

環境変異原研究

**Environmental
Mutagen
Research**

環境変異原研究

Environmental Mutagen Research

目 次

Inhibitory effects of herbal teas and herb extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid upon treatment with nitrite in the presence of ethanol Minoru Higashimoto, Yoshinobu Akada, Masao Sato, Yoshihide Yamada, Tomomi Kuwahara and Yoshinari Ohnishi	1
---	---

第 29 回大会受賞講演

学術賞 変異原研究領域におけるレギュラトリーサイエンスの確立 祖父尼俊雄	9
研究奨励賞 がん抑制遺伝子 p53 の組換え修復を介した遺伝的安定化機構 本間正充	15
大腸菌の活性酸素防御応答と突然変異誘発機構に関する研究 布柴達男	23

第 29 回大会シンポジウム

I. レスポンダーとノンレスポンダー；遺伝的多型と環境変異原研究 薬物代謝酵素の遺伝的多型の変異原活性化における意義 鎌滝哲也, 藤田健一, 串田浩孝, 梅津有理, 宮本昌美, 有吉範高	33
II. 今, 私の考える環境変異原研究とは; 21世紀に向けて 佐々木 有, 祖父尼俊雄	39

付録

Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM)	45
Guidance on a Strategy for Testing of Chemicals for Mutagenicity	

付 記

日本環境変異原学会 会則	環境変異原研究	投稿規定
細則		執筆規定
平成 13 年度 役員名簿		
12 ~ 13 年度 評議員名簿		
入会申込書		
学生会員申込書		

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

Inhibitory effects of herbal teas and herb extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid upon treatment with nitrite in the presence of ethanol

Minoru Higashimoto¹, Yoshinobu Akada¹, Masao Sato¹, Yoshihide Yamada²,
Tomomi Kuwahara³ and Yoshinari Ohnishi³

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, Tokushima 770-8514, Japan,
² Yamada Yakken Co., Ltd., Osaka 577-0948, Japan, ³ School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503, Japan

Summary

The mutagenicity of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCCA), a major mutagen precursor in soy sauce, upon treatment with nitrite and ethanol was considerably reduced by the addition of herbal tea or herb extracts in the reaction mixture when it was treated with 50 mM nitrite at pH 3, 37 °C for 60 min in the presence of 7.5% ethanol. Among the herbal teas tested, *Banaba* and *Tencha* teas showed strong mutagenicity-reducing activity, and *Kakinoha*, *Kakidooshi* and *Yomogi* teas, and *Tochu* and *Senna* teas also showed moderate and weak antimutagenicity, respectively, in the Ames *Salmonella* mutagenicity test. Abundant amounts of typical polyphenols such as catechins were detected in the highly antimutagenic herbal teas. The antimutagenicity and the reducing power of herbal teas were positively correlated. Among the herb extracts tested, *Jiou* extract showed strong antimutagenicity and *Touki* extract was mildly antimutagenic. *Oubaku* extract showed strong bactericidal activity because of its high content of alkaloid berberine. Diluted *Oubaku* extract showed dose-dependent antimutagenicity. These results suggest that the mutagenicity of MTCCA upon treatment with nitrite in the presence of ethanol is decreased by mixed fractions containing polyphenols such as catechins, which have strong reducing power, and other compounds such as derivatives of catechins, which have little reducing power.

Keywords : antimutagenicity, herb, nitrosation, soy sauce, ethanol

Abbreviations : MTCCA, 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid ; EC, (-)-epicatechin ; ECG, (-)-epicatechin gallate ; EGC, (-)-epigallocatechin ; EGCG, (-)-epigallocatechin gallate ; FIA, flow-injection analysis ; HPLC, high-performance liquid chromatography.

Introduction

Carcinogenic *N*-nitroso compounds are known to be easily produced under acidic conditions in the stomach and are suspected to cause stomach cancer (Magee and Barnes, 1967 ; Hartman, 1982). When various Japanese foodstuffs were treated with nitrite, soy sauce was found

received : September, 14, 2000 accepted : February 14, 2000

© Environmental Mutagen Society of Japan

to have the highest mutagenicity and is therefore very important in the relationship between consumption of Japanese food and the high gastric cancer mortality rate in Japan (Wakabayashi et al., 1983). Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce treated with nitrite, and 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCCA) is a minor one (Ochiai, et al., 1984 ; Higashimoto et al., 1988). However, MTCCA becomes the most potent mutagen precursor in soy sauce when it is treated with nitrite in the presence of ethanol, while the

Table 1 Recommended medicinal applications of herbs used in Japan

Japanese name	English name	Applications ^a
Banaba	banaba leaf ^b	obesity, diabetes
Hatomugi	Job's tears	obesity, liver spots, acne, skin eruption, wart, neuralgia
Juyaku	houttuynia herb	obesity, constipation, acne, chapping, skin eruption, feeling of cold, arteriosclerosis
Kakidooshi	ground ivy	edema, obesity, nephropathy
Kakinoha	persimmon leaf ^b	hypertension, arteriosclerosis, heart failure, chapping
Senna	senna leaf	constipation, piles, skin eruption
Sugina	horsetail	constipation, edema, skin trouble, cystitis, urethritis, nephropathy, asthma
Tencha	tian cha tea ^b	pollinosis, allergic disease, asthma
Tochu	eucommia leaf ^b	obesity, feeling of cold, hypertension, chapping
Yomogi	mugwort	feeling of cold, shoulder discomfort, low back pain, abdominal pain
Jiou	rehmannia root	anemia, hematemesis, nephropathy, heart disease, women's disease
Ninjin	ginseng	coronary arteriosclerosis, angina pectoris, myocardial infarction, hypertension
Oubaku	phellodendron bark	gastritis, enteritis, myalgia
Touki	Japanese angelica root	loss of vitality, women's disease, pain
Yokuinin ^c	coix seed	same as Hatomugi

^a Mitsuhashi (1988), Hotta (1989), Uno (1997).^b named by Yamada Yakken Co., Ltd.^c Chinese medicinal name of the seed of Hatomugi (Job's tears).

mutagenicity induced by nitrite-treated tyramine is strongly decreased in the presence of ethanol (Higashimoto et al., 1995, 1996). It is very likely that a large amount of mutagens may be produced in the stomach of a person who consumes alcoholic beverages while eating food cooked with soy sauce, whereas the results of epidemiological studies have shown that habitual drinking does not necessarily increase the risk of stomach cancer (Hirayama, 1977; Kato et al., 1990). We therefore speculated that some anticarcinogens in the diet (Hayatsu et al., 1993) reduce the mutagenicity produced by nitrite-treated MTCCA in the presence of ethanol.

It has been shown that green, black and oolong teas derived from *Camellia sinensis* inhibit N-nitrosation (Wu et al., 1993; Tanaka et al., 1998) and have antimutagenic and antitumor activities (Jain et al., 1989; Hayatsu et al., 1993; Yang and Wang, 1993; Weisburger et al., 1996; Chung, 1999). The antimutagenic and anticarcinogenic activities are mainly due to the actions of polyphenols such as catechins in the teas (Kuroda and Hara, 1999a, 1999b). In addition, much attention has been given in recent years not only to green, black and oolong teas but also to many kinds of herbal teas for their various health-promoting effects (Uno, 1997; Craig, 1999). We previously reported that the mutagenicity of MTCCA treated with nitrite in the presence of ethanol was decreased by the addition of citrus fruits (Higashimoto et al., 1998) and by the addition of green, black or oolong teas (Higashimoto et al., 2000) to the reaction mixture. The 15 herbs used in the present study are all popular folk medicines in Japan and are used for various applications (Table 1).

The 15 herbs used in the present study are all popular folk medicines in Japan and are used for various applications (Table 1).

Materials and methods

Herbal teas and chemicals

Ten commercial dried herb products prepared from *Banaba* (*Lagerstroemia speciosa* Pers.), *Hatomugi* (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf), *Juyaku* (*Houttuynia cordata* Thunb.), *Kakidooshi* (*Glechoma hederacea* L. var. *grandis* Kudo), *Kakinoha* (*Diospyros kaki* Thunb.), *Senna* (*Cassia angustifolia* Vahl.), *Sugina* (*Equisetum arvense* L.), *Tencha* (*Rubus suavissimus* S. Lee), *Tochu* (*Eucommia ulmoides* Oliv.) and *Yomogi* (*Artemisia princeps* Pampan.) were provided by Yamada Yakken Co., Ltd. (Osaka, Japan). Loose tea leaves were packed in commercial tea bags (Tokiwa Industry Co., Ltd., Ehime, Japan), and teas in bags were used as such. The tea leaves were weakly boiled for 10 min in one liter of water per 5 g and then removed. The herbal teas were used for experiments after cooling.

Herb extracts were prepared from 330 g of each herb with 2.2 liters of 50% 1,3-butylene glycol aqueous solution at room temperature by Yamada Yakken Co., Ltd.. Bottled herb extracts from *Jiou* (*Rehmannia glutinosa* Libosch.), *Ninjin* (*Panax ginseng* C. A. Meyer), *Oubaku* (*Phellodendron amurense* Rupr.), *Touki* (*Angelica acutiloba* Kitagawa) and *Yokuinin* (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) were used as such.

The 15 herbs used in the present study are all popular folk medicines in Japan and are used for various applications (Table 1).

MTCCA (CAS No. 5470-37-1), (-)-epicatechin (EC; CAS No. 490-46-0), (-)-epicatechin gallate (ECG; CAS No. 1257-08-5), (-)-epigallocatechin

(EGC; CAS No. 970-74-1) and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG; CAS No. 989-51-5) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). (+)-Catechin (CAS No. 154-23-4) was obtained from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Gallic acid (CAS No. 149-91-7) and berberine chloride (CAS No. 633-65-8) were obtained from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan). The other chemicals were of reagent grade.

Nitrite treatment

Chemicals were dissolved or suspended in sterilized water. One milliliter of aqueous solution containing 0.6 mg of MTCCA, 0.15 ml of ethanol and 0 - 0.4 ml of one of the herbal teas or herb extracts was mixed in a brown tube with 1 ml of 0.1 M sodium nitrite and adjusted to pH 3.0 with 6 N HCl and by monitoring using a pH meter equipped with a small electrode. The reaction mixtures were incubated at 37°C for 60 min in the dark. Nitrosation was stopped by the addition of 1 ml of 0.1 M ammonium sulfamate to decompose the residual nitrite. All nitrite treatments were performed in triplicate. Each nitrite-treated sample was immediately used for the mutation assay.

Mutation test

The mutation test with *Salmonella typhimurium* strain TA100 was conducted in duplicate by the preincubation procedure of Maron and Ames (1983) in the absence of S9 mix. A mixture containing 0.1 ml of a nitrite-treated sample, 0.5 ml of buffer solution (pH 7.4) and 0.1 ml of an overnight culture of strain TA100 was preincubated at 37°C for 20 min, mixed with 2 ml of soft agar, and plated on an agar plate. The His⁺ revertant colonies were counted after incubation at 37°C for 48 hr. The mutation was assayed in brown tubes under a yellow lamp in a dark room. The numbers of spontaneous revertants (118 ± 10) were subtracted from all the data on mutagenicity. A positive control, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (AF-2, 10 ng), generated 431 ± 36 His⁺ revertants.

High-performance liquid chromatography

Six catechin monomers (EGCG, EGC, ECG, EC, catechin and gallic acid) in the herbal teas and herb extracts were detected by high-performance liquid chromatography (HPLC). HPLC was performed using a Shimadzu LC-6A equipped with a UV monitor set usually at 270 nm. The column oven was maintained at 50°C. Separation was conducted with a Shim-pack ODS column (6 mm i.d. × 150 mm) using a mobile phase (1 ml/min) of 10 mM phosphate buffer containing acetonitrile, whose content was linearly increased from 0 to 30% over a period of 45 min.

Reducing power

Polyphenols such as catechins reduce Fe (III) to Fe (II), which subsequently reacts with 1,10-phenanthroline to form a colored complex (Tomàs et al., 1993). The intensity of the absorbance by the colored product, namely a reducing power, reflects the polyphenol contents in herbal teas. The reducing power of each of the herbal teas was determined according to the flow-injection spectrophotometric method of Tomàs et al. Each tea extract to which 0.01 M iron (III) chloride had been added was mixed with 0.5 M acetic acid and subsequently mixed with 0.05 M 1,10-phenanthroline in the flow-injection apparatus. The difference between the maximal absorption (510 nm) and zero absorption (680 nm) derived from the colored complex iron (II)-1,10-phenanthroline was monitored. The data were processed with a computer system to calculate the corresponding analytical concentrations. A calibration was constructed from standards containing gallic acid.

Statistical analysis

The data were analyzed statistically by analysis of variance. The correlation coefficient was calculated by the formula of Pearson.

Results

Mutagenicity-reducing activity of herbal teas

The mutagenicity of MTCCA treated with nitrite in the presence of ethanol was strongly decreased by the addition of 0.1 - 0.4 ml of *Banaba* or *Tencha* teas in 2 ml of the nitrosating reaction mixture as shown in Fig. 1. The mutagenicity was significantly and dose-dependently decreased by the addition of *Kakinoha*, *Kakidooshi* and *Yomogi* teas at almost all the dose levels tested. *Tochu* and *Senna* teas also showed significant antimutagenicity at high dose levels (0.3 - 0.4 ml). The addition of maximum doses of *Banaba*, *Tencha*, *Kakinoha*, *Yomogi*, *Kakidooshi*, *Tochu* and *Senna* teas reduced the levels of mutagenicity to 3.5, 4.5, 18.3, 36.0, 45.4, 51.1 and 58.7% of the levels in the absence of those teas.

Reducing power of herbal teas

The correlation between the reducing power and the antimutagenicity of the ten herbal teas is shown in Fig. 2. The antimutagenicity of the tea extracts showed a significant positive correlation with the reducing power as a whole ($r = 0.824, p = 0.01$).

Catechin contents in the herbal teas

Six catechin monomers (EGCG, EGC, ECG, EC, catechin and gallic acid) in the ten herbal teas were detected by HPLC. Among the herbal teas, *Banaba*, *Kakidooshi*, *Kakinoha*, *Tencha* and *Yomogi* teas, which had strong antimutagenicity against the nitrite-treated

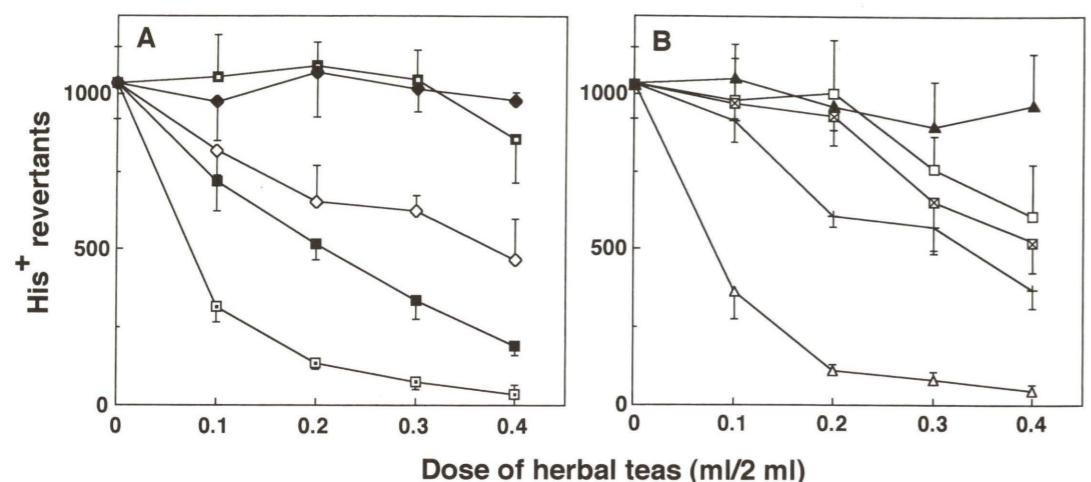


Fig. 1 Antimutagenicity of herbal teas against the mutagenicity of MTCCA upon treatment with nitrite in the presence of ethanol
 (A) —□— *Banaba*, ●—●— *Hatomugi*, ■—■— *Juyaku*, ○—○— *Kakidooshi*, ■—■— *Kakinoha*
 (B) —□— *Senna*, ▲—▲— *Sugina*, △—△— *Tencha*, ■—■— *Tochu*, +—+— *Yomogi*
 A 0.1 - 0.4 ml aliquot of herbal tea was mixed in 2 ml of the nitrosating reaction mixture

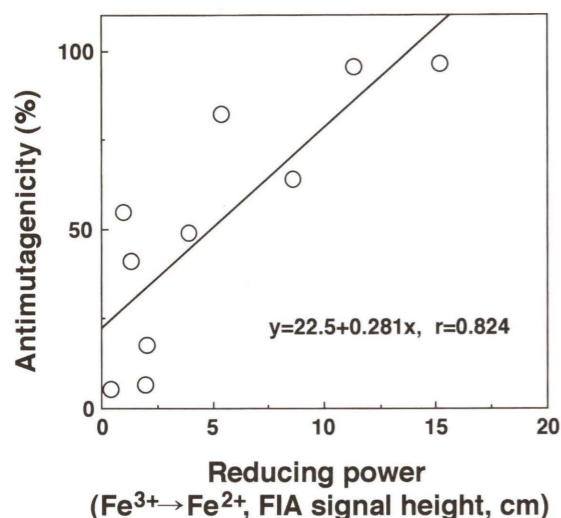


Fig. 2 Correlation between antimutagenicity and reducing power of herbal teas.
 FIA : flow-injection analysis

MTCCA in the presence of ethanol, contained considerably high levels of the six typical catechins listed in Table 2. The other herbal teas contained very low levels of the catechins (data not shown).

Mutagenicity-reducing activity of herb extracts

As shown in Fig. 3, herb extract prepared from *Jiou* strongly decreased the mutagenicity of MTCCA treated with nitrite and ethanol, and *Touki* extract had mild antimutagenicity. The strong decrease in the mutagenicity of nitrite-treated MTCCA in the presence of *Oubaku* extract was a false one because *Oubaku* extract had strong bactericidal activity. When fivefold-diluted *Oubaku* extract was added to the reaction mixture, it showed dose-responsive antimutagenicity without

Table 2 Catechin contents detected in typical herbal teas ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Herbal tea	EGCG	EGC	ECG	EC	catechin	gallic acid
<i>Banaba</i>	115.2	11.5	1.3	9.9	18.1	2.0
<i>Kakidooshi</i>	0.8	1.9	14.4	11.9	4.1	0.2
<i>Kakinoha</i>	71.0	27.2	14.8	6.0	4.4	1.6
<i>Tencha</i>	13.2	14.5	19.8	18.5	10.2	n.d. ^a
<i>Yomogi</i>	7.7	10.6	7.0	n.d. ^a	n.d. ^a	4.2

^a not detected.

HPLC conditions : HPLC, Shimadzu LC-6A ; Detector, UV 270 nm ; column, Shim-pack ODS, 6.0 mm i.d. \times 150 mm ; mobile phase, 10 mM phosphate containing acetonitrile (linear gradient from 0 to 30% in 45 min) ; flow rate, 1 ml/min.

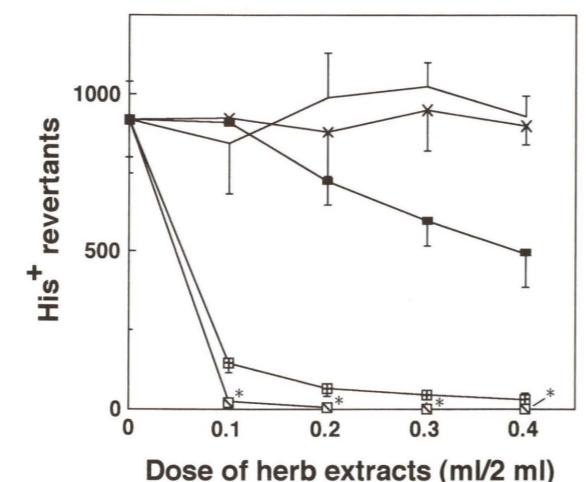


Fig. 3 Antimutagenicity of herb extracts against the mutagenicity of MTCCA upon treatment with nitrite in the presence of ethanol
 ■—■— *Jiou*, ✕—*Ninjin*, □—□— *Oubaku*, ■—■— *Touki*, —— *Yokuinin*

* Bacterial growth in the background culture was found to be inhibited to a great extent
 A 0.1 - 0.4 ml aliquot of herb extract was mixed in 2 ml of the nitrosating reaction mixture

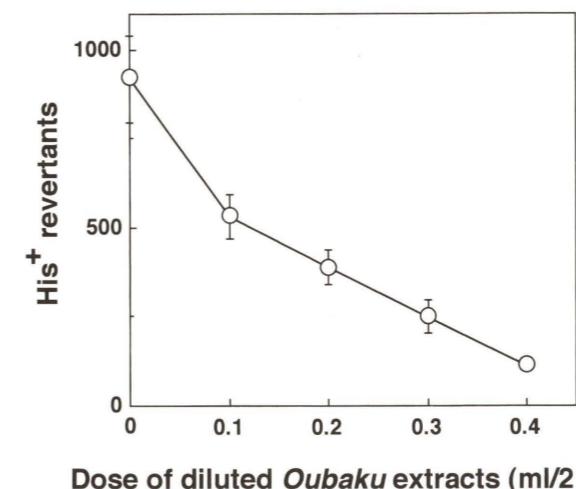


Fig. 4 Antimutagenicity of fivefold-diluted *Oubaku* extract against the mutagenicity of MTCCA treated with nitrite in the presence of ethanol
 A 0.1 - 0.4 ml aliquot of fivefold-diluted *Oubaku* extract was mixed in 2 ml of the nitrosating reaction mixture

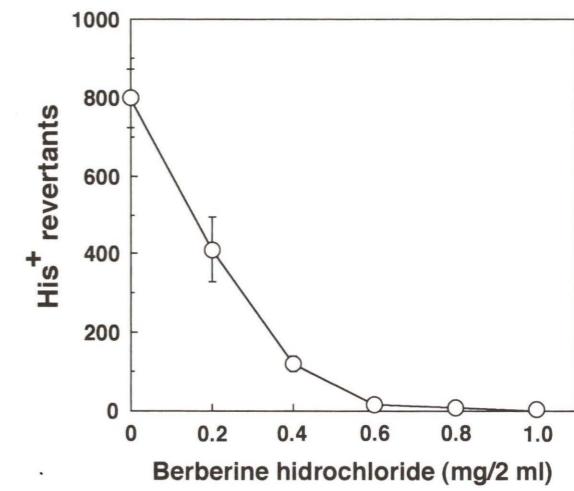


Fig. 5 Antimutagenicity of berberine against the mutagenicity of MTCCA treated with nitrite in the presence of ethanol
 A 0.2 - 1.0 mg berberine hydrochloride was mixed in 2 ml of the nitrosating reaction mixture

bactericidal activity (Fig. 4). The antimutagenicity of *Oubaku* extract was thought to be a result of the high content (3.15 %) of berberine, which had strong antimutagenicity for MTCCA treated with nitrite in the presence of ethanol as shown in Fig. 5.

Catechin contents of herb extracts

Catechin monomers were not detected because of the high contents of unknown ingredients in the *Jiou* extract. *Touki* and the other herb extracts contained less than the detection limits of catechins.

Discussion

The mutagenicity of MTCCA treated with nitrite in the presence of ethanol was strongly and dose-dependently decreased by the addition of some herbal teas to the reaction mixture. It is reported that the antimutagenicity of teas is closely related to their polyphenols such as catechins, namely, reducing components in the teas (Kada et al., 1985 ; 1989 ; Hayatsu et al., 1993 ; Yang and Wang, 1993 ; Apostolidis et al., 1996). The antimutagenicity of the herbal teas used in the present study was positively correlated with their reducing power (Fig. 2) as reported previously (Yen and Chen, 1995 ; Higashimoto et al., 2000). The green tea polyphenol fraction containing six major catechins (49 % EGCG, 14 % EGC, 11 % EGC, 6 % EC, 2 % catechin and 0.3 % gallic acid) mainly accounts for the antimutagenicity of green tea (Ho et al., 1994). Although each herb is a different species of plant, as described above, the five herbal teas, which showed strong mutagenicity-reducing activity against MTCCA treated with nitrite in the presence of ethanol, were also found to contain abundant

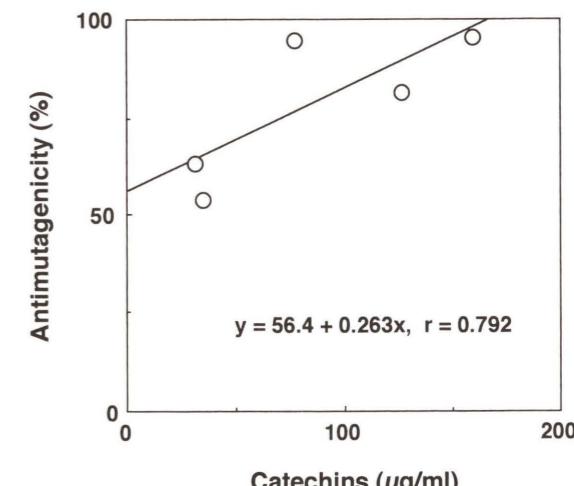


Fig. 6 Correlation of antimutagenicity and the contents of six catechins in five typical herbal teas

amounts of the six catechins. The antimutagenicity and the contents of the six catechins in the five herbal teas were correlated well as shown in Fig. 6, although about half of the antimutagenicity was associated with another factor(s). Among the herbal teas, *Banaba* and *Tencha* teas showed strong antimutagenicity. They have been used as folk medicines for treating obesity and diabetes, and pollinosis, allergic disease and asthma, respectively (Table 1) .

All of the herb extracts used in this study are products from Chinese medicinal plants. Among the herb extracts, *Oubaku* and *Jiou* extracts showed strong antimutagenicity. *Oubaku* is known as a bacteriostatic herb because it contains a large amount of berberine, an antibiotic alkaloid. The original *Oubaku* extract, which

had strong bactericidal activity (Fig. 3), showed dose-responsive antimutagenicity when it was diluted fivefold (Fig. 4), while the antimutagenicity was considerably moderate compared with that of the authentic berberine hydrochloride (Fig. 5). *Oubaku* extract is therefore more suited for natural medicinal or cosmetic use than as a food ingredient. Catechin monomers in herb extracts could not be determined well by our HPLC system. The antimutagenicity of *Jiou* and *Touki* extracts may be due to some polyphenol species such as catechin derivatives and flavonoids. Further work is needed to clarify the antimutagens in them.

Tea is one of the most popular beverages consumed worldwide. Epidemiological studies have indicated that habitual drinking of green tea may diminish the risk of stomach cancer (Oguni et al., 1989 ; Fujiki et al., 1998). In recent years, various herbal teas, as well as green, black and oolong teas, have become popular due to their beneficial health effects such as prevention of allergic disease, obesity, diabetes, nephrosis and arteriosclerosis (Table 1). Although there is still a lack of scientific proof (Winslow and Kroll, 1998 ; Craig, 1999), habitual drinking of herbal teas over a long period of time does seem to have beneficial health effects. Our results also suggest that some herbal teas have health-promoting activity due to their antimutagenic activity in an acidic environment such as that inside the stomach.

References

- Apostolides, Z., D. A. Balentine, M. E. Harbowy and J. H. Weisburger (1996) Inhibition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) mutagenicity by black and green tea extracts and polyphenols, *Mutat. Res.*, 359, 159-163.
- Chung, F. (1999) The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black tea, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220, 244-248.
- Craig, W. J. (1999) Health-promoting properties of common herbs, *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 491S-499S.
- Fujiki, H., M. Saganuma, S. Okabe, N. Sueoka, A. Komori, E. Sueoka, T. Kozu, Y. Tada, K. Suga, K. Imai and K. Nakachi (1998) Cancer inhibition by green tea, *Mutat. Res.*, 402, 307-310.
- Hartman, P. E. (1982) Nitrates and nitrites : Ingestion, pharmacodynamics, and toxicology, in : F. J. de Serres and A. Hollaender (Eds.), *Chemical Mutagens*, Vol. 7, Plenum Pub. Co., New York, pp. 211-294.
- Hayatsu, H., T. Negishi and S. Arimoto (1993) Dietary inhibitors against mutagenesis and carcinogenesis, *Basic Life Sci.*, 61, 387-418.
- Higashimoto, M., K. Matano and Y. Ohnishi (1988) Augmenting effect of a nonmutagenic fraction in soy sauce on mutagenicity of 3-diazotyramine produced in the nitrite-treated sauce, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 79, 1284-1292.
- Higashimoto, M., T. Yamamoto, T. Kinouchi, Y. Handa, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1995) Mutagenicity of soy sauce treated with nitrite in the presence of ethanol or alcoholic beverages, *Mutat. Res.*, 345, 155-166.
- Higashimoto, M., T. Yamamoto, T. Kinouchi, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1996) Mutagenicity of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of alcohols, *Mutat. Res.*, 367, 43-49.
- Higashimoto, M., H. Yamato, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1998) Inhibitory effects of citrus fruits on the mutagenicity of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of ethanol, *Mutat. Res.*, 415, 219-226.
- Higashimoto, M., Y. Akada, M. Sato, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (2000) Inhibitory effects of tea extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid on treatment with nitrite in the presence of ethanol, *Food Chem. Toxicol.*, 38, 7-13.
- Hirayama, T. (1977) Changing patterns of cancer in Japan with special reference to the decrease in stomach cancer mortality, in Hiatt, H. H., J. D. Watson, and J. A. Winsten (Eds.) *Origins of Human Cancer. Book A. Incidence of Cancer in Humans*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 55-75.
- Hotta, M. (1989) *Useful Plants of the World*, Heibonsha, Tokyo.
- Ho, C., T. Ferraro, Q. Chen, R. T. Rosen and M. Huang (1994) Phytochemicals in teas and rosemary and their cancer-preventive properties, in Ho, C., T. Osawa, M. Huang and R. T. Rosen (Eds.) *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II : Teas, Spices, and Herbs*, ACS Symposium Series 547, Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 2-19.
- Jain, A. K., K. Shimoji, Y. Nakamura, T. Kada, Y. Hara and I. Tomita (1989) Crude tea extracts decrease the mutagenic activity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine *in vitro* and in intragastric tract of rats, *Mutat. Res.*, 210, 1-8.
- Kada, T., K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki and Y. Hara (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens : A case of the green tea factor, *Mutat. Res.*, 150, 127-132.
- Kato, I., S. Tominaga, Y. Ito, S. Kobayashi, Y. Yoshii, A. Matsuura, A. Kameya and T. Kano (1990) A comparative case-control analysis of stomach cancer and atrophic gastritis, *Cancer Res.*, 50, 6559-6564.
- Kuroda, Y. and Y. Hara (1999a) Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea catechins (I), *Environ. Mutagen Res.*, 21, 1-10.
- Kuroda, Y. and Y. Hara (1999b) Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea catechins (II), *Environ. Mutagen Res.*, 21, 85-94.
- Magee, P. N. and J. M. Barnes (1967) Carcinogenic nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.*, 10, 163-246.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-215.
- Mitsuhashi, H. (1988) *Illustrated Medicinal Plants of the World in Colour*, Hokuryukan, Tokyo.
- 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, *Jpn. J. Cancer. Res. (Gann)*, 75, 1-3.
- Oguni, I., K. Nasu, S. Kanaya, Y. Ota, S. Yamamoto and T. Nomura (1989) Epidemiological and experimental studies on the antitumor activity by green tea extracts, *Jpn. J. Nutr.*, 47, 93-102.
- Tanaka, K., T. Hayatsu, T. Negishi and H. Hayatsu (1998) Inhibition of *N*-nitrosation of secondary amines *in vitro* by tea extracts and catechins, *Mutat. Res.*, 412, 91-98.
- Tomàs, C., M. Celeste, A. Cladera, E. Gómez, J. M. Estela and V. Cerdà (1993) A new flow-injection spectrophotometric method for the determination of tannins in tea and beer using iron (III) and 1,10-phenanthroline, *Food Chem.*, 47, 201-204.
- Uno, F. (1997) *Beauty-making Healthy Collection*, Dobunshoin, Tokyo.
- Wakabayashi, K., M. Ochiai, H. Saito, M. Tsuda, Y. Suwa, M. Nagao and T. Sugimura (1983) Presence of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, a precursor of a mutagenic nitroso compound, in soy sauce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2912-2916.
- Weisburger, J. H., Hara Y., Dolan L., Luo F. Q., Pittman B. and Zang E. (1996) Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens, *Mutat. Res.*, 371, 57-63.
- Winslow, L. C. and D. J. Kroll (1998) Herbs as medicines, *Arch. Intern. Med.*, 158, 2192-2199.
- Wu, Y., H. Wang, J. Li and C. Han (1993) The inhibitory effect of Chinese tea and its polyphenols on *in vitro* and *in vivo N*-nitrosation, *Biomed. Environ. Sci.*, 6, 237-258.
- Yang, C. S. and Z. Wang (1993) Tea and cancer, *J. Nat. Cancer Inst.*, 85, 1038-1049.
- Yen, G. and H. Chen (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 27-32.

変異原研究領域におけるレギュラトリーサイエンスの確立

祖父尼 俊雄

オリンパス光学工業(株)ライフサイエンステクノロジーリサーチセンター
〒192-8512 東京都八王子市久保山町2-3

Establishment of regulatory sciences in the field of mutagenesis research

Toshio Sofuni

Life Science Technology Research Center, Olympus Optical Co., Ltd.
2-3 Kuboyama-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192-8512, Japan

Summary

"Regulatory sciences" are defined as "sciences to regulate results obtained from basic research fields for practical use in human society". Since not all products of basic research will be useful to society, it is important to be able to select those products which are most likely to be useful. Furthermore, while some products may be profitable, they may be hazardous to humans if handled inappropriately. Therefore, it is important to have processes to evaluate the relative merits of accumulated basic research results, even though such processes may have some limitations. For highly accurate prediction or extrapolation beyond such results, one major requirement is an extensive and high quality database that will help generate "standards (guidelines) for evaluation" with consensus from the regulatory, academic and industry sides. However, it is difficult to establish such a database in basic research fields and relatively large collaborative studies with cooperation of the regulators, academic and industry are essential to establish such database. The achievements in several intra/international collaborative studies on the mouse micronucleus tests, the chromosomal aberration and micronucleus tests using cultured mammalian cells, and the mouse lymphoma *tk* assays, are introduced to demonstrate their usefulness in the regulatory sciences.

Keywords : regulatory sciences, mutagenesis research, *in vitro* chromosomal aberration test, mouse lymphoma *tk* assay, *in vitro* micronucleus test

緒 言

レギュラトリーサイエンスとは、基礎的研究成果を一般社会に活用するために、「それらを調整（レギュレート）して正しい方向付けをする科学」（内山，1990）である。急激な進歩をとげている現代科学技術およびそこから得られる成果物は、すべてが有益とは限らず、また有益なものでも使い方次第では有害となりうるので、「それらの中から人間や環境にとって有益なものを選別し、さらにそれらを正しく利用する道をつけるのがレギ

ュラトリーサイエンスである」といえる（内山，1993）。例えその時点での科学的知見が限られていたとしても、その限られた中からメリットとデメリットを予測することが要求されており、そのためには可能な限り精度の高い予測を下せるべき基準が必要となる。精度の高い予測あるいは外挿を行うためには、高品質でかつ多量のデータベースが必要であり、これを基にして得られた産官学の科学的合意の上に基準が作られるべきである。

しかしながら、現実的には多量の高品質データが存在することはまれであり、そのことが精度の高い予測を行うための基準作りの障害となってきた。基礎研究の場ではそのようなデータの蓄積は困難であり、また個別の研究室で行い得るものでもない。そのため、産官学の横断

受付：2001年4月24日 受理：2001年4月27日
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第29回大会において発表された2000年度学術賞受賞講演である。
This paper is the lecture of the JEMS Award (2000) presented at the 29th JEMS annual meeting, 2000.

Table 1 Comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by the CHL and CHO systems in culture

Cell system	Test results			
	Positive	Weak positive	Equivocal	Negative
CHL	14 (56 %)	6 (24 %)	2 (8 %)	3 (12 %)
CHO	11 (44 %)	1 (4 %)	0	13 (52 %)

From Sofuni et al. (1990)

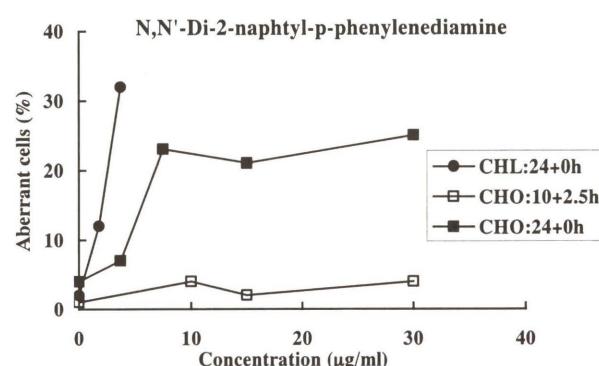


Fig. 1 Comparison of two treatment schedules (10 and 24 h exposure time) in CHO cells without S9 mix

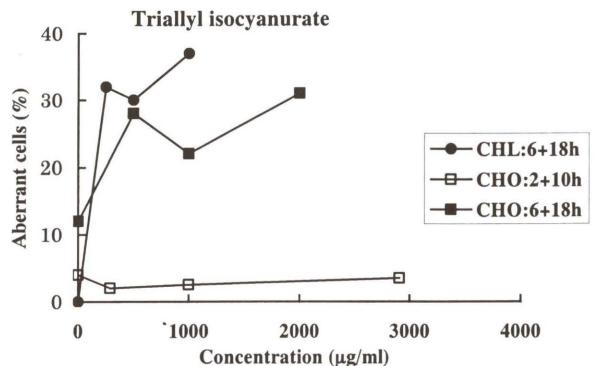


Fig. 2 Comparison of two treatment schedules (2 h exposure time with 10 h recovery time and 6 h exposure time and 18 h recovery time) in CHO cells with S9 mix

的でかつ大規模な共同研究の実施がレギュラトリーサイエンス確立のために必要とされてきたのである。

1. 共同研究体制の確立

変異原性試験は短期間に実行されることから、データの蓄積が比較的用意であるといえ、特に実験動物を用いる試験では必ずしも必要なデータが蓄積されておらず、きわめて希薄な根拠を基に試験プロトコールが示される場合がある。そのため、実験動物を用いる変異原性試験の共同研究をおもな目的として設立されたのが「哺乳動物試験（MMS）研究会」である。後に本学会の下部組織として組入れられ、今日にいたっている。

MMS研究会では、最初にげっ歯類を用いる小核試験の共同研究を開始したが、当初は参加者も限られ、得られるデータの質にも問題があり、試験を繰り返すなどの苦労を重ねて、数年のうちに高品質のデータを排出できる共同研究の体制を確立することができた。MMS研究会による共同研究の成果は膨大であり、国内のみならず国際的にも認知されており、いわゆる基準（ガイドラインなど）作りに多大の貢献を果たすとともに、小核試験は実験動物を用いる変異原性試験の代表的試験としての位置を獲得するにいたった（総説（Sutou, 1996）を参照）。

2. 国際的調和

仮に国内的に妥当な基準が確立されたとしても、それが国際的に通用するとは限らない。各国で異なる基準が用いられたことから、結果の評価に差異が生じることもある。米国国家プロジェクト（NTP）におけるほ乳類培

Table 2 Discordant results by different test protocol in the CHO cell system

No.*	mix	S9		Original		Present		Comment
		protocol	result	protocol	result	protocol	result	
1	-	8 + 4h	-	6 + 18h	w/+	24/48h treatment less effective		
10	-	10 + 2.5h	-	10 + 2h	+	24h treatment improves response		
14	-	10 + 3h	-	24/48 + 0h	+	Needs longer treatment time than 10h		
15	-	10 + 3h	-	24/48 + 0h	+	Needs longer treatment time than 10h		
18	-	10 + 2.5h	-	22 + 2/48 + 0h	+	Needs longer treatment time than 10h		
21	+	2 + 10h	-	2/6 + 18h	+	Needs later sampling time than 12h		
23	+	2 + 10h	-	2 + 22/6 + 18h	+	Needs later sampling time than 12h		
23	-	8 + 4.5h	-	6 + 14h	+ (w)	Needs later sampling time than 12h		
25	+	2 + 10h	-	2/6 + 18h	+	Needs later sampling time than 12h		

From Galloway et al. (1997)

* From Sofuni et al. (1990)

w : weak positive.

自然誘発異常頻度が高くなっている、恐らくS9による影響と考えられ、CHO細胞では6時間よりも短い処理時間が必要であると判断された。このような結果から、試験プロトコール、特に処理時間と標本作製時間の違いが結果の相違に重大な影響を与えていたことが判明した（Sofuni et al., 1990）。

同一ロットの被験物質を用いながらCHLとCHOの試験システムにおいて結果に明らかな違いがみられたことから、これらを確認するために新たな国際共同研究が開始された。米国から5機関、英国から1機関、日本から2機関の計8機関が参加し、先に試験された25物質中、特に結果に相違がみられた9物質を取り上げて試験を実施した。海外の機関はCHL/IU細胞とその試験プロトコールを、日本の機関はCHO-WBL細胞とそのプロトコールを導入し、各機関は同一物質についてCHLとCHOの両システムで試験を行うこととした。ただし、網羅的な試験ではなく、試験結果に違いがみられたプロトコールを中心に比較検討を行った。試験結果の要約をTable 2に示す（Galloway et al., 1997）。9物質中1物質（No. 22）は強烈な染色体異常物質で、CHL細胞を用いた+ S9の実験で陰性の結果が得られたが、これは単に用量が不十分であったという理由が明らかになったので、Table 2では割愛してある。CHL細胞では短時間処理では処理開始後24時間目に染色体標本を作製し、連続処理の場合には24および48時間処理後に作製している。CHL細胞の細胞周期は15～17時間であり、24時間目は約1.5細胞周期に相当する。一方、CHO細胞では通常1細胞周期である12時間の標本作製が行われてきたが、これを1.5細胞周期に相当する時間に延長することによって、これまで陰性の結果が得られていたものが、陽性結果になることが判明した（Table 2）。これらの結果から、短時間処理の場合には回復時間を含めて1.5細胞周期後に標本作製を、連続処理の場合には1.5細胞周期の連続処理が必要であることが判明した。現在OECDガイドラインにおいて、「1.5細胞周期」が標準化されているのは、上記の国際共同研究の成果を反映しているのである。こ

れが現在の国際的な基準となっている（祖父尼, 1998a, b）。

変異原性試験は単一な試験ではなく、いくつかの試験を組合せて行うという特徴がある。すべての変異原を検出できる試験はありえないものの、いくつかの試験を用いて互いに補い合うのである。医薬品規制国際会議（ICH）では、各国での試験組合せが異なることから大きな論議をよんだ。特に、米国が取り入れたマウスリシフォーマ試験（MLA）は遺伝子突然変異に加えて染色体異常をも検出できることから、MLAがどれだけ染色体異常誘発物質を検出できるのかが問題となり、そのバリデーションのために共同研究を行った。

最初の共同研究は、国内から42機関、海外から7機関が参加して行われた。被験物質として染色体異常試験で陽性であるが、Ames試験では陰性であるもの20種を選択した。さらに、共同研究内陽性対照物質としてmitomycin C (MMC) を用いた。試験の陽性対照物質としては、methyl methanesulfonateとcyclophosphamideを用いた。被験物質はコード化して各機関に配布し、1物質について少なくとも2機関で試験を実施した。14物質（MMCを含む）が陽性、2物質が2機関のうちの1機関で陽性となった。3物質は2機関のうち1機関で弱い反応があったが、他の1機関では陰性であった。2物質は陰性と判断された。これらの結果はMLAが多くの染色体異常誘発物質を検出できるが、ある種の染色体異常誘発物質は検出できない可能性が示唆された（Sofuni et al., 1996a）。

そのため第2回目の共同研を開始した。国内から39機関、海外から6機関参加し、23の被験物質について試験を行った。このうち14物質は染色体異常試験で陽性であるが、Ames試験では陰性であり、5物質は両試験で陰性であり、3物質は第1回目の試験で結果が不明確であった物質である。第2回目の共同研究の結果については、第1回目の結果と併せてまとめて報告してある（Honma et al., 1999a）。合計40物質が試験され、そのうち33物質は染色体異常試験で陽性であるが、Ames試験

Table 3 Comparison of published chromosome aberration test results and the mouse lymphoma assay results

Mouse lymphoma assay	Chromosome aberration test		
	Positive	Negative	Total
Positive	31 (11*)	2	33 (11*)
Equivocal	1 (1*)	0	1 (1*)
Inconclusive	0	3	3
Negative	2 (2*)	1 (1*)	3 (3*)
Total	34 (14*)	6 (1*)	40 (15*)

From Homma et al. (1999b)

* No. of chemicals confirmed using 24h treatment protocol

では陰性であり、6物質が両試験で陰性、1物質が両試験で陽性の物質である。染色体異常試験で陽性の34物質についてみると、20物質(20/34: 59%)が陽性となり、9物質が陰性となった。残りの5物質では機関間での結果が異なったり、異なる結果が繰り返されたり、明確な結論が得られなかった。得られた陽性率(59%)は予想より低いものであり、MLAが十分に染色体異常誘発物質を検出できるとは結論づけられなかった。

MLAにおける標準的な試験法では、短時間(3~6時間)処理後に2日間培養した上で選択培地で培養し、12日後に変異コロニーを観察する。今回MLAで陰性となった物質の中には、染色体異常試験の短時間処理では陰性であるが、24時間の連続処理で陽性となるものが含まれている。そこで、染色体異常試験では陽性であるが、MLAで陰性あるいは結果が不明確な物質14および染色体異常試験で陰性な物質1の計15物質について、24時間の連続処理法を適用してみた(Honma et al., 1999b)。その結果、14物質のうち11物質が陽性となった。これらの結果を取り入れた最終的な結果をTable 3に示す。34の染色体異常誘発物質のうち31物質が陽性となり、陽性率は91%となった。この結果は、通常のプロトコールでは染色体異常試験との一致性は必ずしもよくないが、24時間連続処理法を加えることにより高い一致性が得られることが示された。この成果により、ICHにおける試験組合せの論議に合意が得られ、医薬品については日米欧の試験組合せが同一のものとなった(祖父尼, 1998a)。また、本邦にマイクロタイマー法によるMLAが定着し、点突然変異から欠失、組換え型突然変異までを検出できるという本試験の有用性が再認識された。

国際的な調和をはかるためには科学的な基礎データを基にした論議が必要であるが、そのような論議、特に国際的な論議を行う場はきわめて限られている。そのため、実際にデータの作製に関与している研究者による国際ワークショップ(IWGT)を開催し、科学的なデータに基づく論議を行い、国際的に受け入れられる基準作りを行った(Kirkland et al., 1994)。これらの成果はOECDやICHガイドラインの検討に著しく貢献した。

染色体異常試験が重要な情報を提供してくれるが、異常の識別が主観的な判断に依存することから、適正な評価を得るためにには高度な経験/熟練が必要とされる。より客観的な判断を行うために、FISHを利用した染色体ペインティング法の導入を行った。特定染色体を蛍光色素で識別できることから、その染色体に関与する異常をより客観的に識別でき、判別が困難な複雑な異常をも識別できることから、その有用性は高い(Matsuoka et al., 1996)。しかし、ヒト、マウス等の染色体プローブは入手できるが、染色体異常試験に多用されているチャイニーズ・ハムスターのプローブが一般に入手できないことから、化学物質による染色体異常試験への利用が広まっているのが現状である。

染色体異常試験の客観化/簡便化として小核試験への移行があるが、培養細胞を用いる場合には有核細胞で小核を識別するため、観察上の普遍化に問題があり、早くから検討を行った(Matsuoka et al., 1993)わりには、あまり進展をみてこなかった。しかし、ICHにおいて培養細胞を用いる小核試験が注目され、また海外から共同研究などによる論文が発表されるようになり、国際的な試験手法の統一への動きが活発化してきた。本邦においては、労働省による共同研究がほぼ10年にわたって継続され、その成果が論文としてまとめられた(Matsushima et al., 1999)ので、ここで紹介する。

この共同研究は労働省の委託研究として(社)日本化学生物質安全・情報センター(JETOC)の協力の下1989年から開始され、4研究機関が参加し、10年間で66化合物について試験が行われた。当初は染色体構造異常誘発物質や倍数体誘発物質を被験物質としたが、化学構造類似の物質を含めたので、その中には、染色体異常試験のデータがないものが含まれている。チャイニーズ・ハムスター細胞株、CHL/IUを用い、基本的に1物質を1研究機関で試験した。連続処理の場合には非代謝活性化法で24, 48, 72時間処理し、ただちに標本を作製した。短時間処理では代謝活性化法および非代謝活性化法で6時間処理し、18, 42, 66時間の回復時間をおいて標本を作製した。5物質についてはcytochalasin Bの効果を検討した。

66物質のうち55物質が染色体異常試験で陽性、7物質が陰性、4物質が染色体異常試験のデータがないものである。55の染色体異常試験陽性物質のうち49

3. 先端技術の導入

レギュラトリーサイエンスに要求されるものは、高度にバリデーションされた技術/試験であることから、その分野に広く受け入れられ確立されたものであることが多い。一方、そのような技術/試験には限界があり、予測性の向上のためにさらに高度な情報を提供する先端技術が絶えず必要とされている。

染色体異常試験が重要な情報を提供してくれるが、異常の識別が主観的な判断に依存することから、適正な評価を得るためにには高度な経験/熟練が必要とされる。より客観的な判断を行うために、FISHを利用した染色体ペインティング法の導入を行った。特定染色体を蛍光色素で識別できることから、その染色体に関与する異常をより客観的に識別でき、判別が困難な複雑な異常をも識別できることから、その有用性は高い(Matsuoka et al., 1996)。しかし、ヒト、マウス等の染色体プローブは入手できるが、染色体異常試験に多用されているチャイニーズ・ハムスターのプローブが一般に入手できないことから、化学物質による染色体異常試験への利用が広まっているのが現状である。

Table 4 Comparison of the *in vitro* micronucleus test results and published chromosome aberration test results

Micronucleus test	Chromosome aberration test			
	Positive	Negative	No data	Total
Positive	36	0	0	36
Weak positive	13	1	3	17
Negative	6	6	1	13
Total	55	7	4	66

From Matsushima et al. (1999)

(89.1%)が*in vitro*小核試験で陽性となった(Table 4)。染色体異常試験陰性7物質中6(85.7%)が小核試験でも陰性であった。この結果染色体異常試験と小核試験の一一致率は88.7%(55/62)となり、小核試験は十分に染色体異常誘発物質を検出できると判断された。なお、cytochalasin Bによる有用性は本システムでは認められなかった。今後、どのようにして国際的に受け入れられる標準的試験プロトコールを確立するかが重要な課題となっている。

変異原性試験データによる評価/予測のうえでの問題点としては、実験動物による遺伝子突然変異の検出がある。そのためにマウスを用いるスポットテストや特定座位試験があり、MMS研究会によるスポットテストの共同研究も行われたが、進展が得られなかった。Ames試験で得られた陽性結果が、生体においても発現するのかどうかを評価するためには、実験動物による突然変異試験を必要としたが、実用性の高い試験系は得られていなかった。このような状況のときに現われたのがトランジェニックマウス(TM)で、早速若手研究者を海外に派遣して、その技術導入を行った(Suzuki et al., 1993)。いずれの臓器においても検出が可能であるというメリットは、これまでの試験系にはない特徴であり、積極的に試験プロトコールの基準化を試みた(Sofuni et al., 1996b)。さらに、突然変異を塩基配列で解析できるという魅力的な面がある反面、放射線に対し低感受性であることから、ある限られた範囲の突然変異(点突然変異と小さな欠失)の検出には有効であるが、大きな欠失などは検出できないものと考えられた。そのため、点突然変異と欠失突然変異を効率よく検出することができる新しいTMの開発を行った(Nohmi et al., 1996)。目下、このTMのバリデーションのための共同研究が実施されている。

変異原性試験においても、最終的にはヒトへの外挿が問題となる。*In vitro*試験においては殊更困難であるが、DNA組換え技術を利用して部分的なモデル化の可能性がみえてきた。そのため、ヒトの遺伝子を組込んだ培養細胞の作製を試みた(Watanabe et al., 1994)。現在、ヒト型試験系確立に向けて多角的な検討が進められてお

り、今後の進展が期待される。その意味では当時このような試みを行った方向づけは間違つていなかったものと判断できる。将来多様なヒト遺伝子をもつモデルがどのようなものになるのか興味深い反面、その利用には多大の配慮が必要になってくるものと思われる。

謝辞

本研究においてご協力を頂いた方々については、お一人ずつお名前を挙げて深謝申し上げたいのではあります。あまりにも多くの方々のご協力を頂きまして、万一書きもれるような方が出ては失礼になると考えまして、大変恐縮ではありますが、お一人ずつのお名前は割愛させて頂きました。

謝辞を述べたい方々は多くおりますが、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部において、著者が在籍中にお世話をになりました皆様方には厚く御礼を申し上げます。また、MMS研究会での数多くの共同研究に参加された方々、特に世話をの方々にはその努力に心からの御礼を申し上げます。培養細胞を用いる染色体異常試験の共同研究の参加者、ICHにおけるMLA共同研究の参加者、培養細胞を用いる小核試験の共同研究の参加者、TMにおける共同研究者、等々、本当に多くの皆様方にお世話になり、深謝申し上げます。このような多くの方々のご理解とご協力を頂けたことこそが、高品質かつ膨大なデータベースの構築という成果に結びついたものと考えております。

参考文献

- Galloway, S. M., T. Sofuni, M. D. Shelby, A. Thilagar, V. Kumaroo, P. Kaur, D. Gulati, D. L. Putman, H. Murli, R. Marshall, N. Tanaka, B. Anderson, E. Zeiger and M. Ishidate, Jr. (1997) Multilaboratory comparison of *in vitro* tests for chromosome aberrations in CHO and CHL cells tested under the same protocols, Environ. Mol. Mutagen., 29, 189-207.
- Honma, M., M. Hayashi, H. Shimada, N. Tanaka, S. Wakuri, T. Awogi, K.I. Yamamoto, N-U. Kodani, Y. Nishi, M. Nakadate and T. Sofuni (1999a) Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test, Mutagenesis, 14, 5-22.
- Honma, M., L-S. Zhang, H. Sakamoto, M. Ozaki, K. Takeshita, M.

- Momose, M. Hayashi and T. Sofuni (1999b) The need for long-term treatment in the mouse lymphoma assay, *Mutagenesis*, 14, 23-29.
- Kirkland, D. J., S. M. Galloway and T. Sofuni (1994) Report of the international workshop on standardisation of genotoxicity test procedures, Summary of major conclusions, *Mutat. Res.*, 312, 205-209.
- Matsuoka, A., K. Yamada, M. Hayashi and T. Sofuni (1996) Chromosomal aberrations detected by chromosome painting in lymphocytes from cancer patients given high doses of therapeutic X-rays, *J. Radiat. Res.*, 37, 257-265.
- Matsuoka, A., N. Yamazaki, T. Suzuki, M. Hayashi and T. Sofuni (1993) Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosomal aberration test, *Mutat. Res.*, 272, 223-236.
- Matsushima, T., M. Hayashi, A. Matsuoka, M. Ishidate Jr., K. F. Miura, H. Shimizu, Y. Suzuki, K. Morimoto, H. Ogura, K. Mure, K. Koshi and T. Sofuni (1999) Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.
- 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 Spi^r and 6-thioguanine selection, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 465-470.
- Sofuni, T., A. Matsuoka, M. Sawada, M. Ishidate Jr., E. Zeiger and M. D. Shelby (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHL and CHO) systems in culture, *Mutat. Res.*, 241, 175-213.
- Sofuni, T., M. Honma, M. Hayashi, H. Shimada, H. Tanaka, S. Wakuri, T. Awogi, K. I. Yamamoto, Y. Nishi and M. Nakadate (1996a) Detection of *in vitro* clastogens and spindle poisons by the mouse lymphoma assay using the microwell method: interim report of an international collaborative study, *Mutagenesis*, 11, 349-355.
- Sofuni, T., T. Suzuki and M. Hayashi (1996b) Initial consideration for use of transgenic mutation assays in a regulatory submission, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 443-446.
- 祖父尼俊雄 (1998a) 遺伝毒性試験ガイドラインの国際的調和: ICHとOECDの動向(上), *J. Toxicol. Sci.*, 23, 19-22.
- 祖父尼俊雄 (1998b) 遺伝毒性試験ガイドラインの国際的調和: ICHとOECDの動向(下), *J. Toxicol. Sci.*, 23, 77-79.
- Sutou, S. (1996) Achievements by CSGMT/JEMS·MMS: the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test in the Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan, *Mutat. Res.*, 340, 151-174.
- 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.
- 内山 充 (1990) レギュラトリーサイエンス, HS NEWS, 6, 49-52.
- 内山 充 (1993) レギュラトリーサイエンス討論会の背景と目標, 衛試報告, 111, 140-141.
- Watanabe, M., A. Matsuoka, N. Yamazaki, M. Hayashi, T. Deguchi, T. Nohmi and T. Sofuni (1994) New sublines of Chinese hamster CHL stably expressing human NAT1 or NAT2 N-acetyltransferases or *Salmonella Typhimurium* O-acetyltransferases: Comparison of the sensitivities to nitoroarenes and aromatic amines using the *in vitro* micronucleus test, *Cancer Res.*, 54, 1672-1677.

Environ. Mutagen Res., 23 : 15 - 21 (2001)

がん抑制遺伝子p53の組換え修復を介した 遺伝的安定化機構

本間 正充

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

Recombinational DNA repair and maintenance of genomic integrity mediated by p53

Masamitsu Honma

National Institute of Health Sciences, Division of Genetics and Mutagenesis
1-81-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Chromosomal double strand breaks (DSB) occurring in mammalian cells can initiate genomic instability and their misrepairs result in chromosomal deletion, amplification, or translocation, common findings in human tumors. The tumor suppressor protein p53 is involved in maintaining genomic stability. We demonstrate here that the deficiency of wild-type p53 protein may allow unrepaired DSB to initiate chromosomal instability. The human lymphoblastoid cell line TK6-E6 was established by transfection with HPV16 E6 cDNA into parental TK6 cells via a retroviral vector. Abrogation of p53 function by E6 resulted in an increase in the spontaneous mutation frequencies at the heterozygous thymidine kinase (*tk*) locus. Almost all TK-deficient mutants from TK6-E6 cells exhibited loss of heterozygosity (LOH) with the hemizygous *tk* allele. LOH analysis with microsatellite loci spanning the long arm of chromosome 17, which harbors the *tk* locus, revealed that LOH extended over half of 17q toward the terminal end. Cytogenetic analysis of LOH mutants by chromosome painting indicated a mosaic of chromosomal aberrations involving chromosome 17, in which partial chromosome deletions, amplifications and multiple translocations appeared heterogeneously in a single mutant. We speculate that spontaneous DSB triggers the breakage-fusion-bridge cycle leading to such multiple chromosome aberrations. In contrast, no chromosomal alterations were observed in TK-deficient mutants from TK6-20C cells expressing wild-type p53. In wild-type p53 cells, spontaneous DSB appear to be promptly repaired through recombination between homologous chromosomes. These results support a model in which p53 protein contributes to the maintenance of genomic integrity through recombinational repair.

Keywords : p53, genomic instability, double-strand break(DSB), recombinational DNA repair, loss of heterozygosity(LOH)

緒 言

染色体上に生じたDNAの2本鎖切断(DSB)は、end-rejoiningまたは相同組換えによって修復される。End-rejoiningによって修復された場合は染色体の部分欠

受付：2001年4月25日 受理：2001年5月7日

©日本環境変異原学会

失、もしくは転座をもたらし、一方、相同染色体間で組換え修復が起こった場合は、構造的変化を伴わない(Jeggo, 1998)。一般的に、組換え修復は酵母などでは高頻度に起こるが、ほ乳類細胞においてはまれであり、DSBの大部分は前者のend-rejoiningによって修復されると考えられている(Weaver et al., 1995)。しかしながら、遺伝的安定性を考えると、組換え修復の方が生体にとっては有利であるように思われる。がん抑制遺伝子で

本稿は日本環境変異原学会第29回大会において発表された2000年度研究奨励賞受賞講演である。

This paper is the lecture of the JEMS Achievement Award (2000) presented at the 29th JEMS annual meeting, 2000.

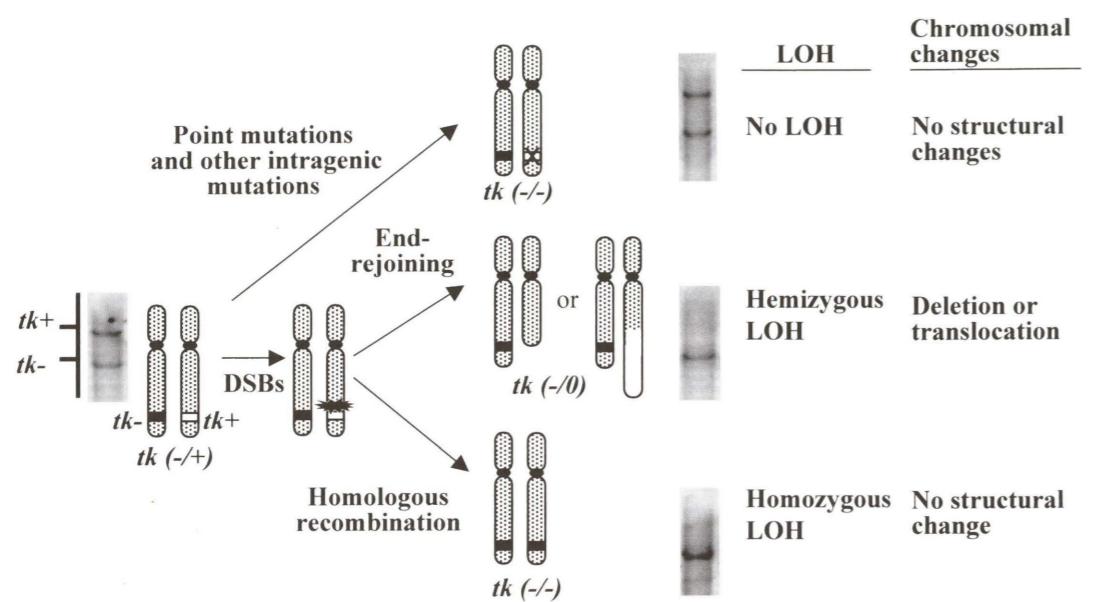


Fig. 1 A general model of recessive mutations in the *tk* locus. The human *tk* gene is located on chromosome 17q and is heterozygous (*tk*+/−) in TK6 cells. DSBs occurring within or near the functional *tk* locus are usually repaired by either of two pathways: end-rejoining or homologous recombination. End-rejoining brings about hemizygous LOH, accompanied by interstitial deletions or translocations, while homologous recombination brings about homozygous LOH, but no apparent changes in chromosome structure. The hemizygous LOH and homozygous LOH can be distinguished by the quantification of the *tk*- band.

あるp53は「ゲノムの守護神」とも呼ばれ、ほ乳類細胞における遺伝的安定化に重要な役割を担っていると考えられている (Lane, 1992; Levine, 1997)。本稿では初めに、ほ乳類ゲノムにおけるDSB修復機構解析のためのモデル系として、チミジンキナーゼ遺伝子 (*tk*) をターゲットとした劣性型遺伝子突然変異検出系の有用性を紹介し、ほ乳類細胞においても組み換え修復機構がDSBの修復に重要な役割を持っていることを示す (本間ら, 1996)。そして、p53欠損および変異細胞を用いた遺伝子突然変異の研究から、p53による組み換え修復を介した新しい遺伝的安定化機構を提唱する (Honma et al., 2000)。

1. 組み換え修復とLOH型突然変異

染色体ゲノムにおけるDSB修復機構を解析するためのモデル系としては、ヒトリンパ芽球細胞株TK6の17番染色体長腕上にヘテロに存在するチミジンキナーゼ遺伝子 (*tk*) をターゲットとした劣性型の遺伝子突然変異検出系が有用である (Fig.1) (Liber et al., 1989)。*tk*遺伝子突然変異細胞はトリフルオロチミジン (TFT) 抵抗性の変異株として回収できるが、*tk*活性アリルにDSBが生じ、それがend-rejoining、もしくは相同染色体間の組み換えによって修復されると、活性型*tk*アリルが消失した変異体、いわゆるLOH (loss of heterozygosity) 型の突然変異体をもたらす (Yandell et al., 1986)。この場合、end-rejoiningによって活性アリルの消失が生じた場合はヘミ型LOH、相同組み換えによって不活化アリルが

ホモになった場合はホモ型LOHとなる。LOHはp53やRbなどの癌抑制遺伝子で観察される変異の一つであり、その多くは単純に遺伝子の欠失によるものと考えられてきた。しかしながら、最近では染色体解析等によりLOHは相同組換えに起因することが多いことが示されている (Honma and Little, 1995; Moynahan and Jasin, 1997)。

組み換え修復が逆に劣性型の突然変異をもたらすことは奇妙に思えるかもしれない。これは、相同組み換えはゲノム上のさまざまな部位で起きDSBの修復に寄与していると考えられるが、たまたま組み換えのドナーとなる遺伝子に突然変異があると、その変異をホモ化するためである (本間, 1999a)。このことは、癌抑制遺伝子の2段階ヒットにおける不活化機構を考慮する上でも重要である。相同組み換え自体は突然変異をもたらさないが、第1ヒットとして点突然変異が存在するときに限り、第2ヒットとしてのDSBが相同組み換えを通じて劣性型の変異をもたらす。多段階発癌過程における癌遺伝子や癌抑制遺伝子の段階的な変異の蓄積にはこのような変異のタイプとその順序が重要であり、点突然変異は癌化初期に、相同組み換えによるLOHは中期以降の変異の蓄積に関与するものと考えられる。

LOHは欠失もしくは相同組み換え以外に、gene conversion, illegitimate recombination, mitotic non-disjunction, chromosome duplication等のメカニズムによっても起こりうる (Fig. 2)。これらメカニズムは染色体や、*tk*近傍の遺伝マーカー等を解析することにより分

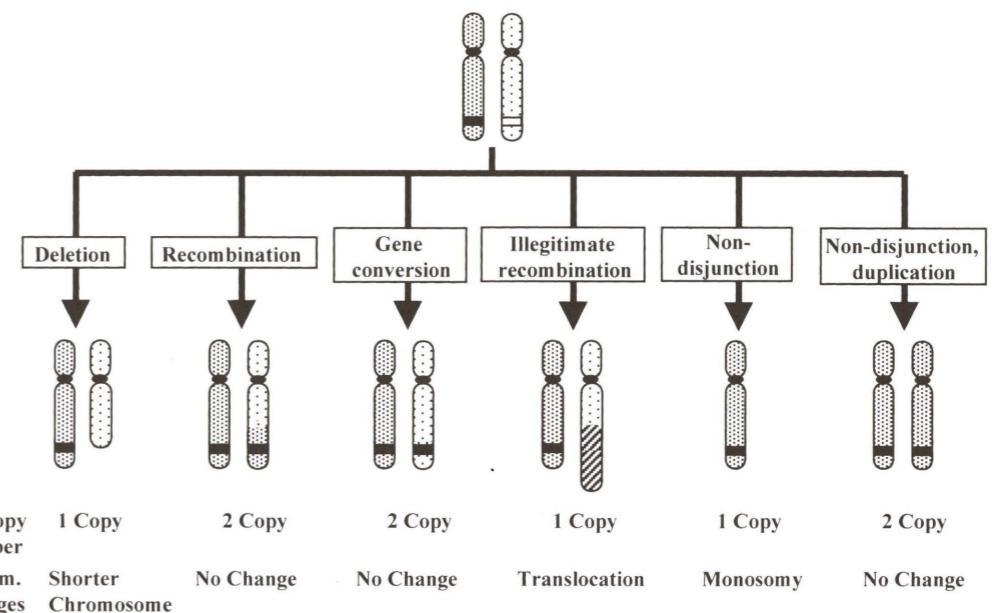


Fig. 2 A model for the mechanisms that generate LOH. Deletion, homologous recombination, gene conversion, illegitimate recombination, non-disjunction, and non-disjunction followed by chromosome duplication contribute to LOH. These mechanisms can be distinguished by molecular and cytogenetic analyses.

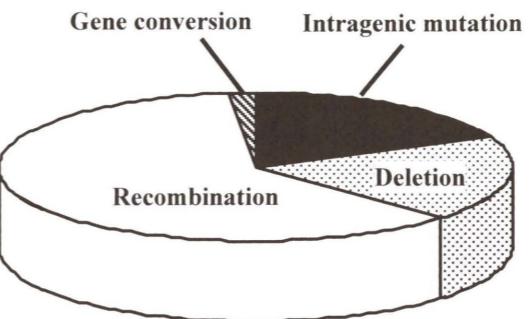


Fig. 3 Spectra of mutations at the *tk* locus spontaneously generating in TK6 cells. Deletion, recombination, and gene conversion are demonstrated as LOH.

類することができる。LOH発生のメカニズムを解明することは、ヒト細胞における組み換え修復機構だけではなく、細胞癌化を制御する因子の解明にもつながるものと考えられている (Honma et al., 2001)。

Fig. 3にTK6細胞の自然誘発*tk*遺伝子突然変異のスペクトルを示す。全体の突然変異の20%が点突然変異で、残り80%がLOHであり、その大部分が相同組み換えに起因していた (Honma et al., 1997a)。このことは、ほ乳類細胞においてもDSBの修復に、組み換え修復が重要な役割を果たしていることを示すものである。ただし、この結果から単純にヒト細胞での自然突然変異は点突然変異よりも、組み換えによるLOHの方が高頻度に起こっていると言いかることはできない。常染色体性劣性型突然変異検出系では、組み換えによってLOHを引き起こすDSBは必ずしも*tk*遺伝子内に生じる必要がなく、ターゲットはセントロメアまでの上流領域まで含まれるた

め、組換型LOHが検出しやすい系であることを理解しておく必要がある。しかしながら、癌抑制遺伝子であるRbやp53のヒトがん組織でのLOH頻度や、その機構はここで観察されたものと一致しており、本検出系はDSB修復のモデル系であると同時に、細胞のがん化過程における遺伝子変化のモデルとも考えることもできる (Li et al., 1992)。

2. p53欠損細胞における遺伝的不安定性の特徴

がん抑制遺伝子であるp53はヒトがん組織において最も高頻度に変異が観察される遺伝子であり (Hollstein et al., 1991)，その役割として、損傷したDNAを認識し、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、DNA修復の促進を行うことによりゲノムの安定化に寄与していると考えられている (Kastan et al., 1991; Ko et al., 1996)。p53遺伝子の突然変異制御への役割を検討するため、p53欠損細胞、もしくは変異細胞を用い、そこで生じる遺伝子突然変異頻度や特徴をp53正常細胞と比較した。

TK6細胞にヒトパピローマウイルスのE6タンパクを発現させたTK6-E6細胞、およびベクターのみを導入したTK6-20C細胞を樹立した。E6タンパクは野生型p53タンパクと結合し、すみやかに分解するため、TK6-E6細胞は機能的にp53を欠損した細胞とみなすことができる (Yu et al., 1997)。Fig.4にそれぞれの細胞株の*tk*遺伝子突然変異頻度を示した。TK6-E6は約10倍の自然突然変異頻度の上昇が認められ、p53の欠損により細胞は遺伝的に不安定にあり、いわゆるmutator phenotypeを示した (Honma et al., 2000)。

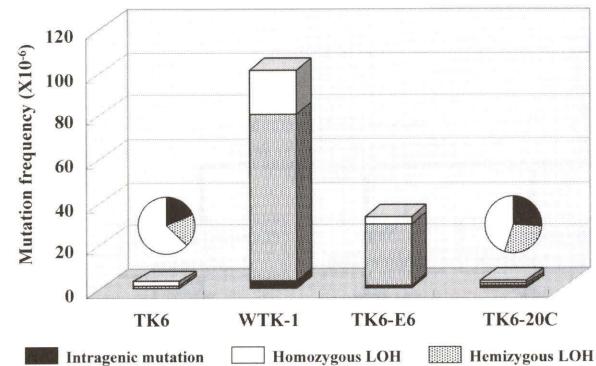


Fig. 4 Spontaneous mutation frequencies and spectra of the mutations at the *tk* locus in wild-type p53 cells (TK6, TK6-20C), p53-deficient cells (TK6-E6), and p53-mutated cells (WTK-1). The mutations are classified into 3 types; intragenic mutation, hemizygous LOH, and homozygous LOH.

TK6-E6細胞で生じる突然変異の特徴を明らかにするため *tk* 変異体のLOH解析を行った (Fig. 4). Fig.3に示したようにp53正常細胞であるTK6では生じる変異の大部分がホモ型のLOHだったのに対して、TK6-E6ではそのほとんどがヘミ型LOHを示した。このことはTK6-E6細胞では組み換え修復が起こらないためDSBの大部分はend-rejoiningによって修復されることを示している。このLOHの範囲をマイクロサテライトマーカーを用いて17番染色体上にマッピングした (Fig. 5)。p53正常細胞 (TK6) 由来の欠失型LOHのほとんどは *tk* 遺伝子に

限局する interstitial deletion か、*tk* より末端までの terminal deletion であり、染色体の変化が最小限となっているのに対して、p53欠損細胞 (TK6-E6) のほとんどの変異体には、染色体広範にわたる terminal deletion が起きていた。また、このような広範なLOHはp53正常細胞ではすべて組換型LOHとして観察されることから、本来組換によって修復されるべきDSBが、p53欠損細胞ではend-rejoiningによって修復され、その結果、大きな染色体異常をもたらしているものと考えられた。実際、TK6-E6由來のLOH変異体をクロモゾームペイント法により解析すると、17番染色体の部分欠失、転座、増幅等の構造異常が同一クローニング中にモザイクとして観察された。

これらの観察結果から、以下のようなp53欠損細胞における遺伝的不安定性のメカニズムを提唱する (Fig. 6)。一般に、染色体上におきた2本鎖切断は、まずend-rejoiningに修復され、これはinterstitial deletionをもたらす。そして、ここで修復されなかった2本差切断は、DNA複製後、相同染色分体間の組換によって修復される。このように正常細胞ではend-rejoiningと組換修復により、染色体は比較的安定に保たれるものと考えられる。一方、p53欠損細胞では、組換修復ができないため、DNA複製後の染色分体は、その安定性を確保するため互いに結合し、chromatid fusionを形成する。これは、一時的には安定であるが、細胞分裂を迎えると引きちぎられ、再び2本鎖切断が生じる。そしてこれが

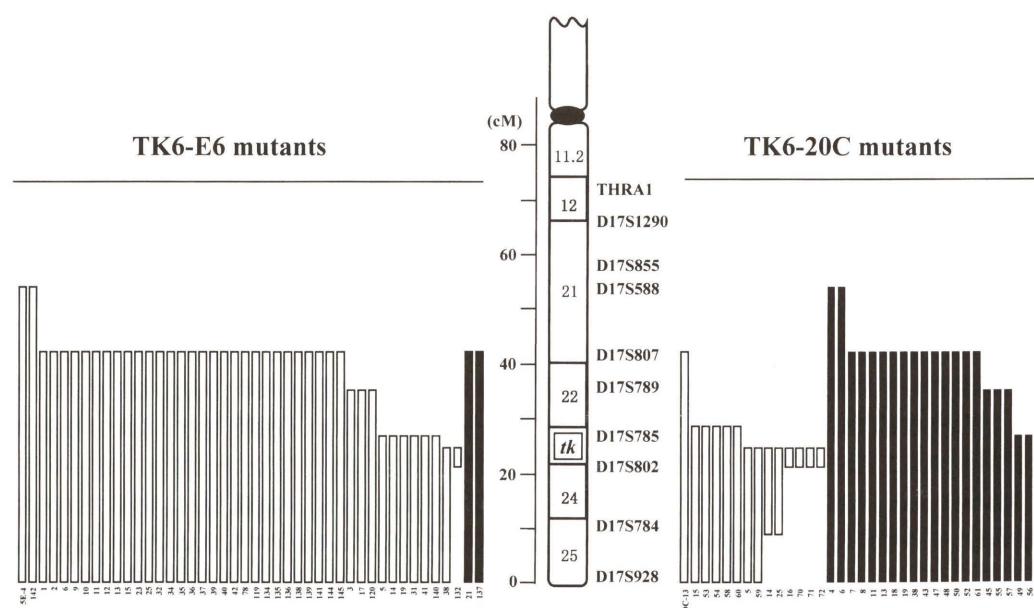


Fig. 5 Extent of loss of heterozygosity (LOH) in the TK-deficient mutants TK6-E6 and TK6-20C. Ten microsatellite loci on chromosome 17 that are heteromorphic in TK6 cells were examined. The approximate position of each locus is mapped on the schematic chromosome 17q. The human *tk* locus is mapped on 17q23.2. Open and closed bars represent hemizygous LOH and homozygous LOH mutants, respectively. Length of bars indicates the extent of LOH. Forty-two hemizygous and 2 homozygous LOH mutants from TK6-E6 and 14 hemizygous and 20 homozygous LOH mutants from TK6-20C were analyzed.

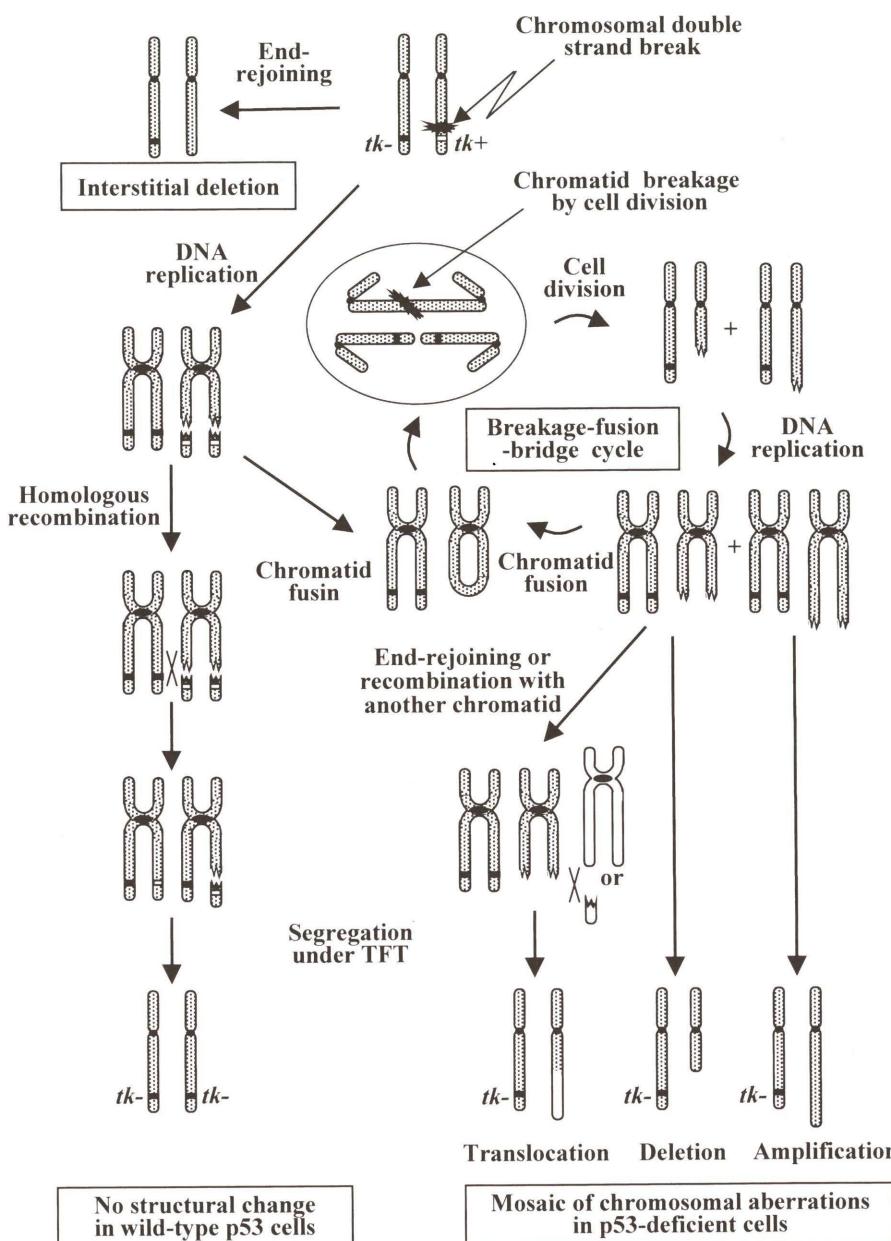


Fig. 6 A model for mechanisms eliciting DSBs repair in wild-type p53 cells and p53-deficient cells. DSBs spontaneously arising are primarily repaired by end-rejoining, resulting in interstitial deletions. After DNA replication, remaining DSBs were promptly repaired by homologous recombination resulting in homozygous LOH, but no apparent chromosomal changes. In p53-deficient cells, on the other hand, the DSBs are not subjected to recombinational repair. Broken chromosomes trigger the breakage-fusion-bridge (BFB) cycle, occasionally stabilized by the addition of a chromosome fragment with telomere through end-rejoining or recombination, and then finally lead to a mosaic of variegated chromosome aberrations.

DNA複製を経て、再びchromatid fusionを起こし、これが繰り返される。この現象をBreakage-fusion-bridge (BFB) cycleという (Coquelle et al., 1997; Pipiras et al., 1998)。このとき引きちぎられる染色体部位は必ずしもfusionした部位ではなく、fragile siteのような物理的に弱い部位で起きることが予想され、この場合、染色体はasymmetricに別れ、一方は長く、一方は逆に短くなり、さらにこの長さの変化は繰り返されることに増幅さ

れる。そしてこのサイクルは偶然に、別の染色体との組換えやend-rejoiningによって、末端部分にテロメア構造を得ることによりストップする。最終的に変異体中に、染色体の欠失、転座、増幅といった異常をモザイク状にもたらす。このように、p53欠損細胞が遺伝的に不安定である、その要因は、すみやかに修復されないDSBであり、これがBFBサイクルの引き金となって、種々の染色体異常を引き起こすものと考えられる。

3. p53 変異細胞における遺伝的不安定性の特徴

p53 変異細胞として WTK-1 細胞を利用した。WTK-1 は TK6 と同一起源をもつ isogenic 細胞であるが、p53 遺伝子のコドン 237 にホモに突然変異をもつため、変異型 p53 タンパクが細胞内に多量に蓄積している。WTK-1 細胞においても tk 遺伝子座で TK6 細胞の 30 倍以上の自然突然変異頻度の増加がみられ、mutator phenotype を示した (Fig. 4)。変異体を解析すると、WTK-1 細胞ではヘミ型 LOH だけでなく、ホモ型の LOH の頻度も増加していた。このことから WTK-1 細胞では TK6-E6 細胞と異なり、組換え修復能は保持されているものと考えられた (Fig. 4)。LOH 変異体の染色体を解析すると、組換え型と思われた変異体の染色体には転座を伴うものが多く、その転座は変異体にクローナルに観察されたことから WTK-1 細胞では組換え修復は起こるが、その fidelity が低いために非相同 (illegitimate) 性の組換えにより、他の染色体部位との転座を誘発するものと考えられた (Honma et al., 1997b)。また、WTK-1 細胞では染色体不分離による aneuploid も高頻度に観察され、変異型 p53 は組換え修復の異常に伴う染色体の構造的変異をもたらすだけでなく、細胞分裂や染色体分離機構にも影響を与える、染色体の数的異常も導くものと考えられた (Cross et al., 1995; Fukasawa et al., 1996; Honma et al., 2001)。

結語

p53 による遺伝的安定化機構として、ゲノム中に生じた DSB の相同組換え修復への関与を提唱する。p53 欠損細胞ではこの相同組換えがすみやかに働くために、修復を免れた DSB は BFB サイクルを介して転座、欠失、増幅等のさまざまな染色体異常をもたらす (Livingstone et al., 1992; Agapova et al., 1996; Mukhopadhyay et al., 1997)。また、p53 変異細胞では組み換え修復能は保持されているものの、その正確さが低いため逆に染色体転座を誘発する。このように p53 の欠損、もしくは異常による遺伝的不安定性は点突然変異のような小さな遺伝子変異よりも染色体レベルの大きなゲノム変化に関与している。多段階発癌過程におけるゲノム変化を考えると、p53 の異常は、相同、非相同性の組換えを介して、ゲノム中に LOH 型の突然変異や染色体異常の蓄積を促しているものと考えられる。

また、ここで示した BFB サイクルによるゲノム不安定化現象は正常細胞においても、放射線等の環境変異原によりゲノム中に多量の DSB が生じた場合にも起こる可能性があり、放射線による染色体の部分欠失、転座、増幅といった遅延型染色体異常誘発のメカニズムを合理的に説明することができる (本間, 1999b)。

謝辞

本研究は林真博士、祖父尼俊雄博士他、国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部の皆様、ハーバード大学 J. Little 教授らのご協力や、有意義な議論によってなされたものです。ここに、感謝の意を表します。また、同じ tk の突然変異試験であるマウスリンゴーマ試験に関しては、製薬協の多くの人たちと共同研究を行い、ICH における遺伝毒性試験の改訂作業にも携わることができ、行政に関わる研究者として大きな経験を得ることができました。この共同研究に携わっていただいた多くの方にも感謝いたします。

参考文献

- Agapova, L., G. V. Illyinskaya, N. A. Turovets, A. V. Ivanov, P. M. Chumakov and B. P. Kopnin (1996) Chromosome changes caused by alteration of p53 expression, *Mutat. Res.*, 354, 129-138.
- Coquelle, A., E. Pipiras, F. Toledo, G. Buttin and M. Debatisse (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons, *Cell*, 89, 215-225.
- Cross, S. M., C. A. Sanchez, C. A. Morgan, M. K. Schimke, S. Ramel, R. L. Idzlerda, W. H. Raskind and B. J. Reid (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint, *Science*, 267, 1353-1356.
- Fukasawa, K., T. Choi, R. Kuriyama, S. Rulong and G. F. V. Woude (1996) Abnormal centrosome amplification in the absence of p53, *Science*, 271, 1744-1747.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991) p53 mutations in human cancer, *Science*, 253, 49-53.
- Honma, M. and J. B. Little (1995) Recombinagenic activity of the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human lymphoblastoid cells, *Carcinogenesis*, 16, 1717-1722.
- 本間正充, 林 真, 祖父尼俊雄 (1996) ヒトリンゴーマ細胞株の tk 遺伝子を利用した欠失型、組み換え型突然変異、環境変異原研究, 18, 107-111.
- Honma, M., M. Hayashi and T. Sofuni (1997a) Cytotoxic and mutagenic responses to X-ray and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mutat. Res.*, 374, 89-98.
- Honma, M., L.-S. Zhang, M. Hayashi, K. Takeshita, Y. Nakagawa, N. Tanaka and T. Sofuni (1997b) Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4774-4781.
- 本間正充 (1999a) 内分泌攪乱化学物質がもたらす遺伝的不安定性、環境変異原研究, 21, 281-285.
- 本間正充 (1999b) 多段階発がん過程における組み換え修復異常と遺伝的不安定性、放射線科学, 42, 423-425.
- Honma, M., M. Momose, H. Tanabe, H. Sakamoto, Y. Yu, J. B. Little, T. Sofuni and M. Hayashi (2000) Requirement of wild-type p53 protein for maintenance of chromosome integrity, *Mol. Carcinog.*, 28, 203-214.
- Honma, M., M. Momose, T. Sofuni and M. Hayashi (2001) Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction, *Mutat. Res.*, (in press).
- Jeggo, P. A. (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells, *Radiat. Res.* 150 (Suppl.), S80-S91.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein and R. W. Craig (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.*, 51, 6304-6311.
- Ko, L.J. and C. Prives (1996) p53 : puzzle and paradigm. *Gene & Devel.*, 10, 1054-1072.
- Lane, D. P. (1992) p53, guardian of the genome, *Nature*, 358, 15-16.
- Levine, A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88, 323-331.
- Li, C.-Y., D. W. Yandell and J. B. Little (1992) Molecular mechanism of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells in vitro, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18, 77-87.
- Liber, H. L., D. W. Yandell and J. B. Little (1989) A comparison of mutation induction at the tk and hprt loci in human lymphoblastoid cells ; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal tk locus, *Mutat. Res.*, 216, 9-17.
- Livingstone, L. R., A. White, J. Sprouse, E. Livano, T. Jacks and T. D. Tlsty (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53, *Cell*, 70, 923-935.
- Moynahan, M. E. and M. Jaschinski (1997) Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8988-8993.
- Mukhopadhyay, T., A. S. Multani, J. A. Roth, and S. Pathak (1997) Identification of additional complementation groups that regulate genomic instability, *Genes Chrom. Cancer*, 20, 103-112.
- Pipiras, E., A. Coquelle, A. Bieth and M. Debatisse (1998) Interstitial deletions and interchromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome, *EMBO J.*, 17, 325-333.
- Weaver, D. T. (1995) What to do at an end : DNA double-strand break repair, *Trend in Genet.*, 11, 388-392.
- Yandell, D. W., T. P. Dryja and J. B. Little (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 12, 255-263.
- Yu, Y., C.-Y. Li and J. B. Little (1997) Abrogation of p53 function by HPV 16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells, *Oncogene*, 14, 1661-1667.

大腸菌の活性酸素防御応答と突然変異誘発機構 に関する研究

布柴 達男

東北大学大学院生命科学研究科分子生命科学専攻遺伝子システム学講座
〒989-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉

Mechanisms for the oxidative stress response and oxidative mutagenesis in *Escherichia coli*

Tatsuo Nunoshiba

Institute of Biomolecular Science, Graduate School of Life Science, Tohoku University,
Aramaki-Aza-Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 989-8578, Japan

Summary

Bacterial cells employ transcriptional factors which sense elevated levels of oxidative stress and regulate expression of antioxidant genes. In *E. coli*, two redox-responsive transcriptional regulators, SoxR and OxyR, have been well characterized. The SoxR contains iron-sulfur centers to sense superoxide stress or nitric oxide. The OxyR contains a thiol-sulfide redox-switch to sense peroxide stress. In this review, I present discussion about the source of oxidative stress in bacteria, oxidative lesions of cellular bio-molecules, the antioxidant responses and their regulation mechanisms.

Keywords : OxyR, SoxR, disulfide bond, iron-sulfur cluster, transcriptional activator

緒 言

Superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\bullet OH$) などの活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) は、好気性細胞の通常の酸素呼吸に伴って常に生じるとともに、ある種の環境変異原や発がん物質の代謝、電離放射線などによってもその生成が増強される。これらのROSは、その高い反応性が故に、核酸、脂質、タンパク質といった生体成分に損傷を与え、突然変異や細胞障害を引き起こし、がんをはじめとするさまざまな疾患の原因となると考えられている。また最近、これらの生体分子の酸化損傷の生成にhypochlorous acid (HOCl), nitric oxide radical (NO \bullet), peroxynitrite (HOONO), nitrosothiol (RSNO)などが関与する可能性も報告されている。

一方好気性生物は、進化の過程で、酸素の有効利用を獲得するとともに、その酸素の利用に伴って常時曝されることになるROSの影響を最小限にいく止めるためのさまざまな防御機構を獲得してきた。細胞にはROSを無毒化したり、損傷部位を修復する酵素が構成的に発現されている。加えて、いわゆる適応応答と呼ばれる防御応答を備えており、高いレベルのROSに対処している。これらの応答システムは、ROSレベルの増加を認識し、それに伴ってさまざまな防御遺伝子の発現を促進するという巧みなシグナルransductionの仕組みによって制御されている。本稿では大腸菌におけるROSストレスとそれに対する防御応答の調節機構、そしてその生物学的役割などについて、最近の研究報告もまじえて総説したい。

1. 酸化ストレスの発生源

受付：2001年5月9日 受理：2001年5月24日
©日本環境変異原学会

好気性のライフスタイルをとる生物にとって、酸化ストレスへの曝露は避けがたいことである。この酸化スト

本稿は日本環境変異原学会第29回大会において発表された2000年度研究奨励賞受賞講演である。
This paper is the lecture of the JEMS Achievement Award (2000) presented at the 29th JEMS annual meeting, 2000.

レスの発生は好気呼吸鎖に伴う酸素の4電子還元による、との説が有名である。しかしながら大腸菌では、チトクロム系酵素による酸素の還元やキノン類の酸化に伴うROSの生成はそれほど重要ではなく（Messner and Imlay, 1999），むしろ還元型 flavoprotein であるNADH dehydrogenase IIなどのflavinの自動酸化が重要で、それこそが好気呼吸鎖での酸素分子への電子の供給の最初のステップを担っているとの説もある（Gonzalez-Flecha and Demple, 1995；Imlay and Fridovich, 1991）。細胞内で生成するROSの量や酸化ストレスの程度は、細胞内の還元型 flavoprotein や NADH dehydrogenase II の量がバクテリアの種類や増殖の条件などによって異なるためさまざまである。大腸菌では構成的に発現している superoxide dismutase (SOD) が、これらの endogenous source から生じた O_2^- を $10^{-10} M$ 程度の濃度に抑えている。この程度の濃度の O_2^- は、許容できるレベルの濃度ではあるものの、特に O_2^- に対して高い感受性を示す酵素の活性などは 50 % 程度に抑制され、細胞増殖にも多少影響を示す（Gort and Imlay, 1998）。一方、 H_2O_2 も catalase や peroxidase 類、あるいは glutathione などにより $10^{-7} \sim 10^{-6} M$ 程度の濃度に抑えられている（Gonzalez-Flecha and Demple, 1995）。この濃度は O_2^- よりは高いが、 H_2O_2 による細胞致死の閾値が $10^{-5} M$ 程度であること（Imlay, personal communication）を考えると毒性を回避するには十分の防御といえるであろう。

しかしながら、これらの防御は細胞内の O_2^- や H_2O_2 濃度が上昇した場合には決して十分とはいえない。例えば、カビなどは生存領域の確保のために、生存競争相手であるバクテリアに対して redox-cycling agent と呼ばれる物質を生産する。この物質は、バクテリアの細胞内に取り込まれ、細胞内で NADH や NADPH などの還元剤の消費を伴い酵素的に還元され、ついで O_2 により非酵素的に酸化され、再び元の物質にもどる。この酸化反応に伴い、 O_2 は電子を受け取り O_2^- を生じる。すなわちこの酸化還元反応により O_2^- が継続的に生成されることになる。また動物体内では、白血球やマクロファージなどの食細胞が NADPH oxidase や nitric oxide synthase, myeloperoxidase などにより O_2^- , NO•, HOCl やその反応副産物である H_2O_2 , •OH, HOONO, RSNOなどを生成し殺菌している。これらはいずれも広義での ROS に数えられている。これらの ROS のうち、 O_2^- は中性条件下ではバクテリアの細胞膜を透過しないといわれている（Lynch and Fridovich, 1978；Nunoshiba et al., 1993a）が、食細胞内は酸性なので、透過するのではないかとも考えられている。In vitro でそれぞれの ROS がバクテリアに対して致死作用を示すことや動物体内でこれらの酵素が食細胞による殺菌に貢献していることなどは確認されているが、実際にどの ROS が直接の致死作用を担っているのかどうかは明らかでない。

2. 生体分子の酸化ストレス障害

上述のような発生源により生じた ROS は、生体分子と反応し、さまざまな異なるタイプの損傷を生じる。 O_2^- は細胞内の鉄や銅などの遷移金属イオンの関与する不均化反応、あるいは SOD により還元され H_2O_2 となる。 H_2O_2 自身は比較的安定ではあるが、細胞増殖を阻害することはよく知られている。しかしながらその原因となる酸化損傷がいかなるものかについてはまだ明らかでない。 H_2O_2 は酵素のシステイン残基のチオールを酸化し、その酵素を失活させるとの報告があり、致死要因の一つとされている。また H_2O_2 は、 O_2^- により還元された二価の鉄イオンや一価の銅イオンなどとの Harber-Weiss/Fenton 反応により、最も反応性の高い •OH となり、核酸、脂質、タンパク質を酸化する（Farr and Kogoma, 1991）。例えば遊離の鉄イオンは DNA の phosphodiester 結合に局在する傾向があるため、Fenton 反応が DNA 近傍で起こることから、DNA は •OH の主たる標的といえる。したがって、 H_2O_2 の致死作用は 100 種を数えるともいわれる DNA の酸化損傷に起因するのではないかと考えられている（Imlay and Linn, 1988；Imlay et al., 1988）。なかでも、8-oxoG や thymine glycol などは有名な塩基損傷で、DNA 複製阻害や突然変異の原因となることは環境変異原の研究分野ではよく知られていることである。さらにヌクレオチドの酸化損傷である 8-oxodGTP (Maki and Sekiguchi, 1992) や 2-oxodATP (Inoue et al., 1998) も高い変異原性を示すことから、注目されている。しかしそれとともに、ここで特筆したいのは、遷移金属を活性部位にもつ酵素に対する O_2^- の影響である（Stadtman, 1993）。なかでも 4 分子の鉄イオンを抱える [4Fe-4S] タイプの鉄-イオウ (Fe-S) クラスターを含有する酵素は、 O_2^- の標的となりやすく、 O_2^- の攻撃により鉄を遊離し、不活性化されることが報告されている。これらの酵素には α , β -dihydroxy acid dehydratase や 6-phosphogluconate dehydratase, fumarase, そして aconitase などがあり、in vitro での生化学的な実験に加えて、細胞質の SOD 欠損大腸菌でこれらの酵素活性が低下していることも報告されている（Gardner and Fridovich, 1991a, 1991b and 1992；Flint et al., 1993）。これらの酵素の不活性化は、単に酵素活性を失活させるにとどまらず、2 値の鉄イオンを細胞質に遊離する。したがって Fenton 反応を促進し、•OH による生体分子の酸化を促進する結果にもなる（Keyer and Imlay, 1996；Liochev and Fridovich, 1994）。

白血球やマクロファージなどは、 O_2^- , NO•, HOCl, また H_2O_2 , •OH, HOONO, RSNOなどを生成し殺菌している。NO• は、cytochrome oxidase の heme や Cu に結合することによりバクテリアの呼吸鎖を阻害する

(Hori et al., 1996；Butler et al., 1997) ほか、aconitase の [4Fe-4S] クラスターを攻撃して不活性化させること (Gardner et al., 1997) が in vitro の実験で示されている。HOONO は NO• と O_2^- の反応によって生じ、 O_2^- と同様に前述の dehydratase や aconitase の [4Fe-4S] クラスターを攻撃する（Hausladen and Fridovich, 1994；Castro et al., 1994；Keyer and Imlay, 1997）。また、 H_2O_2 のように酵素のシステイン残基の thiol を酸化する（Radi et al., 1991）。HOONO は非酵素的に活性化体である ONOO⁻ となり、DNA にも直接酸化損傷を生成する強い酸化力をもつとの報告がある（Beckman et al., 1990；Goldstein et al., 1996）。しかし、この活性化は生体内条件では進まないのではないかともいわれている。RSNO は HOONO と thiol との反応、あるいは酸素や金属の存在下での NO• と thiol との反応によって生じ、thiol の酸化を促進する。このように個々の生体分子に対する影響についての報告はあるものの、それらによる殺菌の機構については明らかでない。

3. 酸化ストレスに対する防御機構

これらの ROS によるさまざまな生体分子の酸化損傷に対して、大腸菌は少なくとも、ROS の消去と ROS によって生じた酸化損傷分子の分解と修復という二段階の防御機構を備えている。例えば、 O_2^- 消去酵素である FeSOD (*sodB*) や Cu/ZnSOD (*sodC*) (Fridovich, 1995；Gort et al., 1999)， H_2O_2 消去酵素である hydroperoxidase II (catalase, *katE*)，酸化的 DNA 損傷の修復に関わる DNA exonuclease III (ExoIII, *xth*)，DNA polymerase I (*polA*) などは重要な防御機構である（Farr and Kogoma, 1991；Demple and Harrison, 1994）。しかしこれらのタンパク質をコードする遺伝子の多くは、先にも述べたが通常の増殖条件で生じる ROS に対処するレベルで発現している。したがって、ROS の細胞内レベルが上昇した場合に対処するための機能が必要と想像される。事実、大腸菌では ROS に反応して、多くの防御酵素群を誘導する応答として、これまでに O_2^- 増産剤で誘導される SoxRS (Fig. 1) と H_2O_2 で誘導される OxyR (Fig. 2) の 2 つの調節システムが発見されている（Hidalgo and Demple, 1996；Nunoshiba, 1996；Zheng and Storz, 2000；Pomposiello and Demple, 2001）。

SoxRS 応答によって誘導される防御酵素には、 O_2^- 消去酵素である MnSOD (*sodA*)，DNA 修復酵素 endonuclease IV (*nfo*)，酸化ストレス下でのエネルギー代謝に関わる fumarase C (*fumC*) や aconitase (*acnA*)，細胞内酸化還元状態の維持に関わる glucose-6-phosphate dehydrogenase (*zwf*) がある（Hidalgo and Demple, 1996；Nunoshiba, 1996）。また GPT cyclohydrolase をコードする *ribA* 遺伝子もこの応答により誘導される遺伝

子の一つである（Koh et al., 1996）。本来これは riboflavin 合成に必須の酵素として知られており、大腸菌の *ribA* 欠損株は riboflavin 要求性を示す。最近この遺伝子が、8-oxodGTP を加水分解する 8-oxodGTPase をコードする遺伝子 *mutT* の欠損株を相補する遺伝子として分離され、in vitro, in vivo の実験により MutT 8-oxodGTPase をバックアップすることが証明されている（Kobayashi et al., 1998）。さらに、flavodoxin A (*fldA*) (Zheng et al., 1999)，ferredoxin-NADPH oido-reductase (*fpr*) (Liochev et al., 1994) が SoxRS 応答により調節されていることが知られているが、その O_2^- に対する防御における役割は明らかでない。 O_2^- に高感受性の [4Fe-4S] クラスターの還元状態の維持に関わっているのではないかと考えられる。

SoxRS 応答は構造遺伝子の発現を促進するだけでなく、調節遺伝子の発現を促進する結果、構造遺伝子の発現を抑制し、防御を促すものもある。例えば、鉄の取込みオペロンのリプレッサーである Fur (*fur*) は、その例である（Zheng et al., 1999）。Fur は細胞内の鉄イオンと結合して活性化され、鉄の輸送タンパク質の合成を抑制する。すなわち細胞内の鉄イオンレベルを制限することで、Fenton 反応による •OH の生成を抑制しているのであろう。また外膜タンパク質 OmpF の antisenseRNA である *micF* がその一つの例といえる（Chou et al., 1993）。SoxRS 応答では *micF* の発現を促進することにより OmpF の翻訳を阻害する。同じく外膜タンパク質をコードする *tolC* 遺伝子も SoxRS で調節されることが報告されており（Aono et al., 1998），いずれの場合もおそらくは redox cycling agents のような O_2^- を増産する原因物質の取込みを抑制しているものと考えられる。その他、これまでに数種の *soi* (superoxide inducible) 遺伝子（Mito et al., 1993），*inaA* 遺伝子（Rosner and Slonczewski, 1994）そして *pqi5* (paraquat-inducible) (Koh and Roe, 1995) が SoxRS 応答により調節されていることが知られているが、それらの遺伝子産物の機能についてはまだ明らかではない。逆に遺伝子は特定されていないが、この応答が構成的に誘導されている変異株で相同性組み換え頻度が野生株の数十倍、SoxRS の欠損株の 100 倍高くなることを見出している（Nunoshiba, 投稿準備中）。SoxRS 応答は以上の十数種の遺伝子発現を調節することで、それらが総合的に働いて細胞を O_2^- ストレスから防御している。

一方の OxyR 応答は、 H_2O_2 で誘導される防御遺伝子の一部の調節を担っている。例えば、 H_2O_2 消去酵素である hydroperoxidase I (catalase, *katG*) の他、酸化型グルタチオンや酸化損傷分子の還元酵素である glutathione reductase (*gor*) や alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) (Hidalgo and Demple, 1996)，glutaredoxin 1 (*grxA*) (Tao, 1997)，さらに SoxRS にも制御されている

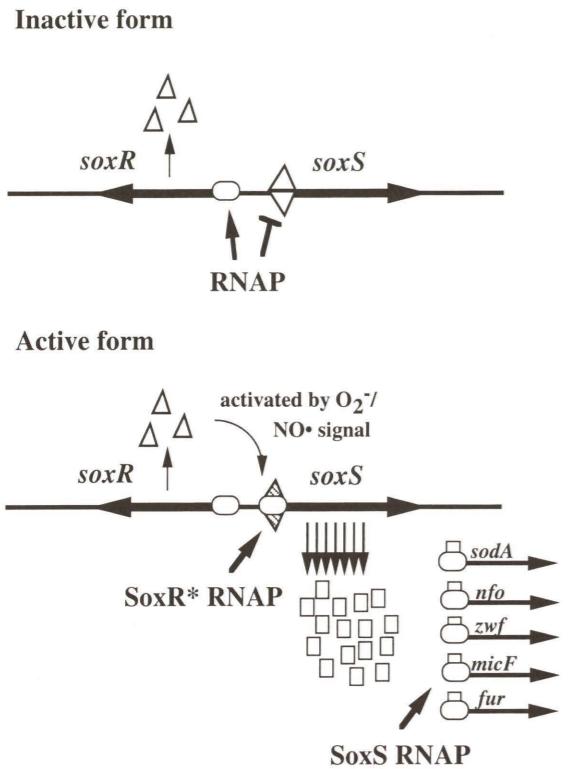


Fig. 1 The *soxRS* regulon. The *soxRS* locus consists of the divergently transcribed *soxR* and *soxS* genes. The SoxR protein (triangles) is constitutively produced and is activated by exposure with redox-cycling agent or nitric oxide. The oxidized form (activated form) of SoxR (SoxR*; triangles with oblique lines) stimulates the transcription of the *soxS* gene, whose product (open square) activates the transcription of genes for protective functions from superoxide stress. RNAP; RNA polymerase

Fur (Zheng et al., 1999) がこの応答に調節されている。また、stationary phaseで誘導され、非特異的にDNAに結合するタンパク質であるDps (DNA binding protein in stationary phase)をコードする *dps* 遺伝子もOxyRで調節されている (Martinez and Kolter, 1997)。このタンパク質の結晶構造がferritinと類似していることから、Dpsは非特異的にDNAに結合するとともに、遊離の鉄イオンなどを取り込んで、DNAの近傍での•OHの生成とそれによるDNA損傷を防いでいるものと考えられている (Grant et al., 1998)。加えて、*oxyS*と呼ばれる遺伝子調節に関わるRNAの発現が見いだされており、この *oxyS* の発現が突然変異誘導を抑制することが確認されているものの、詳しい機構については明らかではない (Altuvia et al., 1997)。最近、それ以外にも新しいOxyRに制御される遺伝子がみつかってきているが、その意義が明らかではないので、本稿では割愛する。

SoxRS応答、OxyR応答は、 O_2^- や H_2O_2 による酸化損傷に対して働くばかりでなく、SoxRSは、多くの抗生物質、有機溶媒、NO•などの活性窒素に対しても抵抗性を導き (Miller and Sulavik, 1996; Nakajima et al.,

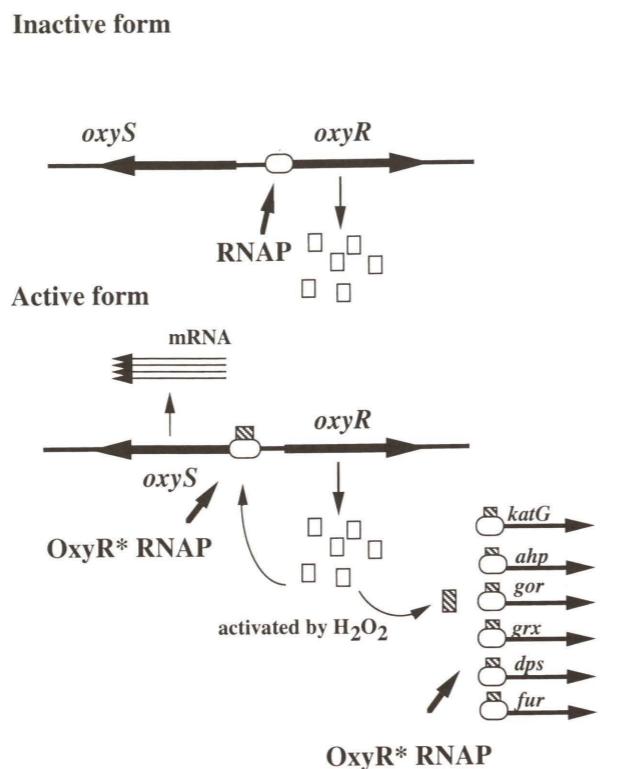


Fig. 2 The *oxyR* regulon. The OxyR protein (open square) is constitutively produced and oxidized by peroxide. The oxidized form (activated form) of OxyR (OxyR*; square with oblique lines) binds to promoter region of genes and the *oxyS* gene, and stimulates their transcription. The gene products and the *oxyS* RNA induced by activated OxyR are involved in protection from peroxide stress. RNAP; RNA polymerase

1995; Nunoshiba et al., 1993a)，また、OxyRもHOClや有機溶媒、活性窒素に対しても防御的に働く (Dukan and Touati, 1996; Ferrante et al., 1995; Hausladen et al., 1996; Chen et al., 1998)。なかでもバクテリアの SoxRS応答と抗生物質やNO•に対する防御については、微生物学の観点から興味深く、最近の知見について後述する。

4. 大腸菌のROS応答の調節機構

先に述べた大腸菌の2つのROS応答、すなわち SoxRS応答、OxyR応答の遺伝子調節の概要を Fig. 1 と Fig. 2 に示した。前者は、*soxR*, *soxS*という2つの遺伝子の産物が中心となる、いわゆる two-component system により転写が調節されている。SoxRは約17kDaのタンパク質でN末端側にDNA結合モチーフである helix-turn-helix (HTH) があり、C末端側には、 $CX_2CX_{10}C$ という特徴的なシステイン (cys) のクラスターがある。このアミノ酸配列は、Tn21やプラスミドに存在する水銀に対する解毒に働く *mer* (mercury resistance) operon のセンサーであり転写促進因子であるMerRと類似しており、

HTH や cys クラスターの位置そして全体にわたって 28% のアミノ酸の identity を示す (Amabile-Cuevas and Demple, 1991)。MerRでは、この cys クラスターに水銀が結合することで活性化され、下流の解毒に関わる遺伝子の転写を促進する (Helman et al., 1990; Summers, 1992)。精製された SoxRタンパク質は、鉄含有を示唆する赤褐色を呈すること (Hidalgo and Demple, 1994) から cys クラスターは鉄を含有する Fe-S クラスターで、これがセンサーの役割を担うと考えられた。この応答が構成的に誘導されている変異株の *soxR* 遺伝子には、3'末端に変異が多く観察されること (Nunoshiba and Demple, 1994)，また4つのcysのいずれをalanineに置換しても、その変異 SoxRは鉄を失うとともに、 O_2^- 増産剤による *soxS* の誘導性を失う (Bradley et al., 1997) なども、その可能性を支持する。SoxRタンパク質は2量体を形成し、*soxS* 遺伝子のプロモーターの -35 から -10 領域を覆うように結合する。この -35 と -10 領域の配列は、それぞれ RNA polymerase の σ subunit が認識して結合し、転写のための二重らせんの巻き戻しを開始する領域である。この *soxS* プロモーターの -35 と -10 領域の配列は転写因子を必要としないプロモーターのそれに比較的よく一致している一方で、両領域のスペースが 19 塩基対であり、通常の 15~17 塩基対より広い特徴がある (Nunoshiba et al., 1992; Hidalgo and Demple, 1994)。SoxRはこの領域に結合することで、この領域のらせん構造を幾分巻き戻すかあるいは歪め、RNA polymerase σ subunit によるプロモーターの認識を助けていると推測されている。事実、-35 と -10 領域間のスペースを 16~18 塩基対にすることで SoxRなしに *soxS* が転写され、16, 17 塩基対の場合、SoxRはむしろ転写を阻害することが実験的に証明されている (Hidalgo and Demple, 1997)。

一方、SoxSは約13 kDaのタンパク質でやはり N 末端側にDNA結合モチーフである HTH があり、抗生物質抵抗性に関わる *mar* (multi-antibiotics resistance) operon の転写促進因子である MarAのアミノ酸配列と42%の identity を、また大腸菌の転写促進因子としてよく知られる AraCの C 末端約100アミノ酸の配列と約28%の identity をもつ (Amabile-Cuevas and Demple, 1991; Wu and Weiss, 1991)。これら2つの遺伝子や遺伝子産物を用いた *in vivo*, *in vitro* の分子遺伝学的あるいは分子生物学的な解析により、以下のことが証明されている。すなわち SoxRはセンサーおよび *soxS* 遺伝子の転写促進因子として働き、 O_2^- シグナルにより活性化されると *soxS* 遺伝子上流のプロモーター領域に結合して転写を促進する。次にこうして大量に生産された SoxSが下流の防御遺伝子群の転写促進因子として働くものである (Nunoshiba et al., 1992; Wu and Weiss, 1992; Li and Demple, 1994)。また、過剰量の SoxSは自身のプロ

モーター領域に結合することで自身の転写を抑制することから、これがこの応答の feedback 機構であると考えられている (Nunoshiba et al., 1993b)。

では、SoxRはいかに活性化されるのか。大腸菌から抽出精製した SoxRは二量体を形成し、C 末端に [2Fe-2S] センターをもち、かつその2つのFeとともに酸化型 (Fe^{3+} - Fe^{3+}) である。この SoxRは *soxS* 遺伝子のプロモーターに対しあわめて強い(約100倍)転写促進活性を示す (Hidalgo and Demple, 1994)。すなわちこの SoxRの [2Fe-2S] センターは O_2^- でなくとも空気中の O_2 によって容易に活性化される。In vitro でこの SoxRの [2Fe-2S] センターを一電子還元して還元型 (Fe^{3+} - Fe^{2+}) にすると、その転写促進活性は失われる (Ding et al., 1996; Gaudu and Weiss, 1996)。また、嫌気条件下精製した還元型 SoxRを化学的に酸化すると活性型にすることができる。すなわち、この SoxRは、[2Fe-2S] センターの一電子の酸化/還元によって、活性化/不活性化が決定されるのである。では大腸菌の細胞内での SoxRの [2Fe-2S] センターの酸化/還元状態はいかに変化するのか。In vivo での酸化/還元状態を Electroparamagnetic Resonance (EPR) を用いて追跡した結果、好気条件下で増殖する大腸菌細胞内の SoxRの [2Fe-2S] センターは 95%以上が還元型で (Hidalgo et al., 1997; Gaudu et al., 1997; Ding and Demple, 1997)、細胞を redox cycling agents で処理すると、酸化型を示す (Ding and Demple, 1997)。すなわち [2Fe-2S] センターこそが SoxRの転写活性化の redox switch であることが証明されたのである (Fig. 3A)。

また SoxRの細胞内での酸化/還元の kinetics も同様の方法で検討され、用いた redox cycling agent の O_2^- 増産速度によって多少異なるものの、概ね、大腸菌細胞を処理した2分後には [2Fe-2S] センターは酸化型を示し、次に嫌気条件下に移して O_2^- 増産を抑制すると再び還元型を示すことが確認されている (Ding and Demple, 1997)。この kinetics はそのまま *soxS* の転写の kinetics に反映し、処理後2分以内に mRNA 量が増え始め、10分後には通常の100倍量に達する。さらに嫌気条件下に移すと20分以内には通常の低いレベルにもどる。

この SoxRS応答の調節機構について、現在、残されている問題は、SoxRの [2Fe-2S] センターを酸化させるのは果たして何か。そして逆に還元状態に戻したり、通常の条件で還元状態を維持するのは何か。ということである。この応答は redox cycling agent が O_2^- を増産するに伴って誘導される。しかしこの O_2^- の増産反応は細胞内の NADH や NADPH などの還元剤の消費を伴う。したがって、SoxRの [2Fe-2S] センターが O_2^- によって直接酸化されるのか、それとも NADPH などの消費、あるいは枯渇によって間接的に酸化されるのかを判定するのではなく、どちらの可能性をも支持する結果

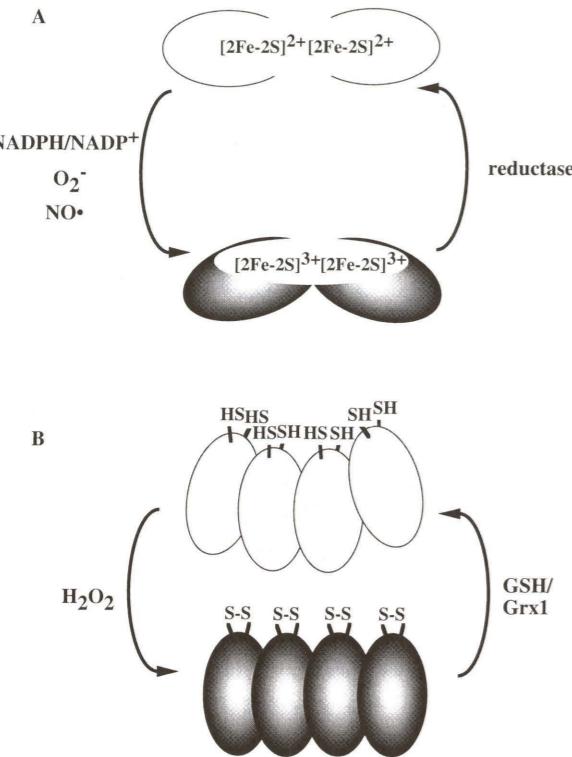


Fig. 3 Mechanisms for SoxR and OxyR activation and deactivation. A ; Inactive form of SoxR contains reduced form of iron-sulfur center ($[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$), whereas its active form contains oxidized iron-sulfur center ($[2\text{Fe}-2\text{S}]^{3+}$). The iron-sulfur center can be oxidized directly by O_2^- and by $\text{NO}\cdot$, or indirectly in response to redox imbalance (NADPH/NADP $^+$). In both cases, the dimer of the SoxR can bind to the *soxS* promoter, and only oxidized form of SoxR dimer can work as a transcriptional activator. B ; Each subunit of the OxyR tetramer contains two cysteine residues that form intramolecular disulfide bonds by H_2O_2 , resulted in its activation for transcriptional factor of the target genes. The bonds are re-reduced by glutathione (GSH) or glutaredoxin 1 (Grx1)

が報告されていて、現在までのところコンセンサスは得られていない。また、NO \bullet によるSoxRの活性化は、それとは異なる機構によると思われる。NO \bullet は直接に[2Fe-2S]センターと反応し、dinitrosyl-iron-thiol complexが生じることが*in vitro*でEPRにより確認され、*in vitro*でのsoxS転写活性化能はいわゆる酸化型SoxRとほぼ同程度である(Ding and Demple, 2000)。また*in vivo*でも、大腸菌細胞へのNO \bullet 処理の2分以内にSoxRのニトロシル化が起こり、処理を止めるとニトロシル化されたSoxRはすみやかに減少して還元型に戻ることやニトロシル化されたSoxRの量の増減がただちにsoxSの転写量の増減に反映されることも確認されている(Ding and Demple, 2000)。以上の結果から、少なくともNO \bullet に対する応答の機構については、NO \bullet が直接[2Fe-2S]センターに結合し、活性化させると理解されている(Fig. 3A)。

酸化型 SoxR を還元状態に戻したり、通常の条件で還元状態を維持するのは何か？好気条件下で精製した SoxR が常に活性型であったことを考えると、細胞内には通常の条件では SoxR を還元状態に維持するものがあると考えるのは reasonable であろう。このことに関して興味深い報告がある。すなわち大腸菌には NADPH 依存的に SoxR を還元する活性のあるというのである (Kobayashi and Tagawa, 1999)。残念ながら、今のところその活性をもつタンパク質やそれをコードする遺伝子の同定にはいたっていない。また、flavodoxin や ferredoxin-NADPH oxido-reductase などがこの応答に調節されていることを考えると、これらが酸化型 SoxR を還元したり、通常の培養時に還元型を維持するのに働くとすれば合目的である。しかしながら、これらの遺伝子の欠損株における SoxRS 応答のレベルは、非誘導状態、誘導状態のいずれの場合も全く変化はみられていない (Gaudu and Weiss, 2000)。この問題については今後の詳細な検討が必要である。

一方、OxyR応答では、SoxRSの場合とは異なり、OxyRのみがセンサーと下流の防御遺伝子群の転写促進因子として働く。OxyRはN末端側にHTH motifをもつ34 kDaのタンパク質で、アミノ酸相同意性からLysRファミリーと呼ばれる転写促進因子のファミリーに属する(Storz et al., 1990)。精製したOxyRは、溶液中で4量体を形成し、常に転写促進活性をもち、還元剤を加えると不活性になることから、OxyRの活性化/不活性化には、OxyRの酸化/還元が関与すると考えられた(Storz et al., 1990；Tao et al., 1991；Tao et al., 1993)。また、この活性型のOxyRタンパク質は、下流の遺伝子群のプロモーター領域に結合し、RNA polymeraseのalpha subunitと直接結合することで転写を促すことが証明されている(Tao et al., 1993)。その後OxyRには6個のcys残基が存在し、このうちのCys199とCys208をのぞく4つのcysは、*in vitro*での変異導入によりalanineまたはserineに置換しても転写の促進に影響はなく、一方Cys199とCys208を置換させると転写促進がみられなくなること(Kullik et al., 1995)から、これらのcysの酸化が活性化に関与すると考えられた。最近、OxyR4量体の個々の分子内のCys199とCys208が直接に酸化されてジスルフィド結合を形成することが、OxyRの活性化に必須であることが*in vivo*で確認されている(Zheng et al., 1998；Aslund et al., 1999；Tao, 1999)。*In vivo*でのOxyRの酸化はきわめて早く、H₂O₂処理後約30秒後には酸化型となり、培養液からH₂O₂除去後5分間は酸化型が存在している。SoxRの場合と同様、この結果はただちにOxyRの下流遺伝子の転写量の変化に一致することが確認されている(Tao, 1999)(Fig. 3B)。

では酸化型 OxyR の還元はいかなる機構によるのか?
In vivo と *in vitro* の実験により OxyR の活性化/不活性化

に glutaredoxin 1/glutathione が関与するという結果が得られている。glutaredoxin 1 や glutathione reductase をコードする *grx* や *gor* はともに OxyR に調節される遺伝子であり、これらの欠損株では酸化型の OxyR の還元がきわめて緩やかに進むことが認められている。したがってこれらが feedback に関わると考えられる (Zheng et al., 1998)。しかしながら *gor* と thioredoxin 1 をコードする *trxA* の二重欠損株または *trxA* と glutathione synthetase をコードする *gshA* の二重欠損株では、 H_2O_2 处理なしに OxyR 応答の誘導がみられること (Aslund et al., 1999) などから、OxyR は H_2O_2 とともに細胞内の thiol の濃度に敏感に反応するので、単一の機構によって酸化型 OxyR を還元したり、通常の培養条件で還元型を維持すると考えるのは難しいかもしれない。

5. バクテリアの ROS に対する防御応答の生物学的意義

先述したように、バクテリアにとってのROSの脅威は、好気呼吸に伴うものばかりでなく、むしろ redox cycling agent や白血球やマクロファージなどの貪食細胞から突発的に生じる ROS であろう。したがってこれらの応答はバクテリアにとって種を保存するために必須といえるのかもしれない。事実、この SoxRS や OxyR のホモログがサルモネラ菌やコレラ菌をはじめさまざまなバクテリアからみつかっている。これに関連して興味深い事実がある。SoxR は O_2^- 増産剤以外にも NO• によっても活性化されることをすでに述べたが、大腸菌細胞をマクロファージに取り込ませることによってもこの応答が誘導される (Nunoshiba et al., 1995)。その誘導は大腸菌を取り込むことで活性化されたマクロファージ内での NO• 生成に依存しておこる。さらに SoxRS を欠損する大腸菌はマクロファージ細胞内での生存率が低く、逆に SoxRS 応答を構成的に誘導する変異株 (SoxR^c) は抵抗性を示す (Nunoshiba et al., 1995)。このことから、大腸菌にとって SoxRS 応答が対マクロファージ防御機構としても重要な意味をもつことが伺える。一方、抗生物質抵抗性に関わる mar operon の転写促進因子である MarA はアミノ酸レベルで SoxS と 42% ときわめて高い相補性を示し、SoxS で誘導される防御遺伝子群の大部分は MarA でも誘導される。言い換えれば SoxRS 応答が誘導されることで抗生物質に抵抗性を示すようになるのである。このことは実験的にも証明されており、SoxR^c 株は、SoxRS 欠損株さらには野生株より、ampicillin, tetracyclin, nalidixic acid, chloramphenicol などに対して抵抗性を示す (Greenberg et al., 1990; Nunoshiba and Demple, 1994)。また逆に O_2^- 増産剤である menadine 抵抗性変異株を多数分離し、原因遺伝子のマッピングをしたところ、soxRS locus と異なる位置にマップされるものがあり、それらについて詳しく解析した (Greenberg et al., 1991)。したがって生体内で、あるいはそれ以前に SoxR に変異が生じて SoxR^c 株となった場合、その細胞はマクロファージにも、抗生物質にも抵抗性を示し、生体内での生存や増殖が可能になる。最近、チフスの患者の便から得られたサルモネラ菌から quinolone 系抗生物質に抵抗性を示す細胞が分離され、その細胞の他の抗生物質に対する感受性を調べたところ、nalidixic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol に抵抗性を示し、また高い MnSOD 活性が確認された。さらに、その株では soxS の転写が増大していた。そこで PCR により soxR 遺伝子を增幅して sequence により変異を検索した結果、soxR の 1092 番目の G に GC → AT の transition が生じており、SoxR の 121 番目の glycine が aspartic acid に置換されていると推定された。この 121 番目の glycine は Fe の結合部位である cys クラスター配列 (CIGCGCLSXXXC) 内に存在する一つ目の G にあたり、これまでに知られている 5 種のバクテリア由来の SoxR すべてに保存されているアミノ酸である (Fig. 4)。そこでこの変異 SoxR をベクターにクローニングしてサルモネラ菌の野生株内で発現させたところ、予想通り SoxR^c の表現型を与えた (Koutsolioutsou et al., 2001)。これらの結果は、SoxRS 応答が生体内でバクテリアのマクロファージに対する、あるいは抗生物質に対する防御として機能し、生存を助けていることを示唆している。環境変異原研究の分野では、環境中に存在する多くの変異原の生体への影響を研究しているが、上述の事実を考慮すると同時に環境中に存在する病原性バクテリアへの影響、すなわち抵抗性獲得変異にも注意を払う必要があるかもしれない。

謝 辭

本総説の一部に紹介させていただきました私の関わり

ました研究は、すべてボスドクとしてHarvard School of Public Health, Department of Molecular and Cellular ToxicologyのBruce Demple教授のもとで行った研究です。ご指導をいただきましたBruce Demple教授をはじめ、頻繁にdiscussionをしていただきました研究室のメンバー、また長い間のご指導と渡米の機会を与えていただきました西岡一教授、武部啓教授に心から感謝致します。

なお本稿では、昨年度頂戴いたしました研究奨励賞「大腸菌の活性酸素防御応答と突然変異誘発機構に関する研究」の大会での受賞講演前半部の「大腸菌の活性酸素防御応答の調節機構」についてのみに焦点を絞り、総説とさせていただきました。後半の「活性酸素による突然変異誘発機構」については次の機会に投稿させていただきたいと考えております。

参考文献

- Ding, H. and B. Demple (1997) *In vivo* kinetics of a redox-regulated transcriptional switch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 8445-8449.
- Ding, H. and B. Demple (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 5146-5150.
- Ding, H., E. Hidalgo and B. Demple (1996) The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor, J. Biol. Chem., 271, 33173-33175.
- Dukan, S. and D. Touati (1996) Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress, J. Bacteriol., 178, 6145-6150.
- Farr, S.B. and T. Kogoma (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Microbiol. Rev., 55, 561-585.
- Ferrante, A.A., J. Augliera, K. Lewis and A.M. Klibanov (1995) Cloning of an organic solvent-resistance gene in *Escherichia coli*: the unexpected role of alkylhydroperoxide reductase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7617-7621.
- Flint, D.H., J.F. Tuminello and M.H. Emptage (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide, J. Biol. Chem., 268, 22369-22376.
- Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases, Annu. Rev. Biochem., 64, 97-112.
- Gardner, P.R., G. Costantino, C. Szabo and A.L. Salzman (1997) Nitric oxide sensitivity of the aconitases, J. Biol. Chem., 272, 25071-25076.
- Gardner, P.R. and I. Fridovich (1991a) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase, J. Biol. Chem., 266, 1478-1483.
- Gardner, P.R. and I. Fridovich (1991b) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase, J. Biol. Chem., 266, 19328-19333.
- Gardner, P.R. and I. Fridovich (1992) Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical, J. Biol. Chem., 267, 8757-8763.
- Gaudu, P. and B. Weiss (1996) SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10094-10098.
- Gaudu, P. and B. Weiss (2000) Flavodoxin mutants of *Escherichia coli* K-12, J. Bacteriol., 182, 1788-1793.
- Gaudu, P., N. Moon and B. Weiss (1997) Regulation of the *soxRS* oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR *in vivo*, J. Biol. Chem., 272, 5082-5086.
- Goldstein, S., G.L. Squarrito, W.A. Pryor and G. Czapski (1996) Direct and indirect oxidations by peroxynitrite, neither involving the hydroxyl radical, Free Radic. Biol. Med., 21, 965-974.
- Gonzalez-Flecha, B. and B. Demple (1995) Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 270, 13681-13687.
- Gort, A.S., D.M. Ferber and J.A. Imlay (1999) The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*, Mol. Microbiol., 32, 179-191.
- Gort, A.S. and J.A. Imlay (1998) Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses, J. Bacteriol., 180, 1402-1410.
- Grant, R.A., D.J. Filman, S.E. Finkel, R. Kolter and J.M. Hogle (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA, Nat. Struct. Biol., 5, 294-303.
- Greenberg, J.T., J.H. Chou, P.A. Monach and B. Demple (1991) Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 173, 4433-4439.
- Greenberg, J.T., P. Monach, J.H. Chou, P.D. Josephy and B. Demple (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6181-6185.
- Hausladen, A. and I. Fridovich (1994) Superoxide and peroxy-nitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not, J. Biol. Chem., 269, 29405-29408.
- Hausladen, A., C.T. Privalle, T. Keng, J. DeAngelo and J.S. Stamler (1996) Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR, Cell, 86, 719-729.
- Helmann, J.D., B.T. Ballard and C.T. Walsh (1990) The MerR metalloregulatory protein binds mercuric ion as a tricoordinate, metal-bridged dimer, Science, 247, 946-948.
- Hidalgo, E. and B. Demple (1994) An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein, EMBO J., 13, 138-146.
- Hidalgo, E. and B. Demple (1996) Adaptive response to oxidative stress: the *soxRS* and *oxyR* regulons, In: E.C.C. Lin and A.S. Lynch (Eds), Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*, R.G. Landes Co., Austin, pp.435-452.
- Hidalgo, E. and B. Demple (1997) Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the *soxS* gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor, EMBO J., 16, 1056-1065.
- Hidalgo, E., H. Ding and B. Demple (1997) Redox signal transduction: mutations shifting [2Fe-2S] centers of the SoxR sensor-regulator to the oxidized form, Cell, 88, 121-129.
- Hori, H., M. Tsubaki, T. Mogi and Y. Anraku (1996) EPR study of NO complex of bd-type ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 271, 9254-9258.
- Imlay, J.A., S.M. Chin and S. Linn (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*, Science, 240, 640-642.
- Imlay, J.A. and I. Fridovich (1991) Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 266, 6957-6965.
- Imlay, J.A. and S. Linn (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity, Science, 240, 1302-1309.
- Inoue, M., H. Kamiya, K. Fujikawa, Y. Ootsuyama, N. Murata-Kamiya, T. Osaki, K. Yasumoto and H. Kasai (1998) Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. New evaluation method for mutagenesis by damaged DNA precursors *in vivo*, J. Biol. Chem., 273, 11069-11074.
- Keyer, K. and J.A. Imlay (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 13635-13640.
- Keyer, K. and J.A. Imlay (1997) Inactivation of dehydratase [4Fe-4S] clusters and disruption of iron homeostasis upon cell exposure to peroxynitrite, J. Biol. Chem., 272, 27652-27659.
- Kobayashi, M., Y. Ohara-Nemoto, M. Kaneko, H. Hayakawa, M. Sekiguchi and K. Yamamoto (1998) Potential of *Escherichia coli* GTP cyclohydrolase II for hydrolyzing 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis, J. Biol. Chem., 273, 26394-26399.
- Kobayashi, K. and S. Tagawa (1999) Isolation of reductase for SoxR that governs an oxidative response regulon from *Escherichia coli*, FEBS Lett., 451, 227-230.
- Koh, Y.S., J. Choih, J.H. Lee and J.H. Roe (1996) Regulation of the *ribA* gene encoding GTP cyclohydrolase II by the *soxRS* locus in *Escherichia coli*, Mol. Gen. Genet., 251, 591-598.
- Koh, Y.S. and J.H. Roe (1995) Isolation of a novel paraquat-inducible (*pqi*) gene regulated by the *soxRS* locus in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 177, 2673-2678.
- Koutsolioutsou, A., E.A. Martins, D.G. White, S.B. Levy and B. Demple (2001) A *soxRS*-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (Serovar typhimurium), Antimicrob. Agents Chemother., 45, 38-43.
- Kullik, I., M.B. Toledano, L.A. Tartaglia and G. Storz (1995) Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation, J. Bacteriol., 177, 1275-1284.
- Li, Z. and B. Demple (1994) SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA, J. Biol. Chem., 269, 18371-18377.
- Liochev, S.I. and I. Fridovich (1994) The role of O_2^- in the production of $HO\cdot$: *in vitro* and *in vivo*, Free Radic. Biol. Med., 16, 29-33.
- Liochev, S.I., A. Hausladen, W.F. Beyer, Jr. and I. Fridovich (1994) NADPH: ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the *soxRS* regulon, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 1328-1331.
- Lynch, R.E. and I. Fridovich (1978) Effects of superoxide on the erythrocyte membrane, J. Biol. Chem., 253, 1838-1845.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, Nature, 355, 273-275.
- Martinez, A. and R. Kolter (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps, J. Bacteriol., 179, 5188-5194.
- Messner, K.R. and J.A. Imlay (1999) The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 274, 10119-10128.
- Miller, P.F. and M.C. Sulavik (1996) Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*, Mol. Microbiol., 21, 441-448.
- Mito, S., Q.M. Zhang and S. Yonei (1993) Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains containing new gene fusions (*soi* : *lacZ*) inducible by superoxide radicals, J. Bacteriol., 175, 2645-2651.
- Nakajima, H., M. Kobayashi, T. Negishi and R. Aono (1995) *soxRS* gene increased the level of organic solvent tolerance in *Escherichia coli*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 1323-1325.
- Nunoshiba, T. (1996) Two-stage gene regulation of the superoxide stress response *soxRS* system in *Escherichia coli*, Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., 6, 377-389.
- Nunoshiba, T. and B. Demple (1994) A cluster of constitutive mutations affecting the C-terminus of the redox-sensitive SoxR transcriptional activator, Nucleic Acids Res., 22, 2958-2962.
- Nunoshiba, T., T. deRojas-Walker, S.R. Tannenbaum and B. Demple (1995) Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages, Infect. Immun., 63, 794-798.
- Nunoshiba, T., T. deRojas-Walker, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum and B. Demple (1993a) Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 9993-9997.
- Nunoshiba, T., E. Hidalgo, C.F. Amabile-Cuevas and B. Demple (1992) Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene, J. Bacteriol., 174, 6054-6060.
- Nunoshiba, T., E. Hidalgo, Z. Li and B. Demple (1993b) Negative

- autoregulation by the *Escherichia coli* SoxS protein : a dampening mechanism for the *soxRS* redox stress response, *J. Bacteriol.*, 175, 7492-7494.
- Pomposiello, P.J. and B. Demple (2001) Redox-operated genetic switches : the SoxR and OxyR transcription factors, *Trends Biotechnol.*, 19, 109-114.
- Radi, R., J.S. Beckman, K.M. Bush and B.A. Freeman (1991) Peroxynitrite oxidation of sulphydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *J. Biol. Chem.*, 266, 4244-4250.
- Rosner, J.L. and J.L. Slonczewski (1994) Dual regulation of *inaA* by the multiple antibiotic resistance (*mar*) and superoxide (*soxRS*) stress response systems of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 176, 6262-6269.
- Stadtman, E.R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 797-821.
- Storz, G., L.A. Tartaglia and B.N. Ames (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes : direct activation by oxidation, *Science*, 248, 189-194.
- Summers, A.O. (1992) Untwist and shout : a heavy metal responsive transcriptional regulator, *J. Bacteriol.*, 174, 3097-3101.
- Tao, K. (1997) oxyR-dependent induction of *Escherichia coli* *grx* gene expression by peroxide stress, *J. Bacteriol.*, 179, 5967-5970.
- Tao, K. (1999) *In vivo* oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, 457, 90-92.
- Tao, K., N. Fujita and A. Ishihama (1993) Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein, *Mol. Microbiol.*, 7, 859-864.
- Tao, K., K. Makino, S. Yonei, A. Nakata and H. Shinagawa (1991) Purification and characterization of the *Escherichia coli* OxyR protein, the positive regulator for a hydrogen peroxide-inducible regulon, *J. Biochem. (Tokyo)*, 109, 262-266.
- Wu, J. and B. Weiss (1991) Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 173, 2864-2871.
- Wu, J. and B. Weiss (1992) Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 174, 3915-3920.
- Zheng, M., F. Aslund and G. Storz (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation, *Science*, 279, 1718-1721.
- Zheng, M., B. Doan, T.D. Schneider and G. Storz (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*, *J. Bacteriol.*, 181, 4639-4643.
- Zheng, M. and G. Storz (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors, *Biochem. Pharmacol.*, 59, 1-6.

Environ. Mutagen Res., 23 : 33 - 37 (2001)

薬物代謝酵素の遺伝的多型の変異原活性化における意義

鎌滝 哲也, 藤田 健一, 串田 浩孝
梅津 有理, 宮本 昌美, 有吉 範高

北海道大学大学院薬学研究科代謝分析学分野 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目

Effects of polymorphism in drug-metabolizing enzymes in the mutagenic activation of chemicals

Tetsuya Kamataki, Ken-ichi Fujita, Hirotaka Kushida, Yuri Umetsu,
Masami Miyamoto, Noritaka Ariyoshi

Laboratory of Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Hokkaido University, N12W6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

Summary

The role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of tobacco-related *N*-nitrosamines was examined by *Salmonella* mutation test using genetically engineered *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) YG7108 cells expressing CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. Seven tobacco-related *N*-nitrosamines, vis. *N*-nitrosoanabasine, *N*-nitrosoanatabine, *N*-nitrosodiethylamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane, *N*-nitrosonornicotine, *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosopyrrolidine were used. Interestingly, CYP2A6 was responsible for the mutagenic activation of essentially all tobacco-related *N*-nitrosamines examined in the present study.

Genetic polymorphism of the *CYP2A6* gene appears to be the major factor in the interindividual variability of cancer susceptibility. We found the deletion of the whole *CYP2A6* gene (*CYP2A6*4C*) as a type of genetic polymorphism in Japanese, and developed a gene diagnosis method to detect the variant. Thus, we evaluated the relationship between *CYP2A6*4C* and the susceptibility to lung cancer. The frequency of *CYP2A6*4C* was significantly lower in lung cancer patients than in healthy volunteers, suggesting that the subjects carrying the *CYP2A6*4C* alleles are resistant to carcinogenesis caused by *N*-nitrosamines because of reduced metabolic activation capacity.

Keywords : cytochrome P450, lung cancer, *N*-nitrosamine, tobacco smoke

緒 言

環境中に分布する変異原・がん原物質は生体内の薬物代謝酵素によって代謝的に活性化される。生成した化学的に反応性の高い代謝物は遺伝子の損傷を誘発する。チトクローム P450 (CYP) は、化学物質の代謝的活性化

受付：2001年4月24日 受理：2001年4月26日
©日本環境変異原学会

に関与する主要な薬物代謝酵素である。CYPには多くの分子種が存在し、それぞれがある程度重複した基質特異性を示し多くの変異原・がん原物質を代謝的に活性化する。したがって、それぞれのCYP分子種の性質や発現量の差異は、発がんに大きく影響すると考えられている。多くのCYP分子種には遺伝的多型が存在することが知られている。化学物質の活性化に関与するCYP分子種の酵素活性や発現量を変化させる遺伝的多型は、ヒトにおけるこれら化合物の発がんリスクを変化させると考え

本稿は日本環境変異原学会第29回大会シンポジウム I 「レスポンダーとノンレスポンダー；遺伝的多型と環境変異原研究」で発表された。
This paper was presented to the symposium I "Responders and nonresponders ; Genetic polymorphism and environmental mutagen research" at the 29th JEMS annual meeting, 2000.

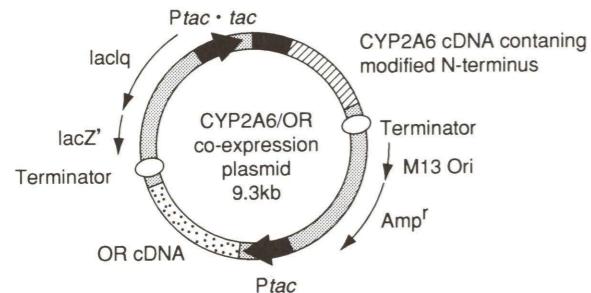


Fig. 1 Structure of co-expression plasmid for human CYP and OR

られる。著者らはこれまでに、CYPにおける遺伝的な多型の研究を展開してきた。これらの研究の中で、日本人においてCYP2A6遺伝子を完全に欠損する個体が存在することを見いだした。CYP2A6により主として代謝的に活性化される化学物質は、これらの個体においてはまったく活性化されず、発がんリスクが低下すると期待される。

以下に、CYP2A6遺伝子を欠損する遺伝子多型の化学物質の変異原活性化と、その発がんリスクにおける意義について述べる。

1. N-ニトロソアミン類の変異原活性化におけるヒトCYP2A6の役割

化学物質の変異原性を調べるために試験系として、Ames試験が頻用されてきた。Ames試験においては、化学物質を代謝的に活性化するために齧歯類の肝より調製したS9を添加して行う。しかしCYPの酵素活性には種差が存在するため、旧来の齧歯類の酵素を用いて得られた結果をヒトCYPに外挿することは困難である。そこで著者らが開発したヒトCYPを大腸菌に発現する技術(Iwata et al., 1998)をAmes試験に用いるサルモネラ菌株に適用し、ヒトCYP2A6とNADPH-CYP還元酵素(OR)を同時に発現するサルモネラ試験菌YG7108株を樹立した(Kushida et al., 2000)。サルモネラ菌YG7108株はアルキル化されたDNAよりアルキル基を除去する修復酵素であるadaおよびogt遺伝子を欠損するため、N-ニトロソアミン類を含むアルキル化剤に対する感受性の高い菌株である(Yamada et al., 1995)。

CYP2A6とORのそれぞれのcDNAを別々のtacプロモータの下流に連結し、CYP2A6およびORの同時発現プラスミドを構築した(Fig. 1)。構築した発現プラスミドをエレクトロポレーション法によりサルモネラ菌YG7108株に導入した。サルモネラ菌YG7108株におけるCYP2A6およびORの発現量は、培地1Lあたり156 nmolおよび179 nmolであった。CYP2A6の発現量は、ヒトの肝臓約390 gに発現している量に相当した。精製したCYPおよびORを用いた再構成系において、CYPの最大の酵素活性はCYPとORの比率がほぼ1においてみ

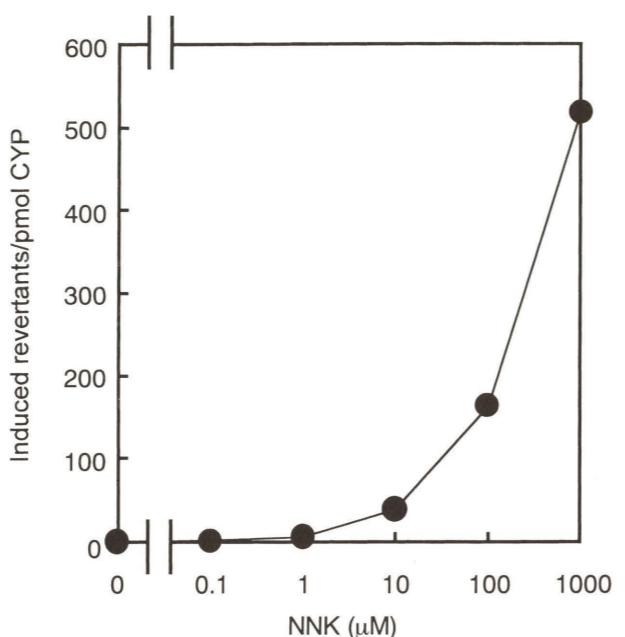


Fig. 2 Metabolic activation of NNK by CYP2A6 expressed in the established *S. typhimurium* YG7108 cells

られるとの報告がある(Taniguchi et al., 1979)。サルモネラ菌におけるORの発現量は、CYP2A6が触媒活性を示すために十分であると考えられた。そこでサルモネラ菌YG7108株に発現したCYP2A6が触媒活性を有するか否かを、CYP2A6の典型的な基質であるクマリンを用いて検討した。キネティックパラメータを算出したところ、Km値は0.72 μM, Vmax値は10.5 nmol/min/nmol CYPであった。これらの値は、ヒト肝ミクロソームや他の宿主に発現したCYP2A6を用いて得られた結果と概ね一致した。

樹立した菌株を用いて、たばこ煙中に含まれることが知られているN-ニトロソアミン類の変異原活性化におけるCYP2A6の役割を検討した。具体的には樹立したサルモネラ菌YG7108株を用いて変異原性試験を行い、N-ニトロソアミン類がCYP2A6により活性化されて復帰変異コロニー数を上昇するか否かを検討した。たばこ煙中に含まれるN-ニトロソアミン類として、N-nitrosoanabasine(NABS), N-nitrosoanatabine(NATB), N-nitrosodiethylamine(NDEA), (4-methylnitrosamo)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK), N-nitrosonornicotine(NNN), N-nitrosopiperidine(NPIP)およびN-nitrosopyrrolidine(NPYR)を用いた。一例としてNNKを被験物質として用いた場合の結果をFig. 2に示す。NNKはCYP2A6により活性化され濃度依存的に復帰変異コロニー数が上昇した。CYP2A6によるNNKの活性化における最少陽性濃度は0.451 μM, CYP2A6の変異原産生能は7.61 induced revertants/nmol NNK/pmol CYPであった(Table 1)。NNKの変異原性が1 μM以下の低濃度から検出された原因として、宿主

Table 1 MC values for activation of tobacco-related N-nitrosamines by CYP2A6 and mutagen-producing capacities of CYP2A6

	NABS	NATB	NDEA	NNK	NNN	NPIP	NPYR
MC ^a	125	44.7	0.769	0.451	21.3	27.3	3.87
Mutagen-producing Capacity ^b	0.00751	0.164	11.4	7.61	2.82	0.537	4.15

^a: The results were judged as positive when the number of colonies increased linearly with the concentration of a promutagen and reached a level twice as high as that obtained with a vehicle alone as a control. MC value of a promutagen was defined as the concentration of the chemical giving positive result(μM).

^b: A slope of the increase of revertant colonies against the increase of the amount of promutagen(nmol) at around MC was calculated. The slope was then divided by pmol CYP present in a reaction mixture.

としてアルキル化剤に対して高い感受性を示すYG7108株を用いたこと、また本試験系では変異原物質はサルモネラ菌の菌体内でヒトCYP2A6により活性化されるので、生成した化学的に不安定な代謝物が効率よくDNAなどの生体成分に結合し変異を誘発したと考えられる。CYP2A6はNNK以外の調査したすべてのたばこ煙中に存在するN-ニトロソアミンの活性化に関与した(Table 1)。

これらの結果はCYP2A6が喫煙者における発がんのリスクに関係することを示唆する。

2. CYP2A6遺伝子欠損と肺がんリスクの関係

著者らはこれまでに、CYPにおける遺伝的な多型の研究を数多く展開してきた。これらの研究の中で、日本人においてCYP2A6遺伝子を完全に欠損する個体が存在することを見い出した(Fig. 3)(Nunoya et al., 1998)。また、見い出したCYP2A6遺伝子の全欠損変異(CYP2A6*4C)の遺伝子診断法を開発し、日本人の3~4%が欠損者であることを明らかにした(Miyamoto et al., 1999)。上述のように、CYP2A6はたばこ煙中に含まれる多くのN-ニトロソアミン類の変異原活性化に関与する。CYP2A6*4Cをホモで有する個体においては、CYP2A6により代謝的に活性化されるたばこ煙中のN-ニトロソアミン類が活性化されないため、喫煙による肺がんのリスクが低下すると考えられた。そこで喫煙歴を有する肺がんの患者においてCYP2A6*4Cの頻度が健常人と比較して少ないか否かを検討した。喫煙歴を有する男性の肺がん患者392名および健常者423名について調査した(ケース、コントロールとも平均年齢58歳)。少なくとも0.5 pack/dayの喫煙を、1年以上続けたヒトを喫煙者と定義した。その結果、喫煙歴を有する肺がん患者では、CYP2A6*4Cの頻度が対照と比較して有意に少ないことを見いだした(Fig. 4)。一方、喫煙歴のない肺がん患者においては、CYP2A6*4Cの頻度の健常人に対する有意差は認められなかった(Fig. 5)。統いて、肺がんを組織学的に分類してCYP2A6*4Cの頻度を調べた。肺

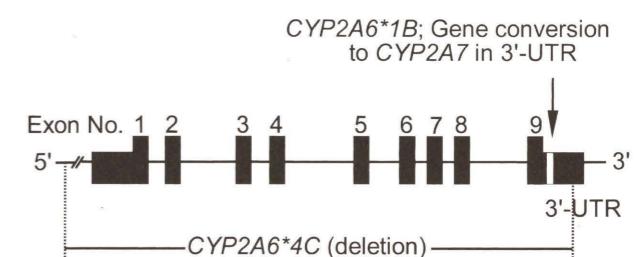


Fig. 3 Major CYP2A6 variants found in Japanese

がん患者392名の内訳は、扁平上皮がん(sqcc)104名、小細胞がん(smcc)49名および非扁平上皮がんと非小細胞がん239名である。興味深いことにsqccおよびsmccにおいては、CYP2A6*4Cは、1例も認められなかった。以上の知見は、たばこ煙中に含まれるN-ニトロソアミンなどの化学物質をCYP2A6がヒト体内において活性化することを示唆する。さらにCYP2A6によって活性化された物質が肺がん、特にsqccおよびsmccの形成に関与する可能性を示唆する。

結語

ヒトCYP2A6とORを同時に発現するサルモネラ菌YG7108株を用いた研究により、CYP2A6がたばこ煙中に含まれるN-ニトロソアミン類を代謝的に活性化することを明らかにした。日本人の3~4%はCYP2A6の全欠損者(CYP2A6*4C)である。著者らは、喫煙歴を有する肺がん患者においては、CYP2A6*4Cの頻度が健常人と比較して有意に少ないことを見いだした。以上の知見を総合すると、CYP2A6がたばこ煙中に含まれるN-ニトロソアミンなどの化学物質をヒト体内において活性化し、肺がんを誘発する可能性が考えられた。

以上本研究では、CYP2A6を例として変異原・がん原物質の活性化に関与する酵素の活性が発がんリスクの一因となり得ることを示した。変異原・がん原物質の活性化に関与する薬物代謝関連酵素の活性を選択的に阻害することができれば、発がんの化学予防が実現できる可能

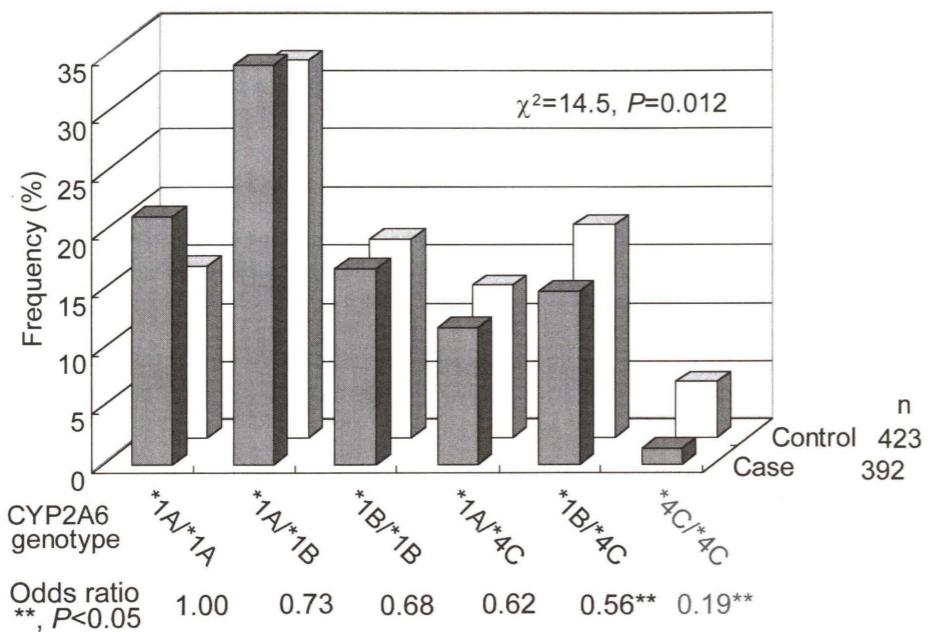


Fig. 4 Distribution of CYP2A6 genotype in male smokers

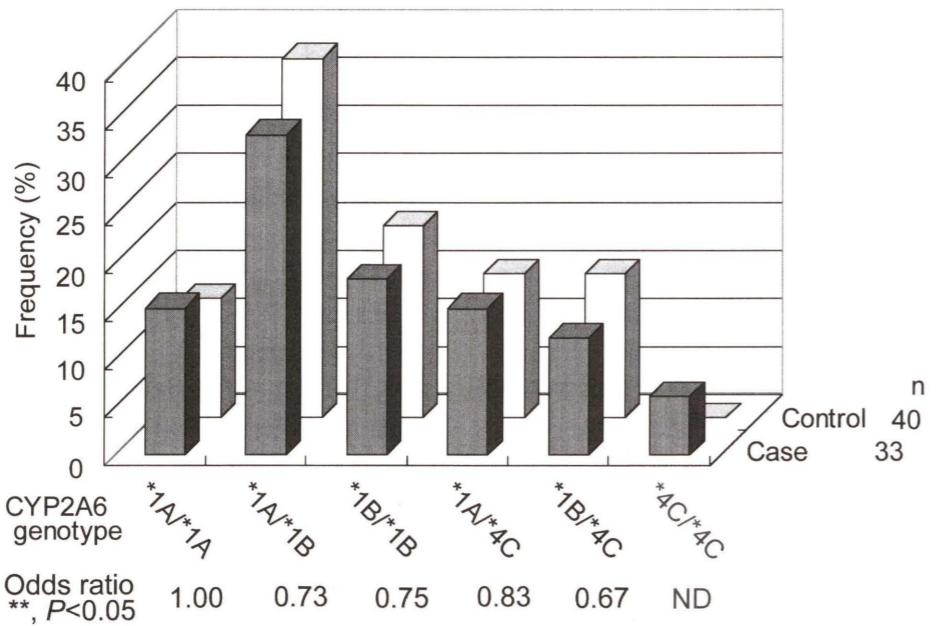


Fig. 5 Distribution of CYP2A6 genotypes in male non-smokers

性が考えられる。特にCYP2A6の酵素活性を強力かつ選択的に阻害する化学物質により、N-ニトロソアミン類による発がんを抑制できると考えられる。

参考文献

- Iwata, H., K. Fujita, H. Kushida, A. Suzuki, Y. Konno, K. Nakamura, A. Fujino and T. Kamataki (1998) High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in Escherichia coli, Biochem. Pharmacol., 55, 1315-1325.
- Kushida, H., K. Fujita, A. Suzuki, M. Yamada, T. Nohmi and T. Kamataki (2000) Development of *Salmonella* tester strain sensitive to promutagenic N-nitrosamines : expression of recombinant CYP2A6 and human NADPH-cytochrome P450 reductase in *S. typhimurium* YG7108, Mutat. Res., 471, 135-143.
- Miyamoto, M., Y. Umetsu, H. Dosaka-Akita, Y. Sawamura, J. Yokota, H. Kunitoh, N. Nemoto, K. Sato, N. Ariyoshi and T. Kamataki (1999) CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer, Biochem. Biophys. Res. Commun., 261, 658-660.
- Nunoya, K., T. Yokoi, K. Kimura, K. Inoue, T. Kodama, M. Funayama, K. Nagashima, Y. Funae, C. Green, M. Kinoshita and T. Kamataki (1998) A new deleted allele in the human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene found in individuals

showing poor metabolic capacity to coumarin and (+)-*cis*-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl) thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502), Pharmacogenetics, 8, 239-249.

Taniguchi, H., Y. Imai, T. Iyanagi and R. Sato (1979) Interaction between NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P-450 in the membrane of phosphatidylcholine vesicles, Biochem. Biophys. Acta, 550, 341-356.

Yamada, M., T. Sedgwick, T. Sofuni and T. Nohmi (1995) Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O⁶-methylguanine, J. Bacteriol., 177, 1511-1519.

今、私の考える環境変異原研究とは； 21世紀に向けて

佐々木 有¹, 祖父尼 俊雄²

¹八戸工業高等専門学校 ☎ 039-1192 青森県八戸市田面木上野平16-1

²オリンパス光学工業(株), LRC ☎ 192-8512 東京都八王子市久保山町2-3

My consideration on environmental mutagen research : Perspectives for the 21st century

Yu F. Sasaki¹, and Toshio Sofumi²

¹ Hachinohe National College of Technology, Tamonoki Uwanotai 16-1, Hachinohe, Aomori
039-1192, Japan

² LRC, Olympus Optical Co. Ltd., 2-3 Kuboyama-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192-8512, Japan

Summary

This is a report of the Symposium entitled "My consideration on environmental mutagen research : Perspectives for the 21st century" which was held at the 29th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society on November 16, 2000 in Sendai. Six speakers from different institutes such as University (Professor Hayatsu), National Institute (Drs Wakabayashi, Hayashi and Nohmi), Contact Laboratory (Dr. Tanaka) and Pharmaceutical Laboratory (Dr. Shimada) presented their opinions on environmental mutagen researches, activities, and especially their perspectives on this research field for the 21st century. The issues presented by these speakers address essential components for establishment of a strategy of environmental mutagen research in the 21st century.

Keywords : environmental mutagen research, perspective, 21st century

緒 言

2000年11月に仙台で開催された大会で、日本環境変異原学会大会も29回を数えた。人間でいえば20歳代の最後であり、2001年からは30歳代という区切りの大会である。時あたかも2000年という20世紀最後の年でもある。「大鏡」という歴史書の書名にもある通り、過去は現在と将来を映す鏡である。この区切りの大会において、今までの環境変異原研究を振り返り、21世紀、特にその最初の10年に我々が何を目標とすべきかを見据えることは有意義であると考えられる。そのような趣旨

に基づき、日本環境変異原学会第29回大会において、「今、私が考える環境変異原研究とは；21世紀に向けて」と題したシンポジウムを開催した。ここでは、基礎から応用とそれぞれ異なる立場で今までの環境変異原研究をリードして来られた先生方に御登壇いただき、それぞれのお立場から今までの研究を振り返り、21世紀最初の10年へ向けた提言をいただくこととした。演題と演者は以下の通りである。

1. 「環境変異原をどう考えるか」
岡山大・共立薬大 早津彦哉
2. 「私の考えるこれからの環境変異原研究」
国立医薬品衛生研 能美健彦
3. 「ヒト発がん要因を探し求めて」
国立がんセンター 若林敬二

受付：2001年4月27日 受理：2001年5月7日
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第29回大会シンポジウムⅡ「今、私の考える環境変異原研究とは；21世紀に向けて」で発表された。
This paper was presented to the symposium II "My consideration on environmental mutagen research : Perspectives for the 21st century" at the 29th JEMS annual meeting, 2000.

4. 「正しく怖がるために」
国立医薬品衛生研 林 真
5. 「環境中の光遺伝毒性物質と生物への影響」
食品薬品安全センター 田中憲穂
6. 「医薬品開発における遺伝毒性試験の過去・現在そして未来」 第一製薬 島田弘康
ここに、本シンポジウムの目的と各演者の講演要旨に著者のコメントをまとめて記録とする。

1. 環境変異原はどう考えるか：

早津彦哉（岡山大学・共立薬科大学）

100歳を越える女性が1万人を突破したと報じられているように、我が国の人々がより長い人生を送ることができるようになってきた。環境変異原の研究は、この結果に貢献しているだろうか？ はっきりと因果関係を示すことは不可能であるが、私は貢献があったと考える。

公害が大きな社会問題であった昭和40年代の後半に本学会が創立されて間もなく、田島弥太郎、賀田恒夫、近藤宗平博士らが、ソーセージや豆腐に用いられた食品添加物AF2が強い変異原物質であることを見いだし、その後結局AF2が使われなくなって、人々の口に入らなくなった。さらには「避けられないがなるべく摂取を少なくしよう」と一般の人々にすすめている焼け焦げの変異原、ヘテロサイクリックアミンの杉村隆、長尾美奈子博士による発見は、最も顕著な成果である。

最近はヒトゲノムの完全解読が目前となり、変異原研究もその中で様変わりを起こしつつある。「Genomicsで元気を出そう」とのかけ声があり、毒性学全体にその波が押し寄せて来て新技術への期待が高まっている。しかし一方では、ヒト遺伝子全体の中で数個程度の特定のアダクトの検出が可能となり、発がんとの関係がわかりつつある。またさらに、1個のアダクトでもヒト細胞に変異を実験的に起こすことができるようになってきている。

これらの進歩は、主として化学的に純粋化された物質を基に行った研究の成果である。すなわち、混沌としたmixture（食物、身体組織、環境試料など）から分離して、構造決定、化学合成した単一の化学物質やDNA中の異物・変形塩基を用いての研究が基盤になっている。これがこの数10年間の環境変異原の科学的手法であった。

これから先の変異原の科学の一つのチャレンジは、mixtureそのものに攻撃し、その性質や振る舞いを解き明かすことであろう。これはすでに古くからいわれ続けてきたことであるが、いまだにどうやったら「科学」になるのかわからないでいる。実際に人間が接するのはmixtureであるのが殆どの場合である。この解明をどうするのか？ 次世代の変異原研究に是非期待したいところである。

2. 私の考えるこれからの環境変異原研究： 能美健彦（国立衛研・変異遺伝部）

我々の環境中には数多くの化学物質が存在しており、その中にはヒトのDNAに作用して突然変異を起こす可能性のあるものが少くない。DNAは「生物の設計図」とも呼ばれ、ヒトを含む生物の構造と機能、すなわち生命を規定している。環境変異原研究とは、環境中の化学物質や物理因子が「生物の設計図」たるDNAにどのような作用を及ぼし、その結果がいかなるものになるのかを予測する学問であるといえよう。

私は1978年から環境変異原研究にたずさわるようになったが、当時はエームステストの開発、普及時期であり、次々とあたらしい変異原物質が環境中から見いだされていった。焦げた食品中からのヘテロサイクリックアミン系変異原の発見や、1980年代になって行われた活性酸素によるDNAの酸化的損傷の研究は、現在も生物・医学研究に大きな影響を与えており、また1990年代に入って開発されたトランスジェニックマウスや高感受性サルモネラ株などの遺伝的に改良されたテスターは、*in vivo*における突然変異と発がんの研究や、環境中（大気、河川、食品）に存在する変異原の高感度モニタリングに威力を発揮している。

これからの環境変異原研究を考えるとき、重要なテーマとして「個々のヒトに対する遺伝的影響の予測」ということがあげられるように思う。これまでの研究から、我々は不斷に変異原に暴露されて生きていることが認識されるようになった。ではその暴露が個々人にとってどの程度有害なものなのかを問うことが、今後ますます重要になるのではないか。天気予報や火山の噴火予知のように、起こり得るリスクを個々の状況に応じて予測・提示できるようにすることが、環境変異原研究をより魅力ある学問にする上で重要であるように思う。だが予測を行う上での困難は多数存在する。例えば、ヒトは実験動物とは異なり遺伝的に不均一な集団であり、個々人の化学物質に対する感受性は、それぞれのヒトの遺伝的背景により異なると考えられる。また、個々人の遺伝的素因の違いは、生活習慣により影響を受けていることが予測される。薬物代謝酵素やある種のDNA修復酵素には遺伝的多型が知られており、そのいくつかは化学物質による発がんリスクの個体差に関連していると考えられている。したがって、薬物代謝酵素やDNA修復酵素の遺伝的多型に関する研究は、環境変異原に対するリスクの個体差を考える上でも重要である。

最近、突然変異の誘発に関与すると考えられる新しいDNAポリメラーゼが、大腸菌、酵母、ヒトから見いだされた（DinB/UmuC/Rev1/Rad30 superfamily）。環境変異原によって誘発される突然変異の多くは、DNAポリメラーゼが損傷部位を乗り越えて複製を行うことによ

り固定されると考えられ、新たに見いだされたDNAポリメラーゼは、この損傷部位の乗り越えに関与していると予想される。したがって、その構造と機能、遺伝的多型や活性の特異的抑制手法を研究することは、これからの環境変異原研究を進める上できわめて重要である。大腸菌のDNA polymerase IV (DinB), pol V (UmuDC)による変異促進の事例を示し、新しいDNAポリメラーゼ・ファミリーの研究が、これからの環境変異原研究において果たす役割について考察する。

3. ヒト発がん要因を探し求めて：

若林敬二（国立がんセンター・がん予防研究部）

多くの先進諸国において、がん患者数は依然上昇しつづけている。我が国も例外ではなく、がんで亡くなった人数は年間27万人を越え、3.3人に1人ががんで命をおとしている。ヒトのがんの主な原因是「たばこ」「食事」と「感染」であることが疫学的に指摘されている。たばこの煙や食品中には芳香族炭化水素化合物、ニトロソアミン、ヘテロサイクリックアミンおよびマイコトキシン等の種々の発がん物質が含まれている。ヒトは日常生活において常にこれらの発がん物質に曝露しており、その暴露量がたとえ微量であっても組織中のDNAに障害を及ぼしている可能性が示唆される。また、環境中には、細胞中の遺伝子に傷をつけるものばかりではなく、食塩や脂肪等はDNAに傷がある細胞をがん細胞に変換させる過程に深く関与していることが明らかにされている。

がんは遺伝子の病気であり、その発生には多くの遺伝子の変化が関与している。すなわち、正常細胞が、がん細胞に変化するためには多くの段階があり、多くの遺伝子変化の蓄積が必要である。言い換れば、長い年月をかけて、我々の身の回りにある多くの発がん因子が各々に作用し合って、がん発生に関与する数多くの遺伝子を少しづつ障害しつづけた結果、がんが発生していくものと考えられる。

しかしながら、どのような環境変異原・がん原物質が、ヒトがんのどのような遺伝子変異に関与しているかについては、ほとんどわかっていないのが現状である。中国やアフリカの一部の地域で、アフラトキシンB1暴露がヒト肝臓がんのp53の変異を誘発していることが指摘されている。しかしながら、このような状況は先進諸国ではあまり起き得ないものと考えられる。一方、我々の身の回りで起きている「肺がんのK-rasの変異を引き起こす物質は何か？」「乳がん、前立腺がんの発生に関与するホルモン以外の要因は何か？」「胃がんの原因はピロリ菌、食塩およびニトロソ化合物すべて説明できるのか？」、「肺がんの発生要因は？」・・・これらの疑問に対し明確な答えはすぐにはでてこない。すなわち、ヒトの発がん要因の本質はいまだよくわかっていない部分が多いものと思われる。

より良いがん予防法を探し求めるためには、ヒト発がん抑制因子とともにヒトがん要因を詳細に検索する必要がある。食品中のヘテロサイクリックアミンやニトロソ化前駆物質等の研究を通して判ったことや問題点を述べ、今後の環境変異原研究の方向性や意義等について討論したいと考えている。

4. 正しく怖がるために：

林 真（国立衛研・変異遺伝部）

行政の立場に置かれた者として、変異原に関する情報を如何に人々の健康維持、QOLの向上に役立てることが出来るかについて懐惱しています。ガイドライン等で示されている、いわゆる変異原性試験を行い、その陽性、陰性の結果を発がんや次世代に対する遺伝的な毒性予測にどのように役立てるのか。さらに、突然変異や染色体異常誘発性の機構解明まで踏み込んだ研究がなされ、多くの貴重な情報が得られた場合にも、それをどのように解釈し、評価するかについては混沌としているのが現状ではないでしょうか。試験を適正に行うための技術開発、また新しい技術の伝達が重要であることに異を唱える人はいないと思いますが、結果の解釈は人によって大きく異なることが予想されます。これからは得られた情報をどのように解釈し、我々自身の健康維持のために役立てるかを真剣に考えることが求められていると思います。すなわち、言い古された言葉ですが、リスク評価、リスクコミュニケーションをきっちりやる必要があると思います。

本シンポジウムでは「変異原性」という用語が使われていますが、「遺伝毒性」、「遺伝子毒性」など、用語の問題も残されています。また、変異原性自体の定義に関する新しい動きがあります。英国Department of Healthの諮問機関であるCommittee on Mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COM) が検討中の文書では、mutagenicityの指標を遺伝子突然変異、染色体の構造異常および染色体の数的異常と定義しています。また、化学物質の変異原性をスクリーニングするのに、まず*in vitro*の系で上記の指標を評価し、陽性の場合には*in vivo*での評価を行う。そして、最終的に生殖細胞に対して変異原性があるか否かを評価するフローを提案しています。これまで、漠然と考えていた点について、しっかりと定義を与えることにより、何をしたいのか、何が出来るのか、何をしなければならないのか、が少しでも明確になることを期待します。また、COMの文書の中で強調されているのが、化学物質の構造の情報を如何に取り込むかです。構造活性相関、定量的構造活性相関、データマインニング等、これまで人手ではなかなか出来なかったことをコンピュータが手伝ってくれそうです。研究者の直感とコンピュータのきめ細かさの融合が、今後この分野で

もキーワードの一つとなるでしょう。

かなり昔の話になりますが、近藤宗平先生が講演の中で寺田寅彦隨筆集を引用され、「怖がりすぎるのもいけない、怖がらなさすぎるのもいけない、正しく怖がることこそ大切である」^{*}といった内容の言葉を紹介しておられました。我々変異原研究を進める者の立場として、正しい情報を入手して解析・解釈し、それを科学的に評価して、正しく怖がるための情報として社会に伝える使命があると考えます。

*「ものを怖がらな過ぎたり、怖がり過ぎるのはやさしいが、本当に怖がることはなかなかむつかしい」

5. 環境中の光遺伝毒性物質と生物への影響：

田中憲穂、若栗忍、中川ゆづき
(食薬安全セ・秦野研究所・細胞)

太陽光(おもに、紫外線UVA, UVB)の直接的な作用により細胞にDNA障害が生じ、皮膚がんを生じることは良く知られている事実である。一方、化学物質の中には、紫外線照射によって、光遺伝毒性作用を示す物質の存在があることが知られている。これらの物質の多くは、石油化学系の原材料として広く用いられ、また化石燃料の燃焼等で生成され、後述するように環境中の大気、土壤、水などに環境汚染物質として広範に含まれている事がわかつてきた。

これらの光遺伝毒性物質の検出に適用可能な試験法は、細胞を用いる光毒性試験、一部の菌株を除くエームス試験、プラスミドDNA切断試験、コメットアッセイ、染色体異常試験、マウスリンフォーマTK試験などがあるが、現時点ではいずれも代謝活性化法は適用できない。培養細胞の系では、それらの光遺伝毒性物質は、光を照射しない場合に比べ強い変異原性を示す。例えば、代表的な多環芳香族炭化水素であるベンツ[a]ピレンの場合、非照射群(代謝活性化)に比べて、約7~8万倍の強烈な変異原活性を示す。その強い変異原性のメカニズムについては不明な部分が多いが、UV照射によって化学物質が励起され、生じたフリーラジカルによる障害と、UV照射によって生じた化学物質の分解産物による毒性などが要因として考えられる。特にエコトキシコロジーの分野では、構造活性相関により、光生物化学の面からその毒性予測の試みがなされている。

演者らは、過去7年間にわたり、環境中のさまざまな物質：大気粉塵、河川の砂泥、焼却灰、土壤、アスファルト、等について光遺伝毒性物質の検出を行ってきた。その結果、大部分の試料から広範囲に光遺伝毒性物質の存在が確認され、それらの主因としてはベンツ[a]ピレンに代表される多環芳香族炭化水素を中心とする物質である事が明らかになってきた。例えば、光毒性については焼却灰や大気粉塵では100倍(非照射比)のオーダーで、特に1975~1976年(25年前)の大気粉塵では

1000倍のオーダーでその毒性が発現し、1997~1998(2年前)迄には、その光毒性は約1/5まで、ほぼ直線的に減少した。また、マウスリンフォーマTK試験の結果においても、変異誘発に関して類似の年次推移がみられた。

これらの*in vitro*試験系で得られたデータより、生体での遺伝毒性や発がんのリスクをどの程度予測できるかという大きな問題がある。特に毒性発現のメカニズムの面から明らかになったように、ラジカル反応による可能性が高いことから、*in vivo*での反応には大いに興味があるところである。水生生物や動物個体で光遺伝毒性を検出する試験系が確立されていないことから、まだパイロットスタディの段階であるが、メダカ、オタマジャクシ、マウス、ラットの皮膚などを用いての光遺伝毒性の実験がなされ、その影響が証明されはじめている。

また、光遺伝毒性試験の分野では各研究者がそれぞれ独自の試験条件で実施しており、試験条件に関しての検討事項がまだ多く残されている。昨年開催された、遺伝毒性試験法国際ワークショップ(IWGTP: International Workshop on Genotoxicity Test Procedure, Washington D.C., 1999)では、Photochemical Genotoxicityの分科会が設けられ、試験の問題点と試験実施にあたっての条件として、光遺伝毒性試験を適用すべき物質、代謝活性化法が導入できない原因、などについて討議された(Environmental Molecular Mutagenesis 35: 173-184, 2000)。

また、光毒性物質のスクリーニング法として、細胞を用いる検出系のガイドライン案がOECDより提案されている。

[本研究の一部は、厚生科学研究および文部省科学研修費の援助をうけて行われました。]

6. 医薬品開発における遺伝毒性試験の過去・現在そして未来： 島田弘康(第一製薬)

ヒトゲノムの全塩基配列がほぼ解読され、創薬に対する取り組みが従来のやり方と根本的に変わってきたことは、すでにいろいろな場で報じられて久しい。医薬品開発における遺伝毒性に対する取り組みも、ICH(医薬品規制の国際調和に関する会議)を契機として変わっているが、創薬パラダイムシフトの影響を受けてさらに大きく変化しようとしている。ICHのインパクトは、これまでわが国の遺伝毒性試験の固定的な概念を変えるのに十分なものであった。従来の遺伝毒性試験ガイドラインは、一般化学物質に対するスクリーニング手法と考え方をそのまま医薬品に持ち込んだことに混乱の原因があった。復帰突然変異試験、染色体異常試験、ならびに小核試験の3点セットに加えて、各試験に頑なまでの厳密さを要求していた日本のガイドラインの一部が否定され、ICHガイドラインでは生体内での影響評価を考慮し

たフレキシブルなものとなったことが高く評価されている。このICHガイドラインの真の意味が十分に咀嚼されていない現時点で、遺伝毒性試験の未来を予見するには混乱を助長させることになりかねないが、敢えてこの機会に提言していきたい。

ICHは医薬品開発のグローバル化を促進したが、製薬企業に限らず企業研究に今求められているのは、開発の期間短縮と成功確率の向上である。安全性、特に遺伝毒性試験の分野でいうと、開発初期への参画による効率の良いスクリーニングとヒトへの外挿性を向上させた試験系での安全性の確保である。創薬パラダイムシフトに関連して、医薬品開発ではHTS(High Throughput Screening)による多量検体でのランダムスクリーニングが日常化してきており、これに対応できるよりシンプルで精度の高いスクリーニング系が要求されつつある。一方、ゲノム研究および技術の著しい進歩は、遺伝毒性試験の役割そのものを変化させる可能性をも示唆しているように思う。

現状では、遺伝毒性試験は毒性試験の中でかなり特殊な位置を占めているのは周知の事実である。他の毒性試験が実験動物を介してヒトに対する毒性予測の精度を高めることに注力しているのに対し、遺伝毒性試験はヒトへの外挿性はおろか標的としているがん原性に対する予測性さえも不確かである。そういう状況にあって、企業の中で如何に遺伝毒性試験の意義を見いだしていくのかは容易なことではない。すでに本学会第25回大会のシンポジウムにおいて、レギュラトリサイエンスとしての企業のスタンスについて述べたが、ここでは過去・現在の遺伝毒性試験の意義を再確認するとともに、創薬パラダイムシフトに関連して、医薬品開発における遺伝毒性試験の未来像について触れてみたい。

まとめ

早津先生は今までの変異原研究の流れを概説された。その中でも、焼け焦げの変異原であるヘテロサイクリックアミンの発見と同定は我が国の変異原研究の世界に誇るべき大きな成果であること、単一の特定アダクトと変異の関係が解明してきたことに焦点をあて、これらはいずれも有機化学の大きな勝利であることを指摘した。しかし、実際にヒトが接するのはmixtureであり、今後はmixtureの性質や振る舞いを「科学的に」解き明かしていくことが重要であると力説された。

能美先生はヘテロサイクリックアミンの発見、DNAの酸化損傷の研究、遺伝的に改良されたテスターの開発が環境変異原研究に大きな影響を与えてきたことを指摘された。我々が不斷に変異原に暴露されていることが認識されるようになったことも今までの研究の大きな成果であるが、それをヒトのリスク予測に結びつけることが今後重要であるとされた。遺伝的に不均一な集団である

ヒトを対象とする場合、突然変異の誘発に関与すると考えられる新たに見いだされてきたDNAポリメラーゼ・ファミリーの機能、遺伝的多型の研究がきわめて重要なテーマとなると予測されている。

若林先生はがんは遺伝子の病気であり、ヒトのがんは我々の身の回りにある多くの発がん因子が各々に作用し合って、がん発生に関与する数多くの遺伝子を少しづつ障害しつづけた結果として発生してくるものと述べられた。ヘテロサイクリックアミンやニトロソ化合物のように我々の身の回りには多くの発がん因子が発見されているが、どの要因が具体的にどのような遺伝子変異に関与し、ヒトのがんの原因となっているかについてはほとんどわかっていない現状が指摘された。がんの予防のためにも、ヒトのがんの原因の本質に迫ることがこれから的重要な課題であることが指摘された。

林先生は行政の立場にありながらあえてガイドラインやGLPよりもサイエンスが重要であるとの視点から論及し、遺伝毒性を基にヒトへのリスクを評価する上での問題点を指摘した。英国で提案された新しいガイドラインを引用し、*in vitro*および*in vivo*試験の活用と今後の遺伝毒性試験の新たな方向付けについて言及した。最後にリスク評価にどれだけ踏み込めるかが重要であり、今後はコンピュータを利用した化学物質の情報の活用を含めて「正しく怖がること」が如何に重要であるかを力説された。

田中先生は近年注目されている光遺伝毒性の焦点をあてて、環境問題における重要性を指摘した。環境中のさまざまな試料(大気粉塵、河川の砂泥、焼却灰、土壤、アスファルトなど)が、光照射することによっていかに遺伝毒性が増強されるかを明らかにした。例えば、細胞を用いた光毒性試験では、照射された焼却灰、大気粉塵は非照射群の100倍も毒性が増強された。それらの主因は多環芳香族炭化水素であり、代表的なベンツ[a]ピレンの変異原性は、照射群が非照射群の約7~8万倍にも増強されている。光遺伝毒性試験は国際ワークショップやOECDにも取り上げられ、環境変異原研究の重要な分野になりつつあることが指摘された。

島田先生は企業における立場からこれまでを振り返りつつ、将来への展望を述べられた。製薬企業における遺伝毒性試験の位置付けを総括するとともに、ICHに関連して現在取り組んでいる不純物の安全性確保における問題点を指摘した。製薬分野においても開発期間の短縮化と効率化が強く要求されており、多数の化合物からスクリーニングするため構造活性相関の活用とHTS的な遺伝毒性評価システムの利用が重要となってきていること、将来的にはToxicogenomics, Genotoxicogenomicsを含めたBioinformaticsの活用が、個々のヒトの遺伝毒性評価に繋がるのではないかと予測している。

6人の先生方はそれぞれの立場から21世紀へ向けての

展望をお話され、その中から敢えて1つのキーワードを選ぶと、次のようなものが考えられる。早津先生からは「複合汚染を科学する」、能美先生からは「低濃度複合暴露と個人差」、若林先生からは「がん要因の本質の解明」、林先生から「ヒトリスクの正当な評価」、田中先生からは「環境中の光遺伝毒性物質」、島田先生からは「Genotoxicogenomics」と、言葉はそれぞれ異なり、一

見かみ合わないようである。しかし、よくみるといずれも相互に絡み合っている問題であり、このようなキーワードを総合的に組み立てていくと、環境変異原研究の21世紀像が浮かび上がってくるような気がする。本文が会員諸氏の21世紀への研究進展に役立つものと期待している。

Committee on MUTAGENICITY

**COMMITTEE ON MUTAGENICITY
OF CHEMICALS IN FOOD,
CONSUMER PRODUCTS AND THE
ENVIRONMENT (COM)**

GUIDANCE ON A STRATEGY FOR TESTING OF CHEMICALS FOR MUTAGENICITY

CHAIR
Professor Jim M Parry BSc PhD DSc

December 2000

Contents

I. Preface Paragraph 1

II. Introduction Paragraph 6

III. General principles of testing strategy Paragraph 13

Stage 1: *In-vitro* tests

Introduction Paragraph 19

Discussion of Stage 1 tests Paragraph 20

Summary Stage 1: *In-vitro* assays Paragraph 32

Stage 2: *In-vivo* assays in somatic cells

Introduction Paragraph 33

Summary Stage 2: *In-vivo* assays in somatic cells Paragraph 50

Stage 3: Germ cell assays

Introduction Paragraph 54

Studies to provide information on genotoxicity to germ cells Paragraph 55

Quantitative Assessment of risk of heritable effects in future generations Paragraph 58

Summary Stage 3: Germ Cell Assays Paragraph 59

OVERALL SUMMARY

Page 28

APPENDIX A:

A suitable procedure for use of the in-vitro micronucleus test for detection of clastogenicity and aneugenicity Page 30

References Page 31

APPENDIX B:

List of Members

Page 35

Figure 1. STAGE 1: Initial screening.

Page 11

Figure 2. STAGE 2: Strategy for in-vivo somatic-cell testing.

Page 17

Figure 3. STAGE 3: Strategy for germ cell testing.

Page 25

Table 1: *In-vivo* assays for consideration in Stage 2 other than bone-marrow assays.

Page 21

I. Preface

1. The Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM) is an expert advisory committee whose members are appointed by the Chief Medical Officer for England following an appointments exercise involving public advertisement. Members serve in their own capacity as independent experts and observe a published code of practice including principles relating to the declaration of possible conflicting interests.
2. The remit of the committee is to advise the Department of Health, and other government departments and agencies with an interest in the safety of chemicals across various sectors, on all aspects of the mutagenicity of chemicals. The Secretariat is provided by the Department of Health (who lead) and the Food Standards Agency (FSA). Other government departments with an interest provide assessors to the Committee; these are specifically from the Department of Environment, Transport and the Regions (DETR), Health and Safety Executive (HSE), Pesticides Safety Directorate (PSD – a MAFF agency responsible for approval of pesticides), Veterinary Medicines Directorate (VMD - a MAFF agency responsible for the licensing of veterinary drugs) and the Medicines Control Agency (MCA - a DH agency responsible for the licensing of human medicines). In addition there are assessors from the devolved administrations (Scottish Executive, Welsh Assembly, Northern Ireland Executive).
3. The role of the COM is advisory. It has no regulatory status, although its advice may be provided to an agency that does have such a role (eg - HSE for occupational aspects and the EU new and existing substances regulations, MCA for human medicines, PSD for pesticides etc). Its remit is to advise on all aspects of the mutagenicity of chemicals, and this may involve advice on a specific chemical, and also on testing strategies and research.
4. In the context of testing strategies the COM first published guidelines for the testing of chemicals for mutagenicity in 1981. These provided guidance to the relevant government departments and agencies on best practice for testing at that time. The need for guidelines to be periodically updated, to reflect advances in development and validation of methods, was recognised and revised guidelines were published in 1989. This new guidance continues this updating process. The strategy outlined is believed to be the most appropriate given the available methods and recognises the need to avoid use of live animals where practical and validated alternative methods are available. It is recognised that, as with the earlier guidelines, it will be some time before this strategy is reflected in the mandatory, regulatory guidelines of the various

agencies, and it is not, of course, intended that the COM guidance should be applied retrospectively.

5. The Committee believes that the approach outlined here will remain valid for several years and will encourage international recognition of the newer tests being recommended here for which there are, currently, no internationally harmonised guidelines.

II. Introduction

6. The Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment is an independent expert advisory committee appointed by the Chief Medical Officer (CMO) for England. The Committee advises the CMO and, through the CMO, the Government, on all matters related to the mutagenicity of chemicals. The COM also has a general remit to advise on important general principles or new scientific discoveries in connection with mutagenic hazard (the inherent mutagenic property of the substance) or risk (the likelihood of mutagenic effects occurring after a given exposure) and to present recommendations for mutagenicity testing. In practice the bulk of the work of the Committee relates to assessing mutagenic hazard.
7. The Committee last published guidance on a strategy for the testing of chemicals for mutagenic potential in 1989 (DH 1989). This provided advice on the application of methods which may be used to determine the ability of chemicals to induce point mutations or structural chromosome aberrations (clastogenicity). Since 1989 there has been a rapid growth in the published data available in this area and the development of many new methods. Thus, for example, the US Environmental Protection Agency and the IARC Genetic Activity Profile (GAP) Database lists results for over 90 different assay systems (Waters *et al* 1999). The Committee reaffirms its general advice published in 1989 that screening for mutagenicity should be based on a limited number of well validated and informative tests. This view is consistent with that reached by a meeting of international experts in 1995 convened by the International Programme on Chemical Safety (IPCS) (Ashby *et al* 1996). Major changes in the new strategy now being proposed are the consideration of the detection of the potential hazard of chemicals which may induce aneuploidy (numerical chromosome aberrations) and the application of *in-vivo* assays for tissues other than the bone marrow. It is the objective of this paper to set out a scientifically valid testing strategy comprising those methods which are believed to be the most informative and (when possible) are well validated. There is no discussion of those methods which experience has shown to have no place in the recommended mutagenicity testing strategy. Details of methodologies are not given since they are provided in the OECD test guidelines and in the extensive published literature (eg UKEMS 1989, 1990, 1993, McGregor *et al* 1999).
8. In this guidance document the term mutation refers to a permanent change in the amount or structure of the genetic material of an organism, which may result in a heritable change in the characteristics of the organism. These alterations may involve individual genes, blocks of genes, or whole chromosomes. Mutations involving single genes may be a consequence of

effects on single DNA bases (point mutations) or of larger changes, including deletions and rearrangements of DNA. Changes involving chromosomes as entities may be numerical or structural. A mutation in the germ cells of sexually reproducing organisms may be transmitted to the offspring, whereas a mutation that occurs in somatic cells may be transferred only to descendant daughter cells. Mutagenic chemicals may present a hazard to health since exposure to a mutagen carries the risk of inducing germ-line mutations, with the possibility of inherited disorders, and the risk of somatic mutations including those leading to cancer.

9. Modification by chemicals of the segregation of chromosomes during both mitotic and meiotic cell division can lead to malsegregation and thus to aneuploidy. This is a type of mutation which involves a change in chromosome number from the normal diploid or haploid status of a species, whereas polyploidy represents an increase in chromosome number which is an exact multiple of the haploid number, eg triploidy (3n) and tetraploidy (4n). Aneuploidy makes a major contribution to human embryonic loss and some birth defects such as Down Syndrome (trisomy of chromosome 21). Chemicals which induce aneuploidy as their predominant mutagenic effect are termed aneugens. A wide range of chemicals (primarily those which modify the spindle of the dividing cell) such as colchicine, benomyl, trichlorphon and griseofulvin have been shown to induce aneuploidy in test systems ranging from *in-vitro* cultured mammalian cells and somatic tissue of intact animals, to germ cells of rodents (Aardema *et al* 1998). Currently, evidence for the carcinogenicity of aneugens is limited. However a large number of aneugens are inducers of malignant transformation in Syrian hamster cells *in vitro* (Gibson *et al* 1995, Oshimura and Barrett 1986, Parry and Sors 1993). Given the association between aneuploidy and heritable effects in germ cells, and potential carcinogenicity, the Committee concludes that the testing of chemicals for potential aneuploidogenic activity should be included in genotoxicity testing strategies. Data from studies of induced aneuploidy have been used for the classification of chemicals in the EU and thus the advice provided here is timely.
10. It is therefore apparent that information on the three levels of mutation, namely gene, clastogenicity (ie structural chromosome aberrations) and aneuploidy (ie numerical chromosomal aberrations), is necessary to provide comprehensive coverage of the mutagenic potential of a chemical. This is also the case when assessing carcinogenic potential, since all three types of mutation have been shown to be associated with the activation and expression of oncogenes, and loss or inactivation of tumour suppressor genes and other classes of genes implicated in carcinogenesis.
11. Genotoxic (or genotoxicity) refers to agents which interact with the DNA and/or the cellular apparatus which regulates the fidelity of the genome, eg the spindle apparatus, and enzymes such as the topoisomerases. It is a broad term that includes mutation as well as damage to DNA or the production of DNA adducts, by the chemical itself or its metabolites. Genotoxic effects also include unscheduled DNA synthesis (UDS), sister chromatid exchange (SCE) and mitotic recombination. However the detection of such effects does not in itself provide direct evidence of inherited mutations. The term "genotoxic carcinogen" as used by the Committee describes those chemicals that are carcinogenic and also give positive results in mutagenicity or genotoxicity tests *in vivo*.
12. The Committee reaffirms its view published in 1989 that there is currently no single validated test that can provide information on all three end-points, namely gene mutation, clastogenicity and aneuploidy and thus it is necessary to subject a given substance to several different assays. A range of tests has been developed which employ a wide variety of organisms, including bacteria, yeasts and other eukaryotic micro-organisms, and mammalian cells studied *in vitro*, as well as whole mammals where effects in either somatic or germ cells can be measured. A number of different end-points can be used which may measure genetic changes or indicators for the potential to produce genetic change. Assays may be classified on the basis of these endpoints (eg gene mutation, clastogenicity, aneugenicity and tests for DNA damage) and by consideration of the different phylogenetic levels represented. The Committee is not aware of any substance giving clear positive results for the induction of gene mutations which does not also give, under appropriate conditions, positive results using *in-vitro* tests for clastogenicity. However the reverse is not true and there are some clastogens, eg inorganic arsenic compounds (IARC 1987), which do not give positive results in tests for gene mutation. In the case of aneuploidogenic chemicals the detection of the induction of aneuploidy is dependent on the use of methods which allow the measurement of the malsegregation of chromosomes leading to chromosome loss and/or non-disjunction.

III. General principles of testing strategy

13. The Committee recommends a three-stage testing strategy for the detection of mutagenic hazard. Initial screening for mutagenic activity at Stage 1 is based upon three [or two in those cases where little or no human exposure is expected eg industrial intermediates, some low production volume chemicals] *in-vitro* tests. Stage 2 consists of a number of *in-vivo* tests designed to investigate whether *in-vitro* mutagenic activity can be expressed in the whole animal. These two stages provide information on the mutagenic hazard of a substance. Stage 3 investigates, when necessary, whether any *in-vivo* mutagenic activity observed in Stage 2 can be expressed in the germ cells of mammals. Some consideration may also be given to assessment of risk of heritable effects at this stage. There is a clear strategy for planning tests within each stage and for progressing to the next stage (see Figs 1-3). Clear statements can be made regarding the *in-vitro* tests to be used in Stage 1 as these methods have been well studied. The strategy for Stages 2 and 3 is more complex, particularly with regard to investigating mutagenicity in target tissues other than the bone-marrow. Thus, some consideration of the current status of a number of alternative tests has been included here. Nevertheless, an overall strategy for Stages 2 and 3 is presented. A short overview of the rationale supporting the approach recommended by the Committee is given below, along with some brief comments on matters to consider before devising a testing strategy for a specific chemical.
14. It is recommended that the screening studies at Stage 1 should investigate the mutagenicity of the chemical using *in-vitro* tests. Few chemicals are active only *in-vivo* and, in such cases, this is usually due to limitations in the exogenous metabolism used in *in-vitro* test systems (Tweats and Gatehouse 1988, Ashby 1988). The available information confirms the Committee's view (expressed in 1989) that it is appropriate to concentrate on a relatively small number of assays, using validated, sensitive methods particularly chosen to avoid false negatives.
15. Under the strategy recommended by the Committee, the use of animals in mutagenicity testing is primarily required when it is necessary to investigate whether mutagenic activity detected *in vitro* is reproduced *in vivo*. Except in those cases where high, or moderate and prolonged human exposure is expected, (eg many human medicines) there is no justification for the routine use of animals for mutagenicity tests when there is no evidence for activity at Stage 1. All assays should be designed to provide the best chance of detecting potential activity, with respect to (a) the exogenous metabolic activation system; (b) the ability of the compound or its metabolite(s) to reach the target DNA and/or targets such as the cell division apparatus, and (c) the ability of the genetic test system to detect the given type of mutational event. The assays should be carried out to internationally recognised protocols (eg OECD 1997).
16. The intrinsic chemical properties of the test substance must be considered before devising the mutagenicity testing programme. Whether the substance would be expected to have mutagenic potential can be assessed from its chemical structure, which may provide structural alerts for mutagenicity. A composite model structure has been devised indicating substituents or moieties associated with DNA-reactivity (Ashby and Paton 1993). This is a valuable tool for initially assessing the potential *in-vitro* mutagenicity of a novel chemical.
17. A number of commercial systems to investigate structure activity relationships (SAR) have also been developed (Zeiger *et al* 1996). These attempt to predict *in-vitro* mutagenicity by automated analyses of the statistical correlation between structure and mutagenic activity and/or programmed rules for prediction based on the available knowledge and expert judgement. Such systems can be useful when a large number of compounds require assessment and prioritisation for biological testing. However the commercial models currently available appear no better for predicting *in-vitro* mutagenic activity than an inspection of the chemical structure and the use of expert judgement.
18. The physico-chemical properties of the test chemical (for example, pH, solubility, and stability in solvents/vehicles) and its purity can affect the ease of conduct and results of tests. For example, the tolerance of cells to acidic chemicals can be enhanced by neutralisation but this may affect the inherent reactivity of substances to DNA (Hiramoto *et al* 1997). Alternatively, low solubility may limit the feasibility of undertaking some or all of the *in-vitro* mutagenicity tests recommended in this strategy. The toxic properties of test chemicals (such as acute toxicity, or irritancy/corrosivity in contact with skin or mucous membranes) and their toxicokinetics and metabolism will influence the choice of route of administration and the highest dose level achievable in *in-vivo* mutagenicity tests. Dose selection for *in-vivo* testing requires estimation of the maximum tolerated dose and consideration of tissue-specific effects. The strategy recommended in the following sections is concerned with investigating mutagenic activity of individual chemicals and no consideration is given in these guidelines to mixtures.

Stage 1: *In-vitro* tests

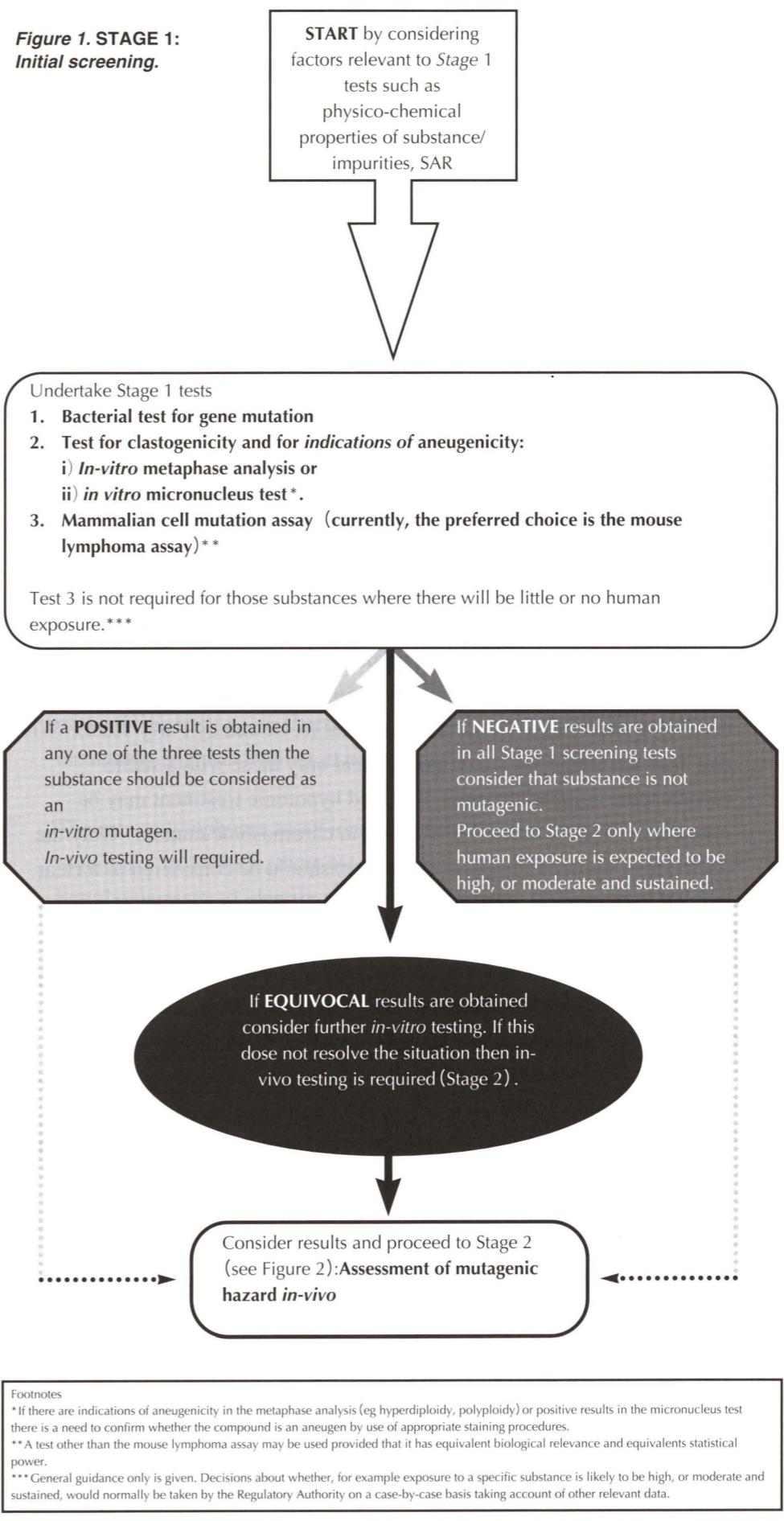
Introduction

19. As outlined above, Stage 1 involves screening tests for mutagenic activity using *in-vitro* methods and comprises three test-systems. A clearly positive result in any one of the three tests is sufficient to define the chemical as an *in-vitro* mutagen and the need to proceed to Stage 2. It is necessary to obtain clearly negative results in these tests in order to reach a conclusion that the chemical has no mutagenic activity. Usually data from all three tests will be necessary but in the case of those substances where there will be little or no human exposure, (eg industrial intermediates, some low production volume chemicals) results from only the first two tests will be necessary. Equivocal results should be investigated by further testing. If this does not resolve the situation then *in-vivo* testing is required (Stage 2). An outline of Stage 1 (initial screening) is given in Figure 1 and a description of the assays recommended is provided in the following paragraphs.

Discussion of Stage 1 tests

20. The most widely used *in-vitro* test is the bacterial reverse mutation assay for gene mutations developed by Ames and his colleagues using *Salmonella typhimurium* (Gatehouse *et al* 1990). The very extensive database available for this assay justifies its inclusion in any initial testing package. Several strains of bacteria capable of detecting both base-pair and frame-shift mutations must be included, the best validated strains being TA1535, TA1537 (or TA97 or TA97a), TA98, TA100. These strains of *Salmonella typhimurium* may not detect some oxidising mutagens and cross linking agents and thus *Escherichia coli* WP2 (pKM101), WP2uvrA (pKM101) or *Salmonella* TA102 should also be used. Testing should be carried out both in the presence and absence of an appropriate exogenous metabolic activation system. However both the repair proficient and repair deficient strains of *E coli* should be used in those cases where the bacterial assay is the only mutagenicity test being carried out on a given substance, to ensure that cross linking agents are detected.

Figure 1. STAGE 1: Initial screening.



21. The Salmonella assay, whilst being an efficient primary screen for detecting compounds with inherent potential for inducing gene mutations, does not detect all compounds with mutagenic potential. Some compounds are clastogens but do not produce gene mutation in the Salmonella assay (eg inorganic arsenic compounds. IARC 1987). The second assay should therefore evaluate the potential of a chemical to produce both clastogenicity and aneugenicity, and it should use mammalian cells, either cell lines or primary human cultures such as fibroblasts or lymphocytes. The Committee notes that a major development since the publication of the previous guidelines has been the development of novel techniques (such as chromosomal painting) and methods (ie the *in-vitro* micronucleus assay) for the assessment of potential aneugenicity. It is now feasible to screen substances for their potential to induce aneuploidy in the initial testing stage.
22. One approach is the *in-vitro* cytogenetic assay for clastogenicity using metaphase analysis. Limited information can be obtained on potential aneugenicity by recording the incidence of hyperdiploidy, polyploidy and/or modification of mitotic index etc (Aardema *et al* 1998). If there are indicators of aneugenicity (eg induction of polyploidy) then this should be confirmed using appropriate staining procedures such as FISH (fluorescence *in-situ* hybridisation) or chromosome painting to highlight alterations in the number of copies of selected chromosomes (reviewed by Parry 1996). When cell lines are employed it is important that only those with a stable chromosome number are used. Reduced hypotonic treatment may be necessary to reduce artifactual changes in chromosome number. Only the detection of hyperploidy (gain in number) should be considered as a clear indication of induced aneuploidy.
23. Another procedure for the detection of both aneuploidy and clastogenicity is use of the *in-vitro* micronucleus assay. There have been considerable developments in deriving a suitable protocol for this assay (Doherty *et al* 1997). The Committee believes that the *in-vitro* micronucleus test has been adequately validated, but recognises that it will be some time before an internationally agreed OECD guideline would be available. The results from ongoing validation studies that are expected to be available shortly will facilitate this process.
24. In the case where the micronucleus test is used then kinetochore or centromeric staining should be incorporated to identify the nature of any micronuclei induced (ie to confirm whether the chemical is aneugenic). This will provide equivalent data to that obtained using the *in-vitro* metaphase analysis supplemented by chromosome painting to identify alterations in chromosome structure and number. A suitable procedure for the use of this assay to confirm aneugenicity is given in Appendix A.
25. The Committee reaffirms the view stated in the 1989 guidelines, that a combination of assays for gene mutation in bacteria and for chromosomal aberrations (plus aneuploidy) in mammalian cells may not detect a small proportion of agents with the potential for *in-vitro* mutagenicity. Thus a third assay, comprising an additional gene mutation assay in mammalian cells, should be used, except for compounds for which there is little or no human exposure. Certain mammalian cell gene mutation protocols that have been widely employed, particularly some of those involving the use of Chinese hamster cells, are now considered to be insufficiently sensitive, predominantly on statistical grounds (UKEMS 1989). Of the available systems, measuring mutations at the thymidine kinase (*tk*) locus in L5178Y mouse lymphoma cells has gained broad acceptance and has the advantage of detecting not only gene mutations but also various sizes of chromosome deletions.
26. The Committee, therefore, recommends the use of the mouse lymphoma assay (or an alternative test of equivalent statistical power) as the third *in-vitro* test in Stage 1. The use of the mouse lymphoma assay for the detection of all types of mutational end-point has been the subject of considerable debate, particularly by the International Conference on Harmonisation of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH 1997). The ICH considers that the mouse lymphoma assay can be used on a routine basis as an alternative to clastogenicity tests that employ metaphase analysis (Müller *et al* 1999).
27. The mouse lymphoma assay identifies substances which induce gene mutations. In addition, there are some data to justify the use of the mouse lymphoma assay to identify potential clastogens. In this regard the Committee considers this assay to be complementary, rather than equivalent to, metaphase analysis. It is felt that the use of extended treatment times to detect some clastogens needs further investigation. The Committee believes that there are insufficient data to assess the ability of the mouse lymphoma assay to detect potential aneugens. It is the view of the Committee that there are major advantages in using assays which primarily identify individual mechanisms of genetic damage, eg point mutations, clastogenicity and aneugenicity.
28. The Committee agrees that both the micro-well method and the soft agar versions of the mouse lymphoma assay are acceptable although it is noted there are methodological problems which may reduce the reliability of the latter method (Cole *et al* 1999). Poor growth conditions, particularly in Noble agar, can lead to inadequate detection of small colonies. For this, and other reasons given later in this paragraph, the Committee considers that appropriate use of positive controls and with colony sizing is an essential element in the quality control of mouse lymphoma assays (Moore *et al* 1999).

A bimodal distribution of colony sizes has been demonstrated in the mouse lymphoma assay. Small colonies grow slowly and have been shown, by microscopy, to generally contain visible chromosome aberrations. Large colonies which grow at the normal rate do not generally contain visible chromosomal changes, although some have been shown, by molecular analyses, to contain large deletions. In order to show that the assay is responding adequately, it is necessary to demonstrate that the cells are capable of producing both types of mutant colonies by the use of appropriate positive control chemicals.

29. Artifactual positive results, which do not reflect intrinsic mutagenicity, may be seen in mammalian cell assays. These effects can, for example, occur with exposures that involve low pH (Morita 1995) or low or high osmolarity. (Kalweit *et al* 1990, Nowak 1990). Variations in the concentrations of sodium, potassium and chloride ions have also been shown to significantly influence the outcome of mutagenicity tests in bacteria (Glatt *et al* 1994). These effects are not well characterised or understood, but their existence needs to be recognised.
30. In line with good scientific practice, the results of each *in-vitro* assay should be confirmed in an independent experiment. However, for mammalian cell assays this may not be necessary if the following rigorous criteria are met:
 - there is no doubt as to the quality of the conduct of the test,
 - the spacing and range of test substance concentrations leave no chance of missing a positive response,
 - the result is not judged to be equivocal by statistical and biological criteria.

While it is accepted that there is no absolute requirement to repeat an *in-vitro* assay which has demonstrated a clearly positive result, there is a need to undertake further testing in an independent assay when an equivocal result is obtained. Further testing when negative results are obtained should be considered on a case-by-case basis. Where *in-vitro* screening tests are repeated in a further independent experiment it is not necessary to carry out the second study in an identical fashion to the initial experiment. Indeed it may be preferable to alter certain aspects of the study (eg concentration levels investigated) so as to obtain more useful data.

31. All mutagenicity studies should as far as possible be carried out to internationally accepted protocols. The Committee recognised that there was currently no such guideline for the *in-vitro* micronucleus test. It was hoped

such a guideline would be agreed in the next year or two, and that the validation studies to be reported shortly will facilitate this process. Provided that the Stage 1 studies outlined in *Figure 1* are done to a high standard the Committee felt there is little to be gained from further *in-vitro* testing. They do not recommend the routine use of other *in-vitro* tests such as assays for sister chromatid exchange or tests using fungi. If a positive result is obtained in any one of the *in-vitro* screening assays cited in *Figure 1*, there is a need for *in-vivo* testing. The Committee recommends that all appropriate tests in Stage 1 should be completed before undertaking any Stage 2 test. It is then necessary to investigate whether the intrinsic mutagenic properties of the compound detected *in vitro* can be expressed *in vivo* in mammals (ie Stage 2).

Summary Stage 1: *In-vitro* assays

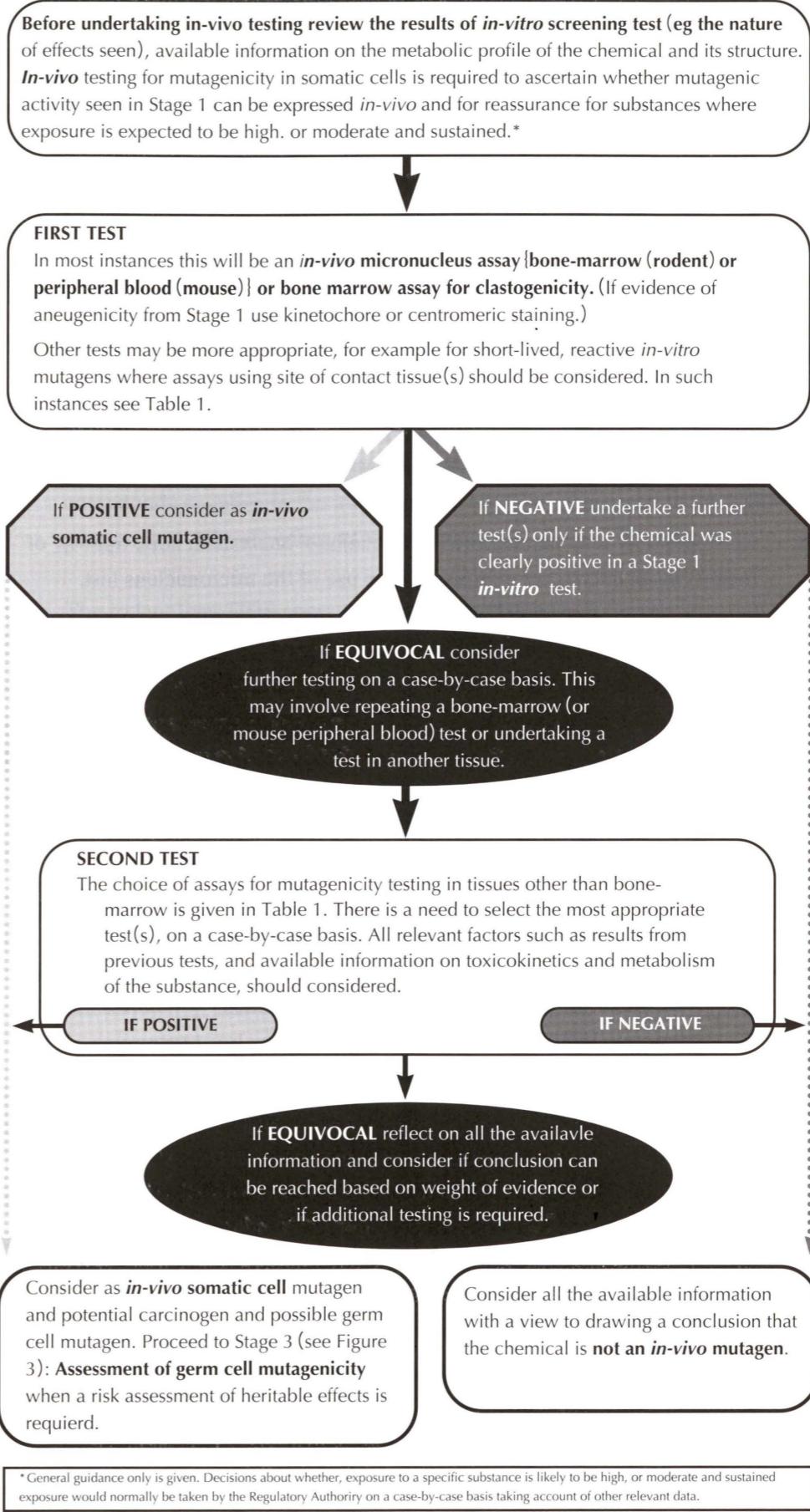
32. The Committee's recommendations for Stage 1 testing are basically similar to those in the 1989 guidelines, the main change being the need at this stage to obtain information on aneugenicity in addition to gene mutation and clastogenicity. As in the earlier guidelines the initial testing is based on a small number of *in-vitro* tests conducted to a high standard. For most chemicals three tests are recommended. In those cases where little or no human exposure is predicted (eg chemical intermediates, or some low production volume chemicals) only the first two tests may be appropriate. Such decisions need to be taken on a case-by-case basis by the appropriate regulatory agency. When only two tests are considered necessary it is recommended that these consist of a bacterial assay for gene mutation and an *in-vitro* mammalian cell assay for clastogenicity which will also screen for aneugenicity. The Committee now believes that routine screening for aneugenicity and clastogenicity is possible using the *in-vitro* micronucleus test in interphase cells, with the use of kinetochore or centromeric probes to identify the nature of any micronuclei induced (whole chromosomes or fragments). Alternatively, an assay using metaphase analysis and appropriate staining procedures to highlight alterations in structure and number is acceptable. The Committee considers that these alternative cytogenetic approaches provide essentially equivalent information. The third assay recommended is an additional gene mutation assay in mammalian cells. The mouse lymphoma assay (or an alternative test of equivalent statistical power) is recommended. This will also provide additional information on clastogenicity; there are however insufficient data to assess the ability of this assay to detect potential aneugens. These three assays, if negative, will provide sufficient information for the assessment of most chemicals. However where high, or moderate and prolonged, levels of exposure are expected (eg most human medicines) an *in-vivo* assay is recommended to provide additional reassurance.

Stage 2: *In-vivo* assays in somatic cells

Introduction

33. The second stage of the testing strategy involves an assessment of activity *in vivo* in somatic cells (see Figure 2). Stage 2 tests are needed for chemicals that are positive in any of the Stage 1 tests so as to ascertain whether mutagenic activity can be expressed *in vivo*. There are numerous reasons why activity shown *in vitro* may not be observed *in vivo* (for example, lack of absorption, inability of the active metabolite to reach DNA, rapid detoxication and elimination). Data from *in-vivo* experiments are therefore essential before any definite conclusions can be drawn regarding the potential mutagenic hazard to humans from chemicals which have given positive results in one or more *in-vitro* tests.
34. In addition, an *in-vivo* test may detect chemicals that only act *in vivo*, although experience has shown that such compounds are rare. Thus data from one *in-vivo* test is appropriate when additional reassurance is needed on the absence of mutagenic potential beyond that provided from the three *in-vitro* tests recommended in Figure 1. The Committee recommends that for chemicals where exposure is expected to be high, or moderate and sustained, (eg most human medicines) data from at least one *in-vivo* test are needed.
35. When considering any testing at Stage 2 it is important that a flexible approach is adopted. Consideration needs to be given to the nature of the chemical, the results obtained from initial tests and the available information on the toxicokinetic and metabolic profile of the chemical.
36. The primary objective of the *in-vivo* study is to assess whether the chemical is an *in-vivo* somatic cell mutagen. In the animal studies the routes of exposure should be appropriate to ensure that the substance reaches the target tissue. Thus routes unlikely to give rise to significant absorption in the test animal should be avoided.

Figure 2. STAGE 2:
Strategy for *in-vivo* somatic-cell testing



37. Most of the available *in-vivo* data on the mutagenicity of chemicals have been obtained from the rodent bone marrow micronucleus test. The bone marrow is readily accessible to chemicals that are present in the blood and a wide range of structurally diverse clastogens has been detected using this tissue. The micronucleus test indirectly detects clastogenicity by measuring micronuclei in newly formed cells in the bone marrow (or peripheral blood). It may be used to identify the induction of both structural and numerical aberrations. Micronuclei containing whole chromosomes (as opposed to fragments) should be identified by use of kinetochore or centromeric staining techniques. It should be noted that aneuploidy produced only by chromosome loss can be measured in the bone marrow micronucleus assay. Although most data are available from bone marrow assays, the use of peripheral blood is an alternative approach when mice are used and this is recognised in the relevant OECD guideline (OECD Test Guideline 474, 1997). The peripheral blood method is not a practical approach in the rat since the spleen removes micronucleated erythrocytes in this species.
38. Clastogenicity may be measured by metaphase analysis in bone marrow of rodents as an alternative approach to the use of the micronucleus test.
39. The Committee considers that in most instances the bone marrow assay will be the appropriate initial *in-vivo* assay, and this should be used unless there is information to suggest otherwise. Either the bone marrow or peripheral blood micronucleus test, or a bone marrow metaphase analysis can be used; in both cases techniques for identification of whole chromosomes are appropriate if evidence of aneugenicity was found in Stage 1. In a few instances, however, the bone marrow assay may not be the most appropriate initial assay, for example with chemicals known to be short-lived reactive mutagens in the Stage 1 assays. In such cases an assay using the site of contact tissue may be more appropriate. The decision needs to be taken on a case-by-case basis having regard to all the relevant information.
40. A negative result in the first *in-vivo* assay in somatic cells will provide sufficient reassurance for compounds that are negative in the three *in-vitro* assays in Stage 1, and which are being investigated *in-vivo* because of concerns about the extent of human exposure (because they are, for example, human medicines and involve direct human exposure to relatively high levels). In addition, a negative result may be sufficient for those compounds that were equivocal in Stage 1 and for which the *in-vivo* assay is being deployed to resolve this question. In the case of chemicals that are positive in any assay in Stage 1 a negative result in a single tissue will not provide sufficient data to conclude that the chemical is inactive in somatic cells *in-vivo*. A number of compounds that are active *in vitro* have been shown to give negative results in the bone marrow micronucleus test, but to give a positive result on further testing *in vivo* in another tissue eg using the liver UDS assay. Examples are dimethylnitrosamine, 2-nitropropane, 2,4-dinitrotoluene, 3-methyldiaminobenzanthracene and dimethylaminophenylazobenzothiazole (Tweats, 1994). Thus further *in-vivo* data will be needed in somatic cells using different tissue(s).
41. The nature of the additional testing needed should be considered on a case-by-case basis taking into account all relevant information. Consideration needs to be given to the structure of the compound, its metabolism and toxicokinetics, the results from earlier studies and the availability of relevant expertise. There are no widely available routine methods for screening for gene mutagens *in vivo* in mammals. A number of approaches that may provide useful data should be considered. In most cases these have not been developed to a level where there is international agreement on methodologies, the one exception being the assay for unscheduled DNA synthesis (UDS) in the liver. Those assays that warrant consideration for further investigation of compounds negative in the initial *in-vivo* assay are discussed in the following paragraphs. A brief outline of these methods is given in Table 1.
42. The rodent liver UDS assay is an established approach for investigating genotoxic activity in the liver, and for which there is an OECD Guideline (No 486, OECD 1997); there is also advice from the UKEMS (Kennelly *et al* 1993). The endpoint measured is indicative of DNA damage and subsequent repair in liver cells. Since the liver is usually the major site of metabolism of absorbed compounds this assay is particularly appropriate for investigating compounds that require metabolic activation to express genotoxic activity.
43. The comet (single cell gel electrophoresis) assay is a relatively simple procedure for detecting genotoxicity in any tissue (McGregor and Anderson 1999). The Committee's earlier concerns (COM Annual Report 1995) about the distinction between cytotoxic chemicals and genotoxins have now largely been resolved and much further work has been carried out on the development and validation of the assay. The method is of particular value in evaluating directly acting genotoxins at their initial site of action. Other DNA strand breakage assays may however also be used as alternatives to the comet assay.
44. There are commercially available transgenic animal models that have the potential for measuring gene mutations *in vivo* in any tissue provided that sufficient DNA can be isolated. Examples of these models are BigBlue™ and Muta™ Mouse (Schmezer and Eckert 1999). There has been relatively little published work to date on the validation of these assays and further work is needed on optimising methodology for particular tissues. Although the assays are not at the stage when they can be used routinely, they may

provide valuable information as supplementary tests, in particular in investigating mutagenic activity in specific tissues which are often the site of initial contact with the chemical (eg gastrointestinal tract, skin, respiratory tract).

45. In addition there are approaches based on measuring DNA adducts using either ^{32}P -postlabelling or covalent binding to DNA. These measure exposure, uptake and reactivity to DNA rather than mutagenicity, but they are useful in considering mechanisms *in vivo*, in combination with other data. These are considered below.
46. The ^{32}P -postlabelling assay is a sensitive method for measuring DNA adducts (which may or may not produce mutations) and it does not require the test compound to be radiolabelled (Phillips *et al* 1993). The method is complex involving numerous steps including digestion of DNA followed by ^{32}P -labelling of adduct nucleoside 3-monophosphates and detection of labelled adducts, for example by chromatography and autoradiography. The sensitivity of the assay may be increased by adduct enrichment techniques which remove normal nucleotides from the digest before ^{32}P -labelling. The choice of enrichment techniques needs justification; knowledge of the type of adduct produced allows tracking to be more sensitive.
47. Another method for measuring DNA adducts is to use radiolabelled compound and measure covalent binding to DNA (Martin *et al* 1993). This is a well established technique, but it does need radiolabelled compounds which are frequently not available for some chemical types. The significance of low level binding observed in this assay is often difficult to interpret since some low level activity measured may not be due to covalent binding to DNA.
48. Thus, there are a number of approaches that can be used when it is necessary to follow up negative results in the initial *in-vivo* somatic cell assay (see Table 1). Identification of the further testing necessary in a specific instance, and whether adequate data are available, will be helped by asking why activity seen *in vitro* was not expressed *in vivo*.
49. Other methods of detecting point mutations are at various stages of development and validation. Such approaches, based mainly on PCR technology, may be appropriate for specific chemicals and exposures (Huber *et al* 1998, Ward *et al* 1998, Jenkins *et al* 1999). Their use to provide supplementary data needs to be considered on a case-by-case basis.

Table 1: *In-vivo* assays for consideration in Stage 2 other than bone-marrow assays

(These assays may also be applicable to the initial evaluation for effects in germ cell)

Assay	Endpoint	OECD guideline	Main Attributes	Comments
Liver UDS	Thymidine incorporation outside S phase	Yes	Long history of use and acceptability by regulatory authorities	Limited use in tissues other than liver. Does not detect mutagenicity resulting from misrepair and non-repair.
Comet assay (or other DNA strand-breakage assays)	DNA strand breaks	No	Can be applied to a large range of tissues, including site-of-contact tissues. Relatively simple to undertake provided that a single cell suspension can be obtained.	May not detect some mutagens (such as those producing bulky adducts). Distinction between apoptosis, necrosis and genotoxicity requires expert judgement.
Transgenic animal models	Point mutations	No	Can be applied to all tissues provided that sufficient DNA can be extracted. Method measures mutations rather than interaction with DNA.	In general less sensitive than methods measuring DNA adducts. Need for further work to optimise protocols for specific tissues.
^{32}P -Postlabelling	DNA adducts	No	Can be applied to all tissues provided sufficient DNA can be extracted. Can be highly sensitive particularly with bulky adducts and if appropriate enrichment technique used.	Interpretation of results can be complex. Involves handling high-activity ^{32}P .
Covalent binding to DNA A variety of methods can be used such as those involving radioactive (eg ^{14}C -) or isotope measurements (eg Accelerator Mass Spectrometry AMS)	DNA adducts	No	Can be applied to all tissues. Some methods (AMS) are potentially very sensitive and can provide data on DNA binding at levels of exposure similar to low level environmental exposures.	Generally need radiolabelled compound (but very small amounts in the case of AMS). Interpretation of results can be complicated (eg by non-specific binding).

Summary: Stage 2 *In-vivo* assays in somatic cells

50. Stage 2 test(s) are required for compounds that are positive or equivocal in any of the Stage 1 tests to ascertain whether mutagenic activity can be expressed *in vivo*. In addition one appropriate *in-vivo* test is needed for all compounds where high, or moderate and prolonged, levels of exposure are expected, for example some human medicines.
51. It is important that a flexible approach is adopted for any testing strategy at this stage. Consideration needs to be given to the nature of the chemical, the results obtained in the initial tests, and also the available information on the metabolism of the chemical.
52. The most appropriate initial test will usually be a bone marrow micronucleus assay to measure clastogenicity and aneugenicity, unless initial considerations give an indication to the contrary. Techniques for the assessment of effects on whole chromosomes are appropriate if evidence of aneugenicity was found in Stage 1.
53. If negative results are obtained in the initial *in-vivo* test, using compounds that were considered positive *in vitro*, then additional testing will be required using other tissue(s) before definite conclusions can be drawn regarding the absence of activity *in vivo*. [This will however not be the case if only equivocal results were obtained in the *in-vitro* assay, and the *in-vivo* assay is being used to resolve its mutagenic potential.] The type of study (or studies) necessary must be considered on a case-by-case basis having regard to the chemical structure, its metabolism, the expertise available and results from earlier tests. The process will be helped by a plausible explanation as to why activity seen *in vitro* may not be expressed in the whole animal. A number of types of study are available and these are listed below; the reasons for the choice of test in a given situation should be provided.
- **Measurement of induction of DNA lesions ie measure of exposure, uptake and reactivity to DNA**
 - Comet assay
 - ^{32}P -Postlabelling assay
 - Covalent binding to DNA

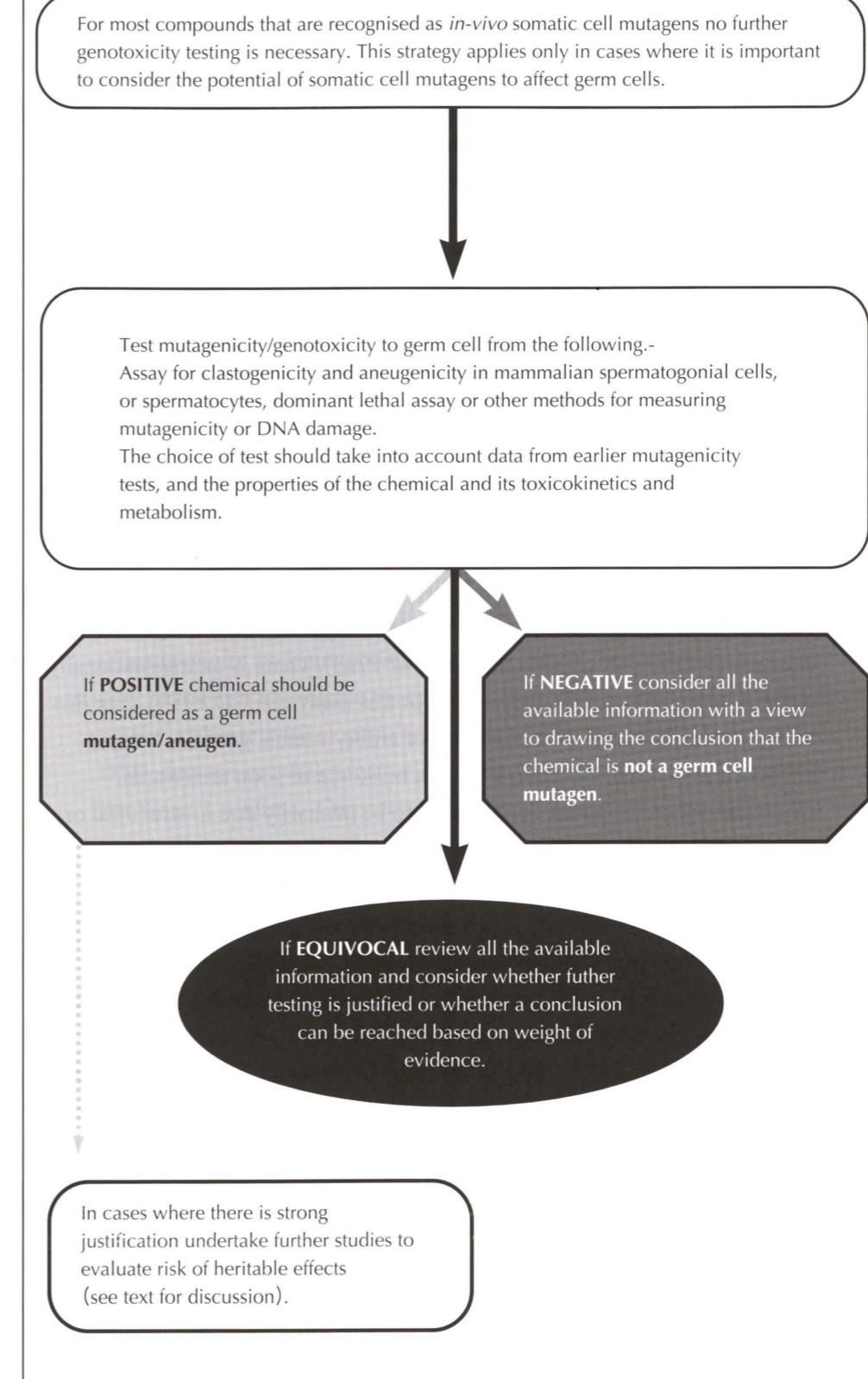
- **Measurement of the repair of DNA lesions**
 - Liver UDS
- **Measurement of induction of genetic changes**
 - Transgenic assay for point mutations
 - Chromosomal aberrations

Stage 3: Germ cell assays

Introduction

54. During the initial stages of investigating the mutagenic hazard posed by a chemical there is no need to screen for germ cell mutagens. Thus far all established germ cell mutagens have been shown also to produce positive results in bone marrow assays and there is no current evidence for germ-cell-specific mutagens (Shelby 1996). However, the reverse is not true. Not all somatic cell mutagens can be demonstrated to be germ cell mutagens. Data on the mutagenic effects in germ cell DNA are needed before any definite conclusions can be drawn relating to the mutagenic hazard of a chemical specifically to germ cells. However, no further genotoxicity testing will be needed for most compounds that are recognised as *in-vivo* somatic cell mutagens since they will be assumed to be both potential genotoxic carcinogens and potential germ cell mutagens. In some cases germ cell studies will be undertaken for the specific purpose of demonstrating whether an *in-vivo* somatic cell mutagen is, or is not, a germ cell mutagen. If it is important to consider the potential of somatic cell mutagens to affect germ cells a strategy for testing is outlined in Figure 3.

Figure 3. STAGE 3: Strategy for germ cell testing:



Studies to provide information on genotoxicity to germ cells

55. When identifying the most appropriate studies consideration should first be given to the type of genetic effect seen in the earlier studies namely point mutations, clastogenicity or aneugenicity. This will be important in identifying the most appropriate study (or studies) in a given instance. In general, the available methods involve measuring effects in the gonads of male rodents.
56. Methods for investigating clastogenicity in mammalian spermatogonial cells are well established. There is an internationally recognised guideline OECD No 483 for this approach (OECD 1997). The use of transgenic animals offers the potential for investigating mutagenic effects in germ cells. Aneugenic and clastogenic effects may be detected by measuring micronuclei induction in spermatocytes using appropriate staining methods. Information on the induction of DNA lesions in germ cell DNA may be obtained from the methods considered in Stage 2 (^{32}P -postlabelling assays, comet assay, UDS, covalent binding to DNA).
57. The dominant lethal assay may also be used to investigate clastogenicity or aneugenicity in germ cells (Holstrom *et al* 1993). There is an internationally recognised guideline, OECD No 478, for this assay (OECD 1984). For this method the endpoint is the production of embryo-lethal genetic changes measured as death of the conceptus as a blastoma or soon afterwards. Dominant lethal mutations are believed to be primarily due to structural or numerical chromosome aberrations. There are essentially two different dosing regimes that may be used in this assay. In one case this involves repeated dosing of the males for a period covering spermatogenesis followed by mating with untreated females and examining the latter for dominant lethals after an appropriate period of gestation. In the other regime single dosing is followed by sequential mating of females. The latter provides information on the various stages of the germ cell cycle that may be affected but uses very many more animals and the need for this additional information is rarely justified.

Quantitative assessment of risk of heritable effects in future generations

58. The only methods available to provide data that allow such risk assessments to be carried out involve investigating effects in subsequent generations bred from treated animals. The methods available are the mouse heritable translocation test and the mouse specific locus test. In view of the very large number of animals that are needed these studies (particularly in the case of

the mouse specific locus test) are not a practical option and should only be used in exceptional cases. Furthermore neither of these assays has been carried out in the rat (nor is this possible in the case of the specific locus test). Currently no methods are available for investigating the induction of aneuploidy in offspring, following exposure of parental animals.

Summary Stage 3: Germ Cell Assays

59. The need to investigate effects in germ cells requires careful consideration. For most chemicals recognised as *in-vivo* somatic cell mutagens no further genotoxicity testing is necessary since they will be assumed to be potential genotoxic carcinogens and potential germ cell mutagens. However, in some specific cases germ cell studies may be undertaken to demonstrate whether a somatic cell mutagen is, or is not, a germ cell mutagen. In those cases where it is important to obtain conclusive information on effects in germ cells the following approach should be followed.
60. Information as to whether the compound is genotoxic in germ cells can be obtained from a number of assays. These include metaphase analysis of spermatogonia (for clastogenicity) or micronuclei induction in spermatocytes (clastogenicity and aneugenicity) and the dominant lethal assay (clastogenicity and aneugenicity). Alternatively the transgenic animal models may be used to investigate mutations in germ cells. Information on exposure, uptake and reactivity to germ cell DNA may be provided by investigating DNA damage or adduct formation using various approaches (as described for the Stage 2 studies). Consideration of the types of mutation seen in the initial tests will be important when deciding on an appropriate assay in a given instance. None of these assays provide conclusive information as to whether the effects seen are heritable in future generations.
61. The only approaches that provide data that allow estimates of risks of heritable effects are of the mouse specific locus test and the mouse heritable translocation test. In view of the very large number of animals used, these are not a practical options and should only be used in exceptional circumstances.

OVERALL SUMMARY

The strategy being recommended, as in the Committee's earlier guidance, is based on three progressive stages.

Stage 1 (initial screening – see Figure 1) is based on *in-vitro* tests. For most chemicals three tests are recommended, but for those where little or no human exposure is expected (eg industrial intermediates, some low production volume industrial chemicals) two tests may be appropriate, namely a bacterial assay for gene mutation and an *in-vitro* mammalian cell assay for clastogenicity and aneugenicity. The Committee believes that screening for both clastogenicity and aneugenicity is now possible in the initial (Stage 1) tests. The second test may be metaphase analysis, with consideration of hyperdiploidy, polyploidy and effects on mitotic indices as indicators of possible aneugenicity; if these suggest potential aneugenicity this needs to be confirmed by use of appropriate staining procedures, such as FISH and chromosome painting. Alternatively an *in-vitro* micronucleus test may be used. If a positive result is obtained, kinetochore or centromeric staining should be employed to ascertain the nature of the micronuclei induced (ie whether induction is due to clastogenicity or aneugenicity). The third assay is an additional gene mutation assay in mammalian cells, the mouse lymphoma assay being recommended. These three assays, if negative, will provide sufficient information for the assessment of most chemicals. However where high, or moderate and prolonged, levels of exposure are expected (eg most human medicines) an *in-vivo* assay is recommended to provide additional reassurance. Decisions on the extent of testing appropriate for given exposure levels of specific chemicals need to be taken by the relevant regulatory authority on a case-by-case basis.

Stage 2 (see Figure 2) involves an assessment of whether genotoxic activity seen in any of the *in-vitro* tests can be expressed in somatic cells *in vivo*. In addition, one appropriate *in-vivo* test is needed for all chemicals for which human exposure is expected to be high, or moderate and prolonged. A flexible approach is needed with consideration of the nature of the chemical, its metabolism and results obtained in the initial *in-vitro* tests. The most appropriate initial test will be a bone marrow micronucleus assay unless the initial considerations give an indication to the contrary. Techniques for the assessment of whole chromosomes are appropriate if there is evidence of aneugenicity. If negative results are obtained in this assay additional testing in other tissue(s) will be required for all compounds that are positive *in-vitro*, to provide adequate reassurance for the absence of activity *in-vivo*. The type of study (or studies) needs to be considered on a case-by-case basis having regard to the available information on the compound including the results from earlier tests. Studies that may be appropriate include the liver UDS assay, comet assay, ³²P-postlabelling assay, covalent binding to DNA and assays using transgenic animals; the reasons for the choice of assay in a given situation should be given.

Stage 3 (see Figure 3) consists of assays in germ cells. The need for such studies requires careful consideration. In most cases chemicals that are recognised as *in-vivo* somatic cell mutagens will be assumed to be both potential genotoxic carcinogens and potential germ cell mutagens, and no further genotoxicity testing is necessary. However, in some cases germ cell studies may be undertaken to demonstrate that a somatic cell mutagen is not a germ cell mutagen. Information on whether a compound is genotoxic in germ cells may be obtained from a number of assays (eg metaphase analysis in spermatogonia or micronuclei induction in spermatocytes, the dominant lethal assay and mutation assays in transgenic animals). Information on the induction of DNA lesions in germ cells may be obtained using the various approaches listed for phase 2. Consideration of the type of mutation produced in earlier studies is important when selecting the appropriate assay in a given instance. None of these assays provide conclusive information as to whether effects will be seen in future generations, and the only methods on which risk estimates for the effects can be based are the heritable translocation test and the mouse specific locus test. These are not practical options in view of the very large number of animals needed. Currently there are no routine methods available for investigating the induction of aneuploidy in offspring following exposure of parental animals.

APPENDIX A

A suitable procedure for use of the *in-vitro* micronucleus test for detection of clastogenicity and aneugenicity

- i) Undertake an *in-vitro* micronucleus assay in which binucleate cells are produced by treatment with the actin inhibitor Cytochalasin B in interphase cells of a type with a stable karyotype. Prepare duplicate cell suspensions.
- ii) Score binucleate cells for the induction of micronuclei: if negative then consider the test substance as non-clastogenic and non-aneugenic in this test: if positive consider as potential clastogen or aneugen.
- iii) If positive in (ii) stain second set of cells for presence of centromeric DNA or kinetochore proteins. If there is an increase in centromeric negative micronuclei then the compound is considered a clastogen. If there is an increase in centromeric positive micronuclei then the compound is considered an aneugen.

In most cases no further testing will be necessary. However, if the investigation relates to the identification of thresholds (rather than just identifying the chemical as an aneugen) then it is advisable that the dose response for the induction of non-disjunction is determined as aneugenic chemicals may induce non-disjunction at concentrations lower than those which induce chromosome loss. In these circumstances a further modification of the suggested *in-vitro* micronucleus assay may be undertaken as follows:

Treat a third set of cells with chromosome specific centromere probes. Analyse the distribution of chromosomes in binucleate cells to quantify the frequency of chromosome non disjunction where the sum of the signals for each chromosome equals 4.

References

- Aardema MJ, Albertini S, Arni P, Henderson LM, Kirch-Volders M, Mackay JM, Sarrif DA, Stringer DA, Taalman RDF (1998). Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutation Research* **410**, 3-79.
- Ashby J (1988). The continuing search for an *in-vivo* mutagen which is non genotoxic *in vitro*. *Mutagenesis* **3**, 103-104.
- Ashby J and Paton D (1993). The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures. *Mutation Research* **286**, 3-74.
- Ashby J, Waters MD, Preston J, Adler ID, Douglas GR, Fielder RJ, Shelby MD, Anderson D, Sofuni T, Gopalan HNB, Becking G, Sonich-Mullin C (1996). IPCS harmonisation of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazard, and for indicating the probable mechanism of action of carcinogens. Current Issues in Mutagenesis and Carcinogenesis, No 67. *Mutation Research* **352**, 153-157.
- Cole J, Harrington-Brock K and Moore M (1999). The mouse lymphoma assay in the wake of ICH4 – where are we now? *Mutagenesis* **14**, 265-270.
- COM Annual Report (1995). The Comet Assay, Department of Health, London pp 39.
- Doherty AT, Ellard S, Parry EM and Parry JM (1997). A study of the aneugenic activity of trichlorfon detected by centromere-specific probes in human lymphoblastoid cell lines. *Mutation Research* **372**, 221-232.
- DH (1989). Report on Health and Social Subjects, 35. Guidelines for the testing of chemicals for mutagenicity. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. London, HMSO.
- Gatehouse DG, Rowland IR, Wilcox P, Calander RD and Forster R (1990). Bacterial Mutation Assays in Basic Mutagenicity Tests. UKEMS Recommended Procedures. D Kirkland (ed) UKEMS Report. Cambridge University Press pp 13-61.
- Gibson DP, Aardema MJ, Kerckaert GA, Carr GJ, Braunerger RM, Le Boeuf RA (1995). Detection of aneuploidy-inducing carcinogens in the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. *Mutation Research* **343**, 7-24.

- Glatt H, Staffa-Pié A, Enders N, Baidossi W, Blum J (1994). The presence of KCl in the exposure medium strongly influences the mutagenicity of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli*. Mutation Research **324**, 111-114.
- Hiramoto K, Nasuhara A, Michikoshi K, Kato T, Kikugawa K (1997). DNA strand-breaking activity and mutagenicity of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4-H-pyran-4-one (DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine. Mutation Research **395**, 47-56.
- Holmstrom LM, Palmer AK, Favor J (1993). The rodent dominant lethal assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. UKEMS Report, Cambridge University Press pp 129-156.
- Huber KB, Bittner J, Bauer K, Trumper L, Sek P, Sebesta C, Rosen H, Tagl KH (1998). Restriction digest PCR (RD-PCR) for the analysis of gene mutations. Application to *K-ras*. Clinical Chemical Laboratory Medicine **36**, 593-595.
- IARC (1987). International Agency for Research in Cancer (IARC) monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Supplement 6. Genetic and related effects: an updating of selected IARC monographs from volume 1-42. Arsenic and Arsenic Compounds, IARC, Lyon pp 71-76.
- ICH International Conference on Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use (1997). Genotoxicity. A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals In, Proceedings of the Fourth International Conference on Harmonisation (ICH), D'Arcy PF, Harron DWG (eds) Brussels 1997 Queens University Press Belfast pp 987-997.
- Jenkins GJS, Suzen HS, Sueiro RA and Parry JM (1999). The restriction site mutation assay: a review of the methodology development and the current status of the technique. Mutagenesis **14**, 439-448.
- Kalweit S, Nowak C, Obe G (1990). Hypotonic treatment leads to chromosomal aberrations but not to sister chromatid exchanges in human lymphocytes. Mutation Research **245**, 5-9.
- Kennelly JC, Water R, Ashby J, Lefevre PA, Burlinson B, Benford DJ, Dean SW, Mitchell I deG (1993). *In-vivo* rat liver UDS assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. UKEMS Report. Cambridge University Press pp 52-77.
- Martin CN, Lawley PD, Phillips D, Venitt S, Waters R (1993). Measurement of covalent binding to DNA *in vivo*. In Supplementary Mutagenicity Tests. UKEMS Report, Cambridge University Press pp 78-104.
- McGregor DB, Rice JM and Venitt S (eds) (1999). The use of short and medium term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. IARC Scientific Publication No. 146, (536 pages) Lyon.
- McGregor DB and Anderson D (1999). DNA damage and repair in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* as indicators of exposure to carcinogens. In, The use of short and medium term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. McGregor DB, Rice JM, Venitt S (eds) IARC Scientific Publication No. 146, Lyon pp 309-354.
- Moore MM, Collard DD and Harrington-Brock K (1999). Failure to adequately use positive control data leads to poor quality mouse lymphoma data assessments. Mutagenesis **14**, 261-263.
- Morita T (1995). Low pH leads to sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations, and its clastogenicity is S-dependent. Mutation Research **334**, 301-308.
- Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T and Tweats D (1999). ICH-Harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. Mutation Research **436**, 195-225.
- Nowak C (1990). Chromosomal aberrations in V79 hamster cells induced by hyperosmotic solutions of sodium chloride. Mutation Research **230**, 227-234.
- OECD (1984). Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing Chemicals No 478. The Dominant Lethal Assay, Paris.
- OECD (1997). Organisation for Economic Co-operation and Development. Ninth addendum to the OECD guidelines for the testing of chemicals. Update of Section 4, Health Effects. Revised guidelines 471, 473, 474, 475, 476, 483, 486. Paris.
- Oshimura M and Barrett JC (1986). Chemically induced aneuploidy in mammalian cells. Mechanisms of biological significance in cancer. Environmental Molecular Mutation **8**, 129-158.
- Parry JM and Sors A (1993). The detection and assessment of the aneugenetic potential of environmental chemicals: the European Community Aneuploidy Project. Mutation Research **287**, 3-15.
- Parry JM (ed) (1996). Molecular Cytogenetics. Mutation Research Special Issue **372**, 151-294.
- Phillips DH, Castegnaro M, Bartsh H (eds) (1993). Postlabelling methods for detection of DNA adducts. IARC Scientific Publication No 124, (396 pages) Lyon.

Schmezer P, Eckert C (1999). Induction of mutations in transgenic animal models. BigBlue™ and Muta™ Mouse. In, The use of short and medium term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogens hazard evaluation. McGregor DB, Rice JM, Venitt S (eds) IARC Scientific Publication No. 146, Lyon, pp 367-394.

Shelby MD (1996). Selecting chemicals and assays for assessing mammalian germ cell mutagenicity. *Mutation Research* **352**, 159-169.

Tweats DJ (1994). Follow up testing for *in-vitro* positives. In Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH). D'Arcy PF, Harron DWG (eds), Orlando 1993, Queens University Press, Belfast, pp 240-244.

Tweats DJ and Gatehouse DG (1988). Further debate on testing strategies. *Mutagenesis* **3**, 95-102.

UKEMS (1989). Statistical evaluation of mutagenicity test data. UKEMS sub-committee on guidelines for mutagenicity testing. Report. Part III. Kirkland DJ. (ed) Cambridge University Press.

UKEMS (1990). Basic mutagenicity tests: UKEMS recommended procedures. UKEMS sub-committee on guidelines for mutagenicity testing. Report. Part I revised. Kirkland DJ. (ed) Cambridge University Press.

UKEMS (1993). Supplementary mutagenicity tests: UKEMS recommended procedures. UKEMS sub-committee on guidelines for mutagenicity testing. Report. Part II revised. Kirkland DJ and Fox M. (eds) Cambridge University Press.

Waters MD, Stack HF and Jackson MA (1999). Short term tests for defining mutagenic carcinogens. In: McGregor DB, Rice JM, Venitt S (eds.) The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. IARC Scientific Publications No. 146. IARC, Lyon, pp 499-536.

Ward R, Hawkins N, O'Grady R, Sheehan C, O'Conner T, Impey H, Roberts N, Fuery C, Todd A (1998). Restriction endonuclease-mediated selective polymerase chain reaction. A novel assay for the detection of *K-ras* mutations in clinical samples. *American Journal of Pathology* **153**, 363-366.

Zeiger E, Ashby J, Bakale G, Enslein K, Klopman G, Rosenkranz HS (1996). Prediction of *Salmonella* mutagenicity. *Mutagenesis* **11**, 471-484.

APPENDIX B

List of Members

Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM)

Appointments are for a three year period from 1st April 2000 to 31st March 2003.

CHAIR

Professor Jim M Parry BSc PhD DSc
Professor of Genetics. University of Wales Swansea
(reappointed till 24.10.01)

MEMBERS

Professor John Ashby BSc PhD CChem FRCS
Senior Research Associate. Mutagenesis, Carcinogenesis and endocrine disruption.
Syngenta, Central Toxicology Laboratory

Dr Julie Clements BSc PhD
Head of Molecular Toxicology, Covance

Professor Colin Cooper BSc PhD DSc
Head of Molecular Carcinogenesis Section.
Institute of Cancer Research, Haddow Laboratories

Professor Peter B Farmer MA DPhil C.Chem FRSC
Professor of Chemistry, MRC Toxicology Unit

Dr Nigel J Gooderham PhD C.Chem FRSC
Senior Lecturer in Molecular Toxicology,
Division of Biomedical Sciences,
Imperial College of Science, Technology and Medicine

Ms Margaret Langley BA
Lay member

Dr Ian Mitchell BA PhD
Consultant in Genetic and Molecular Toxicology,
Kelvin Toxicology Associates

Professor David H Phillips BA PhD DSc FRCPath
Professor of Environmental Carcinogenesis,
Institute of Cancer Research

Professor David J Tweats BSc PhD CBiol FIBiol FRCPath
Director of Preclinical Safety Sciences.
Glaxo Wellcome Research & Development Ltd

SECRETARIAT

R J Fielder BSc PhD Dip RCPPath (Scientific)
K N Mistry (Administrative)
J M Battershill BSc MSc (Scientific)

日本環境変異原学会会則

(平成 11 年 12 月 2 日改定)

第 1 章 名 称

- 第 1 条 本会は日本環境変異原学会と称する。
第 2 条 本会の英語の名称は The Japanese Environmental Mutagen Society と称し、JEMS と略称する。
第 3 条 本会は事務所を〒170-0003 東京都豊島区駒込 1-43-9 駒込 TS ビル 財団法人口腔保健協会内に置く。

第 2 章 目 的

- 第 4 条 本会は人間・生物・地球環境における変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する変異原とこれに関連する基礎研究の推進、ならびに関連情報・技術の伝達を目的とする。

第 3 章 事 業

- 第 5 条 本会は前章の目的を達成するために、次の事業を行う。
1. 年1回大会を開催し、総会、ならびに学術上の研究成果の発表および知識・情報の交換を行う。
2. 学会誌「環境変異原研究」および会報「Jems News」を発行し、会員に配布する。
3. 学会賞（学術賞、研究奨励賞）を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行った会員および将来の成果が期待される会員（原則として個人）に授与する。
4. 國際環境変異原学会連合に加入し、國際協力に必要な活動を行う。
5. Mutation Research 等の英文誌をまとめて購入配付する。
6. その他公開シンポジウムの開催、研究会の支援など本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第 4 章 会 員

- 第 6 条 本会の会員は、正会員、学生会員、賛助会員、購読会員および名誉会員とする。
第 7 条 正会員は、本会の目的に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者とする。

第 8 条 学生会員は、大学または大学院等に在籍し、毎年所定の手続きを経て、定められた会費を納入した者とする。

第 9 条 賛助会員は、本会の目的に賛同し、本会の事業を後援するために、定められた会費を納入した個人または法人とする。

第 10 条 購読会員は、学会誌「環境変異原研究」および会報「Jems News」の購読のみを行う個人または法人とする。

第 11 条 名誉会員は、変異原の研究または本会の発展特に功績のあった者で、理事会が推薦し、評議員会の承認を得た者とする。また、名誉会員は会費の納入を免除される。

第 12 条 本会に入会を希望するものは、正会員 1 名の推薦書付きの所定の申込書に記入の上、年会費の納入とともに、本会事務所に申込むものとする。正式の入会の可否は、理事会および評議員会において決定する。

第 13 条 会員は毎年年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は理事会において審議し、評議員会において定める。

第 14 条 会員は次の事由によって会員、役員および評議員の資格を喪失する。
1. 退会の届け出をしたとき。
2. 会費を滞納し、かつ催促に応じないとき。
3. 死亡、または法人が解散したとき。
4. 本会の名誉及び信用を甚だしく傷つけ、あるいは本会則に違反し、評議員会で除名の決議がなされたとき。

第 5 章 役員および評議員

第 15 条 本会には次の役員（理事および監事）および評議員を置く。
1. 理事 11 名（うち、会長 1 名、会長指名理事 2 名）
2. 監事 2 名
3. 評議員 40 名以上

第 16 条 評議員のうち 30 名は正会員の選挙により、正会員から選出する。それ以外の評議員（推薦評議員と称す）は、正会員 3 名以上、評議員、または理事の推薦により、理事会で正会員歴ならび

- に学会活動歴を審査の上、評議員会で承認を得て選出される。
- 第17条 理事のうち9名および監事2名は選挙で選出された評議員(推薦評議員は除く)の選挙により、正会員から選出する。会長は理事(会長指名理事)2名を指名する。
- 第18条 会長は選出された理事9名の互選によって定める。
- 第19条 会長は本会を代表し、会務を掌握し、理事会、評議員会および総会を招集する。また、評議員会および総会において主たる会務について報告をしなければならない。
- 第20条 会長および理事は理事会を構成し、会務を執行する。会務執行のために理事会には、総務、会計、広報、国際協力、企画、編集、表彰人事、および書記担当理事を置く。
- 第21条 監事は本会の財産の状況、および理事の業務執行の状況を監査し、不整の廉あることを発見したときにはこれを評議員会および総会において報告する。また、監事は理事会、および評議員会に出席して意見を述べることができる。ただし、理事、各種委員会委員を兼ねることはできない。
- 第22条 評議員は評議員会を構成し、会務を審議する。
- 第23条 役員および評議員の任期は選出された年の翌年の1月1日から2年間とする。ただし、補欠または増員により選任された役員および評議員の任期は、補欠の場合は前任者の残任期間とし、増員の場合は現任者の残任期間とする。
- 第24条 役員および評議員は、再任されることができる。ただし、会長は原則として1期をもって限度とする。また、選挙で、得票数上位9名に入った前理事は5名以内まで、第25条の限度内で再任することができる。
- 第25条 理事および監事は連続2期、生涯4期をもって限度とする。ただし、会長指名理事は生涯1期しか指名されず、この1期は生涯4期に含まれる。
- 第26条 会長は必要に応じ、理事会の承認を得て、会長または担当理事を含む委員会を設けることができる。委員は理事会の承認を得て会長が委嘱する。委員の任期は会長の任期に合わせて2年とし、再任は妨げない。委員会委員長には、会長が就任するか、または会長が担当理事か適当な委員に委嘱する。
- 第27条 大会会長は理事会の推薦に基づき評議員会の承認を得て選出される。
- 第28条 大会会長は大会を主宰し、総会の議長となる。

第6章 会議

- 第29条 本会の会議は、総会、評議員会、および理事会とする。
- 第30条 総会は、正会員をもって構成し、大会開催時に年1回開催される。
- 第31条 総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。
- 第32条 評議員会は原則として年2回開催する。評議員会(臨時評議員会を含む)は評議員総数の過半数(委任状を含む)をもって成立し、出席者の過半数の賛否をもって議決する。評議員会の議長は、会長または会長が指名した者が務める。理事は評議員会に出席できるが、議決には参加できない。
- 第33条 会長は総数の1/3以上の評議員の要請があるときは臨時評議員会を開催しなければならない。
- 第34条 理事会は理事の過半数の出席をもって成立し、出席者の過半数の賛否をもって議決する。

第7章 会務

- 第35条 総務担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 会員の入退会に関すること。
 - 会則等制度、規則に関すること。
 - 総会、評議員会、および理事会に関すること。
 - 役員および評議員の選挙に関すること。
 - 事務所との連絡。
 - 研究会等関連事業全般にわたること。
 - 関係委員会に関すること。
 - その他、他の理事担当事項に入らない事項。
- 第36条 会計担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 予算、決算に関すること。
 - 旅費の算出。
 - Mutation Research等英文誌購入、配布に関すること。
 - 関係委員会に関すること。
- 第37条 広報担当理事の担当事項は次の通りとする。
- インターネット「ホームページ」の開設等広報に関すること。
 - 各種団体との連絡調整に関すること。
 - 学会誌の広告に関すること。
 - 名簿の作成、配布に関すること。
 - 会員数の増強に関すること。
 - 関係委員会に関すること。
- 第38条 国際協力担当理事の担当事項は次の通りとする。

- 国際環境変異原学会連合および国際会議事務局との連絡に関すること。
 - 関係委員会に関すること。
- 第39条 企画担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 公開シンポジウムの企画、開催に関すること。
 - 本会の事業全般の企画に関すること。
 - 関係委員会に関すること。
- 第40条 編集担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 学会誌等の企画、編集、出版および配布に関すること。
 - 著作権に関すること。
 - 関係委員会に関すること。
- 第41条 表彰人事担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 学会賞およびMutation Research Awardの公募、審査、選考、推薦に関すること。
 - 名誉会員の選考、その他表彰に関すること。
 - 関係委員会に関すること。
- 第42条 書記担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 理事会の議事を記録し、会長および理事の承認後、公表すること。

第8章 会計

- 第43条 本会の会計年度は1月1日に始まり、12月31日に終わる。
- 第44条 本会の経費は、本会会費、各種補助金、寄付金、事業に伴う収入、財産から生ずる収入等をもって充てる。
- 第45条 収支の予算および決算は、評議員会および総会の承認を得なければならない。

付則

- 本会則は平成12年1月1日より施行する。
- 正会員、学生会員、賛助会員、および購読会員の会費は、それぞれ年額7,000円、5,000円、50,000円、および10,000円とする。ただし、Mutation Research等の英文誌の配布を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

日本環境変異原学会細則

(平成11年5月27日承認)

間は1期と計算しない。

第1章 総則

- 第1条 日本環境変異原学会細則(以下細則という)は日本環境変異原学会会則(以下会則といふ)の目的を遂行するために必要な細目を定める。
- 第2条 細則の改廃制定は理事会で審議・議決し、評議員会の承認を得るものとする。

第2章 選挙

- 第3条 会則に基づく選挙に関する事務は、会則第26条によって決められた選挙管理委員会委員(総務担当理事を含む)4名が行う。開票には当該委員3名以上と監事1名以上が立ち会う。
- 第4条 まず評議員の選挙を行い、30名を選出し、新評議員によって原則として先ず理事を選出し、次に監事を選出する。
- 第5条 会長、理事、監事には会則第24、25条により就任任期数に制限があるが、任期途中に、やむをえず辞任したり、補充就任した場合、その期

第3章 評議員の選出

- 第6条 評議員の選挙に関する事務は選挙管理委員会が行う。
- 第7条 選挙管理委員会は選挙人(正会員)名簿および被選挙人(正会員)名簿を作成し、公表しなければならない。
- 第8条 投票は、被選挙人の中から6名、または6名以下を連記し、無記名小封筒に入れ、さらに記名した封筒で郵送することによって行う。
- 第9条 当選は得票数順に30名とし、得票同数のときは選挙管理委員による抽選により決定する。
- 第10条 当選者はやむをえない理由のある場合、選挙管理委員会宛にその旨を書面に付して提出し、辞退することができる。辞退の申し出は告示を受けてから1週間以内にしなければならない。
- 第11条 当選者が辞退した場合は次点者を繰り上げて当選とする。
- 第12条 選挙で選出された評議員の定数に欠員が生じた

場合には任期途中に補充はしない。ただし、推薦評議員を加えて合計40名未満になったときは、推薦評議員を追加することにより40名以上にする。

第4章 理事の選出

- 第13条 理事の選挙に関する事務は選挙管理委員会が行う。
第14条 投票は、選挙で選出された30名の評議員が、正会員の中から3名連記無記名で行う。
第15条 当選は得票数順に9名とし、得票同数のときは選挙管理委員による抽選により決定する。
第16条 当選者が辞退した場合は次点者を繰り上げて当選とする。次点者が2名以上のときは選挙管理委員による抽選により決定する。
第17条 理事の定数に欠員が生じた場合には、会長の指名により補充する。

第5章 監事の選出

- 第18条 監事の選挙に関する事務は選挙管理委員会が行う。
第19条 投票は、選挙で選出された30名の評議員が、正会員の中から単記無記名で行う。
第20条 当選は得票数順に2名とし、得票同数のときは選挙管理委員による抽選により決定する。
第21条 当選者が辞退した場合は次点者を繰り上げて当選とする。
第22条 監事の定数に欠員が生じた場合には、評議員による投票により補充する。

第6章 会長の選出

- 第23条 会長は選出された理事9名の互選によって決定するが、原則として、単記無記名の投票によって過半数を得たものが就任する。過半数を得たものがいない場合には上位2名の決選投票を行い、最高得票者が就任する。ただし、上位3名以上が同数の場合は、同数得票者の投票を繰り返し、過半数得票者が出れば決定とするが、過半数を得たものがいない場合には上位2名の決

選投票を行う。

第7章 委員会の運営

- 第24条 委員および委員長は会則第26条によって会長が委嘱する。委員会委員長は委員会を招集、主催する。
第25条 委員長は委員会開催通知を委員全員、会長、総務担当理事、および会計担当理事に送付する。
第26条 委員長は委員会開催に必要な最小の経費を会計担当理事に要求することができるが、その採否は会計担当理事により、本学会の予算の範囲内とする。

第8章 表彰人事委員会の運営

- 第27条 表彰人事担当理事を除いた委員は6名とし、1期毎に半数が入れ替わり、任期は2期4年とする。
第28条 会長は本委員会に出席し、意見を述べることができるが、議決には参加できない。
第29条 学会賞の英文名は学術賞をJEMS Award、研究奨励賞をJEMS Achievement Awardとする。必要に応じ、JEMSのあとに（Japanese Environmental Mutagen Society）、またAwardのあとに（西暦年号）を付すことができる。

第9章 編集委員会の運営

- 第30条 編集委員会委員長は原則として編集担当理事が就任し、編集委員会を招集、主催する。
第31条 編集委員会は委員長および6名の委員より構成される。委員は委員長の意見を参考にし、理事会の承認を得て会長が委嘱する。委員の任期は1期2年とし、原則として連続2期とする。

付 則

1. 本細則は平成12年1月1日より施行する。ただし、第3~6章は新会則に基づき平成11年6月1日より施行する。

日本環境変異原学会

役員名簿(平成13年度)

会長	木苗直秀
理事	
総務担当	能美健彦
	下位香代子
会計担当	若林敬二
広報担当	山添康
国際協力担当	早津彦哉
	長尾美奈子
企画担当	大西克成
編集担当	林真
表彰人事担当	鎌滝哲也
書記担当	宇野芳文

監事	菊川清見
	常磐寛

企画委員	大西克成(委員長) 長尾美奈子 島田弘康 瀧谷徹 布柴達男
------	---

編集委員	林真(委員長) 森田健 鈴木勇司 矢嶋信浩 山田雅巳 赤沼三恵 若田明裕
------	--

表彰人事委員	鎌滝哲也(委員長) 太田敏博 葛西宏 早津彦哉 長尾美奈子 祖父尼俊雄 清水英佑
--------	--

広報委員	山添康(委員長)
------	----------

選舉管理委員	荒木明宏(委員長) 能美健彦 下位香代子 降旗千恵
--------	------------------------------------

評議員名簿(平成12~13年度)

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	大西祐
菊池康基	木苗直秀	川純雄
佐々木有	瀧谷徹	後島康
清水英佑	下位香代子	須藤鎮世
祖父尼俊雄	高橋和彦	田憲穂
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
林川和男	早津彦哉	平山晃久
藤川和男	降旗千恵	森秀樹
宮川誠	望月正隆	矢嶋信浩
森川幸雄	森田健	吉川明裕
山添康	吉川邦衛	(五十音順)

日本環境変異原学会入会申込書

年 月 日

入会手続きのご案内

入会申込書に必要事項をご記入の上、年会費とともに現金書留にて事務局宛てお送り下さい。

年会費 7,000円(正会員)

5,000円(学生会員)

事業年度 (1月1日～12月31日)

(お申し込みについて)

1. 入会申込書に必要事項を楷書でご記入の上、年会費とともに現金書留にて事務局までお送り下さい。
2. 正会員は評議員の推薦を必要とします。推薦者がおられない場合は、事務局にご相談ください。
3. 学生会員は指導教官の推薦と在学証明書を必要とします。翌年の3月31日まで会員として登録されます。
4. 年度末に入会申込みをされる場合で、翌年度から入会希望の場合は、その旨お知らせください。
5. 学会誌は入会後に発行した号からお送りしますが、当該年度で入会前の学会誌をご希望の場合は事務局までご連絡ください。それ以前のバックナンバーは有料になります。
6. 住所変更(学会誌送付先の変更)の際は、会員番号(学会誌等送付する際、宛名ラベルに印刷されています)、氏名、新・旧住所をご記入の上、事務局宛、書面にてご連絡ください。

日本環境変異原学会

〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9
駒込TSビル3F 財團法人 口腔保健協会内
電話 03-3947-8891(代) FAX 03-3947-8341

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
財團法人 口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

日本環境変異原学会 学生会員申込書
[1年間(翌年の3月31日まで)のみ有効です]

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に学生会員として入会いたしたく貴学会員である指導教官の署名および在学証明書
(裏面に添付)を添えて申し込みます。

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

の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。

指導教官

(署名)

日付

印

入会申込書の送付先: 〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル
財団法人日本環境変異原学会事務局
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

環境変異原研究 投稿規定

1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」、「一般論文」、「短報」、および「特別企画(受賞講演)」、「論説」、「資料・情報」などを掲載する。なお、投稿論文の採否は編集委員会の審査により決定する。

「総説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などである。原則として編集委員会より寄稿を依頼する。

「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の原著論文で、それ自身独立して価値ある結論あるいは事実を含むものとする。陰性データも受けける。

「短報」は、新しい技術の紹介や価値あるデータを含む短い報告とする。陰性データも受けける。

「論説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などで、会員からの投稿によるものとする。

「資料・情報」は、環境変異原に関する調査の結果などをまとめたもの、および公開シンポジウム、研究会の要旨などとする。

(Letter to Editor も受けける。)

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

論文原稿の用語は英語または日本語とし、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。ただし規定の頁数を超えることが明らかな場合は、事前に編集委員に相談する。

4. 論文原稿の送付

論文原稿は5部と本誌に綴じ込みの「投稿論文チェックリスト」を、下記に(簡易)書留便または宅配便で送付する。

〒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、事前に文書にて学会長に申し出を行い、許諾を求めるなければならない。

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場合がある。
- 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。

編集委員会からのお願い

「環境変異原研究 Environmental Mutagen Research」への投稿論文の、投稿から印刷までの時間の短縮を目指し、投稿論文の査読を評議員にお願いすることになりました。それに伴い、投稿規定の見直しも行い、今後は年大会での発表と同様に、投稿論文の分野を著者に申告していただき、同一分野を登録していただいている評議員に査読していただくことになります。今回投稿時のチェックリストをお届けしますので、投稿論文と一緒に必ずお送り下さい。

現在7名の編集委員が分担して学会誌、Jems Newsの編集作業を行っていますが、それぞれ自分の仕事を抱えるランティアとして活動しています。そこで、会員の皆様の積極的な雑誌作りへの協力として、年大会で発表されたものを一報でも多く論文にまとめ、本学会誌に投稿していただきますようお願い致します。また、Jems Newsへの投稿、情報、意見、公募等もお願いします。

本誌の将来像に関する議論を進めております。英文誌化の話も出ており、編集委員を中心に検討を始めたところですが、皆様のご意見を是非お聞かせいただきたいと思います。どんな些細なことでも結構ですから、学会誌に関することでコメント、提案等がありましたら、編集委員までE-mailにてお知らせください。編集委員一同

投稿論文チェックリスト

環境変異原研究 執筆規定

1. 用語は日本語または英語とする。
 2. 原稿は原則としてワープロを用いて作成する。
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、別に題名、著者名(フルネーム)、所属機関名ならびに所在地を英文で付ける。
 3. 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。
 4. 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。
 5. 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)。
 6. 数字は算用数字を用い、単位は慣用による省略記号を用いる。
 7. 略語を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略語を括弧内に示す。
 8. 句読点はカンマ(,)およびピリオド(.)とする。
 9. 表、図は本文と別にし、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、説明文(英文)を別紙に添える。
 10. 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する。
 11. 表は上部に一連の番号Table1,2……と英文の表題を記入する(文頭のみ大文字)。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。
 12. 本文中の文献引用は著者名および年号をもつてする。
 13. 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名はChemical Abstractsの記載方法に従う。記載順序は著者氏名(年)題名、雑誌名、巻、頁(單行本の一部引用の場合は著者氏名(年)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)書名、発行所、発行地の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。
- Ames, B. N., J. MaCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 31, 347-364.
- Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. Matter and M. D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In : J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds), Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede (1995) DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, Washington, D. C.
- 藤川和男, 梁 治子, 近藤宗平(1984)ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目されている短期試験法, 環境変異原研究, 6 : 107-113.
- 佐々木正夫(1983)環境変異原と染色体異常, 外村晶(編), 染色体異常, 朝倉書店, 東京, pp. 107-113.
- 松影昭夫(編)(1996)DNA複製、修復と発癌, 羊土社, 東京。

(改訂 2000年12月)

論文ご投稿の際、この用紙に必要事項をご記入のうえ、添付してください。

論文名(日本語) :

(英語) :

窓口著者名:

連絡先(住所)

(TEL)

(FAX)

(E-mail)

分類(該当するものに印をつけてください)

- 突然変異のメカニズム
変異原の検出
環境汚染物質
抗変異原
DNA損傷(付加体)
変異原の代謝
変異原の修飾、発現
試験法の開発、改良
その他()

送付前のチェック項目

- 投稿規定、執筆規定に沿っていますか(特に引用文献)
英文校閲はお済みですか
投稿論文は5部ありますか

2001年国際O-CHA学術会議のお知らせ

主 催：2001年国際O-CHA学術会議組織委員会

共 催：財団法人 国際科学振興財團

日 時：平成13年10月5日(金)～8日(月)

場 所：静岡県コンベンション・アーツセンター(グランシップ)

静岡市池田79-4

内 容：

1 テーマ 「Exploring new possibilities for O-CHA(tea) in the 21st century」

2 分 野

歴史・文化 茶の文化、歴史、民族学など

生 産 育種、栽培、製造、土壤肥料、防除、化学など

効 能 医学、薬学、食品栄養学、生化学など

流通・消費 茶の生産状況、新製品開発、多目的利用、マーケティングなど

3 登録料

2001年5月31日まで 30,000円(学生15,000円)

2001年6月1日以降 35,000円(学生18,000円)

学生の方は、在学証明書を申込書と一緒に提出下さい。

その他詳しくは、ホームページを御覧下さい。また、セカンドサーキュラーを御希望の方は、メールで住所、所属を御連絡下さい。郵送いたします。

問い合わせ先：静岡県農林水産部お茶振興室 2001年国際O-CHA学術会議事務局

〒420-8601 静岡市追手町9-6 TEL: 054-221-2673 FAX: 054-221-2299

E-mail: icos@hq.pref.shizuoka.jp URL <http://www.o-cha.net>

平成13年度茶学術研究助成・顕彰事業課題募集

1. 趣 旨：わが国の伝統飲料である茶の科学並びに保健効果に関する茶学術研究に対し、助成並びに顕彰を行います。
2. 助 成・顕彰対象：(1) 茶学術研究会会員並びに賛助会員、(2) 国内外の研究者及び大学院生・研修者等(ただし、申請時に茶学術研究会に入会を必要とします)、(3) 同一研究者に対する同一課題の助成・顕彰については一回限りとします。
3. 助成金：助成 1件100万円で5件、総額500万円、顕彰 1件30万円で3件程度
4. 応募の方法：助成の申請者は、所定の用紙(茶学術研究助成事業申請書)に、顕彰推薦者は、所定の用紙(茶学術研究顕彰事業候補者推薦書)に必要事項を記載し、申請期間内に、社団法人静岡県茶業会議所宛に直接申し込んで下さい。申請用紙は、ハガキまたはFAXで事務局まで請求願います。インターネット・ホームページでも募集案内を行っておりますので、ご覧下さい。
5. 選 考：茶学術研究助成・顕彰事業実施規定により、選考委員会で審査を行い、採否を決めます。
6. 報 告：助成を受けた研究者は、茶学術研究助成・顕彰事業実施規定により、平成14年3月に開催する茶学術研究会講演会で研究成果を発表し、実績報告書を提出していただきます。顕彰者の表彰は、茶学術研究会総会の場で行います。
7. 申請期間：平成13年6月1日(金)～7月31日(火)(必着)
8. 問合せ先：社団法人静岡県茶業会議所 〒420-0005 静岡市北番町81番地
TEL 054-271-5271 FAX 054-252-0331 <http://www.wbs.ne.jp/bt/chacha/>
9. 注意事項：申請者は必ず所定の用紙(今年度の申請書)を使用して申し込んで下さい。所定の用紙以外は無効となりますのでご注意下さい。

ザルトリウス動物天びん LAシリーズ 新ミレニアム対応の動物天びん

安全性試験(毒性試験)などの実験動物の体重測定に最適!!



■激しい動きに対応

動物の動きに応じた13段階モード設定

■正確ひょう量

作業者の使いやすさを考慮した平均化プログラム

糞や尿などによる誤作動に対応できるスタートプログラム
(8段階)

■GLP/ISO9000対応の出力

■先端技術採用による高信頼性

リプロテスト機能搭載

フルオート機能搭載

トレーサブル校正対応のマルチキャリブレーション

■マウスからビーグル犬まで対応

■水・ほこりに強い(防塵防水度IP54)

型式	ひょう量	読み取限度	用 途	価 格	出荷時証明書価格
LA2200S+AP	2,200g	0.01g	マウス用	¥298,000	¥17,000
LA4200+AP	4,200g	0.1g	ラット用	¥248,000	¥17,000
LA6200+AP	6,200g	0.1g	ラット用	¥268,000	¥17,000
LA1600S	16kg	0.1g	ラビット用	¥390,000	¥20,000
LA34	34kg	1g	ラビット/ドッグ用	¥330,000	¥20,000
FB64EDE-S	64kg	1g	ドッグ用	¥510,000	¥20,000
IS150IGG-SOCE	150kg	1g	ドッグ用	¥790,000	¥25,000

●簡易動物機能付きLPシリーズ¥185,000~もございます。

*価格には消費税は含まれていません。

sartorius

ザルトリウス株式会社 本社/〒168-0074 東京都杉並区上高井戸1-8-17 第3保谷ビル新館 (03)3329-3366 Fax.(03)3329-2882

大阪/〒532-0004 大阪市淀川区西宮原2-7-38 新大阪西浦ビル (06)6396-6682 Fax.(06)6396-6686

名古屋/〒461-0002 名古屋市東区代官町35-16 第一富士ビル (052)932-5460 Fax.(052)932-5461

福岡/〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-14-25 新幹線ビル2号館 (092)431-2266 Fax.(092)431-2267

仙台/〒980-0824 仙台市青葉区支倉町4-40-404 (022)223-0191 Fax.(022)223-0373



オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に! より手頃な価格に!

特 徴

- エームステスト用と染色体異常試験用の2種類の試薬セットです。
- コファクターが無菌凍結品になり、解凍後S-9と混合するだけで使用できます。
- S-9とコファクターは実用的な分注量比ですから、混合が容易です。
- S-9とコファクターは未混合ですから、混合条件を変更しての試験が可能です。
また、保存中にS-9とコファクターの未知の反応が起りません。
- 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 单 位	備 考
エームステスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml × 10本	エームステストでのデータ を添付します
	コファクターA 9ml × 10本	
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 2ml × 3本	染色体異常試験でのデータ を添付します
	コファクターC 4.7ml × 3本	

(保存は-80℃でお願い致します)

- エームステスト用コファクターA(注文量100ml以上)および染色体異常試験用コファクターC(注文量30ml以上)の単品注文もお受け致します。

- 従来品は引き続き取扱いしております。

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

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

製造元

 **オリエンタル酵母工業株式会社**

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

保存

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

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

活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

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

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

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

* Salmonella typhimurium

エームス試験用凍結S-9MIX

特長

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

●包装単位：10ml × 8本、5ml × 4本

染色体異常試験用凍結S-9MIX

特長

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

●包装単位：3.5ml × 3本

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

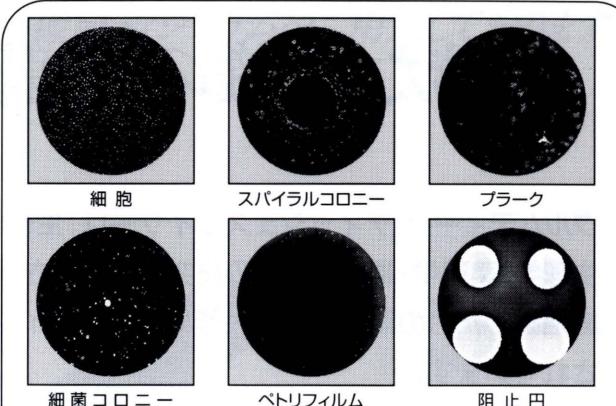
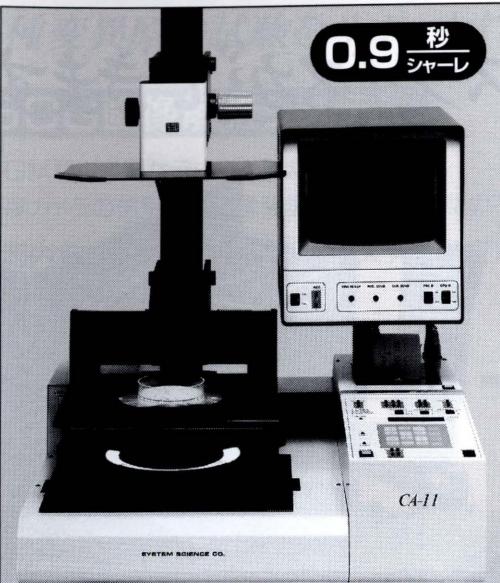


家田貿易株式会社

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

高速画像積算機能を持つCA-11D コロニー アナライザー

GLP、GMP、HACCP対応



- 食品コロニー
- 大腸菌コロニー
- 抗菌コロニー
- エームステスト
- フードスタンプ
- 水コロニー
- レジオネラ菌コロニー
- 細胞コロニー

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

- 混釀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

コンパクト一体型で低価格

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)を押すだけです。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シャレ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)

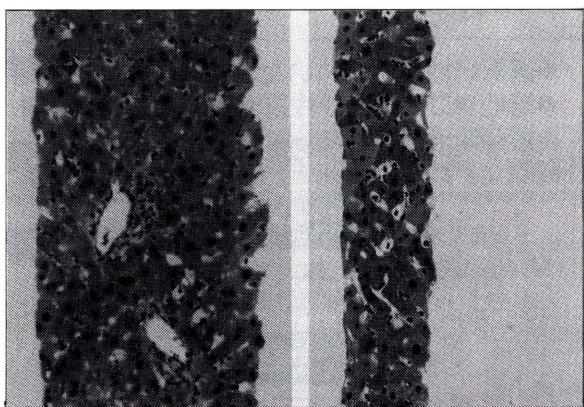
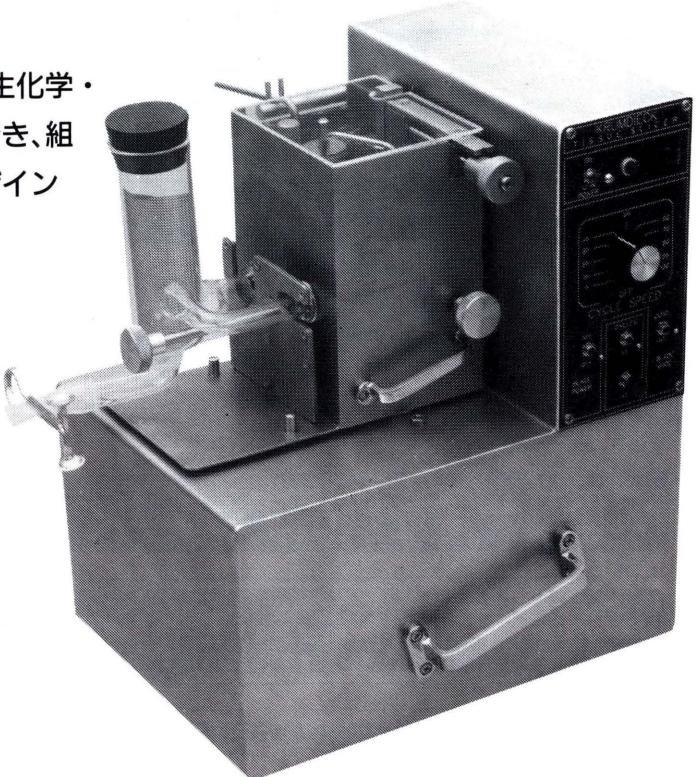
URL:<http://www.ssc-bios.co.jp> E-mail:info@ssc-bios.co.jp

THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

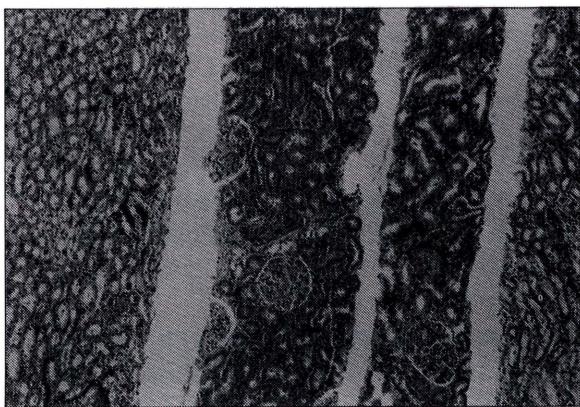
生きた組織の無菌スライスができます。

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

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



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

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



販売元
ショーシンEM株式会社

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

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。

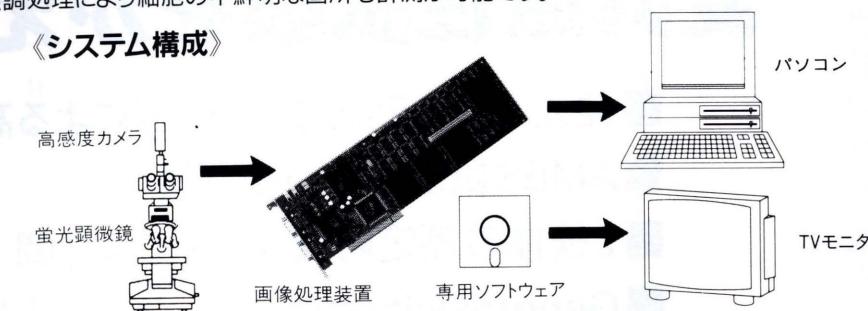
SCG画像解析システム

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》



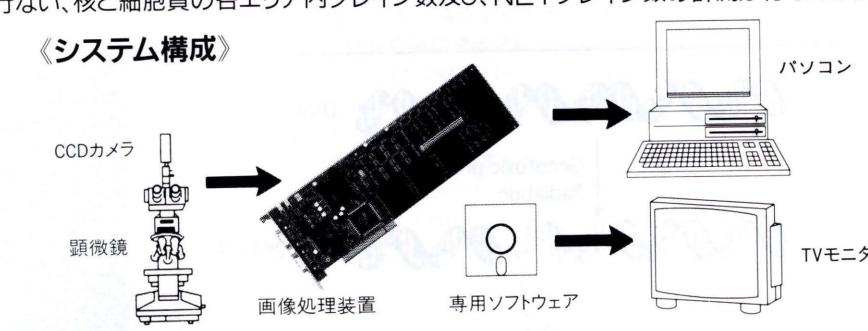
UDS画像解析システム

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》



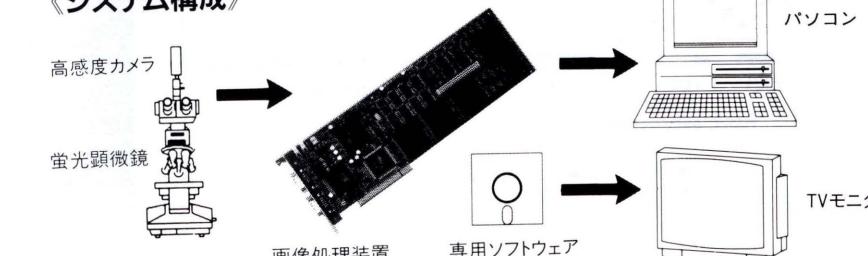
小核画像解析システム

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!

開発製造元

ImageTech®

 **ケイオ一電子工業株式会社**

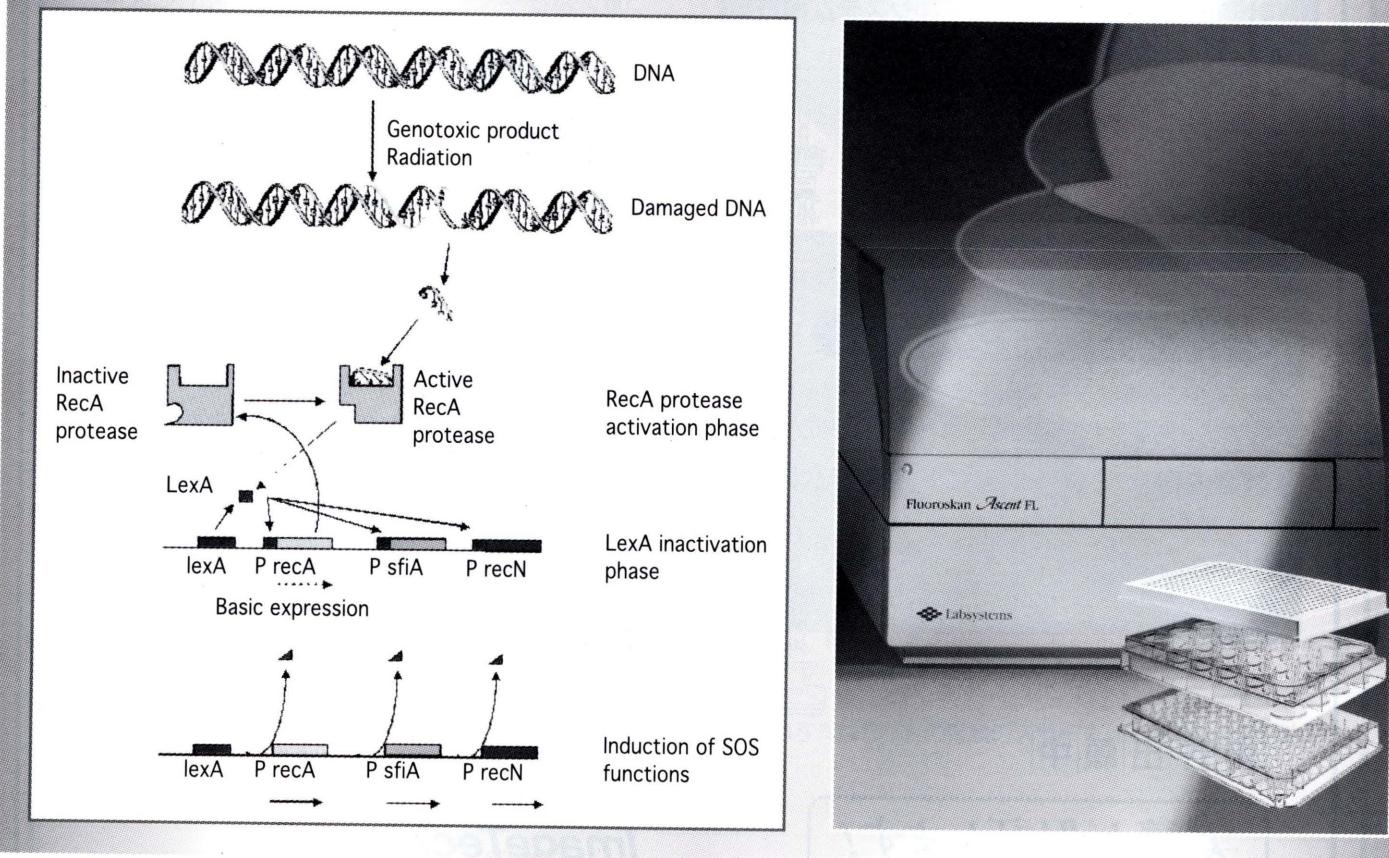
本社 〒567-0828 大阪府茨木市舟木町5番12号
TEL.0726-34-1022 FAX.0726-34-1018
東京支店 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目13番3号 MYビル2F
TEL.03-5251-4355 FAX.03-5251-4420

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

Vitotox™

変異原性試験をかえます！

- 発光カイネティックアッセイによる高感度
- AMES試験と高い相関性
- 2検体の測定時間はわずか4時間
- GenotoxicityとCytotoxicityを同時に測定
- 測定および結果判定は全自动
- わずか1mgの検体量



P 大日本製薬株式会社
ラボラトリー プロダクト部

〒564-0053 大阪府吹田市江の木町33番94号
TEL (06) 6386-2164 (代表) FAX (06) 6337-1606
〒110-0001 東京都台東区谷中3丁目25番6号
TEL (03) 5685-7205 (代表) FAX (03) 3828-6547
ホームページアドレス <http://www.dainippon-pharm.co.jp/labopro/>
学術的問い合わせ
TEL (06) 6386-2184 FAX (06) 6337-1606

編集後記

日本環境変異原学会の事業の中で、環境変異原研究の発行が最も経費がかかりますが、学会の活性化を図るには必要不可欠なものです。しかしながら、学会発表演題数が毎年150題ほどあるにも拘わらず投稿論文数は寂しい限りです。編集委員が会員に論文投稿をお願いして集めているのが現状です。今回、上記のような事情で発刊が遅れてしまいました。会員の先生方には、変異原研究の活性化に積極的に参加することをお願い申し上げます。

担当編集委員 鈴木 勇司

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

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・スミスクライン株式会社 築波研究所
Tel : 0298-64-5532 Fax : 0298-64-8558
E-mail : tm28417@glaxowellcome.co.uk

矢嶋 信浩 (1999-)
〒485-0059 小牧市小棟3-45
雪印ラビオ株式会社 開発研究所
Tel : 0568-77-3235 Fax : 0568-76-1046
E-mail : n-yajima@snowlabio.com

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
(財)残留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

若田 明裕 (2001-)
〒174-8511 東京都板橋区小豆沢1-1-8
山之内製薬株式会社 安全性研究所
Tel : 03-5916-2177 Fax : 03-3960-5141
E-mail : wakata@yamanouchi.co.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	瀧谷 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23巻 第1号 2001年

平成13年6月23日 印刷
平成13年6月30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

Inhibitory effects of herbal teas and herb extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid upon treatment with nitrite in the presence of ethanol

.....Minoru Higashimoto, Yoshinobu Akada, Masao Sato, Yoshihide Yamada, Tomomi Kuwahara and

Yoshinari Ohnishi 1

第29回大会受賞講演

学術賞

変異原研究領域におけるレギュラトリーサイエンスの確立祖父尼俊雄 9

研究奨励賞

がん抑制遺伝子p53の組換え修復を介した遺伝的安定化機構本間正充 15

大腸菌の活性酸素防御応答と突然変異誘発機構に関する研究布柴達男 23

第29回大会シンポジウム

I. レスポンダーとノンレスポンダー；遺伝的多型と環境変異原研究

薬物代謝酵素の遺伝的多型の変異原活性化における意義

.....鎌滝哲也, 藤田健一, 串田浩孝, 梅津有理, 宮本昌美, 有吉範高 33

II. 今, 私の考える環境変異原研究とは; 21世紀に向けて佐々木 有, 祖父尼俊雄 39

付録

Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM) 45
Guidance on a Strategy for Testing of Chemicals for Mutagenicity

付 記

日本環境変異原学会 会則

細則

平成13年度 役員名簿

12~13年度 評議員名簿

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