

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol. 3 No. 1 1981

環境変異原研究

第9回研究発表会特集

1981 ■ Vol.3 ■ No.1

目次

パネル：Amesテストの技術をめぐる諸問題

はじめに	松島泰次郎	1
Ames テスト培地作製における問題点	清水 英佑	3
Ames テストにおける指示菌の培養条件に関する検討	大川 秀郎, 鈴木 裕, 岸田 文雄, 宮本 純之	7
実験に影響する要因とその対策	坂本 豊	11
Ames テストの問題点	長尾美奈子	15
おわりに	松島泰次郎	19

特別講演

発癌性物質代謝機能の動物種差, 細胞種差および個人差
——組織培養によるアプローチ

黒木登志夫	21
-------	----

受賞者のことば

昭和55年学会奨励賞を受賞して	石館 基	27
日本環境変異原学会奨励賞受賞のことば	常盤 寛	28

トピックス：変異原活性を抑制する因子

変異原活性を抑制する因子	賀田 恒夫	29	
だ液が発がん物質を失活する	西岡 一	33	
腸管内細菌による 1-nitropyrene の変異原性の低下	大西克成, 木内武美, 脇坂和見	41	
変異原物質の Ames テストでの陽性を陰性に変える 2,3 の因子	——ヘミンおよび不飽和脂肪酸の場合	早津 彦哉	45

実験ノート

「せっかつ Ames 法」について	有元佐賀恵, 根岸和雄, 早津彦哉	51
-------------------	-------------------	----

お知らせ 京都サテライトシンポジウムについて	西岡 一	53
------------------------	------	----

編集後記		54
------	--	----

突 洞 異 変 異 集

果 林 会 誌 突 洞 回 9 第

1981 ■ Vol.3 ■ No.1

実 目

Amesテストの技術をめぐる諸問題

1	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
5	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
7	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
11	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
15	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
19	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題

実 目

Amesテストの技術をめぐる諸問題

23	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
27	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
31	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題

Amesテストの技術をめぐる諸問題

35	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
39	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
43	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
47	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
51	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題

Amesテストの技術をめぐる諸問題

55	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
59	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
63	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
67	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
71	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題

実 目

Amesテストの技術をめぐる諸問題

75	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
79	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
83	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
87	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題
91	田代 幸司	Amesテストの技術をめぐる諸問題

実 目

パネル

Amesテストの技術をめぐる諸問題

	1978	1979	1980	1981
Amesテスト	100	100	100	100
Amesテスト	100	100	100	100
Amesテスト	100	100	100	100
Amesテスト	100	100	100	100

Amesテストの技術をめぐる諸問題

Amesテストの技術をめぐる諸問題

Amesテストの技術をめぐる諸問題

Amesテストの技術をめぐる諸問題

Amesテストの技術をめぐる諸問題

Amesテストの技術をめぐる諸問題

はじめに

我々の生活環境中に存在する変異・癌原性物質の第一次スクリーニング法としてサルモネラ菌を用いる変異原性テストが広く一般に用いられている。最近の3年間の環境変異原学会での発表のうちでサルモネラ菌を用いた研究の数は年々増加している。研究発表の総数も年々増加しているがそのうちの約50%がサルモネラ菌を用いている(表1)。

表1. サルモネラテストを用いた研究発表

	1978		1979		1980	
変異原学会	26 66	39%	39 80	49%	54 105	51%
EMS			43 178	24%	58 211	27%
EEMS	13 68	19%	42 165	25%	47 167	28%

下段の数字は研究発表総数, 上段の数字はサルモネラ菌を用いた研究発表総数

アメリカの変異原学会(EMS)やヨーロッパの変異原学会(EEMS)ではその割合はやゝ低いのが約20~30%がサルモネラ菌を用いている。このサルモネラ菌変異原性テストは世界中で広く利用されていることがわかる。

この方法が広く利用されているのは、この方法の操作が簡単であること、特別の装置を必要としないこと、短期間で多数の試料をスクリーニング出来ること、動物実験に比べると費用がはるかに廉価であること、等の利点があるためである。更に既知の発癌物質をこのテスト法で調べると大部分のものが変異原性を示したことから、逆に変異原性を示した物質には高い確率

松島 泰次郎* (東京大学・医科学研究所)

で癌原性を予測出来るとされたことにもよる。サルモネラ変異原性テストは100%完全な方法ではないが現在用いられている短期検索法のなかでは再現性も良く信頼性の高いスクリーニング法として優れている方法である。誰にでも簡単に出来るがこの方法の適用限界を知って簡便性を生かして用いる必要がある。細胞毒性の強い物質には適していない。このような場合には従来の方法でテスト菌株をテスト物質で処理したあと遠沈でテスト物質を菌株から除き、突然変異誘発と生存菌数を調べることによって変異原性を調べると良い。このサルモネラ菌プレート法の簡便性を生かして再現性良くテストを実施する為には結果をばらつかせる原因を知って技術的に克服しておく必要がある。

このような結果をふれさせる要因について実例をあげて説明して頂ぐが、テスト菌株の保存方法、テスト菌株の前培養の条件、方法と培養時間、培地の組成と量、培地の滅菌方法などが考えられる。最近アミノ酸やアミン類と糖類が共存すると褐変反応で変異原物質が生成する場合があります、その反応が温度によって促進されることが明らかになって来た。滅菌の条件を一定に保つことが重要である。また蛋白質、アミノ酸、糖質の加熱分解で変異原物質が生じ、beef extracts のなかに変異原物質が含まれていることが報告されている。肉エキスの作製方法によって変異原物質が含まれているので lot 毎の品質管理が購入に当って重要になってくることなどもほんの一例に過ぎない。テスト方法の基本的条件を常に一定に保つ努力が結果の再現性のために

* 〒108 東京都港区白金台4-6-1

重要である。方法が簡便だからと云って安易にテストを実施することはさけない。

サルモネラ菌に変異原性を示したことは、S9 mix で代謝を受けた中間物質を含めてDNAに損傷を与える生物活性物質であることには間違いはない。然しサルモネラ菌の変異原物質が総て哺乳動物の変異原物質あるいは癌原性物質とは限らない。一般に化学物質は動物に摂取されたときに、その物質の吸収、代謝、活性化、不活性化、解毒、排泄等の生体内での物質の動態を考える必要がある。サルモネラ菌に変異原性

を示しその変異原性が強い場合には要注意物質として慎重に取扱う必要がある。サルモネラ菌が一番早く簡単に化学物質の毒性を調べることが出来るので、その結果が間違いのないものである様にテスト方法の精度を保つ努力が必要である。

テストの結果を左右するものに代謝活性化系 S9 mix が重要であるが、これだけでも充分な時間が必要であり、前にも一度とりあげられているので今回はこの問題にはふれない。

Ames テスト用培地作成における問題点

清水英佑* (慈惠医大・公衆衛生学教室)

〔方 法〕

1. 用いた菌株 — *S. typhimurium*
TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA*

(東大医科研・松島教授より分与)

2. 培地作成
- 1) Agar, Glucose, Vogel - Bonner 最少培地 E (10 倍濃度) (VB-E) の 3 成分の混合方法の違いによる培地作成 (最少寒天平板培地 1 ℓ 作成の場合)
- ① Agar (15 g / 700 ml H₂O)
 - ② Glucose (20 g / 100 ml H₂O)
 - ③ VB-E (10 倍原液 100 ml + 100 ml H₂O)

表 1. 培地の影響

S. typhimurium TA98		I	II	III	IV	V
Autoclaved with	Agar	+	+	+		
	Glucose	+	+		+	
	Vogel-Bonner-E	+		+	+	
- S-9 Mix	DMSO	K	28	K	K	23
	AF-2 0.05µg	K	147	K	K	196
+ S-9 Mix	DMSO	91	46	34	67	28
	B(a)P 5 µg	556	835	792	171	755

S.typhimurium TA100

- S-9 Mix	DMSO	470	239	149	K	144
	AF-2 0.01µg	641	371	295	K	327
+ S-9 Mix	DMSO	518	216	186	223	167
	B(a)P 5 µg	1145	1340	751	271	905

E.coli WP2 uvrA

- S-9 Mix	DMSO	44	32	28	25	39
	AF-2 0.01µg	86	152	110	78	112
+ S-9 Mix	DMSO	46	43	37	40	47
	2AA 5 µg	755	505	580	357	464

* 〒105 東京都港区西新橋3-25-8

通常①②③の各成分を別々に三角フラスコにとり高圧蒸気滅菌した後60℃程度まで冷却後、混合するが、表1上段に示すようにI～Vの組合せ方法で混合し、高圧蒸気滅菌後シャーレに30mlずつ分注しテストに用いた。2成分混合の場合、他の1成分は別に滅菌しておいて後で加えた。

2) Agar, Glucose, VB-Eの3成分を同時に高圧蒸気滅菌し、その2, 4, 6, 10, 20, 30 mlを通常の方法で作成した培地と等量置換した際の±S-9 mixでのHis⁺数を数えた。

3) ①②③の3成分別々に高圧蒸気滅菌した後、滅菌直後の約100℃、更に80℃及び通常の60℃まで下げて混合したプレートを各々作成し、このプレートを用いて陽性対照物質であるBenzo(a)pyrene (BP), AF-2, 2-Amino-anthracene (2AA)についてHis⁺数を数えた。

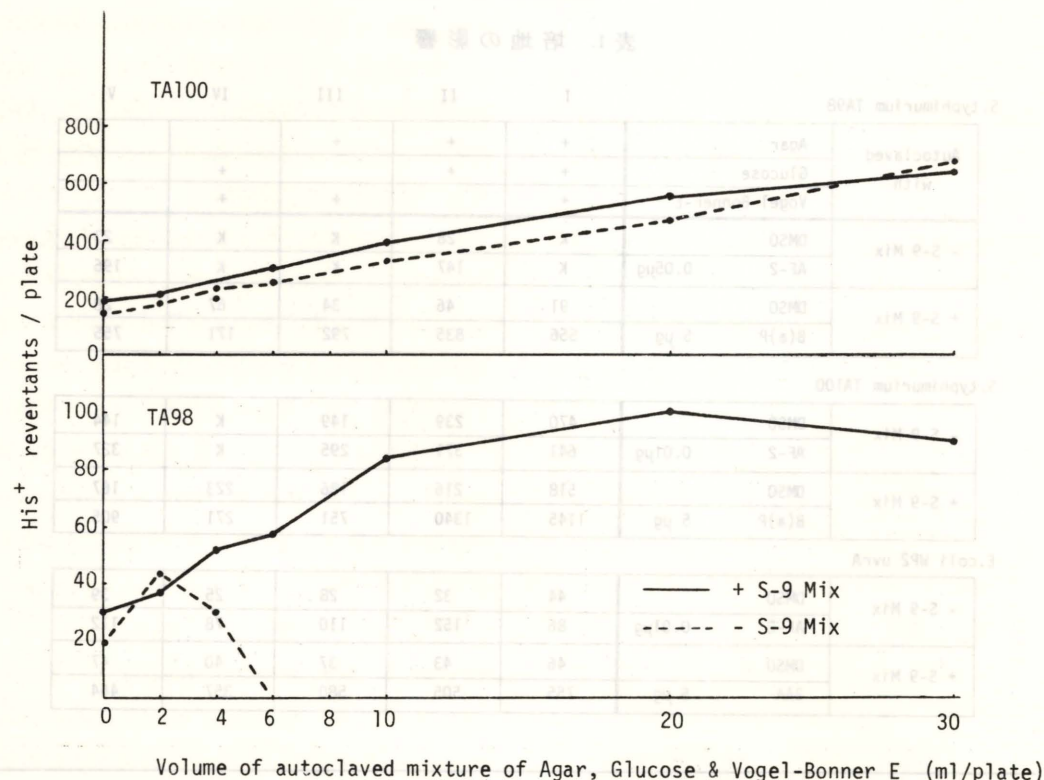
3) Mutation test - 労働省のガイドライン¹⁾に基づきプレート法にて行った。

〔結果〕

Agar, Glucose, VB-Eの3成分を種々組合わせて高圧蒸気滅菌して作成したプレートを用いてS. typhimurium TA98, TA100, E. coli WP2uvrAの3菌株で溶媒対照及び陽性対照について±S-9 mixで調べた結果を表1に示した。

TA98, -S-9 mixでは、I, III, IVでkillingが生じたが、AgarとGlucoseの混合では変化がない。一方、+S-9 mixでは、Iの溶媒対照であるDMSOで増加と、BPの若干の減少がみられる。特にIVでBPの減少が著明である。

図1. 高圧蒸気滅菌の影響



TA100, -S-9 mixでは、IのDMSO, AF-2ともに増加がみられるがIVでkillingとなっている。+S-9 mixでは、IのDMSOが増加し、BPも増加している。IVはTA98の時と同様にBPの著減がみられる。しかし菌の発育阻止はいずれにも認められていない。

E. coli では、Iの+S-9 mixで2AAの増加、IVで若干の減少がみられた。しかし溶媒対照値は±S-9 mixで著変がない。

次に30 mlの最少寒天平板培地を作成する際に、その一部分を、Agar, Glucose, VB-Eの3成分混合滅菌したもの、即ち表1のIの培地を通常の方法で作成した培地と等量だけ置換して作成した培地にsoft agarを播き、そのHis⁺をみた。これは高圧蒸気滅菌して生成された物質に量反応関係があるかどうかをみたもので図1に結果を示した。TA98では-S-9 mixで2 mlをピークに4 mlではすでにkillingが認められた。

+S-9 mixでは加える量が多くなるにつれてHis⁺も増加し20 mlでピークとなる。TA100では±S-9 mixとも同じ位に増加がみられる。

図2は100℃、80℃及び通常の60℃で3成分を混合した際、BP, AF-2はどのように影響を

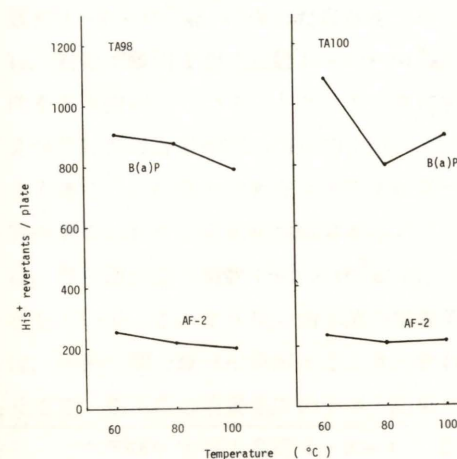
受けるかをみたものである。TA98では高い温度で混合して作成したプレートでHis⁺の減少がみられる。AF-2は22%, BPは13%の減少を示した。TA100でもAF-2は約13%減, BPは17%の減少を示した。

〔考察〕

Ames testを実施するにあたって準備する最少寒天平板培地は、Agar, Glucose, Vogel-Bonner E (VB-E)を高圧蒸気滅菌して作成するが、3成分を混合して滅菌すると着色し好ましくないといわれる。しかし変異原性テストへの影響は明確でなかった。今回の結果から3成分同時に混合し高圧蒸気滅菌するとkillingや溶媒対照値の増加がみられたり、或いは別々に滅菌した場合、温度が高い状態で混合すると陽性対照値が低くなることがわかった。両者の違いは、121℃、20分の高圧滅菌と約100℃での混合による反応の違いによるものと思われる。従って3成分別々に滅菌後60℃まで冷却してから混合することが重要である。又、最近自動培地滅菌器が市販されているが、その使用にあたっては、3成分の混合方法、時期、温度等に十分注意する必要がある。

近年、動物性食品²⁾や植物性食品^{3,4)}等の加熱分解物に、突然変異原性物質が生ずることが報告されているが、今回の結果はグルコースの加熱分解によるものと思われる。特にVB-Eとの混合物は、高圧蒸気滅菌状態でアルカリ側になるため反応が強く進むものと考えられる。一般的にグルコースを加熱分解するとフルフラール誘導体が生成され着色(カラメル化)するが、黄色化は5-hydroxymethylfurfuralであるという。さらに分解物としてoxymethyl-furfural, dioxyacetone, methylglyoxal, levulinic acid, gluconic acid, glucuronic acid, lactic acid, formic acidなどがある。⁵⁾ Furfural及び5-hydroxymethylfurfural

図2. 培地成分混合の温度の影響



ともにTA98, TA100で変異原性は認められなかったが, Weinsteinら⁶⁾はfurfuralがTA100で陽性になると報告している。しかし両物質以外に変異原性に関与する物質があるように考えられ, 現在液体クロマトグラフィーを用いて原因物質を追求中である。

文 献

- 1) 微生物を用いる変異原性試験ガイドブック—がん原性のスクリーニング手法として—, 労働省安全衛生部化学物質調査課編, 中央労働災害防止協会 昭和55年
- 2) Nagao, M., Sugimura, T. and Matsushima, T.: Environmental Mutagens and Carcinogens. Ann. Rev. Genet. 12, 117-159, 1978.
- 3) Yoshida, D., Matsumoto, T., Yoshimura, R. and Matsuzaki, T.: Mutagenicity of Amino- α -carbolines in pyrolysis products of Soybean globulin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 83, 915-920, 1978.
- 4) 清水英佑, 永山和之, 鈴木孝之, 竹村 望 野菜としょう油の加熱分解物の突然変異原性, 日本衛生学雑誌 35, 774-781, 1980
- 5) 不破龍登代, 幸保文治, 竹中英雄, 金庭延慶, 最新薬剤学(第2改稿版), p138, 1976
- 6) Weinstein, D., Mauer, I. and Solomon, H. M.: Effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes. In vivo and in vitro studies. Mut. Res. 16, 391-399, 1972.

Ames テストにおける指示菌の培養条件に関する検討

大川秀郎*, 鈴木 裕
岸田文雄, 宮本純之(住友化学・農業研究部)

1. はじめに

Ames テストに関しては, 既に, 多くの詳細な試験法の解説が発表されており, また, これまでに問題となった試験条件に関するいくつかの改良提案もなされている。しかし, それにもかかわらず, 定められた試験法に従って行った試験結果に大きな偏差が認められ, 再現性に問題があり, 研究所間での変異体出現数にも大きな変動が認められている。^{1~3)}このような事柄は, Ames テストの結果の判定を曖昧にし, 定量化をさわめて困難にしている。Ames テストの再現性に関する要因としては, 指示菌の調製・保存, S-9・S-9 mixの調製, 試料・試薬・溶媒の調製, さらに, プレートに加える試薬・溶媒の量, プレート作製などにおける僅かな相違などが考えられる。この内, 指示菌の調製条件のちがいはきわめて重要な要因であると考えられる。指示菌の培養条件については, Ames⁴⁾らの原法で, 37℃振盪培養(最大16時間)した菌を用いることを提唱しており, その後, deSerresとShelby⁵⁾は振盪培養で生菌数が $1 \sim 2 \times 10^9/ml$ に達した条件を, 長尾ら⁶⁾は, 対数増殖期後期で菌数 $1 \sim 2 \times 10^9/ml$ の条件を各々提唱している。また, その他に植えかえ培養した対数増殖期の指示菌を用いている場合もある²⁾。我国の労働安全衛生法に基づく有害性調査のための変異原性試験ガイドブックでは, 静止期初期で菌数 $1 \sim 2 \times 10^9/ml$ の条件を提示している。このように, 指示菌の培養条件には, 研究所間で幾分相違があるように思われる。そこで, 指示菌の培養条件のテスト結果に及ぼ

す影響について検討した。

2. 方 法

変異原としては, 次の5種の化合物を用いた; 1,1,1-trichloropropylene-2,3-oxide (TCPO), β -propiolactone (β PL), N-(trichloromethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide (Captan), 2-nitrofluorene (NF), methyl methanesulfonate (MMS)。指示菌としては, *S. typhimurium* TA100株を用い, 37℃で振盪培養(140往復/分)し, 7時間目から16時間目までの菌液を0.1 ml用いて, プレインキューベーション法⁷⁾により変異原性試験を行った。生菌数の測定は菌液を希釈後, ヒスチジンを含む最少栄養培地プレートにまき, コロニー出現数から計数した。また, テスト化合物の安定性は, 各化合物を0.5 Mリン酸緩衝液, pH 7.4, に加えて37℃でインキュベートしたのち, 指示菌TA100を加えて, 変異体出現数を測定することにより求めた。

3. 結 果

3-1. 指示菌培養時間と変異体出現数

TA100株を37℃で培養すると, 菌数は9時間まで対数的増加(対数増殖期)を示し, 9-16時間では一定値を示した(定常期)。なお, 菌数は9時間目で $1.5 \times 10^9/ml$ に達した。このような条件下で7-16時間培養した指示菌を用いて, 5種の化合物の変異原性試験を行った。結果を図1に示す。TCPO, β PL, Captan による変異体出現数は, 7-9時間の対数増殖期

* 〒665 宝塚市高司4-2-1 住友化学工業(株)・生物科学研究所

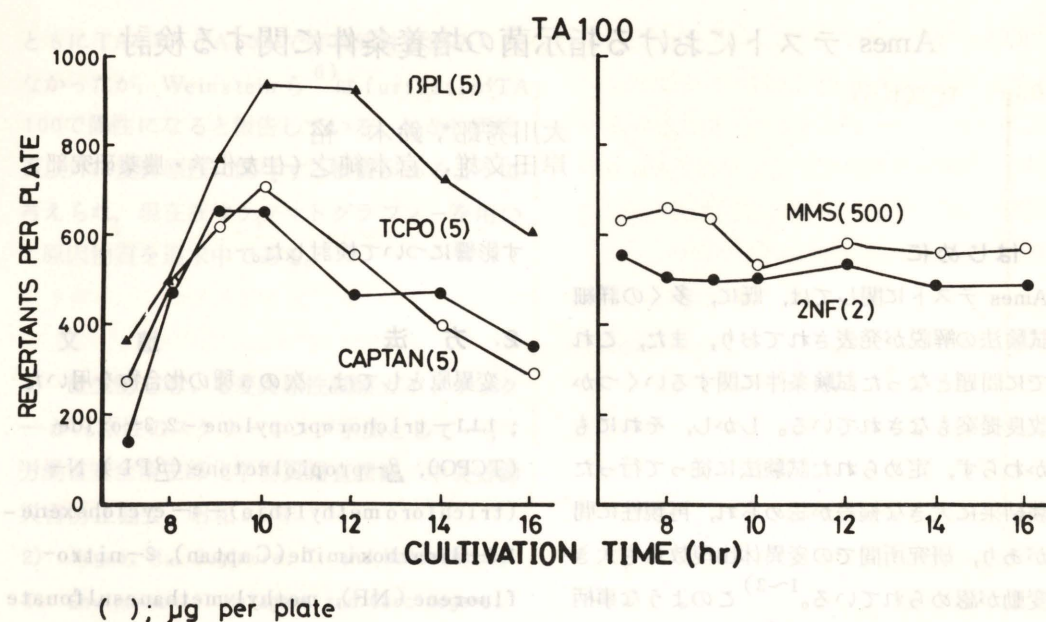


図1. 指示菌 TA100 の培養時間ごとに変異体出現数を測定した。

対照値 ; 139~149 変異体出現数 / プレート

では菌数の増加と共に増大し、9-10時間で最大値に達し、その後は、培養時間が長くなるにつれて減少した。これらの化合物では、指示菌の培養時間7-16時間で変異体出現数に4-10倍の変動が認められ、菌数が $1 \times 10^9/ml$ 以上である培養8-16時間でも2-4倍の変動幅が見られた。一方、NF, MMSによる変異体出現数は指示菌の培養時間にかかわらず、ほぼ一定であった。このように、TCPO, β PL, Captanは、NF, MMSと異なり指示菌の培養条件により変異体出現数に著しい変動を示すことが明らかとなり、再現性あるデータを得るためには、最適条件の選定が必要であることを示唆している。

3-2. 生菌数と変異体出現数

上記の5種の化合物を用いて、指示菌の培養時間ごとに、プレインキュベーション後の生菌数と変異体出現数を測定した。その結果を図2に示す。TCPOは、 β PLやCaptanも同様で

あるが、プレインキュベーション後の生菌数に比例して、変異体出現数が増加し、9-10時間培養菌で最大値を示した。それに対して、NFは、MMSも同様であるが、生菌数にかかわらず一定の変異体出現数を示した。プレインキュベーション後の生菌数はいずれの場合においても、対数増殖期には培養時間とともに増加するが、定常期においては培養時間が長くなるにつれて減少が見られた。定常期における生菌数の減少は、恐らく、培養時間の長くなるのとは異なる菌の生活力が低下し、プレインキュベーション中に供試化合物の殺菌効果が強く発現することによると考えられる。これらのことから、TCPOなどでは変異体出現数が指示菌の生理状態や菌数のわずかな相違により著しく変動することが明らかとなった。

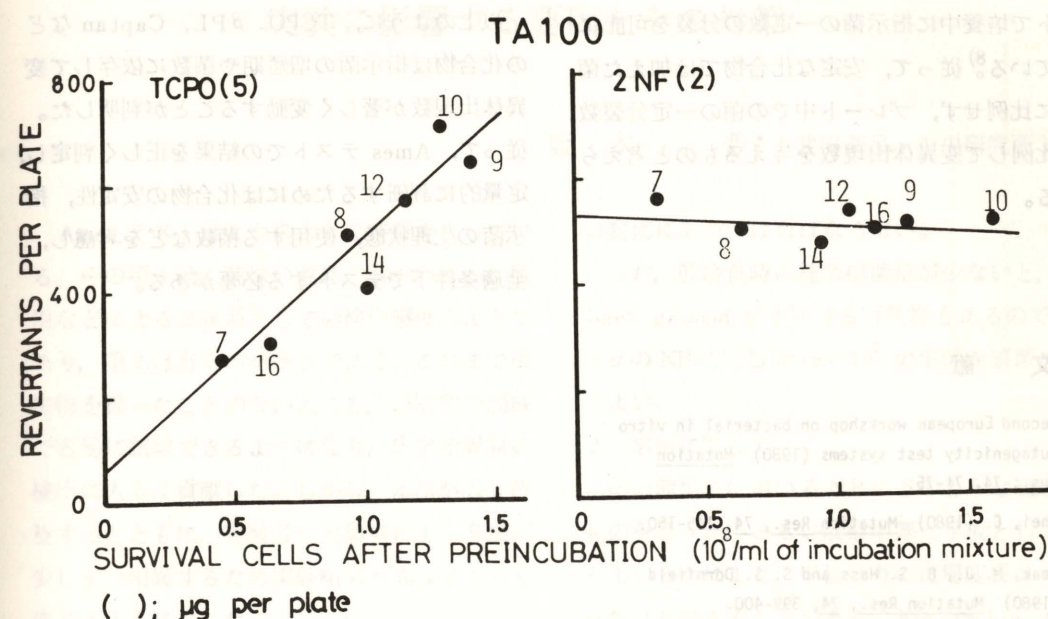


図2. 指示菌 TA100 の培養時間ごとにプレインキュベーション後の生菌数と変異体出現数を測定した。

(図中の数字は指示菌の培養時間を示す。)

3-3. 化合物の安定性

5種の化合物のプレインキュベーション条件下での安定性をテストした(図3)。 β PL, Captan, TCPOはいずれも不安定で短時間内に不活性化され、半減期は各々、20, ~22, 66分であった。これに比べて、MMS, NFは比較的安定であり、半減期は各々、~5, ~13時間であった。このことから、 β PL, Captan, TCPOはプレインキュベーション期間に指示菌に作用するが、その間に大部分が分解されてしまうために、プレート上での指示菌への作用は僅かであると考えられる。このため、これら不安定な化合物の変異体出現数はプレインキュベーション後の生菌数に依存していると推測される。それに対して、MMS, NFは比較的安定であり、プレインキュベーション中、プレート中共に指示菌に作用すると考えられる。Amesテストに用いるプレート培地は半栄養培地であり、プレ

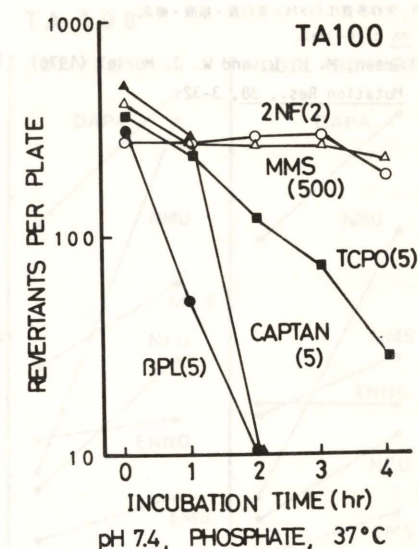


図3. 各化合物の安定性をTA100を用いたプレインキュベーション法による変異体出現数を指標として経時的に測定した。
(0.5 M リン酸緩衝液, pH7.4, 37°C)
() ; μg / プレート

実験に影響する要因とその対策

坂 本 豊* (武田薬品・中央研究所)

ートで培養中に指示菌の一定数の分裂を可能にしている⁸⁾。従って、安定な化合物では加えた菌数に比例せず、プレート中での菌の一定分裂数に比例して変異体出現数を与えるものと考えられる。

文 献

¹⁾ Second European workshop on bacterial in vitro mutagenicity test systems (1980) *Mutation Res.*, **74**, 71-75.

²⁾ Chei, C. (1980) *Mutation Res.*, **74**, 145-150.

³⁾ Peak, M. J., B. S. Hass and S. S. Dornfield (1980) *Mutation Res.*, **74**, 399-400.

⁴⁾ Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) *Mutation Res.*, **31**, 347-364.

⁵⁾ deSerres, F. J. and M. D. Shelby (1979) *Science*, **203**, 563-565.

⁶⁾ 長尾美奈子, 杉村隆 (1979) 「癌の科学」第2巻 p61-75, 南江堂

⁷⁾ 矢作多貴江 (1975) 蛋白質・核酸・酵素, **20**, 1178-1182.

⁸⁾ Green, M. H. L. and W. J. Muriel (1976) *Mutation Res.*, **38**, 3-32.

以上のように, TCPO, β PL, Captan などの化合物は指示菌の増殖期や菌数に依存して変異体出現数が著しく変動することが判明した。従って, Ames テストでの結果を正しく判定し, 定量的に評価するためには化合物の安定性, 指示菌の生理状態, 使用する菌数などを考慮し, 至適条件下でテストする必要がある。

Ames テストは2つの大きな特徴をもっている。その第1は, 菌株の改良, S-9 mix の使用などによる試験系としての検出感度のよさであり, 第2は方法の簡便さである。これまで微生物を扱ったことのない人でも, 短期間の訓練で容易に試験できるようになり, 化学変異原の検出に大きく貢献した。しかし, 本法が広く普及するとともに, 実験者や実験室により方法が少しずつ相異なるため実験結果が異なることも生じるようになった。

そこで, ルーチン試験を対象に, 実験毎のデータのふれを小さくするためにはどうしたらよいかについて, 微生物を扱う上でのごく基本的な問題に限定して話題を提供する。

1. 菌株に関して

入手先, 保存方法, 定期的な特性検査について十分考慮することが必要である。保存菌株の性状が定期的なチェックで文献記載の性状と合わなくなれば, 新たに original strains (TA シリーズのネズミチフス菌なら Dr. Ames から) をもらい直すべきである。

保存方法としては, nutrient broth (以下 NB と略す) に 8% の DMSO を添加した培地で, -80°C 以下に凍結保存するのが, 菌の死滅も特性の変化も少ない。我々の実験室では, 新鮮な種菌菌液を 1 回の実験使用量ずつ数十本の小管に分注して凍結保存している。保存性だけに限れば, 長期保存には L-乾燥 (NB に 1.5% のグルタミン酸ソーダを添加した培地で凍結させずに真空乾燥する) や短期には stab に穿刺培養後密栓して保存する方法もあるが, 特性

の変化に気をつけねばならない。

なお, 前培養時の種菌植菌量が少なく, back ground が上昇する可能性もあるので, 5 ml の NB に対し $2\sim 5 \times 10^7$ の生菌を植菌するとよい。

2. 培地に関して

菌の前培養に用いる NB にどのような組成のものを使うか, あるいは最小寒天平板として何を用いるかにより, 平板当りの復帰変異コロニー数は変動することがある。Fig. 1~Fig. 4 に我々の実験室でのデータを示した。図の横軸には前培養に用いる NB の違いを示した。

Fig 1

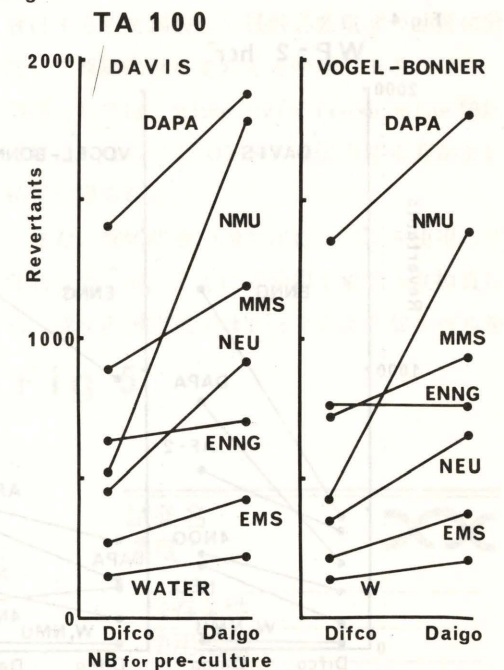


Fig 2

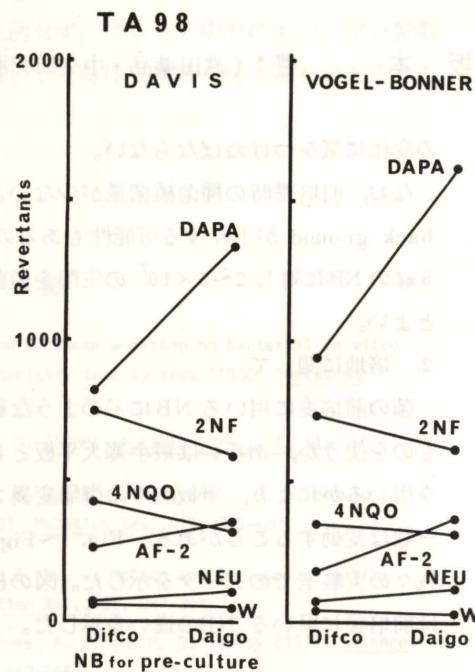


Fig 3

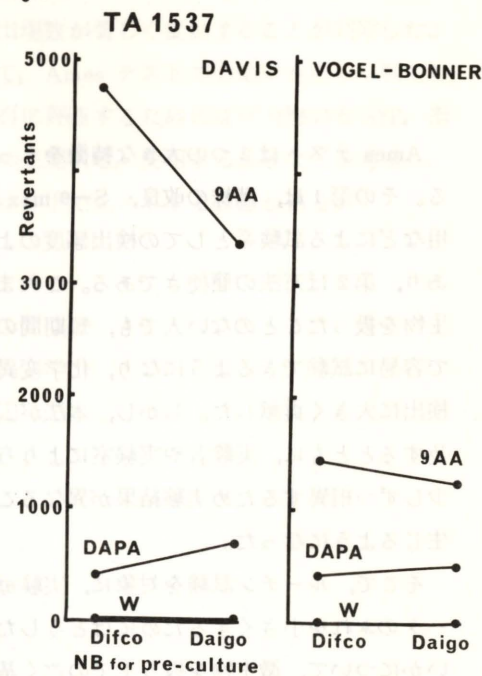
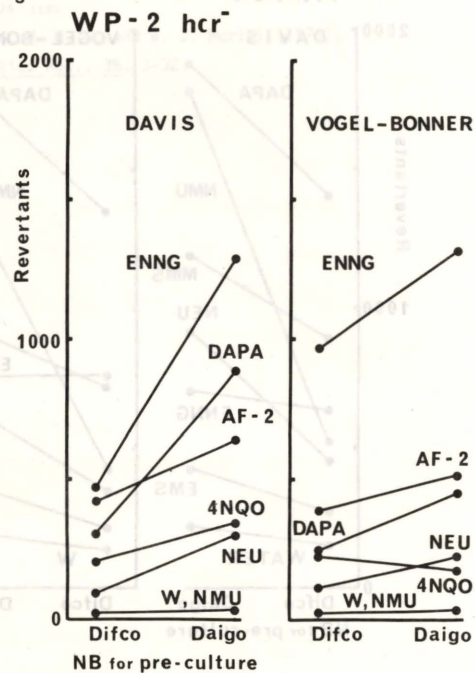


Fig 4



図・1～図4の説明

菌の前培養に用いる nutrient broth (NB) および最小寒天平板培地の違いによる復帰変異コロニー数の変化 (詳細は本文参照)。

用いた変異原の名称と平板当りの濃度は以下の通りである。

- 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride (10 μ g)
 AF-2: Furfurylformide (0.02 μ g)
 DAPA: Sodium p-dimethylaminobenzene diazosulfonate (25 μ g)
 EMS: Ethylmethanesulfonate (1000 μ g)
 ENNG: N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (2 μ g)
 MMS: Methylmethanesulfonate (200 μ g)
 NEU: Nitrosoethylurea (90 μ g)
 2NF: 2-Nitrofluorene (5 μ g)
 NMU: Nitrosomethylurea (20 μ g)
 4NQO: 4-Nitroquinoline-1-oxide (0.2 μ g)

Difcoの粉末培地を使用した場合と、大五栄養製のポリペプトンと酵母エキスを自家調合したNB (Table 1参照)を使用した場合に、変異原により誘発された復帰変異コロニー数が、DifcoのNBよりDaigoのNBが高いもの

Table 1 Ingredients of Nutrient Broth

DIFCO		DAIGO	
Bacto-Peptone	5 g	Polypeptone	10 g
Bacto-Beef ext.	3 g	Yeast extract	2 g
NaCl	5 g	NaCl	2 g
Water	1000 ml	Water	1000 ml
pH 7.2		pH 7.2	

(DAPAやNMUなど)、逆にDaigoの方が低くなるもの(9AAなど)があった。また、同じ変異原でも菌株によって異なる結果を示す場合がある。例えば、DaigoのNBでTA100株を前培養した場合にはメチル化剤がより強い作用を示し、WP 2 hcr⁻株を同じ培地で前培養したときには、逆にエチル化剤がより高い値を示した。

次に、各図の左右は、最小寒天平板培地を変法Davis培地(標準処方からクエン酸を抜き、食塩を1g/l添加したもの)とVogel-Bonner培地(以下VB培地と略す)とで復帰変異コロニー数を比較したものである。両者の間に大きな差は見られない場合も多いが、TA1537株を指示菌とした場合に、前培養NBのいかんにかかわらず、9AAの作用はDavis培地の方がVB培地より強かった。また、WP 2 hcr⁻株においては、DifcoのNBとVB培地の組合せでENNGの作用が強く、DaigoのNBとDavis培地との組合せではDAPAの作用が強くあらわれた。

この他にも、最小寒天平板培地のグルコース

量を変化させたり、半栄養条件としてアミノ酸の単独添加か、2.5%のNB添加かによっても平板上のコロニー数や形態が変動することを経験している。また、培地の違いは、S-9 mix添加の有無によってもTA 98株など一部の菌株の場合に大きな影響を示す。

従って、ルーチン試験では、培地の組成や調製方法は標準方法に従い、常に一定になるように心掛けて、他の実験室のデータと比較しうるようにすることが重要である。標準方法としては労安法のガイドブック(1980年10月)が参考になる。

3. 検体、陽性対照溶液の調製に関して

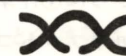
化合物によっては紫外線や白色光により変化する可能性があり、これの防止には黄色蛍光灯照明下での作業が好ましい。

陽性対照は試験毎に設定することが望ましいが、毎回調製すると秤量の誤差や取扱い上の危険性も増すと考えられる。陽性対照化合物の溶液はまとめて調製し、試験必要量ずつ小管に分注して凍結保存しておくことと便利である。なお、溶媒としては、dimethylnitrosoamine類以外には、なるべくDMSOを使用する方がよい結果が得られる。

また、検体溶液の識別にはラベルを使用して混同を防ぐが、とくに変異原(癌原)性物質には、我々の研究室ではFig. 5のようなラベルを

Fig 5

試薬名
濃度



保存条件
使用期限
調製日

用いている。黄色地に赤褐色のマーク(染色体の切断を示す)を印刷し、目立つようにしたものである。

4. 培養条件に関して

フラン器内の温度は平板の出し入れ毎に変動する。我々の研究室で使用している大型フラン器(容積500ℓ, ヒーター800W, ファンなし)について温度を測定した結果は次の通りである。約150枚の平板を庫内に入れた直後には34℃と3℃も低下し、36.5℃まで回復するのに約10時間かかり、2日間の培養中には扉の開閉をしなかったのに37℃まで戻らなかった。また、小型のフラン器では平板収納後の温度の低下のみならず、庫内上部が38℃以上にオーバーヒートし、復帰変異コロニー数の増加原因となった経験もある。従って、フラン器は温度制御の優れた、ファン付のものが望ましい。平板の出し入れも、まとめてカゴに入れて行うなど、扉の開閉を可能なかぎり少なく、かつ短時間にして、庫内温度を常に37℃に保つ工夫が必要になる。

なお、変異原の中には気化しやすいものもあり、他の平板あるいは実験者への影響も無視できない場合も考えられる。その対策としてデシケータに入れて培養したり、換気装置付フラン器の使用を考慮すべきであろう。

5. 実験手順書の整備

ヒトはとりちがえ、思いちがい、転記ミス、計算ミスなど、意外にミスを犯しやすい。その対策として、他研究室と比較可能な標準の実験方法の実施を基本にすることは当然であるが、さらに①作業に関する適切なマニュアルや実験毎のプロトコルの作成とその確実な実施、また、②準備を含む実験中のすべての記録をその場で書き込める複数のワークシートの使用や、本人以外による二重チェックなどのシステムを作ることが効果的である。その他、ミス防止対策の1つとして、平板の識別のためには皿の側

面に記号を記入すると、フタがはずれた場合にも混同を防げる。また、陽性対照や溶媒対照平板でのコロニー数を継続的に記録しグラフ化することも、実験中に気づかなかったミスの発見や、使用試薬の変化など実験条件の変化を発見するのに役立つ利点もある。

Ames テストの問題点

長 尾 美奈子* (国立がんセンター研究所)

Ames テストを、発癌物質検出のための短期テスト法として実用化できるか否かを、我々の研究室で検討を加えはじめてからすでに8年の歳月が流れた。しかし我々が現在なお遭遇している困難な多くの問題は、恐らく多くの他の研究室でも当然問題になっていることであろうと思われる。それらのうち、特にテストの結果の評価についての問題提起をしてみよう。

環境中の未知癌原物質を検出するには Ames テストはきわめて優れた方法であるということには異存は無いであろう。低廉性、再現性、簡便性などの点で多くの利点のある方法である。事実我々の研究室でもこれまでにアミノ酸の加熱分解物や焼魚から、新しい変異原物質を分離精製し、構造決定を行った。また大量にそれら変異原物質を合成し、動物実験によりあるものは癌原性を確認している。またジーゼルエンジンの排気ガスやゼロックス用カーボンには強い変異原物質が存在し、そのうちのあるものはニトロピレンであることも Ames テストによって推定あるいは固定されたものである。1-ニトロピレンは皮下注射により肉腫を作ることとも証明された。しかし植物界に広く存在するフラボノール類は Ames テストで中等度の変異原物質であるばかりでなく、培養哺乳動物細胞の姉妹染色分体交換¹⁾、突然変異²⁾、トランスホメーション³⁾を起す。しかしかなり組織的に、いろいろな動物、いろいろな投与量を用いて発癌実験を行ったが、少なくとも日本の研究結果では癌原性は現在のところ認められていない。

このような事実をふまえて、Ames テストの有用性とその限界を明らかにして置く必要がある。

労働安全規準法でサルモネラテストが採用されると、化学薬品がサルモネラテストで(+)か(-)かという事が当然問題となって来る。何をもって(+)とするかは、dose-response の有無と自然突然変異の何倍以上の突然変異コロニーが誘導されたかということが判定規準になる。

dose-response については問題ないが、何倍以上を(+)とするかについては議論の多いところである。

『第二回欧州バクテリアの in vitro 突然変異テストの会議』で、理論的根拠はないが2倍とするのが経験的に良さそうだということになっている。しかしこれは何ら mutagenic とか nonmutagenic の境界を意味するものではないと記載されている。⁴⁾ (+)および(-)の境界をどこに置くかという事は世界的に問題になっていることでもあるので、論文を国際雑誌に投稿した時に、例えば境界を2倍にしたとすると、“その根拠は何か”という comment がついて来ることを経験された人も多いと思う。また突然変異誘発率が2倍以上で、dose-response がみられるものを(+)としたとしても、テスト毎に(+)と(-)の間をさまよう様な物質も当然あるはずである。

次に Ames テストが(+)であることの意味について考えてみよう。Ames テストの結果と癌原性との相関関係は85~90%であることを McCann⁵⁾、杉村ら⁶⁾ および Purchase ら⁷⁾ がこれまで述べて来ている。筆者もこれまでいか

* 〒104 東京都中央区築地5-1-1

に相関関係が良いかを述べて来たが、こゝでもう少しこの相関関係の意味するものを解析してみよう。

相関関係と一言で云ってもその意味するものは複雑である。sensitivity (変異原物質/癌原物質), specificity (変異原物質/非癌原物質), accuracy (変異原性を示す癌原物質+変異原性を示さない非癌原物質/癌原物質+非癌原物質) で表わすと相関性の内容がはっきり理解できる^{7,8)} また short-term テストの目的から云って重要なのは、short-term テストで(+)に出るものゝうち、癌原物質と予測されるものゝ占める割合、すなわち predictive value である。Predictive value は、sensitivity および specificity によってきまる値であると同時に、テストサンプル中にどの位癌原物質があるかによって変動する値である。85~95% の sensitivity を示す McCann ら、杉村ら、および Purchase らのテストはサンプル中の癌原物質の占める割合が 50~65% の範囲内で行なわれている。これらのテストでの predictive value は 86~93% である。したがってサルモネラテスト(+)のものはほぼ癌原性ありとみて良いと云える。

しかし我々の環境中には一体どの位の癌原物質が存在しているのだろうか。仮に癌原物質の占める割合を 5% と仮定してみよう。Specificity および sensitivity が 90% であるとしてその predictive value を計算してみると 32% ということになる。したがってサルモネラテストが陽性という結果をみて、直ぐ癌原物質であると考えるのがいかに早計であることが容易に理解されよう。環境中の癌原物質の占める割合が多ければ、predictive value も高くなる。図-1 に sensitivity および specificity が 90% の時、サンプル中の癌原物質の占める割合と predictive value と

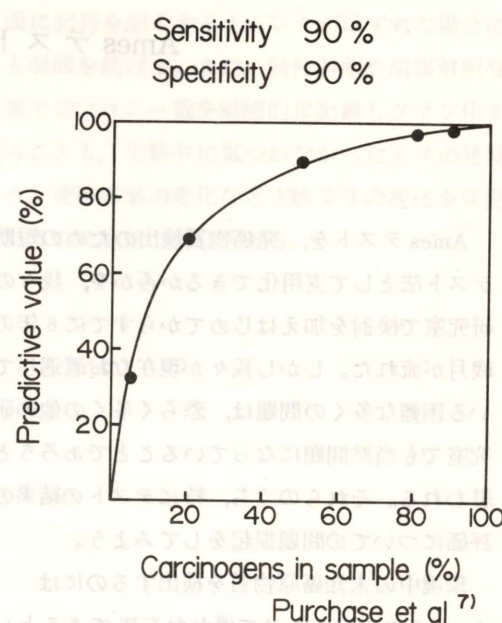


図1. Ames テストによる癌原性予測の的中率

の関係を示す。したがってサルモネラテストの有効性は環境中にどの位癌原物質が存在するか依存していることになる。例えば化学工業の中間産物は反応性に豊んでいるであろうし、DNA-アルキル化剤も多く含まれていることであろうと考えられる。それらの中には癌原物質も多く含まれているであろうと推定されるが、その場合にはAmesテストで癌原性を予測することはかなり有効な手段と考えられる。

ところでサルモネラテストの sensitivity および specificity は各々 50~200 位の癌原性のわかっている化合物について調べた結果であるが、テストに選ばれた化合物がどのような性質をもったものがどの位含まれているかによってもかなり異なった値を与える。例えばハロゲン化合物のようなものを多く含んでいる場合はその sensitivity は低くなるであろうし、アルキル化剤など芳香族炭化素を多く含んでいれば高くなるであろう⁹⁾ 米国 National Institute of Environmental Health Sciences,

イギリス Medical Research Council, およびイギリス Imperial Chemical Industry 主催で 1977 年~1979 年に亘って行われた 42 の化合物に関するブラインドテストの結果、およびわが国の厚生省の大型プロジェクトで 5 年間に亘って 186 の検体をテストした結果はいずれも sensitivity 67% および 66% という低い成績であった。specificity も低く 83% および 70% であった¹⁰⁾ 以上の事は、各研究室で物質を選ぶ場合、比較的性质のはっきりしたもの、即ちニトロソ化合物、芳香族炭化水素、芳香族アミンやアルキル化剤が選ばれる。一方テストする人と化学物質を選ぶ人が異なると、比較的性质の余りははっきりしないものとか、癌原性があるにもかかわらずサルモネラテスト(-)のため問題になっている物質が選ばれる傾向がある。その結果生じた差であろうと思われる。

食品中の癌原物質がヒトの癌の主な原因と考えられているが、その食品中の癌原物質は一体どのようなタイプのものが多いのであろうか。アルキル化剤が多ければ sensitivity, specificity は 100% 近くなるであろうし、有機ハロゲン化合物やホルモン様物質やサフロールのような物質が多いとすれば sensitivity はきわめて低いものになるであろう。どういうタイプの癌原物質が食品中に多いのかを知るには動物実験によるしかないという自己撞着におちいる。日常食品例えば焼魚、ハンバーグ、野菜、緑茶、コーヒー、アルコール飲料等に変異原物質が含まれているのは事実であるが、これらはたして癌原物質であるか否かは、動物実験の結果を待つより他はない。

サルモネラテストは、未知変異原物質の検出、分離、それらの代謝、変異原性を増加あるいは阻止する物質の発見等基礎的研究にはきわめて秀れた手法であることは間違いないが、テストの結果からすぐに癌原性を予測するというよう

な Ames テストばかりでなく、short-term テストの過大評価は、その過小評価と共に差しひかえるべきである。

文 献

- 1) Yoshida, M. A., Sasaki, M., Sugimura, K. and Kawachi, T. (1980) Proc. Jpn. Acad. 56B: 443-447.
- 2) Amacher, D. E., Paillet, S. C., Turner, G. N., Ray, V. A. and Salsburg, D. S. (1980) Mutation Res. 72: 447-479, N. Nakayasu, personal communication.
- 3) Umezawa, K., Matsushima, T., Sugimura, T., Hirakawa, T., Tanaka, M., Katoh, Y. and Takayama, S. (1977) Toxicol. Lett. 1: 175-178.
- 4) Seiler, J. P., Mattern, I. E., Gree, MHL. and Anderson, D. (1980) Mutation Res. 74: 71-75.
- 5) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B. N. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 5135-5139.
- 6) Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M. and Kawachi, T. (1976) In "Fundamentals in Cancer Prevention" Baltimore, Univ. Park Press pp. 191-215.
- 7) Purchase, I. F. M., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J. A., Anderson, D., Lefevre, P. A., Westwood, F. R. (1978) Brit. J. Cancer 37: 873-903.
- 8) Kretzer, H., Habs, M. and Schmähl, D. (1979) Toxicology 14: 283-289.
- 9) Rinkus, S. J. and Legator, M. S. (1979) Cancer Res. 39: 3289-3318.
- 10) Nagao, M. (1980) 代謝 17: 1301-1309.

お わ り に

松 島 泰次郎* (東京大学・医科学研究所)

サルモネラ菌によるスクリーニングで化学物質の安全性を判定する一助にするためには、一定の基礎条件を保って再現性の良い条件下でテストが実施されている必要がある。また一般に化学物質をスクリーニングした場合には大部分の物質は陰性で極くわずかの物質が変異原性を示すに過ぎない。大部分の物質が少くともサルモネラ菌の陰性であると判定出来るためには、テスト菌株の特性を保持したサルモネラ菌を用いて適当な濃度範囲、濃度限界、濃度間隙で充分なテストが実施されている必要がある。

また潜在性癌原物質が極くわずかな割合でしか存在しないときには、短期検索法で癌原性を予測するためにはテスト方法の精度を高める必要がある。菌株の改良やS9mixの改善を含めてテスト方法の精度を向上させる努力を常に進めて行く必要がある。

発癌性物質代謝活性化能の動物種差, 細胞腫差および個人差

——組織培養法によるアプローチ

黒 木 登志夫*

(東京大学・医科学研究所・癌細胞学研究部)

IARCモノグラフについて

本来、この特別講演はWHO国際癌研究機関(IARC)のMontesano博士によって行なわれる予定であった。しかし、同博士が都合によって来日できなかったため、私がピンチヒッターとして友情出演することになったのである。

Montesano博士にお願いしたテーマは、「化学物質のヒトの発癌に対するリスク評価」という大きな、しかも今回のもっとも重要な問題であった。

IARCでは1972年以来、「IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans」というシリーズを年三回発行し、現在22巻に達した。1979年までに発行された20巻のモノグラフに記載された442の化学物質の検索の結果が、最近まとめられたが、¹⁾それによると、18の化学物質がヒトに対して明らかに発癌性をもつと判定された。Montesano博士は、このプログラムに最初から参加し、Tomatis博士とともに、それを推進した人である。彼は、もし来日できれば、IARCではどのような観点から、またどのようにしてヒトに対する発癌性を検索しているのか、そのためにはどのようなデータが評価されるべきか、さらにヒトの発癌における化学物質の意義などについて講演するはずであった。私は、1975年から78年までの三年間このプログラムに関係し、特に突然変異のデータについて評価を担当していた。しかし、

IARCモノグラフについては、その概略を紹介することはできても、その評価、意義などは私の荷に重すぎる。そのため、現在私たちの研究室ですすめられている表記のテーマについて講演することにした訳である。

ヒトの細胞における発癌剤代謝活性化

発癌性物質の代謝活性化は、化学発癌の最初の、しかもその結果を支配する重要なステップである。発癌性化学物質にさらされた細胞あるいは動物が発癌するか否かは、この代謝活性化によって最初決定される。活性化がおこらないか、あるいは、活性化/不活化のバランスが傾けば癌化は起らないであろう。化学物質による発癌に標的臓器があり、ある臓器に癌を作っても、他にはできない事実、さらに、ある種の動物に癌ができやすいことなども代謝活性化の差からかなりの程度説明できる。特に重要なのは、ヒトと動物の間のちがいである。動物実験で得られた成績をそのままヒトにあてはめてもよいのか、あるいは両者の間に深いギャップがあるのであろうか。この間に答えるための基礎的データはまだ得られていないのが現状である。このためには、ヒトの材料を用いた綿密な研究があらゆる角度から行はなければならない。組織培養法はヒトの材料を扱うための優れた方法である。ヒトの各臓器から細胞を分離培養し、それによって得られたデータを、動物のそれと比較することにより、両者の間のギャップは少しづ

つ埋められていくことであろう。

現在までに、いくつかのヒトの細胞によって、発癌性物質の代謝活性化が調べられている。表1に示したように、血球などの間質系細胞あるいは組織片が多く、分離培養された上皮細胞としては、ここに報告する表皮角化細胞のみである。いずれの細胞も、程度の差こそあれ、代謝活性化能をもつ。これらのほとんどの実験で発癌性物質としてbenzo[a]pyrene (BP) が用いられているが、それはBPが環境発癌物質として重要な位置を占めていること、およびその代謝経路の詳細が明らかにされており、それらを化学的に解析する手段が確立しているためである。

Cell type	References
Epithelial cells	
Epidermal keratinocytes*	2, 3
Mesenchymal cells	
Dermal fibroblasts	4, 5
Embryonal fibroblasts	6
Amnion cells	7
Blood cells and macrophages	
Peripheral lymphocytes*	8, 9
Peripheral monocytes*	10
Alveolar macrophages	11
Tissues or mixture of cells	
Embryo cultures	12
Colon*	13
Lung*	14
Bronchus*	15
Tumor cells	
Hepatoma	16, 17
Kidney tumor	18

* Individual difference of metabolic activity was observed.

表1. 化学発癌物質の代謝活性能の証明されたヒト細胞

ヒトおよびマウス皮膚細胞のBP代謝能

われわれは、ヒト皮膚より分離培養した表皮角化細胞と真皮線維芽細胞のBP代謝能の検討

をすすめている²⁾。ヒト皮膚は形成外科より皮膚移植に用いた残りを入手した。喜多野(阪大皮膚科)の方法にしたがい、4℃トリプシン処理後、表皮と真皮をピンセットで剥離し、前者から角化細胞、後者から線維芽細胞の培養を得た。BP代謝の指標としては、BPから3-hydroxy-BP産生測定によるaryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性、高速液体クロマト(HPLC)による中間代謝体、特に7,8-diol-BPの分離、細胞経由法による共培養したV79チャイニーズハムスター細胞の突然変異誘発を用いた。さらに、マウスからも同様の方法によって表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を分離し、両者のBP代謝能を測定、ヒトのデータとの比較を行なった。その結果、次に述べるように、BP代謝能に関して、個人差、細胞種差、動物種差の存在することが明らかになった。

1. 個人差：ヒト表皮角化細胞のBP代謝能は、培養によって大きく異なる。これは培養の由来した個人個人の間の差によるものと思われる。例えば、AHH活性値は、誘導しない場合、ほとんどの人が2-4 pmoles/mg protein/hourの値を示すが、13 μM benz[a]anthracene (BA)で24時間誘導した後の値は8~194と、個人によって大きく異なる。(図1)

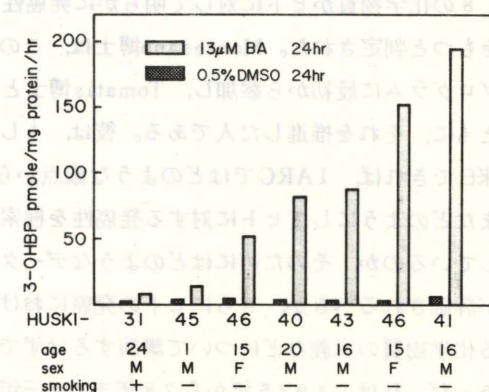


図1. AHH活性の個人差。各個人の性、年齢、喫煙習慣の有無は下段に示した。(未発表成績)

同様に、BPの総代謝量(TLCによって測定)、HPLCによる中間代謝体分析、V79細胞の突然変異誘発のいずれをとっても、個人個人でそれらの値は大きく異なった。これに対して、真皮線維芽細胞のAHH活性は、非誘導のときは0.9~1.9, BAによって誘導したとは4.7~8.4の範囲に入り個人間のバラツキは比較的少なかった。今後さらに例数を増やして解析する必要がある。

2. 細胞種差：表皮角化細胞とV79細胞をBPの存在下で共培養すると、BPは、表皮角化細胞によって代謝活性化されV79細胞は突然変異(ウアバイン耐性)する。突然変異率はBPの濃度(2~10 μM)とともに上昇した。しかし、真皮線維芽細胞とV79細胞を同じ条件下で共培養した場合、V79細胞の突然変異は起らなかった。(図2)このような差は、個人差に由来するものではない。6例の症例から得られた表皮角化細胞と真皮線維芽細胞のセットで、例外なしにこの現象が認められた。このような突然変異に関する細胞種差は、BP代謝のうちで9,10位オキシドの形成の差に由来することがHPLC分析の結果示唆された。すなわち、真皮線維芽細胞はBPを7,8-ダイオールまで代謝することはできるが、それをさらに究極発癌体である7,8-ダイオール-9,10オキシドまで代謝できないため突然変異が起らないと思われる。また、この現象は真皮線維芽細胞にのみ限られた現象ではない。胎児肺より分離されたIMR-90細胞も共培養しているV79細胞にBPによる突然変異を誘発できなかった。

3. 動物種差：上述のような細胞種差はマウス皮膚より表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の間では認められなかった。すなわち、C3Hマウス新生児より、表皮-真皮剥離法の後、フェイコール密度勾配法で分離した真皮線維芽細胞

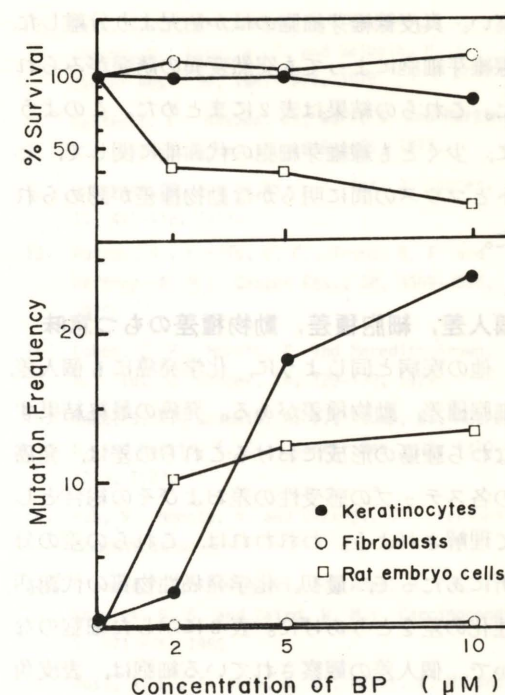


図2 ヒト表皮細胞(●), 真皮線維芽細胞(○), ラット胎児細胞(□)を代謝細胞としたときのBPによるV79細胞の突然変異(下)および細胞毒性(上)の誘導。突然変異は、生存細胞10⁵あたりのウアバイン1mM耐性出現を指標とした。²⁾

Cell types	Humans	Rodents
Epithelial cells		
Epidermal keratinocytes	+	+
Bronchial epithelium	+	N
Mesenchymal cells		
Dermal fibroblasts	-	+
Embryonal fibroblasts	-	+

+ or - : Presence or absence of induction of mutation in co-cultured V79 cells.

N: No reports are available.

*: Hsu et al., PNAS, 75, 2003 (1978).

表2 ヒトおよび啮歯動物由来上皮細胞および線維芽細胞のBP代謝能の比較

は、細胞経由法によって共培養しているV79細胞にBPによる突然変異を誘発した。その程度は、マウスあるいはヒト表皮角化細胞よりも

高い。真皮線維芽細胞のほか胎児より分離した線維芽細胞によっても突然変異の誘発がみられた。これらの結果は表2にまとめた。このように、少くとも線維芽細胞の代謝能に関して、ヒトとマウスの間に明らかな動物種差が認められた。

個人差、細胞種差、動物種差のもつ意味

他の疾病と同じように、化学発癌にも個人差、細胞種差、動物種差がある。発癌の最終結果すなわち腫瘍の形成におけるこれらの差は、発癌の各ステップの感受性の差およびその総合として理解されよう。われわれは、これらの差の分析にあたって、最初、化学発癌性物質の代謝活性化の差をとりあげた。表2に示した細胞のなかで、個人差の観察されている細胞は、表皮角化細胞、末梢リンパ球、末梢単球、大腸組織、肺組織および気管支である。特にKellermannらは正常人のリンパ球のBA誘導時のAHH活性が三つのピークに分かれるのに対し、気管支癌の患者から得たリンパ球の同活性が高い方に偏っていることを見出した⁹⁾。彼らは、リンパ球のAHH値が肺癌のリスク評価に役立つと主張した。しかし、この成績を再確認した報告は現在まで出ていない。

このような個人差は、遺伝的なものか、あるいは生活環境によって生じたものであろうか。Nebertらの広範な研究は、遺伝的現象であることを明らかにした。その証拠はヒトおよび動物実験から得られている。ヒトの場合、一卵性双生児間ではAHH活性値にほとんど差がないのに対し、二卵性双生児には差がみられた。遺伝的な背景を示唆している。さらに、マウスでは系統によってAHH活性が異なる。Nebertらは交配実験から、それがAh locusと呼ばれる遺伝子によって支配されていることを明らかにした。しかし、AHH活性には、環境的因子

の関与しているのも確かである。例えば、喫煙によってこの値は変動する。²⁰⁾このようにAHH、特にその誘導活性が遺伝と環境の要因によって支配されているとしても、その意味づけには慎重でなければならない。多くの症例の積み重ねと、臨床側との緊密な連絡による共同研究が今後すすめられねばならない。

細胞種間の差は、古くから標的臓器の差として認められていた。標的臓器の問題は、最近になって代謝活性化、DNA修復から検討がすすめられている。例えば、アルキル化剤投与後のアルキル化プリン、ピリミジンの生成と消長を標的、非標的臓器で比較する。その結果、グアニンの6位の酸素のアルキル化が標的臓器で多く作られ、また修復されにくいため長く残ることが明らかにされつつある。このような臓器間の差を細胞種間の差として解析するためには、まず上皮細胞と間質系細胞の分離培養の技術が確立されねばならないが、現在、皮膚と一部の臓器に限られている。そのような研究がすすめば、発癌、特にヒトの発癌における上皮性細胞の重要性が浮びあがってくるであろう。

動物種間の差の解析は、動物実験の成績を評価する上で重要である。ヒトの実験は、特に発癌のような実験では、培養細胞を用いた実験以外、ほとんど不可能である。したがって、ここに報告したような技術、すなわち、ヒトとマウスより同種の細胞を分離し、それらを比較する方法は、動物実験の成績をヒトに外挿するときの基礎的な資料を提供するであろう。ここでみられたマウスとヒトの線維芽細胞の間の差は、あるいは、両者の間の癌の分布の差を反映しているのかも知れない。すなわち、ヒトの癌の90%は上皮性の腫瘍(癌腫)であるのに対し、動物ではその比率は低い。従来の研究、特に培養細胞を用いた研究の大部分は、マウス、ハムスターなどの間質系細胞を用いてすすめられてき

たが、その成績をただちにヒトにあてはめることはできないであろう。

皮膚の細胞は、個人差、細胞種差、動物種差を解析するためのよい材料である。マウスの皮膚を用いて、化学発癌の基礎的知識が確立していることと、ヒトからの材料が得やすいことによる。われわれは、現在、代謝活性化のメカニズムについて解析をすすめているが、今後、さらにDNA修復、プロモーションのレベルでも、個人差、細胞種差、動物種差の研究をすすめたい。

この研究は、根本信雄(癌研、実験病理部)喜多野征夫(阪大皮膚科)、鬼塚卓弥、寺内雅美(昭和大形成外科)、細見次郎、宗像君江、井島幸子(東大歯科研)との共同研究によって行なわれた。記して感謝する。

文 献

1. IARC working group: Cancer Res., 40, 1-20, 1980.
2. Kuroki, T., Nemoto, N. and Kitano, Y.: Carcinogenesis, 1, 559-564, 1980.
3. Parkinson, E. K. and Newbold, R. F.: Int. J. Cancer, 26, 289-299, 1980.
4. Levin, W., Conney, A. H., Alvares, A. P., Merkat, I. and Kappas, A.: Science, 176, 419-420, 1972.
5. Rudiger, H. W., Marxen, J., Kohl, F.-V., Melderis, H. and Wichert, P. V.: Cancer Res., 39, 1083-1088, 1979.
6. Brookes, P. and Duncan, M. E.: Nature, 234, 40-42, 1971.
7. Goto, T. and Wiebel, F. J.: Eur. J. Cancer, 16, 751-761, 1980.
8. Busbee, D. L., Shaw, C. R. and Cantrell, E. T.: Science, 178, 315-316, 1972.
9. Kellermann, G., Shaw, C. R. and Luyten-Kellermann, M.: New Eng. J. Med., 289, 934-937, 1973.

10. Bast, R. C., Jr., Okuda, T., Plotkin, E., Tarone, R., Rapp, H. J. and Gelboin, H. V.: Cancer Res., 36, 1967-1974, 1976.
11. Cantrell, E., Busbee, D., Warr, G. and Martin, R.: Life Science, 13, 1649-1654, 1973.
12. Huberman, E. and Sachs, L.: Int. J. Cancer, 11, 412-418, 1973.
13. Autrup, H., Harris, C. C., Trump, B. F. and Jeffrey, A. M.: Cancer Res., 38, 3689-3696, 1978.
14. Cohen, G. M., Mehita, R. and Meredith-Brown, M.: Int. J. Cancer, 24, 129-133, 1979.
15. Yang, S. K., Gelboin, H. V., Trump, B., Autrup, H. and Harris, C. C.: Cancer Res., 37, 1210-1215, 1977.
16. Huh, N., Nemoto, N. and Utakoji, T.: Personal communication.
17. Diamond, L., Kruszewski, F., Aden, D. P., Knowles, B. B. and Baird, W. M.: Carcinogenesis, 1, 871-876, 1980.
18. Aust, A. E., Falahee, K. J., Maher, V. M. and McCormick, J. J.: Cancer Res., 40, 4070-4075, 1980.
19. Nebert, D. W.: Pharmac. Ther., 6, 395-417, 1979.
20. Welch, R. M., Harrison, Y. E., Conney, A. H., Poppers, P. J. and Finster, M.: Science, 160, 541-542, 1968.

受賞者のことば

昭和55年度の日本環境変異原学会奨励賞は、次の二会員の研究に対して贈られましたので受賞者の感想を寄せていただきました。

石 館 基 氏（国立衛生試験所）

「環境変異原および癌原物質の染色体異常によるスクリーニング」

常 盤 寛 氏（福岡県衛生公害センター）

「大気中の変異原性汚染物質の実態の調査と研究」

昭和55年学会奨励賞を受賞して

国立衛生試験所

安全性生物試験研究センター

変異原性部 部長 石 館 基 *

この度、本学会奨励賞をいただき、誠に光栄に存じます。

「研究は自分のためにやるものではない。ある時期が来たら、それを社会に還元して行くことを考えなければならない。」これは私の恩師、今は亡き吉田富三先生のお言葉です。7年程前に、私が財団法人癌研究所から現在の国立衛生試験所に移る際に先生はこう言って私を励まして下さったことを思い出します。

われわれの生活環境中に存在する種々の化学物質の安全性について、どのような方法で検索し、また、その結果をどのように評価して行くべきかという問題は、現代社会の大きな関心事

でもあります。大部分の発癌性物質に、細菌あるいは哺乳動物細胞に対する変異原性が認められることは事実ですが、その逆は必ずしも真ではない。そのギャップを埋めて行く必要があります。また、発癌性がなくても、子孫に危害を及ぼすような所謂遺伝毒性の有無についても考慮して行かねばなりません。

今回の受賞を機に、われわれ研究室員一同は、新たな気概のもとに、上記諸問題を解決すべく、今後も一層奮励努力する所存です。

有難うございました。

日本環境変異原学会奨励賞受賞のことば

福岡県衛生公害センター

常盤 寛*

昭和55年本学会総会におきまして、権威ある本学会奨励賞を受賞いたしました。誠に光栄に存じます。

大気中変異原物質の検索に関する研究はまだ緒についたばかりであります。簡易変異原検出法の研究発展によって大気中に存在する変異原性化学物質の実体が明らかにできることを期待しています。

これを機会に、変異原物質の大気中への汚染又は生成機構について鋭意研究を進めていきたいと考えています。

受賞に際して御指導いただいた本学会会長・杉村隆博士を初め学会会員の方々に対し厚く御礼申し上げます。

トピックス

変異原活性を抑制する因子

変異原活性を抑制する因子

賀田 恒夫*

(国立遺伝学研究所・変異遺伝部)

1. AF2

変異原の不活化を試みた最初は、AF2についてであった。その変異原性を検出した際、食品とともにこれを摂取する以前に、不活化する簡易な方法はないかと種々試みた。そこで、加熱(沸とう水中で100℃で1時間処理)、加圧加熱(オートクレーブで120℃、30分)、ガンマー線照射(137Cs照射線源を用い、40KR)や紫外線照射(殺菌灯による長時間処理)などを試みたが不成功であった。一方、種々な食品成分の作用を試みたところ、システインとの混合加熱が有効であった。ちょうど、放射線の保護剤として種々なSH剤を持っていたので調べたところ、システアミンがもっとも強い不活化剤であった。しかし、一般にAF2は化学的に極めて安全な化合物であって、実際的な不活化には成功しなかった。

AF2に関しては、多くの実験によってラット肝細胞などに含まれる還元酵素によって、還元的に不活化される。しかし、還元活性を欠失したある種の大腸菌変異株においては、もっぱら活性化だけが観察された。¹⁾ 一般に、AF2の還元的な不活化は、一時的な活性態を経るものと思われる。

2. SH剤などによる変異原の不活化

システアミン、シスチン、グルタチオンなどによる変異原の *in vitro* 失活に関しては、高橋ら²⁾によって系統的に検索されている。一般に、変異原はSH剤に対して失活を受けやすい

との強い印象を持っている。その機構は明らかではないが、DNA塩基とSH剤との間には変異原 susceptibility に関して共通性があるものと思われる。農薬キャプタンが強い *in vitro* 変異原性があるにもかかわらず、発がんのデータに乏しいのは、やはり細胞内のSH因子などで急速に不活化されるためと思われる。³⁾

3. ソルビン酸と亜硝酸の反応物の食品成分による不活化

広く利用されている食品添加物であるソルビン酸と亜硝酸とが反応して、種々な変異原を生成することを知ったとき、^{4~7)} 強いショックを受けた。変異原を単純な方法でヒトから避けることが困難であることを知った最初の例である。そこでこれらの食品添加物が添加されている食品類と同時に摂取する可能性のある食品類 — おもに野菜・果実など — について広く不活化因子の検索を行ない、多数の陽性試料を検出した(文献8に一部を要約した)。最近、これらの食品成分の一例として、ビタミンCがソルビン酸と亜硝酸の反応生成物の内、もっとも強い変異原活性を示すY物質を還元的に不活化することが見出された。⁹⁾ その化学的変化を図1に示す。

一方、ソルビン酸と亜硝酸との反応よりもジメチルニトロソアミンがより早く亜硝酸と反応することが示されている。¹⁰⁾ このことは複合系における変異原の生成の抑制という面で、きわめて重要な現象である。変異原の間接的な抑制の一例であろう。

* 〒411 静岡県三島市谷田 1,111

ソルビン酸

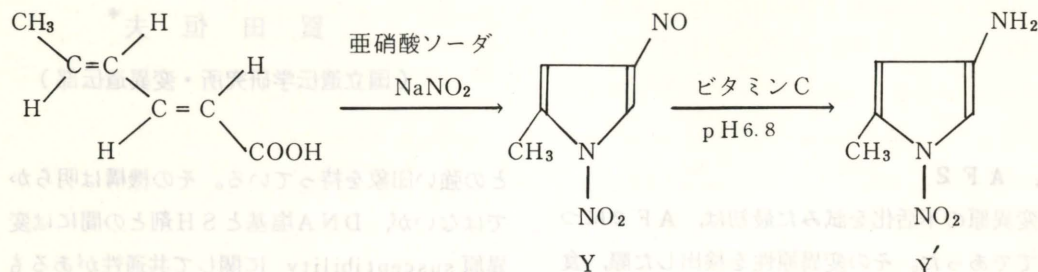


図1. ソルビン酸と亜硝酸との反応による変異原の生成とビタミンCによる失活⁹⁾

精製過程	容量 (ml)	活性単位	タンパク質 (mg/ml)	比活性 (mg当たりの活性単位)
I. Dialyzed 9,000×g sup	3,900	7,100	7.86	0.24
II. DEAE-cellulose	5,000	10,600	4.16	0.51
III. CM-cellulose (concentrated)	1.4	2,300	3.36	49.5
IV. Sephacryl S 200	8.3	1,980	2.24	106.3
V. DEAT-Sephadex A 25	8.0	2,050	2.08	123.3
VI. Second CM-cellulose	3.6	1,522	3.20	87.0

表1. Trp-P2の変異原活性の抑制を指標としたキャベツ Desmatagen の精製
サルモネラ TA-98 株, PCB 誘発ラット S9 を使用¹⁶⁾

4. アミノ酸・蛋白質の加熱燃焼物と野菜因子

アミノ酸・蛋白質の加熱燃焼物のように食生活に密着した問題¹¹⁾については、すべての人が強い関心を有している。われわれは、キャベツ、ブロッコリー、ゴボウなどが、これら変異原の不活化・抑制作用を示すことを見出し、種々報告してきた。^{12,13)} そのうち、キャベツ因子に関しては、これを精製純化しこれが一種のパロキシダーゼであることを、見出している。¹⁴⁻¹⁶⁾ パロキシダーゼによる変異原の失活に関しては、ミエローマ細胞の例¹⁷⁾が報告されている。一般に野菜、果実類は、次のような作用を通

じて、変異原の活性抑制に働いているものと思われる。

- (1) 変異原の酵素的直接不活化：上記のパロキシダーゼによる酸化的不活化が、その例である。
- (2) 変異原と反応性成分：ビタミンC, SH 因子などは還元剤として働き、変異原の活性基と反応して不活化する。
- (3) S9の活性化の抑制：われわれがキャベツから分離したパロキシダーゼはTrp-Pを直接不活化する活性とともに、S9による変異原活性化に必要なNADPH-oxidase 活性に抑制的に働く。^{15,16)} それゆえ、S9活性化を必

要とする変異原の活性を抑制することになる。

5. Antimutagen・Desmutagen など

一般に突然変異を抑制する活性因子は、Antimutagenとよばれてきた。その多くは、“Cellular Mutagenesis”における拮抗因子であった。一方、上記のキャベツ因子のように *in vitro* で変異原に働いて、これを修飾・分解・不活化する因子については、米国のJ. Drake 博士と相談の上、Desmutagenと命名した。そこで、Antimutagen はもっぱら細胞レベルで働くものとして、Desmutagenと区別するのが適当であろう。

それではS9活性化の抑制因子は、どのようなよばれるべきか？一私案として Metabolic Deactivator と云うべきであろう。

6. 環境 Antimutagens

われわれは、ここ数年の間に下記の Anti-mutagen 因子の検出を行なった。¹⁸⁻²²⁾ 本稿は、もっぱら Desmutagen に関して記した。

2価のコバルト、シイタケ成分、ユリ科成分、椿科成分(日本茶・紅茶など)、哺乳動物の Placenta 成分、その他。

× × ×

本稿に関連した総説を御参照ありたい。^{8,19-23)}

文 献

1. Kada, T.: Metabolic activation and *Escherichia coli* mutagenesis of Furfurylformamide, a nitrofur food additive. Ann. Rep. Nat. Inst. Genetics, **24**, 39-41 (1974).
2. Onitsuka, S., N. V. Cahn, S. Murakawa, T. Takashi: Desmutagenicity of several chemical compound and vegetables on some mutagens. 文部省科学研究費特別研究(環境科学), A-2(昭和53年)成果報告書。
3. Moriya, M., K. Kato and Y. Shirasu: Effects of cysteine and a liver metabolic activation system on the activities of mutagenic pesticides. Mutation Res., **57**, 259-263 (1978).
4. Kada, T.: DNA-damaging products from reaction between sodium nitrite and sorbic acid. Ann. Rep. Nat. Inst. Genetics, **24**, 43-44 (1973).
5. Hayatsu, H., K. C. Chung, T. Kada and T. Nakajima: Generation of mutagenic compound(s) by a reaction between sorbic acid and nitrite. Mutation Res., **30**, 417-419 (1975).
6. Namiki, M. and T. Kada: Formation of ethylnitrosic acid by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. Agric. Biol. Chem., **39**, 1335-1336 (1975).
7. Namiki, M., S. Uda, T. Osawa, K. Tsuji, T. Kada: Mutagen formation by sorbic acid and nitrite: Effect of reaction conditions on biological activities and activities of individual products. Mutation Res., **73**, 21-28 (1980).
8. 賀田恒夫: 自然因子による変異原の抑制。遺伝 **34**, 49-54 (1980)。
9. Osawa, T. et al.: Desmutagenic actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrrole mutagen formed by the reaction between food additives: Sorbic acid and sodium nitrite. Biochem. Biophys. Res. Comm., **95**, 835-841 (1980).
10. Tanaka, K. et al.: Inhibition of nitrosamine formation *in vitro* by sorbic acid. Fd. Cosmet. Toxicol., **16**, 209-215 (1978).
11. Sugimura, T. et al.: Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. Origins of Human Cancer, Eds. Hiatt, H. H. et al., Cold Spring Harbor, (1977).
12. Kada, T., K. Morita and T. Inoue: Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. Mutation Res., **53**, 351-353 (1978).
13. Morita, T., M. Hara and T. Kada: Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. Agric. Biol. Chem., **42**, 1235-1238 (1978).
14. Inoue, T., K. Morita and T. Kada: Purification and properties of a desmutagenic factor from plant (Brassica oleracea) for mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. Ann. Rep. Nat. Inst. Genetics, **28**, 79-81 (1978).
15. Inoue, T. and T. Kada: A desmutagenic factor from plant (Brassica oleracea) for mutagenic principle of tryptophan pyrolysate has peroxidase and NADPH-oxidase activities. Ann. Rep. Nat. Inst. Genetics, **29**, 66 (1979).

16. Inoue, T., K. Morita and T. Kada: Purification and properties of a plant desmutagenic factor for mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Agric. Biol. Chem.* (1981) (in press).
17. Yamada, M., M. Tsuda, M. Nagao, M. Mori and T. Sugimura: Degradation of mutagens from pyrolysates of tryptophan, glutamic acid and globulin by myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **90**, 769-776 (1979).
18. Kada, T. and N. Kanematsu: Reduction of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutations by cobalt chloride in *Escherichia coli*. *Proc. Japan Acad.*, **54**, Ser. B, 234-237 (1978).
19. Kada, T., T. Inoue, A. Yokoiyama and L. B. Russel: Combined genetic effects of chemicals and radiation. *Proc. 6th Inter. Congr. Radiat. Res.*, 711-720 (1979).
20. 賀田恒夫: 環境変異原の防除。変異原と毒性 **3**, 4-6 (1978)
21. 賀田恒夫: 発癌性物質と酵素。発酵と工業 **7**, 584-590 (1978)
22. 賀田恒夫: 変異原・がん原の検出と防除。化学と生物 **18**, 474-476 (1980)
23. 賀田恒夫: 環境変異原の不活化と防除。代謝 **17**(6), アップIF (1980)

だ液が発がん物質を失活する

西岡 一* (同志社大・生化)

環境発がん物質の検出技術が進歩するに従って、我々は日常の食生活を通じて様々なタイプの発がん物質を摂取していることを嫌感なしに知ることになった。しかもそれらは、必ずしも人工合成物質、例えば、食品添加物や残留農薬などばかりではなく、天然に生ずる物質、例えば調理の際に生ずる蛋白質の熱分解物や自然の植物中に含まれるフラボン化合物なども含まれる仕末と相なった。環境から発がん物質を有効に検出して、除去することを目標にしてきた我々にとって、この状況ははたと直面した困難な段階ということになる。だが、現実これらの

物質が我々の体内にとり込まれた時、そこには極めて複雑な様々な反応が行なわれるに違いない。ある時は活性化され、またある時は不活性化されることもあり得よう。

いずれにしても、これら食べ物や飲み物中の発がん物質は、通常経口的に体内にとり入れられる。最初の処理は、口腔内において、耳下腺、顎下腺、舌下腺などのだ液腺から分泌されるだ液によって行われることになる。従って、だ液がこれらの発がん物質に対してどのように作用するかを知ることは興味あることである。

Table 1
Samples for mutagenicity assay and their solvents

Samples	Solvents
Chemicals-A	
AF-2	P.B.
MMS	P.B.
MNNG	DMSO
4NQO	DMSO
Quercetin	DMSO
Chemicals-B	
Aflatoxin B ₁	DMSO
B(a)P	DMSO
Trp-P-1	DMSO
Pyrolysates	
Beef	DMSO
Salmon	DMSO
Sodium Glutamate	DMSO
Polypeptone	DMSO
Cigarette smoke condensate	1% ethanol

Abbreviation

Trp-P-1:	Tryptophan pyrolysate-1
AF-2:	2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
B(a)P:	Benz(a)pyren
MNNG:	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
4NQO:	4-Nitroquinoline 1-oxide
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
P.B.:	Phosphate buffer

実験は、表 1 に示された各発がん物質または発がん疑惑物質について、エームスのサルモネラ TA98 と TA100 に対する変異原性を指標として行われた。又、実験法は多少の変更を伴ったが、エームス法に準じた。表の中で chemicals A は、代謝活性を必要しないもの、chemicals B は、S9 mix 処理によって変異原性を示すものであり、だ液処理のあと、S9 がソフトアガーに添加された。熱分解物およびタバコ凝縮物はいずれも S9 処理された。

Table 2
Effect of saliva-treatment for mutagenicity of samples

Samples	Dose	Tester strain	S9 mix	His ⁺ revertants/plate	
				-Saliva	+Saliva
Control		TA98	-	12	13
			+	16	14
		TA100	-	121	134
			+	119	127
Chemicals-A					
AF-2	0.02	TA98	-	167	20
	0.04			208	21
	0.08			246	13
	0.02	TA100	-	517	119
	0.04			616	107
	0.08			596	112
MNNG	0.2	TA100	-	191	41
	0.4			581	147
	0.8			578	161
MMS	100	TA100	-	269	283
	200			625	567
	400			878	963
4NQO	0.2	TA98	-	319	42
	0.4			362	30
	0.8			378	81
	0.2	TA100	-	888	104
	0.4			964	142
	0.8			1260	266
Quercetin	100	TA98	-	29	20
	200			49	36
	400			231	143
	100	TA100	-	97	91
	200			118	101
	400			218	114

だ液は、22~23才の健康な日本男性6~7人が、梅干の香りを嗅ぎながらビーカー中に吐きだした全だ液を用いた。各濃度の発がん物質 0.2 ml は、だ液 1.8 ml と 5 分間 37℃ で処理され、エームス法に従ってプレートされた。但し、グルコース最少培地プレートでは、だ液中に含まれる雑菌の増加を防ぐために、アンピシリン (20 μg/ml) を添加した。この濃度のアンピシリンは、サルモネラの生存率、変異原誘発率に有意の変化を与えなかった。

Chemicals-B					
Aflatoxin B ₁	0.02	TA98	-	19	21
	0.04			22	13
	0.08			28	24
	0.02	TA98	+	299	37
	0.04			457	16
	0.08			602	19
	0.02	TA100	-	95	92
	0.04			102	115
B(a)P	0.08			94	90
	0.02	TA100	+	370	119
	0.04			513	96
	0.08			887	101
Trp-P-1	10	TA100	-	125	94
	20			107	118
	40			161	131
	10	TA100	+	334	85
	20			700	161
	40			770	203
Pyrolysates					
Beef		TA98	-	22	25
			+	179	82
Salmon		TA98	-	19	11
			+	147	70
Sodium glutamate		TA98	-	15	29
			+	192	108
Polypepton		TA98	-	18	24
			+	170	176
Cigarette smoke condensate		TA98	-	28	16
			+	484	188

Table 3
Effect of temperature during saliva-treatment on AF-2 (0.08 μg/plate) mutagenicity

Tester strain	Temp. (°C)	His ⁺ revertants/plate	
		-Saliva	+Saliva
TA98	5	274	18
	20	241	26
	37	277	24
	45	281	24
TA100	5	428	394
	20	549	147
	37	523	118
	45	663	408

だ液は、各濃度の、AF2, MNNG, 4NQO, ケルセチンに対し、サルモネラTA98またはTA100の変異原活性を表2のようにほぼ完全に失活した。但し、MMSに対しては殆ど効果を示さなかった。だ液の効果は、代謝活性を必要とする発がん物質、アフラトキシンB₁, Trp-P-1, B(a)Pに対しても著しかった。また、牛肉、鮭の熱分解物、グルタミン酸ナトリウムの熱分解物、また、紙巻タバコの水溶性凝縮物に対してもある程度の効果が認められた。ただし、ポリペプトンに対しては、有効性が認められなかった。なお、S9 mixの活性はだ液によって変化を受けなかった。

だ液の変異原性失活作用は、温度によく依存した。(表3) AF2(4 ng/ml)によって、誘導されたTA98とTA100の突然変異は、37℃, 20℃で最もよく消失し、5℃, 45℃では、殆ど効果を示さなかった。

Table 4
Effect of period during saliva-treatment on AF-2 (0.08µg/plate) mutagenicity

Tester strain	Period (min)	His ⁺ revertants/plate	
		-Saliva	+Saliva
TA98	0*	279	256
	0.25		151
	0.5		34
	1		15
	5		12
	30		24
	60		10
TA100	0*	510	490
	0.25		371
	0.5		123
	1		119
	5		125
	30		131
	60		128

*At period 0, AF-2 and saliva were placed separately into soft agar with bacterial strains.

このことは、この失活は酵素が関りあっている可能性を示唆する。また、37℃で処理時間を15秒, 30秒, 1分, 5分, 10分, 30分と変える実験では、30秒で失活化がほぼ100%進行し、それ以上の処理時間を必要としなかった。(表4)

吐きだされた直後のだ液をミリポアろ過し、このろ液による実験では、AF2はTA98で変異コロニーは約70%に下がったが、TA100では40%に下がった。また、4NQOはTA100で74%, Trp-P-1はTA98で、15%程度にまで変異コロニー数が減じた。(表5)

だ液の成分については既に幾つかの報告がある。これらをまとめると表7のようになる。この表をみると、多数の酵素群、ビタミン類がまず目を引く。そこでこれらの中から、ペルオキシダーゼとアスコルビン酸ナトリウムを選び、失活化実験を行うことにした。また別の実験で適当濃度の過酸化水素にだ液を与えると急速に分解が進むことを認めているので、カタラーゼについても同様に実験した。(表6)

Table 5
Effect of filtrate of saliva through millipore filter (0.45µm) on mutagenicity of AF-2, Trp-P-1 and 4NQO

Sample	Dose (µg/plate)	Tester strain	His ⁺ revertants/plate		% activity
			-Saliva	+Saliva-filtrate	
AF-2	0	TA98	35	26	
	0.08		257	119	46
	0	TA100	91	80	
	0.08		568	227	40
Trp-P-1 (+S9 mix)	0	TA98	28	32	
	0.4		561	54	10
4NQO	0	TA100	108	98	
	0.2		844	280	33

Table 6
Effect of catalase (0.2mg/ml), peroxidase (0.2mg/ml) and sodium ascorbate (0.2mg/ml) on mutagenicity of AF-2, 4NQO and Trp-P-1

Samples	Dose (µg/plate)	Tester strain	S9 mix	His ⁺ revertants/plate			
				non	catalase	peroxidase	sodium
Control		TA98	-	17	15	13	19
			+	22	24	18	10
		TA100	-	122	118	120	99
			+	141	128	101	135
AF-2	0.02	TA98	-	148	192	155	138
	0.04			229	200	202	166
	0.08			230	189	134	158
	0.02	TA100	-	643	529	323	399
4NQO	0.04			617	376	361	422
	0.08			547	415	310	389
	0.2	TA98	-	135	133	121	135
	0.4			226	218	108	140
Trp-P-1	0.8			239	238	144	105
	0.1	TA98	+	49	46	14	55
	0.2			252	257	22	264
	0.4			443	446	27	394

表 7

混合唾液の成分(ヒト)(M±SD)

	単 位	無 刺 激	刺 激
pH		5.0 ~ 8.0	6.2 ~ 7.6
Na	mmol/l	6.2 ± 0.46 (SEM)	26.4 ± 11.8 (SEM)
K	"	21.6 ± 0.20 "	19.7 ± 3.9 "
Ca	"	1.56 ± 0.06 "	1.48 ± 0.04 "
Mg	mmol/l	0.21 ± 0.01 (SEM)	0.15 ± 0.04 (SEM)
Cl	"	17.40 ± 1.40 "	29.0 ± 8.8
リン酸	"	6.14 ± 0.61 "	
SCN (喫煙者)	"	1.3	
" (非喫煙者)	"	0.35	
I	μmol/l	0.8	
F	"	1.5 ± 0.68	0.56 ± 0.25
Cu	"	5.03 ±	4.1
Co	"		0.41
タンパク質	g/l	1.4 ~ 6.4	1.8 ~ 4.2
アミラーゼ	"	0.38 ± 0.08 (SEM)	
	IU/l	352 × 10 ⁶	
リゾチーム	mg/l		3.7 ~ 625
酸ホスファターゼ	U/l		5 ~ 150
アルカリホスファターゼ	"		0.25 ~ 11.1
α-L-フコシダーゼ	"		520 ± 220
β-N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ	"		9,580 ± 3,100
GOT	"		27,500 ± 20,200
GPT	"		12,500 ± 9,900
カルボニックアンヒドラーゼ	K/l		2,100
リパーゼ	U/l		11.8 ± 5.75
スルファターゼ	"		1.91 ± 1.06
ペルオキシダーゼ	"	1.82 ± 1.07	2.79 ± 1.16
カリクレイン	"		777 × 10 ³
グルコース	mmol/l	0.055	0.056
乳 酸	"		0.01 ~ 0.06
クエン酸	"		0.004
アンモニア	"		4
尿 素	"	3.22	2.17
尿 酸	"	0.09	0.18
アスコルビン酸	μmol/l	10.4 ± 4.3	4
チアミン	μg/l	7	
コリン	"		16
リボフラビン	"	50	
ニコチン酸	"	30	115
ビタミンB ₁₂	"	600	6
パントテン酸	"	80	88
ビオチン	"	0.8	
ビタミンB ₁₂	"		3.3
ビタミンK	"	15	
パロチン	μg	12.9	10 ~ 20
プチアリン	"	6	8.1

この実験で用いられた、各成分の濃度(0.2 mg/ml)は、いずれも実際にだ液に含まれる量をはかるに上まわるので、だ液の活性と直接比較することはできないが、Trp-P-1は、ペルオキシダーゼではほぼ完全に失活されるが、4NQOは、アルコールビン酸によってある程度失活されること、AF 2は、カタラーゼとペルオキシダーゼによって、有意に失活作用を受けることがわかった。

だ液処理によってこれらの発がん物質がどのように変化を受けたかを知ることは興味あることである。だ液処理前後のAF 2, Trp-P-1, グルタミン酸ナトリウムの熱分解物、タバコ水溶性凝縮物の蛍光分析では、蛍光ピークの波長および、相対強度には有意の変化がなかったことから、少なくともこれらの物質の蛍光部分では変化が生じていないことを示唆した。

以上の実験によって、だ液が様々なタイプの発がん性物質を失活する作用は意外に強いことが明らかになった。但し、全ての発がん物質について効果があるのではなく、例えば、MMSやポリペプトンの熱分解物に対しては無効であった。また、だ液の処理が変異原性を誘発したり、増加するような好ましからざることは、本実験に限っては見当らなかった。

だ液の失活作用は、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、アスコルビン酸だけで説明できないことは明らかである。また、だ液の活性は、確かにミリボア汙液にも存在するが、全活性を説明できるものではない。これらの点から、だ液の効果は、比較的低分子の酵素群、ビタミン類による失活作用の他、高分子の蛋白質やウィルス、バクテリア細胞、気道や食道からの剥離組織や鼻汁などへの吸着や包含の作用によって行われるものであろうと推定される。

その機構が何にせよ、だ液処理によって多数の発がん物質が変異原性を示さなくなることは

事実であり、食物とだ液をよく混和すること、つまり「咀嚼」が発がん物質の作用を未然に防ぐ可能性につながることは明らかであろう。

古くからいわれた、「よく噛め」は単に通常の健康法のみならず、がん予防法につながるのではないだろうか。現在は、「早めし、早〇〇も芸の内」などと、とかく噛むことがなごりにされているようであるが、こんな所にも重要なポイントがあるとすれば、大変興味のあることである。

現在さらに、だ液活性の個人差や、年齢、性別、人種による差、または、がん患者などについて研究を行っている。

腸管内細菌による 1-nitropyrene の変異原性の低下

大西 克成*, 木内 武美, 脇坂 和見

(徳島大学・医学部)

1-Nitropyrene (1-NP) は、大気、自動車排ガス、ゼロックスコピー中に多量に含まれており、¹⁻³⁾ その変異原性は Ames 法 (-) S9 で、TA98 株に対して 3050 his⁺/plate/nmol という高い値を示し、⁴⁾ benzo(a)pyrene (B(a)P) の 121⁵⁾ と、また実験室内でよく使う N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine の 1375⁵⁾ と比較しても、環境変異原としては無視することができないものである。気圏の 1-NP は呼吸器系に入ることが考えられるが、痰として飲み込む場合もあるし、また石油等の燃焼によってたやすく生じる多環芳香族炭化水素 (PAH) の 1 つである pyrene が、調理場の都市ガス中の NO₂ で容易にニトロ化して 1-NP が生じることも考えられ、人体特に消化器系に入った場合の影響をも考えて、1-NP の代謝を調べることは重要である。この論文では、1-NP が腸管内の嫌気性菌によって、1-aminopyrene (1-AP) に代謝され、その変異原性が低下することを明らかにした。

材料と方法

1-NP と 1-AP とは Aldrich Chemical 社から購入した。

各種細菌は、当教室保存株の他、本学川田十三夫教授、岐阜大学上野一恵教授、鳥取大学高木篤教授、上田益己教授、ヤクルト中央研究所務台方彦博士、諸富正己博士から分与されたものである。嫌気性菌は、GAM 培地を用いて、

3 種混合ガス (N₂ 80%, H₂ 10%, CO₂ 10%) の嫌気チャンバー内で培養した。

変異原性は、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100 株によって、preincubation を用いて Ames 法で行い、(+) S9 では Aroclor 1254 処理ラット肝の S9 画分を 50 μ l/plate 使用した。

無細胞系での反応液は、1-NP 100 nmol, グルコース-6-リン酸 5 μ mol, NADP⁺ 4 μ mol, KCl 33 μ mol, MgCl₂ 8 μ mol, Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 100 μ mol および酵素画分からなる。37°C で 3 または 15 時間反応後に酢酸エチルで抽出し、一部は蛍光分光光度計で 1-AP を定量し、一部は濃縮後、変異原性を測定した。

結果

1-NP が経口摂取されて腸管に達した場合を仮定して、1-NP と糞便とを混合して嫌氣的に 4 日間 35°C で保温後、抽出して変異原性を TA98 株 (-) S9 で測定すると、6.1% に減少した。同様に 1-NP と腸内常在菌である *Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *Escherichia coli* とを 37°C, 15 時間保温すると、それぞれ変異原性は 7.1, 6.0, 77.8% に減少した。つまり偏性嫌気性菌の前 2 株の方が、1-NP の不活化能が大であった。この時の反応生成物を薄層クロマトグラフィーで、benzene-cyclohexane (2:1) の溶媒で展開すると、1-NP と *B. thetaiotaomicron* や

*〒770 徳島市蔵本町 3-18-15

B. fragilis との反応液では、1-AP に相当する Rf 値 0.38 の位置に、1-NP と *E. coli* との反応液では、1-NP に相当する Rf 値 0.66 の位置に、主な spot が生じた。1-NP の spot は黄色であり、1-AP の spot は紫外線照射によって蛍光を発した。1-AP 相当部分を抽出して蛍光スペクトルをとると、励起波長 363 nm では蛍光波長 420 nm にピークをもち、1-AP の標準物質と同じであった。

B. fragilis の一夜培養液と 1-NP とを 37, 3 時間反応させ、残存変異原性が 15.1 % の時に、その培養上清と 1-NP とを反応させると、87.7 % であったので、1-NP を不活化する活性は細菌細胞にあることがわかった。さらに、細菌を音波処理で壊して、9000 × g, 10 分間遠心して、その上清と沈澱画分とに分けて、1-NP 不活化能を比較したところ、上清 (S 9 画分) では残存変異原性は 4.1 % であるのに、沈澱画分では 77.6 % であり、いわゆる S 9 画分に活性があった。

腸管内の細菌の 99.9 % は嫌気性菌 (偏性嫌気性菌) であるので、常在する嫌気性菌の主なもの、および代表的な好気性菌 (偏性好気性菌と通性嫌気性菌) の粗抽出液 S-9 画分について、1-NP 100 nmol からの 1-AP 生成量、その比活性、および 3 時間反応後の変異原性について測定した結果を表 1 に示した。1-AP 生成比活性が高い菌種は、嫌気性菌の *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *Fusobacterium mortiform*, *F. nucleatum*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *Eubacterium lentum*, *E. limosum*, *Peptostreptococcus anaerobius* であり、嫌気性菌でも、比活性が低い菌種が存在していた。それに対して、好気性菌では、*Klebsiella pneumoniae* を除いて、ほとんど全ての菌種にお

いて、1-AP 生成比活性が低かった。以上を総括すると、1-NP からの 1-AP 生成は、腸管内の主たる嫌気性菌によって行われているものと考えられる。また、表 1 から 1-AP 生成比活性が高い菌種では、反応後の抽出物の残存変異原性が減少している傾向がわかるが、*B. fragilis* の S-100 画分を使用して、経時的に 1-AP 生成量と変異原性減少とを調べると図 1 に示すように、その量的関係が明らかである。つまり、1-NP から 1-AP が生成されるにつれて、変異原性が減少している。

1-NP 不活化能に関して、同一菌種のなかで菌株による差があるかどうかを、臨床分離株をも含めて 5 株の *B. fragilis* について調べたところ、比活性は 2.17 ~ 2.51 であり、その平均値は 2.36 ± 0.14 nmol/h/mg protein で、菌株による差はなかった。

この 1-NP 還元酵素は、30,000 × g, 30 分遠心上清、さらに 100,000 × g, 2 時間遠心上清 (S-100) 画分に存在しており、S-100 画分で調べた限りでは、至適 pH は 6.8 であり、補酵素としては NADH より NADPH の方が活性が高く、KCl, MgCl₂ は不要であった。現在、反応系を改めて、*B. fragilis* の 1-NP 還元酵素を精製中である。

考 察

大気、自動車排ガス、小型エンジン排ガス、トンネル内大気中などの粒子状物質を捕集し、エーテル溶性中性、酸性、塩基性画分に分画して、各画分の変異原性を Ames 法で調べたところ、中性画分の活性が強く、(-) S9 でも変異原性が高いことから、中性画分には、B(a)P を代表とする PAH の他に direct-acting mutagens が含まれていることが予想された。^{6,7)} これらの direct-acting mutagens としては PAH のニトロ化合物が考えられ、実際にこれ

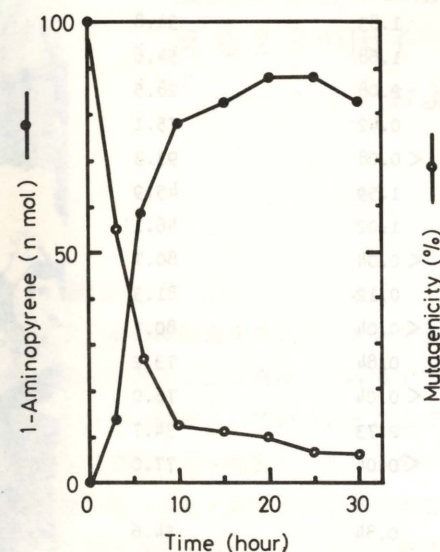


Fig. 1. Kinetics of 1-aminopyrene production from 1-nitropyrene treated with crude extract of *Bacteroides fragilis* and decrease of the mutagenic activity.

らが存在しており、さらに、PAH が大気中や排ガス中の NO₂ によって容易にニトロ化することを明らかにした。¹⁾ また、このことは Pitts らによっても明らかにされている。⁸⁾ この論文

では、これらニトロ化合物の代表として、1-NP の人体への影響を想定して実験を行った。現在、1-NP の発癌性が明らかにされつつあり (河内卓, 私信; 常盤寛, 北森成治, 松尾和美, 大塚久, 大西克成, 未発表), その変異原性の強さからも考え、1-NP が、変異原性 1/30 の 1-AP に、腸管内細菌によって代謝されることは、人体にとって有意義であると思われる。しかし、1-AP 自体が indirect-acting mutagen であり、(-) S9 でも低いながら活性があるので、1-AP の発癌性の有無を明らかにすることも重要である。1-NP から 1-AP への中間代謝産物と考えられる 1-hydroxylaminopyrene の意義や、DNA へ直接作用する物質が何であるのかなど、作用機作まで明らかにする必要がある。

1,6-Dinitropyrene が 1.9×10^5 his⁺/plate/nmol という最強の変異原性を示す⁴⁾ ことから、PAH のニトロ化合物による肺癌発生も考え、新しい吸入装置 (田中勇武, 私信) ができ次第、吸入発癌実験を行いたいと考えている。

Table 1. Production of 1-aminopyrene from 1-nitropyrene treated with crude extracts of intestinal bacteria for 3 hours and decrease of the mutagenic activity.

Bacterial strain	1-Aminopyrene produced		Mutagenic activity (%)
	Total (n mol)	Specific activity (n mol/h/mg protein)	
None	0	0	100
Anaerobes			
<i>Bacteroides fragilis</i>	44.2	2.27	33.8
<i>B. melaninogenicus</i> ss. <i>intermedius</i>	5.6	0.27	74.1
<i>B. melaninogenicus</i> ss. <i>melaninogenicus</i>	8.5	0.63	66.2
<i>B. oralis</i>	6.4	0.47	73.3
<i>B. thetaiotaomicron</i>	69.0	2.59	16.6
<i>B. vulgatus</i>	54.3	2.35	28.5
<i>Fusobacterium mortiform</i>	41.0	2.11	37.3
<i>F. nucleatum</i>	37.8	1.99	27.2
<i>F. varium</i>	17.5	0.93	45.5

変異原物質のAmesテストでの陽性を陰性に変
える2,3の因子

——ヘミンおよび不飽和脂肪酸の場合——

早 津 彦 哉* (岡山大学・薬学部)

はじめに

現在、変異原物質をスクリーニングするためのAmesテストは広く普及し、環境中の変異原を見つけるのに役立っている。ところで、このテストで陽性にでる物質も、テスト系にある種の共存物質があると陰性の結果を与える場合がある。見方を変え、このような妨害物質は、人間に対する変異原の脅威を軽減するために役立つかもしれないので、この現象を解析することは重要である。

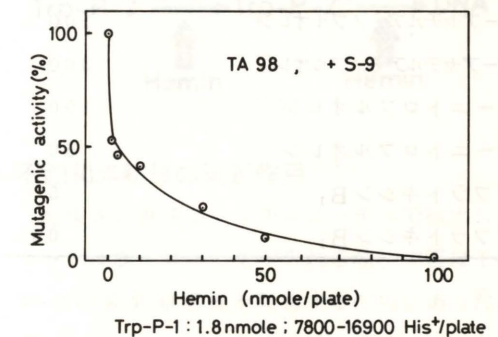
以下、われわれが見出したヘミンとその誘導体の場合、およびオレイン酸などの不飽和脂肪酸の場合について、その阻害作用についてのべてみたい。

ヘミンの種々の変異原に対する阻害作用^{1,2)}

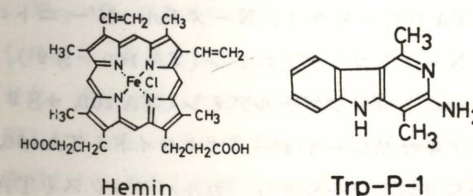
われわれは、生体を構成する低分子物質のうちで、変異原の活性を阻害するものはないかとさがしていたところ、たまたまヘミンがTrp-P-1の活性を阻害することを見出した。Trp-P-1の変異原活性を、*Salmonella typhimurium* TA 98を用い、プレインキューベーション法によって調べる際、ヘミンを共存させておいた。その結果、図1で示したようにTrp-

P-1 1.8 nmole に対してヘミン 3 nmole 添加によってHis⁻からHis⁺に復帰したコロニー数は50%減少した。さらに、100 nmoleヘミン添加によってコロニー数はバックグラウンドと等しくなった。この阻害実験に当っては、菌のコロニー形成能の失活(killing)が起っていないことを確認した。このことは、コロニー数の減少が単なる殺菌作用の結果ではないことを示している。この阻害実験は5回くり返し行なっていた。いずれも大差ない結果を得た。

図1. Trp-P-1の変異原に対するヘミンの阻害



これと同様の実験を行なって、種々の変異原に対するヘミンの阻害作用の有無を調べた。阻害作用のある場合は、50%阻害および95%以上の阻害に必要なヘミン量(I₅₀およびI₉₅)を求めた。また、ヘミンと類縁の構造を持つピロール色素であるプロトポルフィリン、ビリベルディン、ビリルビンおよびクロロフィリンについても同様の実験を行なった。これらの結果を表1と表2に示す。表1は「焼けこげの変異原」



* 〒700 岡山市津島中1-1-1

<i>Clostridium perfringens</i>	41.0	1.89	33.8
<i>C. sporogenes</i>	35.0	1.83	31.8
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	14.0	1.68	54.6
<i>B. bifidum</i>	30.4	2.08	28.5
<i>B. breve</i>	4.6	0.42	75.1
<i>B. infantis</i>	< 0.4	< 0.08	93.3
<i>Eubacterium lentum</i>	27.6	1.59	45.9
<i>E. limosum</i>	19.8	1.02	46.1
<i>Lactobacillus brevis</i>	< 0.4	< 0.04	80.7
<i>L. casei</i> ss. <i>casei</i>	1.65	0.12	81.3
<i>Propionibacterium acnes</i>	< 0.4	< 0.04	80.7
<i>Veillonella alcalescens</i>	4.8	0.84	73.2
<i>Peptococcus magnus</i>	< 0.4	< 0.04	76.0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	36.8	2.73	34.7
<i>Streptococcus intermedius</i>	< 0.4	< 0.04	77.0
Aerobes			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15.7	0.84	54.6
<i>Escherichia coli</i>	7.2	0.38	74.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21.2	1.09	56.2
<i>Proteus morganii</i>	10.6	0.71	60.7
<i>Salmonella typhimurium</i>	3.0	0.19	72.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.6	0.27	75.1
<i>Micrococcus luteus</i>	7.3	0.44	75.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.3	0.17	74.6
<i>S. epidermidis</i>	10.4	0.58	68.3
<i>Streptococcus faecalis</i>	5.3	0.35	74.6

文 献

- 1) Tokiwa, H., R. Nakagawa, K. Morita and Y. Ohnishi (1981) Mutagenicity of nitro-derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide. *Mutation Res.* in press.
- 2) Löfroth, G., E. Hefner, I. Alfheim and M. Møller (1980) Mutagenic activity in photocopies. *Science* **209**, 1037.
- 3) Rosenkranz, H. S., E. C. McCoy, D. R. Sanders, M. Butler, D. K. Kiriazides and R. Mermelstein (1980) Nitro-pyrenes: Isolation, identification, and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners. *Science* **209**, 1039.
- 4) Tokiwa, H., R. Nakagawa and Y. Ohnishi (1981) Mutagenic assay of aromatic nitro compounds with *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* in press.
- 5) McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella/microsome* test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 5135.
- 6) Tokiwa, H., S. Kitamori, K. Takahashi and Y. Ohnishi (1980) Mutagenic and chemical assay of extracts of airborne particulates. *Mutation Res.* **77**, 99.
- 7) Ohnishi, Y., K. Kachi, K. Sato, I. Tahara, H. Takeyoshi and H. Tokiwa (1980) Detection of mutagenic activity in automobile exhaust. *Mutation Res.* **77**, 229.
- 8) Pitts, Jr., J. N., et al. (1978) Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: Facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science* **202**, 515.

表1. ヘミンおよびピロール色素によるアミノ酸加熱分解変異原の活性阻害

変異原	変異原の量 (nmole/plate)	阻害に要する量 (nmole/plate) (TA98. +S9)							
		ヘミン		クロロフィリン		ビリベルディン		プロトポルフィリン	
		I ₅₀	I ₉₅	I ₅₀	I ₉₅	I ₅₀	I ₉₅	I ₅₀	I ₉₅
Trp-P-1	1.8	3	75	100	200	200	750	50	300
Trp-P-2	0.1	20	50	200	300	500	2,000	100	300
Glu-P-1	1.7	75	200	100	300	300	1,000	(-)	(-)
Glu-P-2	9.1	40	100	150	300	200	750	(-)	(-)
アミノ- α -カルボリン	80	30	100	150	300	500	2,000	(-)	(-)
アミノメチル- α -カルボリン	250	25	100	200	500	500	2,000	50	500

表2. 多環構造を持つ発がん物質の変異原性に対するヘミンの阻害効果

変異原	変異原の量 (nmole/plate)	S9 量 (μ l)	阻害に要する量 (nmole/plate)		菌株
			I ₅₀	I ₉₅	
ベンゾ(a)ピレン	8	25	10	50	TA98
ベンゾ(a)ピレン	30	25	10	150	TA100
3-メチルコラントレン	50	50	100	300	TA100
7,10-ジメチル- ベンゾ(a)アントラセン	100	50	30-100	300-500	TA100
クリセネ	120	50	100	300	TA100
2-アセチルアミノフルオレン	100	50	100-200	500	TA98
2-アセチルアミノフルオレン	300	50	200	500	TA100
2-ニトロフルオレン	100	-	200	1,000	TA98
2-ニトロフルオレン	50	-	100	750	TA100
アフラトキシンB ₁	5	10	10	500	TA98
アフラトキシンB ₁	0.5	10	50-70	300-500	TA100

に対する効果をまとめたものであり、表2には多環芳香族炭化水素を中心にした発がん物質に対する効果をまとめた。

ヘミンは、焼けこげの変異原のいずれをも強く阻害した。また、調べた多環式構造の発がん物質のすべてを阻害した。この中にはベンゾ(a)ピレン、アフラトキシンB₁を含んでいる。プロトポルフィリン、ビリベルディン、ピリルビンおよびクロロフィリンはヘミンよりも阻害力が弱く、またヘミンのようにスペクトルは広くないが、多くのものに対して阻害を示した。

一方、ヘミンが活性を阻害しない変異原には次のものがあつた。AF2 (TA100, -S9), 4-ニトロキノリン-1-オキサイド (TA100, +S9 および -S9), ナイトロミン (TA100, -S9), N-メチル-N-ニトロソウレア (TA100, -S9), N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (TA100, -S9), N-ニトロソジブチルアミン (TA100, +S9), キノキサリン-1.4-ジオキサイド (TA100, +S9 および -S9), カルバドックス (TA100, -S9)。

以上のように、ヘミンが阻害する変異原物質はいずれも多環式化合物であり、平面構造を持っている。これに対し、阻害のかからないものは、いずれも2環以下あるいは線状構造である。従って、ヘミンは多環平面構造を持つ変異原一般に対する阻害剤である可能性が大きいと考えられる。上記の実験結果の出た後でテストした新変異原IQ (3環構造) に対するヘミンの効果も、予想されるように阻害作用プラスであつた。構造未知の変異原に対してヘミンが阻害作用を示した場合、その構造は多環性平面構造であると推測してもよいかもしれない。

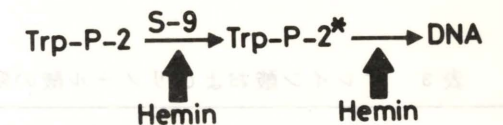
次にヘミンの Trp-P-1 および Trp-P-2 に対する阻害の機構について研究した。まず、ヘミンは Trp-P-1, Trp-P-2 いずれとも複合体を作ることがわかつた。Trp-P 化合物とヘミンのそれぞれの紫外、可視光吸収スペクトルを測定しておき、次いで Trp-P 化合物とヘミンとを1:1のモル比で混合したものの吸収スペクトルを測定したところ、両者単独のスペクトルを加算したものとは異なることがわかつた。また、Trp-P-1 とヘミンの濃い水溶液を混ぜ合わせると直ちに沈でんを生じた。この沈でんは水に難溶であるが、ジメチルスルホキシドに溶ける。ジメチルスルホキシド溶液をシリカゲルの薄層クロマトグラフィーにのせ、メタノールで展開したところ、Trp-P-1 とヘミンの各スポットを与え、複合体としてのスポットは検出できなかった。これらの事実から、ヘミンは Trp-P 化合物と可逆的に複合体を作ることが示唆された。

Trp-P-1 あるいは Trp-P-2 を S9 で処理したのち、有機溶媒で S9 タンパクを沈でんさせた。遠心分離したのちに上澄を減圧下蒸発乾燥したところ、-S9 で TA98 に対し変異原性を示した。こうして得られる直接変異原に対して、ヘミンは阻害効果を持つことがわかつた。

また、Trp-P-2 の場合、この直接変異原 (Trp-P-2*) を高速液体クロマトグラフィーによって単離できた。単離した Trp-P-2* は Trp-P-2 と同様にヘミンと複合体を形成することがわかつた。

以上のことから、ヘミンは Trp-P 化合物と複合体を作つて Trp-P が変異を誘発するのを妨げていると推定される。そこで次に、Trp-P が代謝活性化されるステップをヘミンが阻害するか、また活性化された Trp-P が DNA を攻撃するのをヘミンが妨害するかを調べた。その結果、ヘミンはこの両段階ともに阻害することがわかつた (データは示さない)。従って、図2のように、ヘミンは Trp-P 化合物の変異性を2つのステップで阻害していると結論される。

図2. Trp-P-2 のヘミンによる阻害の機構



不飽和脂肪酸の阻害作用^{3,4)}

健康人の糞便をジエチルエーテルで抽出し、エーテル層を蒸発して得られる油状物質は Trp-P-1 の変異原活性を阻害する作用があつた。Trp-P-1 1.5 nmole に対し、糞便 0.5 g 当量の抽出物を添加すると完全な阻害が見られた。この際、用いた菌 TA98 への殺菌作用は認められないので、この阻害は菌の死滅による見かけ上のものということはない。糞便抽出物が阻害する変異原としては、この他に調べたものでは、Glu-P-1, Amino- α -carboline, IQ, ベンゾ(a)ピレンおよびアフラトキシンB₁がある。これらの変異原物質は、いずれも S9 によって活性化後にはじめて変異原性を示す、いわゆる間接変異原であるが、Trp-P-1 をあらかじめ

めS9処理して得られる直接変異原に対しても糞便抽出物は阻害をした。

次に、この糞便抽出物中の阻害物質の分離同定を行なった。シリカゲルの薄層クロマトグラフィーを用いて分離したところ、阻害活性部分はオレイン酸と同じR_F値を持っていることがわかった。そこでオレイン酸が阻害活性を持つかを調べたところ、図3のように、Trp-P-1の活性を阻害した。

図3. オレイン酸による
Trp-P-1の活性阻害

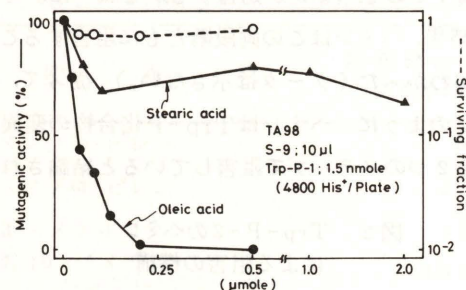


表3 オレイン酸およびリノール酸の変異原阻害活性^{a)}

変異原	変異原の量 (nmole/plate)	S ₉ 量 (μl)	阻害に要する量 (mg/plate)			
			オレイン酸		リノール酸	
			I ₅₀	I ₉₅	I ₅₀	I ₉₅
Trp-P-1	1.5	10	0.02	0.07	0.03	0.05
活性化Trp-P-1	2	—	0.02	— ^{b)}	0.07	0.5
N-アセチル-Trp-P-1	10	10	0.03	0.05	nd ^{c)}	
Glu-P-1	1	10	0.03	0.08	0.02	0.05
Glob-P-2	7.5	10	0.04	0.1	0.03	0.06
IQ	0.3	10	0.03	0.07	0.01	0.04
ベンゾ(a)ピレン	10	25	0.08	0.38	0.03	0.17
アフラトキシンB ₁	3	10	0.02	0.12	0.02	0.04

a) サルモネラ菌TA98を用いた。

b) オレイン酸 0.03 mgで70%阻害、また0.5 mgを加えたとき、80%阻害であった。

c) 未実験

興味あることに、薄層クロマトグラム上でオレイン酸(18:1)と一緒に挙動し、そのため活性部分に含まれてくるステアリン酸(18:0)は、阻害活性がなかった。また、リノール酸(18:2)は阻害活性があるがパルミチン酸(16:0)はない。従って、この阻害活性は不飽和脂肪酸に特異的にあるものと思われた。元々の糞便抽出物のTrp-P-1活性阻害は、それに含まれているオレイン酸とリノール酸によって阻害の強さがよく説明できることもわかった。オレイン酸およびリノール酸は種々の変異原に対して阻害活性を示した(表3)。オレイン酸は直接変異原Trp-P-1*やTrp-P-2*に対しても阻害をするから、変異原との間に化学的な相互作用をすることによって阻害していると考えられる。この点についてはさらに今後の研究を必要とする。

考察

ヘミンや不飽和脂肪酸が共存すると、種々の変異原のAmesテストの結果が陰性になることがわかった。不飽和脂肪酸は広く脂肪層に分布しているので、サンプル中に脂肪分が混っていると変異原性テストが“false negative”となる恐れがあるといえよう。焼いた牛肉中の変異原物質は「塩基性画分」に存在するが、「酸性画分」——ここにはオレイン酸が入っている——を加えると、塩基性画分の変異原性は完全に阻害されてしまった⁴⁾。

このようなAmesテストでの阻害作用を示す物質が、実際に生体内で役立っているか、つまり、変異原が及ぼす害作用から人間を守るか、という点が最も重要である。この点を今後追求してゆきたいと考えている。

文献

1. Arimoto, S., Ohara, Y., Namba, T., Negishi, T. and Hayatsu, H. (1980) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 92, 662-668.
2. Arimoto, S., Negishi, T. and Hayatsu, H. (1980) Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Letters*, 11, 29-33.
3. Hayatsu, H., Arimoto, S., Togawa, K. and Makita, M. (1981) Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens. Inhibition by oleic and linoleic acids. *Mutation Res.*, 81, 287-293.
4. Hayatsu, H., Inoue, K., Ohta, H., Namba, T., Togawa, K., Hayatsu, T., Makita, M. and Wataya, Y. (1981) Inhibition of the mutagenicity of cooked-beef basic fraction by its acidic fraction. *Mutation Res.*, in press.

実験ノート

「せっかちAmes法」について

有元佐賀恵*, 根岸 和雄, 早津 彦哉 (岡山大学・薬学部)

Ames法では、2晩のインキュベーション後にHis⁺復帰コロニー数を数えるが、これを、1晩のインキュベーションですまそうと考え、一つの方法を案出した。これを第9回研究発表会で発表した。その後、あちこちから実際のやり方について問合せがあるので、以下に実験法を簡単にのべる。原理は、プレート上の寒天培地にヒスチジン以外のアミノ酸を加えておいて、His⁺菌の生育を促進することによって、この方法をわれわれは上記のようなラボ用語で呼んでいる。

プレートの作成は、従来の培地1ℓ当り、下記 stock solution 40 mlを加えて作成する。すなわち、Vogel-Bonner 最少培地E, グルコース, 寒天を高圧蒸気滅菌後、混合する時、同時にこの stock solution を混合する。プレートは作成後、半月程の間に使用するとよい。古くなると生育促進の効果が薄れる。

Stock solution は、15種類のアミノ酸 (Gly, Ala, Leu, Val, Ileu, Ser, Thr, Met, Pro, Lys, Arg, Glu, Asp, Phe, Trp) 各々 300 mgを混合して、150 mlの水に溶かし、また、チロシン 300 mgを40 mlの1N HClに溶かして、両者を混合して、水で200 mlにメスアップしたものである。高圧蒸気滅菌後室温で保存できる。

Mutation assay を従来法と同様に行なって、24時間後に、His⁺菌数をcountできる。プレインキュベーション法でも、直接プレート法でもいずれでもよい。現在までにTA98, 100,

1535, 1537, 1538 について、種々の変異原を用いてS9存在下あるいは非存在下でテストを行ない、従来法とほぼ等しいHis⁺コロニー数が24時間で観察できることを確かめてある。大まかな結果は18時間の培養で判定できる場合が多い。

本法は粗材料からの変異原物質の分離方法の検討、あるいは変異原修飾物質の検索、分離のように、答えが出ないと次に進めない研究過程において大変有効であり、われわれの研究室ではそのような目的のため多用している。

文 献

- Arimoto, S., Negishi, K. and Hayatsu, H. (1981) A modification of the Ames test procedure: Accelerated growth of the His⁺ revertants, Mutation Res., 91, 407-411.

お知らせ

第3回国際環境変異原会議

—京都サテライトシンポジウムの御案内—

西岡 一（準備委員会委員長）

本年 9 月東京・三島で開かれます第 3 回国際環境変異原会議(3rd ICEM)のサテライトシンポジウムが京都で開かれます。この会議はすでにサーキュラーなどで御存知のように東京と合わせて登録いただいておりますが、近畿地区を中心に京都シンポジウムのみの参加の希望も出ています。このため ICEM 準備委員会のご了承を得て、京都シンポジウムのみの参加を交付けることになりました。シンポジウムの内容は下記の予定です。ICEM に参加申し込みされなかった方、あるいは皆様の研究室などでこの分野にご関心のある方に多数御参加下さいますよう御案内します。

— 記 —

3rd ICEM京都サテライトシンポジウム

"Current Problems of Environmental Mutagens & Carcinogens"

日時：1981年9月26日(土)、27日(日)

会場：京都市左京区 京都会館 第2ホール

I シンポジウム

食物、大気、水、農薬、医薬品、化粧品など
環境中の変異原、がん原物質についての研究報
告（４セッション）

II パネル討論

職業および産業に関連した変異原，がん原物質の検定法や規制に関する討論（3パネル）

外国からの主な参加予定者

B. Ames (アメリカ), H. F. Stich (カナダ)
D. Wild (西ドイツ), J. Moutschen (ベル
ギー), L. Fishbein (アメリカ),
A. Carere (イタリア), W. Lijinsky (アメリカ)
他 演者約20名。

参加希望者は下記へ御連絡下さい。折返し参加申込書をお送りします。参加費は 15,000 円（プログラム、パーティ会費を含む）、申込みの締切は 8 月 15 日です。

なお一般からの講演申込みはお受けしないことになっていますので御了承下さい。また、京都シンポジウムの特色を打ち出す企画も追加したいと考えています。御意見、御希望をお寄せ下さい。

〒602 京都市上京区今出川通烏丸東入

同志社大学工学部生化学研究室

京都サテライトシンポジウム

準備委員會事務局

電話 (075) 251-3919

(委員長会費助成) 一 岡 西

—— 編 集 後 記 ——

昭和56年も半ばになってしまいましたが、「環境変異原研究」をお届けいたします。9月の第3回国際環境変異原会議を前に、皆様お忙しい毎日と思います。本号は昭和55年11月28日、29日に岡山市の総合福祉会館で開催された日本環境変異原学会第9回研究発表会の特集号として編集いたしました。発表会での特別講演やパネル討論は要旨集に内容が掲載されていないので、ここにまとめたのは大いに意義があらうかと思ひます。

最近、変異原とがんとの関係が新たな観点から盛んに論議され、会員各位も深い関心をもって見て居られると思います。9月の国際会議や、12月3日、4日に予定されている日本環境変異原学会第10回研究発表会でもこの問題が論じられることが期待されます。

われわれの身のまわりにはまだまだ調べればいろいろな変異原があり、スクリーニングを続けることは大切であると感じるこのごろです。皆様の御健闘を祈って居ります。(H)

日本環境変異原学会会則

第1条 本会は日本環境変異原学会(The Environmental Mutagen Society of Japan)と称する。

第2条 本会は人間環境における突然変異原、特に公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。

第3条 本会の会員は、正会員および賛助会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、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、賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。

第4条 本会に入会を希望するものは、所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込みものとする。入会の可否は評議員会において決定する。

第5条 会員は毎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評議員会において審議し総会において定める。

第6条 本会はそ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、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
2. Mutation Research 誌の特別巻を特価で購入販布する。
3. 国際環境変異原協会に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
4. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次の通り役員および評議員を置く。

会 長 1名, 庶務幹事 1名,
会計幹事 1名, 会計監査 2名
および評議員若干名。

評議員は全会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。庶務幹事、会計幹事および会計監査は会長が委嘱する。

この他会長は必要な場合には会員の中から若干名を指名し総会の承認を得て、評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

第8条 評議員会は会員を代表し、事業計画、経費の収支、予算決算およびその他の重要事項について審議する。

第9条 本会は年1回総会を開く。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10条 本会の事務執行機関は会長および2名の幹事をもって構成する。会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員を置く。

附 記

1. 本会則は昭和53年1月1日より施行する。
2. 本会は事務所を静岡県三島市谷田1111番地に置く。
3. 正会員および賛助会員の会費はそれぞれ年額3,000円および1口20,000円とする。

ただし、Mutation Research 誌の特別巻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。

昭和 56 年 7 月 1 日 印刷

昭和 56 年 7 月 10 日 発行

編集者 早 津 彦 哉

岡山大学薬学部薬品化学教室

〒700 岡山市津島中 1-1-1

TEL 0862-52-1111

印刷所 耕 文 協 会

〒700 岡山市丸の内 1-7-4

TEL 0862-22-7887