated, control I (non-treated) and control II (DMSO-treated) groups, respectively.

In spite of the treatment with extremely high doses of TCDD, no difference was found in the incidence of spermatozoa with structural chromosome aberrations between TCDD-treated, control I and control II groups. Types of structural chromosome aberrations and their incidences also showed no difference among the three experimental groups. These results indicate that *in vitro* TCDD exposure does not induce structural chromosome aberrations in mature human spermatozoa. However, a possibility that *in vivo* exposure to dioxin may indirectly induce genetic damage in sperm-derived genome is still remained. This possibility was discussed.

(This paper, in a session chaired by Taisei Nomura and Kazuo Hujikawa, was presented to the symposium "Biological effects of dioxins", organized by Taisei Nomura, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords: dioxin, genetic effect, human spermatozoa, fertility, chromosome aberration

緒 言

受付: 1999年3月31日

受理: 1999年4月8日

©日本環境変異原学会

ダイオキシンの毒性は、催奇形性、発癌性、免疫障害、皮膚・内臓障害など多様かつ強力であり、数多くの研究がなされている。しかし、その遺伝毒性(継世代の遺伝影

響)に関してはほとんど研究が進んでいない。最近、実験動物(ラット、マウス、ハムスター)を用いた研究から、胎仔期・授乳期に TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) 被曝した雄個体における精巣・副精巣の重量減少、副精巣内精子数および射精精子数の減少が報告されている(Mably et al., 1992; Bjerke and Peterson, 1994; Sommer et al., 1996; Theobald and Peterson, 1997; Gray et al., 1997)、生き残って受精に関与した精子に遺伝障害が増加しているか否かに関してはまだわかっていない。

一方、枯葉剤によってダイオキシン被曝した旧北ベトナム兵士(父親)が非被曝女性と結婚して生まれた子供に奇形児が有意に増加しているという疫学報告がベトナムから出されている(Nomura, 1994を参照)。また、TCDD を投与した雄マウスと正常雌の交配実験で、梁ら(1996)は着床胚の有意な低下や死亡胎仔・奇形胎仔の増加傾向を認めている。これらの結果は、TCDD が雄の生殖細胞に遺伝的影響を及ぼす可能性のあることを示唆している。

そこで、われわれは染色体異常誘発率を指標にして TCDD の遺伝的影響をヒト精子で直接調査した。本研究で用いられた実験系(ハムスター卵への異種間体外受精を応用したヒト精子染色体分析法)が環境変異原(放射線や化学物質)の遺伝的影響評価に有用であることはすでに報告している(Kamiguchi et al., 1990, 1995)。

1. ヒト精子の受精能に及ぼす TCDD の影響

TCDD による精子染色体異常誘発率を調査するための予備実験として、まずヒト精子の受精能に及ぼす影響を調査した。このデータをもとに、受精能を損なわない範囲で最も高い TCDD 濃度を決め、その濃度で染色体異常誘発の有無を定性的に調査しようという訳である。

射精されたヒト精液から運動能の良好な精子を回収し、1, 2, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の TCDD(DMSO, dimethyl sulfoxide, に溶解後、精子培養用の BWW 液で希釈)で 60 分間処理した。それらの精子を透明帯除去ハムスター卵へ媒精し、2-3 時間後に卵を固定してスライドグラスへ貼り付け、受精した精子の数を調べた(Fig. 1)。

実験の結果、TCDD 処理群では未処理対照群と比較して受精率が濃度依存的に低下し、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では約 6 割にまで低下した。しかし、それ以上の濃度では受精率はあまり変化せず、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度までよこばい状態を示した。また、DMSO 単独処理群では受精率の低下はみられなかった。これらの結果をもとに、本実験では 1 および 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度が用いられた。

2. ヒト精子染色体に及ぼす TCDD の影響

上の予備実験と同様の方法で精子の TCDD 処理、媒

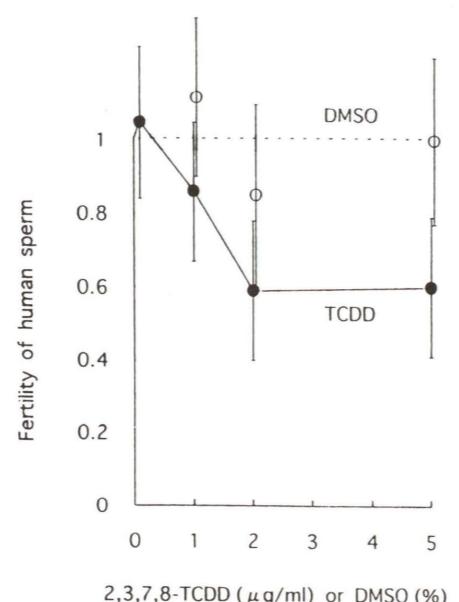


Fig. 1 Fertilizing ability of human spermatozoa after *in vitro* exposure to TCDD

●: treatment of sperm with TCDD dissolved in DMSO, ○: treatment of sperm with DMSO alone

精を行った。一部の精液試料については DMSO 単独処理群も設けた。その後、受精卵を第 1 卵割中期まで培養し、漸進固定・空気乾燥法(Mikamo and Kamiguchi, 1983)で染色体標本作製を行い、精子由来ゲノムにおける構造的染色体異常の出現率を調査した。ヒト精子染色体異常自然発生率には個人差が認められる(Kamiguchi et al., 1994)、実験ごとに精液試料を二分または三分し、一つを TCDD 処理群、残りを対照群(対照群 I, 未処理; 対照群 II, DMSO 単独処理)とした。

5 名の健常男性から得られた精液試料を用いて実験が行われ、TCDD 処理群 748 精子、未処理群 994 精子、DMSO 単独処理群 268 精子が染色体分析された(Table. 1)。その結果、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TCDD で 60 分間処理した群、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TCDD で 120 分間処理した群のいずれにおいても、構造的染色体異常をもつ精子の出現率は対照群 I, II との間で有意な差を示さなかった。また、観察された構造的染色体異常をタイプ別に分類し、比較してみても、各実験群間で出現率に有意差はみられなかった。すなわち、TCDD は放射線やアルキル化剤などの場合とは異なり、成熟精子に対して急性の遺伝毒性(染色体異常誘発能)をもたないことが明らかとなった。今回、われわれが用いた TCDD の濃度(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)はヒト精子の受精能を約 60 % にまで低下させるという高濃度で、マウスにおける LD₅₀ 値の約 1000 倍に相当するものであるから、現実に人体から検出されているダイオキシン濃度(pg レベル)では遺伝的影響はないものと思われる。

井上(1996, 1998)は雄マウスへの TCDD(100-300

Table 1 Incidence of structural chromosome aberrations in human spermatozoa exposed to TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) *in vitro*

Experiment	Donor	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Duration of exposure (min)	Number of sperm analyzed	Number of sperm with chromosome aberrations (%)	Number of chromosome aberrations (per spermatozoon)			
						Breakage-type		Exchange-type	
						Cs ^a	Ctd ^b	Cs	Ctd
Control	A	0	60	161	18(11.2)	11(0.068)	5(0.031)	1(0.006)	18(0.112)
TCDD	A	1.0	60	242	25(10.3)	23(0.095)	3(0.012)	1(0.004)	29(0.120)
Control	B	0	120	180	38(21.1)	48(0.267)	8(0.044)	6(0.033)	65(0.361)
TCDD	B	1.0	120	176	37(21.0)	44(0.250)	6(0.034)	4(0.023)	63(0.358)
Control	C	0	60	433	64(14.8)	22(0.051)	6(0.014)	1(0.002)	53(0.122)
TCDD	C	5.0	60	127	15(11.8)	6(0.047)	1(0.008)	0(0.000)	2(0.016)
Control I	D	0	60	77	9(11.7)	4(0.052)	4(0.052)	0(0.000)	1(0.013)
Control II	D	5% DMSO ^c	60	75	10(13.3)	8(0.107)	2(0.027)	1(0.013)	11(0.147)
TCDD	D	5.0	60	58	7(12.1)	5(0.086)	3(0.052)	0(0.000)	8(0.137)
Control I	E	0	60	143	9(6.3)	7(0.049)	3(0.021)	0(0.000)	12(0.084)
Control II	E	5% DMSO	60	193	15(7.8)	11(0.057)	2(0.010)	0(0.000)	15(0.078)
TCDD	E	5.0	60	145	10(6.9)	6(0.041)	3(0.021)	0(0.000)	1(0.007)

^a Cs, chromosome-type aberrations; ^b Ctd, chromatid-type aberrations; ^c DMSO, dimethyl sulfoxide

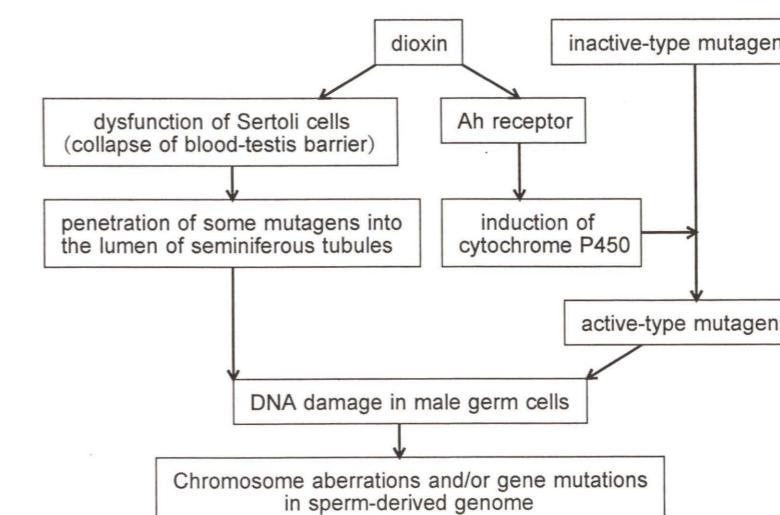


Fig. 2 A possibility of indirect action of dioxin in inducing genetic damage in sperm-derived genome (1): dioxin may potentiate genetic effects of some other mutagens

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与実験を行い、TCDD が精子 DNA 切断を誘発しないこと(アルカリ蔗糖密度勾配遠心法による調査)および第 1・第 2 精母細胞に染色体異常を誘発しないことを報告した。このマウス *in vivo* 実験の結果とわれわれのヒト精子 *in vitro* 実験の結果を考え合わせると、TCDD には直接的な精子 DNA 損傷作用はないと結論づけられる。

3. ダイオキシンの間接作用による遺伝障害誘発の可能性

上に述べたように、TCDD の遺伝障害誘発作用に関しては否定的結論が得られた。一方、ベトナム兵士の子供の疫学調査や TCDD 投与雄マウスの F₁ の発生学的研究からは遺伝障害誘発の可能性を示唆する結果も得られている。もし、これらが事実だとすれば、ダイオキシンは直接的な DNA 損傷作用を持たないが、なんらかの間

接的経路によって遺伝障害を与え得るということになる。以下にその間接作用の可能性について考察する。

1) ダイオキシンが他の変異原物質の遺伝的影響を増強する可能性(Fig. 2)

ダイオキシンによる発癌機構の一つとして次のことが考えられている。ダイオキシンが細胞(特に肝細胞)内に入ると Ah 受容体と結合する。この複合体は核内に入り、特定の遺伝子を活性化させ、チトクローム P450 が誘導される。この酵素は不活性型の変異原(芳香族炭化水素のいくつかのもの)を水酸化し、その代謝産物は活性化された変異原として DNA 損傷を与える。したがって、もし低濃度のダイオキシンへ慢性的に曝露されていれば、常に酵素誘導のかかった状態になっており、そこへ複合的に不活性型の変異原が侵入すれば、DNA 損傷(発癌)のリスクが高まることになる。この図式が精子にも当てはま

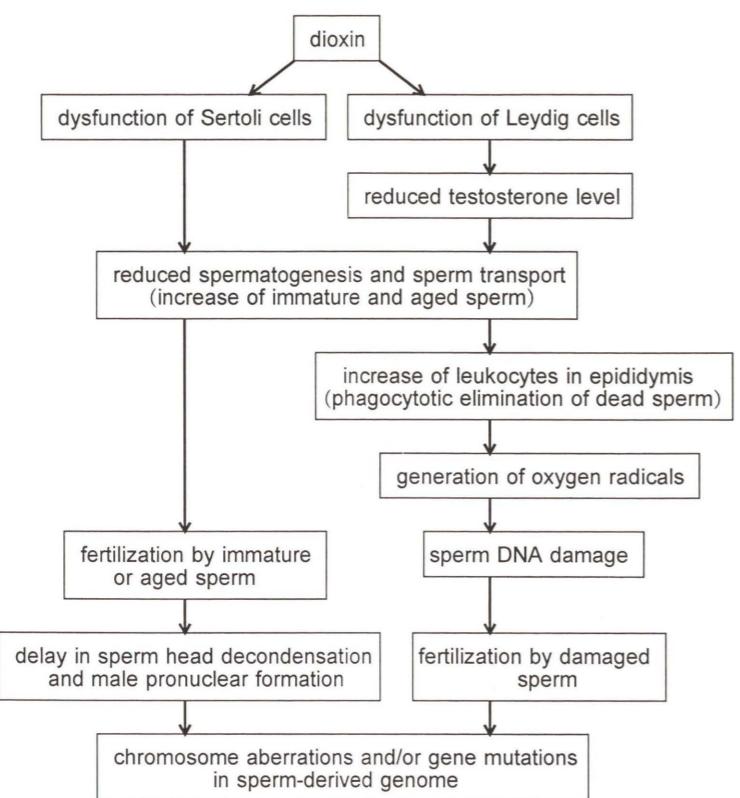


Fig. 3 A possibility of indirect action of dioxin in inducing genetic damage in sperm-derived genome (2) : dioxin may exert its effects through endocrine disruption

れば、複合汚染により間接的に遺伝的影響のリスクが高まることになる。われわれはベンゾ(a)ピレン(不活性型変異原の1種)を *in vitro* でヒト精子に作用させ、薬品そのものには精子染色体異常誘発能はないが、酵素誘導をかけた肝細胞のミクロソーム分画を共存させると精子染色体異常が有意に増加することを確かめた(上口、1998)。したがって、複合汚染によって精子染色体異常が増加する可能性はあるものと思われる(現実にそのリスクがどの程度かは不明であるが)。

ダイオキシンの間接作用にはもう一つの可能性も考えられる。ダイオキシンが精巣のセルトリ細胞に障害を与え、高濃度の場合にはそれらの細胞を死滅させることができると報告されている(井上、1996)。セルトリ細胞どうしの間には密着結合(tight junction)があり、これは血液-精巣閂門(blood-testis barrier)として作用し、一部の変異原の精巣内部への侵入を阻止している。もし、ダイオキシンの作用によりセルトリ細胞が障害を受けると、この閂門が機能しなくなり、それまでブロックされていた変異原が精巣内部へ侵入して精子(DNA損傷の修復機構をもたない)に障害を与える可能性がある。

2) ダイオキシンが内分泌擾乱作用を通して遺伝障害を生む可能性(Fig. 3)

ダイオキシンがセルトリ細胞(変態中の精子を保持し、

栄養を与え、精子の成熟を促す働きを持つ)に障害を与えること(井上、1996)、また、ライディヒ細胞(テストステロンを分泌する)に障害を与えて血中ホルモン量を低下させること(Johnson et al., 1992; Bjerke and Peterson, 1994)が実験動物で明らかにされている。これらの障害作用の結果、精子形成不全が起こり、未熟精子数が増加する可能性がある。また、副精巣の機能不全や射精頻度の減少などが起こり、加齢精子の数が増加する可能性もある。もし、未熟精子や、加齢精子が受精した場合、雌性前核形成の進行と雄性前核形成の進行が遅れ、それによって精子由来ゲノムに構造的染色体異常が生じ得る。事実、精子を *in vitro* で加齢させると精子由来ゲノムに染色体異常が増加するということがマウス精子やヒト精子で報告されており、雄性前核の形成不全が原因と考えられている(Estop et al., 1993; Munné and Estop, 1993)。また、われわれは、ゴールデンハムスター-卵とチャイニーズハムスター精子の異種間体外受精実験において、両配偶子間に前核形成進行のずれが起こり、それが精子由来ゲノムの構造的染色体異常の原因になること、および、このずれをノコダゾール(卵の付活抑制剤)処理によって補正してやると染色体異常出現率が有意に低下することを確かめている(立野・上口、1998)。

また、ダイオキシンの内分泌擾乱作用は別のルートで精子DNA障害を生ぜしめる可能性もある。すなわち、

TCDD処理によって生じた未熟精子や加齢精子のうち、程度のひどいものは副精巣内に集まってきた白血球によって捕食されてしまうと考えられている(Sommer et al., 1996)。この場合、白血球はフリーラジカルの強力な発生源になっているので、近傍にある正常精子にDNA障害が誘発されるという可能性が考えられる。

上に述べた可能性を拡大して考えれば、PCBやDDTなどの内分泌擾乱物質一般に遺伝障害を生む可能性があり得るということになる。

結語

今回の研究から、TCDDがヒト精子DNAに直接作用して染色体異常を誘発することはないという結論が得られた。しかし、精子の形成・輸送や受精の周辺での研究報告をいくつかつなぎ合わせて考えてみると、ダイオキシンは間接作用として精子由来ゲノムに染色体異常や遺伝子突然変異を起こし得る。この間接作用を裏付ける実験的根拠はまだまだ薄く、今後一つ一つ検証して行かなければならぬ。

従来、変異原性試験として行われてきたエイムズ試験や培養細胞を用いた染色体検査・小核試験などは、テストする物質またはその代謝産物がDNA損傷誘発能をもつか否かということに目を向けてきた。しかし、生殖細胞の老化や受精・前核形成のタイミングのずれなど、発生学上の基本的問題が遺伝障害と関連しているという可能性が次第に強まっており、継世代的遺伝影響の評価については一筋縄では行かない。

参考文献

- Bjerke, D. L. and R. E. Peterson (1994) Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats : different effects of *in utero* versus lactational exposure, *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 127, 241-249.
- Estop, A. M., S. Munné, L. K. Jost and D. P. Evenson (1993) Studies on sperm chromatin structure alterations and cytogenetic damage of mouse sperm following *in vitro* incubation. Studies on *in vitro*-incubated mouse sperm, *J. Androl.*, 14, 282-288.
- Gray, L. E., J. S. Ostby and W. R. Kelce (1997) A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring, *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 146, 11-20.
- 井上雅雄(1996)新人為起源有害物質のマウス精子・卵子への蓄積とDNA損傷, 環境科学会誌, 9: 79-81.
- 井上雅雄(1998)ダイオキシンの生殖細胞に及ぼす影響, 環境と健康 II (池永満生, 野村大成, 森本兼義編), へるす出版, pp. 36-47.
- Johnson, L., R. Dickerson, S. H. Safe, C. L. Nyberg, R. P. Lewis and T. H. Welsh Jr. (1992) Reduced Leydig cell volume and function in adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin without a significant effect on spermatogenesis, *Toxicol.*, 76, 103-118.
- Kamiguchi, Y., H. Tateno and K. Mikamo (1990) Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X-irradiated *in vitro*, *Mutat. Res.*, 228, 133-140.
- Kamiguchi, Y., H. Tateno and K. Mikamo (1994) Chromosomally abnormal gametes as a cause of developmental and congenital anomalies in humans, *Cong. Anom.*, 34, 1-12.
- Kamiguchi, Y., H. Tateno, Y. Iizawa and K. Mikamo (1995) Chromosome analysis of human spermatozoa exposed to antineoplastic agents *in vitro*, *Mutat. Res.*, 326, 185-192.
- 上口勇次郎(1998)ヒト精子を用いた染色体突然変異原性試験の最近の状況, 環境変異原研究, 20: 123-128.
- Mably, T. A., D. L. Bjerke, R. W. Moore, A. Gendron-Fitzpatrick and R. E. Peterson (1992) *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability, *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 114, 118-126.
- Mikamo, K. and Y. Kamiguchi (1983) A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster, In : T. Ishihara and M. S. Sasaki (Eds), *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*, Alan R. Liss, New York, pp. 411-432.
- Munné, S. and A. M. Estop (1993) Chromosome analysis of human spermatozoa stored *in vitro*, *Hum. Reprod.*, 8, 581-586.
- Nomura, T. (1994) Male-mediated teratogenesis : Ionizing radiation/ethyl nitrosourea studies, In : D. R. Mattison and A. F. Olshan (Eds), *Male-Mediated Developmental Toxicology*, Plenum Press, New York, pp. 117-127.
- 梁治子, Yeliseeva, K., 中島裕夫, 黒川信夫, 野村大成(1996)ショウジョウウバエおよびマウスを用いた環境有害物質の継世代的検出, 環境科学会誌, 9: 85-88.
- Sommer, R. J., D. L. Ippolito and R. E. Peterson (1996) *In utero* and lactational exposure of the male Holtzman rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin : decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate, *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 140, 146-153.
- 立野裕幸, 上口勇次郎(1998)哺乳動物の異種間受精卵における精子核の発達と染色体異常, 第49回染色体学会, 広島.
- Theobald, H. M. and R. E. Peterson (1997) *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin : effects on development of the male and female reproductive system of the mouse, *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 145, 124-135.

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「ダイオキシンの生体影響」(企画:野村大成)で発表された(座長:野村大成、藤川和男)。

ダイオキシンの遺伝的影響の問題点 —継世代的影響について—

野村 大成, 中島 裕夫, 李 利亜, 福留 優子, Rajamanickam Baskar,
梁 治子, 具 在妍, 森 景子

大阪大学大学院医学系研究科遺伝医学講座・放射線基礎医学 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2

Concern for the hereditary effects of dioxins

Taisei Nomura, Hiroo Nakajima, LiYa Li, Yuuko Fukudome,
Rajamanickam Baskar, Haruko Ryo, JaeYeon Koo and Keiko Mori

Department of Radiation Biology and Medical Genetics,
Graduate School of Medicine, Osaka University
2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Summary

Although a higher risk of congenital malformations has been reported in the children of fathers who had been exposed to dioxin-contaminated herbicides, genotoxicities of the dioxins are unclear in *in vitro* experimental systems using bacteria and culture cells, and also in the mouse and human germ cells. In the series of experiments co-ordinated by the "Man and Earth" project, however, indirect death of the mouse sperm by the damage to Sertoli cells and significant reduction of fertility and live births were observed. Furthermore, significant increase of functional defects like respiratory distress syndrome was observed in the F₁ fetuses of TCDD-treated male mice of two different strains. Morphological anomalies were 5 to 8 folds higher than control, although differences were not significant because of small sample size. Increased incidence of molecular changes, *i.e.*, length polymorphism of repetitive DNA sequences (*pc-3*) was also detected but it was not statistically significant at present. Large scale experiments are in progress.

(This paper, in a session chaired by Taisei Nomura and Kazuo Hujikawa, was presented to the symposium "Biological effects of dioxins", organized by Taisei Nomura, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords : transgenerational effects, dioxins, malformations, respiratory distress syndrome, mice

緒 言

ダイオキシン類の遺伝毒性に関しては、最も強力な2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)において

受付: 1999年5月6日
受理: 1999年5月8日
©日本環境変異原学会

も、Rice博士の講演にあったように、IARC(1997)の分類では、バクテリア、培養細胞等でも遺伝毒性(突然変異等)は起こさないものとされている。しかし、TCDD投与によりマウス精巣は著しく萎縮し、精子数の減少がみられる。放射線照射や、変異原投与によりよくみられる現象であるが、前述のごとく井上らによると、マウス精子へのDNA損傷はほとんど認められない。ヒト精子についても、上口、石井らによるハムスター卵への挿入実験

Table 1 Congenital malformations in the children of fathers who had been exposed to herbicides before conception in Vietnam

Authors	Ton (1981)		Cân (1984)		Dao (1988)	
Father's exposure	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
No. of newborns	1438	1496	16570	1801	1207	3329
No. of congenital malformation (%)	3 (0.2)	47 (3.1)	118 (0.7)	28 (1.6)	13 (1.1)	112 (3.4)
p	<0.001		<0.001		<0.001	

(+) : children of the North Vietnam soldiers who fought in the sprayed area of the South Vietnam and married with the North Vietnam women after returning to their homes

(-) : children of the North Vietnam soldiers who had never been fought in the sprayed area and married with the North Vietnam women after returning to their homes

でも染色体損傷は誘発されなかった。しかし、井上らは、ダイオキシン投与により精細胞の栄養細胞であるSertoli細胞に障害を与えることにより、精子形成が障害され、二次的に(間接的に)精子数が減少する。すなわち、ダイオキシンによる間接的精子損傷作用を発見した。このような現象は、プラスチックの可塑剤である、フタル酸エステルでもみられることを福岡らが報告している(Fukuoka et al., 1993)。最近話題になっているヒトでの精子数の減少に、このような環境有害物質(内分泌擾乱物質)の影響が考えられるが、動物実験とは量的に大きな差がある。胎児期への作用をも考慮する必要がある。なぜなら、合成エストロゲン DES やウレタンがマウス胎児に作用すると生後、精巣、卵巣の萎縮がみられ、精子、卵子の著しい減少をきたすことが 20 年以上前からわかっているからである(Nomura, 1976; Nomura and Kanzaki, 1977)。マウス卵細胞には肝臓の約 50 % が検出されるが、精子同様 DNA 損傷を誘発しなかった(井上ら、本誌)。

このように、ダイオキシン処理されたヒト精子には、DNA 損傷および、染色体異常等の遺伝的障害は誘発されていないが、石井らによると、TCDD(2 μg/ml) 1 時間処理でヒト精子ハムスター卵への挿入がわずかであるが(約 1/2 まで)減少する(石井, 1996)。合成洗剤の主剤である LAS や AS では、0.02 % 液で 1 時間処理すると完全に(0 %)授精能力はなくなることに比べると、はるかに授精障害は弱い(Nomura et al., 1980, 1987; Ishii et al., 1990)。しかしながら、ベトナム戦争において、枯葉剤(ダイオキシン混入)散布地域で戦った北ベトナム兵士の子供に、流死産、奇形発生が有意に高いとの報告がある(Table 1)。雄マウスに放射線照射や変異原を投与した時の F₁ での障害(Nomura, 1975, 1978, 1982, 1986, 1988, 1994; Kirk and Lyon, 1984; Nagao and Fujikawa, 1990; Nomura et al., 1990)と同じようなことが

起こっており、継世代的に何らかの影響を及ぼす可能性が残されている。しかし、矛盾点も多いので、TCDD の継世代的影響を調べている。

1. ヒトにおける次世代影響調査

Table 1 にその概要を示した。北ベトナム兵士が枯葉剤散布地域(山地、森林)で戦い、帰国後、南ベトナムに行つたことのない正常婦人と結婚した場合、枯葉剤非散布地域(平野、海浜)で戦った兵士の場合に比べ、高度に有意に、子供に先天異常が発生しているとの報告がある(Ton, 1981; Cân, 1984; Dao, 1988)。いずれの場合も、対照群(非被曝群)の奇形発生率があまりにも低い(日本人では約 5 %)ことに大きな矛盾を感じるが、被曝群と同じカテゴリーで分析されたものとして一応評価し、記載しておく必要がある。

2. 継世代的発生異常検出

バイオケミカルハザード安全飼育装置内で雄 C3H/HeJ マウス腹腔内に TCDD 100 もしくは 50 ng/g 体重を単回投与し、同装置内で飼育した。精原細胞期に無処置の雌 C57BL/6J マウスと交配した。対照群では溶媒であるコーンオイルのみを投与した雄 C3H/HeJ マウスを雌 C57BL/6J と交配した。ダイオキシン投与群および対照群ともに妊娠 18 日目に帝王切開を行い、F₁ の流死産(早期胎芽死亡、胎仔死亡)、形態異常を検出した。また、胎仔を人工蘇生し、蘇生が可能かどうかを調べた後、内部臓器の形態学的異常を調べた。胎仔臓器は分子レベルでの異常を調べるために凍結保存した。

Table 2 は、ダイオキシン 100, 50 ng/g 体重単回投与群と対照群の現在までの結果をまとめたものである(野村, 1995; 中島, 1997)。

1) ダイオキシン投与群では、対照群に比べて有意かつ用量依存的な着床率および帝王切開時の生存胎仔率の低下

Table 2 Incidence of preimplantation loss, embryonic deaths, respiratory distress syndrome, and malformations in the F₁ fetus of C57BL/6J and C3H/HeJ mice treated with TCDD (50 and 100 ng/g)

TCDD dose (ng/g)	No. of preg. mice	Corpora lutea (CL)	Implant ^a	Early death ^b	Late death ^b	Living fetus ^b	RDS ^c	Malformed fetus ^c	Details
100	10	94 (9.4)	73** (77.7)	20 (27.4)	6 (8.2) ^d	47* (64.4)	9 (19.2)	5 (10.6)	2 ; Dwarf & Omphalcele, 1 ; Agenesis of the testis 1 ; Agnathia, Cleft palate, Kinky tail & PDA 1 ; I-eyeball def. & General edema
50	11	98 (8.9)	87 (88.8)	15 (17.2)	10 (11.5)	62 (71.3)	18** (29.3)	5 (8.1)	5 ; Dwarf
0	11	92 (8.4)	85 (92.4)	13 (15.3)	3 (3.5)	69 (81.2)	5 (7.2)	1 (1.4)	1 ; Dwarf

^a ; % of CL, ^b ; % of implant, ^c ; % of living fetus, ^d ; 1 gigantism

Fisher's exact test ; *p<0.05, **p<0.01

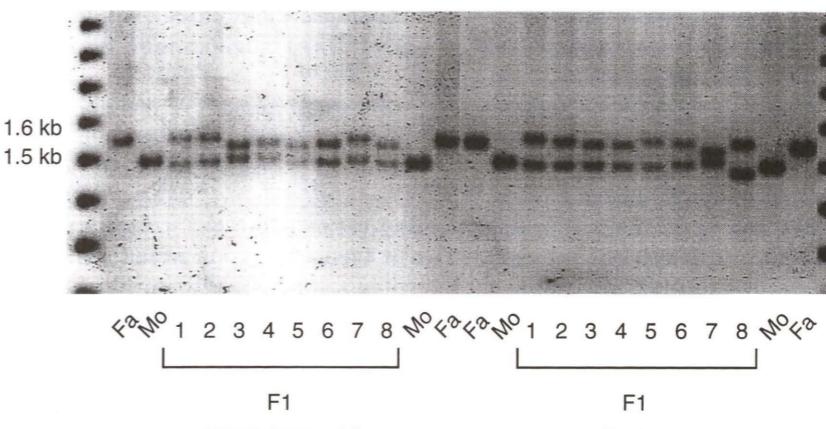


Fig. 1 Length alteration of paternal and maternal bands of pc-3 PCR products in F₁ fetuses of C57BL/6J female and TCDD treated and untreated C3H/HeJ male mice. Experimental procedures are given in the text. Fa : C3H/HeJ male, Mo : C57BL/6J female

が認められた。着床率の減少は、TCDD による精子数減少によるものと考えている。

2) ダイオキシン投与群では、対照群に比べて統計学的には有意性が認められないものの、用量依存的な妊娠早期胎芽死亡率および奇形胎仔率の増加が認められた。

3) 帝切時において小人症が対照群で 1 例、ダイオキシン 50 ng/g 投与群では、5 例に観察された。100 ng/g 投与群では、5 例の生存胎仔に小人症、無頸症、口蓋裂、臍ヘルニア、曲尾、浮腫、精巣発育不全など対照群や 50 ng/g 投与群では認められないような重度の奇形が検出された。また、100 ng/g 投与群では、胎仔死亡例の中にも 1 例の巨大胎仔が認められた。50 ng/g 投与群では仮死(Respiratory Distress Syndrome, RDS)の有意な増加があった。

以上の結果から、まだ個体数が少ないが、ダイオキシン

投与群において、早期胎芽死亡、いわゆる優性致死の増加の傾向が用量依存的に認められる点、着床率や生存胎仔数が有意に用量依存的に減少している点、また自然誘発されにくい重度形態異常などが増加している点、および仮死が有意に増加している点から、TCDD のマウスへの遺伝的影響が示唆される。

以上の予備実験結果を確認するために、異なる系統のマウスを用いた研究も行っている。3 ヶ月齢の雄 C.B 17 マウス腹腔内に 100 ng/g 体重の TCDD を同様に投与し、精原細胞期に正常無処置の雌 C.B 17 マウスと交配した。TCDD 投与群 13、対照群(コーンオイル) 7 匹の妊娠マウスを 18 日目に帝王切開を行い、F₁ 胎仔を調べたところ、排卵数に対する着床数は 76.4 % と対照群(93.7 %)に対し、有意な減少を示し(p<0.01)、生存 F₁ 胎仔での仮死の頻度も 37.3 % と対照群(3.9 %)に対し、有意な

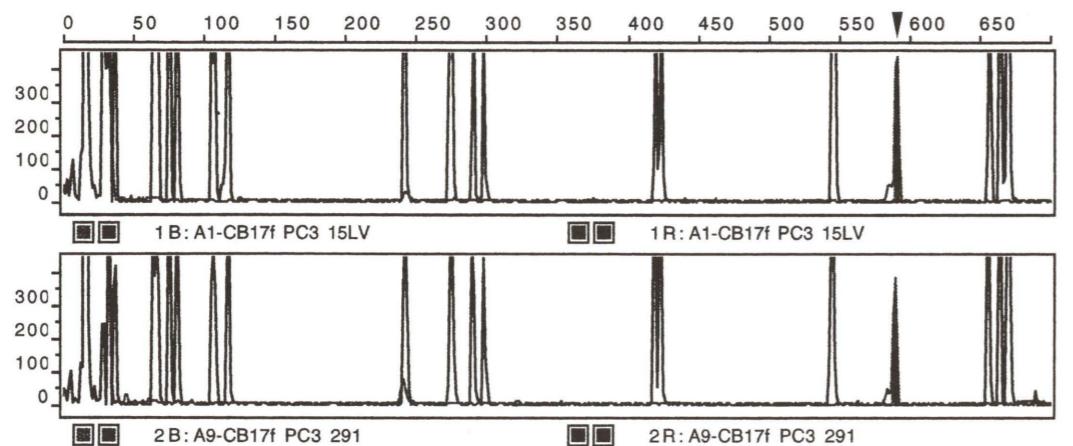


Fig. 2 GeneScan profile of *pc-3* PCR products in F_1 fetuses of TCDD treated and untreated C.B17 male mice. Experimental procedures are given in the text. An arrow indicates *pc-3* PCR products of standard (upper) and untreated (lower) C.B17 fetuses. Other spectra are for length markers

Table 3 Length alteration of maternal and paternal bands of *pc-3* PCR products in F_1 fetuses of C57BL/6J female and TCDD-treated C3H/HeJ male mice

TCDD (ng/g)	Incidence (%)	
	Maternal	Paternal
0	3/72 (4.2)	16/72 (22.2)
50	5/62 (8.1)	11/62 (17.7)
100	4/53 (7.5)	8/53 (15.1)

增加($p < 0.01$)が認められている。

3. 次世代での遺伝子変異検出の試み

前述のごとく、個体レベルでは、次世代に何らかの異常を起こす可能性が示された。より細かな変化を検出するため、反復配列遺伝子 *Pc-3* を指標にして、 F_1 胎仔での Length Polymorphism を調べた。前述の実験で、TCDD 投与雄マウスと非投与マウスを交配して得られた F_1 胎仔の肝臓より DNA を QIAamp Tissue Kit (Qiagen 社)により抽出した。抽出された DNA をテンプレートにして、*Pc-3* 特異的プライマー(高橋ら、未発表)を用い PCR 法にて増幅した。アガロースゲルにて電気泳動を行い、サイバーグリーン(FMC Bio Products 社)にて染色し、Fluor Image 595 (Molecular Dynamics 社)により解析を行った(Fig. 1)。Table 3 に B 6-C 3 F_1 胎仔での結果を示した。TCDD 投与により母マウス(C 57 BL/6 J)由来のバンドのシフトの増加と父マウス(C 3 H/HeJ)由来バンドのシフトの減少がみられるが有意ではない。

C.B 17 マウスの *Pc-3* 遺伝子は反復数が少ない(短い)ので、ABI PRISM 310 GeneScan (Perkin Elmer Applied Biosystems)を用いて F_1 胎仔 DNA の PCR 産物の解析を行った。Fig. 2 に示すごとく、*Pc-3* PCR 産

Table 4 Length polymorphism of *pc-3* PCR products in F_1 fetuses of C.B17 male mice treated with TCDD

TCDD (ng/g)	No of F_1	Mean	SD	No of F_1 with abnormal length (%)
100	75	585.01	0.66	4 (5.3) ^a
0	60	584.87	0.61	1 (1.7)
Standard	47	584.76	0.69	0 (0.0)

^a 2-tail t-test; $p = 0.194$

Two of 4 fetuses have congenital malformations

物は約 585 base である。その平均値は、正常 C.B 17 マウス胎仔と TCDD 無処置群 F_1 胎仔では全く同じであるのに対し、TCDD 投与群ではやや長く、正常 C.B 17 マウス胎仔での 99 % CI を越える異常な長さの PCR 産物は、有意性はないが TCDD 投与により増加傾向がみられた(Table 4)。この方法は、前述の電気泳動法によるバンドの易動度の差を肉眼的に検出する方法に比べ、非常に安定かつ客観的な実験結果が得られる。今後引き続き研究を行う。

結 語

ダイオキシン類は水に溶けにくく、マウス個体への投与方法の面で、生殖細胞に確実に作用させるのが困難であること、強力な毒性が示唆されているため、Chemical hazard safety cabinet 内での実験に限定されること等、これまで遺伝毒性、発癌性研究に用いた多くの化学物質中でも最もやさしくい物質である。

本シンポジウムで取り上げたごとく、いまだ TCDD の継世代の影響に関しては、明確な証拠は得られていない。しかし、30 年前、バクテリア、培養細胞等で変異原性の全くなかったウレタンが有意な継世代的障害(形態異常、癌)を誘発することが証明された例もあるので(Nomura, 1975, 1978, 1982)，従来の遺伝毒性研究法に

とらわれず、柔軟かつ慎重に実験を続ける必要がある。特に、TCDD に関しては、雌マウスの汚染による実験結果の不明瞭性を避けるため、意図的に雄マウスへの TCDD 投与直後の交配を避けてきたが、一部の例外を除くと、より高い感受性を示す精子、精子細胞期への作用をも検討せざるを得なくなつた。

参考文献

- Cân, N. (1984) Effect on offspring of parental exposure to herbicides, In : A. H. Westing (Ed.), Herbicides in War-the Long Term Ecological and Human Consequences, Pailor and Francis, Philadelphia, pp. 137-14.
- Fukuoka, M., T. Kobayashi, Y. Zhou and T. Hayakawa (1993) Mechanism of testicular atrophy induced by di-butyl phthalate in rats. Part 4. Changes in the activity of succinate dehydrogenase and the levels of transferrin and ferritin in the Sertoli and germ cells, J. Appl. Toxicol., 13, 241-246.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1997) Vol. 69 Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans, IARC, Lyon, France.
- Ishii, Y., Y. Samejima, F. Saji and T. Nomura (1990) Effect of alcohol sulfate, linear alkylbenzene sulfonate and natural soap on the development of fertilized eggs of the mouse *in vitro*, Mutat. Res., 242, 151-155.
- 石井 裕(1996)新人為起源有害物質のヒト精子およびマウス受精卵への影響、環境科学会誌, 9 : 81-85.
- Kirk, K. M. and M. F. Lyon (1984) Induction of congenital malformations in the offspring of male mice treated with X-rays at pre-meiotic and post-meiotic stages, Mutat. Res., 125, 75-85.
- Nagao, T. and K. Fujikawa (1990) Genotoxic potency in mouse spermatogonial stem cells of triethylenemelamine, mitomycin C, ethylnitrosourea, procarbazine, and propyl methanesulfonate as measured by F_1 congenital defects, Mutat. Res., 229, 123-128.
- 中島裕夫(1998)新人為起源有害物質による生態系への遺伝障害の検出、1997 年度文部省科学研究費重点領域研究「人間地球系」研究広報、pp. 145-146。
- Nomura, T. (1975) Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethan treatment, Cancer Res., 35, 264-266.
- Nomura, T. (1976) Comparison of tumour susceptibility among various organs of foetal, young, and adult ICR/Jcl mice, Brit. J. Cancer, 33, 521-534.
- Nomura, T. and T. Kanzaki (1977) Induction of urogenital anomalies and some tumors in the progeny of mice receiving diethylstilbestrol during pregnancy, Cancer Res., 37, 1099-1104.
- Nomura, T. (1978) Changed urethan and radiation response of the mouse germ cell to tumor induction, In : L. Severi (Ed.), Tumours of Early Life in Man and Animals, Perugia Univ. Press, Perugia, pp. 873-891.
- Nomura, T., H. Gotoh, and T. Namba (1990) An examination of respiratory distress and chromosomal abnormalities in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea, Mutat. Res., 229, 115-122.
- Nomura, T., S. Kimura, S. Hata, T. Kanzaki and H. Tanaka (1990) The synthetic surfactants AS and LAS interrupt pregnancy in mice, Life Sciences, 26, 49-54.
- Nomura, T. (1982) Parental exposure to X-rays and chemicals induces heritable tumours and anomalies in mice, Nature, 296, 575-577.
- Nomura, T. (1986) Further studies on X-ray and chemically induced germ-line alterations causing tumors and malformations in mice, In : C. Ramel (Ed.), Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B : Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Alan R. Liss, New York, pp. 13-20.
- Nomura, T., S. Hata, K. Shibata, and T. Kusafuka (1987) Killing of preimplantation mouse embryos by main ingredients of cleansers AS and LAS, Mutation Res., 190, 25-29.
- Nomura, T. (1988) X-ray and chemically induced germ-line mutation causing phenotypical anomalies in mice, Mutation Res., 198, 309-320.
- Nomura, T. (1994) Male-mediated teratogenesis-ionizing radiation/ethylnitrosourea studies, In : A. F. Olshan, D. R. Mattison (Eds.), Male-mediated Developmental Toxicity, Plenum Press, New York, pp. 117-127.
- 野村大成(1996)新人為起源有害物質の継世代障害検出と総括、1995 年度文部省科学研究費重点領域研究「人間地球系」研究広報、pp. 277-279.
- Ton, T. T. (1981) US chemical warfare and its consequences, Vietnam Courier, Hanoi, reviewed by Watanuki, R., In : Kagaku, 51, 577-580(in Japanese).
- Ton, D. L. ベトナム枯葉剤被害と保健医療問題国際シンポジウム—オレンジ剤被曝後の次世代への影響(1989)於大阪大学医学部、大阪(in Vietnamese).

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「コメット法、その変異原性試験としての展望」(企画:佐々木有、生島隆治)で発表された(座長:佐々木有、生島隆治)。

コメット・アッセイ：放射線によるDNA損傷と修復

生島 隆治

京都教育大学生物学教室 〒612-8522 京都市伏見区深草藤森町1

Comet assay : radiation-induced DNA damage and repair

Takaji Ikushima

Biology Division, Kyoto University of Education
1 Fukakusa-Fujinomori-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8522

Summary

The single cell gel electrophoresis, known as the comet assay, has been introduced as a simple method to measure DNA damage in individual cells. Other methods used to measure DNA damage, such as pulse-field gel electrophoresis, filter elution and sucrose gradient sedimentation, measure only the average response of a large number of cells. Because of its high sensitivity the comet assay has been used to evaluate the genotoxicity of a variety of physical and chemical agents. The use of the comet assay under neutral conditions has revealed that a major component of X-ray induced sublethal damage may be double-strand DNA breaks in cultured mammalian cells, and that the induction of a novel, efficient repair mechanism for chromosomal DNA breaks may be involved in the radioadaptive response. The ability to evaluate heterogeneity of response has potential value in the study of tissue-to-tissue variations in cellular response to ionizing radiation which plays a role in optimizing radiation therapy. Examining DNA damage in individual cells also allows the determination of apoptotic cells. Along with advancements in techniques based on single cell analysis, the comet assay is now expected to open a new research discipline such as single cell molecular biology.

(This paper, in a session chaired by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, was presented to the symposium "A view of Comet assay as a mutagenicity test system", organized by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998)

Keywords : comet assay, radiation, DNA damage and repair, radioadaptive response

緒 言

DNA損傷を個々の細胞単位で検出する簡便な手法として単一細胞ゲル電気泳動法(single cell gel electrophoresis : SCGE), 通称, コメット・アッセイ(comet assay), が開発されて以来すでに10年以上にもなる現

受付: 1999年3月15日
受理: 1999年4月8日
©日本環境変異原学会

在、その変異原性試験としての期待が急速に高まりつつある。

SCGEは、他の著者によって詳しく紹介されているように多くの優れた特性をもつ。まず第一にあげるべき点は、DNA損傷の検出感度がきわめて高いことである。さらに、この手法の最もユニークで優れたところは、細胞集団の平均値ではなく、ヘテロな細胞集団内の個々の細胞単位での解析が可能なことにある。あらゆる生物の構造的・機能的基本単位は細胞であることからして、この点は特に重要な意味をもつ。その他、多様なDNA損傷の

検出が可能であること、細胞が分裂する必要がないこと、小核試験ほどではないが簡便であり、経済的であること、検出に長時間を要しないこと、少數の細胞があればよいこと、多くのサンプルを同時に解析することができるここと、などがあげられる。

これらの特性からみて、SCGE は原理的に *in vitro*, *in vivo* を問わず、あらゆる生物のどの細胞にも適用できる手法である。それ故、変異原性試験としてのみならず、その応用の範囲は計り知れない。本稿では、コメット・アッセイを用いて行われた、放射線による DNA 損傷、および、その修復に関する著者の研究を 1 例として、コメット・アッセイの優秀性について概述し、さらに簡単に将来展望を試みる。

1. DNA 鎮切断の検出

DNA が電離放射線による細胞死の主要なターゲットであると考えられている。電離放射線によって生じる DNA の損傷は、塩基の損傷、塩基の遊離、鎮切断、架橋形成など 100 種類以上もあり、きわめて多種多様である。そのうちでも、細胞死と直接関連するものは、鎮切断、特に 2 本鎮切断である。1 Gy の電離放射線は、2 倍体細胞当たり約 1000 の 1 本鎮切断と 25–40 の 2 本鎮切断を生成する。電離放射線による細胞死は、DNA 鎮切断が修復されなかつたり、誤った修復がなされた結果として起こると考えられている (Radford, 1985)。

細胞内の多種多様な DNA 損傷を定量的に解析することは、きわめて困難であったが、歴史的にまず注目されたのは DNA 切断であった。McGrath and Williams (1966) は、アルカリ蔗糖密度勾配遠心法を開発し、細胞内の DNA 損傷検出法の先鞭をつけた。この方法を用いれば、DNA の鎮切断 (1 本鎮切断および 2 本鎮切断) と、アルカリ不安定部位が検出される。その後、この方法が基礎となって、種々の改良が加えられ、中性条件で 2 本鎮切断の検出にも応用されてきた。この遠心法は、長い間、DNA 鎮切断研究に汎用されてきたが、特に感度の点で問題があった。アルカリ蔗糖密度勾配遠心法では、DNA 鎮切断を検出するのに数十グレイの線量が必要であり、数グレイ程度の線量域で研究される生物作用との対応づけが困難であった。それ以後今日まで、アルカリ分離法、フィルター溶出法、パルスフィールド電気泳動法などの技術が DNA 切断の検出のために開発・応用されており、検出感度も相当よくなっている (Iliakis et al., 1991; Kohn, 1991)。しかし、これらの方法は、いずれも細胞集団中の DNA 損傷を平均したかたちで調べるものである。これに対して、個々の細胞中での DNA 損傷量を測定する方法も考案されてきた。これには、蛍光色素のアクリジンオレンジが、2 本鎮 DNA に結合した場合と 1 本鎮 DNA に結合した場合とで、放出する蛍光の波長が異なる性質 (2 本鎮では緑、1 本鎮では

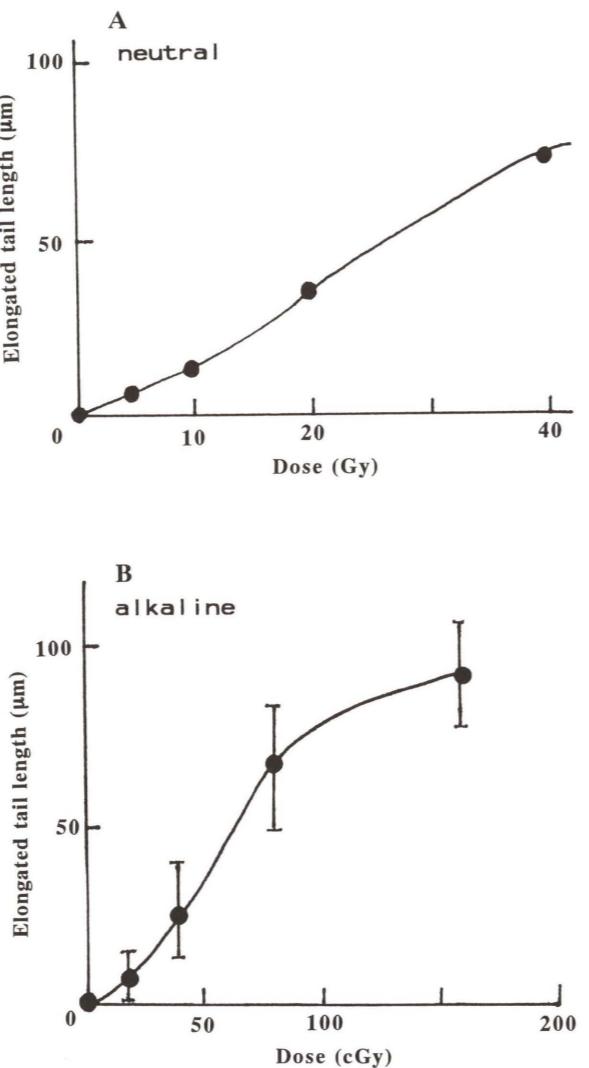


Fig. 1 Dose response of DNA migration in Chinese hamster V79 cells exposed to γ -rays
A : neutral assay condition, B : alkaline assay condition

赤)を利用したものがある。また、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いた細胞化学的検出法もある。本稿で述べるコメット・アッセイも、この系列に属する優れた手法である (Ostling and Johansson, 1984; Sign et al., 1988; McKelvey-Martin et al., 1993)。

コメット・アッセイの種々ある優れた特性のなかで、なによりも特筆すべきは、他のいずれの DNA 損傷検出法よりも高い検出感度を有することである。通常、哺乳類細胞を用いた放射線の生物作用の研究は、数グレイ程度の線量域で行われている。一方、従来の DNA 損傷検出法では数十グレイの線量が必要であった。ところが、アルカリ SCGE では、5 センチグレイ程度の低線量照射 (2 倍体細胞当たり約 50 の 1 本鎮切断を生成する) によって生じた DNA 損傷でも検出が可能である。Fig. 1 は、かなり古いデータである (日本での最初のデータであろう) が、著者が行ったコメット・アッセイによるガンマ線

誘発 DNA 損傷の解析結果である (Ikushima, 1990)。コメット・アッセイの開発により、はじめて、放射線による DNA 損傷とその生物作用を直接的に対応づけることが可能になったといえる。

2. X線による細胞死と DNA 切断

細胞は放射線による障害から回復する能力を有する。この回復は概念的に 2 つに分けられる。一つは Elkind and Sutton により示された亜致死損傷 (sublethal damage : SLD) の回復であり、もう一つは潜在性致死損傷 (potentially lethal damage : PLD) の回復である (Elkind and Sutton, 1960)。SLD は正常な環境下では数時間のうちに修復される障害で、SLD 修復は一定の放射線線量を 2 回に分け、時間間隔をおいて照射したとき、細胞生存率の上昇として認められる。この SLD 修復の分子機構は、今でもほとんどよくわかっていない。ここ

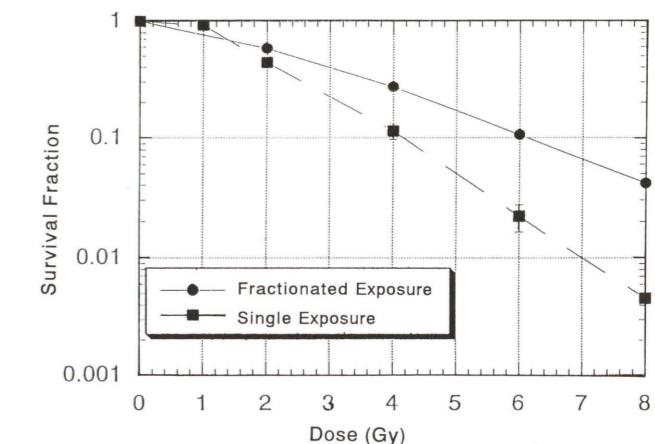


Fig. 2 Cell survival after single and fractionated X-ray irradiation. Fractionated exposure was done at 4h interval

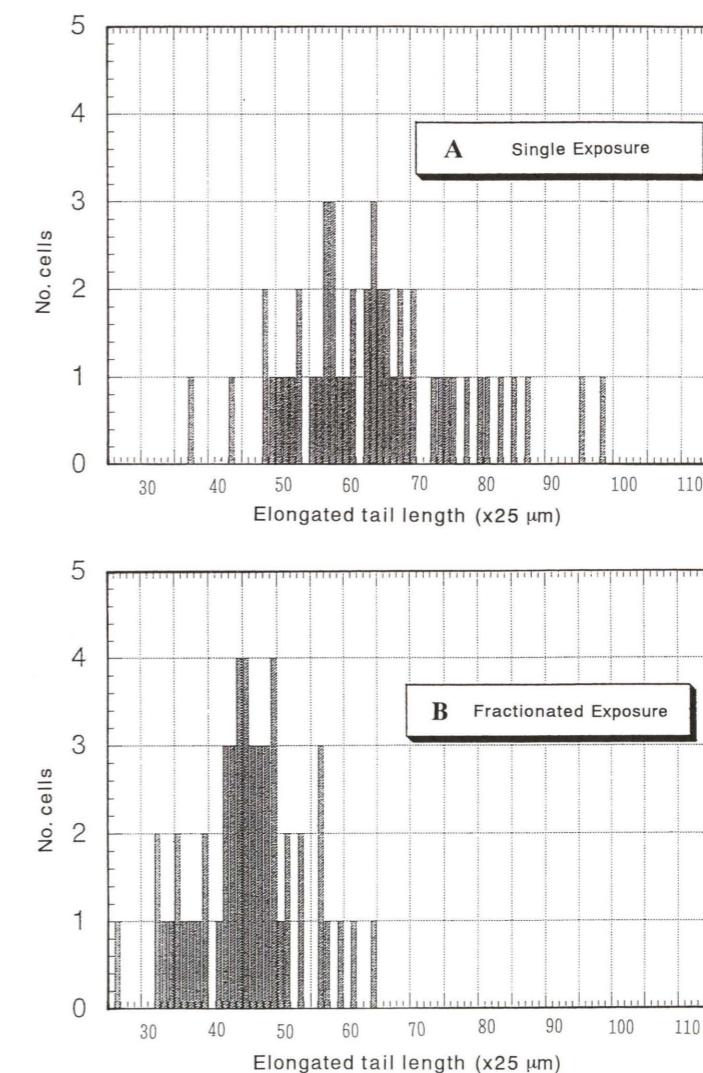


Fig. 3 Distribution of the elongated tail length among cells exposed to single (8 Gy) and fractionated (4 Gy+4 Gy) of X-rays. Fractionated exposure was done at 4h interval
A : single exposure, B : fractionated exposure

では、X線の分割照射による細胞生存率の上昇、すなわち、SLD修復にDNA2本鎖切断の修復が関与するかをコメット・アッセイを用いて検討した小実験を紹介したい(生島、未発表)。

チャイニーズハムスターV79細胞を用いて、同じX線分割照射後の生存率とDNA2本鎖切断を、それぞれ、コロニー形成法と中性条件下でのコメット・アッセイによって調べた。その結果、分割照射による細胞致死率の減少とDNA2本鎖切断の修復率とのあいだによい相関がみられた(Fig.2)。また、DNA損傷の細胞間分布の変化からみて、修復後に残存するDNA2本鎖切断は、どの細胞にも均等に存在しており、DNA2本鎖切断の修復率は、集団内のどの細胞でも均一であると考えられる(Fig.3)。これらの結果から、SLD修復には、DNA2本鎖切断の修復が少なからず関与していることが示唆される。

最近、真核細胞におけるDNA2本鎖切断の修復には、相同組換え(homologous recombination)修復系と非相同DNA末端結合(nonhomologous DNA end-rejoining)修復系の少なくとも2種類があること、しかも、DNA複製時において、相同組換えは致死的な2本鎖切断を常時修復していることが明らかになってきた(Takata et al., 1998)。SLD修復に関わるDNA2本鎖切断の修復にはどのような修復系が働いているのかも、間もなく明らかになるものと思われる。

3. 放射線適応応答の機構

最近、高等動物細胞には、あらかじめ極低線量の放射線を照射しておくと、再度の放射線照射に耐性になる能力があることが明らかにされた。前もってベータ線やガンマ線を哺乳類培養細胞に照射しておくと、後に照射する放射線が誘発する染色体異常の頻度が激減する。同様の現象は放射線照射された細胞の生存率や突然変異率に対してもみられる。この放射線による適応応答は、放射線照射後ある一定時間後にみられ、その発現には4、5時間程度の時間間隔、*de novo*のタンパク合成が必要である。また、p53を中心としたシグナルトラスダクションの関与が示されている。これらの現象的特性は、放射線適応応答が低線量放射線照射によるDNA修復系の活性化により、続く放射線によるDNA損傷を効率よく修復・軽減することにより起こるものであることを強く示唆している。そこで、この仮説を検証する目的で、中性条件下でのコメット・アッセイにより、染色体異常の直接的な生成要因であるDNA2本鎖切断の修復動態を調べた。

その結果、低線量放射線照射により適応化した細胞では、特に早期での修復速度が早くなっている、残存する損傷量も減少していることが明らかになった(Fig.4)。初期損傷量にはなんらの差もないことから、低線量放射

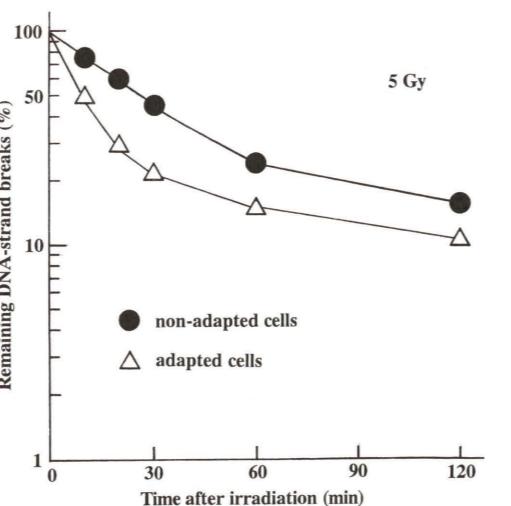


Fig. 4 Repair kinetics of DNA double-strand breaks induced by 5 Gy of γ -rays in adapted (pre-exposed to 5 cGy and incubated for 4h) and non-adapted cells. After irradiation, repair was allowed by incubating the cells at 37°C. The neutral comet assay was used to measure DNA strand breaks

線照射は、再度の放射線によるDNA損傷の生成自身を抑制するのではなく、生成した損傷の効率的な修復を促進するような細胞内変化を誘導するといえる。放射線適応応答が発現する間に、このような照射後早期に作動するDNA修復機構に関わる酵素・タンパク質の誘導合成と蓄積が起こるのではないかと考えられる(Ikushima et al., 1996)。

4. 将来展望

遺伝毒性試験として必要な条件としては、いろいろなタイプの細胞における多様なDNA損傷を検出できること、広い実験条件に適用できること、検出感度が高いこと、迅速であること、簡易で、安価であること等々があげられるが、コメット・アッセイはこれらすべての条件を満たすものである。一個一個の細胞で、DNA損傷そのものを検出することができる点は、他の既存の試験法にはみられない特筆すべきものである。この特性は、癌の放射線治療の成否を決定する主要因である固形腫瘍内の低酸素細胞の検出に生かされている(Olive et al., 1998)。多くの優れた特性を内包するコメット・アッセイは、DNA損傷・修復に関わるあらゆる研究分野に応用が可能であろう。アポトーシス(apoptosis)の検出はもちろんのこと、生殖細胞での遺伝毒性の検出系としても役立つだろうし、自然保護が重要な地球的課題になっている現在、野生動植物の環境モニタリングとしての利用も考えられる(Olive et al., 1993; Gichner and Plewa, 1998)。さらに、生命科学の基礎的な面でも、免疫化学的手法やFISHなどの他の単一細胞単位に基づく研究手法と組み合わせることによって、単細胞分子生物学(Sin-

gle Cell Molecular Biology)ともいえる新しい分野の開拓に発展する可能性も期待できる(Santos et al., 1997)。

コメット(彗星)という語は、その分野で急に注目された有能な新人の喩えとして使われる。今や、その言葉通りになりつつあるといつても過言ではないだろう。

参考文献

- Elkind, M.M. and H. Sutton (1960) Radiation response of mammalian cells grown in culture, Radiat. Res., 13, 556-593.
 Gichner, T. and M.J. Plewa (1998) Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants, Mutat. Res., 401, 143-152.
 Ikushima, T., H. Aritomi and J. Morisita (1996) Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells, Mutat. Res., 358, 193-198.
 Ikushima, T. (1990) Visualization of DNA damage in individual cells, Annu. Rep. Res. Reactor Inst., Kyoto Univ., 23, 85-90.
 Iliakis, G., D. Blocher, L. Metzger and G. Pantelias (1991) Comparison of DNA double-strand break rejoining as measured by pulsed field gel electrophoresis, neutral sucrose gradient centrifugation, and non-unwinding filter elution in irradiated plateau-phase CHO cells, Int. J. Radiat. Biol., 59, 927-939.
 Kohn, K.W. (1991) Principles and practice of DNA filter elution, Pharmacol. Ther., 49, 55-77.
 McKelvey-Martin, V.I., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. DeMeo and A. Collins (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European perspective, Mutation Res., 288, 47-63.
 McGrath, R.A. and R.W. Williams (1966) Reconstruction *in vivo* of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid: the rejoicing of broken pieces, Nature 212, 534-535.
 Olive, G., J.P. Fazer and J.P. Banath (1993) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, Radiat. Res., 136, 130-136.
 Olive, G., P.J. Johnston, J.P. Banath and R.E. Durand (1998) The comet assay: a new method to examine heterogeneity associated with solid tumors, Nature Medicine 4, 103-105.
 Ostling, O. and K.J. Johanson (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 123, 291-298.
 Radford, I.R. (1985) The level of induced DNA double-strand breakage correlates with cell killing after X-irradiation, Int. J. Radiat. Biol., 48, 45-54.
 Santos, S.J., N.P. Singh and A.T. Natarajan (1997) Fluorescence *in situ* hybridization with comets, Exp. Cell Res., 232, 407-411.
 Sign, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, and E.L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. Cell Res., 175, 184-191.
 Sign, N.P., R.E. Stephens and E.L. Schneider (1994) Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, Int. J. Radiat. Biol. 66, 23-28.
 Takata, M., M.S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Sinohara and S. Takeda (1998) Homologous recombination and non-homologous end-rejoining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, EMBO J., 17, 5497-5508.

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「コメット法、その変異原性試験としての展望」(企画:佐々木有、生島隆治)で発表された(座長:佐々木有、生島隆治)。

In vitro および *in vivo* における 6 値クロムによる DNA 損傷の検出

—Comet assay とアルカリ溶出法、カリウム-SDS 沈殿法の比較—

上野 俊治, 山口 未央, 福島 拓哉, 松田 智行
諏佐 信行, 古川 義宣, 杉山 正康¹, 佐々木 有²

北里大学獣医畜産学部獣医公衆衛生学教室 〒034-8628 青森県十和田市東23番町35-1

¹杉山薬局 〒821-0011 福岡県山田市下山田424

²八戸工業高等専門学校物質工学科 〒039-1104 青森県八戸市田面木上野平16-1

Detection of DNA damage induced by hexavalent chromium *in vitro* and *in vivo*

—Comparison of comet assay, alkaline elution method and K-SDS precipitation method—

Shunji Ueno, Mio Yamaguchi, Takuya Fukushima, Tomoyuki Matsuda,
Nobuyuki Susa, Yoshinori Furukawa, Masayasu Sugiyama¹, Yu. F. Sasaki²

Laboratory of Veterinary Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences,
Kitasato University

Higashi 23-35-1 Towada, Aomori 034-8682, Japan

¹Sugiyama Pharmacy, Shimoyamada 424 Yamada, Fukuoka 821-0011, Japan

²Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National
College of Technology
Tamonoki Uwanotai 16-1 Hachinohe, Aomori 039-1104, Japan

Summary

Hexavalent chromium-induced DNA damage *in vitro* and *in vivo* was evaluated by the alkaline single cell gel assay (comet assay), the alkaline elution method and by the K-SDS precipitation method. The chromium-induced DNA damage in the primary culture of rat hepatocytes could readily be detected by each of these three methods and there was little fluctuation in the values obtained in the experiments. It was difficult, however, to detect the DNA damage caused by hexavalent chromium in the mouse liver using the alkaline elution method and the K-SDS precipitation method, because the values obtained with these two methods varied widely between each experiment and because the control values were higher than those in *in vitro* experiments. However, because the numerical values of DNA damage in the control group obtained by the comet assay were lower and much more stable than those in the chromium-treated groups, the DNA damage caused by hexavalent chromium in the mouse liver was detected without difficulty by this method. These results suggest that the comet assay might be a more suitable method for detecting DNA damage induced by some chemicals *in vivo* than the other two methods.

受付: 1999年3月15日

受理: 1999年4月20日

©日本環境変異原学会

(This paper, in a session chaired by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, was presented to the symposium "A view of Comet assay as a mutagenicity test system", organized by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords : hexavalent chromium, DNA damage, comet assay, alkaline elution method, K-SDS precipitation method

緒 言

6価クロム化合物によるDNA損傷は、細胞内における本物質の代謝過程で発生するハイドロキシルラジカルと密接に関連している(Sugiyama, 1994)。すなわち、細胞内に取り込まれた6価クロムは、そこに存在するさまざまな細胞内還元物質によって1電子還元を受け5価クロムとなる過程で過酸化水素を生成する(Shi et al., 1992)。さらに5価クロムは細胞内の過酸化水素と反応してハイドロキシルラジカルを生成し、自身は6価の酸化状態となることから、6価クロムは細胞内におけるハイドロキシルラジカル生成反応において一種の触媒のような働きをすると考えられている(Aiyar et al., 1990; Shi and Dalal, 1990)。細胞内に生成された5価クロムは細胞のDNAと直接結合し(Sugiyama et al., 1991)、ここに過酸化水素が作用すると局所的なハイドロキシルラジカルの発生によってDNAが損傷されると推定される(Kawanishi et al., 1986)。この結果、6価クロム化合物は培養細胞や実験動物などを用いた実験でDNAに一本鎖切断やDNA-タンパク架橋などを引き起こすことが証明されている(DeFlora and Wetterhahn, 1989)。

しかしながら、このような6価クロムによるDNA損傷機序に関する研究のほとんどは、試験管内の化学反応または培養細胞を用いて行われたもので、生体を用いた研究報告は少なく、また、*in vitro*と*in vivo*における6価クロム化合物によるDNA損傷を比較した報告もない。そこで我々は、*in vivo*の実験系における6価クロム代謝とDNA損傷との関係を研究するための基礎データを得ることを目的として、*in vitro*および*in vivo*の実験系で6価クロムによって誘起されるDNA損傷を、アルカリ溶出法、カリウム-SDS沈殿法およびアルカリ単細胞電気泳動法(Comet assay)によって検出し、その成績を比較した。

材料および方法

*In vitro*の実験系として初代培養ラット肝細胞を用いた。定法で分離培養した肝細胞にCr濃度5μMとなるよう重クロム酸カリウムを添加し、37°C、1時間培養後、PBSで洗浄して各実験に供した。また、*in vivo*の実験系には、20mg Cr/kgの重クロム酸カリウムを腹腔内投与して15分後のマウス(ddY系、雄、5週齢)の肝臓を用

いた。肝臓を試料としてアルカリ溶出法を行う場合、定法に従って核画分を精製、調整して用いた。また、カリウム-SDS沈殿法およびComet assayを行う場合は、肝臓に冷却したホモジナイズ緩衝液(75mM NaCl, 24mM EDTA-2 Na, pH 7, 5mL)を加え、クリアランスの緩いテフロン製ポッター型ホモジナイザーで緩やかにホモジナイズし、700gで10分間冷却遠心して沈殿した核画分を同緩衝液に再懸濁した試料を用いた。

アルカリ溶出法は、Kohn and Grimek-Ewingの原法(1973)を改良して行った(Sugiyama et al., 1991)。すなわち、孔径5μmのSMフィルター上に試料をのせ、proteinase K(0.5mg/mL)を含んだLysis緩衝液(2% SDS, 25mM EDTA-2 Na, pH 10, 3mL)を添加して45分間室温で反応後、20mM EDTA-2 Na溶液(pH 10, 5mL)で洗浄した。ついで、アルカリ溶出液(20mM EDTA-2 Na, pH 12.2, 24mL)を加えて0.4mL/minの流速で溶出させた。溶出液を3mLずつ分画し、各分画に含有されるDNA量およびフィルター上に残存しているDNA量を測定した。

カリウム-SDS沈殿法は、Zhitkovich and Costaの方法(1992)で行った。試料100μLに2% SDS含有20mM Tris-HCl緩衝液(1mM PMSF含有, pH 7.5, 0.5mL)を加えて65°C、10分間反応後、200mM KCl含有同緩衝液(0.5mL)を添加して混和し、5分間氷冷下で冷却した。遠心分離して得られた沈殿を100mM KCl含有同緩衝液(1mL)に再懸濁して65°C、10分間反応後5分間冷却して遠心分離した。この操作を2回繰り返してタンパク質結合性DNAの沈殿を得た。別に、対照および標準用としてBSA溶液(1mg/mL)100μLを数本分注し、同様に操作した。得られた沈殿を100mM KCl, 10mM EDTA含有同緩衝液(0.9mL)に懸濁し、標準用には既知濃度のDNAを添加した。試料溶液にproteinase K(2mg/mL, 0.1mL)溶液を添加して50°C、3時間反応後、BSA溶液(0.1mL)を添加、冷却してSDSを沈殿させ、遠心分離後に得られた上澄中のDNA濃度を求め、総DNA量に対するタンパク質結合DNA量の比率を算出し、DNA-protein crosslinking coefficientとした。

Comet assayはSasaki et al.の方法(1997)で行った。全面フロストスライドグラス上に1%Agarose GP-42(Nacalai)の薄層を作成し、試料懸濁液を等量の1%Agarose-LGT(低融点アガロース、Nacalai)と混和し

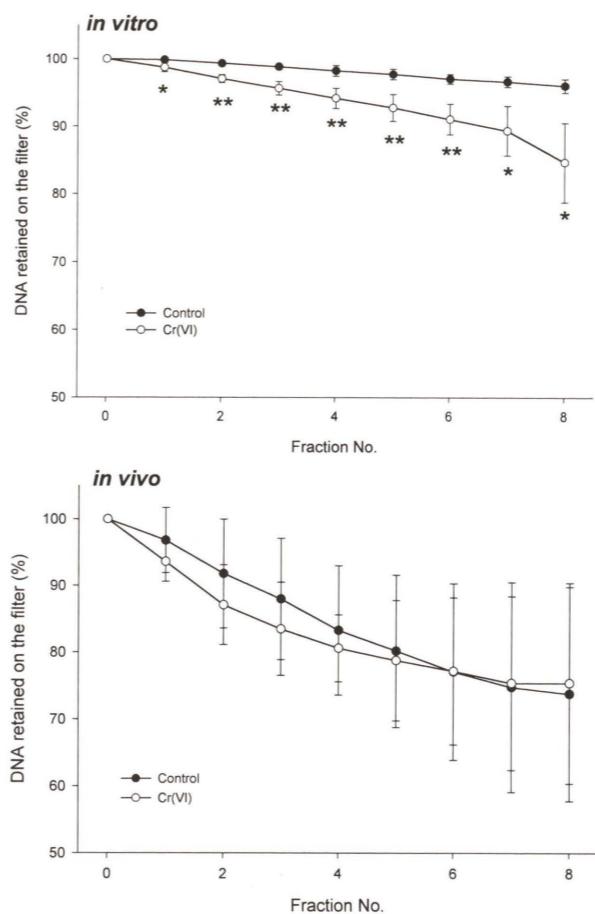


Fig. 1 The effect of chromate on DNA elution kinetics of the primary cultures in rat hepatocytes (*in vitro*) or mouse liver nuclei (*in vivo*)

The cultured hepatocytes were treated with 5μM chromate for 1hr. The mice were injected with potassium dichromate (20 mg Cr/kg, ip) and killed after 15 min. Each value is mean ± S.D. (n=4)

*: p<0.05 compared with control group

**: p<0.01 compared with control group

て第2層とした後、1%Agarose GP-42で第2層を覆った。作成したゲルを細胞溶解液(2.5M NaCl, 0.1M EDTA-4 Na, 10mM Tris, 1% Sodium N-dodecylsarcosinate, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10)に0°Cで1時間以上浸漬して核を溶解させた。ゲルをサブマリン型電気泳動槽に移し、氷冷アルカリ変性液(0.3M NaOH, 1mM EDTA-2 Na, pH 13)で10分間核DNAを解離後、電気泳動(1V/cm, 300mA, 15分)した。泳動後ゲルを0.4M Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)中で中和し、臭化エチジウム(20μg/mL, 50μL)でゲルを染色してG励起系のフィルターを装着した蛍光顕微鏡で100個以上の核の像を観察した。DNA損傷の程度は、核の長径から短径を減じた値を移動度(Migration)として表し、Comet像を示した核の存在比率も求めた。

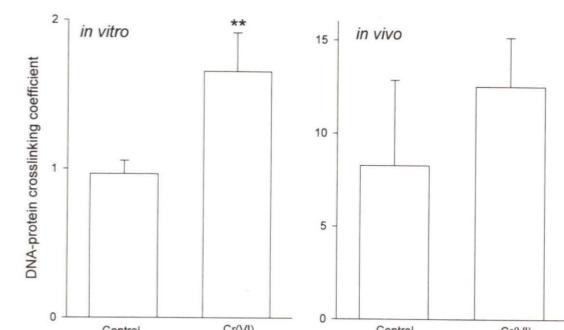


Fig. 2 Detection of DNA-protein crosslinks in the primary cultures of rat hepatocytes (*in vitro*) or mouse liver nuclei (*in vivo*)

The cultured hepatocytes were treated with 5μM chromate for 1hr. The mice were injected with potassium dichromate (20 mg Cr/kg, ip) and killed after 15 min. Each value is mean ± S.D. (n=4)

**: p<0.01 compared with control group

各実験から得られた値は、F検定によって分散分析を行った後、等分散の場合はStudentのt-test、不等分散の場合はWelchのt-testを用いて有意差検定を行った。

結 果

アルカリ溶出法を6価クロムで処理した培養細胞および肝臓試料に適用した場合を比較した。Fig.1に示したように、6価クロムで処理しなかった培養肝細胞の対照ではほとんどDNAがフィルターから溶出されなかったのに対して、6価クロム処理細胞では有意なDNA溶出促進が観察された。肝臓を用いた場合は、対照とした6価クロム未処理群でもかなりの量のDNAが溶出してしまい、また、実験ごとの値の変動が大きく、6価クロム処理試料との間の有意差を検出するのは困難であった。

カリウム-SDS沈殿法の結果はFig.2に示した。培養細胞に本方法を適用すると、6価クロム処理を行わなかった対照では総DNA量の0.97±0.09%程度がタンパク質と結合した形で検出されたが、6価クロム処理細胞では同DNA量が1.66±0.26%と有意に増加した。これに対して、肝臓試料では6価クロムを投与しなかった対照群で総DNA量の8.27±5.58%程度がタンパク質と結合した形で検出され、6価クロム処理群の肝臓でも12.50±2.63%と両群間に統計学的な有意差は検出できなかった。

Comet assayの成績はFig.3に示した。本方法では、培養細胞における対照の移動度が0.478±0.089μmで、Comet像を示す細胞も4.5±1.6%と少なかったが、6価クロム処理細胞では移動度が18.670±5.139μm、Comet像を示す細胞も27.9±6.2%と有意に増加した。肝臓試料においても、6価クロムを投与しなかった対照群では移動度が1.337±0.894μm、Comet像が観察され

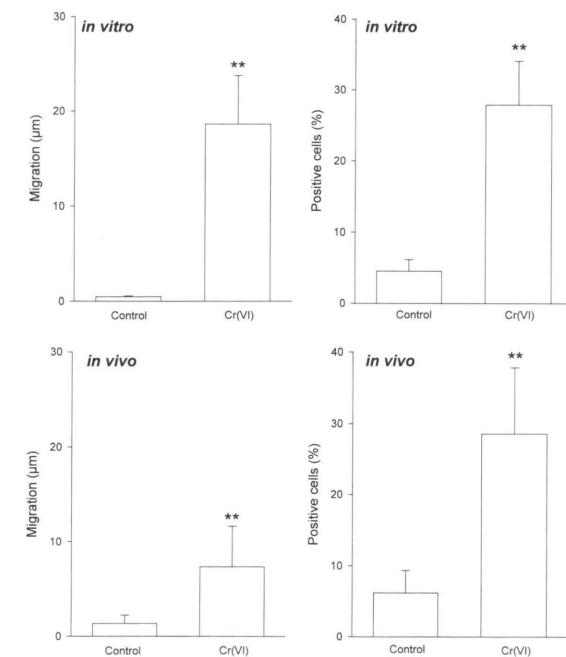


Fig. 3 Detection of DNA lesions in the primary cultures of rat hepatocytes (*in vitro*) or mouse liver nuclei (*in vivo*) by alkaline single cell gel assay (comet assay)

The cultured hepatocytes were treated with 5 μM chromate for 1 hr. The mice were injected with potassium dichromate (20 mg Cr/kg, ip) and killed after 15 min
Each value is mean ± S.D. (n=4)
**: p<0.01 compared with control group

た核は 6.2±3.2 %程度であったのに対して、6 値クロム投与群では移動度が 7.36±4.29 μm, Comet 像が観察された核も 28.6±9.3 %と有意に増加した。

考 察

実験動物に 6 値クロムを投与した場合の臓器における DNA 損傷を観察した報告は、アルカリ溶出法を用いた Tsapakos et al. の報告 (1981) とカリウム-SDS 沈殿法を用いた Zhitkovich and Costa の報告 (1992) がその代表的なものである。

まず、Tsapakos et al. の報告 (1981) であるが、これはラットに 6 値クロムを投与後採材した肝臓および腎臓から核画分を精製してアルカリ溶出法を適用したものである。彼らの成績も我々の成績と同様に 6 値クロムを投与しなかった対照群の臓器から調整された核画分のフィルター上の最終的な残存率が最初に添加した DNA 量の約 70 %, 6 値クロム投与群でも約 65 %程度と、両群の差が小さいことから DNA 溶出速度の差を明確にすることが難しいと考えられる。我々の実験成績でも、アルカリ溶出法を肝臓から精製した核画分に適用した場合、同様に対照群と 6 値クロム処理群の DNA 溶出速度の差を明確にできず、また、実験ごとの値の変動が大きかった。これに対して培養細胞に本法を適用した場合、他の多くの

報告と同様に 6 値クロム未処理の対照細胞では DNA のフィルターからの溶出がほとんど認められず、6 値クロム処理細胞との DNA 溶出速度の差が明瞭であり、実験ごとに得られるデータも変動が少なかった。したがって、本方法は培養細胞を用いた実験では比較的安定した値が得られるが、*in vivo* の実験系に適用するにはさらに実験条件を検討する必要がある。

次に、Zhitkovich and Costa の報告 (1992) であるが、これは 6 値クロム処理した CHO 細胞および 6 値クロム投与マウスから採材した白血球にカリウム-SDS 沈殿法を適用したものである。彼らの成績では、全 DNA 量に対するタンパク質結合性 DNA 量の比率が 6 値クロム未処理の対照 CHO 細胞で約 1 %であったのに対して、6 値クロム処理 CHO 細胞では 3-5 %に上昇している。また、*in vivo* で 6 値クロムを投与したマウス白血球のタンパク質結合性 DNA 量も対照例の 2 倍程度に上昇すると報告されている。われわれの実験成績でも、培養肝細胞を用いた実験では 6 値クロム処理によるタンパク質結合性 DNA 量の有意な上昇が認められた。しかしながら、*in vivo* で 6 値クロムを投与したマウス肝臓では、対照群に比較して上昇傾向は示したが統計学的な有意差では検出できなかった。その原因として、6 値クロム未処理マウスの肝臓試料のタンパク質結合性 DNA 量が、培養肝細胞における値と比較すると約 8 %と 9 倍程度高く、値の変動も大きいことがあげられる。したがって、本方法に関するも *in vivo* の実験系に応用するにはさらに安定した値を得るための実験条件を検討する必要がある。

最後に comet assay の成績であるが、本方法は今回実験した 3 つの方法の中で唯一 *in vitro* および *in vivo* の実験系ともに 6 値クロムによる DNA 損傷を統計学的な有意性を持って検出できる方法であった。この方法で得られた値は、培養肝細胞およびマウス肝臓を用いた場合ともに対照値がきわめて低く、かつ、実験ごとの値の変動もほとんどなかった。さらに、移動度および comet 像を示す核の陽性率とともに、6 値クロム投与群から得られた値と対照群から得られた値との差が大きいことも、両群間の有意差の検出が容易であった理由である。これらの成績は、本方法が *in vivo* の実験系に用いた場合も他の 2 つの方法に比較してきわめて高感度であることを示唆している。また、comet assay の試験手法が今回実験した他の 2 つの方法に比較して簡便、かつ、短時間で処理し得たことも、本方法の利点であった。

以上のように、*in vitro* および *in vivo* の実験系で 6 値クロムによって誘起される DNA 損傷をアルカリ溶出法、カリウム-SDS 沈殿法および comet assay で評価した結果、comet assay は *in vitro* および *in vivo* ともに誘起された DNA 損傷を最も高感度、かつ、簡便に検出できることが明らかとなった。今後、本方法を用いてさまざまな化学物質の生体内における代謝と DNA 損傷機序

との関係の究明が期待される。

参考文献

- Aiyar, J., H. J. Berkovits, R. A. Floyd and K. E. Wetterhahn (1990) Reaction of chromium(VI) to chromium(V) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: Reactive intermediates and resulting DNA damage, *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 595-603.
- DeFlora, S. and K. E. Wetterhahn (1989) Mechanism of chromium metabolism genotoxicity, *Life Chem. Rep.*, 7, 169-244.
- Kawanishi, S., S. Inoue and S. Sano (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium dichromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, 261, 184-188.
- Kohn, K. W. and R. A. Grimek-Ewing (1973) Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cell, *Cancer Res.*, 33, 1849-1853.
- Sasaki, Y. F., S. Tsuda, F. Izumiya and E. Nishidate (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutat. Res.*, 388, 33-44.
- Shi, X. and N. S. Dalal (1990) NADPH-dependent flavoenzyme catalyzed one electron reduction of metal ion and molecular oxygen and generated hydroxyl radicals, *FEBS Lett.*, 276, 189-191.
- Shi, X., X. Sun, P. M. Gannet and N. S. Dalal (1992) Deferoxamine inhibition of Cr(V)-mediated radical generation and deoxyguanine hydroxylation: ESR and HPLC evidence, *Arch. Biochem. Biophys.*, 293, 281-286.
- Sugiyama, M. (1994) Role of antioxidants in metal-induced damage, *Cell Biol. Toxicol.*, 10, 1-22.
- Sugiyama, M., K. Tsuzuki, T. Hidaka, R. Ogura and M. Yamamoto (1991) Reduction of chromium(VI) in Chinese hamster V-79 cells, *Biol. Trace Element Res.*, 30, 1-8.
- Sugiyama, M., K. Tsuzuki and R. Ogura (1991) Effect of ascorbic acid on DNA damage, cytotoxicity, glutathione reductase, and formation of paramagnetic chromium in Chinese hamster V-79 cells treated with sodium chromate (VI), *J. Biol. Chem.*, 266, 3383-3386.
- Tsapakos, M. J., T. H. Hampton and K. Wetterhahn-Jennette (1981) The carcinogen chromate induces DNA cross-links in rat liver and kidney, *J. Biol. Chem.*, 256, 3623-3626.
- Zhitkovich, A. and M. Costa (1992) A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and *in vivo*, *Carcinogenesis*, 13, 1485-1489.

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「コメット法、その変異原性試験としての展望」(企画:佐々木有、生島隆治)で発表された(座長:佐々木有、生島隆治)。

コメットアッセイを用いたDNA損傷の検出 —試験原理の検証—

宮前 陽一

藤沢薬品工業株式会社・安全性研究所 〒532-8514 大阪市淀川区加島2-1-6

Detection of DNA damage using the comet assay : A verification of the test principles

Youichi Miyamae

Toxicology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.
2-1-6 Kashima,
Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan

Summary

The comet assay utilizes some of the chemical properties of DNA. DNA is denatured and unwound at pH generally above 12.0. Furthermore, at pH 12.6 or higher alkaline condition, alkali labile sites are quickly transformed to strand breaks. Thus DNA with strand breaks and alkali labile sites becomes shorter single strand DNA at about pH 12.0 and 12.6 or higher, respectively. Therefore the alkaline condition is an important factor for the comet assay to detect the genotoxic effects of chemicals. In order to verify the relationship between DNA migration and alkaline condition, the effect of model mutagens with different mode of action was evaluated with the comet assay under two different alkaline conditions (pH12.1 and 12.6). We also evaluated the relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. The results of these studies demonstrate that the comet assay will provide reliable data based on the test principles and biological response.

(This paper, in a session chaired by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, was presented to the symposium "A view of Comet assay as a mutagenicity test system", organized by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords : comet assay, DNA damage, single strand break, alkali labile site, cross linking

緒 言

コメットアッセイはSinghら(1988)により開発された個々の細胞のDNA損傷を検出する簡便で高感度な短期変異原性試験である。Fig.1に示したようにDNAの

断片化の程度に応じて種々のほうき星(コメット)のような像が観察されることから、この名称がつけられている。その試験原理は、以下に示したDNAが持つ3つの化学的性質をうまく組み合わせたものである(Fairbairn et al., 1995; Kohn, 1991)。

- 1) 二本鎖DNAをおよそpH 12.0以上の強アルカリに暴露すると一本鎖にほどける。
- 2) DNAをpH 12.6以上の強アルカリに暴露するとアルカリ感受性部位(例:アルキル化部位, 付加体形成部

受付: 1999年3月3日
受理: 1999年3月15日
©日本環境変異原学会

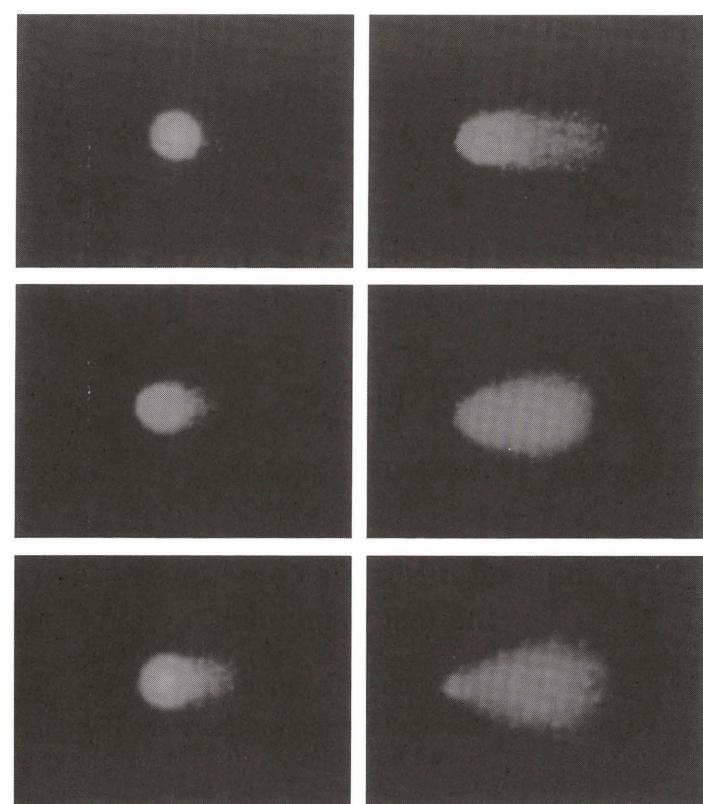


Fig. 1 The comet images

位)からの切断が促進される。

3) アガロースゲルなどに封入したDNAに電圧をかけると、荷電と抵抗のバランスにより分子量の小さいDNA(断片化DNA)ほど陽極側に移動する。

したがって、コメットアッセイがその試験原理を忠実に反映するならば、一本鎖切断、アルカリ感受性部位形成あるいは架橋形成といったDNA損傷タイプの違いを反映した成績が得られるはずである。さらに、試験系として生きた細胞を用いれば、DNAの化学的性質とは別に、DNA修復や細胞死といった生体側の反応も成績に反映されるはずである。

本稿では、さまざまな種類の損傷を持つDNAがコメットアッセイでどういった成績を示すことが期待されるかを試験原理や生体側の反応に基づいて解説し、実際の試験成績を用いて検証した(Miyamae et al., 1997, 1998a).

1. 試験原理の検証

本章ではコメットアッセイの試験原理であるDNAの化学的性質に焦点を当てた。なお、紹介する試験成績は、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO K1細胞に既知変異原物質を1時間処理し、処理直後の細胞をpH 12.1と12.6のアルカリ条件のコメットアッセイに供して得られたものである。

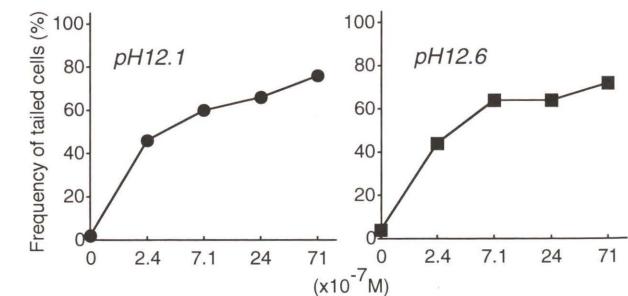


Fig. 2 DNA damage detected at pH 12.1 and 12.6 in cultured cells after treatment of single strand bleaker, bleomycin (BLM)

1) 一本鎖切断を持つDNA

DNAはpH 12.0以上のアルカリ条件下で二重鎖間の水素結合が壊れるために開裂し、さらに一本鎖切断部位から切れて断片化が起きる。したがって、pH 12.0以上のアルカリ条件でコメットアッセイを行えば、一本鎖切断を持つDNAは陽性反応を示すことが期待される。

そこで、一本鎖切断剤であるbleomycin (BLM)で処理した細胞のDNAを用い、pH 12.1と12.6のアルカリ条件でコメットアッセイを行った。その結果、いずれのpH条件下においても、BLMは処理濃度に依存した陽性反応を示した(Fig. 2)。これらの結果は、一本鎖切断を持つDNAがコメットアッセイの試験原理を反映した反応を示すことを示唆している。

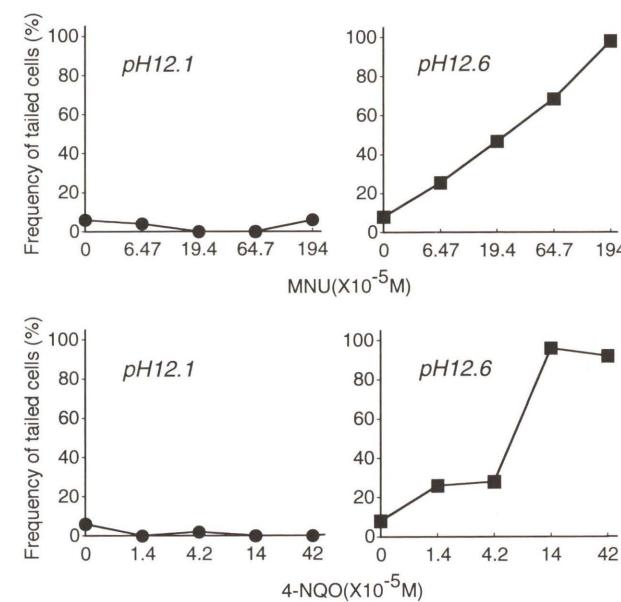


Fig. 3 DNA damage detected at pH 12.1 and 12.6 in cultured cells after treatment of the alkylating agent, methyl nitrosourea (MNU) and the adduct inducer, 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)

2) アルカリ感受性部位を持つDNA

アルカリ感受性部位を持つDNAは、pH 12.1で一本鎖に開裂するもののそれ以上の断片化は起こらない。しかし、pH 12.6ではアルカリ感受性部位からの切断が促進されて断片化が起きる。したがって、コメットアッセイではアルカリ感受性部位を持つDNAはpH 12.1で陰性、pH 12.6で陽性結果を示すことが期待される。

アルカリ感受性部位の多くは、塩基のアルキル化あるいは付加体形成などが原因で塩基の欠損した部位と考えられている(Kohn, 1991)。つまり、アルカリ感受性部位を持つDNAは、アルキル化剤や付加体形成剤で処理することにより調製が可能である。ここでは、典型的なアルキル化剤であるmethyl nitrosourea (MNU)と付加体形成剤である4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)を用いた試験成績を紹介した。Fig. 3に示したように、MNUおよび4-NQOをそれぞれ処理したところ、pH 12.1では陰性、pH 12.6では処理濃度に依存した陽性の結果が得られており、アルカリ感受性部位に関しては試験原理を反映した成績が得られると考えられた。

3) 架橋形成が起きたDNA

架橋形成部位を持つDNAは、DNA鎖間に形成された架橋により一本鎖の開裂が阻害されるため、pH 12.1以上のアルカリ条件でも断片化は起こらない。したがって、コメットアッセイでは架橋形成部位を持つDNAはpH 12.1および12.6のいずれにおいても陰性の結果が期待される。

Fig. 4に示したように、架橋形成剤であるmitomycin

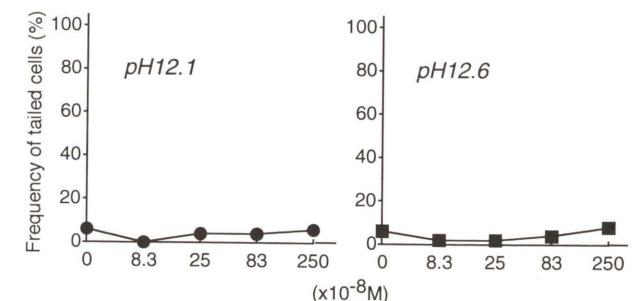


Fig. 4 DNA damage detected at pH 12.1 and 12.6 in cultured cells after treatment of the DNA cross linking agent, mitomycin C (MMC)

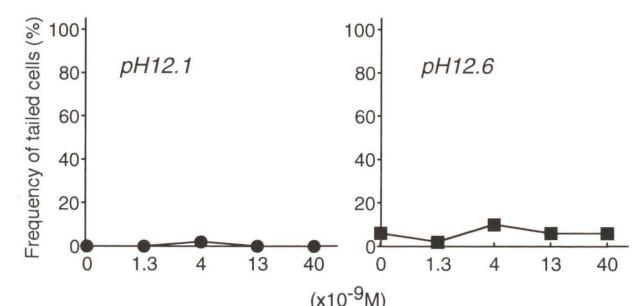


Fig. 5 DNA damage detected at pH 12.1 and 12.6 in cultured cells after treatment of the DNA intercalator, actinomycin D (AMD)

C (MMC)を用いたコメットアッセイを行ったところ、期待通りの成績が得られた。

なお、この成績を一見すると、コメットアッセイは架橋形成部を検出し得ないと結論づけられる。しかし、5項目で述べるように、コメットアッセイでは架橋形成をDNA断片化の抑制反応として捉えることが可能である。

4) 化合物がインタークレートしたDNA

1)~3)では、直接的な障害を持つDNAが、試験原理に基づいた反応を示すか否かについて述べてきた。一方で、DNAに障害がなければアルカリ条件にかかわらず陰性の結果が得られること、すなわち、偽陽性が起きないことを検証しておくことも重要である。そこで、代表例として、化合物がインタークレートしたDNAについて以下に紹介した。

インタークレーターであるactinomycin D (AMD)は、最終的にDNAと結合するが、処理直後はDNAにインタークレートしている。そこで、AMDを用いたコメットアッセイを行ったところ、いずれのpHにおいても陰性の結果が得られた(Fig. 5)。

5) 一本鎖切断と架橋形成が起きたDNA

コメットアッセイにおいて、一本鎖切断を持つDNAからは陽性、架橋形成が起きたDNAからは陰性の結果が得られることはすでに述べた。これらの結果は、一本

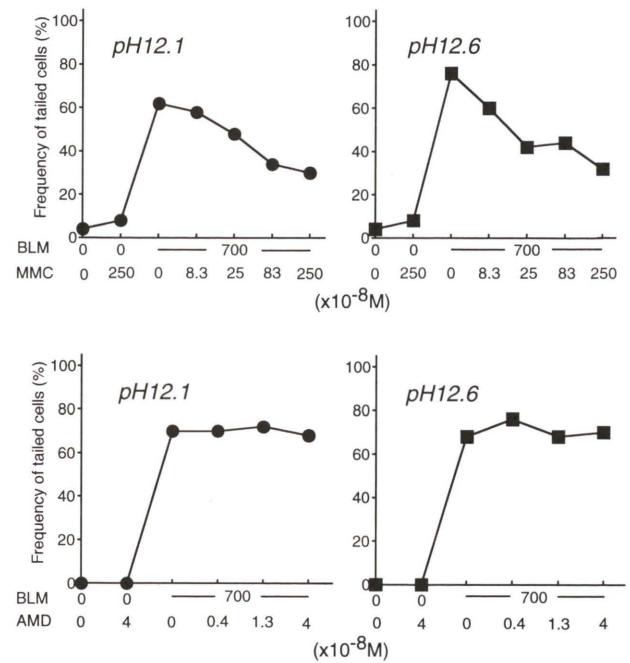


Fig. 6 The effect of MMC and AMD on the positive response of BLM-treated cells

Table 1 Summary results of DNA damage detected at pH 12.1 and 12.6 in cultured cells after chemical treatment

	pH12.1	pH12.6
Alkali labile sites inducers		
MNU	—	+
ENU	—	+
MMS	—	+
EMS	—	+
MNNG	—	+
ENNG	—	+
4-NQO	—	+
Cross linking agents		
MMC	—	—
DDP	—	—
Intercalator		
AMD	—	—
Single strand breaker		
BLM	+	+
Effect of MMC	inhibition	inhibition
Effect of DDP	inhibition	inhibition
Effect of AMD	no effect	no effect

—: negative +: positive

鎖切断がDNAの断片化を促進するのに対し、架橋形成はこれを抑制することに起因すると考えられる。

Fig. 6に示したように、一本鎖切断剤であるBLMを前処理したDNAに架橋形成剤であるMMCを処理すると、MMCの濃度に依存して、陽性反応の抑制が認められる。一方、DNAに作用しないために陰性結果を示す

AMDは、BLMの陽性反応を抑制しない。これらの成績は、一本鎖切断を持つDNAに新たに架橋が形成され、断

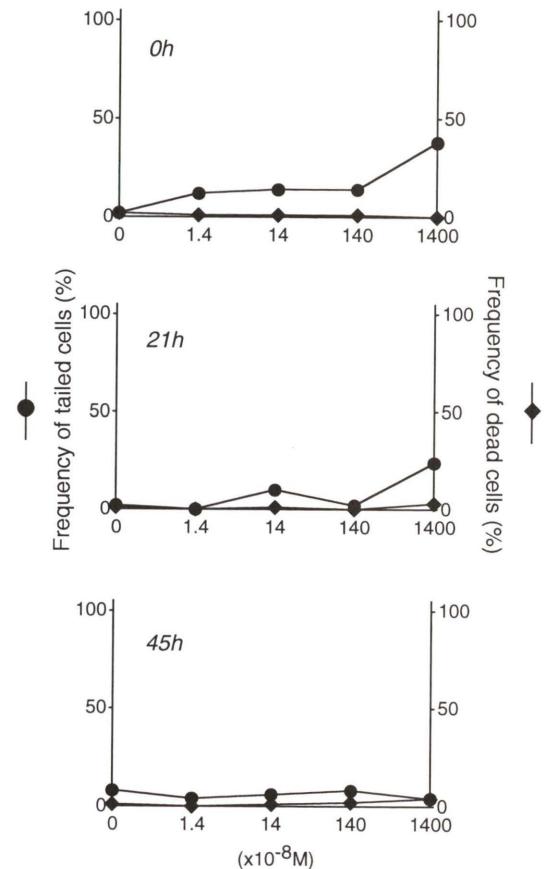


Fig. 7 DNA damage detected at pH \geq 12.6 and cytotoxicity in cultured cells at different sampling times (0, 21 and 45h) after 3h treatment of BLM

片化していたDNAが架橋によりつなぎ合わされて高分子化したことを反映していると考えられる。

以上、各種損傷DNAがコメットアッセイの試験原理を反映した成績を示すことを検証してきた。本章では、各種損傷DNAを調製するための既知変異原物質として、その代表例の成績を中心に解説したが、その他の変異原物質を用いた場合の成績もあわせてTable 1にまとめた。

2. 試験成績に及ぼす生体反応の影響

本章では細胞の反応、特にDNA修復と細胞死に焦点を当て、これらが試験成績に反映されるか否かを検証した。本章で紹介する試験では、生体の反応を把握するため、コメットアッセイの成績に加えて死細胞出現率の成績を経時的に測定した。すなわち、マウスリンホーマL5178Y細胞に既知変異原物質を3時間処理し、処理直後、処理21および45時間後の細胞DNAを用いてpH 12.6以上のアルカリ条件でコメットアッセイを行うと同時に死細胞数も測定した。

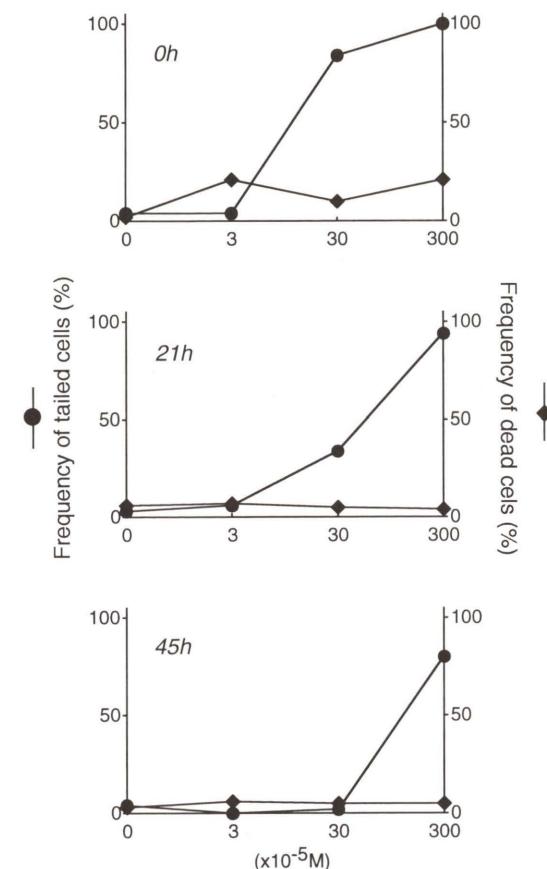


Fig. 8 DNA damage detected at pH \geq 12.6 and cytotoxicity in cultured cells at different sampling times (0, 21 and 45h) after 3h treatment of MNU

1) 一本鎖切断を持つDNA

Fig. 7にBLMで処理した細胞を用いたコメットアッセイの成績を示した。BLMは処理直後に濃度依存的な陽性反応を示したが、この陽性反応は処理後の時間経過とともに低下した。

死細胞のDNAは自己消化により断片化されるため、陽性反応を示すことが考えられる。しかし、死細胞は処理直後から処理45時間後までほとんど認められていないため、本試験成績に死細胞の関与はないと考えられる。したがって、この成績は、BLM処理によって生じた一本鎖切断が経時的に修復された結果を反映したものと考えられる。

2) アルカリ感受性部位を持つDNA

MNUを処理した細胞を用いたコメットアッセイの成績をFig. 8に示した。MNUの処理直後に認められた濃度依存的な陽性反応は時間の経過とともに低下した。また、いずれの細胞採取時間においても死細胞はほとんど認められなかった。

これらの成績は、一本鎖切断と同様、MNU処理によるアルカリ感受性部位が経時的に修復されたことを示唆し

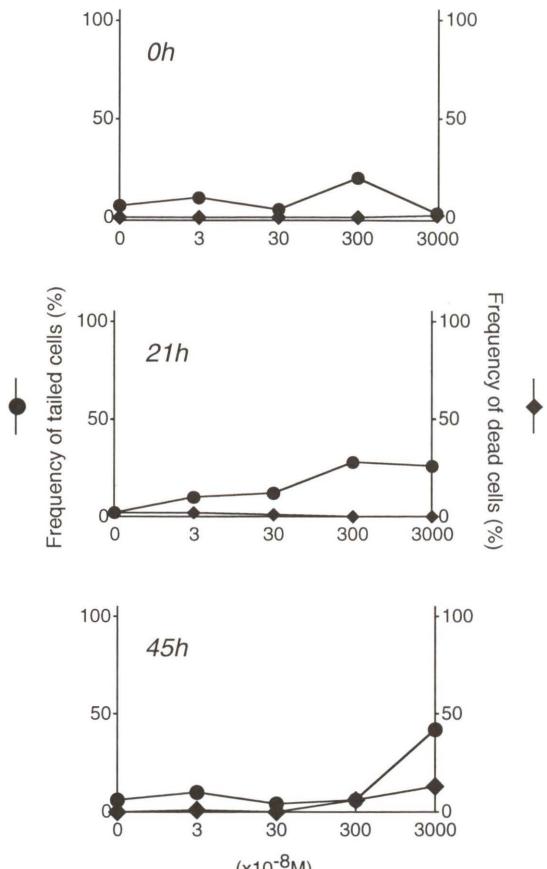


Fig. 9 DNA damage detected at pH \geq 12.6 and cytotoxicity in cultured cells at different sampling times (0, 21 and 45h) after 3h treatment of MMC

ている。

3) 架橋形成が起きたDNA

MMCを処理した細胞を用いたコメットアッセイの成績をFig. 9に示した。MMCは処理直後に陽性反応を示さなかったが、処理21時間後より濃度依存的な陽性反応を示した。一方、いずれの細胞採取時間においても死細胞はほとんど認められなかった。

前章で述べたように、架橋形成が起きたDNAは断片化を阻害されるため、コメットアッセイでは陰性の結果が得られるはずである。この試験においても、処理直後は陰性の成績を示しており、試験原理を反映しているといえる。一方、時間経過とともに陽性反応が現れてきたことは、架橋形成を修復する過程で除去修復が行われた結果を反映しているのかもしれない。

以上、代表的なDNA損傷誘発物質を用いた試験成績からは、コメットアッセイの成績にDNA修復はよく反映されるが、細胞死はあまり影響しないことが検証された。

結語

コメットアッセイにおいて、各種損傷DNAが試験原理や生体反応を反映した試験成績を示すことを、既知のDNA損傷誘発物質の成績を用いて検証した。これらの結果は、コメットアッセイが変異原研究の分野において、少なくとも二通りの手段として活用できることを物語っている。すなわち、DNA損傷誘発物質の検出とDNA損傷機序の解明である。

DNA損傷誘発物質の検出に用いる試験は、当然のことながら、偽陽性や偽陰性といった曖昧な試験成績を含む可能性の低いほうが望ましい。コメットアッセイが試験原理や生体側の反応を反映した成績を導くということは、検出できるDNA損傷の種類が明確であるという点で真の陽性あるいは陰性成績が得られることを示唆している。また、架橋形成剤は陽性反応の抑制や処理後の経時的变化を調べることで検出できることは、すでに紹介した通りである。

DNA損傷機序の解明に関しては、対象となる未知の化合物を今回紹介した試験方法で処理し、得られた成績を試験原理にしたがって解析してやればよい。われわれは、この方法で3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX)が従来からいわれていたアルカリ感受性部位形成作用だけでなく、一本鎖切断作用のあることを確認している(Miyamae, 1997)。

近年では、さまざまな臓器を用いた*in vivo*のコメットアッセイも報告されており(Sasaki et al., 1997; Miyamae et al., 1998 b), 生体反応をより正確に反映した試験系として、コメットアッセイが、今後益々、変異原研究の分野で貢献することが期待される。

謝辞

本稿を執筆するにあたり、山本美佳氏、佐々木有先生のご協力を得ましたことを深く感謝致します。

参考文献

- Fairbairn, D. W., P. L. Olive and K. I. O'Neill (1995) The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.*, 339, 37-59.
- Kohn, K. W. (1991) Principles and practice of DNA filter elution, *Pharmac. Ther.*, 49, 55-77.
- Miyamae, Y., K. Iwasaki, N. Kinae, S. Tsuda, M. Murakami, M. Tanaka and Yu F. Sasaki (1997) Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition, *Mutat. Res.*, 393, 107-113.
- Miyamae, Y., K. Zaizen, K. Ohara, Y. Mine and Yu F. Sasaki (1998a) Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens, *Mutat. Res.*, 415, 229-235.
- Miyamae, Y., M. Yamamoto, Y. F. Sasaki, H. Kobayashi, M. Igarashi-Soga, K. Shimoi and M. Hayashi, (1998b) Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (Comet) assay: a collaborative study by five laboratories, *Mutat. Res.*, 418, 131-140.
- Sasaki, Y. F., S. Tsuda, F. Izumiya and E. Nishidate, (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutat. Res.*, 388, 33-44.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and F. L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.

Environ. Mutagen Res., 21: 231-236 (1999)

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「コメット法、その変異原性試験としての展望」(企画: 佐々木有、生島隆治)で発表された(座長: 佐々木有、生島隆治)。

コメット法における泳動像の分類と評価

小林 浩¹, 林 真²

¹株式会社ライフサイエンス研究センター安全性研究所 ☎ 223-8553 横浜市港北区新羽町1050
²国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 ☎ 158-8501 世田谷区上用賀1丁目18番1号

Classification and evaluation of comets in single cell gel electrophoresis assay

Hiroshi Kobayashi¹ and Makoto Hayashi²

¹Safety Research Laboratories, Life Science Research Center, Shiseido Research Center
1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama 223-8553, Japan

²Division of Genetics and Mutagenesis, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

The comet assay detects DNA damage in individual cells. However, the methods of the comet assay are different according to the authors. We summarized the classification and evaluation methods of comets which had been reported by various authors, and compared the performance of computerized image analysis (CIA) with that of manual microscopic analysis (MMA). We treated human lymphoblastoid cell line TK6 cells with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate. We classified the comets into 5 types according to their appearance. They were undamaged cells without tail (Type 1), cells with a tiny tail (Type 2), cells with a dim tail (Type 3), cells with a clear tail (Type 4) and only tail (Type 5). We analyzed the comets by use of a computerized image analyzer. The various CIA measurements provided the parameters of total length, tail length, percent of DNA in tail and tail moment. Our MMA was superior to the method distinguishing comets only by the presence of a tail, and it expressed dose-response more clearly. With the CIA, the percent of DNA in tail and tail moment were more sensitive indicators than total and tail length. The comet types in our MMA agreed with the values of percent of DNA in tail and tail moment obtained from the CIA. The comets could be classified more in detail by percent of DNA in tail and tail moment, however the CIA was more time-consuming than the MMA. It is concluded that our MMA is sufficiently useful for detecting DNA damaging effects of test chemicals in the comet assay.

(This paper, in a session chaired by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, was presented to the symposium "A view of Comet assay as a mutagenicity test system", organized by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Melparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords: comet assay, DNA damage, image analysis, manual microscopic analysis, tail moment

受付: 1999年3月18日
受理: 1999年4月20日
©日本環境変異原学会

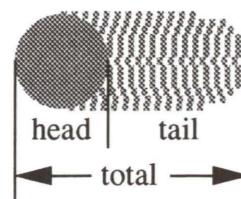


Fig. 1 A shape of comet and names of each part

Table 1 Tail frequencies per 200 cells

Morphine dose(μM)	Damaged cells(%)
0	1.5
0.005	4.5
0.01	7.0
0.05	8.0
0.1	12.0

緒 言

現在、有核細胞のDNA損傷を調べる方法の一つとしてコメット法が関心を集めている。コメット法は、個々の細胞レベルにおけるDNA損傷が検出できる高感度な試験法として開発され、*in vivo*, *in vitro*を問わず、いろいろな分野に応用してきた。

この試験法には、方法にさまざまなバリエーションが報告されており、それが研究者を悩ませる一つの要因となっている。しかし、スライドの作製・染色法、電気泳動等の実験条件については、対象となる細胞や各研究室の状況がそれぞれ異なっており、自ら最適な条件をみつける必要がある。

ここでは、泳動像の分類と評価法について述べるが、どのような方法を取るべきかについては、研究者が自らの研究室の状況や実験の目的を考慮したうえで判断することであり、本報告がその選択の一助となれば幸いである。

コメットの解析法

コメット法の名称は、損傷により切断を起こした核のDNA断片が電気泳動により陽極側に引っ張られ、その核があたかも彗星のような形態に変化することに由来する。このとき、損傷が激しい、つまりDNA断片が小さく、多いほど彗星の尾が長くなる。通常、核の部分はheadと呼ばれ、尾の部分はtailと呼ばれる(Fig. 1)。

コメット法におけるコメットの解析法として、最も簡単な方法は、コメット、つまり尾のある核の出現率を求める方法である。データ例をTable 1 (Shafer et al., 1994)に示した。この例では処理群において用量依存的にコメットの出現頻度が増加しており、このように対照の値が小さく、処理群においても出現頻度が大きくなる場合、この方法は特に有効である。この方法の長所として

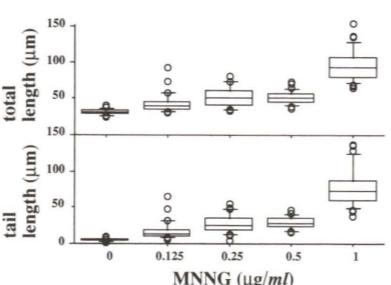


Fig. 2 The box plots of total and tail length obtained by image analysis of TK6 cells treated with MNNG

は、方法が簡単であること、観察細胞数を容易に増やせること、短所としては、各核の損傷の程度が考慮されていないことがあげられる。

次に、よく用いられている解析法として、コメットの長さの測定がある。コメットの長さは、蛍光顕微鏡下で接眼マイクロメーターを用いる方法、コメットの写真を撮影し、その写真やネガ上の像を物差して測る方法、画像解析による測定方法などにより測定される。通常、コメット全体の長さが測定されることが多いが、画像解析による場合、核を除いた尾の部分のみの長さや、尾と全体の長さの比率なども測定することができる。ヒトBリンパ球細胞系のTK6細胞をN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 70-25-7)で処理し、画像解析によってコメットの全長と尾の部分のみの長さを求めた時のデータ例を函ヒケ図でFig. 2に示した(Kobayashi et al., 1995)。この例では用量依存的な長さの値の増加が認められたが、対照と比較した場合の変化量はあまり大きくなかった。これらの方法の長所としては、長さというコメットの特徴を表す数値が得られること、実施例が多いことがあげられ、短所としては、手作業による場合、時間や手間がかかることがあげられる。また、これらの方法を用いた場合、よく研究者が悩まされるのは「どこまでを尾と見なすか?」ということである。コメット中のDNA断片は小さいものほど遠くまで泳動されるため、尾の先端部分に近くなるほど、その蛍光が小さく弱くなり、「どこまでを尾と見なすか?」という判断が難しくなる。画像解析を用いる場合、予め、その蛍光の強さや大きさを閾値として定めておけるため、「どこまでを尾と見なすか?」という問題について、観察・測定者の主観が入る余地をある程度除くことができるが、手作業による場合、この問題はまさに観察・測定者の主観に依存する。よってコメットの長さの測定を手作業で行う場合、予め、「ここまでを尾と見なす」という基準を明確に定めておき、その基準に基づいて測定が行われる必要がある。

最近では、技術の進歩により、蛍光顕微鏡に取り付けられるCCDカメラも以前と比較してより安価で高性能になってきており、画像解析による測定が多く行われる

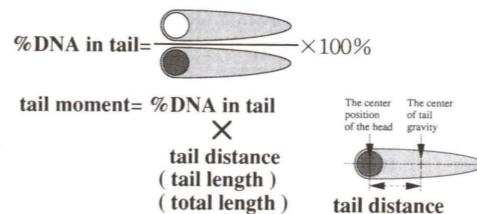


Fig. 3 The calculation methods of % DNA in tail and tail moment

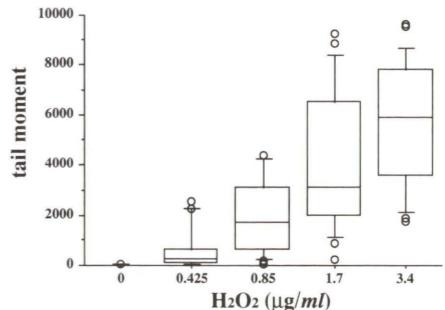


Fig. 4 The box plots of tail moment and % DNA in tail obtained by image analysis of TK6 cells treated with H2O2

ようになってきた。画像解析を用いた場合、前述の他、尾に含まれるDNA量やtail momentと呼ばれるパラメーターも求めることができる(Fig. 3)。コメットの尾は、損傷を受けたDNA、つまりDNAの断片で形成されているので、尾に含まれるDNA量が多いほど、損傷が大きいことになり、画像解析によって、この尾に含まれるDNA量が求められる。通常、この値はコメットの全DNA量を100とした割合、つまり、%で表される。また、小さなDNA断片ほど元の核から遠くへ泳動、つまり、DNA損傷の激しいものほど尾が長くなる。tail momentは、この%の値と長さの積を求めたものである。ただし、このtail momentの求め方は、解析ソフトにより若干異なり、コメットの全長、尾の部分のみの長さ、重心間距離を用いるものなどがある。これらはいずれを用いても問題ないが、tail momentを求めるのに何を用いたかは明らかにする必要がある。データ例として、TK6細胞をhydrogen peroxide (H2O2, 7722-84-1)で処理し、画像解析によってtail momentと尾に含まれるDNA量を求めたものをFig. 4に示した(Kobayashi et al., 1995)。なお、この図のtail momentでは重心間距離を用いている。われわれがtail momentの算出に重心間距離を用いるのは、画像解析による場合であっても、コメットの全長や尾の長さの測定には前述の不確定さの問題がつきまとつたためである。この例では用量依存的に値が増加しているが、処理群において値のバラツキが大きく、これはコメット法の特徴である個々の細胞レベルにおけるDNA損傷の大きさの違いを反映したものと考えられた。またこれらのパラメーターでは、用量依存性や対照に対する変化量では前述の長さの値よりすぐれており、これらの方がコメットの特徴をよりよく表していた。この方法の長所としては、コメットの特徴をよく表す数値が得られること、損傷が激しい場合でも比較的良い用量相関性が得られることがあげられ、短所としては、以前より安価になったとはい、画像解析装置、解析ソフトが必要なことがあげられる。

われわれは、画像解析装置がないところでも、コメット法を実施できるようにと考え、コメットをその損傷の程度により分類して計数する方法について、画像解析の結果と比較検討した。

材料と方法

マサチューセッツ工科大学のWilliam G. Thilly博士より分与されたヒトBリンパ球細胞系のTK6細胞を用いた。TK6細胞は、不活化した馬血清を10%加えたRPMI-1640培地を用い、5%炭酸ガス存在下、37°Cで培養した。対数増殖期の細胞を 5×10^5 cells/mLになるように培地に加え、MNNG, H2O2の場合は1時間、methyl methanesulfonate (MMS, 66-27-3)の場合は4時間処理した。処理後の細胞は遠心して集め、 $1-2 \times 10^6$ cells/mLになるように培地で調整した。

Table 2 The various methods of manual microscopic analysis of comet

Method	cell number	number of categories	categories			
			intact	moderately	severely	
a	100	3	(Total Length)	<40mm	40–80mm	>80mm
b	100	4	Stage 0	Stage 1	Stage 2	Stage 3
c	100	5	class 0	class 1	class 2	class 3
			undamaged			maximally
d	100	5	None	Low	Medium	High
		(%DNA in tail)	<5%	5–20%	20–40%	40–95%
						>95%

^a : Pool-Zobel et al., 1994, ^b : Gedick et al., 1992, ^c : Collins et al., 1995, ^d : Anderson et al., 1994

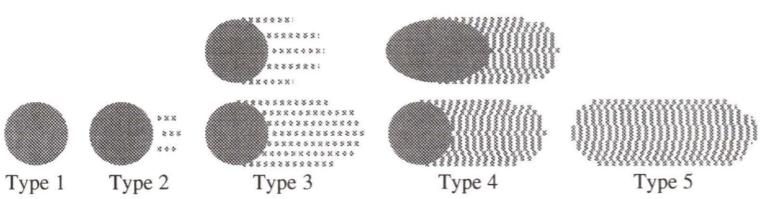


Fig. 5 The classification of comets by visual scoring method

Table 3 The frequencies of each type comet observed microscopically in TK6 cells treated with MNNG, H₂O₂ and MMS

Mutagen	Concentration (μg/mL)	Number of cells				
		Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5
MNNG	0	497	3	0	0	0
	0.125	78	389	32	1	0
	0.25	0	113	374	13	0
	0.5	0	0	83	414	3
	1.0	0	0	1	379	120
H ₂ O ₂	0	407	66	25	2	0
	0.425	71	209	192	26	2
	0.85	40	155	219	78	8
	1.7	0	11	131	292	66
	3.4	0	0	6	232	262
MMS	0	92	200	201	5	2
	5	0	130	333	35	2
	10	0	2	177	318	3
	20	0	0	1	474	25

スライドの調製法は、Singh らの方法によった(Singh et al., 1988)。全面フロストのスライドグラスを用い、等張化リン酸緩衝液(PBS)に 0.65 % の濃度で溶かした normal melting point agarose(ニッポンジーン社)の溶液で第 1 層を作製し、第 2 層として細胞懸濁液 10 μL を加えた 0.5 % low melting point agarose(ニッポンジーン社)の PBS 溶液を重層し、第 3 層として 0.5 % low melting point agarose の PBS 溶液を重層した。スライドは、2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris (hydroxymethyl) amino-methane (Tris), 1 % sodium N-lauroyl sarcosinate, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO を含む pH 10 の細胞溶解液に、遮光下、4 °C で 1 時間浸けた。

細胞溶解後のスライドはサブマリン型の電気泳動槽に入れ、0–10 °C に冷やした 300 mM NaOH, 1 mM EDTA を含む泳動液を加え、15 分間放置後、25 V, 300 mA で 20 分間泳動した。泳動後のスライドは、pH 7.5 の 0.4 M Tris 緩衝液で中和後、20 μg/mL ethidium bromide で染色した。

観察は、スライドをコード化し、処理条件がわからぬようにして行った。スライド 1 枚につき 500 個の核を Fig. 5 のようにその形態に着目して分類し、計数した。Type 1 は尾のない無損傷の核、Type 2 は小さな DNA 断片を伴う核、Type 3 は薄い尾を持つ核、Type 4 は明

Table 4 The fold increase against negative control of each parameter obtained by image analysis of TK6 cells treated with MNNG, H₂O₂ and MMS

Mutagen	Concentration (μg/mL)	Magnifications of median against the control			
		total length	tail length	tail moment	%DNA in tail
MNNG	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.125	1.28	2.63	12.0	3.62
	0.25	1.68	4.94	65.9	9.33
	0.5	1.69	5.57	161	14.5
	1.0	3.08	14.3	712	27.2
H ₂ O ₂	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.425	2.58	10.8	209	11.2
	0.85	3.65	16.8	1493	26.9
	1.7	4.80	24.0	2717	40.7
	3.4	5.02	29.1	5191	58.1
MMS	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	5	2.20	4.42	61.2	5.61
	10	2.31	4.65	93.0	7.15
	20	2.49	6.39	186	11.0

らかな濃い尾を持つ核および核の移動が認められるコメット、Type 5 は無核のコメットである。

コメットの画像は、CCD カメラ(HCC-3600, フローベル社、東京)で撮影し、光磁気(MO)ディスクレコーダー(MV-200, TEAC 社、東京)で MO ディスクに一旦保存した後、画像解析システム(New Vision System, ケイオ一電子工業社、大阪, PC-9801 RA, NEC 社、東京)で解析し、コメットの全長(total length), 尾の部分のみの長さ(tail length), 尾に含まれる DNA の割合(%)(% DNA in tail), tail moment を求めた。なお、この tail moment は、核と尾の重心間距離と% DNA in tail の積である。

結果および考察

Table 3 に、TK 6 細胞を MNNG, H₂O₂, MMS で処理後、各用量につき 500 個の核を観察して各 Type に分類して計数した結果を示した。試験した 3 種の変異原すべてで用量依存的により損傷の激しいコメットの出現数が増加していた。仮に、ここで最初に紹介した核を尾の有無のみで分類し、コメットの出現頻度のみを求める方法、つまり、Type 2 から 5 をすべて同一のものと見なす方法を取ったとすると、MNNG 0.25–1.0, H₂O₂ 1.7–3.4, MMS 5–20 μg/mL はすべて 100 % となり、この方法では、この用量間の用量依存性を示すことはできない。また、実際には Table 3 に示したような損傷の程度の違いがあるにもかかわらず、その違いを表すこともできない。よって、これらの点において、コメットをその損傷の程度により分類して計数する方法は、コメットの出現頻度のみを求める方法よりもすぐれた方法であると考えられた。

Table 4 に、Table 3 の各用量から無作為に選んだ 25 個について、画像解析により total length, tail length,

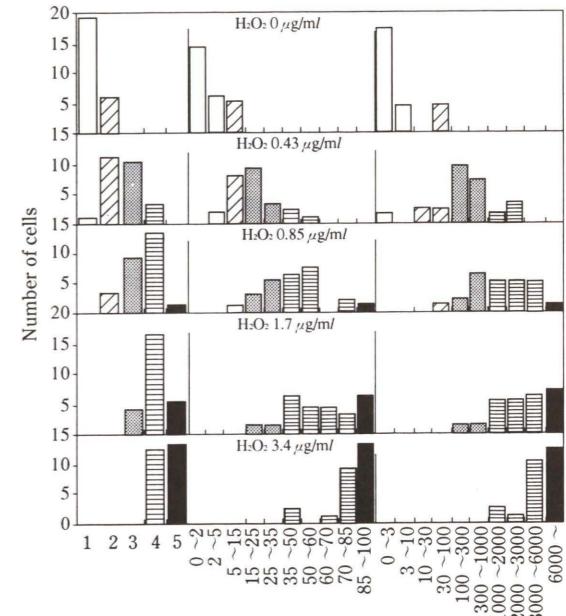


Fig. 6 The correlation between visual score and the parameters obtained by image analysis for TK6 cells treated with H₂O₂

□ : Type 1, □ : Type 2, ■ : Type 3, ▨ : Type 4, ■ : Type 5

tail moment, % DNA in tail を求め、その平均値が対照と比較して何倍に增加了かを示した。各変異原において、4 つのパラメーターのうち tail moment の用量依存的な変化が最も大きく、ついで% DNA in tail, tail length, total length の 1 次元的なパラメーターでは、MMS において用量依存性が悪かったが、tail moment や% DNA in tail などの 2 次元的なパラメーターでは、MMS においても用量依存的な増加が認められており、

画像解析においてはこれらのパラメーターがコメットの損傷の程度を表すのに有用であると考えられた。

Fig. 6 に、Table 2 の H_2O_2 の画像解析結果のうち% DNA in tail, tail moment と、画像解析を行ったコメットを Type 分けした結果をヒストグラムで示した。我々が行ったコメットの分類法は画像解析結果の% DNA in tail, tail moment とよく一致した。ただし、我々の分類法ではコメットを 5 種類に分類するが、画像解析を行った場合、どちらのパラメーターを用いてもコメットは 10 段階に分類できた。% DNA in tail を用いた場合、Type 1: 2 段階、Type 2: 1 段階、Type 3: 2 段階、Type 4: 4 段階、Type 5: 1 段階に分類でき、tail moment を用いた場合、Type 1: 2 段階、Type 2: 2 段階、Type 3: 2 段階、Type 4: 3 段階、Type 5: 1 段階に分類できた。よって、画像解析は、特に損傷の激しい Type 4 のコメットの解析に有用であると考えられた。

結語

コメット法の報文や発表の数の増加には目を見張るものがあり、また、その可能性に対する期待も大きく、コメット法について一度検討してみたいと考えている研究者は多い。しかし、さまざまな理由、特に方法の多様さから、実際にはどのようにしたらいいかがわかりにくく、手を出しそびれていた人も多いのではないか。

ここでは、その中から特にコメットの解析法を取り上げた。我々の方法は、画像解析の装置やソフトも必要としない¹⁾、画像解析結果と相関性を持つ²⁾、単にコメットの出現率を求める方法よりもすぐれている³⁾、画像解析装置やソフトを持たない研究者がコメット法を検討する際に用いる解析法として適している⁴⁾、といえる。

われわれの方法では 500 個の核を分類して計数したが、このコメットを分類して計数するという方法の場合、観察核数は 100 個でも充分という考え方もあり、試験の目的により、あるいは、観察しなければならないスライド数が多い等の場合には、この程度までであれば、観察核数を減らすことも可能である。500 個を分類して計数するのに要する時間は約 15 分間であるので、100 個であれば約 3 分間で計数できる。

また、この方法を取った場合の統計解析法については、

Type 1=1, Type 2=2, ……Type 5=5 のようなスコアを与えて、各スライドごとに DNA 損傷の程度を数値化してから行う方法が取られる。しかし、もし画像解析を行える環境であるならば、一度観察結果と画像解析結果の対応を検討し、例えば、% DNA in tail で、Type 1=平均 2.5 %, Type 2=平均 10 %, ……Type 5=平均 90 % のような関係をそのままスコアにあてはめる方法も考えられる。

画像解析には、細かい分類ができる等のメリットもあるが、細かい解析値の必要のない、被験物質の DNA 損傷性の有無を検討するような目的の試験の場合には、我々の提案した方法のメリットは大きいといえる。

参考文献

- Anderson, D., T.-W. Yu, B.J. Phillips and P. Schmezer (1994) The effect of various antioxidant and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay, *Mutat. Res.*, 307, 261-271.
- Collins, A.R., Ma Ai-guo and S.J. Duthie (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells, *Mutat. Res.*, 336, 69-77.
- Gedick, C.M., S.W.B. Ewen and A.R. Collins (1992) Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 313-320.
- Kobayashi, H., C. Sugiyama, Y. Morikawa, M. Hayashi and T. Sofuni (1995) A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay, *MMS Commun.*, 3, 103-115.
- Pool-Zobel, B.L., N. Lotzmann N., M. Knoll, F. Kuchenmeister, R. Lambertz, U. Leucht, H.G. Schroder and P. Schmezer (1994) Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal-mucosa cells isolated from biopsy samples, *Env. Mol. Mutagen.*, 24, 23-45.
- Shafer, D.A., Y. Xie and A. Falek (1994) Detection of opiate-enhanced increases in DNA damage, HPRT mutants, and the mutation frequency in human HUT-78 cells, *Env. Mol. Mutagen.*, 23, 37-44.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice and E.L. Schneider (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.

Environ. Mutagen Res., 21: 237-241 (1999)

本稿は 1998 年 11 月 24-26 日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第 27 回大会のシンポジウム「コメット法、その変異原性試験としての展望」(企画: 佐々木有、生島隆治)で発表された(座長: 佐々木有、生島隆治)。

アポトーシスに伴う DNA 断片化のコメット法による検出 —その特徴

大山 ハルミ¹, 山田 武²

¹放射線医学総合研究所障害基盤研究部 〒263-8555 千葉市稻毛区穴川 4-9-1

²東邦大学医学部生物学研究室 〒143-8540 東京都大田区大森西 5-16-21

(現: 電力中央研究所生物科学部柏江分室 〒201-8511 狛江市岩戸北 2-11-1)

Teardrop assay: A detection method for individual apoptotic cells with DNA fragmentation

¹Division of Radiobiology & Biodosimetry, National Institute of Radiological Sciences
Anagawa 4-9-1 Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan

²Department of Biology, Toho University School of Medicine
Omori-nishi 5-16-21 Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan

Summary

Apoptosis is a programmed cellular suicide, which plays an important role in many biological events, including removal of cells damaged by a variety of mutagen. DNA fragmentation into oligonucleosomal units is a hallmark of apoptosis. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay) invented for measuring DNA strand breaks in individual cells has been utilized also for visualization of apoptotic DNA fragmentation. Examination of X-irradiated thymocytes by comet assay revealed that apoptotic cells showed almost the same migration pattern with teardrop-shaped fragmented DNA tail and a small non-migrated DNA core particle, whereas viable cells exhibited no DNA migration. The migration patterns were almost the same, independent of radiation dose and time after irradiation. These findings indicate that DNA cleavage in an apoptotic thymocyte is an "all-or-none" type event. The migration patterns differ from those of radiation-induced DNA strand breaks detected by a conventional comet assay. The term "teardrop assay" is then proposed in place of "comet assay" reflecting the shape of migration pattern of apoptotic DNA fragments on electrophoresis.

(This paper, in a session chaired by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, was presented to the symposium "A view of Comet assay as a mutagenicity test system", organized by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords: apoptosis, comet assay, DNA fragmentation

はじめに

アポトーシスは、遺伝子にプログラムされた能動的な細胞死である。1972 年、Kerr らは、ネクローシスと異なる特徴的形態変化に気づき、細胞の増殖分化と表裏一体

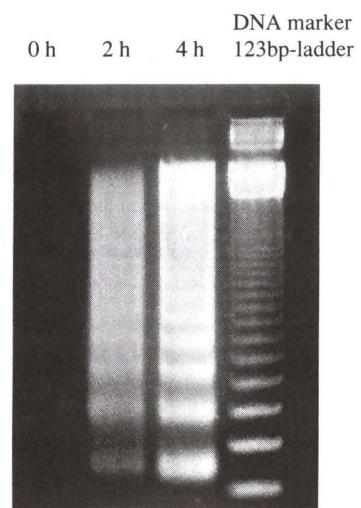


Fig. 1 Apoptotic DNA fragmentation in the irradiated rat thymocytes

DNA fragments were extracted from the cells 2 to 4 h after 10 Gy X-irradiation. Agarose gel electrophoresis of the DNA showed a typical "ladder pattern" of oligonucleosomal fragments

となって多細胞生物の生命維持に必須の役割を果たしているアポトーシス(apoptosis)を発見し、その概念提起を行った(Kerr et al. 1972)。90年代に入り、多くののがん遺伝子やがん抑制遺伝子産物の関与が明らかにされるとともに研究が進んだ。ここ数年、線虫細胞死遺伝子の相同遺伝子の検索から、カスパーゼファミリーなどの細胞死実行に関わるタンパク質が相次いで見出されるなど、研究が一段と加速している(Yamada et al. 1998)。

アポトーシスは、発生過程での形態形成や、細胞交代などの生理的な制御機構や、放射線を含む多くの変異原により損傷を受けた細胞の除去機構として働いている(大山, 山田 1998 a,b, Ohyama & Yamada 1998)。したがって、その異常は、がん, AIDS, 自己免疫疾患, アルツハイマー病など、多くの疾病と関連する。アポトーシスは形態学的にはほぼ同様な過程を経て発現するが、分子機構の面では、誘発要因や細胞の種類、細胞周期他により異なる、多様で複雑で精緻な制御を受けることもわかつて(Yamada et al. 1998, 山田, 大山 1994, 山田 1998, 大山, 山田 1998 a,b)。なお、文献は最近の主として総説を挙げた。

1. アポトーシスの生化学的な指標としてのDNA断片化

この細胞死の特徴的な生化学的な指標(biochemical hallmark)とされているのが、クロマチンDNAのオリゴヌクレオソーム単位の切断である。それをDNA断片化(DNA fragmentation)と呼び、通常、DNA試料をアガロースゲル電気泳動で分離し、180 bp(塩基対)の整数倍に切断されたDNA断片の“ラダー”を検出する(Fig.

1)。ただし、DNA断片化を伴わないアポトーシスも報告されている。また、アポトーシスでのDNA分解には、さらに高分子の50–300 kbpの切断もあり、パルスフィールド電気泳動などで検出されている。

2. DNA断片化検出法としてのコメット法

アポトーシスの大きな特徴は、細胞集団の中で散発的に発現し、一旦始まると急速に進行する点にある。ところが、通常のアガロースゲル電気泳動法では、アポトーシスを起こした細胞集団平均のDNA断片化を検出しているに過ぎず、個々の細胞のDNA分解像は検出できない。DNA断片化を起こした個々の細胞の検出法として、TUNEL法や、フローサイトメトリーで検出する方法なども開発されている。しかし、こうした方法では、個々の細胞でのDNA分解像は観察不能である。この点、単一細胞ゲル電気泳動:通称、コメット法によって、はじめて、個々のアポトーシス細胞でのDNA断片化像が明らかにされた。しかし、通常のDNA損傷検出の場合の、彗星のような“コメット”像と異なり、アポトーシスでのDNA断片化の場合は、少量のDNAが原点に残るだけでほとんどは涙滴状に泳動されることが明らかになった(Olive et al. 1993, Fairbairn et al. 1995, Ohyama et al. 1998)。

3. 胸腺細胞の放射線誘発アポトーシス

胸腺細胞は多くの要因によりアポトーシスを起こし、アポトーシスについての基礎的な多くの知見がこの細胞の研究から得られている。胸腺細胞はもっとも放射線感受性の高い細胞の一つで、照射後、短時間に間期死を起こす。私たちは、X線照射したラット胸腺細胞の死細胞をPercolで分離する方法を確立した。分離細胞の観察から、生きている状態から、細胞サイズ縮小、細胞表面微絨毛の消失やDNA断片化など、アポトーシスの特徴的な変化を示す死の状態に急速に移行することを明らかにした(Ohyama & Yamada 1998, 大山, 山田 1998 b)。

4. アポトーシス細胞の単一細胞ゲル電気泳動

胸腺細胞のX線誘発アポトーシスでのDNA断片化を、コメット法を改良し調べた(Ohyama et al. 1998)。すなわち、180 bpの整数倍のDNA断片のロスを減らすため、細胞を4%の低融点アガロースに浮遊させる。薄い単層のゲルをスライド上に形成、中性条件で細胞融解と泳動を各4分間という短時間に終了、DAPIで蛍光染色しDNAの泳動像を観察した。

その結果、照射胸腺細胞には、DNAが原点にほとんど留まる細胞と、少量が原点に残るだけで大部分のDNAが涙滴状にはほぼ均一な泳動像を示す細胞の2群が検出された(Fig. 2a)。この涙滴状の泳動を示す細胞の割合は、

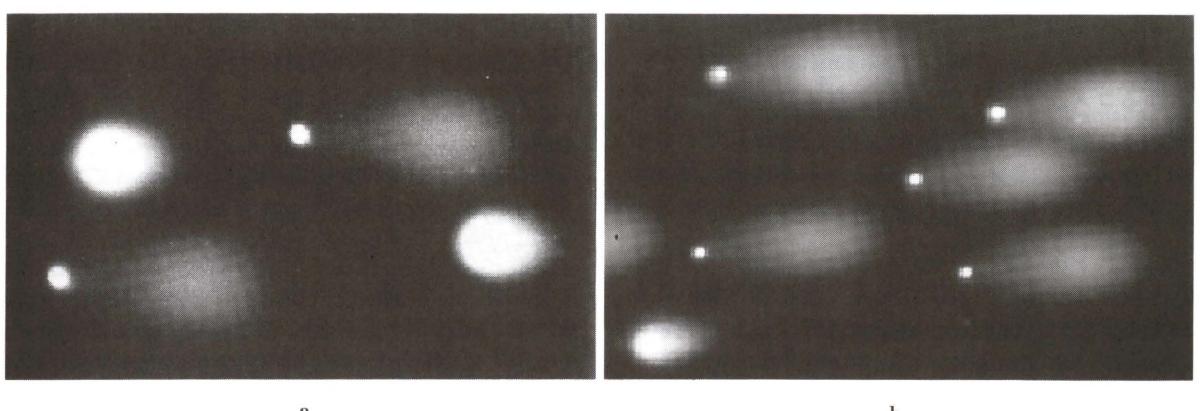


Fig. 2 Photomicrograph of single cell gel electrophoresis of 10 Gy X-irradiated rat thymocytes. The cells 4 h after irradiation consisted of two populations, one showing no DNA migration, and the other having the teardrop-shaped migration pattern (Fig. 2a). Apoptotic cell fraction separated from the irradiated cell population by Percoll density gradient centrifugation exhibited almost homogeneous "teardrop-shaped DNA migration" on the gel electrophoresis (Fig. 2b)

Table 1 Comparison of characteristic features in apoptotic DNA fragmentation with those in DNA damage

	DNA damage	apoptotic DNA fragmentation
Induction	passive	enzymatic (endonucleases)
Site of cleavage	random	linker region of chromatin
DNA fragment size	random	oligonucleosomal fragments
Repair	+	–
Shape of DNA migration in comet assay	"comet"	"teardrop"
Occurrence	depending on dose	independ of dose
	all cells	exclusively in apoptotic cells

エリスロシンB分染法で検出したアポトーシス細胞の割合と一致し、線量と照射後の時間依存性に増加した。両者の中間段階の細胞はほとんど検出されなかった。さらに、Percolで分離した細胞について調べ、アポトーシス細胞はほぼ均一な泳動距離や大きさを示す涙滴状の泳動像を示し(Fig. 2b)，一方、生細胞のDNAは分解せずに原点に留まることを確認できた。なお、この条件では、X線照射自体によるDNA切断の、いわゆるコメット像は検出されなかった。

Percolで分離したアポトーシス細胞の中には、分離の直前に死んだ細胞から、数時間前に死んだ細胞も混在している。したがって、こうした知見は、アポトーシスでのDNA分解が一旦開始するとすみやかに進行し、かつ急速に停止することを示している。なお、泳動像が均一になっているのは、胸腺細胞はほとんどG₀期の細胞でありDNA含量がほぼ同じであること、Percol分離は照射後3時間目に行っていることにもよる。より長時間経ってからでは、分解が進み、涙滴部が小さくなったり泳動像も検出される。

なお、胸腺細胞から、DNA断片化に関与すると考えられるエンドヌクレアーゼ-DNase-γを、東京理科大学の田沼先生のグループが精製し、クローニングを行っている(田沼 1998)。しかし、急速なDNA分解と停止の機構

など作用機構の詳細はいまだ明らかになっていない。

胸腺細胞以外のリンパ腫細胞などでも、同じような涙滴状の泳動像が観察され、これまでの報告からも、アポトーシスにおけるDNA断片化時の特徴的な泳動像と考えられる。ただし、涙滴部の大きさや距離は細胞のDNA含量が異なるため、泳動像は胸腺細胞の場合のように均一ではない。

5. DNA損傷による切断とアポトーシスでのDNA断片化の違い

Table 1に、放射線によるDNA切断とアポトーシスによるDNA断片化の違いをまとめた。コメット法は、元来、放射線による二本鎖あるいは一本鎖のランダムな切断を検出するために考案された方法であり、名称通りの“コメット”様の泳動像を示す。照射されたすべての細胞に線量依存性に切断が生じ、コメット像は、線量依存性に変化する。また、切断は多様な修復機構により修復されるため、照射後時間が経つと尾の部分が消えていく。

それと比較して、アポトーシスにおけるDNA断片化は、エンドヌクレアーゼにより、酵素的にヌクレオソームのリンカー部位が特異的に切断された産物であり、放射線自体によるDNA損傷と成因がまったく異なる。また、アポトーシス細胞にのみ起こり、線量増加はアポト

ーシス細胞の割合を増加させるが、DNA分解像には影響せず、ミクロゲル電気泳動での泳動像は涙滴状となる。いわゆるコメット法はDNA損傷自体の検出に使われている例と、変異原誘発アポトーシスの検出に使われている例とがある。“コメット”という名称を両者に使うのは、紛らわしくもあり、上述のように現象としても泳動像からも好ましくない。そこで、私たちはアポトーシスのDNA断片化の検出の方法としてミクロゲル電気泳動を用いたときは、(Teardrop assay)と呼ぶほうが良いのではないかと考えている(Ohyama et al. 1998)。

6. DNA断片化検出法としてのミクロゲル電気泳動法の限界と留意点

なお、アポトーシスでは、多くの場合、細胞も断片化してアポトーシス小体となり、貪食除去される。胸腺細胞のアポトーシスも、細胞浮遊液の *in vitro* 照射では細胞縮小が起こるだけだが、全身照射した胸腺内ではアポトーシス小体となる。変異原を作用させた組織内でのアポトーシスでも、アポトーシス小体となっていることが多いと考えられる。それらの検出には、ミクロゲル電気泳動は適さない。さらに、アポトーシス小体は、すみやかに貪食除去され消失してしまうため、その点からも検出されにくい。

放射線誘発アポトーシスの例では、照射後に数時間で照射された細胞自体が死ぬ“間期死型”と呼ばれるものと、照射後、一回以上の分裂を繰り返し、場合によっては100時間にも及ぶ長時間にわたって生じる“増殖死型”がある(大山、山田 1998 b, Ohyama & Yamada 1998)。胸腺細胞のような間期死型のアポトーシスを示す細胞は比較的少ない。また、増殖死型アポトーシスについて多くの細胞では研究されていない。

多くの変異原によるアポトーシスにも、放射線誘発アポトーシスのように、間期死型と増殖死型があると考えられる。増殖死型の場合には、長時間にわたってアポトーシス細胞が出現するため、DNA断片化像も胸腺細胞のように単純ではない。こうした点を留意して泳動像の解析結果をみていく必要がある。

変異原を多量に作用させた場合、変異原自体による涙滴状パターンの出現と、アポトーシスによる場合もあるので注意を要する。

7. アポトーシスの機構と意義

アポトーシスの実行過程では、線虫の細胞死遺伝子のホモロジー検索から発見されたシスティンプロテアーゼであるカスパーゼ群が必須の役割を果たしている。現在までに多数のカスパーゼにより分解される多数の基質が明らかにされているが、その中に、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ、DNA依存性プロテインキナーゼの触媒部位、Rad 51などのDNA修復に関連する酵素が含まれ

ている。これらのタンパク質分解は、おそらく、断片化したDNAが修復され、再結合することを阻止し、損傷遺伝子が再利用されるのを抑制する機構となっているのであろう。

生体には多様なDNA修復機構が備わっているが、こうした分子レベルでの修復はミスを伴う。アポトーシスの重要な意義の一端は、DNA損傷を起こした細胞を完全に除去し、修復ミスを避け、発がんや奇形などのリスクへの防御機構として働くことにある。反面、アポトーシスは、場合によっては、変異原による障害をもたらす。形態形成期の照射では、奇形発生が多いことが知られている。p53ノックアウトマウスを用いた実験で、形態形成初期の照射では、正常に比較して流産が減り、奇形が増加することが観察されている(Norimura et al. 1996)。すなわち、p53誘発アポトーシスが異常胚を流産させ、奇形を防ぐ役割を果たしている。ところが、私たちのグループでは、肢指形成期照射により、肢指原基細胞にアポトーシスが多発し、それが奇形の原因となることを明らかにした(Wang et al. 1999)。

DNA損傷要因などのストレスによりp53レベルが上昇し、G₁停止やアポトーシスなどが起こる。DNA損傷要因によるアポトーシスはp53依存性に起こることが多いが、細胞によっては、膜のセラミド生成を介することも報告されている(Ohyama & Yamada 1998)。

結語

アポトーシスに伴うDNA断片化検出法として、単一細胞電気泳動法は、他の方法では得られない情報をもたらす。しかしながら、その利用には限界も存在する。変異原によるアポトーシスの検出と機構の研究は、変異原の生体影響を解明するうえで益々重要性を持つと考えられる。こうしたアポトーシス研究法として、ミクロゲル電気泳動法は、限界をわきまえながら利用すれば有用な方法として役立つであろう。逆に、DNA損傷の検出法としてコメット法を使用する場合も、要因作用後時間が経っている場合は、アポトーシスのことも念頭に入れる必要があるであろう。

参考文献

- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. and O'Neill, K. L. (1995) The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics, *Brit. J. Cancer*, 26, 239-256.
- Norimura, T., Nomoto, S., Katsuki, M., Gondo, Y and Kondo, S. (1996) p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis, *Nature Medicine* 2, 577-580.
- 大山ハルミ, 山田 武 (1998 a)アポトーシス概論, 産婦人科の実際, 47, 1111-1119.
- 大山ハルミ, 山田 武 (1998 b)DNA損傷とアポトーシス, 医学のあゆみ, 187, 363-367.
- Ohyama, H. and Yamada, T. (1998) Radiation-induced apoptosis: A review. In *Apoptosis: its roles and mechanism*, T. Yamada and Y. Hashimoto, (Eds) Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo pp. 140-184.
- Ohyama, H., Tamamoto, H. and Yamada, T. (1998) "Tear-drop assay," a rapid and sensitive method for characterization of radiation-induced apoptotic DNA fragmentation in individual thymocytes. In *Apoptosis: its roles and mechanism*, T. Yamada and Y. Hashimoto, (Eds), Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo, pp. 185-198.
- Olive, P. L., Frazer, G. and Banáth, J. P. (1993) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, *Radiat. Res.* 136, 130-136.
- 田沼靖一 (1998)アポトーシスとDNAエンドヌクレアーゼ, 医学のあゆみ, 187, 324-328.
- Wang, B., Fujita, K., Ohhira, D., Watanabe, K., Odaka, T., Mitani, H., Hayata, I., Ohyama, H., Yamada, T. and Shima, A. (1999), Radiation-induced apoptosis and limb teratogenesis in embryonic mice, *Radiat. Res.* 151, 63-68.
- 山田 武, 大山ハルミ (1994)アポトーシスの科学, 講談社ブルーバックス.
- 山田 武 (1998)アポトーシスとは—Overview—, 医学のあゆみ, 187: 283-288.
- Yamada, T. and Hashimoto, Y. Eds. (1998) "Apoptosis: its roles and mechanism", Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo.

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：	<input type="checkbox"/>	
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：	<input type="checkbox"/> 所属機関	<input type="checkbox"/> 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)口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

環境変異原研究 投稿規定

1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」、「一般論文」、「短報」、および「特別企画(受賞講演)」、「論説」、「資料・情報」などを掲載する。なお、投稿論文の採否は編集委員会の審査により決定する。

「総説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などである。原則として編集委員会より寄稿を依頼する。

「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の原著論文で、それ自身独立して価値ある結論あるいは事実を含むものとする。陰性データも受付ける。

「短報」は、新しい技術の紹介や価値あるデータを含む短い報告とする。陰性データも受付ける。

「論説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などで、会員からの投稿によるものとする。

「資料・情報」は、環境変異原に関する調査の結果などをまとめたもの、および公開シンポジウム、研究会の要旨などとする。

(Letter to Editor も受付けます。)

2. 投稿資格

共著者のうちの1人は日本環境変異原学会会員でなければならない。ただし、招待寄稿の場合にはこの限りではない。

3. 論文原稿の書き方

論文原稿の用語は日本語または英語とし、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。
- 日本文の原稿：
原稿はA4判用紙に1行約40字、1頁30~31行で印字する(刷り上がりの約1/2頁に相当する)。ただし、要約は英文(300語以内)とする。また、別に英文の題名、著者名(フルネーム)、所属機関名ならびに所在地を付ける。
- 英文の原稿：
原稿はA4判用紙にダブルスペースで印字する。1頁25~27行を標準とする。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。
- 論文の記述は、第1頁は表題、著者名、所属および所在地、第2頁は英文の要約(Summary)およびキーワード(英文5語以内、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、緒言の記述は、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判の台紙に一枚づつ軽く糊付けする。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つてする。
- 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名はChemical Abstractsの記載方法に従う。記載順序は著者氏名、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. MaCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 31, 347-364.

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

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

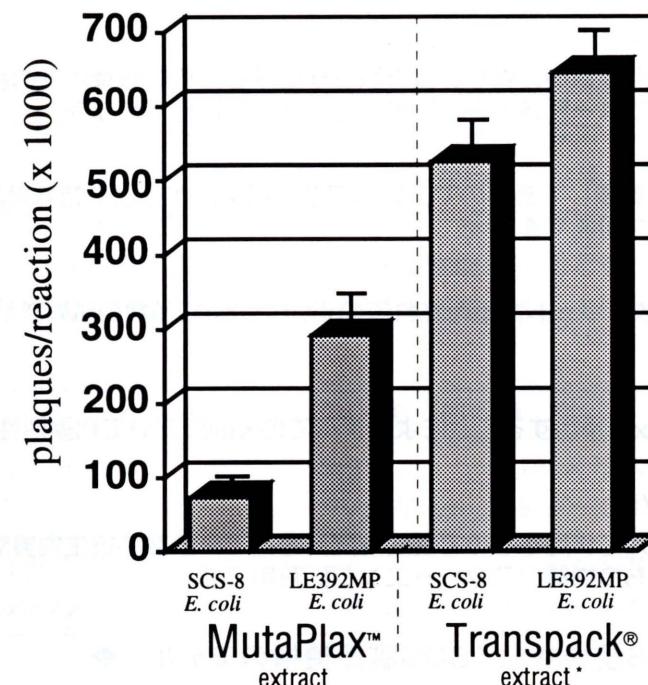
松影昭夫(編)(1996)DNA複製、修復と発癌, 羊土社, 東京。

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.



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

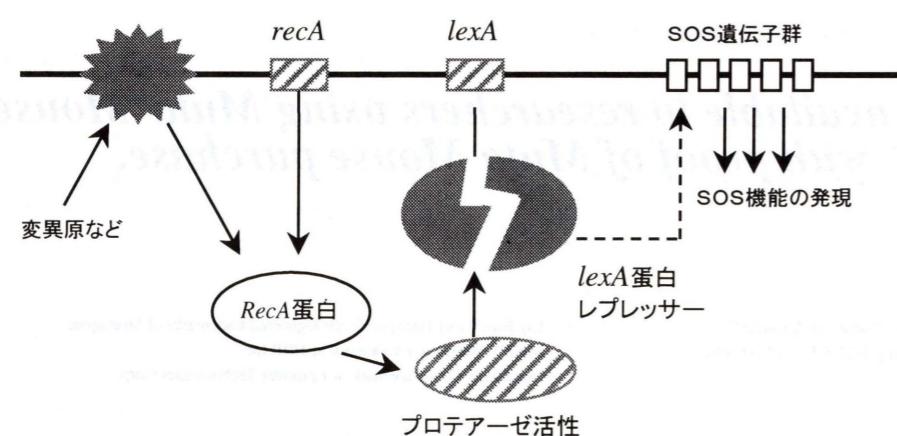
E-mail : Tsumoru_Miyano@kasho.co.jp

変異原性試験キット

umu-テスト ウムラック

- ヒスチジン含有物質でもテスト可能
Amesテストでは不可能なヒスチジンを含んだ物質でもテスト可能。食品、尿、血液、粗抽出液等の検体にも適用できます。
- 高感度でAmes法と相関
標準的変異原性物質AF-2で5ng/mlまで測定。Ames法と良く相関します。
- 单一試験菌株
Amesテストでは反応機構の異なる変異原を検出するために数種以上の試験菌株を要しますが、本テストでは一種類のみで同等以上の成果を期待できます。
- 簡便
菌、S-9Mixが凍結乾燥してあるので、いつでも、無菌操作などの特殊な設備を必要とせずに簡便な操作が可能です。
- 多数迅速
マイクロプレート1枚/キットが添付されているので同時に多数の試料を約6時間でテストできます。
- 代謝活性化
凍結乾燥したS-9Mixを添加することによりすべてのwellにおいて代謝活性化が可能です。
- 制癌剤のスクリーニング
多くの制癌剤はDNAに作用するので制癌剤開発過程で、多数の抗生物質や合成化合物の中から制癌作用をもつ物質のスクリーニングに有用です。

◆ SOS誘発状態 (SOS調節機構のモデル) ◆



JIMRO 研究用試薬

コードNo. : 655510 容量: 96テスト用 価格: 30,000円

製造・発売元 株式会社 日本抗体研究所
〒370-0021 群馬県高崎市西横手町351-1

ホームページ <http://www.jjinet.or.jp/jimro/>
TEL. 027-353-1411 FAX. 027-353-1770

オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に！ より手頃な価格に！

特徴

- エームステスト用と染色体異常試験用の2種類の試薬セットです。
- コファクターが無菌凍結品になり、解凍後S-9と混合するだけで使用できます。
- S-9とコファクターは実用的な分注量比ですから、混合が容易です。
- S-9とコファクターは未混合ですから、混合条件を変更しての試験が可能です。また、保存中にS-9とコファクターの未知の反応が起こりません。
- 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
エームステスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml × 10本 コファクターA 9ml × 10本	エームステストでのデータを添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 2ml × 3本 コファクターC 4.7ml × 3本	染色体異常試験でのデータを添付します

(保存は-80°Cでお願い致します)

- エームステスト用コファクターA(注文量100ml以上)および染色体異常試験用コファクターC(注文量30ml以上)の単品注文もお受け致します。

- 従来品は引き継ぎ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
エームステスト用 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)

変異原性試験画像解析支援システム

各種変異原性試験をサポートする画像解析システムをご用意しております。

SCG画像解析システム

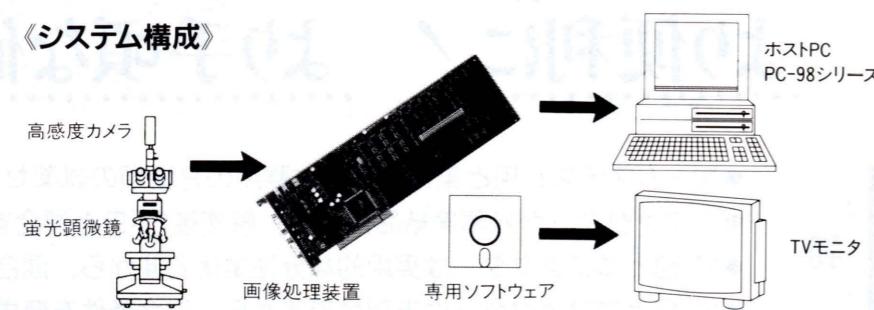
SCG試験に必要なデータを計測します。

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

《計測内容》

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

《システム構成》



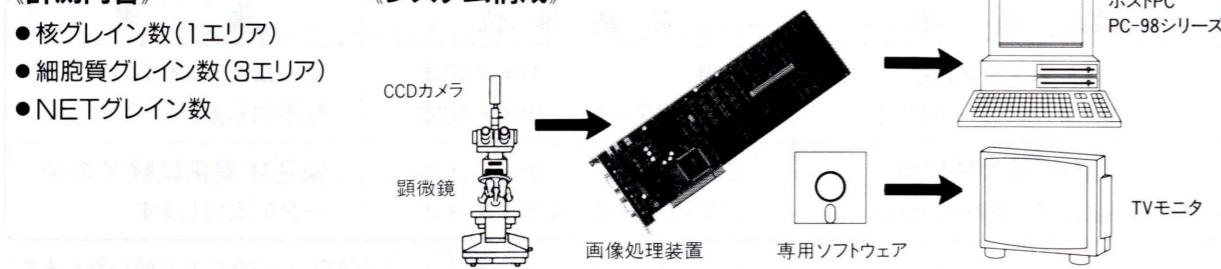
UDS画像解析システム

UDS試験に必要なデータを計測します。

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

《計測内容》

《システム構成》



小核画像解析システム

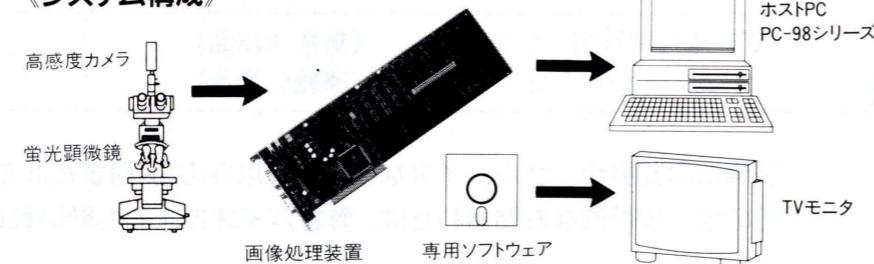
小核試験に必要なデータを計測します。

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!

ImageTech®

ケイオ一電子工業株式会社

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

KIKKOMAN S-9

このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

変異原性試験用凍結S-9

S-9調製法

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

保存

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

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

活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

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

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

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

* Salmonella typhimurium

エームス試験用凍結S-9MIX

特長

- 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



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

家田貿易株式会社

エームス テストシステム CA-11・CA-7II・PCA-11

〈微生物を用いる変異原性試験〉

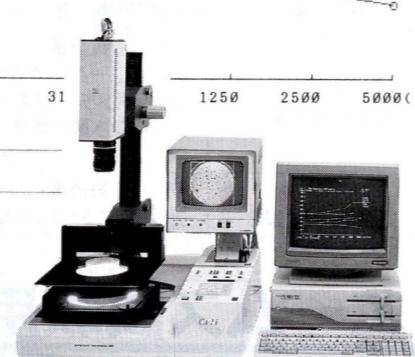
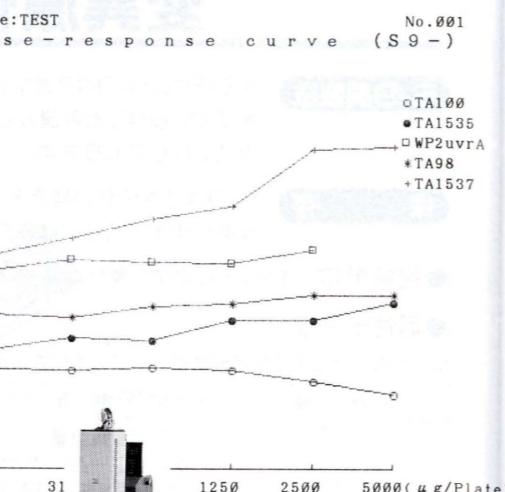
コロニーカウントからデータの保存、試験結果表
濃度別グラフの作成までを自動で高速処理します。

被験物質の名称：TEST

代謝活性化系の有無	被験物質濃度(μg/プレート)			復帰変異数(%)	
	TA100	TA1535	WP2uvrA		
S9Mix (-)	150	149	150	150	
S9Mix (+)	128 127 (128) 129 127 (128) 132 132 (132) 133 121 (127) 129 109 259 193 193 (193) 197 112 262 288 276 (269) 272 277 (275) 288* 288* (288) 269* 228* (249) 228* 228* (249)	156 35 112 313 29 (29) 625 29 (29) 1250 31 (31) 2500 31 (31) 5000 9* 9*	180 (182) 182 108 (181) 193 193 (193) 288 (283) 272 277 (275) 288* 288* (288) 269* 228* (249)	112 223 108 (110) 244 (234) 110 262 (261) 118 276 (269) 118 276 (269) 118 276 (269) 118 276 (269) 118 276 (269)	234* 237* (236) 232* 243* (238) 231 230 (231) 230 (231)



- 実績豊富なコロニー・アナライザ
- サイズ、コントラストによる分離機能
- 阻止円・正式法の力値計算



- コンパクト一体型で低価格
- 細菌コロニーから細胞コロニーまで計測

自由に選べるラインナップ。

顕微鏡システム

CA-7MIグレイン計測システム



CA-7MI

(備考) 数値の右の*印は、菌の生育阻害が認められたものです。

数値の右の#印は、菌の沈殿が認められたものです。

- 不透明な培地、色のついた培地上のコロニー計測
- 粉・異物・トナー・インク・カーボン等混在コロニー計測
- 自由に倍率を変えての拡大計測
- 計測データの自動補正
- 豊富なソフトウェア
- 背景データの検索プログラム
- 生育阻害編集機能
- 一太郎、ロータス1-2-3対応

※依託試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元

SSC システムサイエンス株式会社

本社・工場/〒197-0011 東京都福生市福生1253-16
TEL 0425 (52) 5956 (代表)

改訂新版・新語大巾追加!!

最新医学略語

★臨床医に

★看護婦に

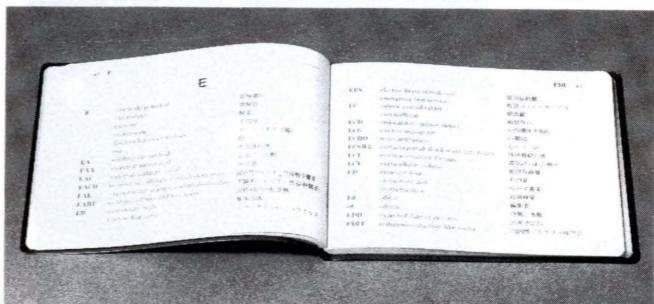
★医学生に

★パラメティカルスタッフに

A6判・横/222頁 定価(2,039円+税) ￥240円

的場 恒孝(久留米大学教授) 編著

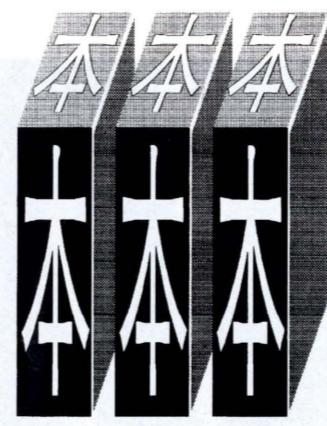
ベッドサイドで頻繁に出あう、最新の英文医学略語2880語をコンパクトなポケット判に収録。



〒170 東京都豊島区駒込1丁目43-9
TEL (03) 3944-2591 FAX (03) 3947-8073

インテルナ出版

●注文はTELまたは
FAXでもお受けします



書籍、雑誌の編集・制作
うけたまわります。

企画・編集のご相談から、レイアウト→校正→
印刷→製本→納品→発送まで、誠実に対応。

学会雑誌、記念誌、名簿、抄録集、論文集、
資料冊子、その他。

〒170-0003 東京都豊島区駒込1丁目43-9
TEL (03) 3944-2591 FAX (03) 3947-8073

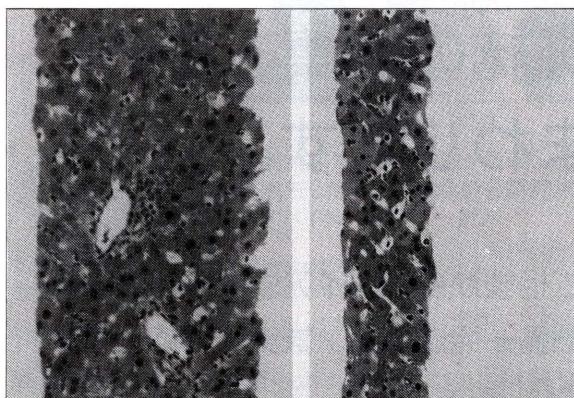
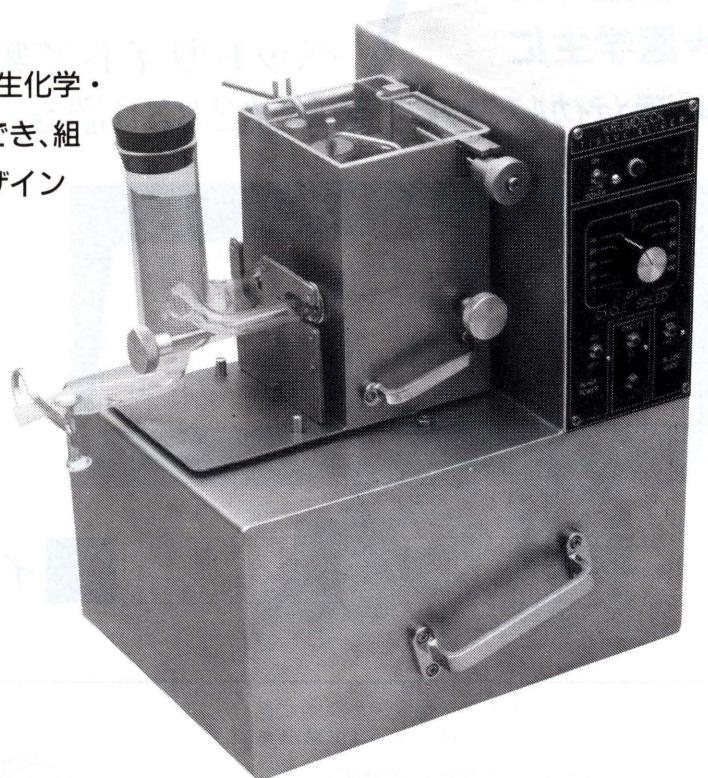
Q インテルナ出版

THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

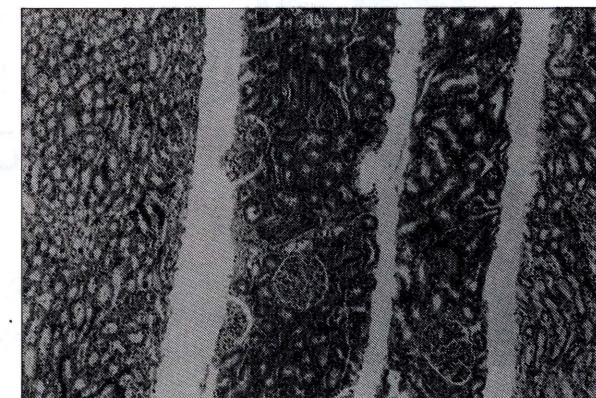
生きた組織の無菌スライスができます。

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

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



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

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



販売元
ショーシンEM株式会社

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

編集後記

本号は、総説1編、原著論文1編、短報論文2編に加えて27回大会(大阪)の特集号から成っています。昨年の大会は34の講演が行われましたが、最終的には19の原稿が集まりました。特に原稿をいただいている本学会員の先生は、至急送って下さいますよう重ねてお願い申し上げます。日本の学会誌、特に日本語表記の学術雑誌の存在意義が論議されている現状において、本誌の発展には1編の論文もおろそかには出来ません。一般論文の投稿も合わせてお願ひいたします。

担当編集委員 鈴木 勇司

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-)

〒243-0123 神奈川県厚木市森の里青山1-1

青山学院大学理工学部生物学

Tel: 0462-48-1211 Fax: 0462-48-7423

E-mail: cfuri@cc.aoyama.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

グラクソ・ウエルカム株式会社・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: matsuoka@nihs.go.jp

矢嶋 信浩(1999-)

〒329-0512 栃木県下都賀郡石橋町下石橋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: n-yajima@snowbrand.co.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下記の協会から許諾を受けて下さい。著作物の転載・翻訳のような複写以外の許諾は、直接日本環境変異原学会へご連絡下さい。

学術著作権協会
〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル
Tel: 03-3475-5618 Fax: 03-3475-5619

環境変異原研究 第21巻 第2号 1999年

平成11年7月5日印刷
平成11年7月12日発行

発行者 日本環境変異原学会
発行責任者 大西 克成
製作 インテルナ出版

目 次

総 説

- 茶カテキン類の抗変異原性および抗発がん性(II) 黒田行昭, 原 征彦 85

一般論文

- Excision-repair activity of green tea extracts in 4NQO-induced mutations of cultured Chinese hamster V79 cells Mamiko Miyajima, Yukihiko Hara and Yukiaki Kuroda 95

短 報

- Suppression of genotoxicity of X-rays in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epigallocatechin, and theaflavin digallate Kazuaki Kawai, Kazuo Fujikawa and Hideyuki Furukawa 103
ラット骨髓および末梢血における MNU の誘発小核について 朝倉省二, 杉原忠一, 澤田繁樹, 大門弘彦 109

第 27 回大会特別講演

- Fertilization and the initiation of development in orthodox and unorthodox ways Ryuzo Yanagimachi 113

受賞講演

学術賞

- 哺乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異の検出と抑制に関する研究 黒田行昭 115
研究奨励賞
遺伝子工学的手法を用いたアルキル化剤高感受性サルモネラ試験菌株の作製とその応用 山田雅巳 123
コメットアッセイを用いたマウス多臓器 DNA 損傷の検出 佐々木有 131

シンポジウム

I. 環境汚染変異原

- 大気環境におけるニトロアレンの生成とその変異原性 久松由東 141
発癌性/変異原性 NPAHs の高感度検出法と大気内動態 早川和一 147
河川水中の変異原物質の検索 糸谷東雄, 大江 武, 寺尾良保, 澤西啓之, 若林敬二 153
水環境中変異原物質の運命 中室克彦 159
表層土壤の変異原性の実態 渡辺徹志, 平山晃久 165

II. ダイオキシンの生体影響

- ダイオキシンの生体影響—序論— 野村大成 171
ダイオキシン類の人体汚染の現状 宮田秀明 173
ダイオキシンの生体作用の分子機構 菊池英明 181
Carcinogenicity of Dioxins in Experimental Animals and Humans: Evaluations by the IARC Monographs Jerry M. Rice 191
ダイオキシンのマウス生殖細胞への影響 井上雅雄, 栗原孝行, 上田忠司, 野村大成 197
ダイオキシンの遺伝的影響: ヒト精子染色体に及ぼす影響の観点から 上口勇次郎, 石井 裕 201
ダイオキシンの遺伝的影響の問題点—継世代的影響について— 野村大成, 中島裕夫, 李 利亜, 福留優子, Rajamanickam Baskar 207
梁 治子, 具 在妍, 森 景子

III. コメット法, その変異原性試験としての展望

- コメット・アッセイ: 放射線による DNA 損傷と修復 生島隆治 213
In vitro および in vivo における 6 倍クロムによる DNA 損傷の検出—Comet assay とアルカリ溶出法, カリウム-SDS 沈殿法の比較— 上野俊治, 山口未央, 福島拓哉, 松田智行 219
諏佐信行, 古川義宣, 杉山正康, 佐々木有
コメットアッセイを用いた DNA 損傷の検出—試験原理の検証— 宮前陽一 225
コメット法における泳動像の分類と評価 小林 浩, 林 真 231
アポトーシスに伴う DNA 断片化のコメット法による検出—その特徴 大山ハルミ, 山田 武 237

付 記

- 日本環境変異原学会 入会申込書
学生会員申込書