

# 環境変異原研究

**Environmental  
Mutagen  
Research**

**Vol.22 No.2 2000**





トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に！

## DNAシーケンシング受託サービス

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


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

基本料金：¥12,000/run (納期：お問い合わせ下さい)

一度にお受けするサンプル数に応じて割引致します！  
(サンプルの本数や状態に応じて別途お見積り致します。)

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

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

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

101run～ 定価 ¥12,000 →  ¥9,000/run

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

1runからでも¥7,200/run 

突然変異部位の解析も別途料金にて承ります！

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

なお、プラスミドは菌体の状態でも別途料金にて受け付けております。

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

# 環境変異原研究

Environmental Mutagen Research



蛍光検出の未来を拓く

株式会社アイシン・コスモス研究所

本社：〒448-8650 愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地

TEL.0566 (62) 1606 FAX.0566 (62) 1607

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



目 次

一般論文

大気浮遊粒子，河川水および土砂の変異原性モニタリング  
後藤純雄，遠藤 治，松本 寛，酒井茂克，芥川智子，麻野間正晴，平山晃久  
渡辺徹志，世良暢之，塚谷裕子，多田敦子，若林敬二 .....45

第 28 回大会受賞講演

学術賞  
食品中変異原・癌原物質の発見と発がん機構の分子生物学  
長尾美奈子 .....55

研究奨励賞

大気・土壌中の変異原物質の定量的評価に関する研究  
渡辺徹志 .....61  
複製 DNA 合成（RDS）試験法を応用した非変異・肝癌原性物質の検出系確立  
宇野芳文 .....67

第 28 回大会シンポジウム

I. がん化学予防の分子生物学的アプローチ  
バイオケモプリベンションーがん予防への新コンセプト  
西野輔翼，里見佳子 .....77  
II. 新しい変異原検出法へのアプローチ  
新しい変異原検出法へのアプローチ  
能美健彦，葛西 宏 .....83  
トランスジェニックマウス *gpt delta* を用いた点突然変異と欠失突然変異の検出  
能美健彦，増村健一 .....85  
分子細胞遺伝学的手法によるがん細胞の染色体遺伝子異常解析  
佐々木功典 .....91  
紫外線で誘発される DNA 損傷とその修復をヒト細胞核内で立体的にみる  
森 俊雄 .....97  
原子間力顕微鏡による DNA 損傷の検出  
村上正弘，古川 章，南久松真子，早田 勇 .....103  
DNA のエンドジョインニングの分子機構：2 種類の非相同的組換え  
池田日出男 .....107

入会申込書

学生会員申込書

投稿規定

執筆規定

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

大気浮遊粒子，河川水および土砂の変異原性モニタリング

後藤 純雄<sup>1</sup>，遠藤 治<sup>1</sup>，松本 寛<sup>2</sup>，酒井 茂克<sup>2</sup>，芥川 智子<sup>2</sup>  
麻野間 正晴<sup>3</sup>，平山 晃久<sup>4</sup>，渡辺 徹志<sup>4</sup>，世良 暢之<sup>5</sup>  
塚谷 裕子<sup>5</sup>，多田 敦子<sup>6</sup>，若林 敬二<sup>6</sup>

<sup>1</sup> 国立公衆衛生院 〒 108-8638 東京都港区白金台 4-6-1

<sup>2</sup> 北海道環境科学研究センター 〒 060-0819 札幌市北区北 19 条西 12 丁目

<sup>3</sup> 名古屋市衛生研究所 〒 467-8615 名古屋市瑞穂区萩山町 1-11

<sup>4</sup> 京都薬科大学 〒 607-8414 京都市山科区御陵中内町 5

<sup>5</sup> 福岡県保健環境研究所 〒 818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野 39

<sup>6</sup> 国立がんセンター研究所 〒 104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

Mutagenicity of airborne particle, river water  
and soil in Japan

Sumio Goto<sup>1</sup>，Osamu Endo<sup>1</sup>，Yutaka Matsumoto<sup>2</sup>，Shigekatsu Sakai<sup>2</sup>，  
Tomoko Akutagawa<sup>2</sup>，Masaharu Asanoma<sup>3</sup>，Teruhisa Hirayama<sup>4</sup>，  
Tetsushi Watanabe<sup>4</sup>，Nobuyuki Sera<sup>5</sup>，Hiroko Tsukatani<sup>5</sup>，Atsuko Tada<sup>6</sup>  
Keiji Wakabayashi<sup>6</sup>

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

<sup>2</sup> Hokkaido Institute of Environmental Sciences

Kita 19 jo, Nishi 12 chome, Kita-ku, Sapporo 060-0819

<sup>3</sup> Nagoya City Public Health Research Institute, 1-11 Hagiya-ma-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615

<sup>4</sup> Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414

<sup>5</sup> Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

39 Mukaizano Dazaifu, Fukuoka 818-0135

<sup>6</sup> National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045

Summary

The mutagenicity of airborne particles (n=100), river waters (n=105) and surface soils (n=111) which were collected from five geographically different areas of Japan, i.e. the Hokkaido, Kanto, Chubu, Kinki and Kyushu areas, between October 1996 and March 1997, were examined by the pre-incubation method using *Salmonella typhimurium* strains. All organic extracts of airborne particles, which were collected by high volume air samplers, were mutagenic toward TA98 and TA100 strains both in the presence and absence of S9 mix. The extracts with the greatest mutagenicity were from samples collected at sites in heavy traffic areas. Most of the blue rayon-absorbed materials from river waters exerted strong mutagenicity toward YG1024 strain with S9 mix, and the potencies varied widely with sampling site. No blue rayon-absorbed materials showed strong mutagenicity in TA100 strain, regardless of whether S9 mix was added. Nonagricultural surface soils were collected from roadsides, parks and so forth in each area. All organic extracts of surface soils except for those from the Kinki area were mutagenic toward both TA98 and TA100 strains with and without S9 mix. The mutagenic activities of surface soil extracts ranged widely, and the effect of additional S9 mix on the activities depend on samples.

受付：2000 年 6 月 29 日 受理：2000 年 7 月 6 日

©日本環境変異原学会



Keywords : mutagenicity, pre-incubation assay, *Salmonella typhimurium*, airborne particles, river water, soil, monitoring

緒 言

近年、環境中に放出される化学物質の種類や量は増加している。また、環境中に存在している多種類の化学物質の中には発がん性や変異原性などを示したり、生体にさまざまな影響を及ぼす物質が多種含まれていることも明らかになってきている。これらの物質の存在実態や曝露実態および生体影響状況を正確に把握し、その対策を講ずることは環境汚染の防止やわれわれの健康を維持するうえできわめて重要である。一方、これまでの環境汚染の実態把握には、主に個別の物質の有害性データや化学分析による環境濃度が用いられてきた。しかし実際には、一般環境中には多種類の有害物質が微量ずつ混在することや化学分析法が十分に整っていない有害物質も存在するため、既存の化学分析法のみで上記の実態を把握することは不可能である。また、汚染有害物質全体としてその曝露がもたらす健康影響については、現在、ほとんど検討されていない状況にある。特に、発がん性が疑われる環境中のがん・変異原性物質の種類や全体としてのがん・変異原性の評価に関するデータは十分に得られていない現状にある。

そこで本研究では、上記の現状に対応するための手法として Ames 法による変異原性試験法を取り上げ、空気、水、土など主要な環境媒体の変異原性調査研究に適用した。今回は、1996～1997 年に 5 地域(機関)で採取された大気浮遊粒子、河川水および土砂試料の変異原性をサルモネラ菌によるプレインキュベーション法で測定したので、得られた主な結果を報告する。

実験材料および方法

1. 試料の採取および調製

大気浮遊粒子は、24 時間ずつハイボリュームエアースンプラーを稼動し、秤量済み石英繊維フィルター(8×10 インチ, Pallflex 2500 QAT-UP)上に採取した。採取期間は、1996 年 10 月～1997 年 2 月とし、採取地域は北海道、関東、中部、近畿および九州の 5 地域とした。各地域の採取地点は、北海道、関東、中部および近畿地域では 5 地点とし、九州地域は 4 地点とした。なお、大気浮遊粒子の採取地点名は Table 1 の試験結果とともに示してある。採取後、石英繊維フィルターを恒湿恒量化し、秤量密封後-80℃で冷凍保存した。変異原性試験用試料(タール状物質)の調製では、上記フィルターをデシケーター中で室温に戻し、所定面積(1/2 または 1/3)を切り取りこれにメタノール(和光純薬工業社製；残留農薬試験用)を所定量(100 mL または 200 mL)を加えて、超音波

抽出法により有機成分を抽出した。エバポレーターで抽出溶媒を留去し、さらに、弱い窒素気流下でジメチルスルホキシド(同仁化学研究所製；蛍光分析用 DMSO)に転溶し、これを変異原性試験に供するまで-80℃で冷凍保存した。

河川水試料は、ブルーレーヨン(フナコシ社製)1.0 g をナイロン製ネットに入れ、この 3 本を懸垂したフロートを 24 時間ずつ河川に浮かせ吸着採取した(坂本&早津, 1990)。1996 年 11 月～1997 年 3 月に全国 5 地域の河川計 90 地点で、雨天後は避けるようにして、総計 105 試料を採取した。Table 2 には河川水試料の採取地点名を示してある。なお、北海道地域では 5 地点で 4 日間連続して 24 時間ずつ計 20 試料採取した。得られた河川水試料は、採取後できるだけ早くメタノール-アンモニア水(50：1,v/v)160 mL(ブルーレーヨン 1.0 g 当たり)を抽出溶媒として有機成分を抽出し大気浮遊粉じんの場合と同様に DMSO 溶液を調製し、これを変異原性試験に供するまで-80℃で冷凍保存した。

土砂試料は、1996 年 11 月～1997 年 3 月に 5 地域の計 111 地点で、雨天後は避けるようにして表土 30～50 g をポリエチレン製バッグに採取した。なお、Table 3 には土砂の採取地点名を示してある。この採取は主に道路近傍や公園内で行った。採取し乾燥した土砂を 60 メッシュのふるいにかけて、その 15 g を秤取し、メタノール 200 mL を抽出溶媒とする超音波抽出法により、有機成分を抽出し DMSO 溶液を調製し、-80℃で冷凍保存した(西村ら, 1984)。

2. 変異原性試験

変異原性試験には、Ames らの方法を一部改良したプレインキュベーション法を用いた(Yahagi et al., 1977)。すなわち、冷凍保存した各試料の DMSO 溶液をデシケーター中で室温に戻し、これに所定量の DMSO を加えて、所定濃度の希釈溶液を作成した。この 100 μL を滅菌試験管に分注し、これに Na-リン酸緩衝液 500 μL (または S 9 mix 500 μL)および前培養菌懸濁液 100 μL を順次加え、37℃で 20 分間プレインキュベーションした。その後、ソフトアガーを 2 mL 加えて混合し、これを最少グルコース寒天平板培地(プレート)に注いで一様に広げ、37℃で 48～72 時間インキュベーションし、得られたプレート上の復帰変異コロニー数を計数した。

試験菌株には、大気浮遊粒子および土砂試料に対してはサルモネラ菌 TA 100, TA 98 株を用い、河川水試料に対しては、サルモネラ菌 TA 100, YG 1024 株(Watanabe et al., 1990)を用いた。

各試料の変異原比活性を補正するため、標準対照試料

Table 1 Mutagenic activities of airborne particulate samples

Sampling			Mutagenic activity (revertants/m <sup>3</sup> , air)							
ID	Location	Date	TA100	-S9mix	TA100	+S9mix	TA98	-S9mix	TA98	+S9mix
A001	Sapporo 1	970127	11.1	( 11.5 )	18.8	( 22.1 )	16.5	( 17.5 )	10.8	( 14.6 )
A002	Sapporo 1	970128	13.7	( 14.2 )	19.2	( 22.6 )	14.2	( 15.1 )	12.1	( 16.4 )
A003	Sapporo 1	970129	18.0	( 18.6 )	24.7	( 29.0 )	19.9	( 21.1 )	17.4	( 23.6 )
A004	Sapporo 1	970130	16.2	( 16.7 )	21.8	( 25.6 )	16.2	( 17.2 )	12.3	( 16.7 )
A005	Sapporo 2	970127	25.4	( 26.2 )	36.9	( 43.4 )	26.4	( 28.0 )	21.4	( 29.0 )
A006	Sapporo 2	970128	35.8	( 37.0 )	43.6	( 51.2 )	30.1	( 32.0 )	24.8	( 33.6 )
A007	Sapporo 2	970129	34.2	( 35.3 )	41.5	( 48.8 )	31.7	( 33.7 )	27.3	( 37.0 )
A008	Sapporo 2	970130	28.8	( 29.8 )	40.4	( 47.5 )	27.1	( 28.8 )	25.3	( 34.3 )
A009	Muroran	970127	22.0	( 22.7 )	89.5	( 105.2 )	17.9	( 19.0 )	48.7	( 66.0 )
A010	Muroran	970128	15.3	( 15.8 )	43.7	( 51.3 )	17.0	( 18.1 )	16.8	( 22.8 )
A011	Muroran	970129	26.0	( 26.9 )	93.2	( 109.5 )	19.9	( 21.1 )	64.1	( 86.8 )
A012	Muroran	970130	25.3	( 26.1 )	82.2	( 96.6 )	19.6	( 20.8 )	49.1	( 66.5 )
A013	Asahikawa	970204	11.4	( 11.8 )	18.9	( 22.2 )	12.3	( 13.1 )	12.1	( 16.4 )
A014	Asahikawa	970205	31.0	( 32.0 )	38.0	( 44.7 )	24.1	( 25.6 )	22.4	( 30.3 )
A015	Asahikawa	970206	43.0	( 44.4 )	58.0	( 68.2 )	38.4	( 40.8 )	38.8	( 52.6 )
A016	Asahikawa	970207	45.6	( 47.1 )	47.5	( 55.8 )	46.6	( 49.5 )	38.4	( 52.0 )
A017	Kushiro	970204	9.2	( 9.5 )	11.1	( 13.0 )	7.9	( 8.4 )	6.4	( 8.7 )
A018	Kushiro	970205	25.2	( 26.0 )	36.7	( 43.1 )	24.0	( 25.5 )	20.0	( 27.1 )
A019	Kushiro	970206	20.0	( 20.7 )	32.3	( 38.0 )	18.9	( 20.1 )	19.9	( 27.0 )
A020	Kushiro	970207	20.1	( 20.8 )	33.7	( 39.6 )	19.7	( 20.9 )	20.2	( 27.4 )
A021	Tokyo 1	961126	13.4	( 11.3 )	13.6	( 21.0 )	20.6	( 14.1 )	7.5	( 11.9 )
A022	Tokyo 1	961127	37.0	( 31.2 )	25.6	( 39.6 )	37.7	( 25.8 )	18.2	( 28.8 )
A023	Tokyo 1	961128	45.3	( 38.2 )	33.1	( 51.2 )	33.7	( 23.0 )	25.0	( 39.6 )
A024	Tokyo 1	961129	15.5	( 13.1 )	10.9	( 16.9 )	16.1	( 11.0 )	7.1	( 11.2 )
A025	Tokyo 2	961126	86.0	( 72.5 )	53.7	( 83.1 )	56.7	( 38.8 )	32.5	( 51.5 )
A026	Tokyo 2	961127	47.2	( 39.8 )	34.6	( 53.5 )	35.5	( 24.3 )	20.8	( 32.9 )
A027	Tokyo 2	961128	92.4	( 77.9 )	60.7	( 93.9 )	60.7	( 41.5 )	47.1	( 74.6 )
A028	Tokyo 2	961129	42.4	( 35.7 )	22.2	( 34.3 )	22.7	( 15.5 )	13.7	( 21.7 )
A029	Sagamihara	961129	28.3	( 23.9 )	16.9	( 26.1 )	22.7	( 15.5 )	9.6	( 15.2 )
A030	Sagamihara	961202	21.7	( 18.3 )	20.9	( 32.3 )	19.0	( 13.0 )	10.3	( 16.3 )
A031	Sagamihara	961204	40.3	( 34.0 )	19.6	( 30.3 )	31.7	( 21.7 )	19.5	( 30.9 )
A032	Sagamihara	961205	49.3	( 41.6 )	37.5	( 58.0 )	40.5	( 27.7 )	19.1	( 30.2 )
A033	Maebashi	961209	53.0	( 44.7 )	23.0	( 35.6 )	37.2	( 25.4 )	20.7	( 32.8 )
A034	Maebashi	961210	65.2	( 55.0 )	37.9	( 58.6 )	47.8	( 32.7 )	29.6	( 46.9 )
A035	Maebashi	961211	18.9	( 15.9 )	10.0	( 15.5 )	20.3	( 13.9 )	7.2	( 11.4 )
A036	Maebashi	961212	22.0	( 18.5 )	18.0	( 27.8 )	15.0	( 10.3 )	8.2	( 13.0 )
A037	Tsukuba	961209	49.7	( 41.9 )	35.6	( 55.1 )	51.0	( 34.9 )	23.4	( 37.0 )
A038	Tsukuba	961210	62.6	( 52.8 )	45.5	( 70.4 )	43.3	( 29.6 )	28.2	( 44.6 )
A039	Tsukuba	961211	55.5	( 46.8 )	37.4	( 57.9 )	37.7	( 25.8 )	25.3	( 40.1 )
A040	Tsukuba	961212	27.0	( 22.8 )	22.7	( 35.1 )	27.0	( 18.5 )	21.7	( 34.4 )
A041	Nagoya 1	961216	108.8	( 57.8 )	85.8	( 54.8 )	38.8	( 19.2 )	46.0	( 39.8 )
A042	Nagoya 1	961217	29.9	( 15.9 )	32.2	( 20.6 )	12.4	( 6.1 )	14.0	( 12.1 )
A043	Nagoya 1	961218	46.9	( 24.9 )	56.7	( 36.2 )	16.1	( 8.0 )	20.2	( 17.5 )
A044	Nagoya 1	961219	45.4	( 24.1 )	51.6	( 32.9 )	18.9	( 9.3 )	15.0	( 13.0 )
A045	Nagoya 2	961216	72.6	( 38.6 )	86.5	( 55.2 )	31.6	( 15.6 )	42.1	( 36.4 )
A046	Nagoya 2	961217	18.6	( 9.9 )	25.1	( 16.0 )	11.0	( 5.4 )	10.2	( 8.8 )
A047	Nagoya 2	961218	24.2	( 12.9 )	31.5	( 20.1 )	9.8	( 4.8 )	10.7	( 9.3 )
A048	Nagoya 2	961219	11.6	( 6.2 )	13.7	( 8.7 )	5.0	( 2.5 )	5.9	( 5.1 )
A049	Nagoya 3	961216	53.5	( 28.4 )	52.0	( 33.2 )	31.8	( 15.7 )	30.8	( 26.7 )
A050	Nagoya 3	961217	14.4	( 7.7 )	16.0	( 10.2 )	8.3	( 4.1 )	8.1	( 7.0 )
A051	Nagoya 3	961218	14.8	( 7.9 )	18.1	( 11.6 )	9.6	( 4.7 )	7.9	( 6.8 )
A052	Nagoya 3	961219	13.1	( 7.0 )	15.7	( 10.0 )	5.1	( 2.5 )	8.5	( 7.4 )
A053	Toyohashi	961216	28.6	( 15.2 )	28.6	( 18.3 )	13.0	( 6.4 )	17.8	( 15.4 )
A054	Toyohashi	961217	9.8	( 5.2 )	13.9	( 8.9 )	5.8	( 2.9 )	7.4	( 6.4 )
A055	Toyohashi	961218	11.8	( 6.3 )	14.9	( 9.5 )	6.2	( 3.1 )	10.1	( 8.7 )
A056	Toyohashi	961219	11.3	( 6.0 )	15.1	( 9.6 )	5.8	( 2.9 )	7.3	( 6.3 )



Table 1 continue

Sampling			Mutagenic activity (revertants/m <sup>3</sup> , air)							
ID	Location	Date	TA100	-S9mix	TA100	+S9mix	TA98	-S9mix	TA98	+S9mix
A057	Inasa-gun	961216	12.3	( 6.5 )	13.9	( 8.9 )	6.2	( 3.1 )	7.5	( 6.5 )
A058	Inasa-gun	961217	2.9	( 1.5 )	5.8	( 3.7 )	1.6	( 0.8 )	2.2	( 1.9 )
A059	Inasa-gun	961218	10.1	( 5.4 )	10.4	( 6.6 )	5.3	( 2.6 )	4.9	( 4.2 )
A060	Inasa-gun	961219	4.7	( 2.5 )	7.5	( 4.8 )	3.2	( 1.6 )	4.1	( 3.5 )
A061	Kusatsu	961021	3.5	( 4.0 )	6.8	( 5.7 )	3.1	( 4.3 )	7.7	( 8.5 )
A062	Kusatsu	961022	9.8	( 11.3 )	33.8	( 28.3 )	11.5	( 15.8 )	32.9	( 36.3 )
A063	Kusatsu	961023	7.7	( 8.8 )	22.1	( 18.5 )	5.3	( 7.3 )	15.4	( 17.0 )
A064	Kusatsu	961024	9.8	( 11.3 )	24.2	( 20.3 )	5.2	( 7.1 )	21.0	( 23.2 )
A065	Kyoto 1	961111	6.4	( 7.4 )	21.1	( 17.7 )	6.2	( 8.5 )	18.0	( 19.9 )
A066	Kyoto 1	961112	1.4	( 1.6 )	2.2	( 1.8 )	1.5	( 2.1 )	3.5	( 3.9 )
A067	Kyoto 1	961113	3.0	( 3.4 )	7.2	( 6.0 )	2.7	( 3.7 )	7.3	( 8.1 )
A068	Kyoto 1	961114	20.8	( 23.9 )	54.8	( 46.0 )	14.9	( 20.5 )	50.1	( 55.3 )
A069	Kyoto 2	961202	9.7	( 13.0 )	17.0	( 16.1 )	4.9	( 6.7 )	11.0	( 13.6 )
A070	Kyoto 2	961203	11.6	( 15.5 )	24.5	( 23.1 )	5.3	( 7.2 )	13.8	( 17.1 )
A071	Kyoto 2	961204	13.2	( 17.7 )	35.3	( 33.3 )	6.1	( 8.3 )	19.4	( 24.0 )
A072	Kyoto 2	961205	6.5	( 8.7 )	11.5	( 10.9 )	4.0	( 5.5 )	10.6	( 13.1 )
A073	Nara	961209	16.5	( 20.6 )	19.8	( 18.2 )	15.6	( 20.9 )	31.6	( 41.2 )
A074	Nara	961210	21.8	( 27.3 )	27.1	( 24.9 )	12.6	( 16.9 )	39.4	( 51.3 )
A075	Nara	961211	27.5	( 34.4 )	41.3	( 37.9 )	23.6	( 31.7 )	49.3	( 64.2 )
A076	Nara	961212	26.1	( 32.6 )	32.3	( 29.6 )	23.1	( 31.0 )	37.6	( 49.0 )
A077	Osaka	961028	20.1	( 25.1 )	60.3	( 55.3 )	15.3	( 20.5 )	55.1	( 71.8 )
A078	Osaka	961029	32.4	( 40.5 )	73.6	( 67.6 )	21.3	( 28.6 )	52.2	( 68.0 )
A079	Osaka	961030	22.1	( 27.6 )	68.8	( 63.1 )	24.0	( 32.2 )	54.4	( 70.8 )
A080	Osaka	961031	8.4	( 10.5 )	52.2	( 47.9 )	12.9	( 17.3 )	42.0	( 54.7 )
A081	Kitakyushu	961209	32.6	( 35.7 )	34.6	( 39.3 )	33.2	( 32.5 )	29.7	( 21.3 )
A082	Kitakyushu	961210	31.7	( 34.7 )	34.8	( 39.5 )	29.4	( 28.8 )	30.1	( 21.6 )
A083	Kitakyushu	961211	32.3	( 35.4 )	31.5	( 35.7 )	25.8	( 25.2 )	28.3	( 20.3 )
A084	Kitakyushu	961212	33.4	( 36.6 )	33.4	( 37.9 )	27.6	( 27.0 )	30.4	( 21.8 )
A085	Kitakyushu	961213	32.8	( 35.9 )	31.9	( 36.2 )	29.3	( 28.7 )	28.2	( 20.2 )
A086	Fukuoka 1	961209	22.9	( 25.1 )	24.4	( 27.7 )	22.2	( 21.7 )	19.5	( 14.0 )
A087	Fukuoka 1	961210	20.7	( 22.7 )	22.8	( 25.9 )	18.6	( 18.2 )	22.3	( 16.0 )
A088	Fukuoka 1	961211	19.5	( 21.4 )	25.4	( 28.8 )	17.6	( 17.2 )	18.7	( 13.4 )
A089	Fukuoka 1	961212	20.4	( 22.4 )	23.5	( 26.7 )	18.8	( 18.4 )	20.3	( 14.5 )
A090	Fukuoka 1	961213	23.9	( 26.2 )	25.6	( 29.0 )	23.2	( 22.7 )	23.8	( 17.0 )
A091	Fukuoka 2	961209	19.5	( 21.4 )	21.8	( 24.7 )	18.6	( 18.2 )	20.4	( 14.6 )
A092	Fukuoka 2	961210	18.8	( 20.6 )	21.6	( 24.5 )	17.8	( 17.4 )	18.6	( 13.3 )
A093	Fukuoka 2	961211	20.3	( 22.2 )	22.6	( 25.6 )	17.2	( 16.8 )	19.8	( 14.2 )
A094	Fukuoka 2	961212	18.4	( 20.2 )	23.1	( 26.2 )	16.8	( 16.4 )	18.2	( 13.0 )
A095	Fukuoka 2	961213	19.6	( 21.5 )	24.4	( 27.7 )	18.2	( 17.8 )	19.3	( 13.8 )
A096	Kumamoto	961209	13.2	( 14.5 )	14.2	( 16.1 )	11.6	( 11.4 )	11.8	( 8.4 )
A097	Kumamoto	961210	12.5	( 13.7 )	15.6	( 17.7 )	12.8	( 12.5 )	12.9	( 9.2 )
A098	Kumamoto	961211	14.2	( 15.6 )	25.3	( 28.7 )	13.3	( 13.0 )	13.5	( 9.7 )
A099	Kumamoto	961212	12.8	( 14.0 )	14.3	( 16.2 )	11.4	( 11.2 )	13.2	( 9.5 )
A100	Kumamoto	961213	12.9	( 14.1 )	14.2	( 16.1 )	12.2	( 11.9 )	12.8	( 9.2 )

Numbers in parenthesis indicate the values which are normalized with standard airborne particulate extract soln.

Sapporo 1: Kita-ku, Sapporo 2: Chuo-ku

Tokyo 1: Minato-ku, Tokyo 2: Shibuya-ku

Nagoya 1: Midori-ku, Nagoya 2: Minami-ku, Nagoya 3: Moriyama-ku

Kyoto 1: Higashiyama-ku, Kyoto 2: Yamashina-ku

Fukuoka 1: Center City, Fukuoka 2: Residential

として大気浮遊粒子の抽出物の DMSO 溶液を用いた (Matsushita et al., 1992). また, 試験菌株, S9 mix などの変異原性試験状況の確認のため, 陽性対照物質には AF-2(ナカライテスク社製, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide) および B[a]P (Sigma Chemical 社製; benzo [a] pyrene) を用いた.

変異原性試験結果(量-反応関係)をもとに, その最小自乗法による直線回帰から, 変異原比活性を求めた. すなわち, 大気浮遊粒子試料ではハイボリュームエアサンプラー単位空気吸引量あたりの復帰変異コロニー数 (rev./m<sup>3</sup>, air), 河川水試料では 24 時間吸着させたブルーレーヨン単位重量あたりの復帰変異コロニー数 (rev./g, blue rayon), 土砂試料では 60 メッシュ以下の土砂重量あたりの復帰変異コロニー数 (rev./g, soil) として変異原比活性を算出した.

## 結果および考察

本研究においては, 試料採取, 試料調製および変異原性試験はすべて, 5 つの担当機関で個別に実施し, 得られた結果を比較検討した. しかし, 個別の試験機関で実施された同一試料の変異原性試験の結果では大きな測定誤差を伴うことが国際共同研究で報告されている (Claxton et al., 1992) ことから, 今回は, 各試験ごとに大気浮遊粒子の抽出物(標準対照試料; DMSO 溶液を褐色アンプルに封入し凍結送付したもの)の変異原性を測定し, その測定値を用いて変異原性試験ごとの各試料の測定値を補正した. 一方, 各試料採取は, これまで検討されてきたさまざまな手法のうち, 各機関で共通にかつ比較的簡易に行える手法を用いた. すなわち, 大気浮遊粒子の採取にはハイボリュームエアサンプラーを用い, 河川水試料はブルーレーヨンを懸垂する方法とし, 土砂の場合は表土を採取して試料とした. また, 変異原性測定用の有機成分の抽出法についても一般に用いられている超音波抽出法とした. なお, 抽出溶媒にはベンゼン-エタノール, ジクロロメタンに換えて健康上影響の少ないと考えられるメタノールを抽出効率等確認のうえ使用した.

### 1) 大気浮遊粒子の変異原性

今回測定された大気浮遊粒子計 100 試料の変異原比活性を Table 1 に示してある. なお, この表には標準対照試料の変異原性測定値を用いて補正した値についても括弧内に示してある. Table 1 から, 今回の大気浮遊粒子試料は TA 100 株および TA 98 株の S9 mix 添加の有無にかかわらず, すべての試料が変異原性を示すことが認められた. 交通量の比較的多いと思われる渋谷区代々木(山手通り)の試料(A 025 や A 027)などが比較的高い値を示すこと, 採取日ごとに大きく変化した値を示す地域や比較的安定した値を示す地域があることなどが認められた. また, 一般に TA 98 株よりも TA 100 株に変異原性が高く現われることや S9 mix を添加しない場合より

も, S9 mix を添加した場合に変異原性が高くなることも認められた. 一方, 近畿の試料では S9 mix 添加条件下で TA 100 株よりも TA 98 株に高い変異原性を与えたり, 九州の試料では TA 98 株の場合に S9 mix 添加時よりも S9 mix 無添加時に高い変異原性を与えるような結果となっており, 地域によって汚染質組成比などが異なることが考えられ, 今後, さらに詳細な調査検討が必要であることが判った.

### 2) 河川水試料の変異原性

今回測定した 105 の河川水試料の変異原比活性データをすべて Table 2 に示してある. また, 大気浮遊粒子から調製した標準対照試料の測定値を用いて補正した変異原比活性についても括弧内に示してある. Table 2 から, 105 試料の河川水試料は, TA 100 株では自然復帰コロニーの 2 倍未満となり陰性となる場合が多いこと, ニトロアレーン類や芳香族アミノ化合物に対して特に高い感受性を示す YG 1024 株では, 逆に, 陽性を示す場合が多くなること, S9 mix を添加しない場合よりも S9 mix を添加した場合に変異原性が高くなることなどが認められた. 一方, 試料採取した河川ごとに変異原活性の大きな差が認められ, 九州の試料では S9 mix 添加条件下で YG 1024 株よりも TA 100 株に高い変異原性を与えたり, 関東の試料では YG 1024 株の場合に S9 mix 添加時よりも S9 mix 無添加時に高い変異原性を与えるような結果も得られ地域や河川ごとに汚染質が異なることが判った. 特に, 西高瀬川(R 065), 日光川(R 041, R 042)などで高い変異原性が認められており, その西高瀬川試料に関しては, その原因物質は PBTA 化合物(PBTA-1; 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)-amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2 *H*-benzotriazole および PBTA-2; 2-[2-(acetylamino)-4-[*N*-(2-cyanoethyl)-ethylamino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2 *H*-benzotriazole)であることが明らかとなっている (Nukaya et al., 1997, Oguri et al., 1998). このように, 変異原性モニタリングと強い変異原性を与える物質の検索などを平行して遂行することが環境汚染防止対策上きわめて重要であると思われる.

### 3) 土砂試料の変異原性

今回測定された土砂 111 試料の変異原比活性等を Table 3 に示してある. なお, この表にも標準対照試料の変異原性測定値を用いて補正した値を ( ) 内に示してある. Table 3 から, 土砂試料は TA 100 株および TA 98 株の S9 mix 添加の有無にかかわらず, 多くの場合に変異原性が認められた. 一般に TA 100 株よりも TA 98 株に変異原性が高く現われ, S9 mix を添加しない場合よりも, S9 mix を添加した場合に変異原性が高くなることなどもうかがわれた. また, 近畿で採取された試料に TA 100 株で変異原性陰性となる場合が比較的多く認め



Table 2 Mutagenic activities of river mater samples

Sample			Mutagenic activity (revertants/g, blue rayon)							
ID	Location	Date	TA100	-S9mix	TA100	+S9mix	YG1024	-S9mix	YG1024	+S9mix
R001	Kotoni 1	961209	ND		ND		226 ( 219 )		ND	
R002	Kotoni 1	961210	ND		ND		ND		ND	
R003	Kotoni 1	961211	ND		ND		412 ( 400 )		1732 ( 3038 )	
R004	Kotoni 1	961212	ND		ND		ND		ND	
R005	Kotoni 2	961209	ND		1888 ( 2148 )		1719 ( 1668 )		43373 ( 76078 )	
R006	Kotoni 2	961210	ND		1579 ( 1796 )		1255 ( 1218 )		35951 ( 63060 )	
R007	Kotoni 2	961211	ND		1292 ( 1470 )		876 ( 850 )		56800 ( 99630 )	
R008	Kotoni 2	961212	ND		1845 ( 2099 )		996 ( 967 )		63745 ( 111812 )	
R009	Sosei	961209	ND		ND		627 ( 609 )		3747 ( 6572 )	
R010	Sosei	961210	ND		494 ( 562 )		435 ( 422 )		2708 ( 4750 )	
R011	Sosei	961211	ND		ND		ND		2875 ( 5043 )	
R012	Sosei	961212	ND		374 ( 425 )		ND		3167 ( 5555 )	
R013	Hassamu	961209	ND		629 ( 715 )		366 ( 355 )		1867 ( 3275 )	
R014	Hassamu	961210	ND		ND		285 ( 277 )		1870 ( 3280 )	
R015	Hassamu	961211	ND		ND		317 ( 308 )		2016 ( 3536 )	
R016	Hassamu	961212	ND		402 ( 457 )		442 ( 429 )		2723 ( 4776 )	
R017	Fuseko	961209	ND		ND		ND		2352 ( 4126 )	
R018	Fuseko	961210	ND		ND		ND		1692 ( 2968 )	
R019	Fuseko	961211	ND		ND		440 ( 427 )		1909 ( 3348 )	
R020	Fuseko	961212	ND		ND		294 ( 285 )		1939 ( 3401 )	
R021	Arakawa	961205	ND		ND		793 ( 504 )		219 ( 145 )	
R022	Sumida 1	961204	334 ( 189 )		ND		1090 ( 693 )		5950 ( 3940 )	
R023	Sumida 2	961204	ND		ND		2320 ( 1476 )		5040 ( 3337 )	
R024	Onagi	961203	ND		ND		788 ( 501 )		ND	
R025	Edo 1	961211	ND		ND		1970 ( 1253 )		634 ( 420 )	
R026	Edo 2	961218	ND		ND		917 ( 583 )		355 ( 235 )	
R027	Edo 3	961221	ND		ND		980 ( 623 )		ND	
R028	Tama 1	961226	ND		ND		2200 ( 1399 )		4630 ( 3066 )	
R029	Tama 2	961226	ND		371 ( 693 )		1940 ( 1234 )		4830 ( 3198 )	
R030	Tama 3	961226	ND		ND		1410 ( 897 )		600 ( 397 )	
R031	Sagami 1	970109	ND		ND		892 ( 567 )		2100 ( 1391 )	
R032	Sagami 2	970109	ND		ND		789 ( 502 )		262 ( 173 )	
R033	Sagami 3	970109	ND		ND		1300 ( 827 )		1600 ( 1060 )	
R034	Tsurumi 1	970116	ND		ND		579 ( 368 )		969 ( 642 )	
R035	Tsurumi 2	970116	ND		ND		1190 ( 757 )		3460 ( 2291 )	
R036	Tsurumi 3	970116	ND		ND		636 ( 405 )		3960 ( 2622 )	
R037	Tone 1	970130	10500 ( 5951 )		4150 ( 7751 )		62600 ( 39820 )		19700 ( 13045 )	
R038	Tone 2	961216	ND		ND		605 ( 385 )		984 ( 652 )	
R039	Tone 3	961216	ND		ND		868 ( 552 )		2050 ( 1357 )	
R040	Tone 4	961221	ND		ND		801 ( 510 )		ND	
R041	Nikko 1	970304	1506 ( 1660 )		4672 ( 4691 )		17100 ( 24155 )		616000 ( 610106 )	
R042	Nikko 1	970401	1636 ( 1803 )		6119 ( 6143 )		12100 ( 17092 )		484000 ( 479369 )	
R043	Nikko 2	970304	718 ( 791 )		1240 ( 1245 )		5420 ( 7656 )		235000 ( 232751 )	
R044	Gojo	970304	ND		ND		929 ( 1312 )		31700 ( 31397 )	
R045	Shinkawa	970304	ND		ND		708 ( 1000 )		18500 ( 18244 )	
R046	Shonai	970304	ND		ND		379 ( 535 )		4050 ( 3994 )	
R047	Yada	970304	ND		ND		383 ( 541 )		7930 ( 7820 )	
R048	Aizuma	970114	ND		ND		609 ( 860 )		4800 ( 4734 )	
R049	Sakai	970114	ND		ND		562 ( 794 )		4550 ( 4487 )	
R050	Toyo	970304	ND		ND		437 ( 617 )		4400 ( 4339 )	
R051	Kiso 1	970304	ND		ND		ND		2490 ( 2456 )	
R052	Kiso 2	970304	ND		ND		ND		1480 ( 1460 )	
R053	Nagara 1	970304	ND		ND		ND		1840 ( 1815 )	
R054	Nagara 2	970304	ND		ND		326 ( 461 )		2840 ( 2801 )	
R055	Ibi 1	970304	ND		ND		ND		827 ( 816 )	
R056	Ibi 2	970304	ND		ND		402 ( 568 )		2010 ( 1982 )	

Table 2 continue

Sample			Mutagenic activity (revertants/g, blue rayon)							
ID	Location	Date	TA100	-S9mix	TA100	+S9mix	YG1024	-S9mix	YG1024	+S9mix
R057	Yahagi 1	970114	ND		ND		ND		2180 ( 2150 )	
R058	Yahagi 2	970114	ND		ND		507 ( 716 )		1540 ( 1519 )	
R059	Yahagifuru	970114	ND		ND		390 ( 551 )		1150 ( 1134 )	
R060	Oto	970114	ND		ND		496 ( 701 )		3690 ( 3639 )	
R061	Aburagafuchi	970114	ND		ND		340 ( 480 )		1630 ( 1607 )	
R062	Katsura 1	970117	ND		ND		794 ( 1101 )		1680 ( 1394 )	
R063	Katsura 2	970117	ND		ND		6640 ( 9207 )		295000 ( 330659 )	
R064	Kamo	970117	ND		ND		2560 ( 3550 )		6240 ( 5176 )	
R065	Nishitakase	970118	981 ( 1417 )		2050 ( 1538 )		22900 ( 31752 )		976000 ( 1093977 )	
R066	Uji 1	961222	ND		ND		3470 ( 4811 )		6720 ( 5574 )	
R067	Uji 2	961222	ND		ND		2190 ( 3037 )		5320 ( 4413 )	
R068	Uji 3	961222	ND		ND		1380 ( 1913 )		4480 ( 3716 )	
R069	Uji 4	961222	ND		ND		4060 ( 5629 )		23600 ( 19577 )	
R070	Uji 5	970304	ND		ND		797 ( 761 )		2460 ( 2899 )	
R071	Kidu 1	970304	ND		ND		1040 ( 993 )		814 ( 959 )	
R072	Kidu 2	970304	ND		ND		695 ( 664 )		1110 ( 1308 )	
R073	Yodo 1	970304	ND		ND		2060 ( 1786 )		11700 ( 14936 )	
R074	Yodo 2	970304	ND		ND		6440 ( 5584 )		8780 ( 11208 )	
R075	Yodo 3	970304	ND		ND		482 ( 418 )		4820 ( 6153 )	
R076	Yodo 4	970304	ND		ND		2370 ( 2055 )		4630 ( 5910 )	
R077	Yasui	970304	ND		3950 ( 4976 )		946 ( 820 )		986 ( 1259 )	
R078	Kanzaki 1	970304	ND		ND		2230 ( 2130 )		4360 ( 5138 )	
R079	Kanzaki 2	970304	ND		ND		1200 ( 1146 )		7070 ( 8331 )	
R080	Kanzaki 3	970304	ND		ND		1810 ( 1729 )		11300 ( 13315 )	
R081	Dojima	970304	ND		2510 ( 3162 )		1030 ( 893 )		18200 ( 23233 )	
R082	Yamato 1	970104	ND		ND		1380 ( 1141 )		6030 ( 6759 )	
R083	Yamato 2	970104	ND		ND		2010 ( 1661 )		3660 ( 4102 )	
R084	Yamato 3	970104	ND		ND		4060 ( 3356 )		6810 ( 7633 )	
R085	Yamato 4	970104	ND		ND		1460 ( 1207 )		8390 ( 9404 )	
R086	Tatara 1	970313	ND		ND		ND		ND	
R087	Tatara 2	970313	ND		ND		ND		ND	
R088	Tatara 3	970313	ND		ND		862 ( 1544 )		ND	
R089	Tatara 4	970313	ND		ND		1068 ( 1913 )		ND	
R090	Naka 1	970313	ND		ND		543 ( 972 )		ND	
R091	Naka 2	970313	ND		ND		ND		ND	
R092	Mikasa 1	970318	ND		ND		ND		ND	
R093	Mikasa 2	970318	ND		ND		ND		4265 ( 3657 )	
R094	Mikasa 3	970318	ND		ND		ND		4876 ( 4181 )	
R095	Mikasa 4	970318	ND		ND		ND		2764 ( 2370 )	
R096	Mikasa 5	970318	ND		ND		ND		3053 ( 2618 )	
R097	Mikasa 6	970318	ND		ND		ND		ND	
R098	Hae 1	970320	ND		ND		ND		ND	
R099	Hae 2	970320	ND		ND		ND		ND	
R100	Doumen 1	970320	ND		ND		ND		ND	
R101	Doumen 2	970320	ND		ND		ND		ND	
R102	Ohmuta 1	970320	ND		ND		ND		ND	
R103	Ohmuta 2	970320	5664 ( 6084 )		2799 ( 3280 )		2565 ( 4594 )		6910 ( 5925 )	
R104	Siragane 1	970320	ND		ND		ND		ND	
R105	Siragane 2	970320	ND		ND		ND		ND	

ND: negative data

Numbers in parenthesis indicates the values which are normalized with standard air extract sample.



Table 3 Mutagenic activities of soil samples

Sample			Mutagenic activity (revertants / g, soil)							
ID	Location	Date	TA100	-S9mix	TA100	+S9mix	TA98	-S9mix	TA98	+S9mix
S001	Sapporo 1	961206	383	( 350 )	2092	( 2774 )	360	( 428 )	582	( 713 )
S002	Sapporo 2	961124	594	( 542 )	1793	( 2378 )	606	( 720 )	825	( 1011 )
S003	Sapporo 3	961207	414	( 378 )	1641	( 2176 )	381	( 453 )	502	( 615 )
S004	Sapporo 4	961124	225	( 205 )	732	( 971 )	214	( 254 )	306	( 375 )
S005	Sapporo 5	961123	516	( 471 )	752	( 997 )	512	( 608 )	664	( 814 )
S006	Sapporo 6	961124	320	( 292 )	357	( 473 )	214	( 254 )	582	( 713 )
S007	Sapporo 7	961123	772	( 705 )	912	( 1209 )	912	( 1084 )	1076	( 1318 )
S008	Sapporo 8	961207	508	( 464 )	448	( 594 )	472	( 561 )	615	( 754 )
S009	Muroran 1	961205	424	( 387 )	700	( 928 )	194	( 231 )	428	( 524 )
S010	Muroran 2	961205	876	( 800 )	2420	( 3209 )	404	( 480 )	1368	( 1676 )
S011	Muroran 3	961205	558	( 509 )	5259	( 6974 )	366	( 435 )	2135	( 2616 )
S012	Muroran 4	961205	616	( 562 )	2676	( 3549 )	624	( 742 )	2400	( 2941 )
S013	Muroran 5	961205	560	( 511 )	6360	( 8435 )	372	( 442 )	1952	( 2392 )
S014	Muroran 6	961205	286	( 261 )	294	( 390 )	130	( 154 )	135	( 165 )
S015	Asahikawa 1	961102	265	( 242 )	741	( 983 )	206	( 245 )	336	( 412 )
S016	Asahikawa 2	961102	668	( 610 )	968	( 1284 )	488	( 580 )	704	( 863 )
S017	Asahikawa 3	961212	790	( 721 )	2054	( 2724 )	454	( 540 )	570	( 698 )
S018	Asahikawa 4	961212	177	( 162 )	726	( 963 )	129	( 153 )	132	( 162 )
S019	Asahikawa 5	961212	219	( 200 )	772	( 1024 )	191	( 227 )	186	( 228 )
S020	Kushiro 1	961202	261	( 238 )	648	( 859 )	170	( 202 )	194	( 238 )
S021	Kushiro 2	961202	240	( 219 )	336	( 446 )	212	( 252 )	210	( 257 )
S022	Kushiro 3	961202	265	( 242 )	350	( 464 )	177	( 210 )	285	( 349 )
S023	Kushiro 4	961202	239	( 218 )	414	( 549 )	114	( 135 )	254	( 311 )
S024	Kushiro 5	961202	120	( 110 )	370	( 491 )	159	( 189 )	154	( 189 )
S025	Tokyo 1	961226	937	( 552 )	735	( 1154 )	1240	( 824 )	885	( 1379 )
S026	Tokyo 2	961126	252	( 148 )	281	( 441 )	324	( 215 )	335	( 522 )
S027	Tokyo 3	961210	242	( 143 )	501	( 786 )	596	( 396 )	648	( 1010 )
S028	Tokyo 4	970118	743	( 438 )	300	( 471 )	508	( 338 )	588	( 916 )
S029	Tokyo 5	961227	279	( 164 )	581	( 912 )	425	( 282 )	528	( 823 )
S030	Tokyo 6	961129	198	( 117 )	357	( 560 )	282	( 187 )	445	( 694 )
S031	Tokyo 7	970116	1800	( 1061 )	1390	( 2182 )	2310	( 1535 )	1300	( 2026 )
S032	Tokyo 8	961225	372	( 219 )	227	( 356 )	303	( 201 )	435	( 678 )
S033	Higashikurume	961209	316	( 186 )	383	( 601 )	137	( 91 )	318	( 496 )
S034	Kawasaki	961226	732	( 431 )	496	( 778 )	315	( 209 )	431	( 672 )
S035	Yokohama 1	961227	428	( 252 )	727	( 1141 )	345	( 229 )	403	( 628 )
S036	Yokohama 2	961203	539	( 318 )	989	( 1552 )	1060	( 704 )	1310	( 2042 )
S037	Yokohama 3	961215	141	( 83 )	477	( 749 )	204	( 136 )	252	( 393 )
S038	Ebina	970109	693	( 408 )	251	( 394 )	243	( 161 )	347	( 541 )
S039	Warabi	970105	511	( 301 )	568	( 891 )	440	( 292 )	755	( 1177 )
S040	Omiya	970116	587	( 346 )	1300	( 2040 )	934	( 621 )	995	( 1551 )
S041	Kumagaya	961208	389	( 229 )	598	( 939 )	395	( 263 )	383	( 597 )
S042	Funabashi	961128	268	( 158 )	484	( 760 )	184	( 122 )	247	( 385 )
S043	Tsukuba	961213	574	( 338 )	445	( 698 )	468	( 311 )	444	( 692 )
S044	Maebashi	970104	84	( 49 )	391	( 614 )	195	( 130 )	310	( 483 )
S045	Nagoya 1	961209	29	( 19 )	80	( 82 )	139	( 173 )	261	( 279 )
S046	Nagoya 2	961209	151	( 98 )	154	( 158 )	61	( 76 )	363	( 387 )
S047	Nagoya 3	970305	285	( 230 )	226	( 231 )	213	( 201 )	237	( 253 )
S048	Nagoya 4	970305	613	( 494 )	607	( 621 )	629	( 595 )	949	( 1013 )
S049	Nagoya 5	961209	240	( 156 )	339	( 347 )	168	( 209 )	493	( 526 )
S050	Nagoya 6	970305	223	( 180 )	340	( 348 )	275	( 260 )	645	( 688 )
S051	Ogaki 1	970305	149	( 120 )	69	( 71 )	56	( 53 )	93	( 99 )
S052	Ogaki 2	970305	603	( 486 )	445	( 455 )	347	( 328 )	560	( 598 )
S053	Ogaki 3	970305	861	( 694 )	875	( 895 )	341	( 322 )	1060	( 1131 )
S054	Okazaki 1	970115	181	( 118 )	148	( 151 )	461	( 572 )	316	( 337 )
S055	Okazaki 2	961209	587	( 381 )	635	( 650 )	180	( 223 )	648	( 692 )
S056	Okazaki 3	970308	319	( 257 )	619	( 633 )	376	( 355 )	587	( 627 )

Table 3 continue

Sample			Mutagenic activity (revertants / g, soil)							
ID	Location	Date	TA100	-S9mix	TA100	+S9mix	TA98	-S9mix	TA98	+S9mix
S057	Hekinan 1	970115	139	( 90 )	147	( 150 )	168	( 209 )	136	( 145 )
S058	Hekinan 2	970305	4600	( 3709 )	6720	( 6876 )	26300	( 24860 )	10400	( 11101 )
S059	Ichinomiya 1	970115	389	( 314 )	539	( 552 )	477	( 451 )	805	( 859 )
S060	Ichinomiya 2	970305	408	( 329 )	424	( 434 )	373	( 353 )	665	( 710 )
S061	Nakatsugawa 1	970119	91	( 59 )	63	( 64 )	141	( 175 )	159	( 170 )
S062	Nakatsugawa 2	970119	248	( 161 )	224	( 229 )	147	( 183 )	408	( 436 )
S063	Shinshiro 1	970115	117	( 76 )	144	( 147 )	256	( 318 )	253	( 270 )
S064	Shinshiro 2	970330	239	( 193 )	299	( 306 )	440	( 416 )	597	( 637 )
S065	Toyohashi 1	970330	64	( 52 )	123	( 126 )	357	( 337 )	325	( 347 )
S066	Toyohashi 2	970115	159	( 103 )	132	( 135 )	117	( 145 )	304	( 324 )
S067	Inasa	970115	147	( 96 )	467	( 478 )	220	( 273 )	312	( 333 )
S068	Kariya	970115	232	( 151 )	320	( 327 )	379	( 471 )	445	( 475 )
S069	Kaizu	970305	385	( 310 )	301	( 308 )	339	( 320 )	608	( 649 )
S070	Moriyama	961215	ND		47	( 44 )	46	( 63 )	98	( 121 )
S071	Kusatsu	970207	ND		ND	( 0 )	66	( 94 )	101	( 88 )
S072	Otsu 1	961215	ND		120	( 72 )	256	( 363 )	629	( 546 )
S073	Otsu 2	961117	ND		69	( 65 )	52	( 71 )	92	( 114 )
S074	Kyoto 1	961117	ND		ND		ND		83	( 103 )
S075	Kyoto 2	961216	ND		55	( 52 )	87	( 119 )	173	( 214 )
S076	Gosho	961117	ND		ND		98	( 139 )	260	( 226 )
S077	Nara	961215	ND		ND		ND		34	( 32 )
S078	Minomo	970206	51	( 83 )	ND		84	( 172 )	95	( 89 )
S079	Ibaraki	970130	92	( 150 )	132	( 106 )	64	( 131 )	138	( 129 )
S080	Takatsuki	970130	86	( 157 )	201	( 311 )	325	( 365 )	830	( 611 )
S081	Osaka 1	961216	585	( 951 )	2672	( 2136 )	6735	( 13776 )	6515	( 6071 )
S082	Osaka 2	970130	527	( 962 )	2397	( 1916 )	5963	( 12197 )	4255	( 3965 )
S083	Osaka 3	970130	ND		141	( 218 )	225	( 253 )	702	( 517 )
S084	Takarazuka	961215	ND		ND		ND		32	( 30 )
S085	Ashiya	970130	ND		153	( 237 )	103	( 116 )	272	( 200 )
S086	Nishinomiya	970130	144	( 263 )	745	( 1154 )	1532	( 1722 )	3965	( 2919 )
S087	Amagasaki	970130	ND		284	( 440 )	380	( 427 )	884	( 651 )
S089	Kobe 1	970130	720	( 1314 )	3275	( 2618 )	10167	( 20797 )	4302	( 4009 )
S090	Kobe 2	970130	82	( 150 )	67	( 104 )	162	( 182 )	552	( 406 )
S091	Kitakyushu 1	970217	155	( 185 )	470	( 518 )	370	( 352 )	419	( 259 )
S092	Kitakyushu 2	970217	367	( 439 )	598	( 659 )	581	( 553 )	726	( 449 )
S093	Dazaifu 1	970217	127	( 152 )	509	( 561 )	331	( 315 )	600	( 371 )
S094	Dazaifu 2	970217	111	( 133 )	251	( 277 )	176	( 168 )	287	( 177 )
S095	Hie 1	970217	308	( 368 )	457	( 504 )	381	( 363 )	571	( 353 )
S096	Hie 2	970217	153	( 183 )	486	( 536 )	330	( 314 )	388	( 240 )
S097	Shimonoharu 1	970217	111	( 133 )	480	( 529 )	224	( 213 )	458	( 283 )
S098	Shimonoharu 2	970217	205	( 245 )	436	( 481 )	348	( 331 )	449	( 277 )
S099	Kurume 1	970210	169	( 202 )	519	( 572 )	349	( 332 )	598	( 370 )
S100	Kurume 2	970210	118	( 141 )	327	( 360 )	284	( 271 )	308	( 190 )
S101	Kurume 3	970210	36	( 43 )	159	( 175 )	84	( 80 )	252	( 156 )
S102	Yame 1	970210	346	( 413 )	476	( 525 )	409	( 390 )	645	( 399 )
S103	Yame 2	970210	276	( 330 )	485	( 535 )	272	( 259 )	595	( 368 )
S104	Tosu 1	970217	198	( 237 )	537	( 592 )	421	( 401 )	982	( 607 )
S105	Tosu 2	970217	308	( 368 )	663	( 731 )	393	( 374 )	621	( 384 )
S106	Ohmuta 1	970210	302	( 361 )	517	( 570 )	417	( 397 )	661	( 408 )
S107	Ohmuta 2	970210	586	( 700 )	806	( 888 )	782	( 745 )	1405	( 868 )
S108	Ohmuta 3	970210	481	( 575 )	686	( 756 )	648	( 617 )	1491	( 921 )
S109	Ohmuta 4	970210	435	( 520 )	657	( 724 )	549	( 523 )	922	( 570 )
S110	Ohmuta 5	970210	639	( 764 )	554	( 611 )	666	( 634 )	669	( 413 )
S111	Ohmuta 6	970210	330	( 394 )	662	( 730 )	412	( 392 )	792	( 489 )

ND: negative data

Numbers in parenthesis indicates the values which are normalized with standard air extract sample.

Tokyo 1: Minato-ku, Tokyo 2: Shibuya-ku, Tokyo 3: Bunkyo-ku, Tokyo 4: Taito-ku, Tokyo 5: Meguro-ku, Tokyo 6: Ota-ku, Tokyo 7: Kita-ku,

Tokyo 8: Edogawa-ku, Yokohama 1: Kohoku-ku, Yokohama 2: Minami-ku, Yokohama 3: Kanazawa-ku

Nagoya 1: Midori-ku, Nagoya 2: Moriyama-ku, Nagoya 3: Kita-ku 1, Nagoya 4: Kita-ku 2, Nagoya 5: Mizuho-ku, Nagoya 6: Naka-ku

Otsu 1: Konan, Otsu 2: Kosei, Kyoto 1: Yamashina-ku



られた。しかし、北海道の試料ではS9 mix 添加条件下でTA 98 株よりもTA 100 株に高い変異原性を与えたり、中部および近畿の試料(S 058, S 089)ではTA 98 株の場合にS9 mix 添加時よりもS9 mix 無添加時に高い変異原性を与えるような結果も得られ、河川水試料の場合と同様に地域や採取地点によって汚染質が大きく異なることなどがうかがわれた。これらの結果をふまえて、高い変異原性を与えた土砂試料について主要変異原性物質を検索した結果、ジニトロピレン類が検出されている(Watanabe et al. 1998, 1999)。また現在、これらの変異原性物質の土砂中濃度と土砂試料の変異原性測定を平行して実施している(Watanabe et al. 2000)。

## 結 語

今回の調査で得られた主な結果は次の通りとなっている。

1) 大気浮遊粒子は、TA 100 およびTA 98 の両菌株でS9 mix 添加の有無にかかわらずすべての変異原性を示したが、日変動はあるものの、その地域差は河川試料や土砂試料の場合と較べて大きくなかった。また、交通量が多い地域の試料に比較的高い変異原性が認められた。

2) 河川水試料はTA 100 株ではあまり高い変異原比活性は得られなかったが、ニトロアレーン類や芳香族アミノ化合物に対して特に高い感受性を示すYG 1024 株で高い変異原比活性が得られた。採取地点により変異原活性が異なるなど試料による差が大きく、特に西高瀬川(R 065)、日光川(R 041, R 042)などで強い変異原性が認められた。

3) 土砂の場合は、近畿地方の試料を除いて、S9 mix 添加の有無にかかわらず、TA 100 およびTA 98 の両菌株に対し、そのほとんどの試料が変異原性を示したが、試料によって変異原性の強さやパターンに差がみられた。また、中部、近畿地方で採取した土砂の一部に強い変異原性が認められた。

今回の調査から、環境汚染の評価およびその対策には各種環境試料の変異原性モニタリングやその主要変異原性物質の検索を並行して実施していくことが重要であることが考えられた。また、本検討に用いた手法の有効性評価、YG 菌株から得られたデータの評価、変異原性物質検索や汚染要因調査などについてさらに継続して検討を加える必要があることも明らかとなった。

## 謝 辞

本研究は環境庁委託研究費により実施された。関係各位に感謝の意を表します。

## 参 考 文 献

- Claxton, L. D., J. Creason, B. Leroux, E. Agurell, S. Bagley, D. W. Bryant, Y. A. Courtois, G. Douglas, C. B. Clare, S. Goto, P. Quillardet, D. R. Jagannath, K. Kataoka, G. Mohn, P. A. Nielsen, T. Ong, T. C. Pederson, H. Shimizu, L. Nylund, H. Tokiwa, G. J. Vink, Y. Wang and D. Warshawsky (1992) Results of the IPCS collaborative study on complex mixture, *Mutat. Res.*, 276, 23-32.
- Matsushita, H., O. Endo, S. Goto, H. Shimizu, H. Matsumoto, K. Tamakawa, T. Endo, Y. Sakabe, H. Tokiwa and M. Ando (1992) Collaborative study using preincubation *Salmonella typhimurium* mutation assay for airborne particulate matter in Japan. A trial to minimize interlaboratory variation, *Mutat. Res.*, 271, 1-12.
- 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: 228-236.
- 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.
- 坂本 博, 早津彦哉(1990) ブルーレーヨンをういた河川水の変異原性モニタリング法, 一淀川水系中の変異原物質について一, 環境変異原研究, 12: 41-45.
- Watanabe, M., M. Ishidate, Jr. and T. Nohmi (1990) Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains processing elevated O-acetyl-transferase levels, *Mutation Res.*, 234, 337-348.
- 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) High-performance liquid chromatography-fluorescence determination of dinitropyrenes in soil after column chromatographic clean-up and on-line reduction, *J. Chromatogr.*, A 839, 41-48.
- Watanabe, T., S. Goto, Y. Matsumoto, M. Asanoma, T. Hirayama, N. Sera, Y. Takahashi, O. Endo, S. Sakai and K. Wakabayashi (2000) Mutagenic activity of surface soil and quantification of 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene isomers in soil in Japan, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 281-286.
- Yahagi, Y., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines of Salmonella, *Mutat. Res.*, 48, 121-130.

Environ. Mutagen Res., 22: 55 - 60(2000)

学術賞 受賞講演

## 食品中変異原・癌原物質の発見と発がん機構の分子生物学

長尾 美奈子

東京農業大学応用生物科学部 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

平成11年12月1日、栄えある日本環境変異原学会学術賞を岐阜市長良川国際会議場で頂きました。有難うございました。将来、日本環境変異原学会で活躍される多くの若い研究者は、ヘテロサイクリックアミンの研究全体を聞く機会は殆どなかったことと思います。実はこの研究は私の研究歴とともにあるもので、25年に及ぶヘテロサイクリックアミン研究を、この機会をお借りして、発見の経緯なども含めて、また最近の進歩を含めてご紹介します。

Ames試験の初期に用いられたTA 1535シリーズのサルモネラ菌は、日本で用いられていた食品添加物AF2の変異原性を検出できず、pKM 101の導入によるTA 100シリーズの開発を促しました。さらに、Amesの原法にプレインキュベーション法の改良を加え、サルモネラテストは変異原検出系として確立されました。また、発がん性との相関に関しても、われわれの研究室で約240の化合物について調べた結果、sensitivity, specificity いずれも非常に高いものでした。次は、Ames法の応用です。

われわれの研究目的は、ヒトがんの原因物質を見つけることでした。西洋の研究の主流が合成化学物質を対象にしたのに対し、普通のヒトの日常生活にその原因を求めた点がわれわれの研究の特徴といえます。当時、生化学部長であられた杉村隆先生の、西洋人の大腸がんや日本人の胃がん誘発物質はきわめて日常的な食品ではないか、という考えの下に、食品の変異原性を検討しました。用いた方法は思いつく食品のメタノール抽出物を調製し、その変異原性を調べるというきわめて簡単なものでした。

変異原物質は焼肉および焼き魚(Nagao et al., 1977 a, b), 野菜(Takahashi et al., 1979), コーヒー(Nagao et al., 1984), 醤油(Ochiai et al., 1984)などに見つかり、

それぞれヘテロサイクリックアミン、フラボノイド、メチルグリオキサールと過酸化水素の相乗作用、チラミンやインドール化合物等のニトロソ化前駆体(Wakabayashi et al., 1983), 等々を変異原として明らかにしました。加熱食品中のヘテロサイクリックアミン量はきわめて少なく、また、新規化合物でもあり、多くの方々との共同研究で構造が決定されました(Sugimura et al., 1977; Kasai et al., 1980)。主なヘテロサイクリックアミンの構造、変異原性をTable 1に示します。いずれも、S9 mixを必要とします。最も変異原性の強いMeIQと最も弱いAαCの間では、単位重量当たりの活性に3,300倍の差があります。ヘテロサイクリックアミンという共通の構造を持ちながら、変異原性にこのような差があるのは大変興味深く思います。

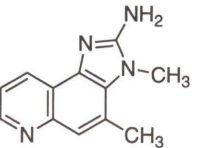
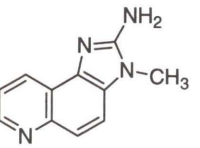
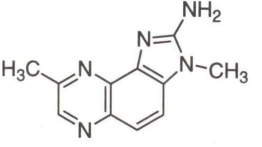
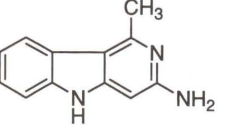
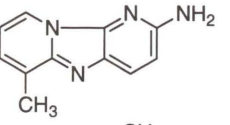
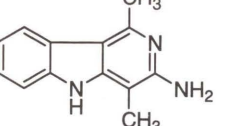
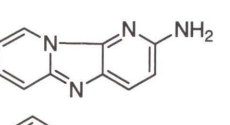
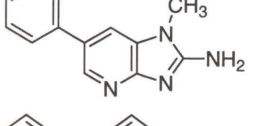
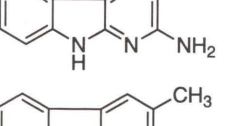
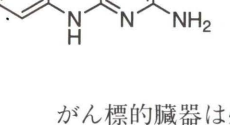
上記、種々の食品中変異原物質の発がん性は、多くの共同研究者の協力を得まして、1つずつ明らかにされました。その結果、発がん性の強さから最も注目をあびたのがヘテロサイクリックアミンでした。これまでにTable 1に示しました10種のヘテロサイクリックアミンの発がん性が検討されました。大変興味深いことは、これらわれわれが日常摂取しているヘテロサイクリックアミンの発がん標的臓器が、乳腺、大腸、皮膚、前立腺、肝、膀胱、前胃、血管内皮、肺、造血器官など多岐にわたることです。しかも、その標的臓器に種差、系統差、性差がみられました。加熱肉食品中に最も多いPhIPはF 344雄ラットに大腸がん、前立腺がん、リンパ腫を誘発しますが、マウスでは大腸発がん感受性の高いC 57 BL/6 Jを用いても大腸がんは誘発されずリンパ腫、小腸腫瘍が誘発されたのみです。SDおよびF 344雌ラットには乳がんを誘発しますが、乳がん感受性の高いBalb/cマウスには誘発できないことが判りました(Ochiai et al., in preparation)。また、MeIQはCDF 1マウスには、前胃がんを誘発せず、大腸がん、肝がんを誘発します(Fujita et al., 1999)。これら種差、系統差に関わる因子の解明が、発がん機構解明における重要な手が

受付: 2000年4月23日 受理: 2000年5月8日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会において発表された1999年度学術賞受賞講演である。  
This paper is the lecture of the JEMS Award (1999) presented at the 28th JEMS annual meeting, 1999.



Table 1 Mutagenicities of typical heterocyclic amines and their structures

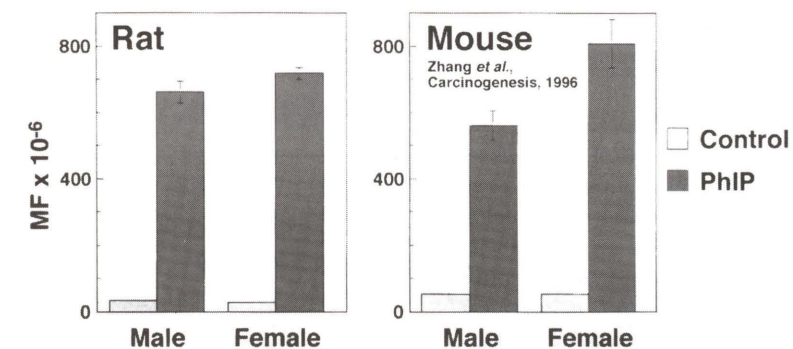
		Revertants/ $\mu$ g	
		TA98	TA100
2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline MeIQ		661,000	30,000
2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline IQ		433,000	7,000
2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline MeIQx		145,000	14,000
3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole Trp-P-2		104,200	1,800
2-amino-6-methyldipyrdo[1,2-a:3',2'-d]imidazole Glu-P-1		49,000	3,200
3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole Trp-P-1		39,000	1,700
2-aminodipyrdo[1,2-a:3',2'-d]imidazole Glu-P-2		1,900	1,200
2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine PhIP		1,800	120
2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole AαC		300	20
2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole MeAαC		200	120

かりになると思われます。

まず第一歩として、標的臓器の差は DNA 付加体レベルの差, *in vivo* 突然変異率の差で説明できるのかについて検討しました。<sup>32</sup>P-ポストラベル法を改良し、1 種類の付加体を TLC 上で 1 つのスポットとして得られるようにしました (Fukutome et al., 1994; Tada et al., 1994, Ochiai et al., 1999)。この改良により、検出感度も  $10^{-10}$  に上昇しました。各臓器における付加体レベルはヘテロサイクリックアミンの投与量に対して直線的に比例することを明らかにし (Yamashita et al., 1990)、また、発

がん標的臓器は必ずしも付加体レベルで決定されているのではないことを明らかにしました (Takayama et al., 1989)。PhIP は雌雄のラットの大腸粘膜に同じレベルの DNA 付加体を生成します (Ochiai et al., 1996)。勿論、遺伝毒性を示す発がん物質は、DNA 付加体を生成することが発がん過程の第一歩であることには相違はありません。PhIP は肝臓にはきわめて低いレベルの付加体しか作りませんので、肝発がん性を示さない理由はそのにあると考えています。

付加体形成後、DNA 複製に伴いそれが突然変異とし

Fig. 1 *LacI* Mutant Frequencies in the Colon of BBR and BBM Administered with PhIPTable 2 Mutational characteristics of MeIQ and IQ in the *ras* gene

MeIQ					
Mouse forestomach tumor	Ha- <i>ras</i>	codon 13	GGC→GTC	22	22/64
Rat Zymbal gland tumor		codon 12	GGA→GAA	1	11/14
			GGA→GTA	1	
		codon 13	GGC→GTC	9	
IQ					
Rat Zymbal gland tumor	Ha- <i>ras</i>	codon 12	GGA→GAA	4	21/24
		13	GGC→CGC	4	
			GGC→GTA	2	
		61	CAA→AAA	4	
			CAA→CTA	1	
	Ki- <i>ras</i>	codon 12	GGT→TGT	3	
			GGT→GAT	2	
		13	GGC→CGC	1	

Nagao et al., 1997

て固定されることが発がんの過程で重要と考えられます。そこで次に、Big Blue マウスおよびラットを用いて突然変異体頻度と発がん標的臓器との関係を調べました。C 57 BL/Big Blue マウスに MeIQ を投与し、各臓器における突然変異頻度 (餌中 300 ppm 60 日投与) と発がん率 (同じ餌を 92 週の実験終了時まで投与) を比較しますと、これら両者には直接的な相関関係はないことが明らかになりました (Nagao et al., 1998; Nagao, 1999)。*In vivo* における突然変体の生成には、幹細胞の回転キネティックスを考慮する必要があります。例えばマウスの大腸粘膜陰窩の幹細胞に生じた突然変異は、1 週間で 200~300 倍に増加することが想像されます。一方、肝臓では、前癌病変の場合は別ですが、増殖はきわめてゆっくりであると推定されます。がん細胞は幹細胞の突然変異によって生ずると考えられますが、突然変異体率と幹細胞変異率の関係は各臓器、各組織により異なることが、突然変異体率と発がん率に相関がない理由の 1 つに考えられます。さらに、正常細胞ががん化するのには、複数のがん関連遺伝子の変異を必要とし、その数は臓器、組織によって異なることが判っています。このことが第 2 の理由です。それでは、同じ臓器間で比較した場合には相関があるかということになります。そこで、

PhIP 投与 Big Blue F 344 ラットの雌雄の大腸粘膜における突然変異率を比較しますと何ら差が見つかりません (Okonogi et al., 1997 a) (Fig. 1)。発がんの過程には多くの step があり、種々な因子により発がん過程が修飾されているというのが、第 3 の理由です (Nagao and Sugimura, 1998)。*Mom-1* もその 1 つですが、この場合には性ホルモンの関与が去勢実験により示唆されています。*In vivo* 突然変異活性を化学物質の安全性評価に用いる場合、上記事実を十分考慮する必要があります。

次に、突然変異スペクトルに関するわれわれの研究を紹介致します。アフラトキシン B 1 が *p53* 癌抑制遺伝子のコドン 249 の第 3 位に G→T 変異の *finger print* を残すことは周知のことです。ヘテロサイクリックアミンも特異的変異を誘発することを期待しまして、まず腫瘍における癌遺伝子、癌抑制遺伝子変異について検討しました。

前胃や Zymbal 腺の扁平上皮癌では *Ha-ras* の活性化がしばしばみられます。MeIQ で誘発されたマウス前胃扁平上皮癌における *Ha-ras* の変異は 22/64 で検出されましたが、全例でコドン 13 の 2 位に G→T 変異が誘発されていました。ラット Zymbal 腺扁平上皮癌でも同様に 11/14 に *Ha-ras* 陽性が検出され、9 例という高率で



Table 3 Characteristic mutations in the *Apc* gene of the colon tumors induced by PhIP and IQ

Tumor	Mutation		Allele loss
	Codon	Change	
PhIP-2-1	635	GGGA→GGA	+
PhIP-13	635	GGGA→GGA	—
PhIP-17	1413	GGGA→GGA	—
PhIP-18-4	869	GGGA→GGA	—
	1413	GGGA→GGA	—
IQ-3-1	523	T→C	+
IQ-I-2-2	921	C→T	+

Kakiuchi et al., 1995

同じ変異が検出されています。一方、IQで誘発された Zymbal 腺上皮癌 21/24 で *ras* の活性化がみられましたが、Table 2 に示すように、種々のタイプの、MeIQ とは異なる変異が誘発されていました。以上のことから、Ha-*ras* コドン 13 の G→T は MeIQ に特異的であるといえます。これまで報告されている種々の発がん物質による *ras* 変異のうち、メチルコラントレンが MeIQ と同じタイプの変異を誘発することが判っていますが、かなり特異性の高い変異であるということが出来ます。しかし、*ras* がん遺伝子は、その活性化の標的になる配列はごく限られており、自ずと化合物特異性は発現し難く、変異誘発原因物質の推定には限界があると思われます。特異的変異、即ち signature mutation の検索には、機能獲得を必要とするがん遺伝子より、機能喪失を要するがん抑制遺伝子の方が、標的となる配列は広範であり適切であると考えました。

ヘテロサイクリックアミン誘発腫瘍における、がん抑制遺伝子 *p53* 変異を検討しました。その変異は、悪性度の高いがんに限ってしか検出されず、特異的変異に関する手がかりを得られませんでした(Nagao et al., 1997)。そこでさらに PhIP 誘発大腸がんにおける *Apc* 変異を検討しました。*Apc* 遺伝子は cDNA 全長が 8 kb に及ぶエクソン 15 からなる遺伝子であり、われわれが変異探しを始めた時はまだラットの *Apc* 配列は報告されておられませんでしたが、エクソン 14 まではイントロンの配列を決め、擬似遺伝子を PCR で増幅しないよう注意しましたが、エクソン 15 は 6 kb あり、エクソン中に primer を設定せざるを得ませんでした。幸いなことに擬似遺伝子に悩まされることはありませんでした。実に力仕事でした。しかし、得られた結果は大変興味深いものでした。Table 3 に示すように PhIP 誘発大腸癌 4/8 に *Apc* 変異が検出され、そのうち 1 例では 2 つの変異が検出されました。しかも、全 5 例の変異は GGGA→GGA でした。一方、IQ で誘発した大腸腫瘍では 2/13 に変異が検出され、しかも 2 種の異なる塩基置換型変異でした。以上の結果は、GGGA からの G の欠失は PhIP の signature

mutation として使える可能性を示唆しました。

Signature mutation の確認には Big Blue 動物が優れていると考えました。Heddle 博士らが Big Blue マウス大腸粘膜に対する PhIP の変異原性を Mutation Research に報告したので、早速共同研究を申し込み、われわれの持っていた MeIQ 誘発変異体とともに、変異パターンの解析をさせて頂きました。それぞれ約 100 個の変異体について解析した結果、G→T の塩基置換型変異が最も高頻度であり、GGGA から G の欠失は PhIP 処理群で 7 % にみられました(Okonogi et al., 1997 b)。それに対し、MeIQ 処理群では 1 % に、AαC 処理群には全く検出されませんでした。さらに Big Blue ラットの大腸粘膜、および乳腺にもこの特異的変異はそれぞれ 8 % および 6 % に認められました(Okonogi et al., 1997 a ; Okochi et al., 1999)。この変異は、国内外の研究者らにより、ヒト繊維芽細胞を含むいろいろな系で誘発されること、その後確認されています(Okochi et al., 1999 ; Nagao, 1999)。一方、ベンゾピレン、アセチルアミノフルオレン、ジメチルニトロソアミン、アフラトキシン B1 ではこのような変異誘発は検出されていません。そこで、一応 PhIP の signature mutation であるとし、ヒト発がんにおける PhIP の関与を *p53* 変異パターンから推定してみました。ヒト腫瘍における *p53* の体細胞変異はすでに 9959 例について database 上で利用できます(Caron de Fromentel and Soussi, 1992)。そのうち 33 例(0.33 %)が PhIP の signature mutation と同じ型の変異をもっていました。PhIP はいろいろの変異を誘発し、また、*p53* は塩基置換や欠失などいろいろな変異により不活性化されます。PhIP 誘発変異のうち 3-10 % が GGGA から G の欠失だったわけですから、*p53* 変異の 3.3-11 % が PhIP 誘発変異という計算になります(Nagao, 1999 ; Okochi et al., 1999)。*p53* 遺伝子はヒト癌の約 50 % で変異していますので、PhIP はヒト発がんに大きな役割を果たしていることになります。しかし、この PhIP signature mutation が果たして PhIP のみによって誘発されるのか問題が残ります。8 ohdG が

GGG 配列に生じると G の欠失が起こることが最近判ってきました。酸化的 DNA 傷害は今後さらに詳しく検討されなければならない問題と考えております(Kawanishi et al., 1999)。

ところで、発がんの過程にはゲノム不安定性が重要な役割を果たしていることが L. Loeb により提唱されました(1996 ; Loeb and Loeb, 2000)。事実、殆どの腫瘍で、mismatch repair 酵素の異常、染色体不安定性などが観察されています。*p53* はゲノムを安定に保つのに重要な役割を果たしています。ヘテロサイクリックアミン誘発腫瘍におけるゲノム不安定性について、大変興味があります。PhIP 誘発大腸がん、乳がんの大多数においてマイクロサテライト配列が変異していることが判りました。しかし、その頻度が低いこと、また動物が実験期間中絶えず PhIP に曝されていることを考えますと、PhIP がマイクロサテライト配列に直接結合して誘発された変異である可能性も考えられます。そこで PhIP 誘発乳がんから培養細胞系を確立しました。クローニングした後、細胞を増殖させ、その間に変異が誘発されるかを調べますと、正常乳腺上皮細胞の 10 倍の頻度で塩基置換型の変異が誘発されており、しかも変異様式も異なっていました。ヘテロサイクリックアミン誘発腫瘍でも、ゲノム不安定性が重要な役割を果たしていることが示唆されました。ゲノム不安定化の分子機構、および発がんまたは悪性化における役割については今後の課題です。この研究は現在、国立がんセンター発がん研究部で引き続き行われています。

最後に、最近、ヘテロサイクリックアミンに関する研究が世界的に増えてきたことを大変嬉しく思っています。

発がん物質の発見から、誘発される腫瘍の分子機構まで研究する機会が与えられたことに深く感謝しています。また、ご指導ご協力下さった先生方、本研究をともに行って下さった発がん研究部の方々に深謝致します。

# 参考文献

- Caron de Fromentel C. and T. Soussi (1992) TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis, Genes Chromosomes Cancer, 4, 1-15.
- Fujita, H., K. Nagano, M. Ochiai, T. Ushijima, T. Sugimura, M. Nagao and T. Matsushima (1999) Difference in target organs in carcinogenesis with a heterocyclic amine, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline, in different strains of mice, Jpn. J. Cancer Res., 90, 1203-1206.
- Fukutome, K., M. Ochiai, K. Wakabayashi, S. Watanabe, T. Sugimura and M. Nagao (1994) Detection of guanine-C8-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine adduct as a single spot on thin-layer chromatography by modification of the 32-P-postlabeling method, Jpn. J. cancer Res., 85, 113-117.
- Kakiuchi, H., M. Watanabe, T. Ushijima, M. Toyota, K. Imai, J. H. Weisburger, T. Sugimura, M. Nagao (1995) Specific 5'-GGGA-3'→5'-GGA-3' mutation of the *Apc* gene

in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 392, 910-914.

Kasai, H., S. Nishimura, K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1980) Chemical synthesis of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ), a potent mutagen isolated from broiled fish, Proc. Japan Acad., 56, 382-384.

Kawanishi, S., S. Oikawa, M. Murata, H. Tsukitome, L. Saito (1999) Sitespecific oxidation at GG and GGG sequences in double-stranded DNA by enzoyl peroxide as a tumor promoter, Biochemistry, 38, 16733-16739.

Loeb, L.A. (1996) Genetic instability in cancer, In : T. Lindahl (Ed), *Genetic Instability in Cancer*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, pp. 329-342.

Loeb, K. and L.A. Loeb (2000) Significance of multiple mutations in cancer, Carcinogenesis, 21, 379-385.

Nagao, M., M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, T. Kawachi and T. Sugimura (1977a) Mutagenicities of protein pyrolysates, Cancer Lett., 2, 335-340.

Nagao, M., M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi and T. Sugimura (1977b) Mutagenicities of the smoke condensate and charred surface of fish and meat, Cancer Lett., 2, 221-226.

Nagao, M. and T. Sugimura (1998) Multiple steps in carcinogenesis, multiple carcinogenic factors, and multiple primary tumors: can we develop an appropriate response for cancer prevention? Drug Metab. Rev., 30, 405-419.

Nagao, M., Y. Suwa, H. Yoshizumi and T. Sugimura (1984) Mutagens in coffee, Banbury Reports 17, In "Coffee and Health", 69-77.

Nagao, M., T. Ushijima, M. Toyota, R. Inoue and T. Sugimura (1997) Genetic changes induced by heterocyclic amines, Mutat. Res., 376, 161-167.

Nagao, M., H. Fujita, M. Ochiai, K. Wakabayashi, T. Sofuni, T. Matsushima, T. Sugimura and T. Ushijima (1998) No direct correlation between mutant frequencies and cancer incidence induced by MeIQ in various organs of Big Blue mice, Mutat. Res., 400, 251-257.

Nagao, M. (1999) A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens—heterocyclic amines—based on molecular information, Mutat. Res., 431, 3-12.

Ochiai, M., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1984) Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite, Gann., 75, 1-3.

Ochiai, M., M. Watanabe, H. Kushida, K. Wakabayashi T. Sugimura and M. Nagao (1996) DNA adduct formation, cell proliferation and aberrant crypt focus formation induced by PhIP in male and female rat colon with relevance to carcinogenesis, Carcinogenesis, 17, 95-98.

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

Ochiai, M., H. Nakagama, R. Turesky, T. Sugimura, M. Nagao (1999) A new modification of the <sup>32</sup>P-post-labeling method to recover IQ-DNA adducts as mononucleotides, Mutagenesis, 14, 239-242.

Okochi, E., N. Watanabe, Y. Shimada, S. Takahashi, K. Wakazono, T. Shirai, T. Sugimura, M. Nagao and T. Ushijima (1999) Preferential induction of guanine deletion



at 5'-GGGA-3' in rat mammary glands by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, Carcinogenesis, 20, 1933-1938.

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

Okonogi, H., T. Ushijima, X.B. Zhang, J.A. Heddle, T. Suzuki, T. Sofuni, J.S. Felton, T. Tucker, T. Sugimura, M. Nagao (1997b) Agreement of mutational characteristics of heterocyclic amines in *lacI* of the Big Blue® mouse with those in tumor related genes in rodents, Carcinogenesis, 18, 745-748.

Sugimura, T., T. Kawachi, M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Okamoto, K. Shudo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, T. Iitaka, A. Itai (1977) Mutagenic principles in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products, Proc. Jpn. Acad., 53, 58-61.

Tada, A., M. Ochiai, K. Wakabayashi, H. Nukaya, T. Sugimura, M. Nagao (1994) Identification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-*f*]

quinoline (dG-C8-MeIQ) as a major adduct formed by MeIQ with nucleotides *in vitro* and with DNA *in vivo*. Carcinogenesis, 15, 1275-1278.

Takahahi, Y., M. Nagao, T. Fujino, J. Yamaizumi and T. Sugimura (1979) Mutagens in Japanese pickle identified as flavonoids, Mutat. Res., 68, 155-161.

Takayama, K., K. Yamashita, K. Wakabayashi, T. Sugimura and M. Nagao (1989) DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rats. Jpn. J. Cancer Res., 80, 1145-1148.

Wakabayashi, K., M. Ochiai, H. Saito, M. Tsuda, Y. Suwa, M. Nagao, T. Sugimura (1983) Presence of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-b-carboline-3-carboxylic acid, a precursor of a mutagenic nitroso compound, in soy sauce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2912-2916.

Yamashita, K., M. Adachi, S. Kato, H. Nakagama, M. Ochiai, K. Wakabayashi, S. Sato, M. Nagao, T. Sugimura (1990) DNA adducts formed by 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in rat liver: Dose-response on chronic administration, Jpn. J. Cancer Res., 81, 470-476.

Environ. Mutagen Res., 22 : 61 - 66 (2000)

研究奨励賞 受賞講演

## 大気・土壌中の変異原物質の定量的評価に関する研究

渡辺 徹志

京都薬科大学 〒 607-8414 京都市山科区御陵中内町 5

### Quantitative evaluation of mutagens in ambient air and soil

Tetsushi Watanabe

Kyoto Pharmaceutical University  
5, Nakauchicho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

### Summary

More than 200 surface soil samples were collected from parks and roadsides in residential areas in the Keihin, Chukyo-Tokai and Keihanshin districts in Japan and were examined by the Ames/*Salmonella* assay. Most of the organic extracts of the soil samples showed mutagenicity toward strains TA98 and TA100. High levels of mutagenicity were found in soil samples from sites close to industrial areas in each district. By bioassay directed fractionation using normal-phase and reversed-phase column chromatography, 1,3-dinitropyrene (DNP), 1,6-DNP and 1,8-DNP were identified as major mutagenes in the organic extracts of soil from Osaka. An efficient clean-up procedure and a sensitive quantification method of 1,3-, 1,6- and 1,8-DNP isomers in soil were developed and applied to 30 soil samples from the three districts. DNP isomers were detected in all soil samples examined. The highest contribution ratios of DNP isomers to the mutagenicity of soil extracts were observed for the samples collected in Osaka, and the total of the contribution ratios of three DNP isomers was about 50%. These results suggest that surface soil is largely contaminated with mutagenic compounds and that DNP isomers are one class of major mutagenic and carcinogenic compounds contaminating surface soil.

Keywords : surface soil, mutagenicity, dinitropyrene, quantification

### 緒 言

我が国において癌は1981年より死因の第1位を占め、1996年以降は総死亡のうち30%以上が癌によるものとなった。また、癌による死亡を部位別にみると男女とも肺癌の割合が高く、男性では1993年から第1位を占めている。癌による死亡や癌罹患率には地域差がみられ、肺癌の場合、都道府県別標準化死亡率は大阪府をはじめ近畿地方で高い傾向にある(垣添ら1999)。このような癌罹患率の地域差はその地域住民の生活習慣とともにその地域の環境特性を反映すると考えられている。このため変

異原・癌原物質による環境汚染の実態を明らかにすることは癌など疾病の原因究明に、また健康被害の予防のために重要であると考えられる。大気の変異原性に関しては、これまで大気粉塵について多くの研究がなされ、多数の変異原・癌原物質が大気粉塵中から検出されており、一部の化合物については化学分析も行われている(Nielsen et al., 1984; 松下1989; Lee 1995)。一方、土壌の変異原性については、これまで工場関連施設や産業廃棄物処理場(Brown et al., 1986; Donnelly et al., 1987; Jones et al., 1989; Donnelly et al., 1991; McDaniels et al., 1993)、農耕地(Goggleman et al., 1982; Smith 1982; Brown et al., 1985)あるいは幹線道路(西村ら1984; 玉川ら1985; Lim-Sylianco 1988; 嵐谷ら1992)などについてそれぞれ数報論文があるのみで、公園など

受付：2000年4月4日 受理：2000年5月8日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会において発表された1999年度研究奨励賞受賞講演である。  
This paper is the lecture of the JEMS Achievement Award (1999) presented at the 28th JEMS annual meeting, 1999.



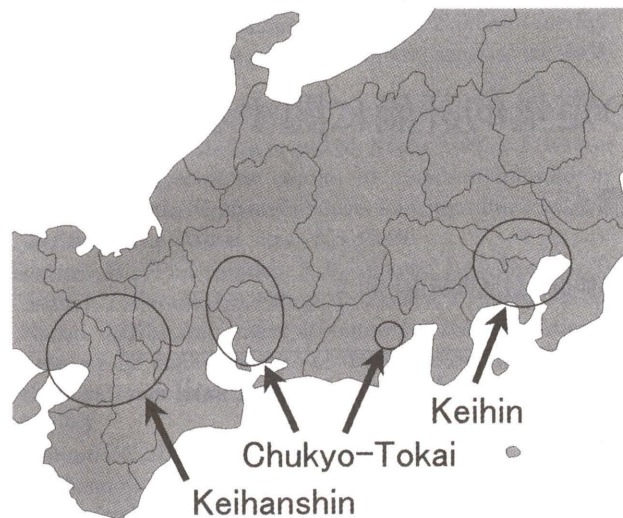


Fig. 1 Sampling areas of surface soil in the Keihin, Chukyo-Tokai and Keihanshin districts

いわゆる一般住居地域の土壌(Knize et al., 1987)の変異原性に関してはほとんど明らかにされていなかった。大気中の浮遊粉塵などはいずれ地表面に落下することから、変異原・癌原物質による大気汚染が進行している地域では表層土壌の汚染も進んでいると予想される。大気粉塵の捕集には特殊な装置が必要であり、捕集可能な粉塵量や採取地点は限りがある。これに対し表層土壌は採取が容易であり、多量採取も可能であることから、表層土壌を試料とすることでより多くの地点の汚染状況を簡便にモニタリングでき、汚染物質の究明にも表層土壌は有用であると予想された。

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年より大気、土壌等の変異原性について調査してきた。そのなかで著者は一般住居地域の大気粉塵ならびに表層土壌の変異原性について明らかにするとともに、変異原物質の究明および分析を行い、以下の知見を得た。

## 1. 表層土壌の変異原性調査

1996年11月から1999年9月にかけて、京阪神地域(87ヵ所)、中京・東海地域(81ヵ所)および京浜地域(41ヵ所)の公園内や道路端などの表層土壌、すなわち地表面から深さ10 cm程度までの土砂を試料として採取した(Fig. 1)。採取した試料は自然乾燥後、篩にかけて小石等を除いたのち、粒径250  $\mu$ m以下の土砂についてメタノールを用いて超音波抽出し、抽出物の変異原性をAmes法により試験した。Fig. 2に土砂抽出物のサルモネラ菌TA 98株およびTA 100株に対する変異原性を示す。TA 98株に対してはほぼすべての土砂抽出物の変異原性を示し、一部例外を除きほとんどの試料がS 9 mix存在下と非存在下において、ほぼ同程度の活性であった。TA 100株に対してはほぼすべての試料がS 9 mix存在

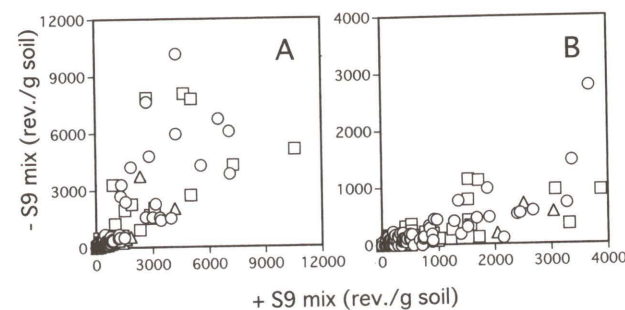


Fig. 2 Mutagenic potencies of surface soil toward *S. typhimurium* TA98 and TA100. ○: Keihanshin district, □: Chukyo-Tokai district, △: Keihin district

下において、非存在下より強い変異原性を示した。また、ほとんどの試料がTA 100株よりTA 98株に対して強い変異原性を示し、TA 100株に対しては最も活性の強いもので土砂1 g当たり4,000 revertants程度であったが、TA 98株に対しては5,000~11,000 revertants/g土砂と非常に強い変異原性を示す試料が多数みられた。これらのことから一般住宅地域の表層土壌は変異原物質を含み、一部例外的な地域を除き、一般的に塩基対置換型よりフレームシフト型変異原物質による汚染が進んでいることがわかった。またその汚染度は土砂採取地点により100倍以上異なることが明らかとなった(Watanabe et al., 2000)。

表層土壌抽出物のTA 98株に対する変異原活性と試料採取地点の関係を京阪神地域を中心とした近畿地方についてみると、滋賀県内や奈良県内などの地方都市郊外の住宅地や農業地域では土砂1 g当たり200 revertants以下の地点が多いのに対し、自動車交通量の特に多い大阪市内中心部ではほとんどの土壌が土砂1 g当たり200~1,000 revertantsとやや強い変異原性を示した。また変異原活性が1,000~5,000/g土砂、あるいはそれ以上と特に強い活性を示す地点が大阪市の臨海工業地域に近い地域において多数みられた。同様な傾向は中京工業地帯や京浜工業地帯においても認められた。これらのことから、表層土壌を汚染する変異原物質の排出源として自動車エンジンとともに工場の燃焼炉や焼却炉などの影響が大きいものと予想された。

## 2. 表層土壌中の変異原物質の検索

表層土壌に含まれる変異原物質を究明するため、特に強い変異原性を示した大阪市内住吉区内の公園の土砂4.4 kgからアセトンを用いソックスレー抽出法により抽出物3.4 gを得た。変異原物質の検索は、土砂抽出物に対して高い感受性を示したYG 1024株に対する変異原性を指標として行った。土砂抽出物(120 revertants/ $\mu$ g)はまずシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、*n*-hexane-benzene(1:1)で溶出する主変異原性画分(Fr. 2)を得た(Table 1)。Fr. 2をさらにシリカゲル中

Table 1 Yield and mutagenicity of Soxhlet extract and the fractions of soil from Sumiyoshi-ku in Osaka City

Sample	Yield (mg)	YG1024-S9 mix (rev./mg) <sup>a</sup>	Recovery of total mutagenicity (%) <sup>b</sup>
Soxhlet extract <sup>c</sup>	3403	120000	100
Silica gel column <sup>d</sup>			
Fr.1	221	2300	0.1
Fr.2	263	1430000	92
Fr.3	305	259000	19
Fr.4	638	25000	4
Fr.5	1951	6300	3
Silica gel HPLPLC <sup>e</sup>			
Fr.2-1	79	39000	0.8
Fr.2-2	38	426000	4
Fr.2-3	46	516000	6
Fr.2-4	21	9120000	47
Fr.2-5	17	5140000	21
Fr.2-6	11	60000	0.2

<sup>a</sup> The slope of dose-response (revertants/mg extract) was calculated by least-squares linear regression from the first linear portion of the dose-response curve.

<sup>b</sup> Recovery represents the ratio of total mutagenicity of each fraction toward that of Soxhlet extract

<sup>c</sup> The Soxhlet extract was obtained from 4.4 kg of soil (<850  $\mu$ m) collected in April 1997.

<sup>d</sup> The Soxhlet extract (3.4 g) was applied to a silica gel column.

<sup>e</sup> Fr.2 (238.4 mg) was applied to a silica gel column for HPLPLC.

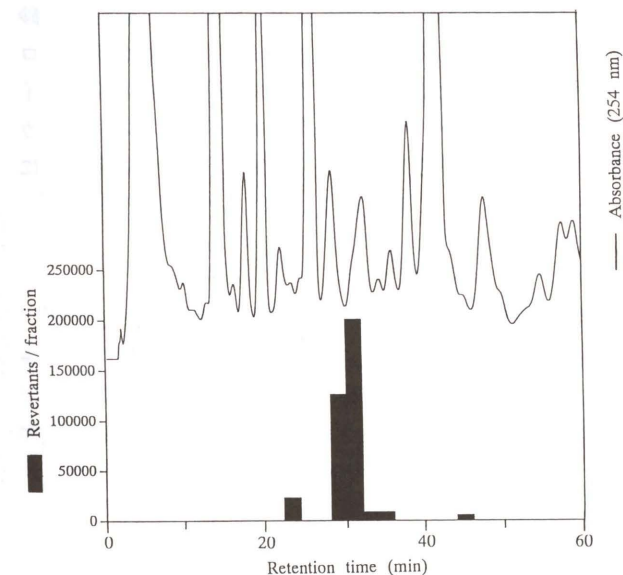


Fig. 3 HPLC profile of mutagens in organic extracts of soil, Fr.2-4, from Sumiyoshi-ku in Osaka. HPLC was performed on an STR PREP-ODS II column eluting with 70% acetonitrile at a flow rate of 9 ml/min. The mutagenicity of each 2 min fraction (histogram bars) was tested in strain YG1024 without S9 mix. The UV absorbance of the eluate (upper line) was monitored at 254 nm

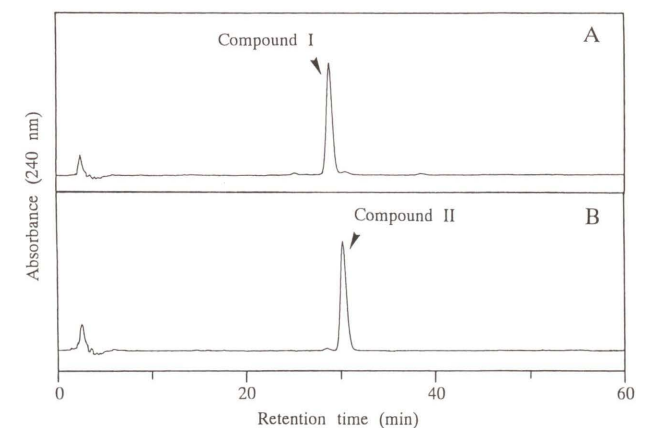


Fig. 4 HPLC chromatograms of compound I (A) and compound II (B) isolated from organic extracts of soil from Sumiyoshi-ku in Osaka. HPLC was performed on an STR ODS II column, eluting with 60% acetonitrile at a flow rate of 0.7 ml/min. The UV absorbance of each eluate was monitored at 254 nm

液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離することにより、主変異原性画分が保持時間28~32分に溶出した(Fig. 3)。この主変異原性画分をPRODIGY 5  $\mu$ m SilicaカラムおよびSTR ODS IIカラムを用いて精製することにより2種類の主変異原物質Compound I, Compound IIを1  $\mu$ gおよび600 ng単離した(Fig. 4)。Compound IおよびIIはマスペクトル、UVスペクトルおよびHPLCにおける保持時間からそれぞれ1,8-dinitropyrene(DNP)および1,6-DNPと同定された

圧カラムクロマトグラフィーにより分画し、強変異原性画分Fr. 2-4 21 mg(9,120 revertants/ $\mu$ g)を得た。Fr. 2-4をセミ分取用STR Prep-ODS IIカラムを用い高速



(Watanabe et al., 1998). また、著者らは同じ大阪市住吉区の土壌抽出物についてさらに検討を行うことにより1,3-DNPを検出した。これらDNP類はディーゼルエンジン等から排出される環境変異原物質(Nakagawa et al., 1983; Hayakawa et al., 1994)としてすでに知られていたが、土壌中からの検出は著者らが初めてであった。なお、1,3-, 1,6-および1,8-DNPは実験動物に対して発癌性を示し(King et al., 1986; Imaida et al., 1995),

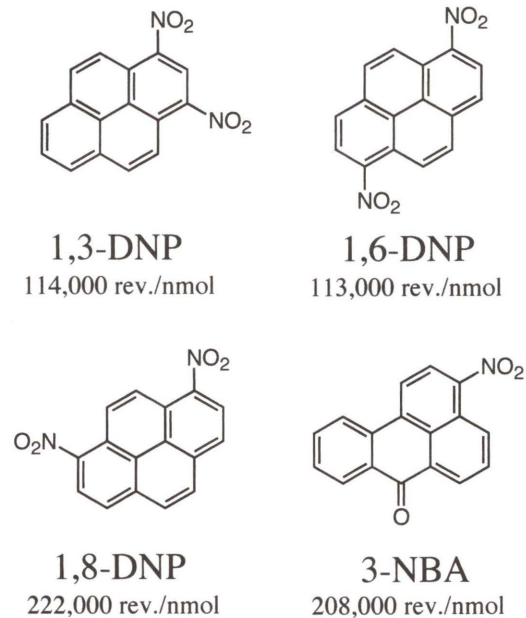


Fig. 5 Structures and mutagenicities of 1,3-, 1,6- and 1,8-dinitropyrene (DNP) isomers and 3-nitrobenzanthrone (NBA) in *S.typhimurium* TA98

Table 2 Amounts of 1,3-, 1,6- and 1,8-DNP in surface soil and contribution ratios of DNPs to the mutagenicity of soil in *S.typhimurium* TA98 without S9 mix

Sampling site	Sampling data	mutagenicity (rev./g soil) <sup>a</sup>	Concentration (pg/g soil) <sup>b</sup>			Contribution ratio (%)			
			1,3-	1,6-	1,8-	1,3-	1,6-	1,8-	Total
Tokyo Shinagawa-ku	98 Feb.	319	19	32	15	2	4	4	10
Higashimurayama	97 Dec.	438	17	14	17	2	1	3	6
Hachioji	98 Apr.	.380	21	22	30	2	2	6	10
Kawasaki	99 Jun.	2,340	130	280	370	6	12	16	34
Nagoya	99 Aug.	7,860	350	630	750	2	3	7	12
Yokkaichi	99 Aug.	1,270	140	310	310	4	10	19	33
Hekinan	97 Jan.	34,300	2,440	4,210	4,370	3	5	10	18
Handa	99 Sep.	1,960	210	480	760	1	2	7	10
Uji	98 May	3,300	320	630	860	4	7	20	31
Osaka Kita-ku	97 Apr.	4,230	910	1,200	1,400	8	11	25	44
Osaka Minato-ku	97 Jan.	5,960	1,530	1,770	2,090	10	12	27	49
Osaka Sumiyoshi-ku	97 Jan.	9,780	2,680	3,070	3,650	11	12	28	51
Kobe	97 Jan.	10,000	1,120	1,850	2,570	4	7	20	31

<sup>a</sup> The organic extracts were obtained from 15 g of soil (<250 mm) with an ultrasonic extractor.

<sup>b</sup> Values were corrected for recoveries during the purification process, including ultrasonic extraction, and represented at the mean  $\pm$  SD (n=3). The recoveries of 1,3-, 1,6- and 1,8-DNP isomers were 95, 97 and 94%, respectively (Watanabe, et al., 1999).

1,6-DNPは肺への直接投与により扁平上皮癌や腺癌を誘発すると報告されている(Takayama et al., 1985; Maeda et al., 1986).

また著者らはTA 98株に対し、土砂1g当たり8,080 revertantsときわめて強い変異原性を示した碧南市の土壌について各種クロマトグラフィーを行いDNP類以外の変異原物質の検索を試みた。その結果、2種類の変異原物質を単離し、一方を3-nitrobenzanthrone(NBA)と同定した。3-NBAは近年、ディーゼルエンジン排出ガスおよび大気粉塵中より検出された強変異原物質であり、マウス末梢血に対して小核誘発性を示す(Enya et al., 1997)。Fig. 5に3-NBAおよびDNP類の構造ならびに変異原活性を示した。3-NBAのTA 98株に対する変異原活性はきわめて強く、DNP類と同程度の変異原性を有している。

### 3. 土壌中のDNP類の分布

次にDNP類の表層土壌における分布と変異原性に関する寄与について究明を試みた。土壌中のDNP類は微量なうえ、土壌抽出物中に分析を妨害する物質が多量に存在するため、高度のクリーンアップと高感度な分析法が必要であった。そこで土壌中のDNP類の定量法を新たに開発した(Watanabe et al., 1999)。すなわち土砂から超音波抽出して得た抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画したのち、モノメリックタイプ次いでポリメリックタイプのオクタデシル(ODS)カラムを用いたHPLCでクリーンアップした。最終的に

DNP画分はポリメリックタイプODSカラムと白金/ロジウム還元カラムを連結したHPLCに注入して、1,3-, 1,6-および1,8-DNPを分離後、オンラインで対応するdiamino体に還元し、それらの蛍光を測定した。抽出時およびクリーンアップ時におけるDNP類の回収率は94%以上と良好であり、検出限界は0.7-4 pgと高感度であった。この定量法を用い、東京都、名古屋市および大阪市を中心とした三大都市圏の表層土壌約30検体について1,3-, 1,6-および1,8-DNPを分析した。その結果の一部を各土砂試料のTA 98株に対する変異原性等とともにTable 2に示す。DNP類はいずれの地域の表層土壌中からも検出され、強い変異原性を示した川崎市、名古屋市、碧南市、大阪市および神戸市の試料では、DNP類は3種類とも土砂1g当たり数百pgから数ngと高濃度であった。またDNP類の変異原性に対する寄与率は数%から50%程度であり、近畿地方において他の地域よりやや高い傾向が認められた(Watanabe et al., 2000)。これら土壌中に高濃度で存在するDNP類の地域住民等に対する健康影響については今後の検討課題である。

また著者らは大気粉塵抽出物と表層土壌抽出物の変異原性が相関性を示す傾向にあることを見出している。土壌中に高濃度に蓄積することが明らかとなったDNP類の発生源はこれまでのところ不明であるが、交通量の多い都心部より、工業地域などに高濃度のDNP類が検出された地点が多くみられることから、これまでいわれてきた自動車エンジン以外に工場の燃焼炉や焼却炉などからの排出の影響が大きいと予想された。

### 結 語

表層土壌の変異原性を調査することが変異原・癌原物質による環境汚染のモニタリングとして有用な情報を提供することを示した。表層土壌中の主変異原物質として既知発癌物質であるdinitropyrene類を単離、同定した。さらに土壌中のdinitropyrene類を白金/ロジウムカラムでオンライン還元する簡便かつ高感度な定量法を開発し、表層土壌が広くdinitropyrene類によって汚染されていることを明らかにした。

### 謝 辞

本研究は多くの方々のご指導とご協力ならびに有意義な議論があって初めて成し得たものです。国立がんセンター研究所の若林敬二博士、塩谷岳樹博士、国立公衆衛生院の後藤純雄博士、久松由東博士、遠藤治博士、名古屋市衛生研究所の麻野間正晴博士、神奈川県環境科学センターの杉山英俊博士、北海道環境科学研究センターの松本寛博士、福岡県保健環境研究所の世良暢之博士、京都薬科大学の平山晃久教授、小川俊次郎博士、笠井映江元助手ならびに平成9~11年度卒業研究生の方々に厚

くお礼申し上げます。本研究は環境庁委託研究費ならびにハイテク・リサーチ・センター整備事業の助成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.
- Enya, T., H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama and 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.
- Goggleman, 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.
- Hayakawa, K., M. Butoh, Y. Hirabayashi and 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.
- Imaida, K., M.S. Lee, S.J. Land, C.Y. Wang and C.M. King (1995) Carcinogenicity of nitropyrenes in the newborn female rat, Carcinogenesis, 16, 3027-3030.
- Jones, K.C. and R.A. Page (1989) Short-term mutagenicity bioassays applied to evaluating contaminated land, Chemosphere, 18, 2423-2432.
- 垣添忠生(1999)がん標準化死亡比の地域特性(平成7年), がんの統計編集委員会(編), がんの統計1999年版, 財団法人 がん研究振興財団, pp. 18-21.
- King, C.M., L.K. Tay, M.S. Lee, K. Imaida and C.Y. Wang (1986) Mechanisms of tumor induction by dinitropyrenes in the female CD rat, Dev. Toxicol. Environ. Sci., 13, 279-290.
- 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.
- Lee, H.K.(1995) Recent applications of gas and high-performance liquid chromatographic techniques to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates, J. Chromatogr. A, 710, 79-92.
- Lim-Sylianco, C.Y.(1988) Genotoxic studies of street soils in Quezon City, Philippines, Proc. ICMR Semin., 389-393.
- Maeda, T., K. Izumi, H. Otsuka, Y. Manabe, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1986) Induction of squamous cell car-



- cinoma in the rat lung by 1,6-dinitropyrene, J. Natl. Cancer Inst., 76, 693-701.
- 松下秀鶴(1989)4.7 空気中のがん・変異原物質とその暴露評価手法の進歩, 大気汚染学会誌, 24, 418-429.
- 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.
- Nakagawa, R., S. Kitamori, K. Horikawa, K. Nakashima and H. Tokiwa (1983) Identification of dinitropyrenes in diesel-exhaust particles, their probable presence as the major mutagens, Mutat. Res., 124, 201-211.
- Nielsen, T., B. Seitz and T. Ramdahl (1984) Occurrence of nitro-PAH in the atmosphere in a rural area, Atmos. Environ., 18, 2159-2165.
- 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.
- Takayama, S., T. Ishikawa, H. Nakajima and S. Sato (1985) Lung carcinoma induction in Syrian golden hamsters by intratracheal instillation of 1,6-dinitropyrene, Jpn. J. Cancer Res., 76, 457-461.
- 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. A, 839, 41-48.
- Watanabe T., S. Goto, Y. Matsumoto, M. Asanoma, T. Hirayama, N. Sera, Y. Takahashi, O. Endo, S. Sakai and K. Wakabayashi (2000) Mutagenic activity of surface soil and quantification of 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene isomers in soil in Japan, Chem. Res. Toxicol., 13, 281-286.

## 複製 DNA 合成(RDS)試験法を応用した 非変異・肝癌原性物質の検出系確立

宇野 芳文

三菱東京製薬(株)横浜研究所安全性研究所 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000

### Rodent liver replicative DNA synthesis (RDS) test for detection of nongenotoxic (Ames-negative) hepatocarcinogens

Yoshifumi Uno

Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals, Inc., Yokohama Research Center,  
Pharmacokinetics and Toxicology Laboratory  
1000, Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama 227-0033, Japan

#### Summary

To better establish an *in vivo-in vitro* rodent hepatocyte replicative DNA synthesis (RDS) test for screening nongenotoxic (Ames-negative) rodent hepatocarcinogens, experimental conditions and judgement criteria were assessed. After single-gavage of three model compounds, isolated hepatocytes showed the highest labeling index (L.I., %) when plated at density of  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Spontaneous RDS incidences showed constant values in hepatocytes from male F344 rats aged 9 weeks or older and from male B6C3F1 mice aged 6 weeks or older, respectively. Based on the distribution of spontaneous L.I., in 9-week-old rats, L.I. of 2% or more induced by a test compound should be judged as positive and that of less than 1% as negative using the maximum tolerated dose in the time-course experiment at 24, 39 and 48 hr. In the case of L.I. between 1 and 2%, the finding clear dose-dependence was considered to justify the conclusion of a positive effect. In 8-week-old mice, 0.4% or more of L.I. was judged as a positive response.

Under the above experimental conditions, 18 of 22 rat hepatocarcinogens and 32 of 41 mouse ones gave positive responses (positive sensitivity : 82% and 78%, respectively) and 20 of 25 noncarcinogens and 25 of 31 ones gave negative responses (negative specificity : 80% and 81%, respectively) in the rat and mouse RDS test, respectively. These findings suggest that the RDS test is a useful method for early detection of nongenotoxic hepatocarcinogens.

A collaborative study was conducted to evaluate whether an RDS test in rat livers using a continuous 5-bromo-2'-deoxyuridine-labeling method can detect nongenotoxic hepatocarcinogens with three daily administration at dose-levels effective in long-term bioassays. Six of seven nongenotoxic hepatocarcinogens tested gave positive or equivocal results. It is considered that the RDS test can detect many nongenotoxic rat hepatocarcinogens with short-term administration at dose-levels used in long-term bioassays.

**Keywords :** replicative DNA synthesis, cell proliferation, RDS test, nongenotoxic carcinogen, hepatocarcinogen

受付 : 2000 年 4 月 4 日 受理 : 2000 年 5 月 8 日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会において発表された1999年度研究奨励賞受賞講演である。  
This paper is the lecture of the JEMS Achievement Award (1999) presented at the 28th JEMS annual meeting, 1999.



## 緒 言

癌原性物質のスクリーニングには、変異原性試験が簡便かつ有用な方法として広く使用されている。しかしながら、変異原性試験では検出できない癌原性物質も多数知られており、これらを短期間で検出することが化学物質による癌原性の予測にきわめて重要と考えられる。検出法のひとつとして、癌原性物質がもつ細胞増殖作用に着目した。その理由は、化学物質の暴露により誘発される細胞増殖作用が、非遺伝毒性的な発癌誘発機構の一要因であることが報告されていたためである (Loury et al., 1987 a; Marsman et al., 1988; Butterworth and Goldsworthy, 1991)。癌原性物質による細胞増殖誘発の解析には複製 DNA 合成 (replicative DNA synthesis: RDS) の測定が一般的に行われ、RDS 誘発が癌原性予測のために有効な指標となることが知られている (Busser and Lutz, 1987; Doolittle et al., 1987; Loury et al., 1987 b; Mirsalis et al., 1989; Eldridge et al., 1990; Furihata et al., 1995; Yoshikawa, 1996)。また、非遺伝毒性的な癌原性物質の多くがげっ歯類の肝臓を標的としていること (Gold et al., 1993) から、肝臓における RDS 誘発測定系 (肝 RDS 試験) の確立と、その検出精度の検討を行った。なお本稿において、非変異・癌原性物質とは標準的な手法で実施される Ames 試験で陰性の結果を示す癌原性物質と便宜的に定義する。これは、Ames 試験が癌原性予測のために最も汎用される試験であり、この試験とのバッテリーで癌原性を予測することを意識したためである。

### 1. 肝 RDS 試験の基礎的実験条件の検討

肝 RDS 試験は、ラットまたはマウスに被験物質を単回強制経口投与 (最高用量: LD<sub>50</sub> または最少致死量の 1/2, 上限は 2000 mg/kg) し、一定時間後に肝細胞をコラゲナーゼ灌流法にて分離、<sup>3</sup>H-thymidine の共存下で 4 時間培養してオートラジオグラフを作製し、RDS 上昇の有無を評価する試験法である (宇野ら, 1994)。本研究において、動物は癌原性試験で汎用される F 344 ラットまたは B6C3F1 マウスの雄を使用し、RDS 上昇は 2000 個/動物の肝細胞をカウントして labeling index (L.I., %) を算出し評価した。肝 RDS の測定は従来から、肝不定期 DNA 合成 (unsheduled DNA synthesis, UDS) 測定に付随して実施されてきた。このため、肝 RDS 測定用に実験条件を最適化する必要があると考え、以下の基礎的な検討を実施した。

#### 1) 肝細胞の培養密度

正常な初代培養肝細胞の増殖には、肝細胞の培養密度が密接に関与することが知られている (Nakamura, et al., 1983)。同様に、被験物質の *in vivo* 処理後の *in vitro* での肝細胞の RDS 誘発にも細胞培養密度が深く関与し

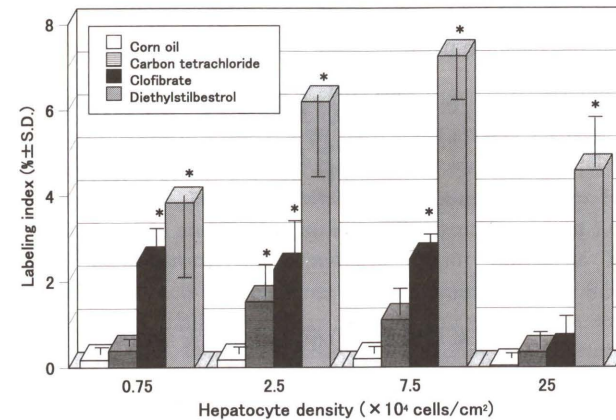


Fig. 1 Effects on hepatocyte density on RDS induction in rats after *in vivo* treatments with three typical nongenotoxic hepatocarcinogens. Each column represents mean  $\pm$  S.D. (n=4). Asterisks (\*) show statistically significant increase compared with solvent (corn oil) controls by the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ )

ていることが予想されたため、RDS 観察に最適な肝細胞培養密度につき検討した。肝 RDS を誘発することが既知の肝癌原性物質のうち、RDS 誘発機構が異なると思われる carbon tetrachloride, clofibrate および diethylstilbestrol をラット (9 週齢) に投与後、肝細胞を分離して 4 段階の濃度で播種し L.I. を測定した。その結果、 $2.5 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup> ( $5 \times 10^4$  細胞/mL に相当) で播種したときに、すべての被験物質において統計学的に有意な RDS 上昇がみられた (Fig. 1)。このため、肝 RDS 試験は  $2.5 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup> の培養密度で実施することにした (Uno et al., 1992 a)。この密度は、 $4.2$  または  $6.2 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup> で実施される UDS 試験 (Butterworth et al., 1984; Bermudez et al., 1989; Mirsalis et al., 1989) よりやや低密度であった。

#### 2) 肝 RDS 自然誘発率

既報における肝 RDS の自然誘発率 (コントロール値) は報告者によりかなり異なっていた (Butterworth et al., 1984; Mirsalis et al., 1985; Loury et al., 1986; Steinmetz et al., 1988; Bermudez et al., 1989; Mirsalis et al., 1989)。その主原因は使用される動物の週齢が画一化されていないためと推測され、安定したコントロール値を得るために最適な動物の週齢につき検討した。異なる週齢の動物を日本チャールスリバーより購入し、肝 RDS の自然誘発率を測定した。その結果、ラットは 9 週齢で、マウスは 6 週齢で自然誘発率が安定することが判明した (Fig. 2)。これらの週齢以降の動物を使用すれば安定したコントロール値が得られると考え、ラットは解剖時 9 週齢で、マウスは個体が小さいと肝臓の灌流操作が困難であることを考慮して解剖時 8 週齢で使用することにした (Uno et al., 1992 a; Miyagawa et al., 1995)。

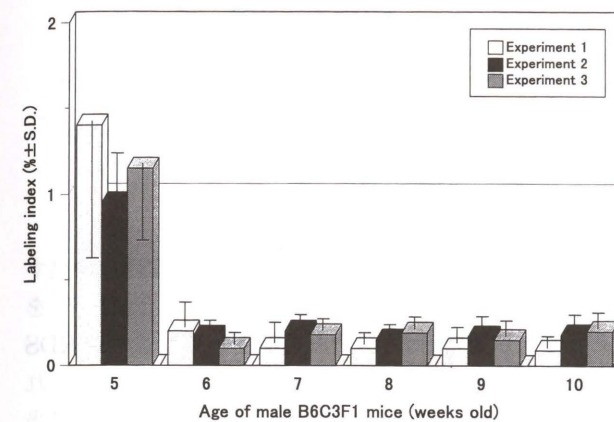
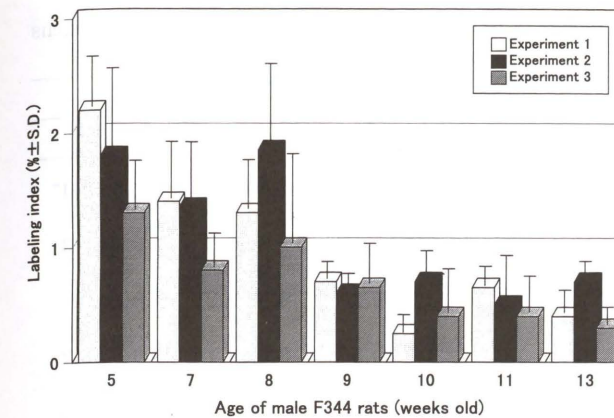


Fig. 2 Spontaneous RDS induction in hepatocytes from different aged male F344 rats (upper) or B6C3F1 mice (lower). The studies were repeated three times (experiments 1, 2 and 3) and rats aged 9 weeks or older and mice aged 6 weeks or older showed constant results. Each column represents mean  $\pm$  S.D. (n=4)

### 2. 肝 RDS の測定方法および結果の判定基準

肝 RDS 誘発の有無は、通常、陰性対照群と被験物質投与群の L.I. を統計学的に比較検定して判定される。しかしながら、毒性試験においては一般的に、陰性対照群の背景データとの比較を考慮することも重視されている。また、背景データが蓄積されていれば統計学的な検定を行うことなく評価することも可能で、例として *in vivo* 肝 UDS 試験では、正味グレイン数が 5 個以上の場合に陽性と判定されている (Butterworth et al., 1987)。肝 RDS 試験について背景データに基づく判定方法を記載した報告は少なく、著者の知る限り Mirsalis ら (1989) が L.I. を基準にした判定方法を記述しているが、これには設定根拠に関する明確な記載はない。著者らの研究所においても当初、肝 RDS 誘発の有無は統計学的な有意差検定により判定されていた。しかしながら、試験を実施するにつれて蓄積された背景データをまとめると、1 回の実験あたり 4 または 5 匹の動物から得られた肝 RDS

自然誘発率の平均値は、9 週齢の雄性 F 344 ラットで  $0.4 \pm 0.18\%$  (L.I., mean  $\pm$  S.E., n=105 実験)、8 週齢の雄性 B 6 C 3 F 1 マウスで  $0.15 \pm 0.08\%$  (L.I., mean  $\pm$  S.E., n=84 実験) であり、その上限はそれぞれ 1.0 % および 0.4 % であることが判明した (Uno et al., 1992 a; Miyagawa et al., 1995)。したがって、被験物質の投与により上限値以上の L.I. (平均値) が得られた場合、その被験物質は肝 RDS 誘発の能力をもつと判定する簡便な方法を考えた。

この判定方法の検証と肝 RDS 測定方法を確立する目的で、4 種類の非変異・肝癌原性物質 (carbon tetrachloride, clofibrate, D,L-ethionine, sodium phenobarbital) と 3 種類の非癌原性物質 (butylated hydroxytoluene, lithocholic acid, 2,6-toluenediamine) とを使用し、ラットにおいて肝 RDS 試験を行った。被験物質を LD 50 値の 1/2 量 (最大耐量: MTD) で単回強制経口投与し、15, 24, 39, 48 および 63 時間後に動物を屠殺して経時的に肝 RDS を測定した。結果を Table 1 に示す。Carbon tetrachloride は投与後 24, 39, 48 および 63 時間に、butylated hydroxytoluene は投与後 39 時間に、陰性対照群と比較して統計学的に有意かつ背景データと比較しても明らかな肝 RDS を誘発した。2,6-Toluenediamine はいずれの測定時間においても、統計学的に有意な肝 RDS を誘発せず、また L.I. は 1.0 % 未満であった。D,L-Ethionine および sodium phenobarbital は投与後 39 時間に統計学的に有意かつ 1.0 % 以上の L.I. を示した。また、clofibrate および lithocholic acid は陰性対照群に対して統計学的に有意な肝 RDS を誘発しなかったが、前者は投与後 39 時間に、後者は投与後 48 時間に 1.0 % 以上の L.I. を示した。以上の経時的測定により、明らかな陽性または陰性結果ではないと考えられた 4 被験物質 (clofibrate, D,L-ethionine, sodium phenobarbital, lithocholic acid) について、用量反応性を検討した。4 被験物質の 2 MTD, MTD, 1/2 MTD および 1/4 MTD を投与し、経時的測定において最大の L.I. を示した時間に肝 RDS を測定した。Clofibrate および sodium phenobarbital では結果が再現されたが、D,L-ethionine および lithocholic acid では再現されなかった (Fig. 3)。

これらの結果のうち、clofibrate のケースは、有意差検定よりも背景データに基づく判定基準が有効なことを示唆していた。D,L-Ethionine および lithocholic acid のケースは、1.0 % をわずかに越える L.I. が得られた場合、統計学的な有意差の有無にかかわらず再現性確認の必要性があることを示唆していた。また、肝 RDS の経時的測定の結果、使用したすべての被験物質における L.I. の最大値は、投与後 24, 39 または 48 時間のいずれかであった。既報においても、単回投与による肝 RDS はいずれもこれらの時間に誘発されていたこと (Butterworth et



Table 1 Labeling index (%) in rat hepatocytes in time-course experiments of RDS test with nongenotoxic hepatocarcinogens and noncarcinogens

Test chemical (CAS No.)	Dose (mg/kg)	No treatment	Time after treatment				
			15 hr	24 hr	39 hr	48 hr	63 hr
Carbon tetrachloride (56-23-5)	1400	0.4±0.3	0.1±0.1	13.6±4.8*	12.4±5.8*	14.9±2.2*	1.6±0.4*
Clofibrate (637-07-0)	470	0.8±0.2	0.1±0.1	0.1±0.1	1.1±1.0 <sup>a</sup>	0.8±0.3	0.4±0.3
D,L-Ethionine (67-21-0)	2000	0.3±0.1	0.1±0.1	0.1±0.0	1.2±0.2*	0.5±0.2	0.1±0.1
Sodium phenobarbital (57-30-7)	75	0.4±0.2	0.8±0.5	0.1±0.0	1.5±0.3*	0.6±0.1	0.6±0.2
Butylated hydroxytoluene (128-37-0)	900	0.7±0.2	0.7±0.2	2.5±4.1 <sup>a</sup>	9.2±6.0*	0.8±0.3	0.6±0.2
Lithocholic acid (434-13-9)	2000	0.6±0.2	0.4±0.3	0.3±0.2	0.6±0.7	1.1±0.5 <sup>a</sup>	0.9±0.1
2,6-Toluenediamine (823-40-5)	250	0.7±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0

\*: Significant increase of RDS compared with no treatment groups by the Student's *t*-test or the Welch test ( $p < 0.05$ );

<sup>a</sup>: Not significant but showing 1% or more labeling index.

al., 1984; Busser and Lutz, 1987; Mirsalis et al., 1989) から, ラット肝 RDS の測定は以上の 3 点で実施すれば良いと考えた。さらに, 用量反応性の測定において, clofibrate では MTD 投与より 1/2 MTD 投与で高い L.I. を示し, 逆に clofibrate と sodium phenobarbital の 2 MTD 投与(致死量)では L.I. が抑制された。これらの事実から, 肝 RDS は必ずしも用量相関的に誘発されるのではなく, また, 過剰な投与量では動物または細胞に何らかの毒性的な障害をもたらして肝 RDS はむしろ抑制されるものと推察される。したがって, ラットにおける肝 RDS の経時的変化の測定は MTD および 1/2 MTD の投与で実施する必要がある。

以上のことを考慮して, ラット肝 RDS の測定方法および背景データに基づく判定基準を以下のように設定した(Uno et al., 1992 b)。最初に, 被験物質の MTD および 1/2 MTD を投与し, 24, 39 および 48 時間後に肝 RDS を経時的に測定する。これら 3 点の測定時間のうち, 1 点以上で背景データ上限値の 2 倍(2.0%)以上の L.I. が観察された場合は陽性と判定する。いずれの点でも背景データの範囲内(1.0%未満)の場合は陰性と判定する。経時的測定の結果 1.0%以上 2.0%未満の L.I. が観察された場合, 用量反応性を測定して再度 1.0%以上の L.I. が得られたときのみを陽性と判定する。なお, マウス肝 RDS の測定については, 自然誘発率の上限値 0.4% を越えた場合は必ず結果の再現性が得られたこと(データを示さず)から, 経時的測定のみを実施して判定することにした(Miyagawa et al., 1995)。

### 3. 肝 RDS 試験の有用性の検討

化学物質の癌原性を短期間で予測するための試験系が有用であるかを評価するためには, 癌原性物質を陽

性に検出する陽性検出率と非癌原性物質を陰性に検出する陰性検出率とを算出し, 両者の平均値(総合検出率)を求めることが通常行われる。肝癌原性物質による肝 RDS 誘発は, これまで数種類の被験物質を使用して報告されているに過ぎず, これらの検出率を算出したものは見当たらなかった。特に, 既報において非癌原性物質を使用した検討はまれであった(Ashby et al., 1986; Bermudez et al., 1989)。そこで, 既知の非変異・肝癌原性物質と非癌原性物質とを使用して肝 RDS 試験を実施し, その陽性検出率と陰性検出率ならびに総合検出率を算出して, 本試験法の有用性を検討した。

被験物質は, 米国 National Toxicology Program (NTP) で実施された癌原性試験において評価されている化学物質を中心に選択した。肝癌原性物質は, 通常の手法で実施された Ames 試験において陰性結果が知られているものを選定し, 非癌原性物質は, Ames 試験で陽性結果が報告されているものも敢えて含むようにした。各被験物質ごとに, 必要に応じて予備的な急性毒性試験を行い MTD を設定し, 前述した測定および判定方法で肝 RDS 試験を実施した。その結果, ラットにおいては 22 種類の非変異・肝癌原性物質のうち 18 種類を陽性に(陽性検出率: 82%), 25 種類の非癌原性物質のうち 20 種類を陰性に(陰性検出率: 80%)検出し, 総合検出率は 81%であった(Fig. 4)。また, マウスにおいては 41 種類の非変異・肝癌原性物質のうち 32 種類を陽性に(陽性検出率: 78%), 31 種類の非癌原性物質のうち 25 種類を陰性に(陰性検出率: 81%)検出し, 総合検出率は 79%であった(Fig. 5)。これらの数値は他のスクリーニング試験の数値と比較して十分に高いと思われることから, ラットおよびマウスを用いる肝 RDS 試験は, Ames 試験陰性の非変異・肝癌原性物質の短期スクリーニングにきわ

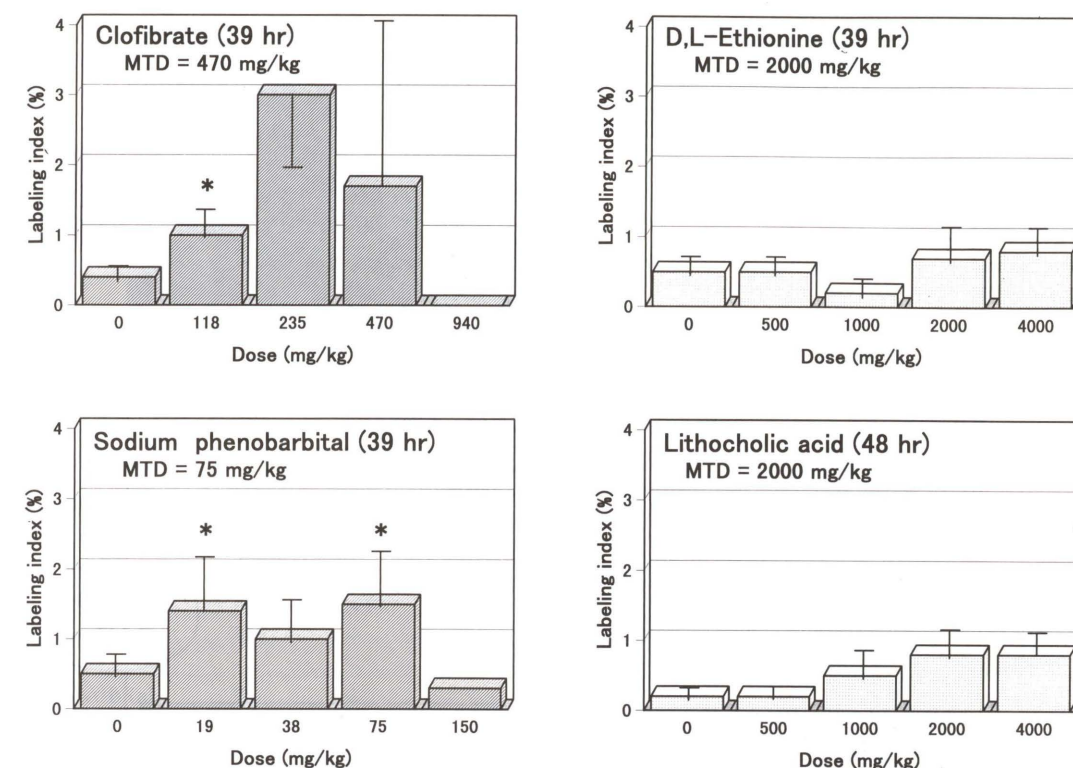


Fig. 3 Results of dose-response experiments in RDS tests using rat hepatocytes. Each test compound was examined at the time of maximum RDS induction obtained in the time-course experiment. Each column represents mean  $\pm$  S.D. ( $n=4$ ). Asterisks (\*) show statistically significant increase compared with solvent controls by the Student's *t*-test or the Welch test ( $p < 0.05$ ).

めて有用であると結論した(Uno et al., 1994; Miyagawa et al., 1995)。

### 4. 試験法の一般化

上述してきた肝 RDS 試験においては, RDS 測定のために  $^3\text{H}$ -thymidine を DNA に取り込ませる必要があり, 放射性物質を取り扱えない研究施設では本試験を実施することができない。このため, 試験法の一般化には非 RI 実験にすることが望ましいと思われた。病理学分野では以前から, 非放射性物質の 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) で DNA を標識し, 免疫組織化学的に RDS を測定する手法が使用されており, いずれの手法を使用しても RDS の測定結果に差がないことが報告されている(Eldridge et al., 1990)。以上を考慮し, BrdU を使用した RDS 試験を検討することにした。また, 被験物質の高用量単回投与による肝傷害性を避けるために, 癌原性試験が実施可能な用量域の反復投与により試験を行うことが望ましいと考えた。これらの内容を非変異・がん原性物質への対策研究会において共同研究テーマとして提案し, 多くの研究機関とともに以下の検討を実施した。

被験物質の投与開始の前日に, BrdU 溶液(150 mg/mL)を浸透圧ポンプ(Alzet model 1003 D または 2001,

Alza 社)に注入して, 雄性 F 344 ラットの皮下に包埋した。既知の非変異・肝癌原性物質 7 種類[carbon tetrachloride, clofibrate, diethylstilbestrol, D,L-ethionine, methyl carbamate, urethane, sodium phenobarbital (陽性対照として検討)]を癌原性試験または二段階発癌実験において発癌または発癌プロモーション作用の報告がある投与用量域で, ラットに 3 日間強制経口投与した。その後, 肝を摘出して組織切片を作製し, 免疫組織化学的手法により BrdU 染色を施して L.I. を算出した。各被験物質に対して 2 または 3 研究機関で試験を実施し, 2 機関以上で統計学的に有意な L.I. の上昇がみられた場合を陽性反応, 1 機関以上で有意な上昇がみられた場合を疑陽性反応, いずれの機関でも有意な上昇がみられなかった場合を陰性反応と評価した。Clofibrate は 62.5 および 250 mg/kg 投与群でそれぞれ 1 機関においてのみ検討されたため, 限定的な陽性または陰性と評価した。結果として, carbon tetrachloride, clofibrate, diethylstilbestrol, sodium phenobarbital, urethane は陽性, methyl carbamate は疑陽性, D,L-ethionine は陰性の結果であった(Table 2)。これらの判定結果は, 高用量単回投与による肝 RDS 試験での陽性/陰性の結果とほぼ一致しており, BrdU 持続ラベル法による肝 RDS 試験により, 長期投与が可能な用量域において非変異・肝癌



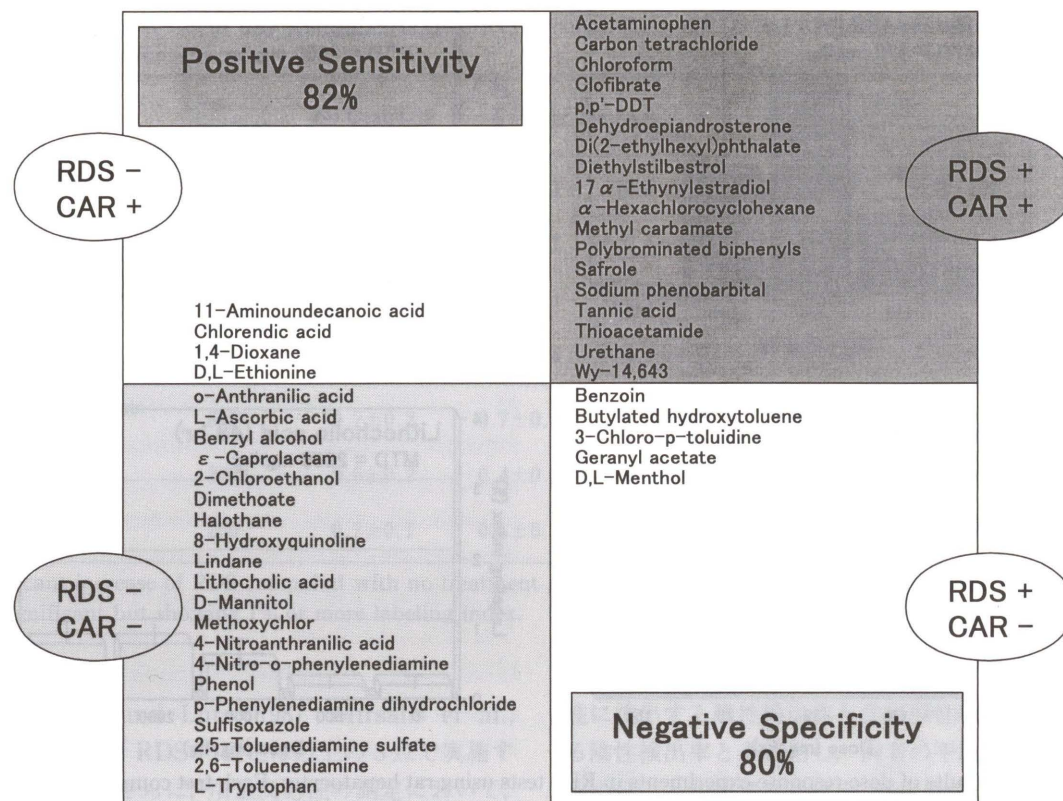


Fig. 4 Positive sensitivity (upper right column) and negative specificity (lower left column) in the RDS test using rat hepatocytes. The total concordance was 81% in this study. "CAR" in the figure means "carcinogenicity"

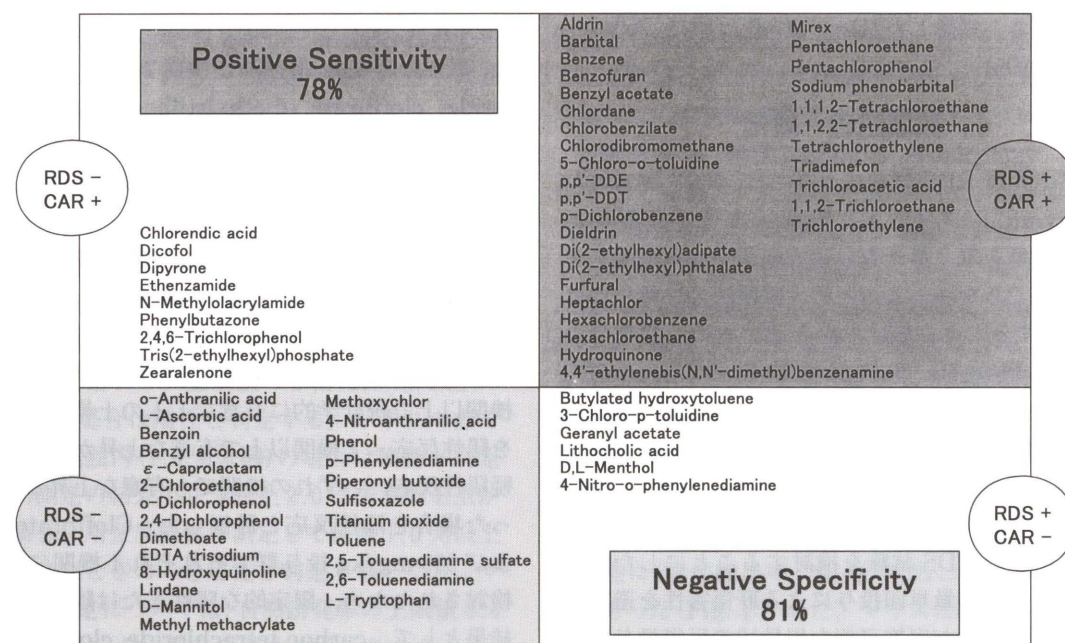


Fig. 5 Positive sensitivity (upper right column) and negative specificity (lower left column) in the RDS test using mouse hepatocytes. The total concordance was 79% in this study. "CAR" in the figure means "carcinogenicity"

Table 2 Summary of collaborative study results of RDS testing in three daily administrations of nongenotoxic hepatocarcinogens

Test chemical (CAS No.)	Dose (mg/kg)	Tumor induction/ promotion in rat livers	RDS test by 3 days dosing	cf. RDS test by single p.o.	References
Carbon tetrachloride (56-23-5)	50 100	+ +	± +	+ (400 mg/kg) <sup>a</sup>	Weisburger, 1977 ; Ito et al., 1988 ; Mirsalis et al., 1989
Clofibrate (637-07-0)	62.5 125 250	NT NT +	(-) + (+)	+ (235 mg/kg)	Reddy and Qureshi, 1979 ; Uno et al., 1994
Diethylstilbestrol (56-53-1)	0.125 0.25	NT +	± +	+ (500 mg/kg)	Ito et al., 1988 ; Uno et al., 1994
D,L-Ethionine (67-21-0)	62.5 125	NT +	- -	- (2000 mg/kg)	Ito et al., 1988 ; Uno et al., 1994
Methyl carbamate (598-55-0)	100 200 400	- - +	- ± ±	+ (1000 mg/kg)	Selkirk and Soward, 1993 ; Uno et al., 1994
Urethane (51-79-6)	50 100	NT +	- +	+ (500 mg/kg)	Adenis et al., 1968 ; Ito et al., 1988 ; Uno et al., 1994
Sodium phenobarbital (57-30-7) (positive control)	25	+	+	+ (38 mg/kg)	Ito et al., 1988 ; Gold et al., 1991 ; Uno et al., 1994

+ : positive, ± : equivocal, - : negative, (+) : limited positive, (-) : limited negative, NT : not tested,

a : minimum dose reported positive or negative

原性物質を検出可能なことが示唆された(Uno et al., 1999). また、肝発癌または発癌プロモーション作用を示す用量とRDS誘発を示す用量は概ね一致していた。単純に癌原性試験での陽性/陰性結果との一致性のみを考えれば、スクリーニングは単回投与の肝RDS試験で良いと考えられるが、被験物質の暴露量と肝発癌/発癌プロモーション作用の関連性もRDS誘発を指標としてある程度定量的に評価できる可能性がある点で、反復投与の肝RDS試験に利点があると考えられる。しかしながら、現時点ではまだ背景データが不十分であり、今後さらに検討を要する。

## 5. 肝RDS誘発機構と肝癌原性との関連

肝RDSの誘発機構は大きく2つに分類され、ひとつは肝細胞傷害性に引き続き誘発される代償性/再生性の肝細胞増殖であり、もうひとつは明確な肝細胞傷害性なしにRDSが誘発される、いわゆるmitogenesisである。前者については誘発機構がかなり解明されており、例えばcarbon tetrachlorideはラジカルの発生による膜傷害性によって肝細胞に損傷を与え(Zimmerman, 1978)、これにตอบสนองしてHGFなどの増殖因子が分泌されて、残存している肝細胞が増殖することが知られている(中村, 1990; Lindroos et al., 1991)。後者については主にリセプターを介した反応と推察され、例えばWy-14,643によるRDS誘発はperoxisome proliferator-activated receptor αを介したものであることが報告さ

れている(Peters et al., 1997)。

これらの誘発機構による肝細胞増殖と肝癌原性との関連については、次のような報告がある。Butterworthら(1995)は、肝細胞傷害性が知られているchloroformをマウスに投与し、代償性の肝細胞増殖を誘発する暴露量と肝癌原性を誘発する暴露量とが一致することから、chloroformの肝癌原性は肝細胞増殖に起因した2次的な変化で、肝細胞増殖を誘発しない暴露量では肝発癌のリスクが増加しないと考察している。また、Marsmanら(1988)は、Wy-14,643の反復投与により持続的に誘発される肝細胞増殖が肝発癌に重要な役割をはたすことを報告している。これらの報告と本研究において得られた結果から、化学物質のもつ肝細胞増殖作用が肝発癌の重要な要因になり得ることは明らかと思われる。その一方で、特にmitogenesisな作用による肝細胞増殖は肝癌原性との関連がないとする報告もあり(Ashby et al., 1986; Schmezer et al., 1990; Columbano et al., 1990)。本研究においてもD,L-mentholのような明らかな非癌原性物質が肝RDSを誘発した。逆に、D,L-ethionineのように肝RDSを誘発しない肝癌原性物質も存在する。当然のことながら、肝細胞増殖作用のみで肝癌原性の非遺伝毒性学的な誘発機構を説明できるとは思えず、別の観点からの検討(細胞間連絡の阻害、癌遺伝子/癌抑制遺伝子および関連蛋白の発現/抑制、アポトーシスの誘導/阻害など)が今後必要と思われる。



## 結 語

げっ歯類を用いる肝 RDS 試験法の確立と Ames 試験陰性の非変異・肝癌原性物質に対する有用性評価を行い、本試験が非変異・肝癌原性物質の短期検出法としてきわめて有用なことを明らかにした。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導下さった東京農大の吉川邦衛博士に深甚なる謝意を表します。本稿は、三菱東京製薬の高沢博修をはじめとする諸氏、三菱化学安全科学研究所の宮川誠博士、帝国臓器製薬の谷藤久氏をはじめとする非変異・がん原性物質への対策研究会の共同研究者各位との共同研究の成果をまとめたものであり、関係諸兄に心から感謝の意を表します。

## 参 考 文 献

- Adenis, L., A. Demaille and J. Driessens (1968) Pouvoir cancerigene de l'urethane chez le rat sprague, C.R. Soc. Biol.(Paris), 162, 458-461.
- Ashby, J., P.A. Lefevre, B. Burlinson and B. Beije (1986) Potent mitogenic activity of 4-acetylaminofluorene to rat liver, Mutat. Res., 172, 271-279.
- Bermudez, E., T. Smith-Oliver and L.L. Delehanty (1989) The induction of DNA-strand breaks and unscheduled DNA synthesis in F-344 rat hepatocytes following *in vivo* administration of caprolactam or benzoin, Mutat. Res., 224, 361-364.
- Busser, M.T. and W.K. Lutz (1987) Stimulation of DNA synthesis in rat and mouse liver by various tumor promoters, Carcinogenesis, 8, 1433-1437.
- Butterworth, B.E., E. Bermudez, T. Smith-Oliver, L. Earle, R. Cattley, J. Martin, J.A. Popp, S. Strom, R. Jirtle and G. M. Michalopoulos (1984) Lack of genotoxic activity of di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes, Carcinogenesis, 5, 1329-1335.
- Butterworth, B.E., J. Ashby, E. Bermudez, D. Casciano, J. Mirsalis, G. Probst and G. Williams (1987) A protocol and guide for the *in vivo* rat hepatocytes DNA repair assay, Mutat. Res., 189, 123-133.
- Butterworth, B.E. and T.L. Goldsworthy (1991) The role of cell proliferation in multistage carcinogenesis, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 198, 683-687.
- Butterworth, B.E., M.V. Templin, S.J. Borghoff, R.B. Conolly, G.L. Kedderis and D.C. Wolf (1995) The role of regenerative cell proliferation in chloroform-induced cancer, Toxicol. Lett., 82/83, 23-26.
- Columbano, A., G.M. Ledda-Columbano, M.G. Ennas, M. Curto, A. Chelo and P. Pani (1990) Cell proliferation and promotion of rat liver carcinogenesis: different effects of hepatic regeneration and mitogen induced hyperplasia on the development of enzyme-altered foci, Carcinogenesis, 11, 771-776.
- Doolittle, D.J., G. Muller and H.E. Scribner (1987) Relationship between hepatotoxicity and induction of replicative DNA synthesis following single or multiple doses of carbon tetrachloride, J. Toxicol. Environ. Health, 22, 63-78.
- Eldridge, S.R., L.F. Tilbury, T.L. Goldsworthy and B.E. Butterworth (1990) Measurement of chemically induced cell proliferation in rodent liver and kidney: a comparison of 5-bromo-2'-deoxyuridine and [<sup>3</sup>H] thymidine administered by injection or osmotic pump, Carcinogenesis, 11, 2245-2251.
- Furihata, C. and T. Matsushima (1995) *In vivo* short-term assays for tumor initiation and promotion in the glandular stomach of Fischer rats, Mutat. Res., 339, 15-35.
- Gold, L.S., T.H. Slone, N.B. Manley and L. Bernstein (1991) Target organs in chronic bioassays of 533 chemical carcinogens, Environ. Health Perspect., 93, 233-246.
- Gold, L.S., T.H. Slone, B.R. Stern and L. Bernstein (1993) Comparison of target organs of carcinogenicity for mutagenic and non-mutagenic chemicals, Mutat. Res., 286, 75-100.
- Ito, N., H. Tsuda, M. Tatematsu, T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki, S. Uwagawa, M. Kagawa, T. Ogiso, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima and M. Asamoto (1988) Enhancing effects of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats -an approach for a new medium-term bioassay system, Carcinogenesis, 9, 387-394.
- Lindroos, P.M., R. Zarnegar and G.M. Michalopoulos (1991) Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increase in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration, Hepatology, 13, 743-750.
- Lourey, D.J., T. Smith-Oliver, S. Strom, R. Jirtle, G. Michalopoulos and B.E. Butterworth (1986) Assessment of unscheduled and replicative DNA synthesis in hepatocytes treated *in vivo* and *in vitro* with unleaded gasoline or 2,2,4-trimethylpentane, Toxicol. Appl. Pharmacol., 85, 11-23.
- Lourey, D.J., T.L. Goldsworthy and B.E. Butterworth (1987a) The value of measuring cell proliferation as a predictive index of tissue-specific tumorigenic potential. In: B.E. Butterworth, T. Slaga (Eds), Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis, Cold Spring Harbor, NY, pp. 119-136.
- Lourey, D.J., T. Smith-Oliver and B.E. Butterworth (1987b) Assessment of unscheduled and replicative DNA synthesis in rat kidney cells exposed *in vitro* or *in vivo* to unleaded gasoline, Toxicol. Appl. Pharmacol., 87, 127-140.
- Marsman, D.S., R.C. Cattley, J.G. Conway and J.A. Popp (1988) Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid (Wy-14,643) in rats, Cancer Res., 48, 6739-6744.
- Mirsalis, J.C., C.K. Tyson, E.N. Loh, K.L. Steinmetz, J.P. Bakke, C.M. Hamilton, D.K. Spak and J.W. Spalding (1985) Induction of hepatic cell proliferation and unscheduled DNA synthesis in mouse hepatocytes following *in vivo* treatment, Carcinogenesis, 6, 1521-1524.
- Mirsalis, J.C., C.K. Tyson, K.L. Steinmetz, E.K. Loh, C.M. Hamilton, J.P. Bakke and J.W. Spalding (1989) Measurement of unscheduled DNA synthesis and S-phase synthesis in rodent hepatocytes following *in vivo* treatment: testing of 24 compounds, Environ. Mol. Mutagen., 14, 155-164.
- Miyagawa, M., H. Takasawa, A. Sugiyama, Y. Inoue, T. Murata, Y. Uno and K. Yoshikawa (1995) The *in vivo-in*

*vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test with hepatocytes prepared from male B6C3F1 mice as an early prediction assay for putative nongenotoxic (Ames-negative) mouse hepatocarcinogens, Mutat. Res., 343, 157-183.

Nakamura, T., Y. Tomita and A. Ichihara (1983) Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture, J. Biochem., 94, 1029-1035.

中村敏一(1990)肝細胞増殖因子の発見と構造決定,サイエンス, 20, 6-17.

Peters, J.M., R.C. Cattley and F.J. Gonzalez (1997) Role of PPAR $\alpha$  in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643, Carcinogenesis, 18, 2029-2033.

Reddy, J.K. and S.A. Qureshi (1979) Tumorigenicity of the hypolipidaemic peroxisome proliferator ethyl-alpha-p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats, Br. J. Cancer, 40, 476-482.

Schmezer, P., B.L. Pool, P.A. Lefevre, R.D. Callander, F. Ratpan, H. Tinwell and J. Ashby (1990) Assay-specific genotoxicity of N-nitrosodibenzylamine to the rat liver *in vivo*, Environ. Mol. Mutagen., 15, 190-197.

Selkirk, J.K. and S.M. Soward (Eds) (1993) Compendium of abstracts from long-term cancer studies reported by the National Toxicology Program of the National Institute of Environmental Health Sciences from 1976 to 1992, Environ. Health Perspect., 101 (suppl. 1), 194-195 (TR-328).

Steinmetz, K.L., C.K. Tyson, E.F. Meierhenry, J.W. Spalding and J.C. Mirsalis (1988) Examination of genotoxicity, toxicity and morphologic alteration in hepatocytes following *in vivo* or *in vitro* exposure to methapyrilene, Carcinogenesis, 9, 959-963.

Uno, Y., H. Takasawa, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata, M. Ogawa and K. Yoshikawa (1992a) *In vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic he-

patocarcinogens: I. establishment of a standard protocol, Toxicol. Lett., 63, 191-199.

Uno, Y., H. Takasawa, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata, M. Ogawa and K. Yoshikawa (1992b) *In vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: II. assessment of judgement criteria, Toxicol. Lett., 63, 201-209.

Uno, Y., H. Takasawa, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata and K. Yoshikawa (1994) An *in vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test using rat hepatocytes as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: screening of 22 known positives and 25 noncarcinogens, Mutat. Res., 320, 189-205.

宇野芳文, 高沢博修, 吉川邦衛 (1994) *In vivo-in vitro* ラット/マウス肝複製 DNA 合成(RDS)試験のプロトコール, 変異原性試験, 3, 174-181.

Uno, Y., K. Matsuura, M. Miyagawa, H. Takasawa, H. Tanifuji, K. Abe, A. Akimoto, K. Asanoma, K. Baba, H. Daigo, T. Hagiwara, K. Hirano, T. Inoue, Y. Kawano, K. Kijima, F. Sato, K. Shibata-Yoshida and E. Yamamura (1999) Rat liver *in vivo* replicative DNA synthesis (RDS) test for short-term prediction of nongenotoxic (Ames-negative) hepatocarcinogenicity: a collaborative study of the Nongenotoxic Carcinogen Study Group (NGCS) of Japan, Toxicol. Lett., 109, 105-114.

Weisburger, E.K. (1977) Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons, Environ. Health Perspect., 21, 7-16.

Yoshikawa, K. (1996) Anomalous nonidentity between Salmonella genotoxicants and rodent carcinogens: nongenotoxic carcinogens and genotoxic noncarcinogens, Environ. Health Perspect., 104, 40-46.

Zimmerman, H.J. (Ed) (1978) Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver, Appleton-Century-Crofts, New York.



## バイオケモプリベンション

### ——がん予防への新コンセプト——

西野 輔翼, 里見 佳子

京都府立医科大学生化学教室 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル

## Bio-chemoprevention

### —— New concept for cancer prevention ——

Hoyoku Nishino, Yoshiko Satomi

Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine  
Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

## Summary

Our aim of the study on anti-carcinogenic agents is the development of “designer foods” or “functional foods” for cancer prevention ; i.e., the creation of new type of foods, which are fortified the cancer preventive function. Food-originated anti-carcinogenic agents seem to be especially useful for this purpose.

As the prototype experiment to accomplish this project, we established mammalian cells synthesizing phytoene, an anti-carcinogenic carotenoid, by introduction of the crtB gene, phytoene synthase gene. Expression plasmid, pCAcrtB, was constructed to transfer the crtB gene to mammalian cells, and transfected to NIH3T3 cells and HeLa cells by electroporation and/or lipofection. Phytoene was detected in these cells.

Recently, we have also succeeded to express limonene synthase gene in mammalian cells. Since limonene has been suggested to be a possible anti-carcinogenic phytochemical, we will continue this study and lead it to future projects for the development of valuable functional foods.

**Keywords :** bio-chemoprevention, lactoferrin, carotenoids, terpenoids

## 緒 言

がんのケモプリベンションに関する研究は、40 年以上の歴史があり、天然化合物および合成化合物を用いて多くの試みが行われてきた。この間に、バイオテクノロジーの急速な発展がみられた。したがって、がんのケモプリベンションの分野においてもバイオテクノロジーの活用が当然積極的になされてきたであろうと普通であれば考えられるところである。ところが意外なことに、実際にはこれまでほとんど接点がなかったのである。われわれ

はバイオケモプリベンション、すなわちバイオテクノロジーを取り入れたケモプリベンションという戦略を提案して研究を進めているが、これは新しいコンセプトとして位置付けることができる。

バイオケモプリベンションの範囲は、制限のまったくない広いものであり、自由な発想で多彩な展開が可能である。本稿では、これまでにわれわれが試みてきた例を紹介するとともに、関連した研究について述べる。また、今後の展望や問題点についても考察してみたい。

## 実験材料・方法および結果

バイオケモプリベンションにおいて取り上げられる研究対象は、生合成のために必要な酵素群の遺伝子がすで

受付：2000 年 4 月 4 日 受理：2000 年 4 月 10 日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会シンポジウム I 「がん化学予防の分子生物学的アプローチ」で発表された。  
This paper was presented to the symposium I “Molecular approach of cancer chemoprevention” at the 28th JEMS annual meeting, 1999.



にクローニングされている化合物群である。したがって、基本的には合成経路が明らかにされている天然化合物を対象としている。もちろん、将来的には合成のプロドラッグを活性のあるケモプリベンターに変換させるための代謝系遺伝子が研究対象として取り上げられることなども予想されるが、現在までのところそのような例はない。現時点で、バイオケモプリベンションの研究対象となりうると考えられているものとしては、低分子化合物から高分子化合物にいたるまで、種々のものがあり、たとえば、カロテノイド、テルペノイド、ステロイドやサイトカイン、ペプチド、タンパク質など多彩なものを取り上げられている。もちろん、発がん抑制効果がすでに明らかになっている化合物であることが基本であるが、場合によっては、この点がはっきりしていなくても取り上げられることもあり得る。(たとえば、がん予防効果が期待されているものの確定的ではないという状況であっても、それ以外のメリットがあることは確実である場合などは対象となりえる。) また、ほとんどの場合、食品として利用することを目標としており、いわゆる機能性食品の開発の一環ととらえることができる。

#### 1. ラクトフェリン

ラクトフェリンは抗菌作用などの生体防御作用を持つタンパク質であるが、最近になって発がん抑制作用も持っていることが明らかになり注目されている。

このラクトフェリンを利用する場合、現在のところ大量に入手可能なのはウシ・ラクトフェリンである。しかし、もし、ヒト・ラクトフェリンを用いることが可能になればより望ましいことはいうまでもない。このような視点からヒト・ラクトフェリンを大量に産生する技術の開発が進められるようになり、その一環としてヒト・ラクトフェリンをミルク中に分泌する乳牛の開発が試みられた。その結果、すでに韓国などの研究グループがトランスジェニック牛を作製することに成功している。ただ、このプロジェクトにおいては、研究開始時点では、ラクトフェリンに発がん抑制作用のあることは知られていなかったため、がん予防に有用なミルクの開発を目指していたわけではない。また、生産コストが高すぎることから実用化にはいたっていないのが現状である。しかし、いずれにしても、バイオテクノロジーを応用して新しい食品を開発する試みとしてはさきがけとなるものであったという点で評価すべきであろう。動物性の食品としては、ミルクの他に、タマゴも興味のある研究対象である。鶏卵は、ヒト・ラクトフェリンを蓄積する可能性があるからで、もし、それが実現できれば低コストで大量生産できる道を開くことになる。また、養殖魚でのヒト・ラクトフェリン産生に関しても今後取り上げられる可能性がある。

さて、ラクトフェリンは、動物細胞が産生するタンパク質であるが、バイオテクノロジーを応用すれば植物で

も産生させることが可能である。事実、イネにヒト・ラクトフェリンを産生させる試みがいくつかの研究グループで進められており、一部では成功している。ただ、コメを食するためには通常、加熱のプロセスが必要であるため、タンパク性の化合物であるラクトフェリンはその過程で生理活性を失ってしまう。

そこで、加熱しないで食べるのできる野菜や果物にヒト・ラクトフェリンを産生させる試みが開始され、すでにトマトで成功している。われわれはイチゴ、バナナおよびミカンでヒト・ラクトフェリンを産生させるプロジェクトを今後の課題として提案しており、また、その他のグループでは大豆などをターゲットに取り上げている。今後の展開に注目したい。

ところで、ラクトフェリンは抗菌作用や抗ウイルス作用を持っているため、ラクトフェリンを産生できるようになった野菜や果物が病害を受けにくくなる特性を獲得する可能性もある。もし、そうであれば、がん予防機能を付加できるのみにとどまらないことになり、一石二鳥である。この点に関しては、動物性食品の場合にも重要な検討項目となる。家畜・家禽・養殖魚でも病害予防は大きな問題となっているからである。興味深いことに、養殖魚においては、餌にラクトフェリンを添加することによって病害が予防できることが実証され、抗生物質の投与量を減らすことが可能となるため、すでに実用化されている。もし、体内でラクトフェリンを産生できれば、体外からの投与は不必要になるのではないかと期待される。動物や植物だけではなく、微生物にヒト・ラクトフェリンを産生させる試みも行われている。先にも述べたようにラクトフェリンには抗菌作用があり、微生物がラクトフェリンを産生すれば自殺することになるのではないかという疑問が当然生じる。しかし、ラクトフェリンに耐性の微生物があることが明らかとなり、この問題点は解決可能であることがわかった。そして、実際に、ヒト・ラクトフェリンを産生しても生存可能な酵母が開発されたのである。多くの微生物が食品のプロセッシングなどに活用されているので、それらの微生物を対象としてヒト・ラクトフェリンを産生させる試みが今後も続けられるものと予測される。

なお、ラクトフェリンの抗菌作用および発がん抑制作用は、限定分解されて生じるペプチドであるラクトフェリシンにもあり、その効力はラクトフェリンよりも強い。そこで、食品中にラクトフェリシンを産生させる試みも進められており、すでにイネでは成功している。今後、イネ以外の食品でも同様の試みが行われるものと予測される。

#### 2. カロテノイド

がんと食品の関連を考える場合、がん予防効果を持つ成分に関しての探索研究をするとともに、食品因子が発がんの原因となっている場合があることも考察しなけれ

ばならない。実際、ヒトのがんの原因を分析した結果、約3分の1は食事が原因であると指摘されており、大きな問題なのである。その中で、動物性食品の脂質に関する問題を避けて通るわけにはいかない。すなわち、動物性脂質の摂取による発がん率の増加の問題である。特に、過酸化を受けた動物性脂質の危険性が指摘されている。しかし、その一方で、動物性食品が健康維持・増進に役立っていることは明らかである。したがって、動物性食品を安全に摂取できるようにするための技術を開発することはきわめて有意義である。特に、その技術によって、同時にがん予防効果という新しい機能を付加することも達成できるというケースでは、さらにその価値は高いものになる。そこで、われわれの研究グループでは、がん予防効果を持つ植物性抗酸化物質を動物性食品中で産生させる技術を開発することにした。

そのプロトタイプとして、フィトエン(カロテノイドの一種で抗酸化作用があり、また癌予防効果を示すことが証明されている)を動物細胞内で合成させるための基礎的な技術の開発を開始した。(ちなみに、フィトエンは細胞内で存在している場合安定であるが、単離・精製するときわめて不安定となる。したがって、フィトエンを外部から添加して用いる方法は効果を期待することができない。そこで、フィトエンを有効利用するためには細胞内で産生させる方法を開発することが必要となる。) フィトエンの直前の前駆体であるゲラニルゲラニルピロリン酸は動物細胞中に存在している。したがって、バイオテクノロジーを応用して動物細胞内にフィトエン合成酵素を発現させることができれば、ゲラニルゲラニルピロリン酸からフィトエンを産生できるようになる可能性が出てくる。このような戦略に基づいて実験を行い、培養動物細胞内でフィトエンを合成させることに成功した(Satomi et al., 1995)ので、以下にその概要を紹介する。まずフィトエン合成酵素遺伝子を組み込んだプラスミドを作成した。すなわち、強力なプロモーターおよびエンハンサーを持つプラスミドに、フィトエン合成酵素遺伝子 crtB を組み込んだ。(ここで用いた crtB 遺伝子は、*Erwinia uredovora* からクローニングされたものである。) crtB 遺伝子は PCR で必要量を調整した。この時、PCR に用いるプライマーを工夫することによって動物細胞内で発現しやすい DNA 断片を得た。すなわち、Kozack の配列や、動物における転写開始コドン ATG を含むように改変したプライマーを用いて PCR を行った。このようにして作成した crtB 遺伝子を組み込んだプラスミドを、エレクトロポレーションあるいはリポフェクションによって、動物細胞に導入し、フィトエンの産生に成功したのである。フィトエンを合成できるようになった細胞では、酸化ストレスがかかっても細胞の脂質過酸化が起こりにくくなることが明らかとなった。この点は、酸化しにくい(すなわち鮮度の維持が可能な)動

物性食品を開発できることにもつながる基礎的データが得られたということを意味しており、重要である。なお、興味深い点は、フィトエンを産生できるようになった細胞においては、活性化癌遺伝子による細胞のトランスフォーメーションも起こりにくくなったことである。いずれにしても、発癌予防効果を示す因子を含有し、同時に品質および安全性が向上した動物性食品を開発するための基盤技術が確立できたことになる。現在、フィトエンを産生するトランスジェニックマウスの作製を進めているところである。また、興味深いことに、スイセン由来のフィトエン合成酵素遺伝子をイネに導入してフィトエンを産生することに成功したという報告が、スイスとドイツの共同研究グループから出された(Burkhardt et al., 1997)。このケースでは、われわれの研究グループのようにフィトエンそのものを積極的に利用することを目的としているのではなく、フィトエンをプロビタミンA合成の中間体と位置付けている。すなわち、将来的にはイネに  $\beta$ -カロテンを産生させ、ビタミンA欠乏症を減少させるために利用することを目標としている。現在の世界をみた場合、栄養失調に苦しむ人々は数百万人以上に達しており、これらの経済的に貧困な地域に住む多くの人々にとってはビタミンA欠乏による盲目などの問題が大きな脅威になっている。したがって、その対策は重要であるが、このようなビタミンA欠乏の危険のある人々に、ビタミンの豊富な野菜や果物を供給しようとしても、社会経済的にみてきわめて困難である。このような状況を背景として、基本食である穀類にプロビタミンAを含有させるという戦略が立てられた。そのため、フィトエンを合成させる段階は、目標達成のための第一歩と位置付けられているのである。さて、この研究が進んで、最終的にビタミンA欠乏症を改善できた場合、先に述べたような盲目などを減少させることが達成できることになるが、注目に値することは、胃がんの予防にもつながる可能性があるという点である。(ビタミンA欠乏は胃がんのリスクを増加させる因子の一つであることが明らかになっているのである。) いずれにしても、この研究のインパクトは大きい。

ところで、最近になって、強力な発癌抑制効果ならびに抗酸化作用を持つことが明らかになり、注目されているリコピンはフィトエンからさらにもう一段階(あるいは二段階)の酵素反応で合成される。そこで、フィトエンを産生できるようになった細胞にさらにリコピン合成に必要な酵素遺伝子(群)を導入すれば、リコピンも産生できるようになるはずであり、われわれの次の課題として計画である。すなわち、われわれの研究グループにおいても、フィトエン産生のみではなく、さらにそれ以後のカロテノイド群の産生にも研究を展開していく計画である。

なお、リコピンに関しては食品分野ではないがバイオ



ケモプリベンションの一つの応用として腸内細菌をターゲットとした興味ある試みがなされているので紹介しておきたい。腸内細菌が発がんあるいはがん予防に影響を与える重要な因子の一つであることは以前から指摘されている。そこで、腸内細菌に対して遺伝子操作を加えることによってがん予防に有利な状況をつくり出そうというアイデアが提案された。そして、その一環として、腸内細菌にリコピンを産生させる試みが行われた。すでに、リコピンを産生する腸内細菌が得られており、このリコピン産生細菌を腸内へ戻した時にどのような効果が得られるのかを調べるための動物実験が進行中である。

次に、温州ミカンに豊富に含まれている $\beta$ -クリプトキサンチンに関してであるが、やはり強力な発がん抑制効果を持つカロテノイドの一種であり、バイオケモプリベンションの研究対象として取り上げられている。

$\beta$ -クリプトキサンチンは、 $\beta$ -カロテンヒドロキシラーゼによって $\beta$ -カロテンから合成される。しかし、注意すべき点は、この酵素はゼアキサンチンも合成できるということである。すなわち、本酵素を発現させても目的とする $\beta$ -クリプトキサンチンができるとは保証されないという問題がある。そこで、 $\beta$ -クリプトキサンチンを多く産生する温州ミカンから $\beta$ -カロテンヒドロキシラーゼをコードする遺伝子がクローニングされた。(温州ミカン由来の $\beta$ -カロテンヒドロキシラーゼであれば、ゼアキサンチンよりも $\beta$ -クリプトキサンチンを多く産生する活性のほうが高い可能性があるからである。)そして、このクローニングされた遺伝子をあらかじめ $\beta$ -カロテンを産生できるように改変した大腸菌に導入して温州ミカンタイプの $\beta$ -カロテンヒドロキシラーゼを発現させた。その結果、確かに $\beta$ -クリプトキサンチンが産生されることが証明されたのである。ただし、 $\beta$ -クリプトキサンチンのみが産生されたのではなく同時にゼアキサンチンも合成された。したがって、完全に目的が達成されたわけではない。また、目的とする食品中で働かせた場合に、 $\beta$ -クリプトキサンチンが産生されることを最終的には証明しなければならない。現在、食用酵母中に温州ミカン由来の $\beta$ -カロテンヒドロキシラーゼ遺伝子を導入して $\beta$ -クリプトキサンチンを産生させるプロジェクトが進行中である。

### 3. テルペノイド

モノテルペンであるリモネンは、発がん抑制効果が期待されている化合物である。カンキツ類にはd-リモネンが含有されており、シソなどではl-リモネンが含まれている。l-リモネン合成酵素(リモネンシクラゼ)の遺伝子に関しては、シソ科植物よりすでにクローニングされており、バイオケモプリベンションの研究対象として取り上げられている。現在、l-リモネン合成酵素遺伝子を導入することによって、動物細胞内でl-リモネンを産生させる試みを開始している。そして mRNA の発現はすで

に確認されており、続いてl-リモネンが産生していることを証明するための研究を進める計画である。

### 4. その他

ヒト・インターフェロンを産生する野菜や果物の開発は興味深い。経口摂取されたインターフェロンが生理的活性を示すという報告が以前になされたが、再現性がなく現在のところ否定的である。しかし、野菜や果物にインターフェロンを産生させて経口摂取した場合、もともと野菜や果物に豊富に含まれている種々の発がん抑制物質とインターフェロンとの相加・相乗効果によって優れたがん予防効果が得られる可能性は否定しきれない。

また、種々のサイトカインのうち、経口摂取した場合に有効である場合には、バイオケモプリベンションの研究対象となりうる。その他、ステロイド類やプロスタグランディン類の中には可能性のあるものが見出されるのではないかと期待されている。

## 考 察

バイオケモプリベンションの可能性について述べてきたが、実用化されるためには解決すべき問題点が多い。

その中で最も重要なことは、安全性をどのようにして確認するかという問題である。

大豆やトウモロコシなどの遺伝子組み換え作物はすでに市場に出まわっているが、それらの安全性に対して不安を感じている消費者は多い。そこで国際的な規制基準の作製が提案されており、その中で安全性の確認方法についても一定の方向が出されることになる。少なくとも決められた国際基準をクリアしていることがバイオケモプリベンションのための食品が受け入れられるために必須の条件であることはいままでもない。なお、バイオケモプリベンションのために開発された食品の場合、これまでのように害虫や雑草などを防ぐための遺伝子操作を行ったものではなく、機能性を高めるために遺伝子操作したものであるため、環境に対する悪影響は少ないであろうと予測されている。

次に大きな課題となるのはがん予防効果の確認を行うことがきわめて困難であるという点である。この問題はバイオケモプリベンションのために開発された食品のみに特有の課題というわけではなく、すべてのがん化学予防物質がかかえている課題である。そのため、効果の判定基準として最終的ながんの発生率の低下を指標とするのではなく、その代替として用いることができる短期判定指標の開発が現在進められているところであるが、それが確立されれば状況は改善される。

なお、がんのバイオケモプリベンションのために開発した食品が、がん以外の生活習慣病の予防にも役立つ可能性が高いことは注目に値する点であろう。新しい食品を創製することは大変な作業であるが、得られたものが応用範囲の広いものであれば取り組む価値は十分にあ

る。

## 謝 辞

本稿の中で紹介したわれわれの研究グループのデータは、生研機構、文部省、厚生省からの支援を受けて行わ

れた研究によって得られたものである。

## 参考文献

- 1) Burkhardt, P.K. et al. (1997) The Plant J., 11, 1071.
- 2) Satomi, Y. et al. (1995) Proc. Japan Acad., 71 Ser. B, 236.



## 新しい変異原検出法へのアプローチ

能美 健彦<sup>1</sup>, 葛西 宏<sup>2</sup><sup>1</sup> 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<sup>2</sup> 産業医科大学産業生態科学研究所 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1

私たちの身の回りには多数の環境変異原物質が存在し、これらの変異原が生体に作用することで突然変異が誘発される。この過程をさらに詳しくみると① DNA 損傷の誘発②損傷を受けた DNA の修復③修復を逃れた損傷が鋳型となって起こる DNA の複製④突然変異の誘発という4つのステップに分けられるように思う。今回のシンポジウムでは、この4つのステップのうち① DNA 損傷の誘発と④突然変異の誘発に焦点をあて、それぞれの段階を解析する新しい試みについて5名の演者より発表をいただいた。特に突然変異の誘発に関しては、欠失、転座といった非相同的組み換えに由来すると考えられる変異を中心に講演していただいた。

山口大学の佐々木先生からは、転座、挿入、染色体数の増加を解析する新しい分子細胞遺伝学的手法についてご講演をいただいた。また奈良県立医科大学の森先生からは、紫外線照射により形成される DNA 損傷を鋭敏に検出するモノクローナル抗体を用いた解析法についてご

講演をいただいた。放射線医学総合研究所の村上先生からは、原子間力顕微鏡を用いて DNA 損傷を直接目でみえるようにする新しい試みが紹介された。そして北里大学の池田先生からは、環境変異原によって誘発される非相同的組換えの機構についてご発表をいただいた。国立衛研の能美からは、トランスジェニックマウスを用いた点突然変異と欠失突然変異の効率的な検出法に関する研究成果を紹介させていただいた。

環境変異原も沢山みつがっているが、分析法の進歩に伴いこれまで検出されなかった物質が変異原として認識されるようになることが考えられる。同様に、高い検出感度を備えた新しいバイオアッセイ法の開発や、これまでとは異なる角度から変異や損傷を検出する手法の開発により、新しい変異原がみつけれられることが予想される。分子生物学と最新の分析化学とが車の両輪となり、新しい環境変異原研究の流れができることを祈って、このシンポジウムを企画した。



# トランスジェニックマウス *gpt delta* を用いた 点突然変異と欠失突然変異の検出

能美 健彦, 増村 健一

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

## Detection of the point mutations and deletions using *gpt delta* transgenic mouse

Takehiko Nohmi and Ken-ichi Masumura

Div. of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

### Summary

A novel transgenic mouse, named *gpt delta*, has been developed for the efficient detection of mutations *in vivo*. A feature of the assay system is the incorporation of two distinct positive selections for the detection of two different types of mutations, *i.e.*, point mutations and deletions. The first selection is 6-thioguanine selection, which uses the *gpt* gene of *E. coli* as a reporter and mainly detects point mutations such as base substitutions and frameshifts. Since the coding region of the *gpt* gene is 456 base pairs (bp), it is convenient for the identification of mutations by DNA sequencing. The second selection is Spi<sup>-</sup> selection, which uses the *red/gam* genes of  $\lambda$  phage as a reporter and preferentially detects deletion mutations with the molecular sizes from 1 bp to about 10,000 bp. The results of the mutation assay with ethylnitrosourea and gamma-ray irradiation are presented.

**Keywords :** *gpt delta* mouse, 6-thioguanine selection, Spi<sup>-</sup> selection, deletion mutation

### 緒 言

変異原のヒトに対するリスクを評価するためには、動物個体を用いた *in vivo* での突然変異検出系が重要である。しかし、*hprt* や *dlb-1* などの内在性遺伝子を指標とした *in vivo* 突然変異検出系は、検索できる組織が限定されてしまう点や、塩基配列レベルの詳細な解析が困難であるなどの問題を抱えている。近年、大腸菌やファージの遺伝子をレポーター遺伝子として組み込んだトランスジェニックマウスを用いて遺伝子突然変異を検出し分子レベルで解析することが可能になりつつある。体細胞

すべてにレポーター遺伝子のコピーを持っているため、個体の全組織を対象に変異原性の検索を行うことが可能である。このことは、変異原への暴露形態のみならず、発癌の臓器特異性や薬物代謝、さらに加齢や生殖細胞への影響などを考慮した変異原性評価を可能にする点で意義が大きい。現在商業的に入手できるものには大腸菌 *lacZ* 遺伝子をレポーターとする Muta<sup>TM</sup> Mouse (Gossen et al., 1989), *lacI* 遺伝子をレポーターとする Big Blue<sup>®</sup> mouse (Kohler et al., 1990 ; Kohler et al., 1991 a) がある。しかし、既存のトランスジェニックマウス突然変異検出系は必ずしも普及しているとはいえない。原因としては、変異体の検出や変異部位の同定に要するコストの問題や、放射線等で誘発される欠失変異の検出に効果的な系がないなどの点があげられる。われわれはこ

受付：2000 年 5 月 18 日 受理：2000 年 5 月 22 日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会シンポジウムII「新しい変異原検出法へのアプローチ」で発表された。  
This paper was presented to the symposium II "The approach to novel detection systems for environmental mutagens" at the 28th JEMS annual meeting, 1999.



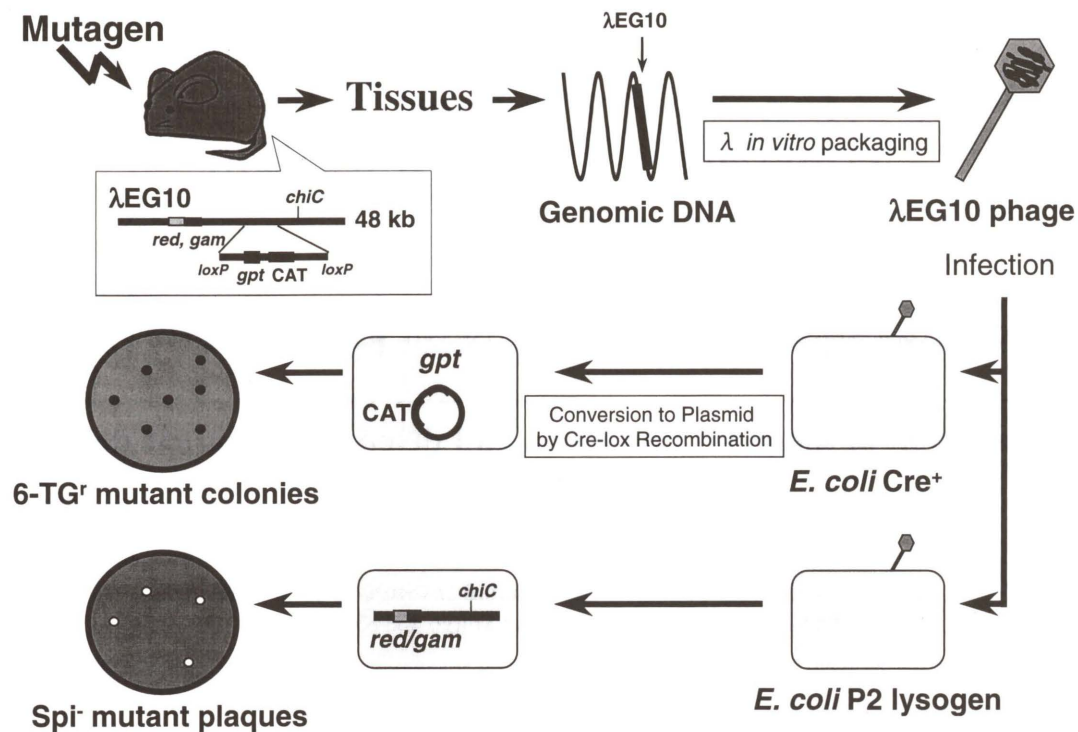


Fig. 1 Summary of *gpt* delta transgenic mouse mutagenicity assay.

うした点を改善するため、 $\lambda$ EG 10 DNA を組み込んだトランスジェニックマウス *gpt* delta を開発した(Nohmi et al., 1996). このマウスは、2つの検出法によって異なるタイプの突然変異を効率よくポジティブセレクションできる特徴を持っている。①大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとする 6-thioguanine セレクションは、主に点突然変異(塩基置換変異とフレームシフト)を検出する。②  $\lambda$  ファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターとする  $\text{Spi}^-$  セレクションは、主に欠失変異を検出する。本稿では *gpt* delta マウスを用いた突然変異検出系について解説する。

### 1. トランスジェニックマウスの作製

われわれは、点突然変異検出用の標的遺伝子である大腸菌 *gpt* 遺伝子と欠失変異検出用の標的遺伝子である  $\lambda$  ファージ *red/gam* 遺伝子を持つトランスジェニック  $\lambda$ EG 10 を構築した(Fig. 1).  $\lambda$ EG 10 は、chloramphenicol 耐性遺伝子(CAT)、大腸菌 *gpt* 遺伝子、pBR 322 由来の複製開始部位(ori)と一対の *loxP* 配列を持ったプラスミドを直鎖状にし、 $\lambda$  2001 DNA の *Hind* III 部位に挿入して作製された。 $\lambda$ EG 10 DNA をマイクロインジェクション法によりマウス受精卵に導入し、トランスジェニックマウス産仔(C57 BL/6J および BDF 1)を得た。これらのマウスについて PCR によって *gpt* 遺伝子の導入を確認した。導入された  $\lambda$ EG 10 の *in vitro* パッケージングによる回収効率を測定し、高い回収効率を得られた系統についてさらにサザンブロット法に

より導入遺伝子コピー数を概算したところ、ハプロイドあたりの導入コピー数は BDF 1 由来の #21 マウスで約 30 コピー、C57 BL/6J 由来の #30 マウスで約 80 コピーと算出された。

### 2. 6-TG セレクションによる点突然変異の検出

大腸菌 *gpt* 遺伝子は、purine サルベージ回路に関わる guanine phosphoribosyltransferase をコードしている。この酵素はグアニンのフォスホリボシル化を触媒し、グアニンの DNA への取り込み過程を担っている。一方でこの酵素は 6-thioguanin (6-TG) も基質とする。6-TG は DNA に取り込まれることで毒性を示すため、野生型の *gpt* 遺伝子を持った大腸菌は 6-TG を含む培地上で生育することができず、*gpt* 遺伝子に変異を持った大腸菌のみが 6-TG を含む寒天培地上で生育しコロニーを作る。これが *gpt* 遺伝子を用いたポジティブセレクションの原理である。大腸菌 *gpt* 遺伝子はバクテリアや培養細胞の系でも突然変異検出の標的遺伝子として用いられてきており、コード領域が 456 bp と小さいためシーケンシングによる変異の同定も比較的容易である。

実験方法の概略を Fig. 1 に示す。変異原で処理したマウスから組織 DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジェニック  $\lambda$ EG 10 をファージ粒子として回収する。回収したファージを Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG 6020 株に感染させると、 $\lambda$ EG 10 上にある一組の *loxP* 配列に挟まれた領域が Cre 組み換

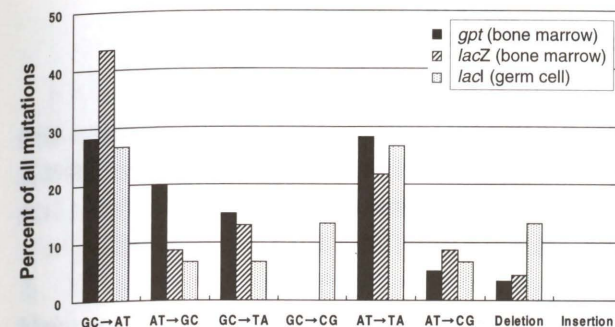


Fig. 2 ENU-induced mutation spectra analyzed by several transgenic mice systems. Bars represent the percentage of a particular type of mutation among total mutations identified. The source of the data is as follows: 60 *gpt* mutants from *gpt* delta mice in bone marrow (Masumura et al., 1999a); 23 *lacZ* mutants from the *lacZ* transgenic mouse strain 40.6 in bone marrow (Mientjes et al., 1998); 15 *lacI* mutants from *lacI* transgenic Big Blue™ mice in germ cells (Kohler et al., 1991b).

え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG 6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm)を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが 6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率が求められる。したがって、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異体頻度を算出する。

無処理および ethylnitrosourea (ENU) で処理したマウスにおける *gpt* 遺伝子突然変異体頻度を測定した結果を示す。トランスジェニックマウスをヘテロに持つ #21 系統マウス(BDF 1)の雄個体に ENU を単回腹腔投与(150 mg/kg body weight)し、7 日後に骨髄を回収した。ENU 処理群における *gpt* 突然変異体頻度は  $2.1-2.3 \times 10^{-4}$  であり、無処理群の骨髄と比較して変異体頻度は約 4-7 倍に上昇した。さらに、得られた変異コロニーからプラスミド上の *gpt* 遺伝子領域を PCR で増幅し DNA シーケンシングによって解析したところ、ENU 処理群では GC → AT 変異 (17/60)、AT → TA 変異 (17/60) が多くみられた(Fig. 2) (Masumura et al., 1999 a). 同様の特徴は *lacI*, *lacZ* 遺伝子をレポーターとしたトランスジェニックマウスや哺乳類培養細胞の *hprt* 遺伝子を用いた実験データからも得られている(Jansen et al., 1994; Kohler et al., 1991 b; Mientjes et al., 1998). 一方、無処理群においては GC → AT を主とした塩基置換変異およびフレームシフト変異がみられたが、大腸菌の自然突然変異で高頻度にみられる IS1 の挿入は観察されず、大腸菌における変異スペクトラムとは明らかに異なっていた。このことは、レポーター遺伝子上の突然

変異がマウス個体内で固定されていることを示している。

### 3. $\text{Spi}^-$ selection による欠失突然変異の検出

トランスジェニックマウス *gpt* delta は  $\text{Spi}^-$  セレクションを用いて欠失変異の検出が可能である。トランスジェニックの  $\lambda$ EG 10 には *red/gam* 遺伝子および *chi* 配列が存在する。 $\lambda$  ファージの *red/gam* 遺伝子は、ファージが感染した大腸菌の *recBC* 遺伝子機能を抑制し、自身の DNA が大腸菌の exonuclease により分解されるのを防ぐ。その結果ファージは増殖し寒天培地上にプラークを作る。しかし P2 溶原菌では、 $\lambda$  ファージの侵入により *recBC* 遺伝子が不活化されると P2 ファージの持つ Old 蛋白により宿主大腸菌を殺すので、結果的に  $\lambda$  ファージの増殖は抑止されプラークを生じない。この野生型  $\lambda$  ファージの P2 溶原菌に対する表現型を  $\text{Spi}^+$  (sensitive to P2 interference) と呼ぶ。一方、*red/gam* 両遺伝子機能が不活化している変異体ファージは P2 溶原菌に対してもプラークを形成することができる ( $\text{Spi}^-$ )。  $\text{Spi}^-$  ファージの増殖には宿主大腸菌が *recA*<sup>+</sup> であることが必要である。  $\text{Spi}^-$  表現型は *red/gam* 両遺伝子機能の不活化によりもたらされるため、  $\text{Spi}^-$  変異体は主に欠失型の変異を持つと考えられる。*red, gam* 遺伝子にそれぞれ独立した点突然変異が同時に生じる確率は非常に低いと考えられるためである。  $\text{Spi}^-$  セレクションが検出できる欠失変異の大きさは *in vitro* パッケージングを阻害しない範囲(約 10 kb)が上限と考えられるが、 $\lambda$ EG 10 がマウスゲノム上にタンデムに挿入されていることから、複数のユニットにまたがった大きな欠失変異も理論的には検出可能と思われる。

$\text{Spi}^-$  セレクションの実験方法の概略を Fig. 1 に示した。 *In vitro* パッケージングによって  $\lambda$ EG 10 を回収する段階までは 6-TG セレクションと共通である。回収されたファージを P2 溶原菌に感染させた後、 $\lambda$ トリプティック寒天培地にまいて 37°C で一晚培養し、  $\text{Spi}^-$  変異体プラークを得る。また、非溶原菌に感染させると全ファージが溶菌してプラークを作るので、ファージの回収効率が求められる。したがって、変異プラーク数を回収ファージ数で除して突然変異体頻度が算出される。

今回測定された無処理マウスの  $\text{Spi}^-$  突然変異体頻度は #30 マウス(C57 BL/6J)の骨髄で  $0.14 \times 10^{-5}$ 、#21 マウス(BDF 1)の精子で  $0.11 \times 10^{-5}$  であった(Nohmi et al., 1996). この値は、 *gpt* 遺伝子や *lacI*, *lacZ* 遺伝子をレポーターにしたトランスジェニックマウスにおける自然突然変異体頻度と比較して一桁ほど低い。 #21 系統の雄マウスに  $\gamma$ 線 5, 10, 50 Gy を照射し、3 日後に臓器を回収したところ、脾臓における  $\text{Spi}^-$  突然変異体頻



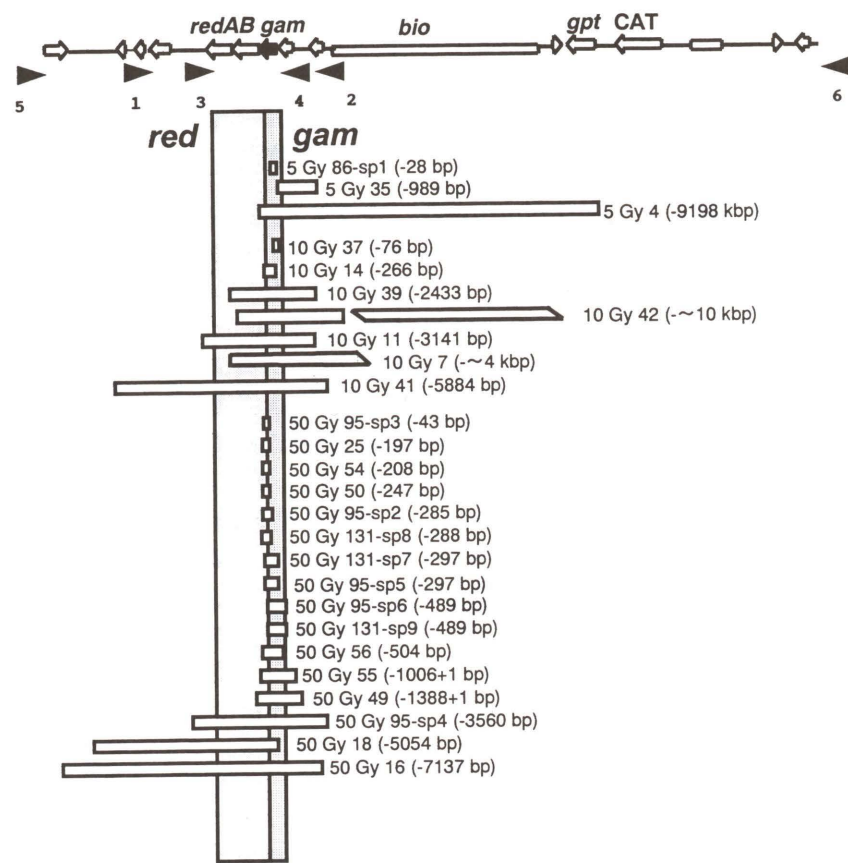


Fig. 3 A partial genetic map of the lambda EG10 transgene and the recovered  $\text{Spi}^-$  mutants from gamma-ray-irradiated mice. Gray columns represent the *gam/red* region. Arrows represent the position of PCR primers for the analysis of mutants.

度はそれぞれ  $0.7 \times 10^{-5}$ ,  $1.2 \times 10^{-5}$ ,  $2.0 \times 10^{-5}$  であり, 明らかな上昇が認められた (Nohmi et al., 1999). 照射マウス由来の  $\text{Spi}^-$  変異体について欠失部位を解析したところ, 最大で約 9 kb に及ぶさまざまな大きさの欠失変異が同定された (Fig. 3).  $\gamma$  線照射により生ずる  $\text{Spi}^-$  変異の多くは二重鎖切断を起こした DNA 末端同士が非相同的組換えにより連結して生じたものと考えられる.

非照射マウス由来の  $\text{Spi}^-$  変異体は, いずれも *gam* 遺伝子内の同一塩基が繰り返している配列 (repetitive sequence) 中で 1 bp のフレームシフトを起こしていた (\*). これは *gpt*, *lacI*, *lacZ* 遺伝子などの突然変異スペクトルとは大きく異なっている. これらのマウスの無処理群で観察される変異の多くは, CpG 部位で起こる G : C  $\rightarrow$  A : T トランジションや, G : C  $\rightarrow$  T : A トランスバージョンであり, こうした塩基置換は 5-メチルシトシンの脱アミノ化や DNA の酸化損傷により起こるものと考えられる (Bird, 1986 ; Moriya, 1993 ; Sagher and Strauss, 1983). しかし  $\text{Spi}^-$  セレクションでは *gam* と *red* の両方の遺伝子機能が不活化した変異を選択するため, 1 bp の塩基置換は  $\text{Spi}^-$  変異体を誘発することができない.  $\text{Spi}^-$  セレクションのこの特異性が, 他のセレク

ションに比べ自然突然変異頻度が低い原因と考えられる. Big Blue mouse や Muta mouse などのトランスジェニックマウスでは欠失変異は検出されにくいといわれているが (Suzuki et al., 1993 ; Tao et al., 1993), その原因の一つは, 塩基置換の自然突然変異頻度が高いため低い頻度でしか起きない欠失変異を検出にくいことにあると考える. 塩基置換を検出しない  $\text{Spi}^-$  セレクションの特異性が, 低い自然突然変異頻度と欠失変異の効率的な検出の原因と考えられる.

(\*) *gam* の終始コドンと *red* の開始コドンの間は 5 bp しか離れておらず, 両遺伝子の転写は連続していると考えられる. *gam* に 1 塩基の欠失が生じると, フレームシフトによって変異 *gam* の終始コドンが *red* のコード領域内にずれ込む. このため翻訳レベルでは Gam だけでなく Red 産物も機能的に不活化すると考えられる. したがって,  $\text{Spi}^-$  セレクションでは *red/gam* 両遺伝子にまたがる欠失変異に加え, *gam* 内での 1 塩基欠失を含むフレームシフト変異が検出される (Nohmi et al., 1999).

## 結 語

トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出系は個体全組織を解析対象とする *in vivo* 試験系であり, 臓器特異性や代謝能を反映した変異原性の検索と解析を可能にした点でその意義は大きい. 近年はポジティブセレクションの導入などにより実験操作の効率化が進んでいる.  $\lambda$  ファージの *cII* 遺伝子を用いた系なども, 既存の Muta mouse, Big Blue mouse に適用できる点やコード領域が約 300 bp と短く塩基配列の解析が容易なことなどから注目されている (Jakubczak et al., 1996). 効率の良い検出系の開発ならびにコストの軽減は今後も課題であろう.

今回開発された *gpt delta* マウスは, 同一サンプルから 2 つの検出法によって点突然変異 (塩基置換とフレームシフト) と欠失変異を選択的にポジティブセレクションし, 得られた変異体を塩基配列レベルで解析できる特徴を持っている. 現在 *gpt delta* mouse は C 57 BL 6/J 系統のホモ体で維持されており, FISH 解析によって 17 番染色体上に  $\lambda$  EG 10 DNA の導入が確認されている (Masumura et al., 1999 a). ゲノムへの導入コピー数は約 160 コピーとなる (ハプロイドあたり約 80 コピー). ホモ化された *gpt delta* mouse を用いて, 加熱食品に含まれるヘテロサイクリックアミンや, 紫外線等により誘発される突然変異の解析が進んでいる (Horiguchi et al., 1999 ; Masumura et al., 1999 b ; Okada et al., 1999). また, ノックアウトマウスとの交配による遺伝子機能の解析にも用いられている (Minowa et al., 2000).

トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出系は, 変異原性の検索に加え, 発がんや DNA 修復に関連した遺伝子を欠損させたマウスと交配させることで, 個体における発がんや DNA 修復メカニズムの解明に重要な役割を果たすものと考えられる. また,  $\text{Spi}^-$  セレクションは欠失変異を選択的に検出するユニークな検出系であり, 放射線をはじめとした DNA の切断や組換えが関与するタイプの変異原の検出および解析に有効と考えられる. 従来のシステムではみることのできなかった新しい突然変異生成機構の解明に寄与するものと期待される.

## 参考文献

- Bird, A. P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature*, 321, 209-213.
- Gossen, J. A., W. J. de Leeuw, C. H. Tan, E. C. Zwarthoff, F. Berends, P. H. Lohman, D. L. Knook and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice : a model for studying mutations *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 7971-7975.
- Horiguchi, M., K. Masumura, H. Ikehata, T. Ono, Y. Kanke, T. Sofuni and T. Nohmi (1999) UVB-induced *gpt* mutations in the skin of *gpt delta* transgenic mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, 34, 72-79.

- Jakubczak, J. L., G. Merlino, J. E. French, W. J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996) Analysis of genetic instability during mammary tumor progression using a novel selection-based assay for *in vivo* mutations in a bacteriophage lambda transgene target, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 9073-9078.
- Jansen, J. G., C. M. van Teijlingen, G. R. Mohn, A. A. van Zeeland and H. Vrieling (1994) AT base pairs are the main target for mutations at the *hprt* locus of rat skin fibroblasts exposed *in vitro* to the monofunctional alkylating agent *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, *Mutagenesis*, 9, 417-421.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, P. L. Kretz, A. Fieck, J. A. Sorge and J. M. Short (1990) The use of transgenic mice for short-term, *in vivo* mutagenicity testing, *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7, 212-218.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, J. A. Sorge, D. L. Putman and J. M. Short (1991a) Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lacI* gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 7958-7962.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, D. L. Putman, J. A. Sorge and J. M. Short (1991b) Analysis of spontaneous and induced mutations in transgenic mice using a lambda *ZAP/lacI* shuttle vector, *Environ. Mol. Mutagen.*, 18, 316-321.
- Masumura, K., M. Matsui, M. Katoh, N. Horiya, O. Ueda, H. Tanabe, M. Yamada, H. Suzuki, T. Sofuni and T. Nohmi (1999a) Spectra of *gpt* mutations in ethylnitrosourea-treated and untreated transgenic mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, 34, 1-8.
- Masumura, K., K. Matsui, M. Yamada, M. Horiguchi, K. Ishida, M. Watanabe, O. Ueda, H. Suzuki, Y. Kanke, K. R. Tindall, K. Wakabayashi, T. Sofuni and T. Nohmi (1999b) Mutagenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) in the new *gpt delta* transgenic mouse, *Cancer Lett.*, 143, 241-244.
- Mientjes, E. J., A. Luiten-Schuite, E. van der Wolf, Y. Borsboom, A. Bergmans, F. Berends, P. H. Lohman, R. A. Baan and J. H. van Delft (1998) DNA adducts, mutant frequencies, and mutation spectra in various organs of lambda *lacZ* mice exposed to ethylating agents, *Environ. Mol. Mutagen.*, 31, 18-31.
- Minowa, O., T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, M. Fukuda, M. Itoh, H. Takano, Y. Hippou, H. Aburatani, K. Masumura, T. Nohmi, S. Nishimura and T. Noda (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 4156-4161.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells : 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C  $\rightarrow$  T.A transversions in simian kidney cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 1122-1126.
- Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996) A new transgenic mouse mutagenesis test system using  $\text{Spi}^-$  and 6-thioguanine selections, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 465-470.
- Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999)  $\text{Spi}^-$  selection : An efficient method to detect gamma-ray-induced deletions in transgenic mice,



Environ. Mol. Mutagen., 34, 9-15.

Okada, N., K. Masumura, T. Nohmi and N. Yajima (1999) Efficient detection of deletions induced by a single treatment of mitomycin C in transgenic mouse *gpt* delta using the Spi(-) selection, Environ. Mol. Mutagen., 34, 106-111.

Sagher, D. and B. Strauss (1983) Insertion of nucleotides opposite apurinic/apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during *in vitro* synthesis: uniqueness of adenine nu-

cleotides, Biochemistry, 22, 4518-4526.

Suzuki, T., M. Hayashi, T. Sofuni and B. C. Myhr (1993) The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C *in vivo* using *lacZ* transgenic mice, Mutat. Res., 285, 219-224.

Tao, K. S., C. Urlando and J. A. Heddle (1993) Comparison of somatic mutation in a transgenic versus host locus, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 10681-10685.

Environ. Mutagen Res., 22: 91-95 (2000)

シンポジウムII

## 分子細胞遺伝学的手法によるがん細胞の 染色体遺伝子異常解析

佐々木 功典

山口大学医学部第二病理 〒755-8505 宇部市南小串 1-1-1

### Analysis of aberrations in chromosomes and genes by molecular cytogenetic methods

Kohsuke Sasaki, M.D.

Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minamikogushi,  
Ube 755-8505, Japan

#### Summary

Many novel methods have been developed for research of molecular and genetic biology with the advance of biotechnology, and technologies for molecular cytogenetics are so. In particular, FISH (fluorescence *in situ* hybridization), SKY (spectral karyotyping) and CGH (comparative genomic hybridization) are frequently used in experimental research fields. In this brief review article, I showed the application of the molecular cytogenetic methods to clinical oncology. In addition to these methods, recently developed DNA array technology, which is a powerful method for biological research and medical practice, is also mentioned.

Keywords: FISH, SKY, CGH, cancer, DNA, hybridization

#### 緒 言

最近の分子遺伝学の発達は著しく、FISH (fluorescence *in situ* hybridization)、さらにはその応用というべき CGH (comparative genomic hybridization)、SKY (spectral karyotyping) といった新しい解析方法は、従来の核型分析では同定できなかったあるいはきわめて困難な染色体異常や遺伝子変化を明らかにする細胞遺伝子学的手法として急速に普及している。

遺伝子解析の技術である fluorescence *in situ* hybridization (FISH) は、染色体や遺伝子を組織や細胞さらには染色体上において遺伝子の位置や数を *in situ* で直接視覚に捉えることができることに大きな特徴があ

る。すなわち、細胞一つ一つにおける変化を知ることができるので、癌組織のように腫瘍内 heterogeneity が存在する場合の解析にもきわめて有用な方法である。また、染色体上の座位を染色体上で *in situ* にて明らかにできる遺伝子 mapping にも利用されている。本稿では FISH の概略を紹介するが、ここでの内容は染色体を主なターゲットとする DNA-DNA ハイブリダイゼーションに限ることをおことわりしておく。なお、FISH の原理や手技自体はきわめて単純であるし、実際の手順についてもいくつかのプロトコール集が出版されており、それらを参考にすれば、誰にでも簡単に実施可能な技術となっている。以下に現在われわれの施設で利用している方法を順を追って紹介する。

#### 1. FISH

(a) 既知のゲノム DNA に対して特異性を有する

受付: 2000 年 4 月 3 日 受理: 2000 年 4 月 10 日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会シンポジウムII「新しい変異原検出法へのアプローチ」で発表された。  
This paper was presented to the symposium II "The approach to novel detection systems for environmental mutagens" at the 28th JEMS annual meeting, 1999.





Fig. 1 Analysis of chromosomal translocation by FISH. A case of t(8;9) in a baby. Chromosomes 8 and 9 show red and green fluorescence, respectively. Two kinds of fluorescence is seen one chromosome, representing t(8;9) (arrow)

DNA(塩基配列がわかっているかは問題ではない)をプローブとする FISH である。通常、FISH と称しているものはこれに属する。

#### 1. 染色体ペインティング

特定の染色体全体を覆う DNA をプローブとして用いる。この方法は染色体数異常の検出にも使用できるが、転座といった染色体の構造異常の解析にはきわめて有用である。特に、通常の染色体核型解析法では解析できないような小さな変化や複雑な変化にも対処できる。現在では、予め蛍光標識を施した DNA プローブが、必要な緩衝液や洗浄液等も一緒となったキットとして市販されており、誰でも簡単に実施できる。しかも、2種類の異なる蛍光色素で標識されたプローブが利用できるために、二色 FISH を行うことにより、2つの染色体相互の関係を簡単に知ることができる(Fig. 1)。このような多色 FISH は、転座の検索にはきわめて有用な手段となっており、実際に白血病の染色体転座、さらには遺伝子の再構成の検索に応用されている。この方法は、後に紹介する SKY に繋がるものである。FISH の好都合なことには、複雑な構造異常でなければ、分裂中期染色体標本を用いなくても、間期細胞でも染色体異常解析が可能である点にある。すなわち、interphase cytogenetics(間期核細胞遺伝学)は FISH の技術の導入によって初めて可能となった。この方法は、臨床材料、特に固形癌のように細胞培養が困難な検体においてはきわめて有用である。最近になって、一つの染色体全体(あるいは一部)に対して、多数のプローブを異なる蛍光色素を用いて標識することによって転座や逆位等の小さな変化を検出することが可能な rainbow (barcode) FISH も報告されている。

#### 2. 分光画像装置による 24 染色体の同時識別

最近、Schrock ら(1996)によって考案された方法である。複数の蛍光色素の組み合わせにより DNA プローブ

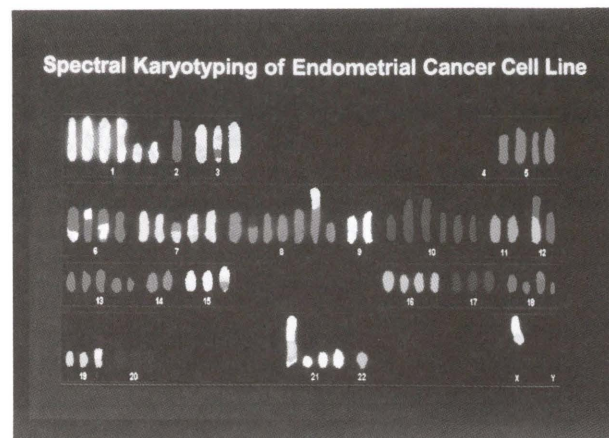


Fig. 2 SKY in a cell line of human endometrial cancer. It is easy to detect chromosomal translocation with multicolored chromosomes

を標識し、ハイブリダイゼーション後に各染色体について蛍光スペクトラムを解析することにより、一度に全染色体の識別を行う方法である。これは複雑な染色体構造異常の解析に有用であり、今後の臨床応用が注目されている。染色体の転座等の複雑な構造異常の解析にも有用である。現時点では5種類の蛍光色素を組み合わせることにより31種類(25-1)まで識別可能となっているが、実際には24種類の染色体を色を変えて表示している(Fig. 2)。ただし、分裂中期染色体標本が作製できる場合に限り、固形癌のように染色体標本の作製が困難な場合には事実上適用できないことは明らかである。これと類似した方法に M-FISH という方法があるが、これはフィルターを用いて各蛍光を識別する方法であるが、得られる結果は SKY と同様である。

#### 3. 染色体セントロメア

DNA プローブとして染色体特異的反復配列(主として alphoid satellite DNA sequence)を利用する染色体セントロメアの染色は、FISH のうちでも最も簡単であるし、解析も楽である。しかも、この方法は染色体の数的異常の解析には、きわめて有用かつ実用的な手段である。間期細胞においても染色体解析が可能であることは先にも述べたが、特に染色体数的異常の解析精度はきわめて高いといえる(Fig. 3)。染色体標本の作製が必要ではなく、細胞培養による artifact も排除できる。染色体ペインティングの場合と同様に異なる蛍光色素によって標識されたプローブを用いることにより、複数の染色体異常を同時に解析できるばかりではなく、同一細胞での相互の関係も知ることができる(Fig. 4)。実際の臨床検査としては、癌細胞の染色体解析や奇形に伴う染色体異常解析、さらに最近では、性の異なる骨髄移植の生着の早期判定において、日常的に利用されるようになっている。半日から1日程度で結果を得ることができる。

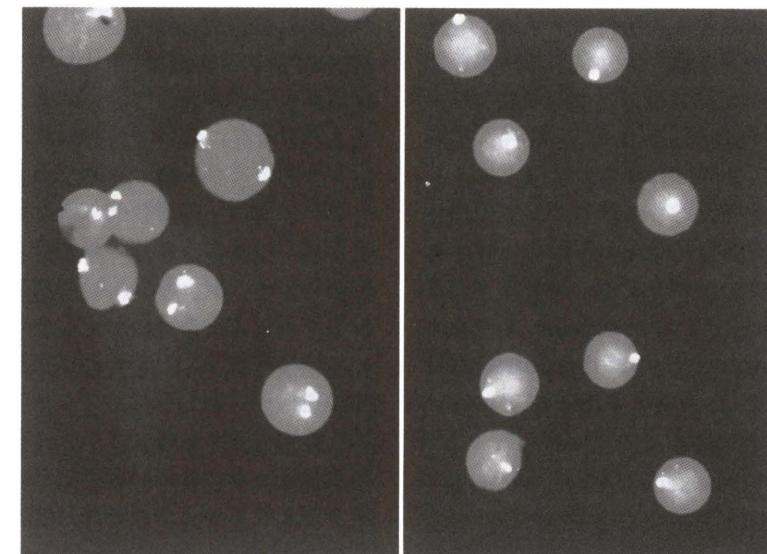


Fig. 3 FISH using DNA probe specific for X chromosome centomere. Cells from female have two spots (left), while cells from male have a single spot (right)

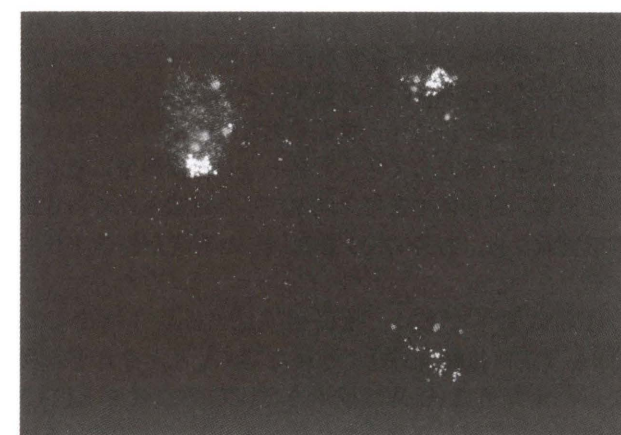


Fig. 4 Amplification of c-erbB-2 gene in a case of poorly differentiated gastric adenocarcinoma. A cluster of yellow color spots indicates amplification of c-erbB-2, and red spots represent centromere of chromosome 17

とも、臨床的観点からもこの方法の大きな利点の一つである。

#### 4. 特定の遺伝子染色

最近では、病気特異的遺伝子の発見があり、染色体における遺伝子座も次々に決定され、染色体異常と遺伝子異常とが疾患と直接に関係づけられるようになっている。遺伝子の点突然変異といった微細な解析は FISH の守備範囲ではないが、欠失や増幅といった遺伝子の量的異常は FISH によって十分に検出可能である。癌のように、遺伝子の増幅や欠失が高頻度に出現する場合には、FISH による遺伝子異常の検出も有意義となる。特に、癌のように heterogeneity が明らかに存在する場合には、各細胞での染色体や遺伝子レベルでの解析も可能となる。先にも述べたように、これらすべてが間期細胞にお

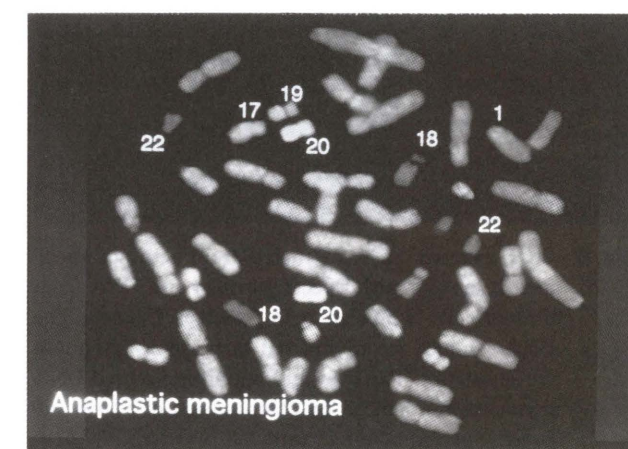


Fig. 5 Comparative genomic hybridization (CGH) applied to a case of meningioma. Green fluorescence represents gains of DNA copy number, and the entire of chromosome 20 is stained with green

いても解析できるという点も大きな長所である(Fig. 5)。

最近では、DNA fiber 上にて FISH を行い、gene mapping の詳細な解析を行う技術(fiber DNA FISH)も日常化しつつある。

以上述べてきた FISH は、プローブとして予めその特異性が知られている DNA を利用した解析である。今後多数の DNA プローブが市販されるとともに何れの病院にても一般的な検査法となるであろう。

(b) 次に紹介する FISH は、正常の染色体標本を用いて出処不明の DNA の特異性を決めるという手技である。すなわち、通常の FISH の逆であり、遺伝子のマッピングに相当する技術である。



## 1. マイクロダイセクション

通常の染色体標本において、見出された異常染色体や異常なバンドの出処が不明な場合には、その部分だけを顕微鏡下に切り出し、得られた DNA を PCR にて増幅し、それをプローブとして正常染色体とハイブリダイズさせることにより、その異常染色体や異常バンドの由来を明らかにすることができる。FISH の方法自体は上記の方法と変わるところはない。現在では、染色体バンドに相当した DNA が商品として入手可能となっている。

## 2. Comparative Genomic Hybridization (CGH)

腫瘍細胞遺伝学の領域では、通常の FISH・スタンダー

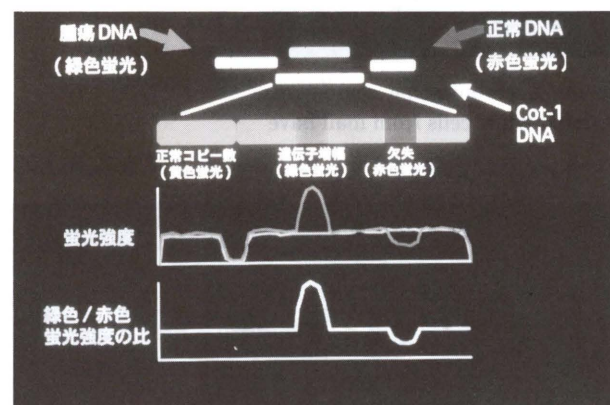


Fig. 6 CGH analysis. DNA extracted from a tumor specimen is labeled with SpectrumGreen and DNA from normal cells is labeled with SpectrumOrange. The DNA samples are hybridized to normal metaphase chromosomes. The over- and underrepresented DNA segments are depicted by computation of SpectrumGreen/SpectrumOrange ratio

ド FISH・に加えて、その応用である comparative genomic hybridization (CGH) が急速に注目されるようになってい。これは、1992 年に Kallioniemi らによって開発され、現在多くの研究者ばかりではなく臨床家からも期待されている技術である。

腫瘍は遺伝子の増幅や欠失を伴った複雑な染色体異常をしばしば呈する。癌の発生や進展といった癌の生物学的解析には、遺伝子 (DNA) の増幅や欠失といった異常の検出が不可欠である。しかしながら、すべての遺伝子をつ一つ解析していくことは実際上不可能であるし、未知の遺伝子に関しては、プローブが用意されていないために検索することもできない。効率的かつ短時間で既知の遺伝子も含めて広い範囲にわたる染色体レベルでの検索が望まれているが、それに応えることのできる技術がこの comparative genomic hybridization (CGH) である。この技術の最大の特徴は、一度のハイブリダイゼーションで、全染色体について DNA コピー数の増減 (量的異常) を検出することが可能という点にある。最近では、CGH といって通用するほどに知られた技術である。CGH には特殊な画像解析装置が必要であるが、いくつかのシステムが本邦にでも簡単に入手できる。この数年のうちに腫瘍の染色体・遺伝子異常の解析の手技の一つとして急激に普及していくであろうことは想像に難くない。実際、染色体や遺伝子関連記事の掲載されている英文学術誌では、毎号 CGH を利用した研究が報告されている。

原理は簡単である。腫瘍組織 (細胞) より抽出した DNA と正常組織 (細胞) より得た DNA とをそれぞれ異なる蛍光色素 (通常は前者を FITC で後者を RITC) で標識し、同時に正常染色体標本とハイブリダイズさせ

る (Fig. 6)。両者の濃度比に応じて競合的に標的染色体 DNA とハイブリダイズするので、癌組織にて増加・増幅している遺伝子・染色体部分は緑色の蛍光をより強く発するし、逆に欠失している場合は相対的に正常 DNA が多くハイブリダイズするので赤色が強くなる。すでに遺伝子とその染色体における座位が知られていれば、その遺伝子の異常の可能性が最も高いことになるし、そうでない場合は新しい癌関連遺伝子の探査につながる。この方法で解析可能な DNA の大きさは異常の程度にもよるが、一般的には 10 MB 程度以上であり、point mutation は検出できないといった欠点はあるが、すべての染色体の全体あるいは一部の量的異常を検出するのに威力を発揮する (Fig. 7)。Gene hunting の目的ばかりではなく、今後臨床的に一層広く利用されるようになるであろう。

## 2. DNA アレイ

ここで扱う項目ではないかもしれないが、現在ではこの技術も細胞遺伝学的研究や診断に取り入れられており、若干の紹介をさせていただく。紹介記事は毎日のように出ているので、それらを参考にされたい。

DNA chip あるいは DNA microarray は、一度に多

数の DNA を解析できる方法として注目されている。遺伝子の塩基配列の決定や遺伝子発現モニタリングといったことは当然として、特に細胞機能や SNPs (single-nucleotide polymorphisms) の解析には、威力を発揮するものとして注目されている。現在では、種々の chip が商品として入手可能であり、また受託作製も可能なほどに急速に普及しており、研究や医療に取り入れられるようになってい。本邦でも国策として、レディメイドの医療からテーラーメイドの医療を目指した SNPs 解析技術開発には大きな予算をつけている。

## 参考文献

- Kallioniemi, A., P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J.W. Gray, F.M. Waldman and D. Pinkel (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *Science*, 258, 818-821.  
Schrock, E., S. du Manoir, T. Veldman, B. Schoell, J. Wienberg, M.A. Ferguson-Smith, D.H. Ledbetter, I. Bar-Am, D. Soenksen, Y. Garini and T. Ried (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes, *Science*, 273, 494-497.

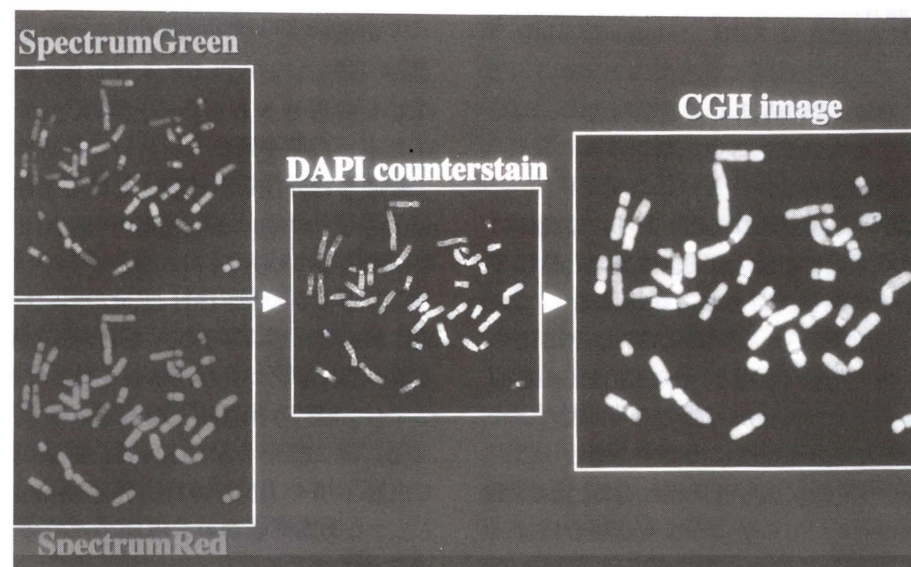


Fig. 7 A CGH image is constructed by green, red and blue fluorescence images



# 紫外線で誘発される DNA 損傷とその修復を ヒト細胞核内で立体的にみる

森 俊雄

奈良県立医科大学ラジオアイソトープ実験施設 〒 634-8521 奈良県橿原市四条町 840

## Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei

Toshio Mori, Ph.D.

Radioisotope Research Center, Nara Medical University, Kashihara, Nara 634-8521, Japan

### Summary

Two major DNA damage produced by 254-nm UV light are cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) and (6-4) photoproduct (6-4PP). Both photolesions are repaired in normal human cells by nucleotide excision repair (NER). However, little is known about where CPDs are repaired or where 6-4PPs are repaired in relation to the various sub-nuclear structures. The present study was performed to aim at three-dimensional demonstration of UV-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. We first investigated the repair kinetics of CPD and 6-4PP using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with damage-specific monoclonal antibodies in normal human and xeroderma pigmentosum complementation group C (XP-C) cells. We also examined the kinetics of repair DNA synthesis (unscheduled DNA synthesis, UDS) using a quantitative immunofluorescence method with anti-5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. We confirmed the normal repair in normal human cells and the impaired repair in XP-C cells. Then, using laser scanning confocal microscopy, we succeeded in three-dimensional visualization of the nuclear localization of CPDs, 6-4PPs and UDS in individual human cells. The typical three-dimensional images of photolesions or UDS at various repair times reflected well the repair kinetics obtained by ELISA or immunofluorescence. The important finding is that the punctate, not diffusely spread, nuclear localization of unrepaired 6-4PPs was found at 2 h after irradiation. Similarly, the focal nuclear localization of UDS was observed both during the first and the second 3h-repair periods. The present results suggest that both 6-4PPs and CPDs are non-randomly repaired from nuclei in normal human cells.

**Keywords :** cyclobutane pyrimidine dimer, (6-4) photoproduct, xeroderma pigmentosum, unscheduled DNA synthesis, immunofluorescence

### 結 言

太陽光に含まれる紫外線(特に, B 紫外線)は細胞 DNA 中にシクロブタン型ダイマー(CPD)や(6-4)型ダ

イマー(6-4 PP)といった DNA 損傷を誘起し, 皮膚がんを発生させる(Clingen ら, 1995). ヒトにおいては, これらの DNA 損傷はヌクレオチド除去修復機構(NER)によって修復され, 修復機構に欠陥を持つ常染色体劣性遺伝病, 色素性乾皮症(XP)患者では太陽光被ばく部位の皮膚がん発生頻度は著しく高くなる(Cleaver ら, 1995). 近年, DNA 修復研究は驚くべき速度で進展し, E を除いて

受付: 2000 年 3 月 31 日 受理: 2000 年 4 月 10 日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会シンポジウム II 「新しい変異原検出法へのアプローチ」で発表された。  
This paper was presented to the symposium II "The approach to novel detection systems for environmental mutagens" at the 28th JEMS annual meeting, 1999.



8種類の相補性群(A-G, variant)からなるXPの原因遺伝子すべてがクローニングされるに至った。また、精製修復蛋白を用いて修復反応を試験管内で再構築することが可能となり、NERは約30種類の蛋白が順序よく関与する反応であることが明らかとなってきた(Sancar 1994, Aboussekhra ら, 1995)。こうした中、修復蛋白の一つであるXPGは細胞核内でドット状に分布し、修復に伴い再分布することが報告された(Park ら, 1996)。この結果は、試験管内修復実験に加えて、DNA損傷や修復酵素を実際の修復反応の場である細胞核内で観察することの必要性を示唆するものである。そこで本実験では、主要な2種類の紫外線誘発DNA損傷の生成および修復について、われわれが樹立した損傷特異モノクローナル抗体を共焦点レーザー顕微鏡に應用することにより個々の細胞レベルで三次元的に可視化することを試みた。

## 実験材料および方法

### 1. 細胞

正常ヒト皮膚由来(MSU-1, MSU-2)、および相補性群Cに属するXP患者皮膚由来(XP1CTA)の線維芽細胞を実験に用いた。細胞はグルベッコ変法MEM培地に10%の牛胎児血清を加えた培養液中で培養した。

### 2. CPD および 6-4 PP の修復動態の解析

細胞に紫外線(主として254 nm)を照射した直後および各時間修復後にDNAを抽出し、損傷特異モノクローナル抗体(CPDに対するTDM-2抗体、6-4 PPに対する64 M-2抗体)を利用したELISA法(酵素標識免疫法)により各サンプルDNA中の損傷を定量した(Mori ら, 1991)。

### 3. 細胞内DNA損傷の三次元的可視化

細胞に紫外線を照射した直後および各時間修復後に細胞を固定し、細胞DNAを変性した後、損傷特異モノクローナル抗体、Biotin標識2次抗体、さらにStreptavidin-FITCによりDNA損傷を蛍光染色した。同時に、細胞核DNAをpropidium iodide(PI)で蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡(InSIGHTplus-IQ, Meridian Instruments社製)を用いて蛍光画像を作成し、各サンプル当たり0.2  $\mu$ m間隔の約25枚の連続平面画像を付属したソフトで立体化し三次元画像を構築した(Nakagawa ら, 1998)。

### 4. 修復DNA合成(不定期DNA合成)動態の解析およびその三次元的可視化

紫外線照射後、細胞をfluorodeoxyuridineおよびbromodeoxyuridine(BrdU)存在下で種々の時間修復培養した。細胞を固定しDNAを変性させた後、抗BrdUモノクローナル抗体、Biotin標識2次抗体、さらにStreptavidin-FITCにより修復DNA合成部位を蛍光染色した。同時に、細胞核DNAをPIで蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、1サンプル当たり約

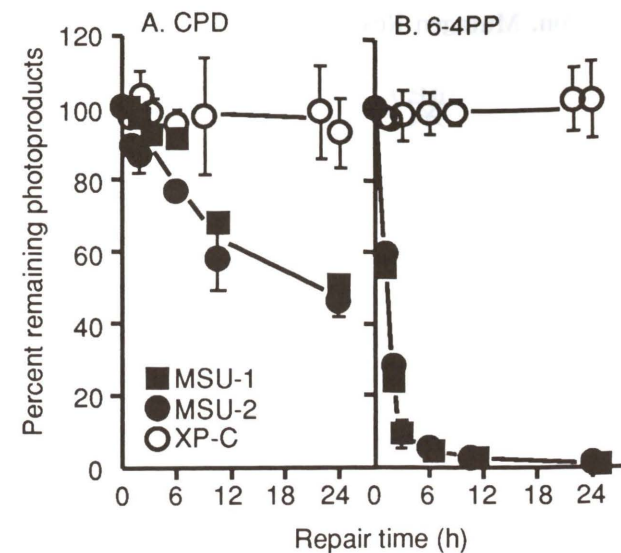


Fig. 1 The repair kinetics of CPD (A) and 6-4PP (B) from genomic DNA in normal human and XP-C cells

100細胞について、単個細胞当たりのFITCおよびPIの蛍光量を定量し、修復DNA合成量をFITC/PIとして計算した。なお、サンプル中に一部混入する定期DNA合成細胞はきわめて強力なFITC蛍光を示し、修復DNA合成の計算から除外した。

また、これらの細胞において、3と同様の方法で三次元蛍光画像を構築した。

## 結果

### 1. ヒト細胞におけるCPDおよび6-4 PPの修復動態の定量

Fig. 1に、30 J/m<sup>2</sup>の紫外線を照射された正常およびXP-C細胞におけるCPDおよび6-4 PPの修復動態のELISA法による定量の結果を示す。二つの正常細胞はほぼ同様の修復動態を示した。つまり、6-4 PPの90%以上を3時間以内に修復し、また、CPDの40%および50%をそれぞれ照射後10および24時間に修復除去した。一方、XP-C細胞は照射後24時間以内に両損傷をほとんど修復できなかった。

### 2. 細胞内DNA損傷の三次元的可視化

Fig. 2に、30 J/m<sup>2</sup>の紫外線照射直後および修復過程の正常細胞(MSU-2)における6-4 PPおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像を示す。画像は細胞核の下側半分のみを表示しており、細胞核内部の観察を可能とした。また、損傷の画像を大きく示し、対応する細胞核DNAを右下に小さく表示した。未照射の細胞には6-4 PPを示す蛍光画像はほとんどみられなかった(Fig. 2A)。しかし、照射直後には強い画像が得られた(Fig. 2B)。損傷とDNAの三次元蛍光画像が重なり合うことから、6-4 PPが細胞核内一面に誘発されていることがわかる。6-4 PPの蛍光画像は照射後の修復時間に依存して次第に弱まっ

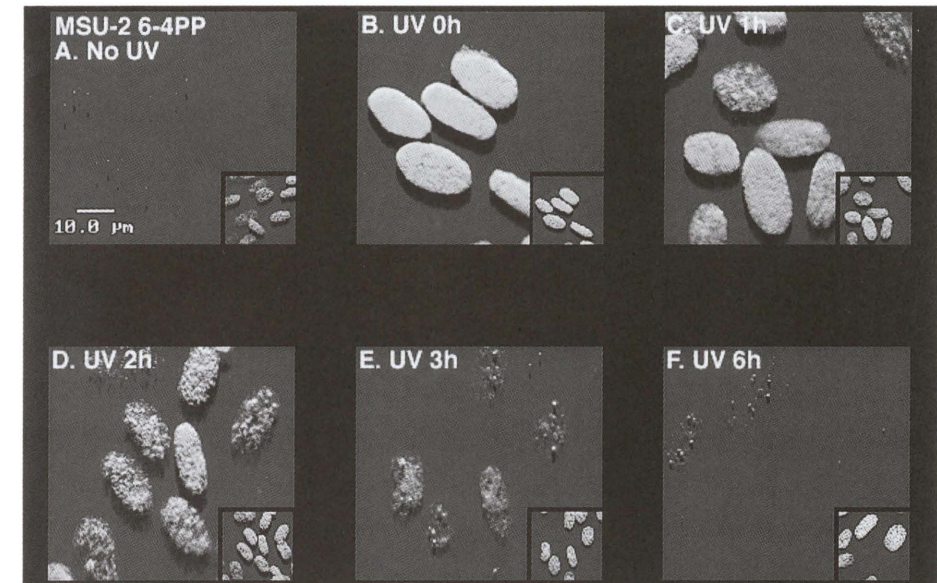


Fig. 2 Typical three-dimensional fluorescent images of 6-4PP (higher magnification) and nuclear DNA (lower magnification) in normal human cells. (A) No UV; (B) UV, No repair; (C) UV, 1 h repair; (D) UV, 2 h repair; (E) UV, 3 h repair; (F) UV, 6 h repair. Scale bar, 10  $\mu$ m

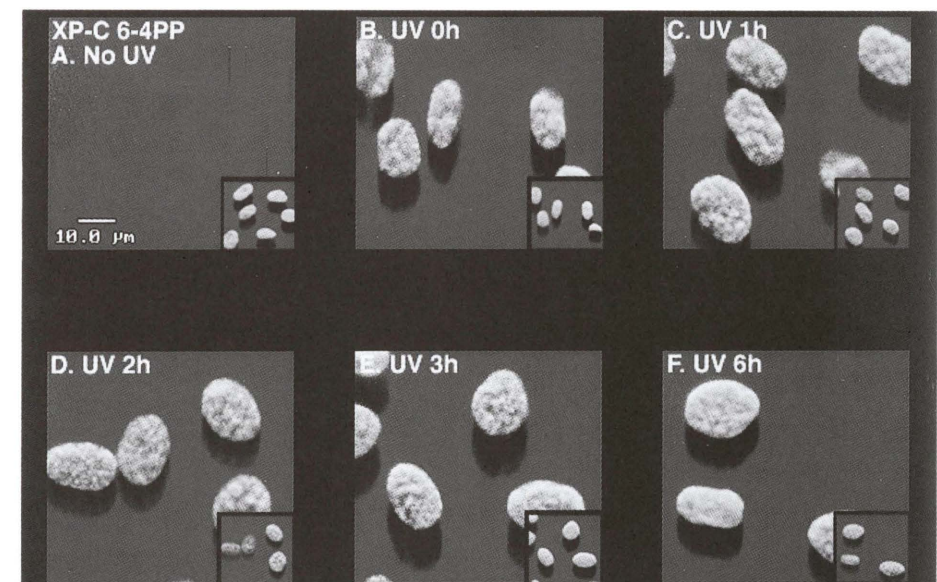


Fig. 3 Typical three-dimensional fluorescent images of 6-4PP (higher magnification) and nuclear DNA (lower magnification) in XP-C cells. (A) No UV; (B) UV, No repair; (C) UV, 1 h repair; (D) UV, 2 h repair; (E) UV, 3 h repair; (F) UV, 6 h repair. Scale bar, 10  $\mu$ m

た(Fig. 2C-F)。興味あることに、修復2時間後に修復されずに残った6-4 PPの画像は細胞核内でドット状にみられた。

Fig. 3に、30 J/m<sup>2</sup>の紫外線照射直後および修復過程のXP-C細胞における6-4 PPおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像を示す。MSU-2細胞の場合と同様に、未照射の細胞には6-4 PPの蛍光画像はほとんどみられないが(Fig. 3A)、照射直後にはDNA画像と重なり合う明るい蛍光画像が得られた(Fig. 3B)。しかしながら、6-4 PP

の明るい蛍光画像は照射後6時間修復させても何ら変化しなかった(Fig. 3C-F)。

Fig. 4に、30 J/m<sup>2</sup>の紫外線照射直後および修復過程の正常細胞(MSU-2)におけるCPDおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像を示す。未照射の細胞にはCPDの蛍光画像はほとんどみられないが(Fig. 4A)、照射直後には明るい蛍光画像が得られた(Fig. 4B)。照射6時間後でも、CPDの明るい蛍光画像に大きな変化がみられなかった。これは高々20%しか修復されないとするELISAの



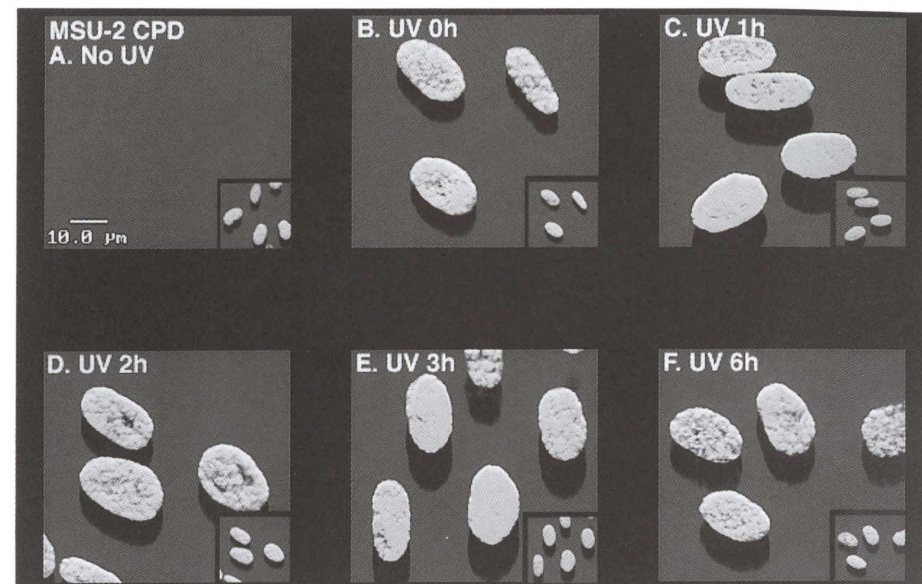


Fig. 4 Typical three-dimensional fluorescent images of CPD (higher magnification) and nuclear DNA (lower magnification) in normal human cells. (A) No UV; (B) UV, No repair; (C) UV, 1 h repair; (D) UV, 2 h repair; (E) UV, 3 h repair; (F) UV, 6 h repair. Scale bar, 10  $\mu$ m

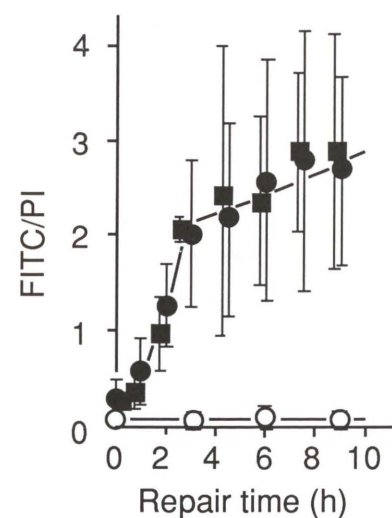


Fig. 5 The kinetics of UV-induced UDS in normal human and XP-C cells. Symbols are same as those in Fig. 1

結果(Fig. 1)とつじつまが合う。

### 3. 修復 DNA 合成(不定期 DNA 合成)動態の定量

Fig. 5 に、30 J/m<sup>2</sup> の紫外線を照射後の正常および XP-C 細胞における修復 DNA 合成動態の定量的結果を示す。二つの正常細胞はほぼ同様の修復 DNA 合成動態を示した。照射後 3 時間まではきわめて効率が良かったが、それ以降は効率が低下した。一方、XP-C 細胞は照射後 9 時間の間全く修復 DNA 合成を示さなかった。

### 4. 細胞内修復 DNA 合成の三次元的可視化

Fig. 6 に、30 J/m<sup>2</sup> の紫外線照射後の正常細胞(MSU-2)における修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。修復が始まっていない照射直後には修復 DNA 合成を示す蛍光画像が全くみられないが(Fig. 6A), その後修復時間に依存して次第に画像は明るくなった(Fig. 6B-E)。修復 3 時間で、修復 DNA 合成蛍光画像が細胞核内でドット状を示すのが興味深い。

Fig. 7 に、30 J/m<sup>2</sup> の紫外線照射 XP-C 細胞における修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。照射後 6 時間まで、全く修復 DNA 合成が行われていないことがわかる。

また、Fig. 8 に、30 J/m<sup>2</sup> の紫外線照射直後からの 3 時間、および 3 時間目から 6 時間目にかけての 3 時間における正常細胞(MSU-2)の修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。どちらの場合も修復 DNA 合成蛍光画像が細胞核内でドット状を示した。

### 考 察

254 nm 紫外線はヒト細胞 DNA 中に主に CPD と 6-4 PP を誘起する。さらに、CPD と 6-4 PP は共通して NER で修復され、損傷を含む約 30 ヌクレオチドが DNA から修復除去された後、生じたギャップは修復 DNA 合成によってうめられる。それゆえ、Fig. 1 と Fig. 5 の結果を比較することで、それぞれの損傷の生成割合などが計算できる。計算の結果、6-4 PP の CPD に対する生成割合は 0.34 となった。また、照射後 3 時間までの修復 DNA 合成は、75 % の 6-4 PP と 25 % の CPD が関与

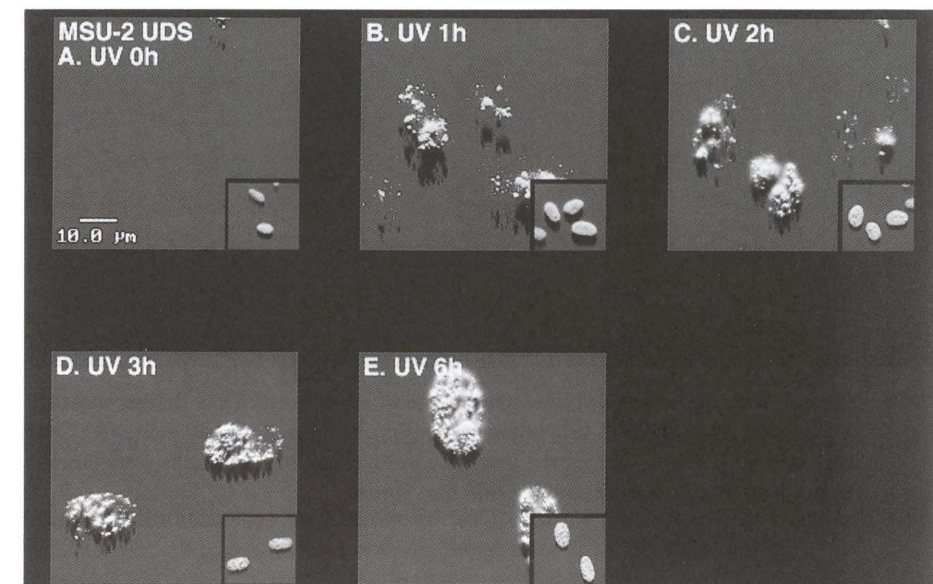


Fig. 6 Typical three-dimensional fluorescent images of UV-induced UDS (higher magnification) and nuclear DNA (lower magnification) in normal human cells. (A) No repair; (B) 1 h repair; (C) 2 h repair; (D) 3 h repair; (E) 6 h repair. Scale bar, 10  $\mu$ m

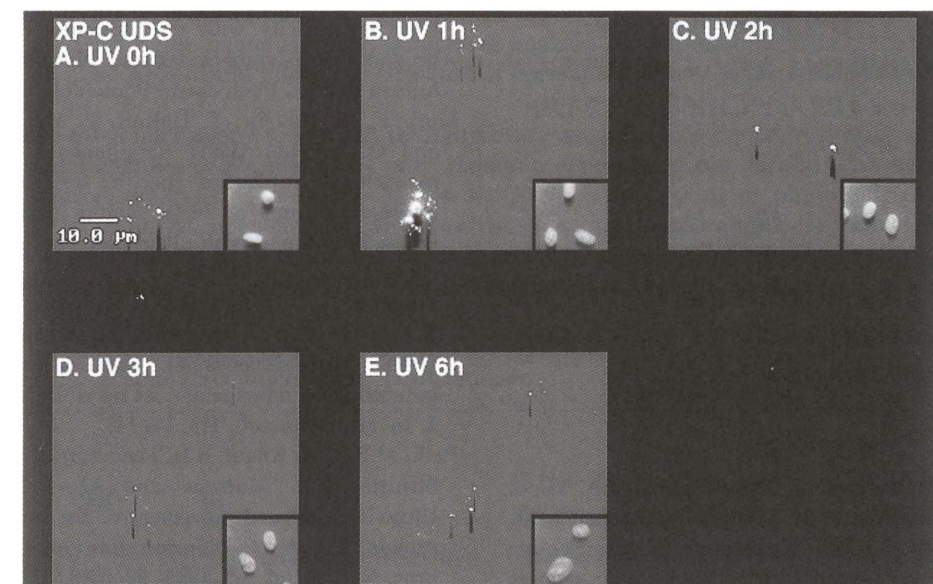


Fig. 7 Typical three-dimensional fluorescent images of UV-induced UDS (higher magnification) and nuclear DNA (lower magnification) in XP-C cells. (A) No repair; (B) 1 h repair; (C) 2 h repair; (D) 3 h repair; (E) 6 h repair. Scale bar, 10  $\mu$ m

すること、さらに、3 時間以降の修復 DNA 合成は、ほぼ 100 % CPD が関与することが明らかとなった。

紫外線照射直後および修復過程のヒト細胞において、私たちは世界で初めて CPD、6-4 PP および修復 DNA 合成の三次元的表示に成功した。得られた蛍光画像は各損傷や修復 DNA 合成にきわめて特異的であることが確認され、さらに、修復に伴う画像変化は、ELISA 法や免疫染色法による定量的結果を見事に反映することもわか

った。これらの結果は 3 次元蛍光画像がきわめて信頼性の高いものであることを示している。この新技術の開発がもたらした最大の発見は、6-4 PP の修復が細胞核内で均一ではないことを示唆したことである(Fig. 2D)。この結果は、修復 DNA 合成される部位も細胞核内で均一ではないという Fig. 6D により支持された。さらに、6-4 PP が主に関与する照射後 3 時間の修復 DNA 合成も、CPD がほぼ全面的に関与する 3 時間目以降の修復 DNA 合成



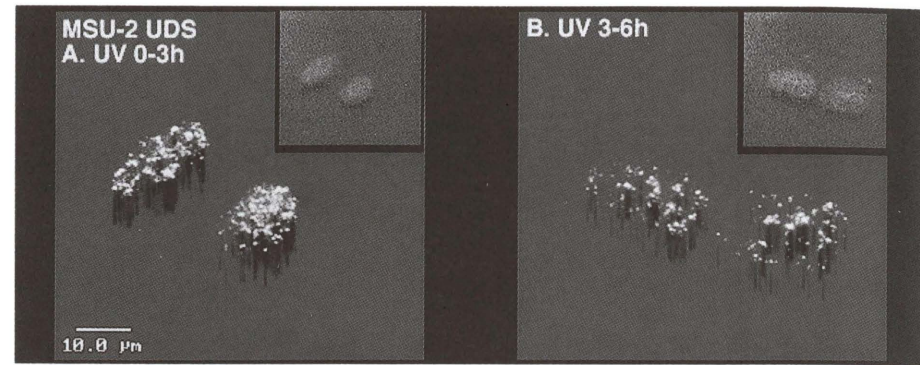


Fig. 8 Typical three-dimensional fluorescent images of UV-induced UDS (higher magnification) and nuclear DNA (lower magnification) in normal human cells. (A) Cells were labeled by BrdU during the first 3 h after irradiation; (B) Cells were labeled from 3 h to 6 h after irradiation. Scale bar, 10  $\mu$ m

もともに細胞核内で不均一に起こることが明らかとなった (Fig. 8). 以上の結果は, CPD も 6-4 PP もともに細胞核内で不均一に修復されることを示すものとなった。

## 結 語

紫外線照射直後および修復過程のヒト細胞において, CPD, 6-4 PP および修復 DNA 合成の三次元的表示に成功した。また, CPD も 6-4 PP もともに細胞核内で不均一に修復されることを示唆した。

## 謝 辞

本研究は奈良県立医科大学皮膚科学研究室との共同研究であり, 関係する諸先生に心より感謝いたします。また, 本研究は文部省科学研究費補助金およびコスメトロジー研究振興財団研究助成の援助を受けた。

## 参考文献

- Aboussekhra, A., M. Biggerstaff, M.K.K. Shivji, J.A. Vilpo, V. Moncollin, V.N. Podust, M. Protic, U. Hubscher, J.-M. Egly and R.D. Wood (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components, *Cell*, 80, 859-868.
- Cleaver, J.E. and K.H. Kraemer (1995) Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome, In : C.R. Sriver, A.L.

Beaudet, W.S. Sly and D. Valle (Eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, pp. 4393-4419.

Clingen, P.H., C.F. Arlett, J. Cole, A.P.W. Waugh, J.E. Lowe, S.A. Harcourt, N. Hermanova, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido and M.H.L. Green (1995) Correlation of UVC and UVB cytotoxicity with the induction of specific photoproducts in T-lymphocytes and fibroblasts from normal human donors, *Photochem. Photobiol.*, 61, 163-170.

Mori, T., M. Nakane, T. Hattori, T. Matsunaga, M. Ihara and O. Nikaido (1991) Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA, *Photochem. Photobiol.*, 54, 225-232.

Nakagawa, A., N. Kobayashi, T. Muramatsu, Y. Yamashina, T. Shirai, M.W. Hashimoto, M. Ikenaga and T. Mori (1998) Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei, *J. Invest. Dermatol.*, 110, 143-148.

Park, M.S., J.A. Knauf, S.H. Pendergrass, C.H. Coulon, G.F. Strniste, B.L. Marrone and M.A. MacInnes (1996) Ultraviolet-induced movement of the human DNA repair protein, Xeroderma pigmentosum type G, in the nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8368-8373.

Sancar, A. (1994) Mechanisms of DNA excision repair, *Science*, 266, 1954-1956.

# 原子間力顕微鏡による DNA 損傷の検出

村上 正弘, 古川 章, 南久松 真子, 早田 勇

放射線医学総合研究所障害基盤研究部 〒263-8555 千葉県稲毛区穴川 4-9-1

## Atomic force microscopy of DNA damage

Masahiro Murakami, Akira Furukawa, Masako Minamihisamatsu and Isamu Hayata

Division of Radiobiology and Biodosimetry, National Institute of Radiological Sciences  
9-1, Anagawa-4-chome, Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan

## Summary

An atomic force microscope (AFM) has become a useful tool to visualize biological molecules with nanometer level resolution. It is theoretically possible to visualize biological molecule in the original form by AFM. Many types of biological molecules, such as DNA and protein, have been observed in air or in water by AFM.

We used AFM for nanometer-level structural analysis of chromosome damage induced by radiation. The AFM could image the structure of chromosomes on Giemsa stained or unstained samples.

Atomic force microscopy to analyze DNA structure was also introduced to further explain of formational changes in plasmid DNA after radiation exposure in comparison with agarose gel electrophoretic analysis (Murakami, M., et al., 2000). Three forms of plasmid DNA, closed circular (intact DNA), open circular (DNA with single strand break) and linear form (DNA with double strand break) were visualized by dynamic force mode AFM after  $\gamma$ -irradiation. The torsional feature of the plasmid DNA was imaged better with AFM than with a transmission electron microscope (TEM).

**Keywords :** atomic force microscope, DNA damage

## 緒 言

電離放射線は, DNA 分子に対して塩基損傷, DNA 単鎖切断, DNA 二重鎖切断等の損傷を引き起こし, これらが細胞の不活化の主要因と考えられている (Chadwick, K.H. and Leenhouts, H.P., 1994). これらの損傷は, 生体内の修復機構により修復されるが, 基質となる DNA 損傷の構造を明らかにする事は, 修復の分子機構研究に有用な情報を提供する事になると期待される。従来, 電離放射線誘発 DNA 損傷の解析には, ゲル電気泳動

法 (Roots, R., et al., 1985), パルスフィールドゲル電気泳動法 (Murakami, M., et al., 1995 b), 電子顕微鏡法 (Herskind, C., 1987) 等が用いられてきた。近年発明された原子間力顕微鏡 (AFM) は (Binnig, G., et al., 1986), Si や Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> などのできた長さ数百  $\mu$ m のカンチレバーの先に付いている逆ピラミッド形をした鋭利なプローブを限りなく物質の表面に近付けた状態で走査し, 原子間力を利用して物質の表面形状を計測し画像化するものである。鳥瞰図を描く一種の表面粗さ計であるが, 原理的には個々の原子を識別できる程の高い解像度を持つ。生体高分子物質の AFM による観察に際しては, 従来の電子顕微鏡観察において必要とされるような試料の化学固定, 金属の蒸着等の操作は不要であり, 観察条件

受付: 2000 年 4 月 4 日 受理: 2000 年 4 月 10 日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会シンポジウムII「新しい変異原検出法へのアプローチ」で発表された。  
This paper was presented to the symposium II "The approach to novel detection systems for environmental mutagens" at the 28th JEMS annual meeting, 1999.



も空气中, 溶液中どちらでも観察可能である. AFM は近年生体高分子物質の解析の有用な道具として利用され, DNA, 染色体, 膜蛋白質, DNA-蛋白質複合体, 中性子線照射による DNA 損傷等について新たな知見が多く得られている (Hansma, H.G., et al., 1992; De Grooth, B.G. and C. A. J. Putman, 1992; Hansma, H.G. and Hoh, J.H., 1994; Pang, D., et al., 1998; Czajkowsky, D. M. and Shao, Z., 1998; Hansma, H.G., 1999).

われわれは,  $\gamma$  線等に比べて高い細胞致死効果を示す重粒子線による染色体異常の詳細な構造を解析するために, ネオンイオン線もしくは炭素イオン線をマウス由来の電離放射線高感受性突然変異細胞 (SL 3-147, Murakami, M., et al., 1995 a) に照射した後, その染色体構造を通常の光学顕微鏡 (LM) および AFM を用いて解析した.

さらに, 通常の実験室環境下において, 無固定, 無染色の状態で高い解像度で生体高分子物質を可視化することができるという AFM の利点を生かして, プラスミド DNA に対する  $\gamma$  線照射により生じた DNA 二重鎖切断の超微細構造を解析する系を開発し,  $\gamma$  線照射後のプラスミド DNA のナノメートルレベルでの構造を可視化する事ができた.

#### 1. 重粒子線照射後の染色体損傷の解析

ネオン線もしくは炭素イオン線照射後の染色体標本をギムザ染色したところ, LM によって細胞分裂中期染色体中に, 染色分体型ギャップ, 染色分体型切断等が観察された.

続いて同一の染色体標本を, AFM で解析した. ギムザ染色した未照射の試料において, AFM により詳細な染色体像を得る事ができた. 染色体表面は比較的滑らかであった. 一方, 無染色の試料においては, 染色体の表面は粗くなっており, 高い拡大率で走査したところ, 染色体の 30 nm 繊維構造に相当すると思われる構造を可視化することができた (村上, 江口-笠井, 2000). 続いて, 照射後の分裂中期染色体サンプルを AFM で観察したところ, LM 観察によって染色体異常が確認されたものでは, LM 観察と同様に, AFM で染色分体型ギャップ, 染色分体型切断等が観察され, その中には, 同一染色体上に染色分体型切断, 染色分体型ギャップが観察されたものがあった (村上, 他, 1999). 切断領域では切断点の高さは, ほぼ基盤部分と同じ高さまで低くなっており, 染色体が不連続であった. 染色分体型ギャップの生じている領域では, 連結部分の高さは基盤部分の高さまでは低くなっておらず, 染色体断片が繋がっている事が確認できた (村上, 江口-笠井, 2000). AFM では, 高解像度で染色体構造の画像を取得できるだけでなく, 同時に高さ情報, 距離情報等が得られるので, LM より詳細に染色体形態を解析する事が可能であった.

#### 2. $\gamma$ 線照射後の DNA 損傷の解析

次に  $\gamma$  線照射による DNA 損傷の解析を行うために, プラスミド DNA を  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  線で照射し, その形状変化を AFM により解析した.  $\gamma$  線による照射を受けると, プラスミド DNA は種々の損傷を受けその損傷の種類により形状が変化する事が知られている. 損傷を受けていないプラスミド DNA は, 多くのねじれを持ったスーパーコイル状のいわゆる閉環状 DNA であるが, 放射線により単鎖切断が生じるとねじれが解消されて, 開環状 DNA になる. さらに DNA 二重鎖切断が生じるとひも状の線状 DNA となる. アガロースゲル電気泳動法で解析すると, 上記の 3 形態によりプラスミド DNA のアガロースゲル上での移動が異なる事から容易に識別することができる.

まず,  $\gamma$  線照射前後のプラスミド DNA の形状分布をアガロースゲル電気泳動法で解析した. 未照射のサンプルでは, ほぼすべての DNA は閉環状であったが,  $\gamma$  線照射によりその割合は急激に減少した. 線量 5.6 kGy では, 閉環状 DNA は検出限度以下になり, 開環状 DNA が大多数を占める状態になった. 開環状 DNA は今回用いた線量範囲においては, すべての条件下で大多数を占めた. 線状 DNA は線量依存的にほぼ直線的にその割合が増加することが明らかになった (Murakami, M., et al., 2000).

続いて, 電気泳動法解析に用いたものと同じサンプルを AFM を用いて観察を試みた. 未照射のプラスミド DNA を観察すると, いくつかのねじれを持ったスーパーコイル状の閉環状 DNA 像を得る事ができた. 線量 1.9 kGy の条件では, 閉環状, 開環状そして線状の 3 つの形状のプラスミド DNA を観察することができた. 線量 5.6 kGy と 8.3 kGy の条件では, 閉環状はほとんど確認されず, 開環状と線状のものが観察された. 特に, DNA 二重鎖切断の結果生じた線状 DNA の割合は, 線量に従って増加するという良い線量効果関係が認められた (Murakami, M., et al., 2000). 次に, DNA 分子の長さを測るために, 制限酵素 (SmaI) で一箇所切断した線状 DNA を観察し, 長さを計測したところ平均的長さはおよそ  $1\mu\text{m}$  であった. この値は, 3 kbp の B 型 DNA として仮定した計算から予測される長さ  $1\mu\text{m}$  と同じであった. ロータリーシャドウイング法による透過型電子顕微鏡観察 (TEM, 試料作成法は, Takeda, Y., et al., 1992 に従った.) によっても同様の値が得られた. TEM とは異なり AFM では, 金属の蒸着等の操作を行っていないため, DNA 鎖のねじれの様子が詳細に観察する事ができた.  $\gamma$  線の照射前後において, AFM により DNA 鎖の長さを計測し比較したところ, 未照射の試料と比べて, 照射後の試料, 特に 5.6 kGy と 8.3 kGy で, DNA 鎖の短縮が認められた (Murakami, M., et al., 2000).

#### 結 語

AFM は, 原理的には個々の原子を識別できる程の高い解像度を持ち, ナノテクノロジーにおける重要な装置である. 生命科学の領域においては, AFM は, 細胞レベルから分子のレベルまで幅広い範囲で応用が始まっている. われわれは, この AFM を用いることにより, 染色体レベルから DNA レベルまでの範囲で, 電離放射線による損傷を詳細に可視化, 解析する事ができた. 今後は, 電離放射線による DNA 損傷を解析するために, さらに解像度を上げた AFM を用いて損傷領域における詳細な構造変化を可視化解析する系を開発する予定である.

#### 謝 辞

本研究は, 科学技術庁原子力基盤技術クロスオーバー研究および放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置の共同利用の一環として行われた.

#### 参考文献

- Binning, G., C.F. Quate, C. Gerber (1986) Atomic force microscope, Phys. Rev. Lett., 56, 930-933.  
Chadwick, K. H. and H.P. Leenhouts (1994) On the linearity of the dose-effect relationship of DNA double strand breaks, Int. J. Radiat. Biol., 66, 549-552.  
Czajkowsky, D.M. and Z. Shao (1998) Submolecular resolution of single macromolecules with Atomic force microscopy, FEBS Lett., 430, 51-54.  
De Grooth, B.G. and C.A.J. Putman (1992) High-resolution imaging of chromosome-related structures by atomic force microscopy, J. Microsc., 168, 239-247.  
Hansma H.G., J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, R.L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante, P.K. Hansma (1992) Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope, Science, 256, 1180-1184.

- Hansma, H.G. and J.H. Hoh (1994) Biomolecular imaging with the atomic force Microscope, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 23, 115-139.  
Hansma, H.G. (1999) Variety of imaging with scanning probe microscopes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14678-14680.  
Herskind, C. (1987) Single-strand breaks can lead to complex configuration of plasmid DNA *in vitro*, Int. J. Radiat. Biol., 52, 565-575.  
Murakami, M., K. Eguchi-Kasai, K. Sato (1995a) Biological effects of active oxygen on an X-ray-sensitive mutant mouse cell line (SL3-147), Mutat. Res., 336, 215-221.  
Murakami, M., K. Eguchi-Kasai, K. Sato, S. Minohara, F. Yatagai and T. Kanai (1995b) Differences in heavy-ion-induced DNA double-strand breaks in a mouse DNA repair-deficient mutant cell line (SL3-147) before and after chromatin Proteolysis, J. Radiat. Res., 36, 258-264.  
Murakami, M., H. Hirokawa and I. Hayata (2000) Analysis of radiation damage of DNA by atomic force microscopy in comparison with agarose gel electrophoresis studies, J. Biochem. Biophys. Methods, in press.  
村上正弘, 南久松真子, 江口-笠井清美, 古川 章, 佐藤弘毅, 早田 勇 (1999) ネオンイオン線照射による染色体異常の原子間力顕微鏡による解析, 宇宙生物科学, 13, 250-251.  
村上正弘, 江口-笠井清美 (2000) 重粒子線照射による染色体損傷の原子間力顕微鏡による解析, 1999 Annual Report of the Research Project with Heavy ions at NIRS-HIMAC, NIRS-M-139, HIMAC-026, 150-151.  
Pang, D., B.L. Berman, S. Chasovskikh, J.E. Rodgers, A. Dritschilo (1998) Investigation of neutron-induced damage in DNA by atomic force microscopy: experimental evidence of clustered DNA lesions, Radiat. Res., 150, 612-618.  
Roots, R., G. Kraft, E. Grosschalk (1985) The formation of radiation-induced DNA breaks: the ratio of double-strand breaks to single-strand breaks, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 11, 259-265.  
Takeda, Y., H. Hirokawa and T. Nagata (1992) The replication origin of proplastid in cultured cells of tobacco, Mol. Gen. Genet., 232, 191-198.



## DNA のエンドジョイニングの分子機構： 2 種類の非相同的組換え

池田 日出男

北里研究所・基礎研究所・微生物薬品化学 〒108-8642 港区白金 5-9-1

### Molecular Mechanism of DNA end-joining : two types of illegitimate recombination

Hideo Ikeda

Microbial Chemistry, Center for Basic Research, The Kitasato Institute  
Shirokane 5-9-1, Minato-ku, Tokyo 108-8642, Japan

#### Summary

Based on study of illegitimate recombination in *Escherichia coli*, we have classified illegitimate recombination into two types. One is a short homology-dependent illegitimate recombination (SHDIR) and the other is a short homology-independent illegitimate recombination (SHIIR). SHIIR is mediated by DNA gyrase, and it usually takes place at a low frequency, but enhanced in the HU-defective mutant. Therefore this recombination is usually suppressed by HU protein. SHIIR may also be induced by a modification of DNA substrate, because the recombination induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seems to be of short homology-independent type. SHDIR takes place spontaneously or induced by irradiation with UV light or gamma ray and is widely detected in various genetic systems of *E. coli*. The 5'-3' exonuclease, exoVIII, enhances SHDIR by producing DNA ends with 3'-overhang, while the 3'-5' exonuclease, exoI, suppresses SHDIR by degrading the 3'-overhang from DNA ends. RecJ exonuclease also plays a role in UV-induced SHDIR. Models for SHIIR and SHDIR have been discussed.

**Keywords :** short homology-dependent illegitimate recombination, short homology-independent illegitimate recombination, DNA gyrase, DNA exonuclease, DNA helicase

#### 緒 言

DNA は、電離放射線や紫外線などの外からのストレスによって二本鎖切断を生じるが、その損傷は、相同的組換えあるいは DNA 末端連結反応 (DNA エンドジョイニング) によって再び修復される。エンドジョイニングでは、DNA の切断によって生成された DNA 末端がそのまま同じ相手とつながれば修復になる。一方、DNA 末端が別の DNA 末端とつながれば、染色体間との転座や

欠失変異などの非相同的組換えが起こることになり、癌化や遺伝子疾患の原因となると考えられる。また、組換えという観点からこの現象をみると、非相同的組換え (illegitimate recombination) とは、DNA 上の異なる二つの部位において、相同性のない塩基配列や、高々数塩基対の短い相同性のある塩基配列の間で起こる組換えのことである。一方、長い相同性のある塩基配列の間で起こる相同的組換え (homologous recombination) は、非相同的組換えとは対照的な別の機構によって行われている。

受付 : 2000 年 4 月 3 日 受理 : 2000 年 4 月 10 日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会シンポジウムII「新しい変異原検出法へのアプローチ」で発表された。  
This paper was presented to the symposium II "The approach to novel detection systems for environmental mutagens" at the 28th JEMS annual meeting, 1999.



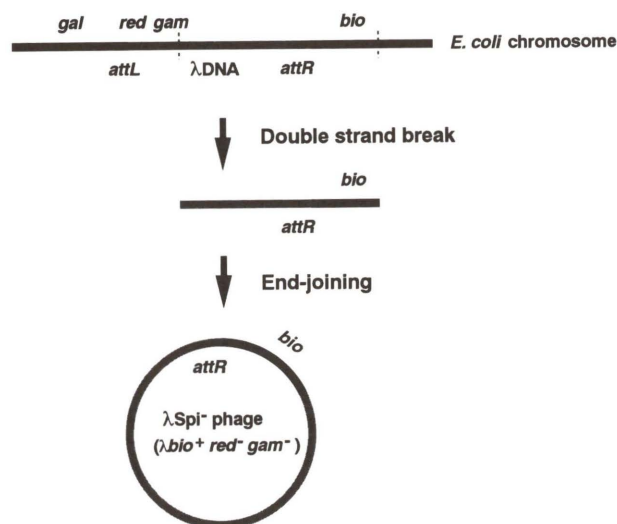


Fig. 1 *In vivo* assay system for illegitimate recombination. Illegitimate recombination between  $\lambda$  phage and *E. coli* chromosome occurs during formation of  $\lambda$ bio transducing phages. Most of  $\lambda$ bio phages have defects in the *red-gam* region of  $\lambda$  DNA, and these phages can be preferentially detected by *E. coli* P2 lysogen as an indicator ( $\text{Spi}^-$  phenotype).

## 1. 2 種類の非相長的組換え

今回は、二種類の非相長的組換えの機構に焦点を当てて、その機構の詳細を解説する。私たちは、特殊形質導入ファージの形成時に起こる非相長的組換えを検出する *in vivo* アッセイ系を確立し、紫外線など、他の環境のストレスが非相長的組換えを誘導することを見出した (Ikeda, et al., 1995). 一方、以前に DNA ジャイレースによって触媒される非相長的組換えを見出していたので (Ikeda, et al., 1981), この新しい系を用いてこれらの二つの非相長的組換え機構を検討した。その結果、非相長的組換えは、II 型の DNA トポイソメラーゼによって触媒され、その阻害剤によって促進される、相同配列を必要としないタイプと、紫外線などの環境のストレスによって誘導される短い相同配列を必要とするタイプとに分類できることが明らかになった。この総説では、両方の組換えの特徴とこれらに因する因子について紹介し、その機構の違いを明らかにしたい。

## 2. 非相長的組換えのアッセイ系

まず、*in vivo* において非相長的組換えを定量的に検出するアッセイ系 ( $\lambda\text{Spi}^-$  アッセイ) について説明する。原理は、溶原化している  $\lambda$  ファージが熱によって誘発される際に非相長的組換えによって形成される  $\lambda\text{bio}$  特殊形質導入ファージを特異的に選択し、総ファージ数に対する  $\lambda\text{bio}$  特殊形質導入ファージ数の割合を求め、非相長的組換えの頻度としたものである (Fig. 1).  $\lambda\text{bio}$  特殊形質導入ファージ  $\lambda\text{Spi}^-$  ファージ) とは、 $\lambda$  DNA の一部と

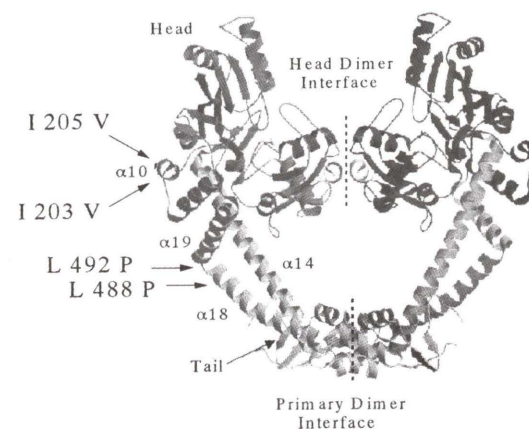


Fig. 2 Location of the *gyrA* mutations that spontaneously induce illegitimate recombination at high frequencies. Arrows indicates location of the *gyrA* mutations on the three-dimensional model of DNA gyrase A subunit (Ashizawa et al., 1999)

大腸菌染色体 DNA の一部 (*bio* 遺伝子を遺伝マーカーとして持つ) からなるハイブリッド DNA をゲノムとするファージを意味し、そのほとんどは、 $\lambda$  DNA の *attL* 近傍にマップされる *red* 遺伝子と *gam* 遺伝子との両方を欠失している ( $\lambda\text{bio red}^- \text{gam}^-$ )。このような変異ファージは、野生型ファージが感染することのできない P2 ファージ溶原菌にも感染することができるため、この菌液を塗った寒天培地上で選択的にプラーク数を数えることができる。また、ここで用いている  $\lambda$  ファージは、cI リプレッサーが温度感受性になっているため、溶原菌を熱処理すれば容易に  $\lambda$  ファージを誘発させることができる (熱誘発)。したがって、熱誘発により生成したファージを用い、P2 ファージが溶原化していない大腸菌を指示菌としてプラークを形成させ、その数を計測することによって総ファージ数を算出し、両者の比を求め、 $\lambda\text{Spi}^-$  ファージの出現頻度とした (Ikeda, et al., 1995)。

## 3. DNA ジャイレースによる非相長的組換え

私たちは、これまでに、DNA ジャイレースの阻害剤の一種であるオキシリニン酸が *in vivo* および *in vitro* において非相長的組換えを促進されることを見出している (Ikeda, et al., 1981; Shimizu, et al., 1995)。オキシリニン酸の標的は DNA ジャイレースの二つのサブユニットの一つである GyrA 蛋白であることが知られているので、DNA ジャイレースそれ自体が組換え反応を誘導することと結論された。

DNA ジャイレースのどのような機能が、組換えを誘導するかを調べるために、組換えの誘導が起こりやすくなった DNA ジャイレースの温度感受性変異株を単離し、DNA ジャイレースのどの領域に変異が起きているかを調べた。温度感受性変異株より *gyrA* 遺伝子を単離し塩基配列を調べたところ、 $\alpha 10'$ ,  $\alpha 18$  の  $\alpha$  ヘリックス

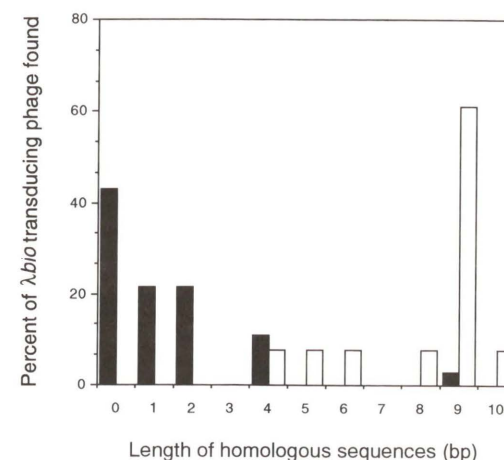


Fig. 3 Distribution of lengths of short homology in the junctions of  $\lambda\text{bio}$  transducing phages formed spontaneously in the wild type, and the *gyrAhr1* mutant. Vertical line indicates percent of the transducing phages detected. Horizontal line indicates nucleotide length (bp) of short homologies found in the bacterial and phage recombination sites. A solid bar represents the junctions of  $\lambda\text{bio}$  transducing phages produced spontaneously in the *gyrAhr1* mutant. An open bar represents the junctions of  $\lambda\text{bio}$  transducing phages produced spontaneously in the wild type. Average lengths of short homology are 1.3 bp for the recombination in the *gyrAhr1* mutant and 8.4 bp for the recombination in the wild type, respectively (Shimizu et al., 1997).

領域に変異があることがわかった (Fig. 2) (Ashizawa, et al., 1999)。この図は、GyrA 蛋白がダイマーを構成しているところを表しているが、 $\alpha 10'$ ,  $\alpha 18$  は DNA 鎖が通過するゲイト部分を開閉する腕の機能を持つと考えられる領域であり、これらが欠損すると GyrA 蛋白のゲイト開閉機能が異常になり、組換えが起こりやすくなると考えられる。

## 4. DNA ジャイレースによる非相長的組換えには相同な DNA 配列は要らない

このジャイレース温度感受性変異株を用いたときに誘導される非相長的組換えについて組換え産物の解析をしたところ、組換え部位において観察される塩基配列の相同性は、平均 1 塩基対程度であった。したがって、この組換えには相同な DNA 配列は要しないと結論された (Fig. 3)。一方、野生株において自然に現れる組換え体では、比較的長い相同配列 (約 8 塩基対) 間で組換えが起こっていた。この結果は、非相長的組換えには相同な DNA 配列の要求性に関して二種類の機構があることを示唆した (Shimizu, et al., 1997)。したがって、この解析法を用いて、非相長的組換えの機構を少なくとも二つに分類することができるようになった。

## 5. DNA 結合蛋白質 HU による非相長的組換えの抑制

DNA ジャイレース依存の組換えは通常は低く抑えられており、オキシリニン酸の添加やジャイレースの変異がないと組換えはほとんど検出されない。しかし、その裏には DNA ジャイレース依存の組換えが起こらないような精巧な制御機構が働いている可能性が考えられる。私たちは、偶然に DNA 結合蛋白質である HU が DNA ジャイレース依存の組換えを抑える役割をはたしていることを明らかにした。そのきっかけとなったのは、後で述べる紫外線のストレスによって誘導される組換えの解析をしていたときに、HU 蛋白質の変異株 *hupA-hupB* において自然に起こる組換えの頻度が高いことに気がついたことである。HU 蛋白質は二つのよく似た遺伝子 (*hupA* と *hupB*) によってコードされる二つの蛋白質の混合物であり、どちらも似た機能を持つことが知られている。

この *hupA-hupB* 変異株において自然に起こる組換えによって生成された組換え体を解析すると、この組換えが DNA ジャイレース依存の組換えの特徴を持つことがわかった。すなわち、Fig. 3 のジャイレース変異株の場合と同様に、この組換えが相同配列のない DNA の間で起こっていた。このことから、HU 蛋白質に欠損があると DNA ジャイレース依存の組換えが自然に誘発されることが示唆された (Shanado, et al., 1998)。

## 6. DNA ジャイレースによる組換えは DNA の損傷に伴って誘発されるか

私たちは、酸化ストレスの原因となる過酸化水素が非相長的組換えを誘導することをみつけているが、このとき、もう一つ面白い現象を観察した。過酸化水素によって誘導された組換えは、ほかの条件に比べて、相同配列のない DNA の間、あるいは非常に短い相同配列のある DNA の間で起こっているものが多いことである (Fig. 4a) (Onda, et al., 1999)。特に、*mutM* 変異を持つ株では、DNA 中の 8-oxoG が修復されにくいため、その傾向が顕著になる (Fig. 4b)。このことは、過酸化水素によって DNA 中の 8-oxoG が形成されたときに DNA ジャイレースによる組換えが誘導される可能性を示唆している。しかし、まだ確実な証拠は得られておらず、今後、より直接的な証拠を得ることが必要である。

## 7. DNA ジャイレースによる非相長的組換えのモデル

DNA ジャイレースは、一方の DNA 鎖に二重鎖切断を導入し、その間を、もう一方の DNA 鎖を通過させ、切断した DNA 末端を再び結合させることによって、DNA のリンキング数を増減させる活性を持つことから、二重



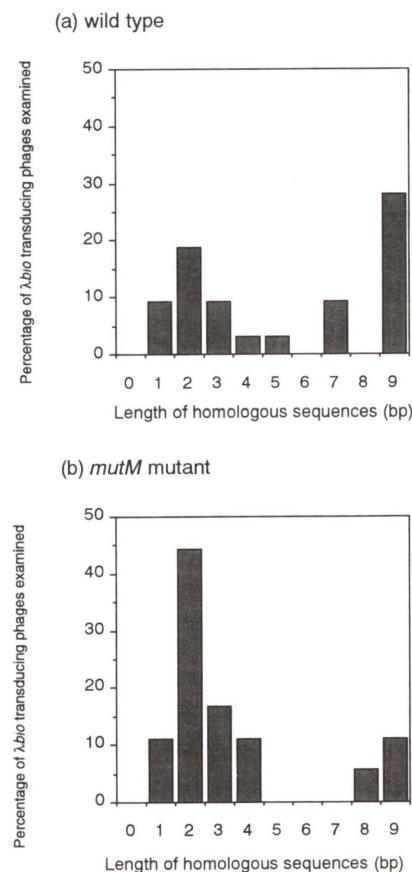


Fig. 4 Distribution of lengths of homologous sequences at recombination sites in wild-type strain (a) and in *mutM* strain (b). The y axes in (a) and (b) indicate the ratios of  $\lambda$  bio transducing phages examined and x axes indicate numbers of nucleotide(s) homologous between  $\lambda$  and *E. coli* recombination sites (Onda et al., 1999).

鎖切断が導入された DNA 鎖と DNA ジャイレースが結合した中間産物、いわゆる「クリーバブル・コンプレックス」が独立に二つ存在し、両者が互いに接近、結合した後、再び解離する際、サブユニットの交換が起こり、結果としてそれぞれのサブユニットに結合していた DNA 鎖の交換が起こることによって組換えが起こると考え、このモデルを「DNA ジャイレース・サブユニット交換モデル」と呼んだ (Fig. 5) (Ikeda, et al., 1982). オキソリン酸存在下、あるいは上記の *gyrA* 変異株では、二重鎖切断が導入された DNA 鎖の再結合の過程が阻害されることにより、このようなクリーバブル・コンプレックスが蓄積されることが示されている。したがって、DNA ジャイレースによる組換え反応におけるオキソリン酸や *gyrA* 変異株の促進効果は、このクリーバブル・コンプレックスの数を増加させることによるものであると説明することができる。

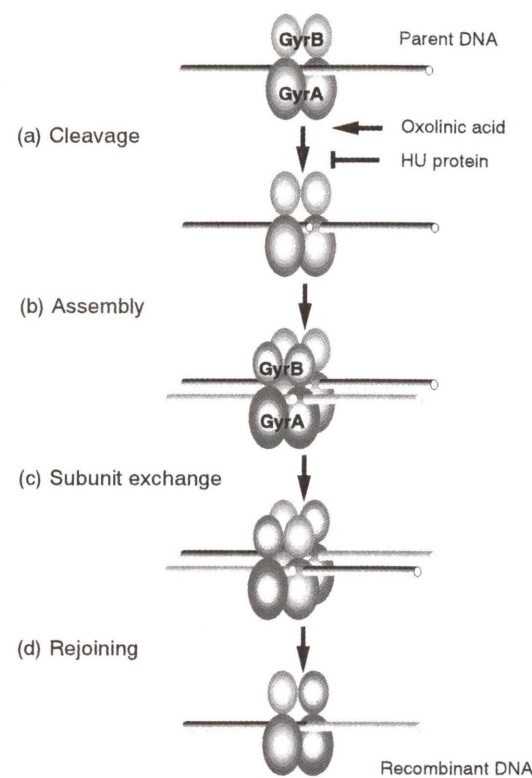


Fig. 5 Model for DNA gyrase-mediated illegitimate recombination: DNA gyrase subunit exchange model (Ikeda et al., 1982). A DNA gyrase cleaves DNA (a), and the gyrase-DNA complex, cleavable complex, assembles with another complex, forming the tetrameric structure (b). The dissociation of the tetrameric form results in subunit exchange that leads to the exchange of DNA strands (c-d).

## 8. 紫外線や変異原物質などのストレスによって誘導される非相同的組換え

私たちは、*in vivo* 非相同的組換えアッセイ系を確立する過程において、紫外線などの環境のストレスもまた非相同的組換えを誘導することを発見した (Ikeda, et al., 1995). 紫外線によって誘導される非相同的組換えの発見の経緯は、以下の通りである。λ Spi<sup>-</sup>アッセイにおいては、λ ファージを増殖させるために熱誘発を採用しているが、これは、ここで用いている λ ファージ (*cI857*) の *cI* リプレッサーが温度感受性であるためである。*cI* 遺伝子が野生型である λ ファージを溶原化ファージとして採用し、紫外線照射によって λ ファージを誘発させ、特殊形質導入ファージの出現頻度を測定したところ、その頻度は、熱処理によって λ ファージを誘発させるアッセイ系によって測定された特殊形質導入ファージの出現頻度に比べ、非常に高い値を示すことがわかり、これが契機となって紫外線の組換えに対する効果が明らかになった。

紫外線によって誘発された組換え体ファージの塩基配

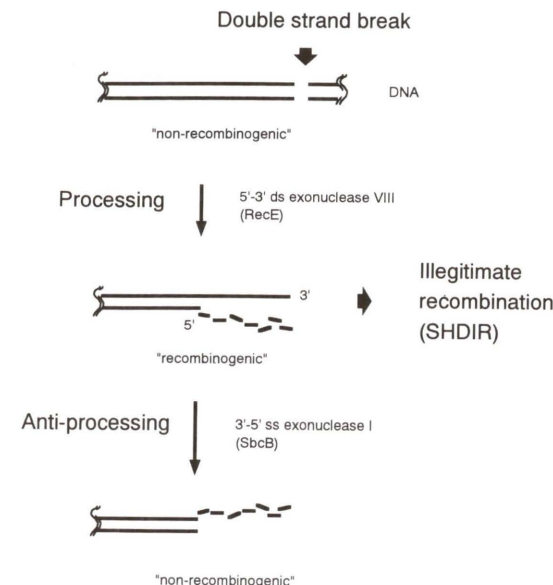


Fig. 6 Model for processing of DNA ends (Yamaguchi et al., 2000). DNA ends with 3'-overhang produced by the 5'-3' exonuclease, *exoVIII*, are proficient for short homology-dependent illegitimate recombination (SHDIR), while the 3'-5' exonuclease, *exoI*, suppresses this illegitimate recombination by degrading the 3'-overhang from DNA ends.

列の解析の結果、この組換えには二つの際立った特徴があることがわかった。一つは、この組換えの多くは、いくつかのホットスポットで行われていることである。そのうち、もっとも頻度の高いものはホットスポット I と呼ばれているが、これが全組換え体ファージの 57% に達する (Yamaguchi, et al., 1995). もう一つの特徴は、ほとんどの組換えが、約 8 塩基対の相同な配列間で起こっていることである。したがって、この組換えは、短い相同配列を必要とする組換えであると考えられ、short homology-dependent illegitimate recombination (SHDIR) と名付けられた (Shimizu, et al., 1997). これらの結果から、この組換えが、DNA ジャイレースによって触媒される非相同的組換え (short homology-independent illegitimate recombination; SHIR) とは異なる機構によって行われていることが明らかになった。

## 9. 紫外線や変異原物質などのストレスによって誘導される非相同的組換えにはなぜ DNA の短い相同配列が必要か

大腸菌 *sbcB* 遺伝子は、ExoI と呼ばれる 3'→5'エキソヌクレアーゼをコードしているが、この遺伝子に変異が起こると非相同的組換えの頻度が上昇することが知られている。一方、*recE* 遺伝子は、ExoVIII と呼ばれる 5'→3'エキソヌクレアーゼをコードしているが、この酵素を細胞内に大量に生産させると非相同的組換えの頻度が

上昇することが知られている。私たちは、大量に生産された RecE 蛋白質に変異が起こると、組換えが再度下がることから、ExoVIII が DNA の末端に働いて、そこに 3'側に一本鎖部分を持つ二本鎖 DNA を形成させ、DNA 末端同士の間を結合を起しやすくしていると考えた (Yamaguchi, et al., 1995). 次に、ExoVIII が大量に生産された状態で、さらに SbcB 蛋白質を大量に発現させると、RecE 蛋白質の発現によって上昇された非相同的組換えの頻度が低下することが明らかとなった (Yamaguchi, et al., 2000). このことは、RecE 蛋白質によって形成された 3'側の一本鎖 DNA が、SbcB 蛋白質によって削られて組換えが起こりにくくなったためであると考えられた。この過程で重要な働きをしていると考えられる 3'一本鎖 DNA は、水素結合で繋がることによって DNA 末端同士の間を結合を促進する役割を持っていると考えられ、そのために相同配列が必要であると考えられる (Fig. 6).

## 10. 環境のストレスによって誘導される非相同的組換えの分子機構

それでは、環境のストレスによって誘導される非相同的組換えはどのような分子機構で起こるのだろうか。λ Spi<sup>-</sup>アッセイにおいて検出される非相同的組換えは、λ DNA の欠失と大腸菌染色体 DNA の挿入である。欠失の形成は、二つの異なるモデルによって説明される。一つは鋳型となる DNA の一部が読み飛ばされて複製されず、娘 DNA 鎖からその部分が消失することによって起こるもので、スリッページモデル (または、slipped mispairing model) と呼ばれる (Farabaugh, et al., 1978; Albertini, et al., 1982).

もう一つのモデルは、その部位が切り出されることによって起こるものである。λ Spi<sup>-</sup>アッセイは、いわば λ DNA の異常な切り出しを検出するものであり、したがって、ここで起こる欠失は切り出しによるものであると考えられる。切り出しによる欠失の最初の段階は、λ DNA と大腸菌染色体 DNA とにそれぞれ二本鎖切断が導入されることなので、私たちは、紫外線照射によって組換えが亢進されるのは、紫外線によってこのような二本鎖切断が促進されるからではないかと考えている。しかしながら、紫外線は γ 線などとは異なり、DNA に直接的に二本鎖切断を導入することはないので、紫外線照射によって生じた DNA の損傷部位では複製フォークの進行が停滞し、鋳型となった DNA 鎖が一本鎖となるため、切断を受けやすくなることが考えられる。実際、*dnaB* 遺伝子の温度感受性変異株では紫外線照射後の非相同的組換えの頻度が低下することが観察されている (Yamashita, et al., unpublished) (Fig. 7).

次に、相同的組換えに関与する *recJ* 遺伝子の破壊株では、紫外線を照射しても組換えが促進されないことが



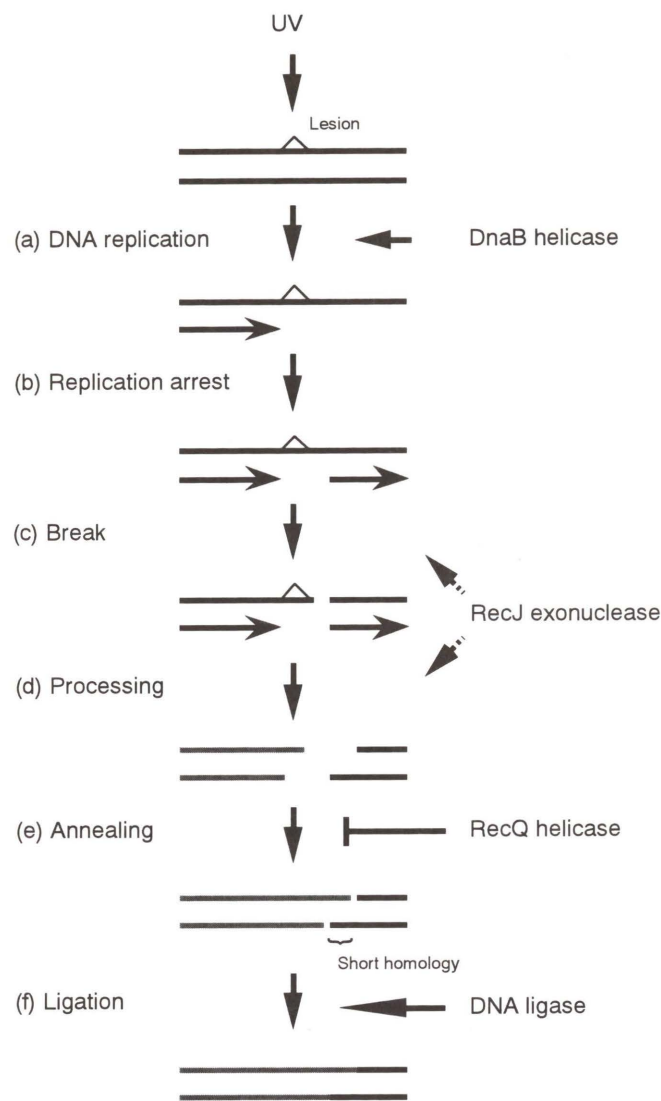


Fig. 7 Model for UV-induced illegitimate recombination. The progression of replication forks arrests at the UV-induced lesion (b), and a single strand of the template DNA is broken, then resulting in the formation of double-strand break (c). Next, the DNA ends is processed (d), annealed (e) and ligated (f). DnaB protein is involved in the step of the progression of replication forks, and RecJ protein participates in either the step of the formation of double-strand breaks (c) or the processing of DNA ends (d). Annealing of the single-stranded DNA takes place in regions having short homology (e), and RecQ protein can suppress this step by degrading the recombination intermediates.

示された(Ukita and Ikeda, 1996). RecJ 蛋白は、一本鎖 DNA を 5'末端から 3'末端の方向に分解する DNA エキソヌクレアーゼ活性を持つので(Lovett and Kolodner, 1989), 非相同的組換えにおける RecJ 蛋白の役割として、紫外線照射によって切断を受けた DNA 鎖の末端を分解することにより、一本鎖 DNA を形成させることが考えられる。一方、RecJ 蛋白が紫外線照射後の DNA

二重鎖切断の過程に寄与する可能性も考えられ、どちらが正しいか明確にすることが必要である(Fig. 7)。

一方、*recJ* 遺伝子と同様に相同的組換えに参与する *recQ* 遺伝子の破壊株では、*recJ* 破壊株とは逆に、紫外線照射後、組換えが野生株以上に亢進することが示された(Hanada, et al., 1997)。ただし、この株では、紫外線非照射時でも組換えが高頻度起こるので、RecQ 蛋白は、紫外線照射の有無にかかわらず、非相同的組換えを抑制している。RecQ 蛋白は、二本鎖 DNA を 3'末端から 5'末端の方向に解離する DNA ヘリケース活性を持つので、RecQ 蛋白が、DNA ヘリケース活性によって短い相同性を持つ DNA 鎖同士の結合を抑制していることが考えられる(Fig. 7)。この他、この過程に参与する因子として、DNA の折り曲げに働く Fis 蛋白、IHF 蛋白(Shanado, et al., 1997)などが見い出されており、今後紫外線や一線によって誘導される非相同的組換えにおけるそれぞれの蛋白の役割を明らかにしていかなければならない。

## 11. 真核生物における二種類の非相同的組換え

では、大腸菌における二種類の非相同的組換えの機構は真核生物においても保存されているであろうか。大腸菌の DNA ジャイレースに対して真核生物では DNA トポイソメラーゼ II が存在する。私たちは、子牛胸腺 DNA トポイソメラーゼ II が非相同的組換えに働くことを明らかにした(Bae, et al., 1988)。このことは、ヒトにおいても、トポイソメラーゼの阻害剤が染色体の相互転座を誘導し、その結果白血病を誘導することが知られている(Negrini, et al., 1993; Gu, et al., 1994)。したがって、高等真核生物においても、大腸菌 DNA ジャイレースと同様に DNA トポイソメラーゼのサブユニット交換の機構によって非相同的組換えが行われていることが示唆されている。

一方、DNA リガーゼ IV やその補助因子であると考えられる XRCC 4 もエンドジョイニングに参与していることが示唆されている(Ramsden and Gellert, 1998; Frank, et al., 1998; Grawunder, et al., 1997)。さらに、DNA-PK は、大きくわけて二つのサブユニット、DNA-PKcs と Ku 蛋白質からなり、セリン/スレオニン・キナーゼであることが知られている。また、Ku 蛋白質は、Ku 70 と Ku 86/Ku 80 からなるヘテロ二量体によって構成されている。この Ku 蛋白質は切断された DNA の末端部分に結合し、DNA-PKcs は Ku 蛋白質と複合体を形成して DNA 末端に結合し自身を活性化する(Hammarsten and Chu, 1998)。高等真核生物におけるエンドジョイニングの機構は、大腸菌における short homology-dependent illegitimate recombination (SHDIR) に相当すると考えられる。したがって、これらの二種類の機構は、大腸菌から高等真核生物にまで保存

されていることになる。

## 結 語

大腸菌の DNA エンドジョイニングは、相同な配列の要求性によって二つの機構に分類された。そして、それぞれのジョイニングには特有の因子と機構が存在する。さらに、これらの二種類の機構は、大腸菌から高等真核生物にまで保存されていることがわかってきた。ヒトのゲノムにおける DNA 再編機構についても、この点を基本にして解析を進めることが機構の解明のために大切である。また、環境変異原によって誘導されるエンドジョイニングの解析においても、二つの非相同的組換えのうちどちらの機構が誘導されているのか確認したうえで研究を進めることが重要である。私たちの研究がゲノムの解析や発がんの機構の解明に役立つことは望外の幸せである。

## 参考文献

- Albertini, A.M., M. Hofer, M.P. Calos and J.H. Miller (1982) Cell, 29, 319-328.
- Ashizawa, Y., T. Yokochi, Y. Ogata, Y. Shobuike, J. Kato and H. Ikeda (1999) J. Mol. Biol., 289, 447-458.
- Bae, Y.-S., I. Kawasaki, H. Ikeda and L.F. Liu (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 2076-2080.
- Farabaugh, R.J., U. Schmeissner, M. Hofer and J.H. Miller (1978) J. Mol. Biol., 126, 847-863.
- Frank, K.M., J.M. Sekiguchi, K.J. Seidl, W. Swat, G.A. Rathbun, H.-L. Cheng, L. Davidson, L. Kangaloo, and F.W. Alt (1998) Nature, 396, 173-177.
- Grawunder, U., M. Wilm, X. Wu, P. Kulesza, T.E. Wilson, M. Mann, and M.R. Lieber (1997) Nature, 388, 492-495.

- Gu, Y., T. Nakamura, S.A. Schichman, R. Prasad, O. Canaani, H. Saito, C.M. Croce and E. Canaani (1994) Cancer Res., 54, 2326-2330.
- Hanada, K., T. Ukita, Y. Kohno, K. Saito, J. Kato and H. Ikeda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 3860-3865.
- Hammarsten, O. and G. Chu (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 525-530.
- Ikeda, H., K. Moriya and T. Matsumoto (1981) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45, 399-408.
- Ikeda, H., K. Aoki and A. Naito (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3724-3728.
- Ikeda, H., H. Shimizu, T. Ukita and M. Kumagai (1995) Adv. Biophys., 31, 197-208.
- Lovett, S.T. and R.D. Kolodner (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2627-2631.
- Negrini, M., C.A. Felix C. Martin, B.J. Lange, T. Nakamura, E. Canaani and C.M. Croce (1993) Cancer Res., 53, 4489-4492.
- Onda, M., K. Hanada, H. Kawachi and H. Ikeda (1999) Genetics, 151, 439-446.
- Ramsden, D.A. and M. Gellert (1998) EMBO J., 17, 609-614.
- Shanado, Y., J. Kato and H. Ikeda (1997) J. Bacteriol., 179, 4239-4245.
- Shanado, Y., J. Kato and H. Ikeda (1998) Genes Cells, 3, 511-520.
- Shimizu, H., H. Yamaguchi and H. Ikeda (1995) Genetics, 140, 889-896.
- Shimizu, H., H. Yamaguchi, Y. Ashizawa, Y., Kohno, M. Asami, J.Kato, and H. Ikeda (1997) J. Mol. Biol., 266, 297-305.
- Ukita, Y. and H. Ikeda, (1996) J. Bacteriol., 178, 2362-2367.
- Yamaguchi, H., T. Yamashita, H. Shimizu and H. Ikeda, (1995) Mol. Gen. Genet., 248, 637-643.
- Yamaguchi, H., K. Hanada, Y. Asami, J. Kato and H. Ikeda (2000) Genes Cells, 5, 101-109.



日本環境変異原学会入会申込書

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の署名を添えて申し込みます。

フリガナ：		
氏 名：	㊟	
Name（ローマ字つづり）		
生年月日（性別）	年 月 日	（男・女）
所属機関名：		
住 所：〒		
TEL：		FAX：
電子メール：		
Affiliation Address Belong		
自 宅 住 所：		
電 話：		
Home address		
学会誌送付先：	①所属機関	②自 宅
学 位：	年取得	
研究領域（複数可）		
加入学会名：		

\_\_\_\_\_の本学会への入会を推薦致します。

日本環境変異原学会評議員

(署名)

日付

印

入会申込書の送付先：〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TS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)	印
日付	

入会申込書の送付先：〒 170-0003 東京都豊島区駒込 1-43-9 駒込 TS 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. 論文原稿の送付

論文原稿は正 1 部コピー 3 部の計 4 部を,下記に(簡易)書留便で送付すること。  
〒 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

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越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。



## 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、総説の記述は、第3頁以下、緒言、1. ……、2. ……、結語、謝辞、参考文献、表、図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明文はすべて英文とする。
- 学名、遺伝子記号などはイタリックとし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
- 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、化学物質のCAS登録番号を記載する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる(文頭の場合は大文字)。
- 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
- 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
- 句読点はカンマ(,)およびピリオド(.)とする。
- 表、図(写真)は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号Fig. 1, 2…を付し、原則として英文の説明文を別紙に添える。
- 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面にFig. 1, 2…および上下を鉛筆書きし、A4

判の台紙に一枚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ってする。
- 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名はChemical Abstractsの記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁(単行本の一部引用の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁)の順とする。単行本そのものを引用する場合は、編者名あるいは著者名、年号、書名、発行所、発行地の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。

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

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

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 2000年3月)

# オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に! より手頃な価格に!

## 特徴

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

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

(保存は-80℃でお願い致します)

- エームテスト用コファクターA(注文量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。

- 従来品は引続き取扱いしております。

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

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

製造元



**オリエンタル酵母工業株式会社**  
飼料・バイオ事業部

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

販売元



**和光純薬工業株式会社**

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
電話 (06) 6203-3741 (代表)  
東京支店 〒103-0023 東京都中央区日本橋四丁目5番13号  
電話 (03) 3270-8571 (代表)



# KIKKOMAN S-9

このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

## 変異原性試験用 凍結S-9

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

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

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

### ●活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

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

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

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

\* *Salmonella typhimurium*

## エームス試験用凍結S-9MIX

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

●**包装単位**：10ml×8本、5ml×4本

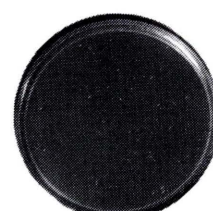
*Salmonella typhimurium* TA-100,  
Benzo(a)pyrene 5μg/plate

## 染色体異常試験用凍結S-9MIX

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

●**包装単位**：3.5ml×3本

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



-S-9 Mix



+S-9 Mix

家田貿易株式会社

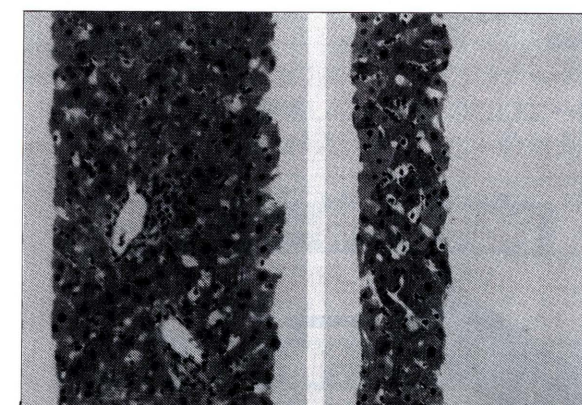
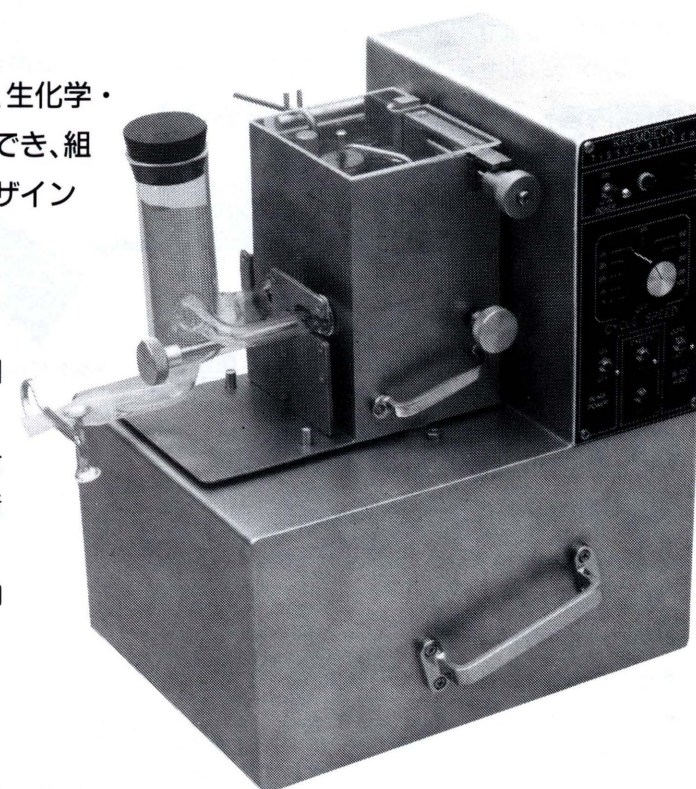
東京：〒113-0033 東京都文京区本郷3-14-16 EKビル  
TEL.03(3816)2861 FAX.03(3814)5347  
大阪：〒564-0044 大阪府吹田市南金田1-14-5  
TEL.06(6338)1518 FAX.06(6338)5626

# THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

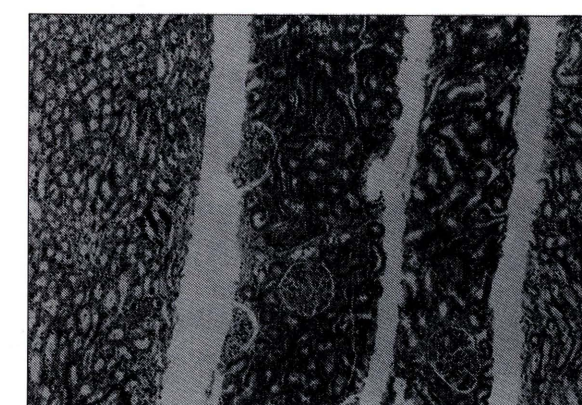
## 生きた組織の無菌スライスができます。

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



# 変異原性試験画像解析支援システム

各種変異原性試験をサポートする画像解析システムをご用意しております。

## SCG画像解析システム

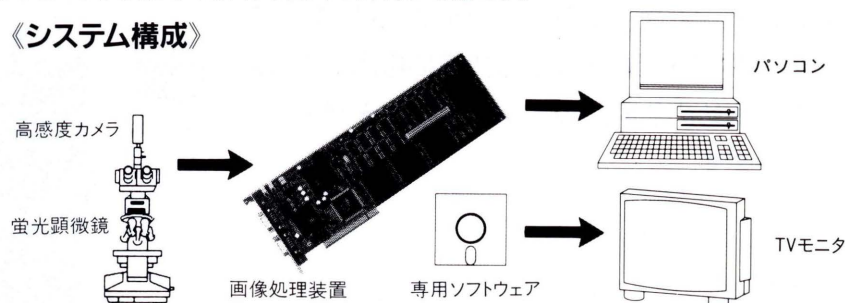
SCG試験に必要なデータを計測します。

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

### 《計測内容》

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

### 《システム構成》



## UDS画像解析システム

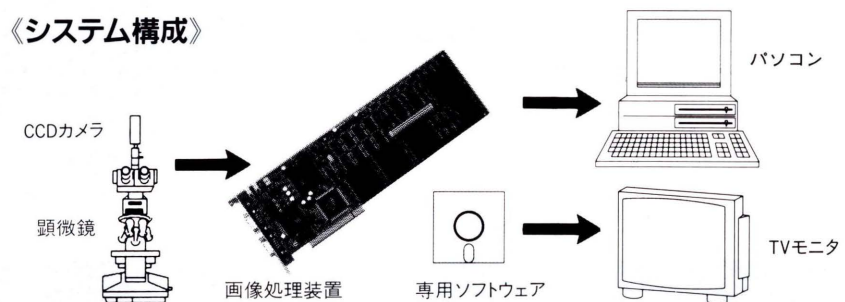
UDS試験に必要なデータを計測します。

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

### 《計測内容》

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

### 《システム構成》



## 小核画像解析システム

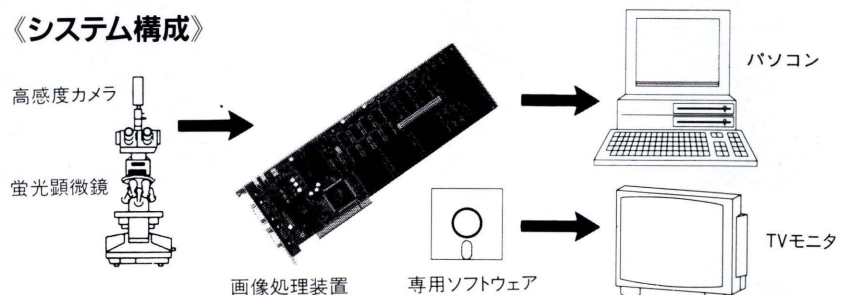
小核試験に必要なデータを計測します。

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

### 《計測内容》

- 小核カウント
- 小核サイズ
- 主核カウント
- 主核サイズ

### 《システム構成》



特許出願中

実績が保証します!

E-mail: keio@magical.egg.or.jp  
URL: http://www.Tokyoweb.or.jp/KEIO/

開発製造元

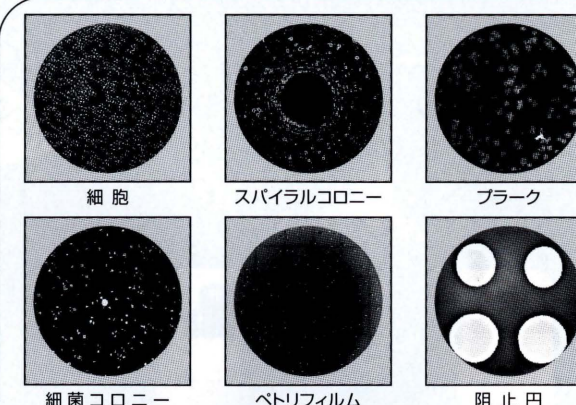
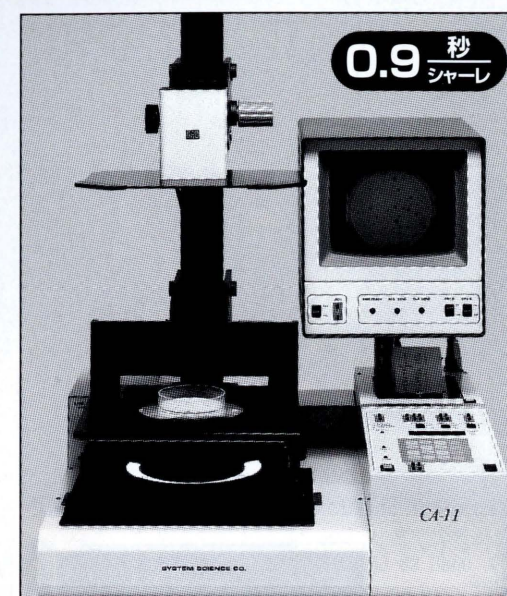
ImageTech®

ケイオー電子工業株式会社

本社 〒567-0828 大阪府茨木市舟木町5番12号  
TEL.0726-34-1022 FAX.0726-34-1018  
東京支店 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目13番3号 MYビル2F  
TEL.03-5251-4355 FAX.03-5251-4420

# 高速画像積算機能を持った CA-11D コロニー アナライザー

GLP、GMP、HACCP対応



- 食品コロニー
- 水コロニー
- 細胞コロニー
- 大腸菌コロニー
- レジオネラ菌コロニー
- 抗菌コロニー
- エームステスト
- フードスタンプ
- フィルター上のコロニー 等

## コロニー等を検出する能力と操作性を追求した国産実用機

CCDカメラによる撮像画像を次々に加算累積(32画面で約0.5秒)していき、高品質な計測画像を得る画像積算機能

計測する試料の培地や照明等の不均一なところの濃度差等を検出して計測する、実時間シェーディング補正機能

- 混濁コロニー等での淡く小さいコロニーの計測
- 不均一な培地、透過しない培地のコロニー計測
- ゴミ、インク、気泡が入ったコロニーの計測

- 選択培地等色の付いた培地のコロニー計測
- 培地やコロニーが片寄ったサンプルの計測
- 短時間培養コロニーの計測

## コンパクト体型で低価格

僅か60cm巾のワゴンにのります。  
(プリンター付き)

## 操作が簡単(面倒な操作不要)

電源投入後サンプルをセットしてスタートボタン(フットスイッチでも可)を押すだけでどなたにでも使えます。

## データの信頼性

サンプルをセットすると同時にCRT画面上に計測状況が表示されます。

## 強力な分離機能

重なり合ったコロニーを自動分離しても1シャッター0.9秒で計測できます。

## 拡大計測

数十μmのコロニーや数万個のコロニーが計測できます。

## 豊富な拡張性

顕微鏡、高倍率レンズ、パソコン等の接続により更に効率の良い運用ができます。

※ 現在、測定しているサンプルを、お客様の所へ伺って測定するデモを行います。

製造発売元

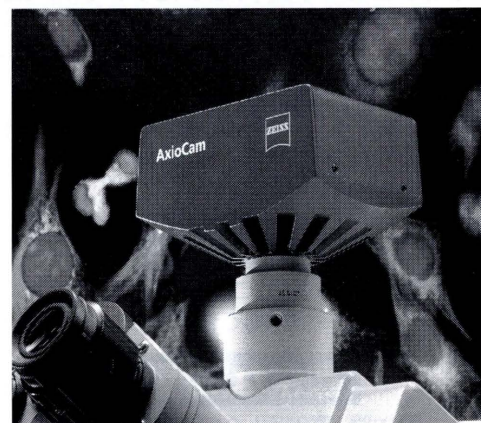


システムサイエンス株式会社 本社・工場/〒197-0011 東京都福生市福生1253-16  
TEL 042(552)5956(代表)



# 高解像度デジタルカメラシステム AxioCam

NEW



顕微鏡観察をより高精度、効率的にする最新鋭デジタルカメラ。

- ◆最高1200万画素解像度〔3900(H) x 3090(V)〕
- ◆全ての顕微鏡観察に対応
- ◆最高水準の色再現性
- ◆自由に設定可能な解像度
- ◆顕微鏡システムへの拡張性

AxioCam (アキシオカム) は、顕微鏡のCarl Zeissが提供する、あらゆる顕微鏡観察に対応した画期的なデジタルカメラです。ピエゾ制御方式により最高1200万画素まで解像度を選択可能です。リアルタイムのオンライン画像は位置決め、ピント合わせを簡単にし、ペルチエ冷却方式の採用により明視野だけでなく、位相差、微分干渉、偏光、そして蛍光等、の全ての検鏡において高解像度画像を提供します。

このほかにも数多くの新開発・新設計・すぐれた技術が搭載されております。

輸入/販売元  
**Carl Zeiss 株式会社**

顕微鏡部

〒160-0003 東京都新宿区本郷町 22 番地  
Tel 03-3355-0332 Fax 03-3358-7554  
URL <http://www.zeiss.co.jp>  
営業所：大阪/名古屋/福岡/仙台



## 編集後記

原稿執筆を先生方をお願いしたのは、昨年度の終わりでした。ご協力を戴き、心からお礼申し上げます。一般論文、受賞講演、シンポジウムと内容が多彩で、学会活動の活発さを反映する号となりました。私ごとですが、梅雨開けの猛暑の大阪で出版の最終作業を行うことになりました。多数の企業人会員を抱える本学会の活動が、社会の福祉に貢献できることを祈る次第です。

担当編集委員 矢嶋 信浩

## 編集委員

### 林 真 (委員長) (2000-)

〒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  
安全性生物試験研究センター変異遺伝部  
Tel : 03-3700-9872 Fax : 03-3700-2348  
E-mail : hayashi@nihs.go.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

### 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

### 山田 雅巳 (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 (ext 282)  
Fax : 03-3707-6950  
E-mail : myamada@nihs.go.jp

### 赤沼 三恵 (2000-)

〒187-0011 東京都小平市鈴木町 2-772  
勸業農薬研究所試験企画部  
Tel : 042-382-2146 Fax : 042-383-7640  
E-mail : mie.a@viola.ocn.ne.jp

## 評議員

赤沼 三恵	荒木 明宏	宇野 芳文	太田 敏博	大塚 雅則
大西 克成	葛西 宏	鎌滝 哲也	川西 正祐	菊池 康基
木苗 直秀	後藤 純雄	佐々木 有	澁谷 徹	島田 弘康
清水 英佑	下位香代子	須藤 鎮世	祖父尼俊雄	高橋 和彦
田中 憲穂	出川 雅邦	寺尾 良保	長尾美奈子	中嶋 圓
中村 好志	糠谷 東雄	布柴 達男	根岸 和雄	能美 健彦
林 真	早津 彦哉	平山 晃久	藤川 和男	降旗 千恵
本間 正充	宮川 誠	望月 正隆	森 秀樹	森 幸雄
森田 健	矢嶋 信浩	山添 康	吉川 邦衛	若田 明裕
若林 敬二	(五十音順)			

環境変異原研究 第22巻 第2号 2000年

平成12年7月17日 印刷

平成12年7月31日 発行

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



目 次

一般論文

- 大気浮遊粒子，河川水および土砂の変異原性モニタリング  
後藤純雄，遠藤 治，松本 寛，酒井茂克，芥川智子，麻野間正晴，平山晃久  
渡辺徹志，世良暢之，塚谷裕子，多田敦子，若林敬二 .....45

第 28 回大会受賞講演

学術賞

- 食品中変異原・癌原物質の発見と発がん機構の分子生物学  
長尾美奈子 .....55

研究奨励賞

- 大気・土壌中の変異原物質の定量的評価に関する研究  
渡辺徹志 .....61
- 複製 DNA 合成 (RDS) 試験法を応用した非変異・肝癌原性物質の検出系確立  
宇野芳文 .....67

第 28 回大会シンポジウム

I. がん化学予防の分子生物学的アプローチ

- バイオケモプリベンションーがん予防への新コンセプトー  
西野輔翼，里見佳子 .....77

II. 新しい変異原検出法へのアプローチ

- 新しい変異原検出法へのアプローチ  
能美健彦，葛西 宏 .....83
- トランスジェニックマウス *gpt delta* を用いた点突然変異と欠失突然変異の検出  
能美健彦，増村健一 .....85
- 分子細胞遺伝学的手法によるがん細胞の染色体遺伝子異常解析  
佐々木功典 .....91
- 紫外線で誘発される DNA 損傷とその修復をヒト細胞核内で立体的にみる  
森 俊雄 .....97
- 原子間力顕微鏡による DNA 損傷の検出  
村上正弘，古川 章，南久松真子，早田 勇 .....103
- DNA のエンドジョインニングの分子機構：2 種類の非相同的組換え  
池田日出男 .....107

付 記

日本環境変異原学会 入会申込書  
学生会員申込書

環境変異原研究

投稿規定  
執筆規定