

# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

S. Arimoto

Vol. 5 No. 2 1983

---

## 目 次

---

### 第11回大会発表講演に関連して

#### 〔変異原の試験法〕

修復DNA合成を指標とする胃がん原物質および大腸がん原物質の検索

降旗 千恵・山脇 裕子・金 賢淑

守谷 宏毅・児玉 協子・松島泰次郎 ..... 1

染色体異常誘発試験における代謝活性化法について

祖父尼俊雄・松岡 厚子 ..... 4

ショウジョウバエにおけるBasc法と付着X法の比較

井上 寛 ..... 7

---

#### 〔変異原の検出〕

ニトロフラン剤の変異原性 富田 黙・中村 好志 ..... 10

キイロショウジョウバエにおける窒素酸化物とその反応生成物の遺伝的

影響 — NO<sub>2</sub>を中心として — 大嶋加代子・綾本 歳一

吉川 黙・塩見 敏男 ..... 14

---

#### 〔食品の変異原性〕

亜硝酸処理により生成するしょう油の変異原性 若林 敬二 ..... 18

調理食品の変異原性について — 青緹法による変異原活性の測定

村岡 知子・大下 市子 ..... 22

油脂の酸化と変異原活性について 並木 和子 ..... 25

---

#### 〔変異原の代謝〕

加熱食品中変異原IQの代謝的活性化

加藤 隆一・山添 康・鎌滝 哲也 ..... 29

P-450-サルフォトランスフェラーゼによる7, 12-

ジメチルベンツ[a]アントラセン(DMBA)の活性化

渡部 烈 ..... 32

---

## 〔変異原の修飾〕

$\alpha$ -ピロンおよびポリアミン共存系の変異原性について

古川 秀之・岡戸 信夫

河井 一明・北川 博美 ..... 36

## 〔変異発現の機構〕

アブリシアトキシンおよびその誘導体のプロモーション活性

藤木 博太 ..... 40

環境変異原 —— カイコの研究から見た一見解

田島弥太郎 ..... 43

## 〔変異原による環境汚染〕

都市大気浮遊粉じんの変異原性の経日変動パターン——

大気モニタリング方法の検討を中心として

松下 秀鶴 ..... 46

大気およびディーゼル排ガス中ニトロアレンの変異原性

常盤 寛 ..... 50

給油所排水中の1-ニトロピレン

大西 克成・木内 武美・真鍋 芳樹

脇坂 和見・田原 功・秋本 茂 ..... 54

ステンレス鋼溶接作業者の末梢血液リンパ球の染色体について

奥 貴美子・中西 良文・八上 享司 ..... 59

日本環境変異原学会会則 ..... 63

編集後記 ..... 64

## 修復DNA合成を指標とする胃がん原物質および大腸がん原物質の検索

東京大学医科学研究所

降旗 千恵・山脇 裕子・金 賢淑  
守谷 宏毅・児玉 協子・松島泰次郎

### 1. はじめに

現在、変異原物質および化学がん原物質の第一次スクリーニング法として、Amesらの開発した、*Salmonella typhimurium* を用いる変異原性試験が広く用いられている。しかしながら、化学物質が動物の体内にいずれかの経路で入ると、どの臓器に運ばれ、どの細胞に吸収され、代謝活性化され、解毒され、排泄されるなど、多くの要素が絡んでくる。それ故、細菌で変異原性が陽性となった物質が、動物で必ずしも陽性とは限らない。また陽性の場合にも臓器特異性が生ずる。そこでわたくし達は、動物を用いる *in vivo* の試験法として、胃と大腸について、修復DNA合成を指標とする方法を開発したので紹介したい。

### 2. 修復DNA合成の検出法

(FurihataとMatsushima, 1982)

1群5頭のF344/Du Crj 6~8週令雄ラットにがん原物質をDMSOまたはH<sub>2</sub>Oに溶かして胃チューブで投与した。大腸の一部の実験では注腸した。対照群では溶媒のみを投与した。投与2~4時間後に、個別に、胃または大腸を取り出し、はさみで粘膜を切り取り、メスでさらに細かく刻んで、L字管に入れ、L-15培地、10 μCi/ml [<sup>3</sup>H]チミジン、±10mM ヒドロキシウレア(HU、複製DNA合成の阻害剤)、100 μg/ml ストレプトマイシン、100 単位/ml ベニシリソウで37°C 2~3時間振盪培養した。組織からのDNA分画をSchmidt、Thanhauser、Schneider(1957)の方法で抽出し、一部を液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し、一部を3,5ジアミノ安息香酸法(KissaneとRobins, 1958)でDNAを定量した。

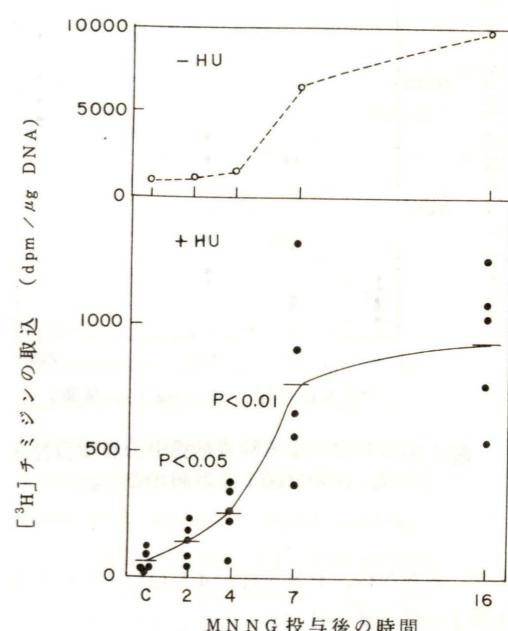


図1 MNNGによる腺胃粘膜中の修復DNA合成と総DNA合成。●：ラット1頭、-：平均値、○：5頭の平均値、C：対照。

この図は総DNA合成、+HUの図はHUで複製DNA合成を90~95%阻害した時のDNA合成である。+HUの図で、投与後2および4時間の値から対照(C)値を差し引いた値が修復DNA合成である。7および16時間後では、総DNA合成が7~11倍上昇する。それ故HUで阻害しても、阻害されずに残るbackgroundの複製DNA合成が上昇するので、7および16時間後の修復DNA合成の真の量は明らかでない。腺胃にがんを誘発する、N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(ENNG)、N-プロピル-N'-ニト

口-N-ニトロソグアニジン(PNNG)、4-ニトロキノリン-1-オキサイド(4NQO)とN-ニトロゾ-N-メチルウレタン(NMUT)も同様の時間経過を示し、投与後2および4時間で修復DNA合成が検出でき、16時間後に総DNA合成の顕著な上昇があった。図2はMNNG投与2時間後に屠殺した結果で、投与量一反応を示

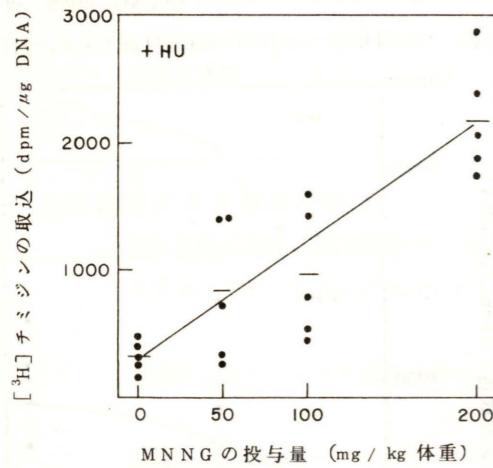


図2 MNNGによる腺胃粘膜中の修復DNA合成。記号は図1を参照のこと。

した。ENNG、PNNG、4NQOとNMUTも表1の投与量で投与量一反応を示した。

表1 腺胃における修復DNA合成

がん原物質	投与量 mg/kg体重	腺胃での 修復DNA合成	腺胃での がん原性
M N N G	50 - 200	+	+
E N N G	100 - 500	+	+
P N N G	250 - 1000	+	+
4 N Q O	10 - 30	+	+
N M U T	23 - 90	+	+
M N U	30 - 120	-	-
A A	100 - 400	-	-
2 A A F	400 - 600	-	-
D M N	11 - 21	-	-
T r p - P - 1	85 - 254	-	-
T r p - P - 2	27 - 104	-	-

略号は本文参照のこと。

図3は前胃にがんを誘発し、腺胃にはがんを誘発しない1-メチル-1-ニトロソウレア(M

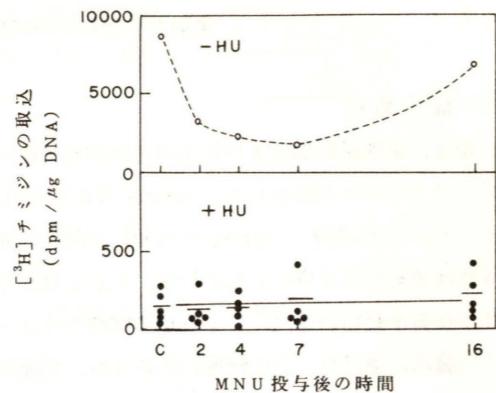


図3 MNUによる腺胃粘膜中のDNA合成。記号は図1を参照のこと。

NU、90 mg/kg 体重)の腺胃粘膜への作用の時間経過である。修復DNA合成も総DNA合成の上昇もなかった。前胃がん原物質Aristolochic acid (AA)でも修復DNA合成はなかった。肝がん原物質2-アセチルアミノフロレン(2AAF)、3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-b]インドール(トリップ-P-1)、3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド[4,3-b]インドール(トリップ-P-2)、ジメチルニトロサミン(DMN)も腺胃粘膜に修復DNA合成を誘起しなかった。

以上の結果から、がん原物質投与2~4時間後が修復DNA合成検出に適していることが明らかになった。がん原物質の臓器特異性と修復DNA合成の誘起とはよく一致した。また投与後16時間後の総DNA合成の上昇も腺胃がん原物質に例外なく見られた。

#### 4. 大腸がん原物質

図4は大腸にがんを誘発するメチルアゾキシメタノール酢酸(MAMAc、129 mg/kg体重、経口投与)の大腸粘膜への作用の時間経過である。

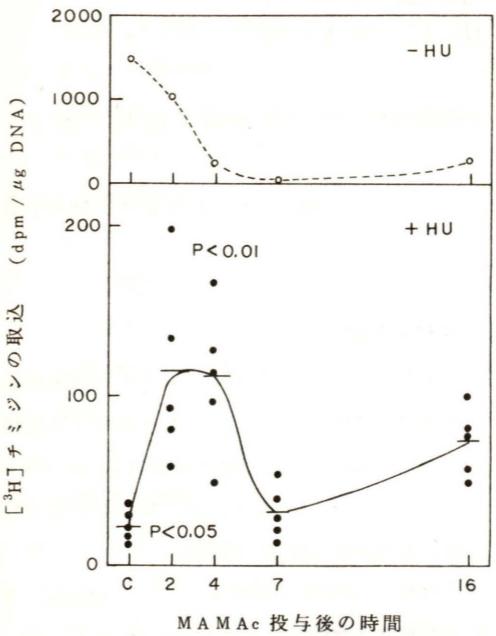


図4 MAMAcによる大腸粘膜中の修復DNA合成と総DNA合成。記号は図1を参照のこと。

-HUの図は総DNA合成、+HUの図HUで修復DNA合成を95%以上阻害した時のDNA合成である。+HUの図で、投与後2および4時間で修復DNA合成が検出された。7時間後の値は、MAMAcによる総DNA合成の顕著な阻害を反映している。このように大腸では、胃と違って、がん原物質による総DNA合成の増加がないので、数日連続投与して、2~4時間後に屠殺すると、修復DNA合成は増加して検出し易くなる。MAMAcと、注腸により大腸にがんを誘発するMNNGとMNUとは表2の投与量で投与量一反応を

表2 大腸における修復DNA合成

がん原物質	投与法	投与量 mg/kg体重	大腸での 修復DNA 合成	大腸での がん原性
M A M A c	経口	63 - 198	+	+
	注腸	62 - 124	+	+
M N N G	注腸	10 - 25	+	+
M N U	腸	9 - 90	+	+
D M N	経口	6.5 - 26	-	-

略号は本文参照のこと。

示した。しかしながら大腸にがんを誘発しないジメチルニトロサミン(DMN)は修復DNA合成を誘起しなかった。大腸でもがん原物質の臓器特異性と修復DNA合成の誘起は一致した。

#### 5. おわりに

以上述べたように、がん原物質投与2~4時間後に、修復DNA合成をin vitroで測定することにより、胃がん原物質は2日で、大腸がん原物質は2~4日で検索できることが明らかになった。この方法ではがん原物質のイニシエーション作用を測定しているので、さらに胃と大腸粘膜でのプロモーション作用を短期間に測定する方法も開発して行きたい。

#### 文 献

- Furihata, C., and Matsushima, T.: Unscheduled DNA synthesis in rat stomach — Short-term assay of potential stomach carcinogens. Banbury Report 13, Indicators of genotoxic exposure. Cold Spring Harbor Laboratory, 123-135 (1982). Kissane, J.M., and Robins, E.: The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system, J. Biol. Chem., 233: 184-188 (1958). Schneider, W.C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. Methods in Enzymology, 3: 680-684 (1957).

# 染色体異常誘発試験における代謝活性化法について

国立衛生試験所・変異原性部 祖父尼俊雄・松岡 厚子

## 1. はじめに

哺乳動物培養細胞による染色体異常誘発試験には1975年頃より代謝活性化法が導入されるようになったが、その方法は微生物などの試験に適用されているものと基本的には変わらない。代表的なものがラットなどの肝ミクロソーム分画(S9)を用いる方法であり、これに加えて、代謝酵素を比較的よく保持している細胞をフィーダー層として用いる細胞経由法や、さらには哺乳動物個体を利用する宿主経由法が用いられることがある。S9を用いる方法も研究者によって微細な点で異っており、これらの方法について逐次紹介することは紙面の都合上できないため、他の成書(乾と西、1982)を参照されたい。ここでは当研究室においてこれまで行ってきたS9を用いる代謝活性化法について簡単に紹介する。

S9を用いる代謝活性化法は大別すると、剥離した浮遊細胞を検体およびS9 Mixとともに振盪する方法(振盪法)(BimboesとGreim, 1976; Natarajanら, 1976)と単層で生育している細胞を検体とS9 Mixで処理する方法(静置法)(StichとLaishes, 1975; Weinsteinら, 1977)とに分けられる。前者については当研究室において少し改良を加えて用いており、ジアルキルニトロサミン系の化合物について良好な結果が得られている(Matsuokaら, 1979)。しかし、多環芳香族炭化水素については必ずしも適切とはいえず、また本来単層で生育する細胞を剥離して浮遊状態で振盪させるため、細胞毒性が強く現われる傾向がある。後者の静置法はより穏やかに処理することができ、当研究室においても検討を加えてきた

ので、両法を比較しながら以下にその結果を述べる。

## 2. 材料と方法

- (1) 細胞: チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)。10%の子牛血清を含むEagleのMEM培地(GIBCO 410-1100)を用い、5%CO<sub>2</sub>、飽和37°Cで培養。倍加時間は約15時間。
- (2) 検体: ジメチルニトロサミン(DMN)(東京化成工業㈱)、ベンゾ(a)ピレン(B(a)P)、3-メチルコラントレン(3-MC)(和光純薬工業㈱)、7,12-ジメチル(a)アントラセン(DMBA)、3'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼン(3'-MeDAB)、フェナセチン(厚生省がん研究助成金による研究班)
- (3) S9: PCB 500 mg/kg 1回投与したラット雄7週令より摘出した肝臓をホモジナイズし、9000×g 20分間遠心した上清。
- (4) S9 Mix組成: S9 3ml、20mM HEPES 2ml、50mM MgCl<sub>2</sub> 1ml、330mM KC1 1ml、40mM NADP 1ml、50mM G-6-P 1ml、蒸留水 1ml
- (5) 処理方法

a. 振盪法 培養して3日目の細胞を集め $1 \times 10^7/\text{ml}$ の細胞懸濁液を調製する。試験管に細胞液0.2 ml、S9 Mix 1mlおよび検体溶液0.2 mlを加えて、37°C恒温槽で約35°の傾きで固定し3時間振盪させる。その後、遠心して細胞だけを集めシャーレに再播種後、さらに21時間培養して染色体標本を作製する。

b. 静置法  $2 \times 10^4/\text{シャーレ}$ の細胞を播き、3日後に検体およびS9 Mixで処理する。処理時間は6時間で、処理終了後新しい培養液と交換し、さらに18時間培養して染色体標本を作製する。

- (6) 染色体標本作製: 標本作製2時間前にコレセミド(0.2 μg/ml)を加え、0.2%トリプシンで細胞を剥離し、0.075 M KC1溶液で低張処理後、酢酸:メタノール=1:3の固定液で固定し、空気乾燥法で染色体標本を作製する。

## 3. 結果及び考察

### (1) 回復時間の検討

a. 振盪法 DMN 2.0 mg/mlで3時間処理後、新しい培養液で再播種し経時的に染色体観察を行った結果を図1に示す。24時間

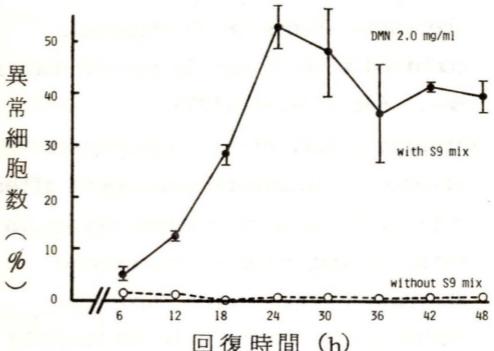


図1 DMNによる染色体異常頻度と回復時間(振盪法、3時間処理)

の回復時間をおいた時に染色体異常出現頻度が最高となった。

b. 静置法 DMN(1.0 mg/ml)およびB(a)P(0.02 mg/ml)で6時間処理後、新しい培養液と交換し経時的に染色体標本を作製した(図2)。DMNでは約18時間の回復時間をおいた時に染色体異常出現頻度が最高に達した。B(a)Pは12時間で最高を示したが、約18時間でも同程度の出現頻度を保っていた。以下は18時間を回復時間として実

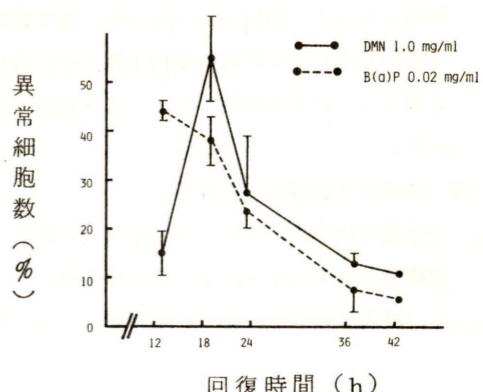


図2 DMNとB(a)Pによる染色体異常頻度と回復時間(静置法、6時間処理)

験を行った。

### (2) S9濃度の検討

B(a)P 0.02 mg/mlで、S9の濃度を変えた染色体異常出現頻度を比較した。図3に示されているようにS9濃度5%で異常頻度が

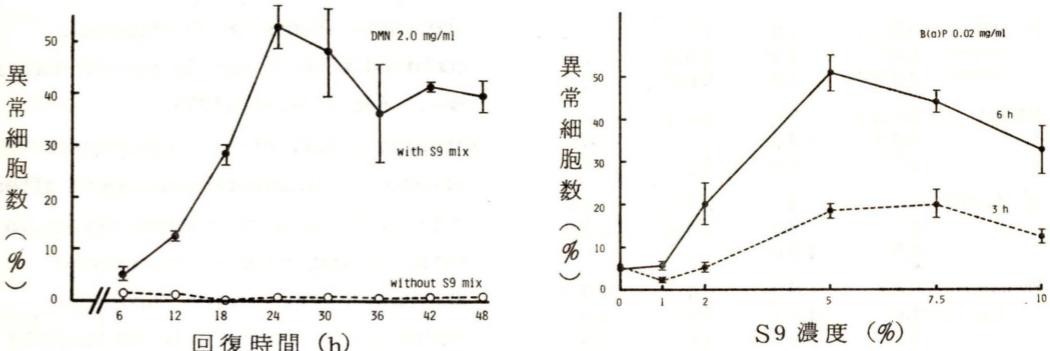


図3 B(a)Pによる染色体異常頻度とS9濃度(静置法、実線: 6時間処理、点線: 3時間処理)

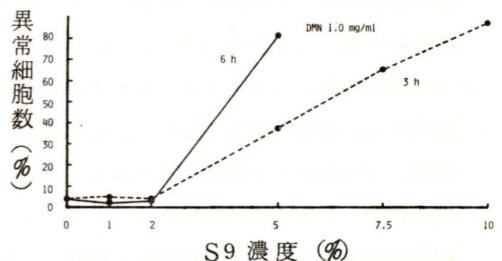


図4 DMNによる染色体異常頻度とS9濃度(静置法、実線: 6時間処理、点線: 3時間処理)

最高となった。DMNについても、S9濃度5%から明らかな異常頻度の上昇がみられた(図4)。以下の実験は5%のS9濃度で行った。

### (3) 振盪法と静置法の比較

6種の化合物について両法を用いて比較した結果を表1に示す。すべての化合物において、静置法の方が振盪法に比べて明らかに低

表1 染色体異常誘発試験における代謝活性化—振盪法と静置法の比較

化合物	振盪法 <sup>1)</sup>		静置法 <sup>2)</sup>	
	濃度 (mg/ml)	異常細胞 (%)	濃度 (mg/ml)	異常細胞 (%)
DMN	1.0	4.00	0.25	5.3
	2.0	5.47	0.5	1.30
	4.0	7.73	1.0	7.33
B(a)P	0.13	6.0	0.01	2.23
	0.26	8.0	0.02	4.80
	0.51	22.0	0.04	47.6
3-MC	0.5	1.0	0.02	1.03
	1.0	1.0	0.04	1.20
	2.0	3.0	0.08	1.23
DMBA	0.125	8.0	0.05	5.23
	0.25	16.0	0.1	6.06
	0.5	25.0	0.2	3.83
3'-MeDAB	2.0	4.0	0.025	2.6
	4.0	7.0	0.05	2.56
	8.0	10.0		
Phenacetin	0.8	9.0	0.4	1.90
	1.6	18.0	0.8	2.33
	3.2	51.0	1.6	2.60

1) 3時間処理

2) 6時間処理

い濃度で染色体異常が出現した。この差異は静置法において処理時の細胞数が10倍程度少ないと起因していると考えられる。以上の結果から、現在静置法を用いて、処理時間6時間、回復時間18時間、S9濃度5%の条件を標準として代謝活性化法を行っているが、細胞の損失もなく、実験操作も簡便で、良好な結果を得ている。

染色体異常試験における代謝活性化に関する

報告もこれまでかなりの数にのぼっている。しかし、とくに染色体異常に直接関与する代謝産物の検出やその生成量と染色体異常の定量的関係などについてはまだ十分に検討されているとはいえない。実験操作が簡便でかつ効果的な方法を用いて、今後これらの面についても広く検討していく必要があろう。

### 文 献

Bimboes, D., and Greim, H.: Human lymphocytes as target in a metabolizing test system in vitro for detecting potential mutagens: *Mutation Res.*, 35: 155-160 (1976)

乾直道、西義介: 化学物質の代謝活性と染色体異常、「放射線・化学物質と染色体異常」、医学書院、175-200 (1982)

Matsuoka, A. et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro: *Mutation Res.*, 66: 277-290 (1979)

Natarajan, A.T. et al.: Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system in vitro I. Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by diethylnitrosamine(DEN) and dimethylnitrosamine(DMN) in CHO cells in the presence of rat-liver microsomes: *Mutation Res.*, 37: 83-90 (1976)

Stich, H.F., and Laishes, B.A.: The response of *Xeroderma pigmentosum* cells and controls to the activated mycotoxins, aflatoxins and sterigmatocystin: *Int.J. Cancer*, 16: 266-274 (1975)

Weinstein, D. et al.: Chromosomal effects of carcinogens and non-carcinogens on WI-38 after short term exposures with and without metabolic activation: *Mutation Res.*, 46: 297-304 (1977)

## ショウジョウバエにおける *Basc* 法と付着 X 法の比較

国立遺伝学研究所 井上 寛

を Lewis と Bacher (1968) の方法によって1昼夜、EMS処理 ( $2.5 \times 10^{-4}$  M,  $2.5 \times 10^{-3}$  M,  $2.5 \times 10^{-2}$  M) を施した後、下記の2法で分析した。

### (1) *Basc* 法

図1に*Basc* 法による交配図を示した。シ

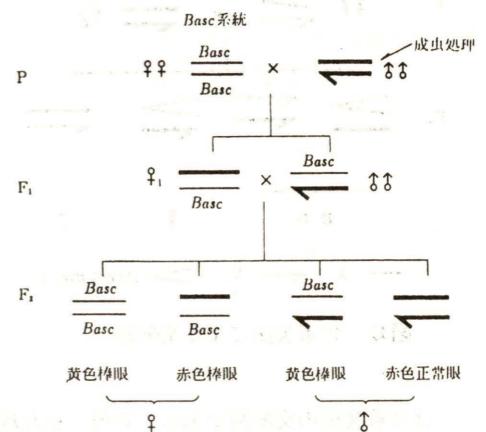


図1 *Basc* 法による交配図

ショウジョウバエでは、雌に限り染色体の長さに比例して組換えが起こる。しかし*Basc*のように複雑な逆位があると、雌でもその染色体は全長にわたって交叉が抑制され、相手方の染色体はそのまま次代へ伝えられる。処理された雄を*Basc*の雌と2日間交配した。F<sub>1</sub>で1匹のヘテロ(*Basc/+*)の雌を選び*Basc*雄に交配する。その結果、F<sub>2</sub>では雄のX染色体が*Basc*のものと、処理された染色体のものとが同数ずつ羽化していく。もし処理された染色体に劣性致死突然変異があると、F<sub>2</sub>の正常型の雄が出てこない。F<sub>2</sub>の交配の時、雌1匹ずつの交配を多くつくることによって、致死遺伝子をもつ染色体の頻度が求められる。

### 2. 材料と方法

野性型純型 Oregon-R の1~2日の成虫雄

## (2) 付着X法

付着X染色体とは通常棒状であるX染色体の動原体付近で2本のX染色体が付着しV字型になったものでXXと表記する。この染色体は通常、ある1本のX染色体を雄個体を通じて毎世代残していくときに用いられる染色体である。XXYは♀となりXXXは発生途中で死亡する。YYの個体も生存不可のためXXY♀と正常♂を交配すると、次世代以後は常にXXY♀とXY♂のみが生じる。図2

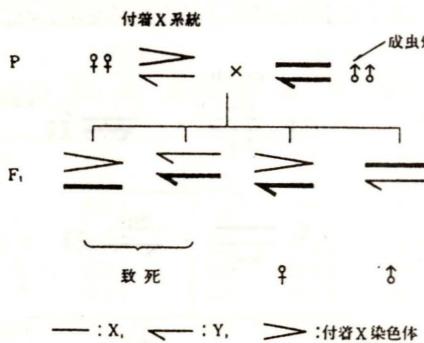


図2 付着X法による交配図

は付着X法の交配図である。処理された雄を2日間、付着Xの雌と交配する。雄個体のもつX染色体が無傷なら、F<sub>1</sub>で生じる♀：雄の比は1：1になる。もしX染色体に致死突然変異があれば必ずF<sub>1</sub>の雄個体は死ぬので、F<sub>1</sub>では雄の比率が減少する。個体数が対照区(♀:♂=a:d)、実験区(♀:♂=c:d)であった場合、致死相当量は $(c \times b/a-d)/(c \times b/a)=1-a^d/cb$ となる。効果のない場合のindexはゼロ、♂がまったく出ない場合は1となり、値が大きいほど突然変異性の強いことを表わす。

また $2.5 \times 10^{-4} M$ のEMS濃度でOregon-R、y(yellow) w(white)、w mei-41<sup>D5</sup> & yf:=およびy mei-9<sup>a</sup> & yf:=系統の雄を処理した後、付着X系統の雄と交配した。

2日ごとのBroodを5回設け、突然変異の

検出を試みた。mei-41<sup>D5</sup>とmei-9<sup>a</sup>は、各々タイプの異なる修復欠損の遺伝子である。

## 3. 結果と考察

対照区と3段階のEMS濃度で誘発された突然変異を両方法で分析した。結果を表1に示す。

表1 付着X法とBasc法の対比、( )内の数値は各々、しらべられた個体数、もしくは染色体数である。

EMS濃度 (M)	付着X法による		Basc法による致死 染色体頻度	
	index		♀	♂
対照区	0	(2206)	0.0013 (1495)	
$2.5 \times 10^{-4}$	0.068	(2041)	0.0262 (534)	
$2.5 \times 10^{-3}$	0.449	(1321)	0.1542 (214)	
$2.5 \times 10^{-2}$	0.781	(275)	—	

EMS濃度が0から $2.5 \times 10^{-3} M$ まで増すにつれて付着X法では0から0.449へ、Basc法では0.0013から0.1542へ突然変異率が上昇した。617,776,9染色体をBasc法で分析したCrowとTemin(1964)の対照区の結果では、0.0010～0.0073の範囲で平均が0.0026であった。またEMS $2.5 \times 10^{-3} M$ での渡辺(1980)のBasc法の結果は0.1019となり本実験の0.1542とほど離れていない。 $2.5 \times 10^{-2} M$ におけるBasc法の結果はサンプル数が少なくて出せなかったがKaplanら(1970)の0.2837、渡辺(1980)の0.2400という値が報告されている。この値を今回のデータに加えて両方法の相関をしらべると有意な正相関が見られた( $r=0.999$ ,  $P<0.01$ , d.f.=2)。付着X法の、Basc法に対する一次回帰系数は0.36となり、Basc法で10%の頻度増加は付着X法のindexで3.6の上昇に相当する。

表2は野生系統と修復欠損系統を用いて、EMS( $2.5 \times 10^{-4} M$ )処理後の突然変異を付

付着X法で分析した結果である。付着X系統で

表2 付着X法でしらべたEMS $2.5 \times 10^{-4} M$ による突然変異。

系統	対照区		Brood: 1+2+3			Brood: 4+5		
	♀	♂	♀	♂	Index	♀	♂	Index
Oregon-R	768	769	616	583	0.055	153	160	0
y <sup>w</sup>	1080	1308	704	895	0	158	258	0
w mei-41 <sup>D5</sup>	647	718	756	736	0.123	253	252	0.102
y mei-9 <sup>a</sup>	706	730	1028	979	0.079	165	144	0.156

は通常雄が雌の数を上回る。若い時期の材料が少なくなり比較は難しいが、全体的に修復欠損系統は修復系統に比べて突然変異が高くなること、そしてこの違いは若い時期でより顕著になることを示唆している。これらの結果はBasc法を用いたSmithら(1982)の結果と同じ傾向を示す。

## 4. おわりに

このように付着X法はBasc法の結果と有意な相関を示すうえに実験的規模が少なくてすむ。しかしBasc法はF<sub>3</sub>で再テストが可能な点も加えて、その精密性において付着X法にまさる。また高い投与量の場合、付着X法のindexには優性致死が含まれてくることも考慮に入れねばならない。

## 文 献

- Crow, J.F. and Temin R.G.: Evidence for the partial dominance of recessive lethal genes in natural populations of *Drosophila*. Am. Natur., 98: 21-33 (1964)  
 Kaplan, W.D., Seecof, R.L., Trout, W.E., Pasternack, M.E.: Production and relative frequency of maternally influenced lethals in *Drosophila melanogaster*. Am. Natur., 104: 261-271 (1970)

Lewis, E.B. and Bacher, F.: Methods of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. D.I.S., 43: 193 (1968)  
 Smith, P.D., Dusenberry, R.L., Cooper, S.F. and Baumen, C.F.: Examining the mechanism of mutagenesis in DNA repair-deficient strains of *Drosophila melanogaster*. in: T. Sugimura et al. (Eds.), Environmental Mutagens and Carcinogens, Univ. Tokyo Press, Tokyo and Alan R. Liss, New York, pp: 147-155 (1982)

渡辺隆夫: 化学変異原のショウジョウバエによる検出実験。フジテクノシステム刊「変異原と毒性」第11集: 74-82 (1980)

# ニトロフラン剤の変異原性

静岡薬科大学 富田 熊次・中村 好志

## 1. はじめに

ニトロフラン剤といえば、今もわれわれの記憶に新しいのはAF-2：(2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミドである。周知の通り、AF-2は過去食品添加物保存料として用いられたが、その変異原性(1973年)、がん原性(1974年)が明らかになって使用禁止となった。以来、とくに医薬品として用いられていた数々のニトロフラン剤は、再評価によって削除され、現在ヒト対象の医薬品としてはニトロフラントイシンを残すのみとなっている。

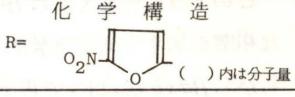
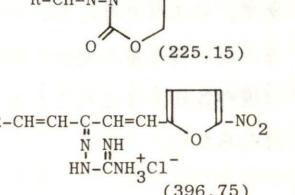
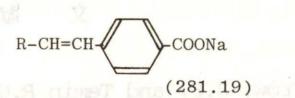
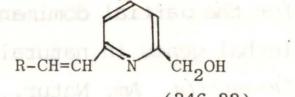
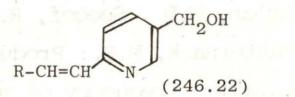
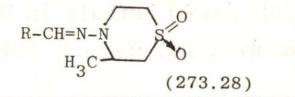
ここでとり上げるニトロフラン剤は主に畜産動物の疾病の治療や予防に用いられてきた

いるもので(高畠、1981；江草、1983の総説参照)抗菌スペクトルが広く、抗菌力が強く、また耐性菌も生じ難い等数々の特徴を有し、優れた薬物として用いられてきた(いる)。

たまたま、著者らはニフルピリノール(以下NPと省略)一わが国で主に薬浴剤として使用されてきたが、昨年春以来使用が中止されている)について、その変異原性を *S. typhimurium* TA 100 で検討したところ、AF-2 に比べ約 30 倍というきわめて強い変異活性を示すことを認めた(Nakamuraら、1982)。(表1)

その後、他のニトロフラン剤についても同様な研究を行ったところ、いずれもかなり強い変

表1 ニトロフラン剤の名称と構造

略称	名 称	化 学 構 造
F Z	フラブリドン N'F-180	N-(5-nitro-2-furylidine)-3-amino-2-oxaazolidin-2-one  (分子量 225.15)
P Z	パナゾン ジフラゾン ニトロビン	1,5-bis(5-nitro-2-furyl)-1,4-pentaene-3-one amidino-hydrazone hydrochloride  (分子量 396.75)
N S	ニフルスチレン酸 ナトリウム	Sodium 4-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]benzoate  (分子量 281.19)
N P	フルピリノール ニフルピリノール	6-hydroxymethyl-2-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]pyridine  (分子量 246.22)
5-NP	5-ニフルピリノール	5-hydroxymethyl-2-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]pyridine  (分子量 246.22)
N T	ニフルチモックス	3-methyl-4-[5-nitrofuran-2-ylamino]tetrahydro-4H-1,4-thiagine-1,1-dioxide  (分子量 273.28)

異活性を示すことが明らかとなり、衛生学上の観点から早急な検討が必要と思われた。すなわち、これら化合物は、それが飼料添加剤または動物用医薬品として用いられた時、動物体内あるいは環境(土壤、水)で代謝、分解されると思われるが、条件によっては動物体内での残留(例えは魚でのFZの残留、永田ら、1982)，環境での蓄積が起こることが考えられるからである。著者らはとりあえず、これらニトロフラン剤についてその変異原性を指標に、S9や光(自然光)分解に基づくと思われる活性の変化あるいは、魚における活性の減少を検討した。

本稿ではこれらの結果について総合して述べる。

## 2. ニトロフラン剤の変異活性

ニトロフラン剤6種について、それらの *S. typhimurium* TA 100、TA 98 および TA 97 に対する変異活性を Ames 法(プレインキュベーション法)で検討したところ、いずれのニトロフラン剤も TA 100、TA 97 に対しあなりの変異活性を示したが、TA 98 に対しては、ほとんど活性を示さなかった。TA 100 および TA 97 に対し、殺菌作用をほとんど示さない濃度を選び、用量と活性を両対数グラフにプロットすると、いずれのニトロ

フラン剤でも両者の間には直線関係が得られた(図1参照、TA 97での図は省略)。これより各ニトロフラン剤 1 μg 当りの変異活性(His+コロニー数)を求めるとき、TA 100 および TA 97 に対しそれぞれ FZ :  $3.66 \times 10^4$ 、 $7.67 \times 10^2$ 、PZ :  $1.99 \times 10^3$ 、 $4.77 \times 10^2$ 、NS :  $1.07 \times 10^5$ 、 $9.35 \times 10^2$ 、NP :  $1.25 \times 10^6$ 、 $6.98 \times 10^4$ 、5-NP :  $3.65 \times 10^4$ 、 $3.05 \times 10^4$ 、NT :  $8.80 \times 10^1$ 、 $5.50 \times 10^1$  となり、化学構造のわずかな違いが変異活性にかなり大きな違いをもたらすことがわかった。ここで FZ、PZ の TA 100 に対する活性は、文献値とほぼ一致していた。これら6種のニトロフラン剤の中では NP と NS がともにその活性が大きく、TA 100 に対しては AF-2 ( $4.19 \times 10^4$  His+ rev./μg) のそれぞれ約30倍、2.6倍の活性であった(表2参照)。

## 3. S 9 M i x、太陽光による変異活性の変化

NP を S 9 Mix で処理すると、その活性は処理しないものに比べ 1% 以下に、また 5-NP では 6.3% に減少したが、同じ条件で PZ (23.5%)、FZ (50%)、NS (67.8%) の順に低下は小さくなり、NT では 13.8.4% と逆に S 9 Mix により活性化された(表2参照)。一方、光に対しては、FZ、PZ、NS、NP はいずれも著しく敏感で、太陽光下室温に

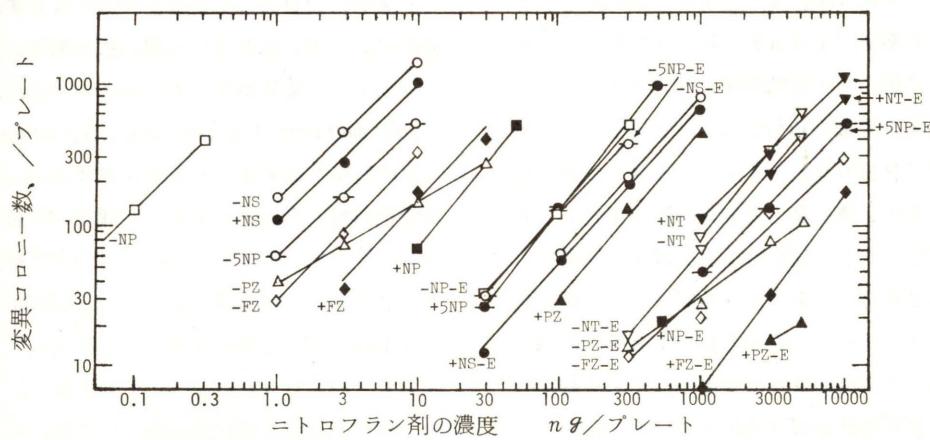


図1 ニトロフラン剤の *S. typhimurium* TA 100 に対する変異活性

表2 ニトロフラン剤の*S. typhimurium* TA 100に対する変異活性とラットS9あるいは光による変化。

ニトロフラン剤	変異活性 ( $\text{His}^+$ revertants / $\mu\text{g}$ )		
	-S9 Mix	+S9 Mix	+S9/-S9 (%)
FZ FZ-E <sup>*</sup> FZ-E/FZ(%)	36,600 33 0.9	18,300 6 0.03	50.0 18.2
PZ PZ-E PZ-E/PZ(%)	1,990 31 1.5	465 20 4.3	23.5 6.5
NS NS-E NS-E/NS(%)	107,000 800 0.75	72,600 739 1.0	67.8 92.7
NP NP-E NP-E/NP(%)	1,250,000 1,920 0.15	6,600 20 0.3	0.53 1
5-NP 5-NP-E 5-NP-E/5-NP(%)	36,500 13,300 36.4	2,312 49 21	6.3 0.4
NT NT-E NT-E/NT(%)	86 66 76.7	119 82 68.9	138.4 124.2

\*E : 4時間太陽光下、室温に放置。

4時間放置することによって変異活性は大きく低下し、放置前の数%以下となった。NPは、光に対し不安定であることが知られており（Shimizuら、1967）これは当然の結果と思われるが、異性体である5-NPやNTでは活性の低下は他の4化合物ほど大きくではなく、ここでも化学構造のわずかな違いによりかなりの差が認められた。

#### 4. 薬浴した魚体の変異活性の減衰

和金（体長5cm、20±1°Cで飼育）をFZとNPで薬浴（10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30分）した後、正常水に戻して一定時間後にサンプリングし、魚体全体を等量のDMSOと、3倍量のリン酸緩衝液（PH 6.0）でホモジナイズし、遠心分離後、その上清を使って変異活性をTA 100で調べた。FZ、NPともに2段階の減衰を示し（図2参照）、薬浴後3時間まで活性は急速に低下（それぞれ薬浴直後の18%、2.2%）したが、その後の変化は緩慢で、その直線部分から、変異活性がほぼ消失する（1.00  $\text{His}^+$  変異/ $\text{g}$ 組織）に要する時間はFZで6.2日、

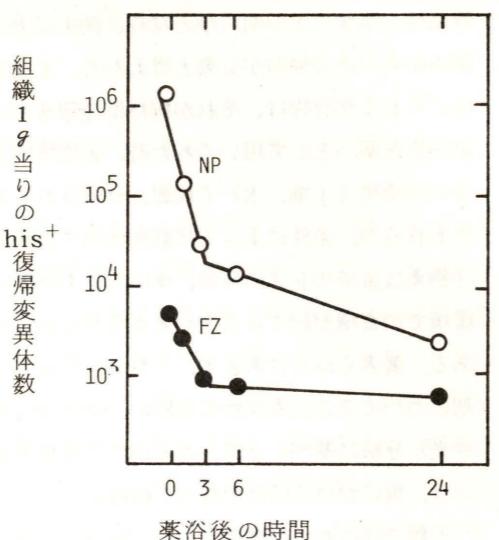


図2 ニトロフラン剤で薬浴した和金における変異活性の減衰。

和金をNP、FZ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有容器で薬浴（30分）し以後蒸留水に移した。魚体の変異活性の変化はTA 100で検討。

NPで2.4日であった。この結果はS9 Mixによる活性の減少と対応しており、少くとも金魚ではNPに比べFZの方が残留性が強いといえそうである。

#### 5. おわりに

FZおよびPZは現在わが国のみならず、世界的に広く用いられている飼料添加剤で、FZについては、変異原性〔*E. coli*(+)、*S. typhimurium* TA 100(+), *N. crassa*(+)〕、染色体異常〔ヒトリソバ球(-)〕、不定期DNA合成〔ヒトリソバ球(-)〕および、発がん性〔ラット(+)、マウス(+)〕が、またPZについては変異原性〔*S. typhimurium* TA 100(+)]、発がん性〔ラット(-)〕が知られている。（Bryanら、1978）。NSは、現在わが国で飼料添加物として用いられまた5-NPおよびNTはそれぞれ緑膿菌、シャ

ガス病に著効を示すことが福島ら、Van den Bossche(1978)により報告されているが、わが国ではまだ実用に供されていない。

NPはすでに述べたように、現在使用されていないがきわめて強い変異活性を示し、魚やマウスに対しても発がん作用をもつことが木村ら（1981、1982）によって明らかにされ、Squire(1981)の分類に従えば、ランクIに位置付けされるがん原性物質である。しかし、光やS 9による不活性化がきわめて大きいので魚体あるいは環境での残留は低いものと思われる。

ニトロフラン剤の構造の違いによる、変異活性の大きな差や発がんに見られる臓器特異性等興味ある問題が多くあるが、今回はページ数の関係ですべて割愛した。

終りに本研究に際し献身的な協力を惜しまれなかった院生、福島春生、学部学生、倉田幸子、交告伸弥の諸氏に感謝する。

#### 文 献

Bryan, G.T.: Nitrofurans: Chemistry, Metabolism, Mutagenesis and Carcinogenesis in Carcinogenesis-A Comprehensive Survey Vol. 4, Raven Press, New York (1978).

江草周三：水産用医薬品—その現状と将来—日本。

薬剤師会雑誌、35: 375-382 (1983)。  
福島清吾ら（静岡薬大）。未発表。

Kimura, I., Kumai, H., Taniguchi, Y., Nakamura, M., and Kitaori, H.: Chemical induction of proliferative pigmented lesions in croaker, Nibe (*Nibea mitsukurii*).  
日本癌学会第40回総会（札幌）記事、P 30 (No. 6) (1981).

Kimura, I. and Kitaori, H.: Carcinogenicity of Nifurpirinol in mice. 日本癌学会

第41回総会（大阪）記事、P 43 (No. 25) (1982).

永田知子、宮本文夫、佐伯政信：高速液体クロマ

トグラフィによる養殖魚中のニトロフラン誘導体の定量。食衛誌、23: 278-282 (1982)。

Nakamura, Y., Fukushima, H., Tomita, I., and Kimura, I.: Mutagenicity of Nifurpirinol (P-7138) in *Escherichia coli* WP2 and *Salmonella typhimurium* TA 100. Mutat. Res., 104: 61-66 (1982).

Shimizu, M., and Takase, Y.: A potent chemotherapeutic agent against fish disease: 6-hydroxy-methyl-2[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]pyridine(P-7138). Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 33: 544-554 (1967).

Squire, R.A.: Ranking animal carcinogenesis: A proposed regulatory approach. Science, 214: 877-880 (1981).

高畠英伍：畜水産用薬物の現状と問題点。衛生化学誌、27: 127-143 (1981)。

Van den Bossche, H.: Chemotherapy of parasitic infections. Nature, 273: 626-630 (1978).

# キイロショウジョウバエにおける窒素酸化物とその反応生成物の遺伝的影響

## —NO<sub>2</sub>を中心として—

長崎大学医学部・原爆後障害 大嶋加代子・綾木 賢一  
医療研究施設・遺伝学部門 吉川 熟・塙見 敏男

### 1. はじめに

石油および石炭をエネルギー源とする産業活動は必然的に窒素酸化物(NO<sub>x</sub>)を大気中に放出する。これら窒素酸化物には種々の化学組成の物質が存在する。生成されるものとしては大部分一酸化窒素(NO)で、一部二酸化窒素(NO<sub>2</sub>)が含まれる。このうち、NOは放出された後大気中で光化学反応等によりNO<sub>2</sub>に変化する。NO<sub>2</sub>は反応性が高く、それ自身にも突然変異原性があると同時に、変異原である亜硝酸(HNO<sub>2</sub>)や硝酸(HNO<sub>3</sub>)の前駆物質でもあり、さらに大気中の種々の汚染物質と反応し、その反応生成物が変異原性を示すことが明らかにされている(Tokiwaら, 1981)。

これらの化学物質のヒトへの遺伝的影響評価に際しては、少なくとも高等動物の生殖細胞に生じた突然変異が対象とされなければならない。

Inoueら(1981)はキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の生殖細胞系を用い、NO<sub>2</sub>とエチルウレア(EU)との反応生成物の変異原性を検討し、反応生成物エチルニトロソウレア(ENU)による高変異原性を報告している。

さらに、われわれはNO<sub>x</sub>のうちNO<sub>2</sub>の変異原性をNO<sub>2</sub>単独の変異原性、NO<sub>2</sub>と他の化学物質(EU)との間で生じる反応生成物の変異原性を曝露および投与条件を変え、詳細に検討した。

### 2. 実験材料

#### (1) キイロショウジョウバエの使用系統

Canton-S: 野生型、この系統のX-染色体上に誘発される劣性致死突然変異の検出を行う。  
0-1: *y sc<sup>s1</sup>* In 49 sc<sup>s</sup>; bw; st pp, 伴性劣性致死突然変異の検出を行うための標識遺伝子群をもった系統。

#### (2) 伴性劣性致死突然変異の検出

羽化後2~4時間のCanton-S雄に処理し、0-1の処女雌に2日毎に雌を替えて10日間交配を続けた。F<sub>1</sub>雌を個々に0-1雄と交配し、F<sub>2</sub>でのyellow雄の有無により突然変異を検出した。詳細は塙見(1980)を参照されたい。飼育には全実験を通して標準飼料を用いた。

### 3. Canton-S系統の伴性劣性致死突然変異の自然発生率(Historical control)

われわれの研究室における過去8年間の伴性劣性致死突然変異の自然発生率は0.1302% (65/49934)である。本実験においては個々の処理に対して対照群を設定しているが、処理群との突然変異率の比較はこのHistorical controlとの間で行った。

### 4. 変異原処理の方法とその結果

NO<sub>2</sub>の曝露は内径27mm、高さ120mmの

アクリル製容器内に180ppmのNO<sub>2</sub>標準ガスを流すことにより行った。1%ショ糖あるいはEU溶液は、ガラス繊維ろ紙を入れたアクリル製カップ(高さ12mm)を同容器内に置き注入した。注入後の溶液のpHはすべて酸性域である。

#### (1) NO<sub>2</sub>単独曝露の変異原性

1%ショ糖溶液を与えるながら(ウェット条件)NO<sub>2</sub>ガスに16~24時間曝露したところ得られた突然変異率は0.21% (1%水準で有意、KastenbaumとBowmanの方法による)で、自然突然変異率の1.7倍であった。NO<sub>2</sub>はショ糖溶液中のH<sub>2</sub>Oと反応し、キイロショウジョウバエに対して変異原性を示すHNO<sub>2</sub>及びHNO<sub>3</sub>を生成するため、ショ糖溶液を与えない条件(ドライ条件)でハエを16時間NO<sub>2</sub>ガスに曝露した。得られた突然変異率は0.13%で自然発生率とほぼ同じである。気体として取り込まれたNO<sub>2</sub>ガスには変異原性は認められなかった。NO<sub>2</sub>が水に溶け、その結果生じた反応生成物が変異原性をもつと考え、あらかじめNO<sub>2</sub>ガスを24時間曝露したショ糖溶液をハエに24時間経口投与したところ、突然変異率は1.23%であり、自然発生率の9.47倍であった(表1)。

表1: キイロショウジョウバエにおけるHistorical ControlとNO<sub>2</sub>曝露による伴性劣性致死突然変異率  
(処理条件の詳細は本文参照)

処理	調査染色体数	劣性致死	突然変異率%
Historical Control	49,934	65	0.1302
NO <sub>2</sub> 24時間曝露(ウェット条件)	19,647	43	0.2189
NO <sub>2</sub> 16時間曝露(ウェット条件)	5,142	10	0.1945
(小計)	24,789	53	0.2138
NO <sub>2</sub> 16時間曝露(ドライ条件)	5,313	7	0.1318
(NO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O)→投与	4,461	55	0.2329

(2) NO<sub>2</sub>とエチルウレアの併用投与による変異原性  
NO<sub>2</sub>と他の化学物質との反応生成物による変異原性の検討を目的としてエチルウレア(EU)を取りあげ、種々の条件下で実験を行った。エチルウレアそれ自体には変異原性はほとんど認められなかった(表2)。

表2: キイロショウジョウバエにおけるNO<sub>2</sub>とEUの併用投与による伴性劣性致死突然変異率(処理条件の詳細は本文参照)

処理	調査染色体数	劣性致死	突然変異率%
EU	7,293	16	0.2194
EU+NO <sub>2</sub> →投与	6,332	1,132	17.8774
EU投与→NO <sub>2</sub> 曝露(ウェット条件)	4,621	132	2.8565
EU投与→NO <sub>2</sub> 曝露(ドライ条件)	3,641	304	8.3494
EU投与→(NO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O)投与	2,665	234	8.7805

最初の実験として、NO<sub>2</sub>ガスに24時間曝露したEU溶液(100mM)を24時間経口投与したところ、17.88%の高突然変異率が得られた。第2の実験として、この高い誘発率をもたらす反応生成物がin vivoにおいても生じているかどうかを確かめるため、EU溶液を24時間与えたのち、ドライ及びウェット条件下でNO<sub>2</sub>ガスに24時間曝露した。それぞれ8.35%と2.86%の突然変異率が得られた。(表2)これらの結果はin vivoおよびin vitroのいずれでもEUとNO<sub>2</sub>の反応によりニトロソ化合物が生成され変異原性をもつことを示唆する。

NO<sub>2</sub>が水に溶けた場合NO<sub>2</sub><sup>-</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>が生じると考えられる(織田ら, 1980)。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>とEUとの反応にはEU 100mM溶液に亜硝酸ナトリウム(5mM)を加え、また、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>との反応には硝酸ナトリウム(5mM)を加え、pHを酸性に調整した後、ハエに24時間経口投与した。EU+NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の

突然変異率は 14.06% であるのに対して、  
EU + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> では 0.25% にすぎなかった  
(表 3)。

表 3： キイロショウジョウバエにおける  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> と EU の併用投与による伴  
性劣性致死突然変異率  
(処理条件の詳細は本文参照)

処理	調査染色体数	劣性致死	突然変異率%
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4,644	3	0.0646
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3,796	3	0.0790
EU + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → 投与	2,426	341	14.0561
EU + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → 投与	3,185	8	0.2512
EU + (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) → 投与	2,621	581	22.1671

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と EU の反応により強力な変異原物質であるエチルニトロソウレア (ENU) が生成される (Mirvish, 1971)。本実験でもこの反応生成物 ENU が変異原として作用していると考えられる。つぎに、EU を 24 時間投与した後、NO<sub>2</sub> に曝露したショ糖溶液を 24 時間与えたところ、8.78% の突然変異率を得た (表 2)。このことは *in vitro* での ENU 生成反応が *in vivo* においても同様に行われることを示唆している。

## 5. 考察

Inoue ら (1981) はキイロショウジョウバエでの NO<sub>2</sub> 単独の変異率は自然の 2~3 倍であると報告している。本実験のウェット条件においても NO<sub>2</sub> は同程度の誘発率を示した。曝露条件によって誘発率が異なり、呼吸系を通して取り込まれる場合は変異原性を示さないが、水に曝露した場合、反応生成物が生じそれを経口的に取り込むことにより突然変異が誘発されると考えられる。NO<sub>2</sub> が水に溶け生成される

もののうち HNO<sub>2</sub> は微生物で変異原性をもっている (Baranowska と Putrament, 1979)。したがって、キイロショウジョウバエに対しても HNO<sub>2</sub> が変異原性をもつことが推論される。以上のこととは、あらかじめ NO<sub>2</sub> に曝露した水を与えた場合、有意な突然変異率の上昇が認められたことから推定される。しかし、われわれの実験では NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 及び NO<sub>3</sub><sup>-</sup>のみでは、変異原性が認められなかつた (表 3)。したがって、他の反応生成物の関与も考えられる。

NO<sub>2</sub> および EU 単独では変異原性が認められないか、あるいは微弱である。しかし、NO<sub>2</sub> に曝露した EU 溶液を投与、あるいは、EU を投与した後 NO<sub>2</sub> に曝露することにより、顕著な突然変異率の上昇が見られた。これらの結果は Inoue ら (1981) と一致する。

NO<sub>2</sub> が水に溶けた場合、主として NO<sub>2</sub><sup>-</sup> および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> が生成される。EU と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 及び NO<sub>3</sub><sup>-</sup> との反応生成物による突然変異誘発では NO<sub>2</sub><sup>-</sup> で有意に高い値を得た。これは、EU が NO<sub>2</sub><sup>-</sup> によりニトロソ化され ENU が形成されることによると推定される。この反応は、EU を投与した後、NO<sub>2</sub> に曝露した水溶液を与えてても高い突然変異率が得られることから、生体内でも同様であると考えられる。

## 6. まとめ

- (1) NO<sub>2</sub> は気体として直接取り込まれる場合よりも水に溶けた状態で取り込まれる場合の方が高い変異原性を示した。
- (2) EU と NO<sub>2</sub> 併用投与時の変異原性は、単独投与の場合よりもはるかに強い。
- (3) *in vitro* でみられるニトロソ化反応は *in vivo* でも同様に起こっていると考えられる。

## 文献

Tokiwa, H., Nakagawa, R., Morita, K., and Ohnishi, Y.: Mutagenicity of

nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide. *Mutat. Res.*, 85: 195-205 (1981).

Inoue, H., Fukunaga, A., and Okubo, S.: Mutagenic effects of nitrogen dioxide combined with methylurea and ethylurea in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 88: 281-290 (1981).

塙見敏男: 昆虫を用いる実験系と検出法. 環境変異原実験法, 講談社サイエンティフィク, p.p. 112-134 (1980)。

Kastenbaum, M.A., and Bowman K.O.: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.*, 9: 527-549 (1970).

織田肇, 局博一, 鈴木明, 市瀬孝道: 二酸化窒素を曝露したマウスの血液中亜硝酸・硝酸イオン量の変動. 国立公害研究所報告, 15: 43-53 (1980)。

Mirvish, S.S.: Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N-alkylurethans, and alkylguanidines: Possible implications for the etiology of human gastric cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 46: 1183-1193 (1971).

Baranowska, H., and Putrament, A.: Mitochondrial mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. III. Nitrous acid. *Mutat. Res.*, 63: 291-300 (1979).

# 亜硝酸処理により生成するしょう油の変異原性

国立がんセンター研究所生化学部 若林 敬二

## 1. はじめに

日本人の死因の第一位はがんである。なかでも胃がんによる死亡率が最も高い。胃がんによる死亡率と硝酸塩の摂取量との間には相関関係があると報告されている(Hartman, 1983)。

日本人の1日当りの硝酸塩の平均摂取量は296mgであり、米国人のそれに比べ約3倍多い(Kawabataら, 1979)。硝酸塩は口腔内の細菌等により亜硝酸に変換する。亜硝酸は生理的酸性条件下で二級アミンおよびアミド化合物と反応し、変異原・がん原物質を生成する。そこで、筆者等は日常食品中より胃がんの原因物質を探索する目的で、各種日常食品に亜硝酸を添加しその変異原性をしらべた。

## 2. 各種食品の亜硝酸処理により生成する変異原性

食品をpH 3.0で亜硝酸と37°C, 1時間、遮光下で反応し、スルファミン酸アンモニウムで反応を停止した後、その変異原性をサルモネラ菌TA 100を用いて-S 9 mixでしらべた。試験した食品の内、しょう油が最も強い変異原性を示し、1ml当たり25,000個の復帰コロニーを誘導した。さらに、豆みそ、フィッシュリースおよびそら豆にも変異原性が認められた。しかし、しょう油および豆みその原料である大豆には変異原性は認められなかった。

つぎに、各種しょう油の亜硝酸処理により発現する変異原性を比較した。その結果を表1に示した。日本で製造されたしょう油は、Gを除き、強い変異原性を示した。一方、米国で製造されたしょう油の変異原性は、Mを除いて、日本のものにくらべ弱かった。ハワイで製造された合

成しょう油Jは変異原性を示さなかった(Wakabayashiら, 1983)。

表1 各種しょう油の亜硝酸処理により生成する変異原性およびMTCAとチラミン含量

製造場所 しょう油	復帰コロニー数/ml	変異原前駆体含量 μg/ml	
		MTCA	チラミン
A 日本, 千葉県	25,200	668	1,040
B 日本, 千葉県	18,300	678	930
C 日本, 千葉県	24,300	378	960
D 日本, 三重県	9,600	95	18
E 日本, 千葉県	22,200	604	1,100
F 日本, 千葉県	24,900	521	2,250
G 日本, 愛知県	2,700	82	17
H 日本, 三重県	17,300	275	660
I 米国, ハワイ	4,100	55	14
J 米国, ハワイ	0	<4	<2
K 米国, ハワイ	2,300	34	<2
L 米国, オハイオ州	6,100	<4	<2
M 米国, ウィスコンシン州	26,600	711	1,180

変異原性はS 9 mix 非存在下でTA 100を用いてしらべた。

3. しょう油中の変異原前駆体の分離および構造

しょう油中の亜硝酸処理により生ずる変異原物質は不安定である可能性がある。そこで、亜硝酸処理により変異原となる化合物、すなわち変異原前駆体の精製を行った。

しょう油80mlを水で17倍に希釈し、活性炭カラムにかけると変異原前駆物質はすべて吸着した。変異原前駆物質をメタノール、メタノール:5N酢酸(8:2, v/v)およびメタノールで順次溶出した。これら三つの溶出分画を集め、濃縮した後、水に溶かしXAD-7カラムにかけた。XAD-7カラムを水で洗い、メタ

ノールで溶出すると変異原前駆物質は両分画に認められた。しょう油からの変異原前駆体の回収率は、各々14および31%であった。

XAD-7カラムのメタノール溶出分画からLS-110ステレンカラムおよびLS-410 ODSカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、二つの変異原前駆体を単離した。これら化合物の量は、しょう油80mlより19.4mg(化合物I)および4.2mg(化合物II)であった。

さらにXAD-7カラムの水分画からも、CM-セファデックスおよびセファデックスG-10カラムクロマトグラフィー、さらにLS-410 ODSカラムを用いたHPLCによりもう一つの変異原前駆体(化合物III)を単離した。化合物IIIの量は、しょう油80mlより47.4mgであった。

化合物I, IIおよびIIIの構造を各種スペクトルを用いて解析した。その結果、化合物Iの構造は、(-)-(1S, 3S)-1-メチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-β-カルボリノ-3-カルボキシル酸[(-)-(1S, 3S)-MTCA]であり、化合物IIは化合物Iの立体異性体である(-)-(1R, 3S)-MTCAと決定した。化合物IIIはチラミンであった。これら化合物の構造を図1に示した。

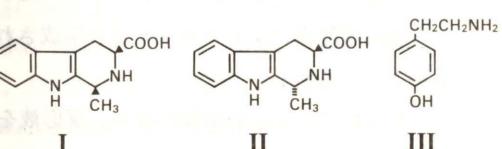


図1 しょう油より分離された変異原前駆体の構造

## 4. 亜硝酸処理した(-)-(1S, 3S)-MTCA, (-)-(1R, 3S)-MTCA およびチラミンの変異原性

(-)-(1S, 3S)-MTCA, (-)-(1R, 3S)-MTCA およびチラミンの合成標品をpH 3.0で1時間亜硝酸処理し、発現する変異原性をTA 100およびTA 98を用いて検討した。変異原前駆

体1mg当たりに認められた変異活性を表2に示した。

表2 変異原前駆体と亜硝酸により生成する変異原性

変異原前駆体	復帰コロニー数/1mgの変異原前駆体			
	TA 100 -S 9 mix	TA 98 +S 9 mix	TA 100 +S 9 mix	TA 98 +S 9 mix
(-)-(1S, 3S)-MTCA	17,400	3,600	1,400	590
(-)-(1R, 3S)-MTCA	13,000	1,400	2,400	230
チラミン	3,900	2,300	2,500	3,100

(-)-(1S, 3S)-MTCA(4.3mM), (-)-(1R, 3S)-MTCA(4.3mM)およびチラミン(1.5mM)は、各々亜硝酸(50mM)とpH 3.0で1時間反応させた後、変異原性をしらべた。

(-)-(1S, 3S)-MTCAおよび(-)-(1R, 3S)-MTCAの変異原性は、-S 9 mixでTA 100に対して最も強く認められた。また、これら化合物の変異原性は、S 9 mixの添加により $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{10}$ に減少した。

一方、チラミンは、-S 9 mixでTA 100およびTA 98に対してほぼ同様な変異活性を示した。しかし、S 9 mixを添加してもMTCAの場合とは異なり、変異原性は減少しなかった。

## 5. 各種しょう油中の(-)-(1S, 3S)-MTCA, (-)-(1R, 3S)-MTCAおよびチラミンの定量

(-)-(1S, 3S)-MTCAおよび(-)-(1R, 3S)-MTCAの定量は、しょう油をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで展開し、Rf値0.25~0.75の部分を集め、さらにLS-410 ODSカラムを用いたHPLCにより行った。しょう油より検出された(-)-(1S, 3S)-MTCAと(-)-(1R, 3S)-MTCAの存在比は全て約4:1であった。各種しょう油中の(-)-(1S, 3S)-MTCAおよび(-)-(1R, 3S)-MTCAの総含量を表1

に示した。亜硝酸処理により生成する変異原性が強いしょう油A-F,HおよびMは、MTCAを1ml当り95-711μg含んでいた。一方、亜硝酸処理により生成する変異原性が弱いしょう油G,IおよびKのMTCA含量は低かった。亜硝酸処理しても変異原性が認められないしょう油JにはMTCAは検出されなかった。また、亜硝酸処理により変異原性が発現する中国製のしょう油LにはMTCAは検出されなかった。亜硝酸処理したMTCAにより説明できる変異原性は、日本のしょう油で16-61%であり、米国のしょう油で22-44%であった。

チラミンの含量は、しょう油を水で100倍に希釈し、CM-セファデックスにかけ0.5Nアンモニア水で溶出する分画をLS-410ODSカラムを用いたHPLCで分離し、測定した。表1に示すように、しょう油A-C,E,F,HおよびMには1ml当り660-2,250μgと多量のチラミンが存在していた。D,GおよびIではチラミンが少量検出され、J-Lでは検出されなかった。亜硝酸処理したチラミンにより説明できる変異原性は、日本のしょう油で1~34%であり、米国のしょう油で1~17%であった。

#### 6. (-)-(1S,3S)-MTCAおよびチラミンの亜硝酸処理により生成する変異原

4.3mMの(-)-(1S,3S)-MTCAと50mMの亜硝酸をpH3.0で1時間反応させた後、反応溶液を酢酸エチルで抽出し、LS-310シリカゲルカラムを用いたHPLCで分離した。この反応の生成物の大部分は(-)-(1S,3S)-MTCAの2位の窒素にニトロソ基が結合した(-)-(1S,3S)-1-メチル-2-ニトロソ-1,2,3,4-テトロヒドロ-β-カルボリジン-3-カルボキシル酸[(-)-(1S,3S)-MNTCA]であった。しかし、この化合物には全く変異原性は認められなか

った。変異活性はLS-310シリカゲルカラムで(-)-(1S,3S)-MNTCAよりも前に溶出されるUV吸収の検出されないフラクションに認められた。このことより、(-)-(1S,3S)-MTCAと亜硝酸より生成される変異原の比活性は非常に強いものといえる。

5mMのチラミンと50mMの亜硝酸をpH1.0で1時間反応させ、反応溶液をLS-410ODSカラムを用いたHPLCで分離すると二つの主生成物が認められた。変異活性はチラミンよりも前に溶出される生成物に認められた。この化合物の生成率は約30%であった。現在、この変異原物質の構造解析を行っている。

#### 7. おわりに

しょう油の年間総生産量より計算すると、日本人のしょう油の年間消費量は1人当たり約10ℓである。したがって、われわれは1日当たり、しょう油より(-)-(1S,3S)-MTCAおよび(-)-(1R,3S)-MTCAを約2-18mg、チラミンを0.5-6.2mg摂取していることになる。(-)-(1S,3S)-MTCAおよび(-)-(1R,3S)-MTCAはしょう油の製造過程でL-トリプトファンとアセトアルdehyドの縮合反応により、また、チラミンはチロシン脱炭酸酵素によりチロシンより生成されたものと考えられる。

さんまのひらきを亜硝酸処理し、反応液をゾンデでラットの胃に投与すると、胃に腫瘍が誘発されることが報告されている(Weisburgerら, 1980)。最近、Piacek-LlanesとTannenbaum(1982)はコロンビアの胃がんの多い地方の主用食品であるソラ豆を亜硝酸処理すると変異原性が出現することを報告している。しかし、さんまのひらきおよびソラ豆中の変異原前駆体および亜硝酸処理により生成する変異原の構造は明らかにされていない。

日本人の胃がんによる死亡率は近年減少傾向にあるものの、依然、がん死亡の主要因になっている。したがって、亜硝酸存在下におけるしょう油、(-)-(1S,3S)-MTCA,(-)-(1R,3S)-MTCAおよびチラミンの発がん性、とくに胃がん誘発の有無を確かめることは非常に重要である。現在、ラットを用いてこれらの発がん実験を行っている。

#### 文 献

- Hartman, P.E.: Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality. Environ. Mutagen., 5: 111-121 (1983)  
Kawabata, T., Ohshima, H., Uibu, J., Nakamura, M., Matsui, M. and Hamano, M.: Occurrence, formation, and precursors of N-nitroso compound in Japanese diet. In: Miller, E.C., Miller, J.A., Hiroto, I., Sugimura, T. and Takayama, S. eds., Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, pp. 195-209 (1979).  
Piacek-Llanes, B.G. and Tannenbaum, S.R.: Formation of an activated N-nitroso compound in nitrite-treated fava beans (*Vicia faba*). Carcinogenesis, 3, 1379-1384 (1982).  
Wakabayashi, K., Ochiai, M., Saito, H., Tsuda, M., Suwa, Y., Nagao, M. and Sugimura, T.: 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. Nat. Acad. Sci., 80, 2912-2916 (1983).  
Weisburger, J.H., Marquardt, H., Hirota, N., Mori, H. and Williams,

G.M.: Induction of cancer of the glandular stomach in rats by an extract of nitrite-treated fish. J. Nat. Cancer Inst., 64, 163-167 (1980).

# 調理食品の変異原性について —青綿法による変異原活性の測定—

山陽学園短期大学家政学科食物栄養 村岡知子・大下市子

※現在、大下学園短期大学家政学科

## 1. はじめに

食品構成成分または食品の加熱によって生成される変異原物質の研究は急速に進行され、すでに総説等に示されているように、数多くの報告がなされている。(長尾 1982, 若林 1982)

日常食品のもつ変異原活性は、材料の組み合せ、調理条件によって大きく影響を受けるのではないかと考えられる。より安全な食生活を守るために、調理に際し、どのような配慮がのぞましいかを知る手がかりとして、成人女子昼食用に集団給食室で調製された調理食品 10 食・30 品目および一般調理食品 3 品目について、早津ら(1983)によって考案された銅フタロシアニンを固着した綿(青綿)に吸着されるフレームシフト型変異原活性を、食品 1 食分毎に測定し、タンパク性材料を主体とし、高温調理された食品が、他の食品に比べてより高い活性を示している結果を得たので報告する。

## 2. 実験方法

### (1) 材 料

成人女子昼食用に本学集団給食室で調製された食品 10 食分、主食 4 種、スープ類 6 種、副食 11 種、デザート 8 種に、一般調理の副食 3 種、計 34 種を用いた。

青綿は、岡山大学薬学部・早津彦哉教授より分与していただいた。

### (2) 変異原物質の抽出および測定

調理食品 1 食分の試料 1 重量に対して、純水 2 容を加え、ジューサーで均質液を作り、

この液 1 ml に対して、1 mg の青綿を加える。20 °C で振とうしつつ吸着させる。24 時間後に同量の青綿を入れかえて、さらに 3 時間振とう吸着させる。吸着青綿は、乾燥青綿 1 mg に対して 5 ml 以内の純水で洗浄し、乾燥青綿 100 mg に対して 10 ml のメタノール: 濃アンモニア (50:1) の抽出溶剤で、30 分振とう抽出を、2 回繰り返し、抽出液を減圧乾涸する。100 ml のジメチルサルファンオキシドに溶解して変異原活性を測定する。

測定には、*Salmonella typhimurium* TA 98 を用い、Ames 法 (1975) の矢作らによる変法、前保温法 (1977) を用いた。この際フェノバービタルと 5.6-ベンゾフランボンを用いてラット肝に誘導した S-9・50 μl を使用した。

## 3. 実験結果

調理食品中の活性物質の回収率を知る目やすとして、主食のコッペパン 50 g に標準トリップ-P-1 を、0.02, 0.1, 0.5 μg 混合して、青綿に吸着させ活性を測定したところ、平均して、31% のトリップ-P-1 の回収率が示された。また、トリップ-P-1 を加えたコッペパンホモジネートを遠心分離した上清での青綿吸着物の回収率は、加えたトリップ-P-1 の 11% であったが、ホモジネート中の回収率は、59% であったので、ホモジネート中に青綿を加え、振とう吸着させる方法をとることにした。純水中のトリップ-P-1 の回収率は約 71% であっ

た。  
調理食品の変異原活性は、図 1 に示すように、

シャレー当りの His<sup>+</sup> 変異体 (TA98, +S-9)

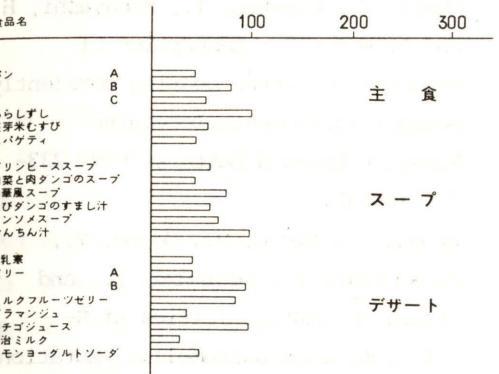


図 1 主食・スープ・デザートの 1 食分の変異原活性

主食 9 種、スープ 6 種、デザート 8 種についての測定結果では、ほとんどの食品が His<sup>+</sup> の復帰突然変異菌数が、1 食当り 100 個以下で、自然突然変異数の 2 倍~3 倍以内で、有意の活性を示すものは認められなかった。副食では、図 2 に示すように、八宝菜(炒め物)、鶏肉のカレー煮(炒め煮)、とりひき肉ダンゴの串し焼き(焼物・揚物)、コロッケ、魚のたつた揚げ(揚物)などで、比較的高い活性が示された。これらの食品は、前出の主食、スープ、デザート等の食品に比べて、炒める、焼く、揚げる、という高温調理操作をとったものであり、いずれも動物性タンパク質を主材料とした食品である。とりひき肉ダンゴの串し焼きでは、同じ材料を、オーブンで焼いたものと、揚げたものを比較して、焼く方がより高い変異原活性を測定した。

集団給食食品は作業の手順や工程の複雑さから、「焼く」という調理はまれになる。そこで、日本人の食卓に欠かせない副食、焼き魚を調製して、その活性を測定すると、さわらの照り焼き 1 切約 50 g につき 149 個、522 個の復帰

シャレー当りの His<sup>+</sup> 変異体 (TA98, +S-9)

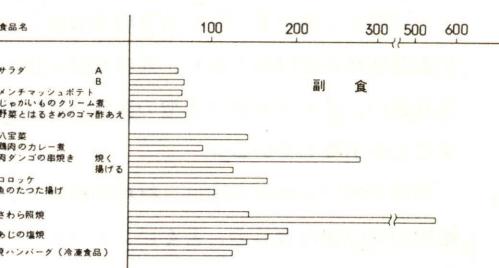


図 2 副食 1 食分中の変異原活性

突然変異数で、焼け方によって大差の出ることが示された。あじの塩焼きでは、可食部 50 g 当り、196 個、171 個、143 個の復帰突然変異数で、3 回ともに大差のない測定値がみられた。これらの活性は濃度依存性を示したものであった。

われわれは、すでに、幼児用集団給食食品 1 食分の変異原活性を Commoner 法 (1978) にしたがって塩基性分画について測定してきた (1982)。あじの塩焼き、さわらの照焼について、Commoner 法と青綿法の 2 法を用いて、同量の材料について測定した結果は、表 1 に示す通り、青綿法での測定値が 2~5 倍高いことが認められた。

表 1 焼き魚の変異原活性・抽出法による比較

サルモネラ菌 T A - 9 8 , S - 9 Mix の変異原テストの結果、データーは 2 回の平均値

方 法	His <sup>+</sup> 復帰コロニー数 / 培地	
	あじの塩焼き (100g)	さわら照焼 (100g)
青綿 法	288	1003
Commoner 法 <sup>1)</sup>	113	203

<sup>1)</sup>pH 2-ホモシネート : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 塩基性分画

## 4. おわりに

今回の測定結果は、調理食品の 1 食分中の変

異原活性は、タンパク性材料を主とする食品がとくに焼く、揚げる、炒める等の水分量の少ない高温調理を受けるときに、他の食品に比べてより高い、フレームシフト型の変異原活性を示すことを示唆している。

青綿を用いる抽出方法は、材料が複雑で、夾雜物の多い調理食品の、とくにフレームシフト型変異原活性に注目して、スクリーニングするに当っては、効率のよい方法であると考えられる。いくつかの食品を測定してみて、混在する中性脂肪の処理、纖維質の多い食品での処理など、さらに検討の必要があるが、さらに回収率を高める抽出方法を検討して、より多くの食品についてのスクリーニングを続けて行きたいと考えている。

この研究を進めるために、トリプ-P-1をご分与くださいました国立ガンセンター長尾美奈子室長、青綿を提供してくださり、数々のご指導とご助言をくださいました岡山大学薬学部・早津彦哉教授に感謝いたします。集団給食食品は本学大橋良子教授より提供されたことを感謝いたします。

## 文 献

- Ames, B.N. McCann, J., and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31: 347-364 (1975)
- Commoner, B., Vithathil, A.J., Dolara, P., Nair, S., Madystha, P., and Cuca, G. C.: Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking. *Science*, 201, 913-916 (1978)
- Felton, J.S., Henly, S., Stuermer, D., Berry, C., Timourian, H., Hatch, F., Morris, M., and Bjeldane, F.: Mutagens from the cooking of food. I. Improved isolation and characterization of mutagenic fraction from cooked ground beef. *Mutation Res.*, 88: 33-44 (1981).
- Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H., and Arimoto, S.: Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-phthalocyanine. *Mutation Research Letters*, 119, 233-238 (1983).
- Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T., and Okada, M.: Mutagenicities of N-nitrosamine on *salmonellas*. *Mutation Res.*, 48: 121-130 (1977).

村岡知子・高橋仁美：調理食品の変異原活性の検索。I。幼稚園児会について。山陽学園短期大学研究論集 13: 71-81 (1982)

長岡美奈子：加熱分解によって生ずる変異原物。生体と有害・発がん物質。早津彦哉編 講談社サイエンティフィク、128-150 (1982)

若林敬二、加熱分解物中の突然変異原・がん原物質の検索 その成果と問題点・変異原と毒性、5: 261-266 (1982)

## 油脂の酸化と変異原活性について

梶山女学園大学 家政学部 並木 和子

### 1. はじめに

油脂は蛋白質・炭水化物とともに食品の3要素の一つであり、とくにエネルギー源としての役割が大きいことはいうまでもない。また油脂は、調理、加工の材料としても非常に大きな役割をもっており、広く使用されている。

この、油脂とくに栄養評価の高い不飽和脂肪酸を多く含むものは空気中の酸素との接触で酸化がおこり、まず不快な酸敗臭を生ずるが、さらに進行したものは下痢などの急性毒性を示すのみでなく、遺伝障害や発がん、さらに生体系における老化という複雑な生命現象との関連なども明らかにされつつある。高度不飽和脂肪酸を含有する魚油は、以前有害であるとの説もあったが、その後これは有毒酸化生成物によるものであることが確認され(金田, 1957、金田と石井, 1953)、一方近年の研究では、魚油中のエイコサペンタエン酸(EPA)のような高度不飽和脂肪酸に血栓症などへの効果が認められており(Dyerberg ら, 1978)、油脂に関する問題は古くて新しい話題である。

さて、食品系においては、過酸化脂質やその分解物を摂取する可能性もあるので、それらの変異原性をしらべることは安全性の上からも、また生体での細胞膜などの脂質酸化物の生物活性への影響をみる上でも重要であると考えられる。

### 2. 油脂の酸化機構

油脂の劣化反応は、常温で進行する自動酸化と、熱媒体として油を用いた場合の重合や分解反応をともなった熱酸化との二つに大別される

が、ここでは、主に自動酸化の影響について述べる。油脂の自動酸化機構は、油脂を構成している脂肪酸、とくに高度不飽和のものが酸素により酸化されるものであり、誘導期があるが、一度始まると速やかに進行する反応であり、この機構は連鎖反応である。この反応は、リポキシゲナーゼの存在によって非常に早く進行し、また光と色素存在下では活性酸素による光酸化機構が重要になる。

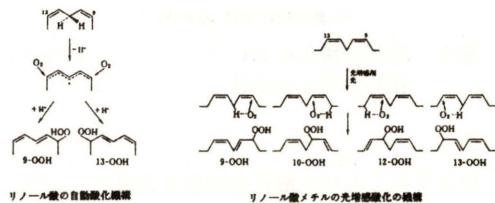


図1 油脂の自動酸化機構

### 3. 酸化油脂の急性毒性

油脂の自動酸化生成物の毒性については、これまでの見解としてヒドロペルオキシド(HPO)が主な原因物質であると考えられ(衣卷, 1970、松尾, 1954, 1957)、その毒性症状はネズミを用いた実験でつぎのようなものとされていた(太田, 1977)。

- (1) 粗毛→脱毛、体重の減少→死
- (2) 酵素の不活性化
- (3) ビタミン類の破壊
- (4) タンパク質・アミノ酸の不溶化

しかし、酸化油脂の急性毒性については上記のヒドロペルオキシド説以外にもヒドロキシ化合物、カルボニル化合物など諸説が出されており、Poling (1962) はシロネズミを用いた実験で、酸化程度とエネルギー利用率および

肝臓肥大への影響の関連を図2のように示しているが、この場合過酸化物価が減少をする段階においても、肝肥大率は増加傾向を示している。また、金田らもリノール酸メチルの酸化によるPOV, CoVの経時変化を示し、POVが減少したNo.8の段階でネズミへの毒性最大を認めている(吉岡と金田, 1972)(図3)。こ

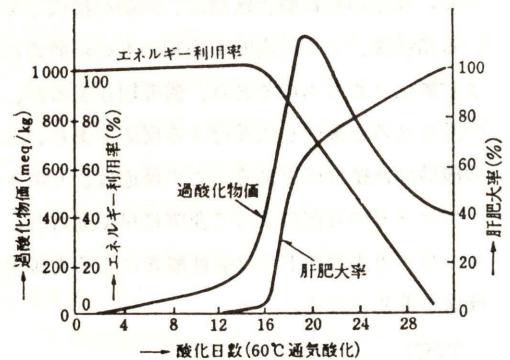


図2 油脂の酸化におけるエネルギー利用率と肝肥大率との関係

のようなことから酸化油の急性毒性については、POVが増加する初期段階のHPOは有毒であるが、さらに酸化が進行してHPO分解のころに生ずる二次酸化物の不飽和アルデヒド類も有毒であり、有毒成分の本体は酸化の進行程度によって異なると考えられている。

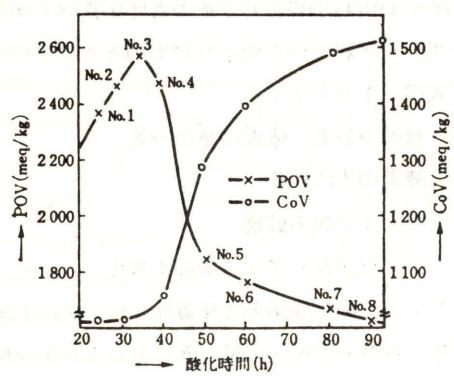


図3 リノール酸メチルの酸化によるPOV, CoVの経時変化

#### 4. 酸化油脂の変異原活性

はじめにも述べたように、近年の研究では体内での酸素の働きによる過酸化脂質の生成が老化や発がんなどとも関連することが明らかにされつつあり、著者らも遺伝毒性という観点から酸化油脂の変異原性について検討しているので、モデル系における実験結果について2,3紹介する(亀田と並木, 1982)。

油脂の自動酸化と変異原性の関係をリノール酸メチル(LM)およびトリリノレイン(TL)を37°C, 暗所で自動酸化させ、経時にRec assayおよびAmes assay(TA 98, TA 100)によって変異原性をしらべたところ、LM, TLの自動酸化生成物の変異原性は、いずれの方法においてもPOVの増加傾向とはほぼ一致することが認められた(図4)。

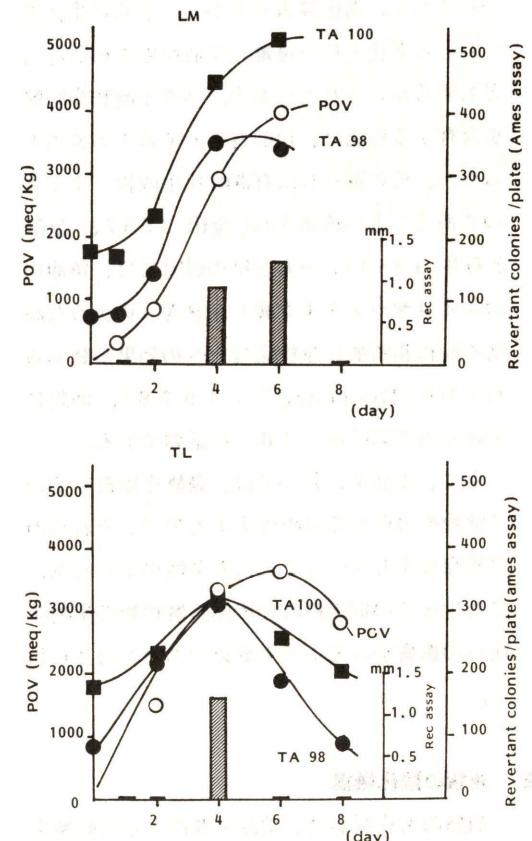


図4 リノール酸メチル(LM)とトリリノレイン(TL)の37°C暗所における自動酸化

POVの増加とともに変異原活性を示す物質は過酸化物であろうと考えられたが、さらにつきだけ单一のHPOによって効果を確認するために、Aoshima(1977)の方法によりリノール酸をリポキシゲナーゼを用いて酵素的に酸化、TLC精製により、13-HPOを得てその変異原活性をしらべた。酵素酸化によって得られた13-HPOは、自動酸化生成物と同様

#### TLC

Rf	yield %	POV meq/Kg	Rec assay mm
0.77 F 3	5	190	0
0.50 F 2	48	4900	2.0
0.36 F 1	17	800	0.4

Fraction 2○Ames assay

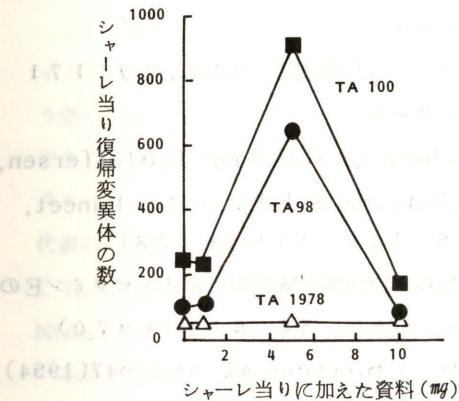


図5 リノール酸のリポキシゲナーゼによる酸化生成物のTLC分画と変異原性

Rec assayおよびTA 98, TA 100の両菌を用いたAmes assayで陽性を示したが、マロンアルデヒドに特異的な菌であるTA 1978菌では活性を示さなかった(図5)。さらにリノール酸の自動酸化生成物と、酵素酸化による13-HPOをHPLCを用いて分画したこと、その保持時間から自動酸化による生成物に13-HPOの存在を認めた。

#### 5. 酸化油脂の変異原性失活の条件

酸化油脂中の過酸化物に変異原性を認めたので、2,3の処理条件による活性変化をしらべた。すなわち、リノール酸を酵素酸化して得た13-HPOを40°Cで24時間と48時間通気酸化したのち変異原性をしらべたところ、このよ

うな過剰の酸化で活性は低下した。また同じく13-HPOを120°Cで20分間加熱後変異原性の変化をしらべたところ、活性は認められなくなった(表1)。一方、13-HPOおよびt-Bu-HPOをNaBH4で室温還を行い、還元物について変異原性をしらべたところ、還

うな過剰の酸化で活性は低下した。また同じく13-HPOを120°Cで20分間加熱後変異原性の変化をしらべたところ、活性は認められなくなった(表1)。一方、13-HPOおよびt-Bu-HPOをNaBH4で室温還を行い、還元物について変異原性をしらべたところ、還

元によっても失活することが認められた(表2)。

表1 13-HPOの過剰酸化および加熱処理による変異原性への影響

試料	変異原性	Rec assay		Ames assay	
		mm	TA98 Revertant colonies/plate	TA 100 Revertant colonies/plate	
13-HPO		3.0	400	600	
過剰酸化	40°C 24h	0.5	73	253	
生成物	40°C 48h	0.5	62	254	
加熱生成物	120°C 20min	0	56	—	

表2 過酸化物の還元処理による変異原性への影響

試料	変異原性	POV meq/Kg	Rec assay		Ames assay	
			mm	TA98 Revertant colonies/plate	TA 100 Revertant colonies/plate	
13-HPO		4900	3.0	660	900	
13-HPO 還元生成物		1100	0	100	190	
t-Bu-HPO		4500	—	110	400	
t-Bu-HPO 還元生成物		390	—	40	180	

## 6. おわりに

酸化した油脂の毒性については、従来急性毒性は酸化初期のHPOと、さらに酸化分解生成物としての不飽和アルデヒド類などが関連するものとされていた。著者らが Rec assay および Ames assay を用いて行った変異原性の試験では、酸化の比較的初期段階のみに活性が認められ、これは主にHPOによるものと考えられた。また、この変異原性は過剰な酸化、加熱および還元等の処理で不活性化されることが示された。これらのことから、油脂食品において、たとえ酸化がおき変異原性が生じたとしても、加工処理や調理によって分解不活性化す

ることも考えられ、また変異原物質の生成や分解に対するアスコルビン酸や抗酸化剤等の共存物質の影響も当然考えられるので、実際の食品における問題は総合的に検討し判断する必要がある。

また、最近 Ames 法の創始者であるカリфорニア大学の Ames 教授は、この試験に用いる菌として酸化的変異原に特異的に作用する TA 102 という菌を提案している。このような菌の使用によって、今後この方面の研究にさらに新しい展開がみられるものと期待される。

## 文 献

- 金田尚志: “油脂の栄養価”。油化学, 6: 1 (1957)
- 金田尚志, 石井清之助: 日水誌, 19: 171 (1953)
- Dyerberg J., H.O. Bang, E. Stoffersen, S. Moncada and J.R. Vane: Lancet, 15: 117-119 (1978)
- 衣巻豊輔: 脂肪酸過酸化物の毒性とビタミンEの作用・日水誌, 36: 854 (1970)
- 松尾登: J. Biochem, 41: 481, 647 (1954)
- 松尾登: 生化学, 29: 769 (1957)
- 太田静行: 油脂食品の劣化とその防止。幸書房, 326 (1977)
- C.E. Poling et al.: J. Am. Oil Chemists' Soc., 39: 315 (1962)
- 吉岡倭子, 金田尚志: 油化学, 21: 316 (1972)
- 亀田清, 並木和子: 第11回日本環境変異原学会要旨集, 114 (1982)
- Aoshima, H.: J. Biochem, 82: 569 (1977)

## 加熱食品中変異原IQの代謝的活性化

慶應義塾大学医学部薬理学教室 加藤 隆一・山添 康鎌滝 哲也

ることしかできず、ATPは必要ではない。

表1 フエノバービタル(PB), メチルコラントレン(MC)またはPCB投与ラットの肝ミクロゾームによるIQの代謝的活性化(Yamazoeら, 1983)

投与 薬物	変異活性 (変異体/ $\mu$ g蛋白)	N-水酸化活性 Pmole/mg 蛋白/分 <sup>1)</sup>	吸光度 <sup>2)</sup>
なし	50±8	57.4±7.9	0.11±0.03
PB	52±16	65.8±5.4	0.17±0.07
MC	119±10	153.4±9.1	0.37±0.11
PCB	595±70	541.2±151.6	1.18±0.30

1) HPLCによる定量

2) 鉄イオンによる比色定量

## 1. はじめに

杉村らにより種々のアミノ酸加熱分解物中にトリプト- $P$ -2を始め強力な変異原が存在することが明らかにされ、引きつづき加熱されたイワシの表面に存在する変異原が2-アミノ-3-メチルイミダゾール[4,5-f]キノリンという構造を持つことが明らかにされ、IQと命名された(Sugimuraら, 1981, 若林, 1981, Kasaiら, 1981)。さらにIQは焼肉中にも存在することが明らかにされた。

これら加熱食品中の変異原はすべてヘテロサイクリックアミンであり、それ自身はサルモネラ菌に対して変異作用を持たない前変異原物質であり、肝などのミクロゾームに存在するチトクロムP-450, とくにP-448型により代謝的に活性化されることが明らかにされた(Yamazoeら, 1980, Ishiiら, 1981, Niwaら, 1982, Katoら, 1983)。

本稿においてはIQの代謝的活性化の実体につき述べる。

## 2. IQの肝ミクロゾームにおける代謝的活性化

Okamotoら(1981)はIQをPCB投与ラットの肝ミクロゾームと保温し、N-水酸化体が生成され、このものはDNAと中性のpH下で反応することを明らかにした。

ラット肝におけるIQの代謝的活性化はミクロゾーム分画のみに存在し、上清には活性がほとんど認められない(Yamazoe, 印刷中)。ミクロゾームによる代謝的活性化にはNADPHを必要として、NADHはその一部分を代替す

表1に示すように肝ミクロゾームの代謝的活性化能はフェノバービタル投与によってはほとんど増加せず、3-メチルコラントレン投与により2倍以上増加し、PCB投与により約10倍も増加する(Yamazoe, 印刷中)。一方、活性代謝物と考えられるN-水酸化体の生成を高速液体クロマトグラフィーにより測定すると、変異原活性の上昇と相関してその生成が上昇し、N-水酸化体が変異原活性の本態であることが強く示唆された。

さらに、PCB投与ラットからの肝ミクロゾームのIQ-N-水酸化活性は一酸化炭素、ベンゾ(a)ピレン、7,8-ベンゾフラン、エリプティシン、イソサフロールなどにより阻害されたが、SKF525-Aには阻害されず、トリプト- $P$ -2やグル- $P$ -1と同様にP-448型

のチトクロム P-450 により代謝されるものと考えられた。

### 3. IQ のチトクロム P-450 による代謝的活性化

PCB 投与ラットの肝より精製したチトクロム P-450 (P-448 II-a) は NADPH - チトクロム P-450 還元酵素、燐脂質、NADPH の添加 (再構成系) により IQ を N-水酸化し、変異原活性が発現される。燐脂質を除去するとその活性は約 3 分の 1 に減少する。

表2 精製チトクロム P-450 による加熱食品中の変異原性ヘテロサイクリックアミンの代謝的活性化 (Kato ら, 1983)

チトクロム P-450	代謝活性化 (変異体 × 10 <sup>-3</sup> /nmole P-450)		
	Trp-P-2	gلو-P-1	IQ
ラット PB P-450	128	44	69
MC P-448	7,208	2,030	1,030
PCB P-450 I-c	207	52	41
PCB P-450 I-c	188	45	30
PCB P-448 II-a	7,018	7,068	2,410
PCB P-448 II-d	2,826	96	202
ウサギ PB P-448	1,494	2,534	5,003

表2 に示すように PCB 投与ラットから精製した、チトクロム P-450 のうち高スピン型の P-448 II-a は II-d 型 (低スピン型) にくらべて約 2.2 倍も代謝的活性化能が高い。興味深いことには従来知られていた高スピン型のチトクロム P-450 には代謝能がほとんど認められておらず、事実われわれの分離精製した P-448 II-a のベンゾ(a)ピレン水酸化活性は低スピン型 (P-448 II-d) の約 60 分の 1 に過ぎない。一方、表2 に示すように P-448 II-a はトリプト P-2 やグル P-2 の代謝的活性化 (N-水酸化) に対しても P-448 II-d よりもそれぞれ 3 倍、7.4 倍も強い作用を持つ (Kato ら, 1983)。

P-450 型はいずれもかなり弱い代謝的活性化能しか示さない。一方、フェノバービタル投与ウサギ肝から精製した P-448 はきわめて高い IQ の代謝活性化能を示す。

### 4. IQ の代謝的活性化体の同定

IQ の肝ミクロソームと保温すると高速液体クロマトグラフィー上変異原活性を示す一つのピークが得られる。このピークは酸化するとニトロソ体を与え、還元するとアミン体を生成する点から N-水酸化体と推定されたが、このものはきわめて不安定で分離、同定され難いので、O-ニトロソトルエンを加えて誘導体として、GC-MS により同定した (図 1)。

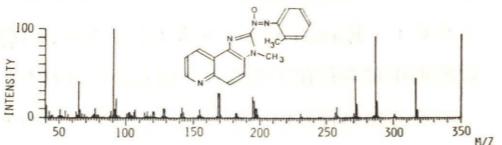


図1 N-ヒドロキシ・IQ の O-ニトロソトルエン誘導体の GC-MS

### 5. おわりに

以上 IQ の代謝的活性化につき述べたが、IQ はミクロソームの P-448 型のチトクロム P-450 により N-水酸化されることが、その代謝的活性化の本態であることが確立されたといえよう。

しかし、N-水酸化体そのものが化学的に DNA と反応する以外に、エステル化などによりバクテリアの菌体内または哺乳動物の細胞内の活性化経路が存在するか否かは今後の検討課題であろう。

### 文 献

Ishii, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: Metabolic activation of glutamic acid pyrolysis products,

2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a-3',2'-d]imidazole and 2-amino-dipyrido[1,2-a-3',2'-d]imidazole, by purified cytochrome p-450, Chem.-Biol. Interact., 38: 1-13 (1981).

Kasai, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Springarn, N.E., Weisburger, J.H., Yokoyama, S., and Miyazawa, T.: A potent mutagen in broiled fish. Part 1. 2-Amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline, J. Chem. Soc. Perkin I, 1981: 2290-2293.

Kato, R., Kamataki, T., and Yamazoe, Y.: N-Hydroxylation of carcinogenic and mutagenic aromatic amines, Environ. Health Perspec., 49: 21-25 (1983).

Niwa, T., Yamazoe, Y., and Kato, R.: Metabolic activation of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole by rat-liver microsomes, Mutation. Res., 95: 159-170 (1982).

Okamoto, T., Shudo, K., Hashimoto, Y., Kosuge, T., Sugimura, T., and Nishimura, S.: Identification of a reactive metabolite of the mutagen, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, Chem. Pharm. Bull., 29: 590-593 (1981).

Sugimura, T. et al.: Mutagenic heterocyclic amines in cooked food, Environmental Carcinogens-Selected Methods of Analysis, 4. (eds) Egan, H. et al., IARC Sci. Publ., No. 40, 251-267, (1981)

若林敬二: 加熱分解物中の変異原・がん原物質の検索——その成果と問題点——, 変異原と毒性, 5: 261-266 (1981)。

Yamazoe, Y., Ishii, K., Kamataki, T., Kato, R., and Sugimura, T.: Isolation and characterization of active metabolites of tryptophan-pyrolysate

mutagen, Trp-P-2, formed by rat liver microsomes, Chem.-Biol. Interact., 30: 125-138 (1980).

Yamazoe, Y., Shimada, M., Kamataki, T., and Kato, R.: Microsomal activation of IQ, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a pyrolysate of sardine and beef extracts, to a mutagenic intermediate, Cancer Res., in press.

# P-450-サルフォトランスフェラーゼによる7,12-ジメチルベンツ[a]アントラセン(DMBA)の活性化

東京薬科大学・第二衛生化学 渡 部 烈

## 1. はじめに

発がん性多環状芳香族炭化水素のうち、ベンツ[a]-アントラセン(BA)の7,12-位は、“L-領域”とよばれ、この位置にメチル基が置換すると、元来微弱な発がん性しかもたないBAが、7-メチル-BA, 12-メチル-BA、DMBAのように強大な発がん性を示すようになる(Dipple, 1976)。

エポキシドまたはジオールエポキシドが、これらの活性体であろうと推察され、これを立証するために、数多くの研究が行われてきたが、「BAのL-領域にメチル基が置換すると、なぜ発がん性が著しく増強されるか?」という古くから多くのがん研究者達の興味の対象となってきたこの疑問に対しては何ら答を与えることができなかった。

## 2. 活性代謝物としてのヒドロキシメチル硫酸エステル抱合体

DMBAのラット肝における主代謝物はL-領域メチル基がP-450によって酸化されてアルコールになった7-HMBAおよび12-HMBAであるが、これらはいずれも強い発がん物質である(Dipple, 1976)。

*S. typhimurium* TA 98またはTA 100のHis<sup>+</sup>復帰変異を指標として、DMBAおよび両HMBAから未処置ラット肝S 9によって生成する活性代謝物の性状を検討すると、NADPH産生系共存下、すなわちP-450作用下では、DMBAおよび両HMBAとともに弱い変異原性しか示さなかった。しかし、これらの系にPAPS産生系を添加すると、いずれの

発がん物質も強い変異原性を示し、両HMBAの場合は、NADPH産生系不在下で強い変異原性が認められた。両HMBA変異原性は、S 9をS 105(可溶性画分: サルフトランスフェラーゼの存在部位)に置き換えてても発現し、サルファターゼを添加すると消失した。

活性代謝物として、7-および12-HMBA硫酸エステル(硫酸塩)がこれら反応系から単離され、構造決定され、合成標品と同定された(Watabeら, 1982a)。他のヒドロキシメチル置換芳香族炭化水素の硫酸エ斯特ル合成品についても、TA 98に対して直接変異原性が認められ、活性は環の数が少なくなるとともに減少し、ベンジルエ斯特ルでは、むしろTA 100に対してより強い変異原性を示した(図1)。メチル、エチル、およびn-ブロピル硫酸塩は両菌株に対して変異原性を示さなかった。

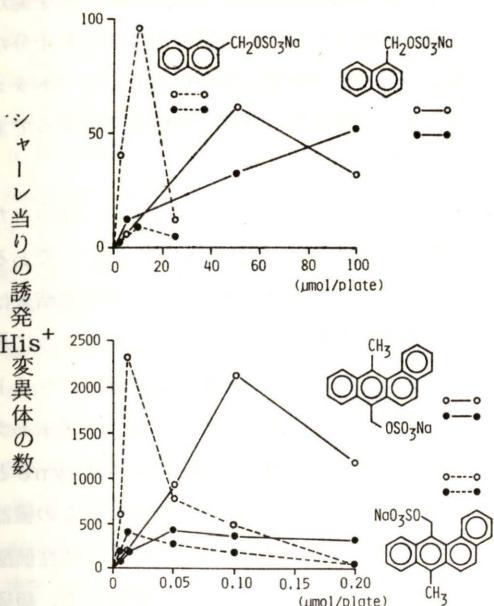
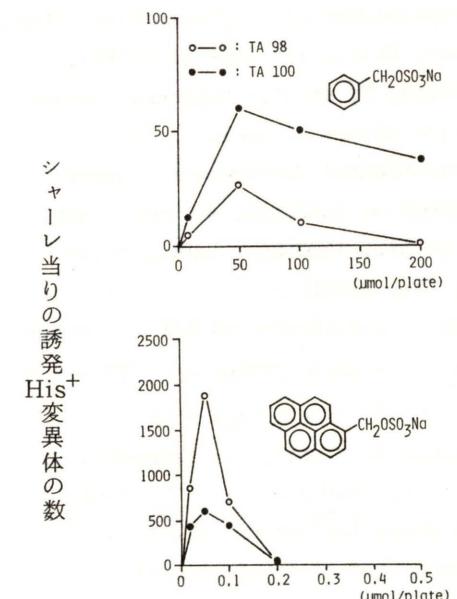


図1 *Salmonella typhimurium* TA 98およびTA 100に対する各種アリールメタノール硫酸エ斯特ル(Na 塩)の変異原性。

## 3. グルタチオンによるHMBA硫酸塩の不活性化

ラット肝に存在する濃度のグルタチオン(GSH, 4 mM)を上記の代謝活性化系に添加しておくと、7-HMBA, 12-HMBAともに変異原性を発現しなかった。また、両者の硫酸エ斯特ルの直接変異原性も、S 105と4 mMのGSHによって消失した。これらの系から、硫酸エ斯特ル残基がGSHによって置換された不活性なGSH抱合体が単離され、構造決定され、合成標品と同定された(Watabeら, 1982b)。

著者らは、HMBAのアルコール基が硫酸抱合を受け、ついで直ちにGSH抱合を受けるこの新しい抱合代謝様式を“交叉抱合反応(trans-conjugation reaction)”と命名した。

## 4. HMBA硫酸塩と肝タンパク質との共有結合

7-HMBAは、PAPS産生系共存下S 105タンパク質と共有結合する。この系からタンパク質を単離し、酸加水分解すると、7-HMBAの7-位メチレン基を介して、システインのSH, メチオニンのSCH<sub>3</sub>, およびリジンのε-NH<sub>2</sub>が結合した付加体が単離され、構造決定され、合成標品と同定された。付加体の生成比は、システイン>メチオニン>リジンであった(Watabeら, 1983a)。

同様の結果が、PAPS産生系不在下で、7-HMBA硫酸塩とS 105の間でも認められた。当然のごとく、この場合の共有結合量は、上記の場合よりはるかに大きかった。また12-HMBAおよび12-HMBA硫酸塩も同様に、それぞれ、PAPS産生系存在下および不在下でS 105タンパク質と共有結合したが、構成アミノ酸との結合部位は、7-HMBAの場合と同様であった。この場合、共有結合は12-HMBAの12-位メチレン基を介して行われていた(Watabeら, 1983a)。

## 5. HMBA硫酸塩とDNAとの共有結合

7-および12-HMBAは、PAPS産生系およびS 105共存下、仔ウシ胸腺DNAと共に結合した。この共有結合は、共存するS 105タンパク質に対するよりも高率に起こり、同様な傾向がDNAと各HMBA硫酸塩の場合も認められた。12-HMBA硫酸塩は、7-HMBA硫酸塩よりもやや結合し易く、最大28%塩基対に対して1分子の割合でDNAに共有結合した。

S 105とPAPS産生系共存下における7-HMBAのDNAに対する修飾は、その7-位メチレン基を介して、76%がアデニンのN<sup>6</sup>およびグアニンのN<sup>2</sup>に対して起っていることが明らかとなった。両プリン塩基付加体は、約

4:6の比で単離され、構造決定され、合成標品と同定された。7-HMBA硫酸塩とDNAの直接反応の結果も、塩基に対する修飾部位と比は同じであった(Watabe, 1983b)。

以上述べた結果を要約図示する。ただし、図を単純化するため、7-HMBAのみの経路を示し、12-HMBAの経路は省略した(図2)。

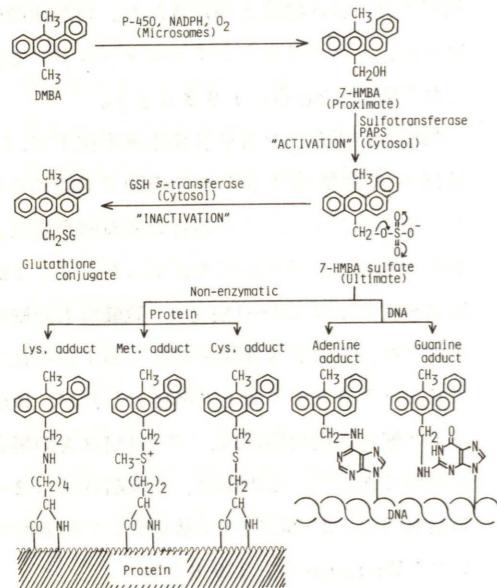


図2 7-HMBAを経由するDMBAの代謝的活性化、不活性化、ならびに活性代謝物7-HMBA硫酸塩による生体高分子の修飾。GSH: グルタチオン

## 6. むすび

DMBAおよびその発がん性主代謝物であるHMBAは、細菌の変異を指標としてその活性化機構を検討した限りにおいては、硫酸エステル抱合体形成の方がエポキシドの形成よりも重要な役割を演じていることが明らかとなった。この事実によって、BAの“L-領域”メチル基置換によるがん原性の増強を説明できる可能性が生じてきた。

また、DMBAおよび両HMBAが肝を発がん標的臓器としないことも、肝における十分な濃度のGSHの存在と強いGSH-S-トランスフェラーゼ活性の存在で説明ができるようである。

DMBAおよび両HMBAは、よく知られた副腎組織の壞死剤(大量投与のとき)である(Boylandら、1965)。本研究結果は、この急性腎毒性の機構も予言しているように思われる。すなわち、副腎中には各種ステロイドの硫酸エステルを産生する強力なサルフォトランスフェラーゼ活性が存在する(PayneとSinger, 1979)。したがって、この臓器にたどり着いたHMBAから生成する活性硫酸エステルは、組織タンパク質と結合して、組織の壞死を惹起すると考えられないであろうか。硫酸エステルが発がん物質の活性代謝物として生成する可能性は、N-OH-FAA, N-OH-MAB, および1'-ヒドロキシサフロールなどで仮説として提唱されているが(MillerとMiller, 1975), これらいずれの場合も直接的な証明はまだなされていない。著者らは、過去12年間にわたるエポキシドに関する研究の途上で、DMBAの活性化はエポキシド生成では説明がつかないことに気付き、硫酸エステルが活性体であることを証明することができた(Watabeら, 1982a)。この活性体と発がんの関係は、著者らが解決すべき問題と考えている。

終りに臨み、本誌への発表の機会を与えて下さった黒田行昭氏(国立遺伝研形質遺伝部)に深謝いたします。なお、本研究の一部は文部省がん特別研究費によって行われた。

## 文 献

- Boyland, P.E., Sims, P., and Huggins, C.: Induction of adrenal damage and cancer with metabolites of 7, 12-

dimethylbenz[a]anthracene. *Nature*, 207: 816-817 (1965).

Dipple, A.: Polynuclear aromatic carcinogens, in *Chemical Carcinogens* (C.E. Searle, ed.), American Chemical Society, Washington, D.C. pp.245-314 (1976).

Miller, J.A., and Miller, E.C.: The concept of reactive electrophilic metabolites in chemical carcinogenesis: Recent results with aromatic amines, safrole, and aflatoxin B<sub>1</sub>, in *Biological Reactive Intermediates* (D.J. Jollow, J.J. Kocsis, R. Snyder, and H. Vainio, eds.), Plenum Press, New York and London. pp. 6-24 (1975).

Payne, A.H., and Singer, S.S.: The role of steroid sulfatase and sulfotransferase enzymes in the metabolism of C<sub>21</sub> and C<sub>19</sub> steroids (R. Hobkirk, ed.), CRC Press Inc., Florida. Vol. I: pp. 111-145 (1979).

Watabe, T., Ishizuka T., Isobe, M., and Ozawa, N.: A 7-hydroxymethyl sulfate ester as an active metabolite of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *Science*, 215: 403-405 (1982a).

Watabe, T., Ishizuka, T., Ozawa, N., and Isobe, M.: Conjugation of 7-hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene (7-HMBA) with glutathione via a sulfate ester in hepatic cytosol. *Biochem. Pharmacol.*, 31: 2542-2544 (1982b).

Watabe, T., Ishizuka, T., Hakamata, Y., Aizawa, T., and Isobe, M.: Covalent binding of the proximate carcinogen, 7-hydroxymethyl-12-methylbenz[a]-anthracene (7-HMBA), to rat liver cytosolic protein via 7-HMBA sulfate. *Biochem. Pharmacol.*, in press (1983a).

Watabe, T.: Metabolic activation of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 7-methylbenz[a]anthracene (7-MBA) by rat liver P-450 and sulfotransferase: Invited paper, *J. Tox. Sci.*, in press (1983b).

# $\alpha$ -ピロンおよびポリアミン共存系の変異原性について

名城大学薬学部附属医薬研究施設・古川秀之・岡戸信夫  
環境科学研究所・河井一明

千葉大学薬学部・生物薬剤学教室 北川博美

## 1. はじめに

環境変異原の活性を抑制ないしは失活させる方法に関する研究は、最近若干の方向に体系化されてきた。

Kadaら(1978, 1981)は抗変異原(anti-mutagen)や変異原不活化因子(desmutagen)および代謝的不活化などについての概念を明らかにし、協同研究者らと多くの例を示している(Kadaら, 1978, 1981. KadaとKanematsu, 1978. 賀田, 1980, 1981). Arimotoら(1980), Hayatsuら(1981)はヘミンあるいはその類似物質がN-ヘテロ縮合多環性変異原、たとえばトリプ-P-1などの変異原性を抑制すること、およびオレイン酸やリノール酸などの不飽和脂肪酸が同じくトリプ-P-1やアフラトキシンB<sub>1</sub>などの変異原性を抑制することを報告している(早津, 1981. Hayatsuら, 1980a, 1980b, 1981a, 1981b.)。西岡(1981)はだ液が発がん生じる物質を失活させることを報告し、大西ら(1981)は腸内細菌により1-ニトロビレン変異原性が低下することを報告している。

筆者らは変異原の化学構造の中に-O-C=O部分をもつものが多いのに着目し、とくに $\alpha$ -ピロン類に関心を持つようになった。分子内の環状エステル部分は、その分子に強い極性を与えるばかりでなく、C=O-H-N型の水素結合を形成する性質を持つと思われるから、核酸やタンパク質に存在するアミノ基や生体内に普遍的に存在しているポリアミンなどと相互作用するであろうことを予想して、スペルミン

やスペルミジンと $\alpha$ -ピロンの中の直接変異原であるシトレオビリジンとの共存系について変異原性を検討することとした。

## 2. 変異原性試験における抑制効果または増強効果の検出

物質Aと物質Bの変異原性試験の測定値を合計して、A, B混合系における変異原性試験の値を推定しようとすると、対照値を2回数えていることになるので、物質Aの変異原性試験の計数値と物質Bの変異原性試験の計数値の和より対照の値を差引いた値をもって、A, B混合系の変異原性試験の抑制も増強もない推定値とする。この推定値と実測値を比較して抑制あるいは増強の効果を知るのであるが、変異原活性の有無や大小の比較には2倍法によらず、実測値がt分布に従うとして、対照の95%信頼区間と比較することにより、多少は定量的な議論に近づくことができると考える。この信頼区間法はChuら(1981)が推奨している。

## 3. シトレオビリジンとスペルミンまたはスペルミジンとの共存系の変異原性

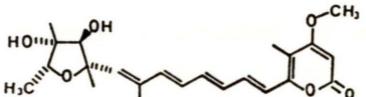


図1 シトレオビリジン

シトレオビリジンは図1に示す化学構造をもつ黄変色の色素であり、前保温法により、S-9(-), *Salmonella typhimurium* TA

-100の系で変異原活性を示す直接変異原である。前保温の際にスペルミンやスペルミジンなどのポリアミンを共存させると、表1,

表1 シトレオビリジン、ポリアミン、両者の等モル混合物の変異原性

濃度 (μmole/plate)	シトレオビリジン	スペルミン	スペルミジン	陰性対照
1.0	252	131	148	
0.5	210	145	152	149±25
0.25	182	151	154	コントロールの95%信頼区間
0.125	133	162	138	
0.02	141	142	151	

濃度 (μmole/plate)	シトレオビリジン-スペルミン 実測値	期待値	シトレオビリジン-スペルミジン 実測値	期待値
1.0	157	234	195	251
0.5	182	206	192	213
0.25	189	184	168	187
0.125	162	146	127	122
0.02	170	162	150	143

シトレオビリジン-スペルミン系の期待値  
 $f(x) = \text{シトレオビリジン} + \text{スペルミン}$  対照  
シトレオビリジン-スペルミジン系の期待値  
 $f(x) = \text{シトレオビリジン} + \text{スペルミジン}$  対照

3にシトレオビリジンに対し若干のモル比段階

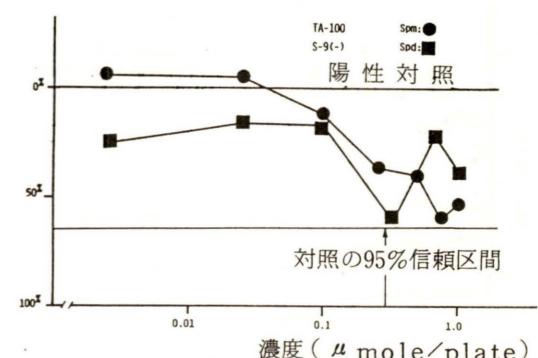


図3 ポリアミンによるシトレオビリジンの阻害百分率  
でポリアミンを共存させた場合の変異原性抑制率を示したが、モル比1:1附近で50~60%の抑制を示している。

## 4. シトレオビリジンとポリアミン間の水素結合について

両成分間の相互作用の種類を見出たく、IR吸収スペクトルを測定したところ、図4に示

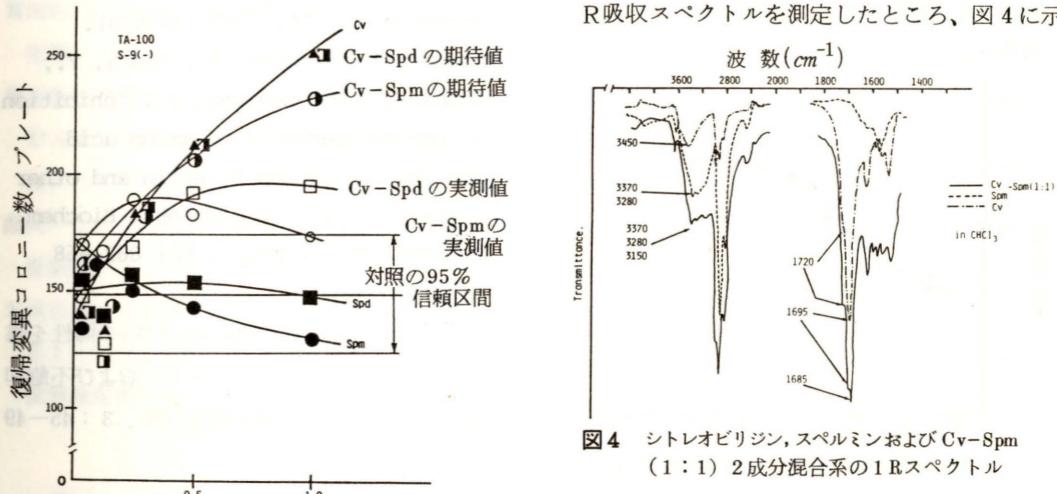


図2 シトレオビリジン、ポリアミン、ポリアミンとシトレオビリジン  
2成分混合系の変異原性

図2に示すようなHg<sup>2+</sup>の復帰変異コロニー数の減少を認める結果を得た。なおこの実験におけるポリアミンの濃度範囲内において、生菌数は対比との間に有意差を認めなかった。また図

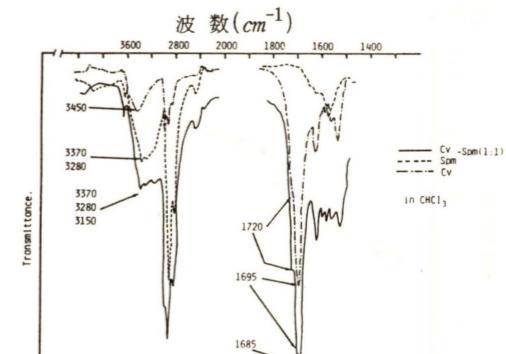


図4 シトレオビリジン、スペルミンおよびCv-Spm  
(1:1) 2成分混合系の1Rスペクトル

す結果を得た。スペルミンのNH伸縮振動(3370 cm⁻¹, 3280 cm⁻¹, 3200 cm⁻¹)はシトレオビリジン共存下で幅広い吸収となり、一方シトレオビリジンのC=O伸縮振動(1695 cm⁻¹)はスペルミン共存下に1685 cm⁻¹へと10 cm⁻¹低波数側へシフトし、NH···O=C型の水素結合の存在を示している。

## 5. NMRスペクトルによる水素結合の証明

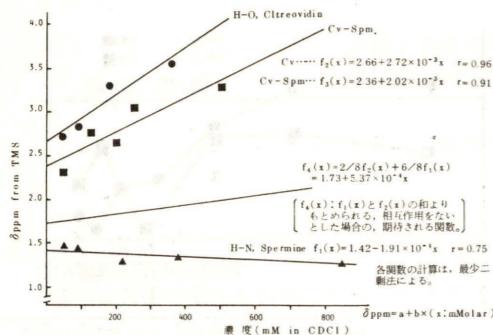


図5 シトレオピリジン、スペルミンおよびCv-Spm(1:1モル)2成分混合系における、H-N, H-Oプロトンのケミカルシフト値。

図5に示すようにスペルミン(0.05 mM)の $\delta_{\text{CDCl}_3}$ は1.46 ppm(6H, S, NH)で、0.05 mMのシトレオピリジン共存下では2.3 ppmへと低磁場シフトが観察され、この測定条件下で、シトレオピリジンとスペルミンの間に水素結合の存在を支持している。図5、図6は水素結合による相互作用を支持するものである。

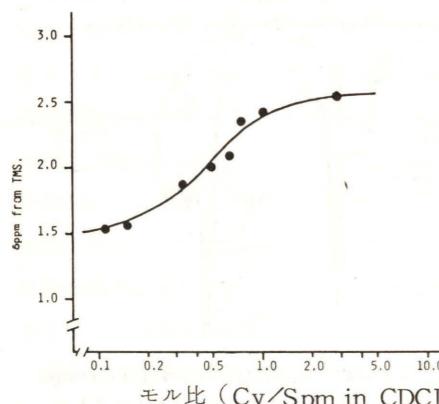


図6 シトレオピリジン、スペルミン系の各種モル比における、H-N, H-Oプロトンのケミカルシフト値。

## 6. むすび

シトレオピリジンの直接変異原性はポリアミン共存で抑制されることおよび両成分間に水素結合形成のような相互作用の存在することは判明

したが、変異原性の抑制される分子的過程はまだ分らない。

筆者らはアフラトキシンB₁とアフラトキシンG₁に対するスペルミンの影響についても多少の知見をもっているが、アフラトキシンB₁に対しては変異原性の抑制ではなく、アフラトキシンG₁に対しては抑制が観察されることを附記しておく。

## 文 献

- Chu, K.C., Patel, K.M., Lin, A.H., Taron, R.E., Linhart, M.S., and Dunkel, V.C.: Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays. *Mutation Res.*, 85: 119-132 (1981).
- Hayatsu, H., Arimoto, S., and Negishi, T.: Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.*, 11: 29-33 (1980a).
- Hayatsu, H., Arimoto, S., Ohara, Y., Namba, T., and Negishi, T.: Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92: 662-668 (1980b).
- 早津彦哉: 変異原物質のAmesテスト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一, 環境変異原研究, 3: 45-49 (1981)。
- Hayatsu, H., Arimoto, S., Togawa, K., and Makita, M.: Inhibitory effect of the ether extract of human faces on activities of mutagens: inhibition by oleic acid and linoleic acid. *Mutation Res.*, 81: 287-293 (1981a).
- Hayatsu, H., Inoue, K., Namba, T., Togawa, K., Hayatsu, T., Makita, M., and Wataya, Y.: Inhibition of the mutagenicity of cooked-beef basic fraction by its acidic fraction. *Mutation Res.*, 91: 437-442 (1981b).
- Kada, T., Morita, K., and Inoue, T.: Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.*, 53: 351-353 (1978).
- Kada, T., Inoue, T., and Morita, K.: Purification and properties of a plant desmutagenic factor for mutagenic principle of triptophan pyrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 343-353 (1981).
- Kada, T., and Kanematsu, N.: Reduction of N-methyl-N'-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutation by cobalt chloride in *Escherichia coli*. *Proc. Japan Acad.*, 54, Ser. B, 234-237 (1978).
- 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)。
- 賀田恒夫: 環境変異原の研究—とくに、食品中のがん原・防除因子、ヒトにおけるDNA障害修復について—. 農化誌, 55: 597-605 (1981)。
- 西岡一: だ液が発がん物質を失活する. 環境変異原研究, 3: 33-39 (1981)。
- 大西古哉, 木内武美, 脇坂和見: 腸管内細菌による1-nitropyreneの変異原性の低下. 環境変異原研究, 3: 41-44 (1981)。

# アブリシアトキシンおよびその誘導体のプロモーション活性

国立がんセンター研究所集団検査研究部 藤木博太

## 1. はじめに

人がんの原因の80%以上が環境因子によると報告されている。がんがイニシエーターとプロモーターの2つの異なる因子によって生じるとすれば、プロモーターも環境中に広く存在すると考えられる。環境中のプロモーターを検索する試みは、人がんの原因を追求する上でぜひ必要な研究である。私どもは、まず皮膚プロモーターに注目し、これらを検索する検索法を確立した。この方法によって、これまでにフルボルエステルと化学構造が異なる2つの新しいクラスのプロモーターとしてインドールアルカロイドおよびポリアセテートを見出している。編集者のご希望によりポリアセテートについて記述する。

## 2. 2つのポリアセテート：アブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシンの生物活性

1980年ハワイ、オアフ島カイウラ海岸で海水浴をした400人以上の人々が急性の水泡性皮膚炎にかかった。ハワイでは度々このような“swimmer's itch”が生じることが知られている。リングビアトキシンAの時と同じようにハワイ大学化学教室 Moore教授は、カ

イウラ海岸に生育する海草を集め、原因物質の検索を試みた。その結果、彼は2種類のポリアセテート、アブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシン(Br原子を欠損したもの)であることを突き止めた。興味あることに、この2つの化合物はすでに1974年ハワイ大学加藤博士、Scheuer教授によって報告されていた。すなわち、彼らは、アメフラシ、正式には*Stylocheilus longicauda*日本名クロスジアメフラシの消化管の中から分離し、構造を決定していた。また沖縄でも、具志川で皮膚炎が起こることが報告されているが、この附近に生育する海草の中にアブリシアトキシン、デブロモアブリシアトキシンが含まれることを、琉球大学山里教授のご協力によって私どもは見出した。これら2つのポリアセテートが誘導する種々の生物活性を、TPA、テレオシジン、リングビアトキシンAのそれらと比較し、表1に示した。

私どもの開発した短期検索法のマウス耳の発赤テスト、ODC(オルニチン脱炭酸酵素)の誘導テストでは、アブリシアトキシン、デブロモアブリシアトキシンはともにTPAと同程度の強い活性を示した。しかし、もう1つのHL

表1 プロモーターの生物活性

	TPA	テレオシジン	リングビアトキシン	アブリシアトキシン	デブロモアブリシアトキシン
刺載テスト ED <sub>50</sub> <sup>24</sup> nmoles/ear	0.016	0.008	0.011	0.005	0.005
ODCの誘導 nmoles CO <sub>2</sub> /5.0 μg compound	1.45	1.89	2.05	2.15	2.05
HL-60の接着 ED <sub>50</sub> ng/ml	1.5	4.0	7.0	2.0	1.80
HL-60の喰作用 ED <sub>30</sub> ng/ml	2.5	3.6	2.5	1.7	1.00
NL-3の細胞凝集 ED <sub>50</sub> ng/ml	1.15	3.1	2.4	2.1	1.80
フレンド赤白血病細胞の分化の阻害 ED <sub>50</sub> ng/ml	1.0	2.0	0.4		1.50
3-H-PDBuの特異的結合の阻害 ED <sub>50</sub> ng/ml	3.0	5.0	8.0	4.0	5.20
30週以内の腫瘍発生率 (%)	100	100	80.0	93.0	53.0

-60細胞の接着テストでは、アブリシアトキシンがTPAと同等に強い活性を示したのに対し、デブロモアブリシアトキシンの活性は比較的弱いという結果を得た。すなわち、デブロモアブリシアトキシンがTPAあるいはアブリシアトキシンと同じ効果を得るには約100倍の量を必要とした。この結果から、アブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシンのプロモーション活性に2つの可能性が考えられる。

①発赤テスト、ODC誘導がプロモーション活性を反映するすれば、アブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシンはTPAと同様に強力なプロモーターであるだろう。②HL-60細胞の接着が反映するすれば、アブリシアトキシンはTPAと同様に強力なプロモーターであり、デブロモアブリシアトキシンは弱いプロモーターであるだろうと予測された。単に1個のBr原子の有無で生物活性が異なるこのような化合物は、構造、生物活性、プロモーション活性、等の相関性を研究する上で最適の化合物であった。

## 3. アブリシアトキシンおよびデブロモアブリシアトキシンの発がん実験

CD-1雌マウス、8週令の皮膚に100 μgのDMBAを塗布、その1週間後から、0.25 μgのアブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシンを週2回塗布した。0.25 μgのアブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシンの量はマウス皮膚で約1.0 nmoles CO/mg protein/30 minを誘導した量である。8週までの経過観察から、何ら腫瘍の発生が見られなかったので、9週から1.25 μgに両物質共增量し、30週で実験を終了した。30週における腫瘍の発生頻度はDMBA+アブリシアトキシン群93%、DMBA+デブロモアブリシアトキシン群53%であった。その他、DMBA単独、アブリシアトキシン単独、デブ

ロモアブリシアトキシン単独群はともに腫瘍の発生は見られなかった。この実験結果は、アブリシアトキシンはTPA、テレオシジンと同等に強力なプロモーターであり、Br-原子欠損したデブロモアブリシアトキシンはやや弱いプロモーターであることを証明した。アブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシンの腫瘍発生頻度は、93%に対し53%と差があるだけでなく、腫瘍平均個数においても5.0に対し1.5と差を認めた。現在、発生した腫瘍について、すべて病理組織学的に診断し、良性腫瘍と悪性腫瘍に分類を進めている。

以上の結果から前述の可能性を考えると、HL-60細胞のテスト結果がプロモーション活性の強弱をより強く反映したと思われる。

## 4. プロモーターの作用機構

プロモーターは細胞膜に存在するレセプターに結合することが知られている。表1に示したように、ラット胎児纖維芽細胞を用いた<sup>3</sup>H-PDBuの結合はアブリシアトキシンがデブロモアブリシアトキシンよりも5倍から10倍強く阻害した。この事実から、私どもはアブリシアトキシンが強いプロモーターであり、デブロモアブリシアトキシンがやや弱いプロモーターであることとよく一致すると解釈した。最近、冷酢酸で洗うことによって、TPAの非特異的吸着を除くことができるようになり、直接<sup>3</sup>H-TPAのレセプターへの結合が、マウスの表皮のparticulate fractionを用いて測定できるようになった。アブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシンによる<sup>3</sup>H-TPAの結合阻害を測定すると、興味あることに、今回全く同等に<sup>3</sup>H-TPAのレセプターへの結合を阻害した。アブリシアトキシンとデブロモアブリシアトキシンのレセプターへの結合が同等に強いとすると、プロモーション活性の強弱は何を意味するのであろうか？ レセプター

結合以後に生じる生物活性の差がプロモーション活性の強さを決めるのであろうか？

この問題に直面したので、私どもはふたたび発がん二段階実験を行った。今回はDMBAでイニシエートした後、両物質共4 nmolesを週に2回塗布した。4 nmolesはアブリシアトキシンで $2.69\mu g$ 、デプロモアブリシアトキシンで $2.37\mu g$ である。30週の実験結果では、ともに73.3%，71.4%と高い腫瘍発生頻度を示し、この2回目の実験結果は $^3H-TPA$ の結合阻害の値を強く支持した。考えてみると、プロモーションには最適な濃度が存在する。この微妙な差が、両物質のプロモーション活性に強弱を生じたり、或いは同等であったりするのかも知れない。

## 5. まとめ

アブリシアトキシンとデプロモアブリシアトキシンで見られたBr-原子の違いによるいろいろな生物活性の強さの違いの意味を明らかにするために、種々の誘導体を用いてさらに研究を進めている。自然界には、Brを2個含むプロモアブリシアトキシン、メチル基を欠くオシラトキシンが存在する。さらにプロモバオキシダーゼを用いてデプロモアブリシアトキシンに3個のBrを入れることができ、ジプロモアブリシアトキシンを酵素学的に合成することも可能である。プロモーターの構造と活性の相関を研究する上で、海草に含まれるポリアセテートの誘導体は、新しい1つの代表的なクラスとなる。

## 文献

- Fujiki, H., Suganuma, M., Nakayasu, M., Hoshino, H., Moore, R. E., and Sugimura, T.: The third class of new tumor promoters, polyacetates (debromoaplysiatoxin and aplysiatoxin), can differentiate biological actions related to tumor promoters. *Gann*, 73, 495-497 (1982).
- Sugimura, T.: Potent tumor promoter other than phorbol ester and their significance. *Gann*, 73, 499-507 (1982).
- Moore, R.E.: Toxins, anticancer agents, and tumor promoters from marine prokaryotes. *Pure & Appl. Chem.*, 54, 1919-1934 (1982).
- Horowitz, A.D., Fujiki, H., Weinstein, I.B., Jeffrey, A., Okin, E., Moore, R.E., and Sugimura, T.: Comparative effects of aplysiatoxin, debromoaplysiatoxin and teleocidin on receptor binding and phospholipid metabolism. *Cancer Res.*, 43, 1529-1535 (1982).

菅沼雅美、藤木博太、杉村隆：新しい環境性発がんプロモーターとその生物学的作用。最新医学，37：1781-1785（1982）。

## 環境変異原—カイコの研究から見た一見解

国立遺伝学研究所 田島 弥太郎

がん原物質なりという考え方が裏付けられ、がん学者が突然変異原の研究に大きな関心を持つようになった。短期検出法によって、発がん性や突然変異性を持つ物質が、われわれの生活環境の中に充満しているということが明らかになったが、この発見は、われわれの心臓を寒くするものであった。しかし、発がんにはイニシエーション過程のほかにプロモーションの過程が必要であることが実証され、がん研究に一段の進歩を見た。一方突然変異の方は如何であろうか。サルモネラのデータをヒトに外挿することは可能かどうか。

以下カイコの研究を通じて見た私見をのべて見よう。

## 2. がん原物質検出方法についての協力研究

環境に存在する変異原の研究の重要性にかんがみ、各国でその研究が開始されたが、わが国では厚生省の補助のもとに、故小田島成和氏を代表者とする大きな共同研究班が組織された。この組織は2班からなり、一つは変異原性を標識として変異原物質をスクリーニングするグループ、他はこの結果に基づいてがん原物質をスクリーニングするグループである。変異原性をスクリーニングする前者では、サルモネラ菌を用いたAmes法、枯草菌を用いたrec assay法（以下これらを短期検定法とよぶ）などで、これにより多数の変異原物質がつぎつぎに発見された。一方リスク推定法の方は、かねてから十分研究の行われてきた放射線のそれと対比したrec (radiation equivalent chemical)で簡単に解決できると思われたが、生殖細胞の発育段階によって放射線感受性や化学物質に対する感受性が大変異なることなどから、予想外にむずかしい問題としてICPEMC (International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens) の作業にまつこととした。

さて短期検定法の開発により、かねてからがん学者の間に予想されていた突然変異原物質は

表 1 協力研究の結果

1-1

調査した化学物質の総数	サルモネラ(TA 100)に対する変異原性	カイコに対する変異原性	該当する化学物質の数(割合)
154	+	+	11 ( 7.2 %)
	-	+	3 ( 2.0 %)
	+	-	36 ( 23.4 %)
	-	-	104 ( 67.5 %)

1-2

調査した化学物質の総数	ハムスターに対する <i>in vitro</i> 染色体切断	カイコに対する変異原性	該当する化学物質の数(割合)
129	+	+	10 ( 7.8 %)
	-	+	4 ( 3.1 %)
	+	-	50 ( 38.8 %)
	-	-	65 ( 50.4 %)

1-3

調査した化学物質の総数	ラットに対する <i>in vivo</i> 染色体切断	カイコに対する変異原性	該当する化学物質の数(割合)
113	+	+	5 ( 3.9 %)
	-	+	6 ( 5.8 %)
	+	-	11 ( 9.7 %)
	-	-	91 ( 84.5 %)

殖細胞突然変異との関係を考察する上で極めて重要な資料を提供する。その結果を表1に示す。

生殖細胞系の検出感度は細菌の突然変異系やハムスターの *in vitro* 細胞遺伝系はもちろん、ラットの *in vivo* 細胞遺伝系にくらべても劣る。これは生物の相違が原因をなしているとも思われるが、本質的には、(1) *in vitro* 系と *in vivo* 系の違い、(2) 体細胞と生殖細胞の違いの2点が主要な原因をなしていると見るべきであろう。

(1)については、高等生物の体内に侵入した異物を排除するためのさまざまな機構の存在がすでに明らかにされている。すなわちスカベンジ

ヤーとしてのヘミン、代謝作用による活性化や解毒分解等が知られている。

カイコについて、われわれが、まず遭遇した例はカイコがニトロフラン類に反応することであった。ところがAmesのTA 1835系は陰性でここにカイコの代謝特性の例がまず見出された。つぎにDMNAに対しショウジョウバエでは陽性の結果がえられているのにカイコは陰性、また4NQOに対しカイコはどんな方法でテストしても陰性であった。化学物質の生体内代謝の機構は思いのほか複雑のようである。

カイコで気のついた第2の例は、フラボン類の変異原性をこの虫が解毒してしまうことであ

った。杉村博士らによりフラボン類にかなり強力な変異原性を持つものがあることが報告されたが、カイコは緑の桑葉のみを食餌としている。桑葉の中にはケルセチンをはじめとして少くも5種のフラボン類が含まれていることが知られている。したがってカイコには当然これを解毒する機構をそなえていなければならない。林屋博士はこの推定の正しいことを明らかにした。糖がつくと無毒になる。糖が外れると変異原性を持ってくる。グリコシスによる解毒機構はフラボノイドだけでなく、かなり一般に見られる現象のようである。

次は(2)の体細胞と生殖細胞との間の違いで、最も大きな相違が考えられるのは突然変異を起したDNA(染色体)放出の機構であろう。生殖細胞は放射線に対し著しく感受的で容易に殺され、または異常を起す。その結果不妊、流死産、新生児死亡等が起り、突然変異は排除されて、これが次代に伝達されるのを防除する仕組みが備わっている。化学変異原による生殖細胞致死作用については、まだ十分な研究はないが、生殖細胞系では細胞分裂の回数や、受精後の個体発生過程における細胞分裂回数が非常に多いことを考えると、おそらく体細胞と生殖細胞との間に突然変異の検出される機会に大きな相違が起るものと考えられる。従って他の体細胞を用いた実験系にくらべて、カイコの生殖細胞系の検出度の低かったのは当然で、これは生殖細胞一般の特性と見てよいであろう。

### 3. 閾値の問題

最後にカイコの化学突然変異原に関する研究で最も注目に値するのは投与量一効果関係が、シグモイド型を示すことが見られることである(村上)。このことは変異原性の弱い変異原、たとえばクロルジアゼポキンドで明瞭に認められるばかりでなく、変異原性の高いAF<sub>TB</sub>のようなものでもシグモイド関係を認めることが

できた。このことから筆者は化学変異原の作用には原則的に閾値の存在を考えてよいものだとと思っている。

このようなことからカイコの特定座位系は生殖細胞系における突然変異性の検出や、実験にはえがたい貴重な実験系であることを理解できると思う。

# 都市大気浮遊じんの変異原性の経日変動パターン — 大気モニタリング方法の検討を中心として —

国立公衆衛生研究所地域環境衛生学部 松下 秀鶴

## 1. はじめに

人がんの発生に環境がん（変異）原物質が大きく寄与していることは衆知の事実である。われわれはこれらのがん（変異）原物質を空気の吸入や水・食品などの摂取を通じて体内に取り込んでいるが、空気の場合、水や食品などの場合と趣を異にする。なぜなら、われわれは一生涯にわたってたえず空気を吸いつづけなければならず、たとえその場の空気が極度に汚染されても、その空気を吸わなければならないからである。しかも空気の一日吸入量は約  $20 \text{ m}^3$ 、重量にして約  $20 \text{ kg}$  と比較的大きい。このため、空気中に含まれるがん（変異）原物質をたえずモニタリングし、これらを定量的に評価することは、空気汚染と肺がん等との関連を究明する上にも、がん予防対策策定の上にも重要である。

空気中のがん（変異）原物質のモニタリングは化学計測に基づくものと、変異原性試験などの生物学的計測に基づくものがある。前者は個々の発がん物質等を定量的に評価するのに適しているが、汚染物全体の影響を評価するのに問題がある。後者は汚染物全体の影響を知る上で極めて有益であるが、定量性に問題が残されている。

われわれは変異原性を指標とする大気のモニタリングに関して、これを簡易かつ精度よく行う方法の検討を行ってきてている。そしてたとえば大気試料の調製法として、従来のソックスレー抽出法を含む方法の代りに、ベンゼンーエタノール（3:1、 $\sqrt{\lambda}$ ）混合液を用いる超音波抽出・試料調製法を用いれば試料調製時間が著しく短縮するばかりでなく、試料調製に伴う人為的変異原生成も防止することができることなどを見

出している（後藤ら、1981、1982）。ここではモニタリング方法検討の延長線上にある2つの研究成果の概要をのべてみたいと思う。

## 2. 復帰変異コロニー計数法の検討

大気試料等の変異原性モニタリングにおいては、数多くの測定点で定期的に長時間にわたって採取された試料の変異原性をたえず測定する必要がある。このためのテストとしては簡易で迅速であることが望まれる。そこでコロニー計数法の簡易化の検討を行いつぎの結果を得た（松下ら、1982）。

すなわち、市販の自動コロニーカウンターは復帰変異コロニーの計数に便利であるが、この装置による計数値は目視による計数値と一般に異なり、両計数値の差はコロニー数が多くなるほど多くなることが知られている。そこでこの原因について解析した結果、自動コロニーカウンターでは、互いに接触したコロニーを識別することができないことと、コロニーが小さくなりその吸光度がある値以下になるとカウントしなくなることによると考えられた。

そこで、前者の原因の解決に対しては、モンテカルロ法によるコンピュータシミュレーションにより、一定面積内に所定のコロニーを分散させた時に単独に存在するコロニーの数と2個、3個、…… $n$  個互いに接触して存在するコロニーの数を算出し、これらの値から補正式を求める方法を検討した。なお、この計算においてコロニー数とその粒径との関係は実験により求めた。その結果、自動コロニーカウンターの計数値（ $x$ ）からの真のコロニー数（ $y$ ）を求める補正式として

$$y = 3184.7 - 1000 \sqrt{10.14 - 6.466 \times 10^{-4} \frac{x}{k}} \quad (x=1 \sim 455)$$

$$y = 6017.0 - 634 \sqrt{90.25 - 3.158 \times 10^{-4} \frac{x}{k}} \quad (x=455 \sim 1583)$$

ここで  $k$  : 視野率

を得た。この式は一見複雑に見えるが通常の小型プログラム電卓に  $x$  と  $k$  を入れれば簡単に  $y$  を求めることができる。

一方、後者の原因、すなわちコロニーカウンターの検出力の問題は通常、コロニー数 1000 個附近で感度を切りかえることにより解決できることを認めた。

1(a)と(b)の比較から本補正法の有効性が理解されるであろう。また、コンピュータシミュレーションによる検討はコロニー数 2000 までしか行わなかったが、それ以上のコロニー数でも本補正式が有効であることは図 1(b)からうかがえるであろう。

なお、これらの計数に先立ってプレート 1 個 1 個を観察し、Killing や汚染の有無等を調べる必要があることはいうまでもない。

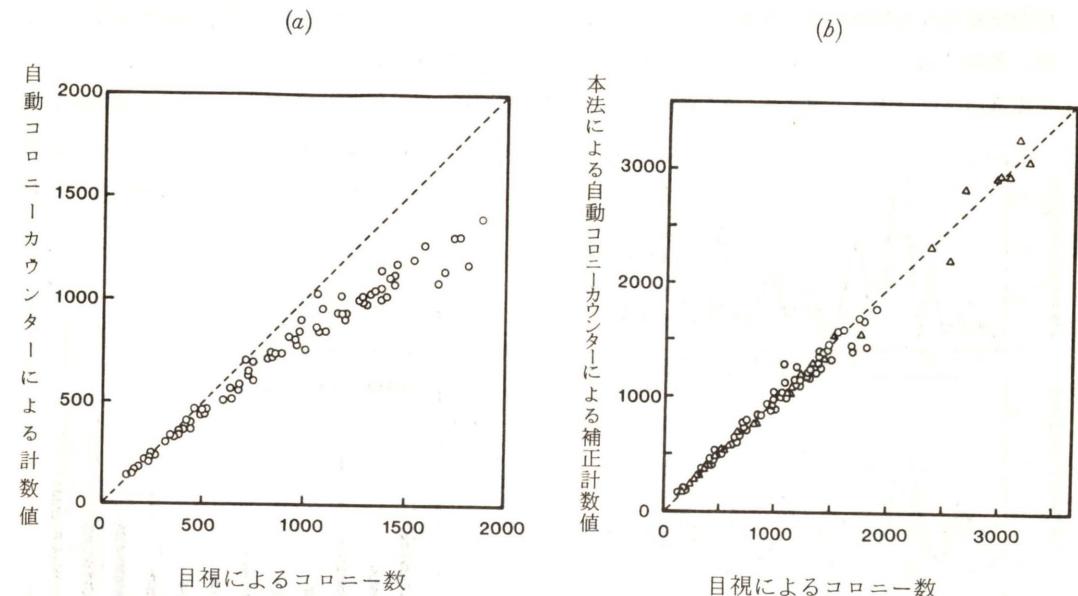


図 1 目視によるコロニー計数値と自動コロニーカウンターによる計数値との関係。

(a)：自動コロニーカウンター値を視野率補正した場合

(b)：自動コロニーカウンター値を本法により補正した場合

△ : Artek 880 (Sense 4.8)、○ : CA-7A (コロニー数、約1000以下はSlope3、それ以上はSlope 2)

図 1 にその検討結果の1例を示す。図 1(a)は市販自動コロニーカウンターの計数値に視野率補正をほどこしたものと目視による計数値との関係を示したものである。図 1(b)は自動コロニーカウンターの計数値を本補正式で補正した値と目視による値との関係を示したものである。図

## 3. 大気浮遊粉じんの変異原性の長期経日変動パターン（後藤ら、1982 b、1982 c）

大気浮遊粉じんに含まれるベンゾ(a)ピレンなどの発がん関係物質のモニタリングは、通常1カ月に1回ないし2回行われているにすぎない。変異原性に関して定期的モニタリングが行われ

ている例は極めて少ない。一方、大気中のベンソ(a)ピレン濃度や変異原活性は種々の原因により大きく変動することが知られている。したがって、上述のモニタリング結果が何を表わしているのか必ずしも明らかでなく、このような値を用いて発がん性物質等の被曝量を求めるときには誤差が生じる可能性がある。そこでわれわれは1カ年間連日、大気浮遊粉じんを採取し、その変異原性と若干の発がん関連物質を測定することにした。

図2に測定結果の1部を示す。この図から単位空気量当たりの変異原活性は春、夏期に低く、秋、冬期に高いことや、同一月内でも日によつて変異原活性は大きく変わることがわかる。また、

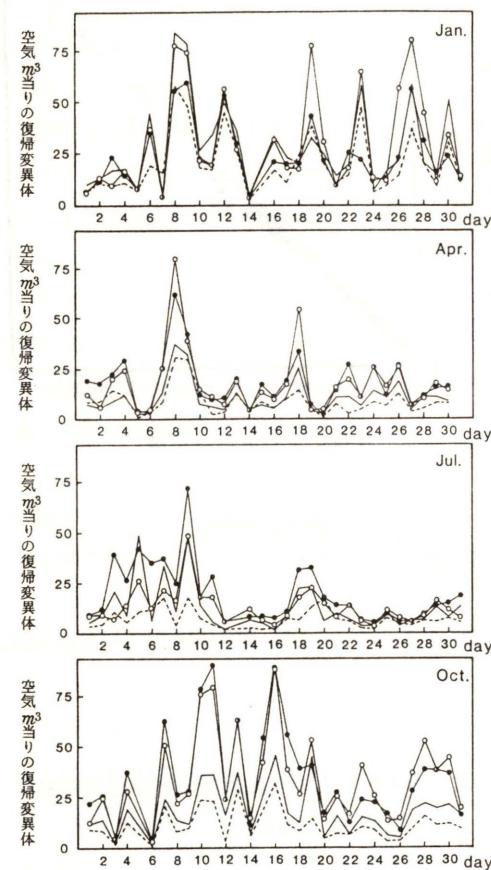


図2 季節別にみた東京都の大気单位体積当たりの変異原活性の経日変動（昭和55年）

正月や夏休みなど産業活動が低下した時は大気中の変異原活性も低いことがうかがえる。

図2は明らかに、1カ月に1～2回のデータからその月の変異原活性等を云々するのは危険であることを示している。そこで、データが若干欠落している時の月、または季節平均値を求める方法を検討した結果、変異原活性やベンゾ(a)ピレン等の多環芳香族炭化水素（PHA）濃度はすべて対数正規分布に従うことから、データは幾何平均値とその偏差で表現するのがよく、データが欠落した場合に算術平均値を求める場合には幾何平均値とその偏差から求める方がよいと判断された。

図3は大気浮遊粉じん1mg当たりの変異原活性の月別幾何平均値が年間を通じてどのように変化するかを示したものである。なお、図中の棒

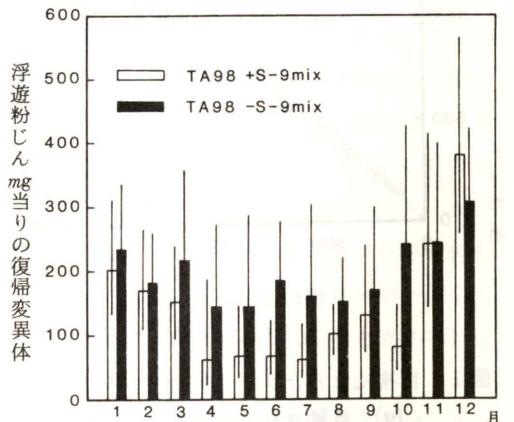


図3 東京都の大気浮遊粉じん単位重量当たりの変異原活性の月別幾何平均値の年間変動（昭和55年）

は偏差を示している。この図からも変異原活性は一般に春・夏期に低く、秋・冬期に高いことがわかる。また12月を除いて直接変異原（direct mutagen）としての活性の方が前変異原（pro-mutagen）としてのそれより高いこと、前者と後者の活性の比（ $^{-89}/_{+89}$  値）は春・夏期に

に著しく高いことがわかる。このことは変異原生成に関して大気中での光化学反応が関与していることを強く示唆している。

#### 4. モニタリングにおけるサンプリング方法の検討

モニタリングは長期間にわたって定期的に行う必要があるため、そのための試料採取はせいぜい1週間に1回程度である。そこで、このようなサンプリングで比較的信頼性の高い値を得るには何曜日にサンプリングすればよいかを検討してみた。

表1は季節平均値を出す場合の検討結果を示したものである。表1から各季節における全測定値の平均を100とすると、土、日、月曜日に採取した場合は平均値を下まわることが多く、

表1 季節別算術平均値におよぼす試料採取曜日の影響

季節 地域 S-9	曜日 平均 値						全平均値	
	月	火	水	木	金	土		
冬期 TA100 +	68	115	100	145	113	76	84	100
12月 TA100 -	70	122	87	138	101	102	82	100
1月 TA98 +	79	113	96	142	112	86	71	100
2月 TA98 -	77	116	89	138	102	96	85	100
春期 TA100 +	88	117	117	104	121	95	81	100
3月 TA100 -	113	130	96	115	114	51	88	100
4月 TA98 +	83	116	113	121	104	66	83	100
5月 TA98 -	96	115	112	119	107	75	77	100
夏期 TA100 +	100	106	112	99	88	125	89	100
6月 TA100 -	100	125	96	73	112	77	100	100
7月 TA98 +	99	104	102	104	85	89	118	100
8月 TA98 -	91	108	104	97	118	81	104	100
秋期 TA100 +	102	125	106	110	90	64	105	100
9月 TA100 -	96	130	111	114	93	69	83	100
10月 TA98 +	98	130	105	110	99	59	100	100
11月 TA98 -	104	126	94	123	64	83	80	100

逆に火、木曜日の場合は上廻ることが多いことが分る。そして、全測定値の平均に最も近い値を与えるのは水曜日の採取試料の場合であり、±15%以内で一致することを認めた。同様の結果がベンゾ(a)ピレン等のPAHでも確認されている。したがって、少なくとも東京都の大気モニタリングにおいては水曜日に試料を採取することが望ましいと判断された。現在このようなことをより明確にするために、さらに試料を採取しつづけ測定を続行している。なお、試料

採取地点の地域代表性の検討も重要であることはいうまでもない。

#### 5. おわりに

以上、大気浮遊粉じんの変異原性のモニタリングに関して、われわれの研究室での成果を述べた。從来、変異原性試験は定性的または半定量的評価に用いられる場合が多く、モニタリングのように長期間にわたる定量的評価はほとんどなされていなかったため、試験方法に関して検討すべきことが多く残されているように思う。

変異原性試験に対しても化学計測に準じた定量性が保証され、環境試料に対するモニタリングが化学的モニタリングとともに各地で行われるにつれて、日常生活を通じてどの程度のがん（変異）原物質を体内に取り込んでいるかが明らかとなり、がん予防対策策定の重要な基礎資料となるものと考えられる。がん予防対策にとって最も重要な基礎資料の一つは環境がん（変異）原物質の定量的評価である。

#### 文 献

後藤純雄、河合昭宏、米川徹、久松由東、松下秀鶴：大気浮遊粉じんの変異原性におよぼす抽出溶媒の影響。大気汚染学会誌、16：18-25（1981）。

後藤純雄、河合昭宏、米川徹、松下秀鶴：大気浮遊粉じんの変異原性モニタリング用超音波抽出法。大気汚染学会誌、17：53-57（1982a）。松下秀鶴、後藤純雄、森田昌宏、林健児：変異原性試験用自動コロニーカウンター計測値の補正方法に関する研究。大気汚染学会誌、17：177-186（1982）。

後藤純雄、加藤幸彦、折井章子、田中一幸、久松由東、松下秀鶴：大気浮遊粉じんの変異原性の経日変動。大気汚染学会誌、17：295-303（1982b）。

後藤純雄、奥貫正美、西村哲治、久松由東、松下秀鶴：都市大気浮遊粉じんの変異原活性の長期経日変動パターン。日本環境変異原学会第11回大会講演要旨集、109（1982c）。

# 大気およびディーゼル排ガス中ニトロアレンの変異原性

福岡県衛生公害センター 常盤 寛

## 1. はじめに

大気中の汚染物質はヒトの肺がん増加と密接な関係があり、他の環境因子とともに注目されている。われわれの調査によると、過去10年間の大気中汚染物質の変異原性は必ずしも減少しているとはい難く、むしろ従来とは異なった変異原が検出されつつある（Tokiwら、1983）。その要因の一つにディーゼル排ガス汚染が指摘されている。

ニトロアレンは芳香族炭化水素（PAH）がNO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>、硝酸およびオゾンなどとのニトロ化反応によって生成されるため、種々の環境材料に広く分布していると考えられる。さらに本物質はサルモネラ系によるテストで高い変異原性を示し（Tokiwら、1981、RosenkranzとMermelstein、1983）、おそらく発がん性を有すると推定される。そこで大気汚染物質やディーゼル排ガス中のニトロアレンの役割について生体影響を考察する必要がある。

## 2. ニトロアレンの変異原性

多くのニトロアレンはラット肝S-9画分による代謝活性をうけないで突然変異を誘起する。しかし、ニトロアレンは種々の腸内細菌、腸管内常在嫌気性細菌に存在するニトロレダクテスによって活性化されることがわかっている（Ohnishiら、1983）。したがってニトロアレンの変異原性、発がん性に関与している活性体はこのニトロレダクテスによって還元される際に生じるヒドロキシルアミン中間体であると考えられている。この中間体はMNNGなどにおいては比較的安定しているが、ニトロアレンから生成される中間体は不安定なものであ

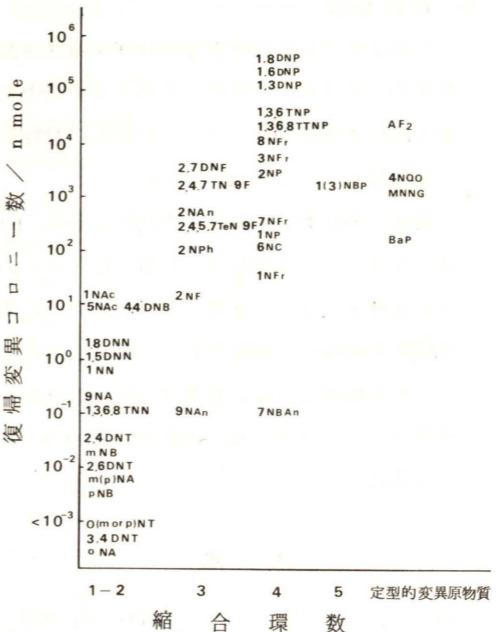
ろうと推定される（PoirierとWeisburger、1974）。

サルモネラ菌を使ったニトロアレンの変異原性はわれわれの研究を始め多数報告されているが、各研究者の変異原性結果を相互に比較することは困難である。これは発育増殖ステージの異なる検定株を使うと、異なる成績がえられるからである。Mermelsteinら（1981）は対数増殖期より休止期の細胞を使用すると、比較的安定した変異原性結果がえられると報告している。この原因は細胞内のニトロレダクテス産生性によるものか、あるいはニトロアレンがこのレダクテスによって還元される際に生じるヒドロキシルアミン中間体の安定性に起因しているものかも知れない。

一方ニトロアレンの変異原性の強度は化学物質の構造に関係がある。図1に示したように、

図1 ニトロアレンの変異原性

NT, ニトロトルエン；DNT, ジニトロトルエン；NA, ニトロアニソール；NB, ニトロビフェニール；TNN, テトラニトロナフタレン；NN, ニトロナフタレン；DNN, ジニトロナフタレン；NAn, ニトロアントラゼン；NAC, ニトロアセナフテン；DNB, ジニトロビフェニール；NPh, ニトロフェナントレン；NF, ニトロフルオレン；DNF, ジニトロフルオレン；TN-9F, トリニトロ-9-フルオレノン；TeN-9F, テトラニトロ-9-フルオレノン；NFr, ニトロフルオランテン；NP, ニトロピレン；DNP, ジニトロピレン；TNP, トリニトロピレン；TTNP, テトラニトロピレン；NC, ニトロクリセン；NBP, ニトロベンジ(a)ピレン；NBAn, ニトロベンジ(a)アントラゼン；AF<sub>2</sub>, フリルフラマイド；4NQO, 4-ニトロキノリン-N-オキシド；MNNG, N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロゾグアニジン；BaP, ベンジ(a)ピレン



1～2員環をもつニトロアレンでは弱く、これに反し3～4員環では非常に高い変異原性を示す。またモノニトロよりジニトロ置換体は強い変異原性を示す傾向がある。これをニトロピレン誘導体についてみると、ジニトロピレンの変異原性はニトロピレンのそれの260～560倍の活性を保有している。したがってサルモネラ系による変異原性テストでは被検化合物の純度が重要となってくる。

ニトロアレンの突然変異機構は必ずしも明らかでないが、ニトロピレン誘導体の変異原性についてみると、変異原物質がDNAの塩基対間に挿入することによって惹起したframe-shift型の突然変異であろうと推定されている。しかし、これには異論があり、1,8-ジニトロピレンはウアバイン耐性をマーカーとしたマウスリンパ細胞性腹水腫瘍に由来するL5178Y細胞で塩基置換型の突然変異を示すようである（Coleら、1982）。

## 3. ディーゼル排ガス中のニトロアレン

ディーゼル排ガスの変異原物質としては、間

接変異原より、むしろ直接変異原物質が重要であろうと考えられている。そして、この変異原物質の主体は極性の高い物質・ニトロアレン類が関与している。

Xuら（1982）、Schuetzleら（1983）は、ディーゼル排ガス中にニトロアレン50～70種類を確認同定した。しかし非極性部分の変異原性が弱いため、主要な変異原物質はやや極性の高い画分に存在していると考えた。Schuetzleはディーゼル排ガスの粒子状物質における総変異原性の60～80%はニトロピレン、ニトロフルオランテン、ジニトロピレンの活性が反映していると報告している。

われわれもほぼ同様の結果を得ている。すなわち、ディーゼル排ガスの粒子状物質からの中性画分をセファデックスLH<sub>20</sub>カラムを使って、活性部分を一部精製した。ついで主要な活性画分はZorbax ODSカラムによる高速液体クロマトグラフィーで溶出し、30秒間隔で分画した後、TA 98株に対する変異原性を測定した。活性の大部分はニトロピレン、ジニトロピレンおよびニトロフルオランテンの溶出位置と一致した。この活性部分をガスクロマトグラフィー（ECD）で同定および定量すると、粗抽出物あたり、1-ニトロピレンが7.05 ppm、3-ニトロフルオランテンが1.2 ppm、1.6-と1.8-ジニトロピレンが3.5および5.7 ppmで、この4種のニトロアレンはディーゼル排ガス中の主要な変異原物質であろうと推定された。

## 4. 大気中のニトロアレン

一方大気中におけるニトロアレン生成については、ベンジ(a)ピレンがNO<sub>2</sub>、O<sub>3</sub>、PANなどとの反応によってニトロベンジ(a)ピレンが生成されることが示唆されている（Pittsら、1978）。Gibson（1981）によると、大気粒子状物質1 mgあたり、1-ニトロピレンは0.27～0.56、6-ニトロベンジ(a)ピレン

は0.91～2.48nmであったと報告している。

われわれはディーゼル排ガス汚染の著しいチリ・サンチャゴ市で採取した大気粒子状物質についてニトロアレンの検索を試みた(Tokiwaら、印刷中)。図2示したように粗抽出物の中

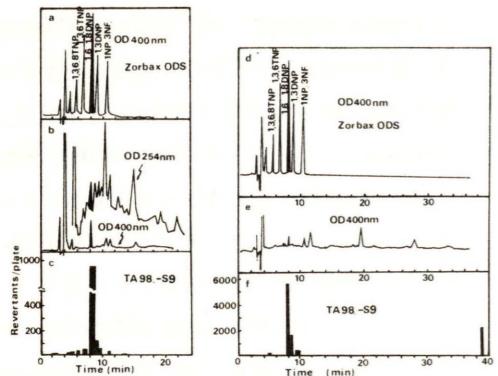


図2 大気試料の高速液体クロマトグラフィーと各画分の変異原性

チリ・サンチャゴ市の大気試料(a, b, c)と日本における大気試料(d, e, f)の中性画分をZorbax ODS(溶媒、アセトニトリル/メタノール、80/20)で分画した。

aとdはニトロビレンおよびニトロフルオランテンの標準物質。

bとeは試料の高速液体クロマトグラム。  
cとfは各画分の変異原性。

性画分を上述の方法によってZorbax ODSカラムによる高速液体クロマトグラフィーで分析した。溶出液は30秒間隔で分画し、変異原テストを行った(図2c)。また日本で採取した大気試料について同様の実験を行った結果を図2d, e, fに示した。これらの結果から、ジニトロビレン溶出相当画分に高い変異原性が得られた。したがって、大気中の直接変異原の主体はジニトロビレンによる可能性が強いと考えられる。

## 5. おわりに

ジニトロビレンの変異原性はサルモネラ菌に特異的であるが、既知のニトロアレンの中では最も高い変異原物質である。しかし、動物の発がん性は明らかにされていない。

最近、われわれの発がん実験によると、1,6-ジニトロビレン2mgをBALB/Cマウスの皮下に接種すると、50%のマウスが局所に著明な腫瘍を形成し、組織学的には纖維性肉腫であることを観察したが、同量の1-ニトロビレン接種マウスには発がん性が認められていない(未発表)。

## 文 献

- Cole, J., Arlett, C.F., Lowe, J. and Bridges, B.A.: The mutagenic potency of 1,8-dinitropyrene in cultured mouse lymphoma cells. *Mutation Res.*, 93: 213-220 (1982).
- Gibson, T.L.: Nitro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne and source particulate, Research Publication GMR-3836, ENV #18 (1981).
- Mermelstein, R., Kiriazides, D.K., Butler, M., McCoy, E.C. and Rosenkranz, H.S.: The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria. *Mutation Res.*, 89: 187-196. (1981).
- Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y. and Wakisaka, K.: Environmental aromatic nitro compounds and their bacterial detoxification; in Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixture III, p527-539, Plenum Press, New York (1983).
- Pitts, Jr., J.N., Van Cauwenbergh, K.A., Grosjean, D., Schmid, J.P., Fritz, D.R., Belser, Jr., W.L.,

Knudson, G.B. and Hynds, P.M.: Atmospheric reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science*, 202: 515-519 (1978).

Poirier, L.A. and Weisburger, H.: Enzymic reduction of carcinogenic aromatic nitro compounds by rat and mouse liver fractions. *Biochem. Pharmac.*, 23: 661-669 (1974).

Rosenkranz, H.S. and Mermelstein, R.: Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes, All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutation Res.*, 114: 217-267 (1983).

Schuetzle, D.: Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. *Environ. Heal. Persp.*, 47: 65-80 (1983).

Tokiwa, H., Kitamori, S., Nakagawa, R., Horikawa, K. and Matamala, L.: Demonstration of a powerful mutagenic dinitropyrene in airborne particulate matter. *Mutation Res.*, 印刷中。

Tokiwa, H., Kitamori, S., Horikiwa, K. and Nakagawa, R.: Some findings on mutagenicity in airborne particulate pollutants. *Environ. Mutagen.*, 5: 87-100 (1983).

Tokiwa, H., Nakagawa, R., Morita, K. and Ohnishi, Y.: Mutagenicity of nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide. *Mutation Res.*, 85: 195-205 (1981).

Xu, X.B., Nachtmann, J.P., Jin, Z.L., Wei, E.T., Rappaport, S.M. and Burlingame, A.L.: Isolation and identification of mutagenic nitroarenes in diesel-exhaust particulates. *Anal. Chim. Acta*, 136: 163-174 (1982).

# 給油所排水中の1-ニトロピレン

徳島大学医学部細菌学教室

大西 克成・木内 武美・真鍋 芳樹  
脇坂 和見・田原 功・秋本 茂

## 1.はじめに

水圈の変異原検索のために、河川水、ノリ、ワカメなどの海産物、魚貝類、プランクトンなどをAmes法で調べたところ、TA100株、S-9無添加で変異原性が認められたが、含まれている変異原の同定のために分画していくと、だんだんと変異原性が弱くなり、結局原因物質の同定は困難であった。そこで、水圈を汚染する可能性があるものは何かを考えて、その発生源を調べることにした。徳島市では、下水の一部は汚水処理場に行くが、大部分は直接河川に放出され、紀伊水道、太平洋へと流出する。給油所の排水は直接下水道へ放出されることはなく、各給油所に作られた油水分離槽に一時貯えられ、油分はオイルパットで取り除かれ、水分だけが下水道に出て行くことになっている。給油所では通常1日50トンを越える水を使用しているので、厳しい排水基準の適用は受けていない。給油所によっては、時々変異原を排出しているのではないかと考え、10カ所の給油所について、2ヶ月ごとに1年間、排水の変異原性と変異原である1-ニトロピレン(1-NP)の定量を行った。

## 2.排水採取と定量方法

徳島市内の5カ所の給油所と、市外の国道沿いの5カ所の給油所の油水分離槽の排水口から、1回に1~3ℓの排水を採取し、ジエチルエーテル可溶性の中性・酸性・塩基性画分に分画した。各画分について、*Salmonella typhimurium* TA98株とTA100株とを試験菌株として、37℃20分の前保温法を用いたAmes試験を行い、Aroclor 1254処理し

たラット肝のS-9画分50mlを添加した場合と無添加の場合とで変異原性を測定した。

1-NPの定量のためには、まずジエチルエーテル可溶性中性画分をZorbaxODSカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかけ、移動相として70%アセトニトリルで溶出し、1-NP溶出相当画分を分取した。その画分中の1-NPを1-アミノピレン(1-AP)に還元するための反応液0.5mlとして、NADPH2μmol、グルコース6-燐酸2.5μmol、グルコース-6-燐酸脱水素酵素0.5単位、燐酸緩衝液(PH6.8)50μmol *Bacteroides fragilis*から精製したニトロレダクターゼI(KinouchiとOhnishi, 1983)、および1-NP相当画分を、37℃15時間保温した。エチル酢酸で抽出し、溶媒を溜去した残渣を0.1mlのメタノールに溶解し、再度HPLCに導入して、溶出した1-APの量を蛍光検出器で測定し、排水中の1-NPを定量した(Kinouchiら、1982)。

## 3.排水の変異原性と1-NP含有量

市内では1981年10月から2ヶ月ごとに6回、市外では1981年12月から2ヶ月ごとに5回排水を採取したが、一般に中性画分の変異原性が高かった。中性画分の中では、1ℓの排水当りの変異原性が10<sup>4</sup> His<sup>+</sup>/プレート以上の試料が、市内では全30試料のうち9試料、市外では全25試料のうち2試料であり、給油所利用車台数が多いためか、市内の給油所の排水の方が変異原による汚染の程度が大きかった。試験菌株では、一般にTA98株の方が高い変異原性を示し、しかもラット肝S-9無添

加の時の方が高いことが多かった。これらのこととは、排水中にはフレームシフト型の突然変異を起こす直接変異原が多いことを示唆しているので、つぎには、多環芳香族炭化水素のニトロ化合物の代表として1-NPの定量を行った。

中性画分をHPLCカラムに注入し、1-NP相当画分を、ガスクロマトグラフィー・質量

分析法で分析して、1-NPが含まれていることを証明した(Ohnishiら、1983)が、1-NP以外の物質も含まれているため簡単に定量できなかった。したがって、前述のように1-APに還元して、再度HPLCに導入し、1-APのピーク面積から1-NPを定量した。

表1 給油所排水中性画分の変異原性。1-NP含有量およびTA98株による中性画分全変異原性に占める割合

給油所	試料採取日	中性画分の変異原性 (His <sup>+</sup> /プレート/ℓ排水) TA98株(-)S-9	1-NP (ng/ℓ排水)	1-NPの中性 画分全変異原性 に占める割合(%) <sup>a</sup>
市内				
A	1981. 10. 25	13,100	926	12.9
	12. 20	455,000	25,570	10.2
	1982. 2. 7	41,300	2,020	8.9
	4. 25	8,750,000	12,600	0.3
	6. 6	3,000	33	2.0
B	8. 22	519	< 0.51	< 0.2
	1981. 10. 25	649	< 0.63	< 0.17
	12. 20	1,320	4.2	0.6
	1982. 2. 7	487	28	10.5
	4. 25	253	53	37.8
C	6. 6	2,820	244	8.2
	8. 22	400	< 0.40	< 0.2
	1981. 10. 25	567	52.8	16.9
	12. 20	297	< 0.50	< 0.3
	1982. 2. 7	161	< 1.1	< 1.2
D	4. 25	6,6600	560	1.5
	6. 6	6,470	533	15.0
	8. 22	110	< 0.34	< 0.6
	1981. 10. 25	22,700	433	3.5
	12. 20	7,680	1,586	37.6
E	1982. 2. 7	7,790	286	6.7
	4. 25	200	10.2	9.5
	6. 6	8,860	583	12.0
	8. 22	180	< 0.36	< 0.4
	1981. 10. 25	22,700	178	1.4
	12. 20	357	< 3.0	< 1.5
	1982. 2. 7	2,230	93	7.6
	4. 25	182	< 1.7	< 1.7
	6. 6	10,500	447	7.8
	8. 22	890	< 0.4	< 0.1

給油所	試料採取日	中性画分の変異原性 (His <sup>+</sup> /プレート/ $\ell$ 排水) TA 9 8 株(-)S-9	1-NP (ng/ $\ell$ 排水)	1-NP の中性 画分全変異原性 に占める割合(%) <sup>a</sup>
市外				
F	1981. 12. 20	4,630	361	14.2
	1982. 2. 7	2,170	464	38.9
	4. 25	2,450	293	21.8
	6. 6.	3,350	248	13.5
	8. 22.	195	< 0.25	< 0.2
G	1981. 12. 20	1,530	343	4.1
	1982. 2. 7.	73	< 1.0	< 2.5
	4. 25	193	240	22.8
	6. 6	3,910	301	14.0
	8. 22	1,230	< 0.44	< 0.1
H	1981. 12. 20	374	< 0.43	< 0.21
	1982. 2. 7	53	16.8	58.5
	4. 25	602	< 24.3	< 7.3
	6. 6	1,070	116	19.7
	8. 22	190	< 0.38	< 0.4
I	1981. 12. 20	39,800	165	0.8
	1982. 2. 7	1,790	162	16.5
	4. 25	234	< 10.2	< 7.9
	6. 6	1,140	98.0	15.6
	8. 22	160	< 0.38	< 0.4
J	1981. 12. 20	99,200	323	0.6
	1982. 2. 7	1,360	43.0	5.7
	4. 25	2,600	661	46.3
	6. 6	839	76	16.4
	8. 22	1,962	< 0.36	< 0.03

a 1-NP ngはTA 9 8 株、(-)S-9で1.82 His<sup>+</sup>復帰変異集落数/プレートを生じるものと仮定して計算した。

(表1) 1-NP 含有量は、検出される試料では4.2~25,570 ng/ $\ell$ と幅広く、1-NP が検出された市内の20試料の平均が2,312 ng/ $\ell$ 、市外の16試料の平均が211 ng/ $\ell$ で、やはり1-NP も市内の排水の方が多かった。TA 9 8 株、(-)S-9による中性画分全変異原性に占める1-NPの寄与率は、計算上0.3%から5.85%であった。53試料のTA 9 8 株S-9無添加での変異原性と1-NP含有量との間には正の相関が観察された( $r=0.386$ 、 $P<0.01$ )。

排水中の変異原物質としては、車に付着した

排ガス成分が洗車の際に出てきたものもあるが、給油所によってばらつきがあることから、使用済のエンジンオイルが油水分離槽に混入したものと考えられた。実際に、肉眼的にオイルが観察された試料では変異原性と1-NPの量が大きかった。

#### 4. 使用済エンジンオイルの変異原性と1-NP

##### 含有量

使用済のエンジンオイルとしては、ガソリン乗用車のエンジンオイルを3,200 km走った後に採取し、その30 mlをソックスレーで8時間

メタノール抽出し、ジエチルエーテルで中性、酸性、塩基性画分に分けた。中性画分は、逆相のMerck RP 18カラムを用いたHPLCで分画分取し、同様に変異原性と1-NPとを定量

(TA 100株S-9添加)にも未知の変異原が含まれており、将来これらについても化学的に明らかにされなければならない。

表2 使用済エンジンオイル中性画分のHPLC分画後の変異原性

HPLC分画	His <sup>+</sup> 復帰変異集落数/プレート/中性画分 0.5 mg相当					
	TA 9 8 株 (-)S-9		TA 100 株 (+)S-9		TA 9 8 NR 株 (-)S-9	TA 98/18 DNP 6 株 (-)S-9
1. 溶媒画分	296 (15.0)	32 (7.2)	161 (13.1)	37 (11.9)	331 (21.1)	281 (24.8)
2. 極性画分	531 (26.9)	150 (33.6)	426 (34.9)	59 (18.9)	509 (32.4)	437 (38.6)
3. diNP画分	886 (44.8)	82 (18.4)	370 (30.3)	60 (19.2)	592 (37.7)	215 (19.0)
4. 1-NP画分	215 (10.9)	112 (25.1)	213 (17.4)	42 (13.5)	98 (6.2)	154 (13.6)
5. 非極性画分	47 (24)	70 (15.7)	52 (4.3)	114 (36.5)	41 (26)	45 (40)
総計 (%)	1,975 (100%)	446 (100%)	1,222 (100%)	312 (100%)	1,571 (100%)	1,132 (100%)

量した(表2)。分取は、溶媒画分、極性画分diNP画分、1-NP画分、非極性画分に分画して行った。

まずジエチルエーテル可溶性中性、酸性、塩基性画分の変異性を測定したが、排水の場合と同じように、中性画分の変異原性が高く、TA 9 8 株、S-9無添加の時は、 $5.6 \times 10^4$  His<sup>+</sup>/プレート/ml(オイル)という最高の値を示した。

使用済エンジンオイルの中性画分をHPLCで5分画したが、1-NP相当画分のTA 9 8 NR株、(-)S-9での変異原性はTA 9 8 株、(-)S-9の45.6%であり、diNP相当画分のTA 9 8 /1.8 DNP 6 株、(-)S-9での変異原性はTA 9 8 株、(-)S-9の24.3%であり、それぞれ、1-NP、diNPを含有していることが示唆された。実際に、1-NP相当画分は、もとのオイル1 ml当たり138 ngの1-NPを含んでおり、TA 9 8 株、(-)S-9での中性画分の全変異原性の0.45%を占めていた。表2からわかるように、極性画分、非極性画分

#### 5. おわりに

排水中の1-NPが環境中の細菌によって変異原性が弱い1-APに還元される可能性がある。油水分離槽には $1.1 \times 10^4$ ~ $1.3 \times 10^6$ /ml( $2.5 \times 10^5$ /ml)の細菌がいたが、すべて好気性菌であり、そのニトロレダクターゼ活性は嫌気性菌に比べて低かった。実際に油水分離槽の排水から1-NPは検出されなかったので、排水中の細菌によって1-NPが1-APに還元されているとは考えられなかった。したがって、下水道に出た排水中の1-NPが、河川に出てどのように変化するのかは現在のところまったく不明である。

エンジンオイルのHPLC diNP画分の変異原性の割合が高いことから考えて、発がん物質であるdiNPの環境での変化、影響も重要である(大西と木内、1983)。

以上の研究の一部は、文部省科学研究費補助金、厚生省がん研究助成金、財団法人日産科学振興財団の援助によるものである。

## 文 献

- Kinouchi, T., Manabe, Y., Wakisaka, K., and Ohnishi, Y.: Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria. *Microbiol. Immunol.*, 26: 993-1005 (1982).
- Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 投稿中 (1983).
- 大西克成, 木内武美; ディーゼル排出ガスの変異原性. トキシコロジーフォーラム, 6; 印刷中 (1983)。
- Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., and Wakisaka, K.: Environmental aromatic nitro compounds and their bacterial detoxification. In *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*, edited by M.D.Waters et al., Plenum Press, 527-539 (1983).

## ステンレス鋼溶接作業者の末梢血液リンパ球の染色体について

労働省産業医学総合研究所 輿 貴美子・中西 良文  
昭和大学医学部第二内科 八上 享司

### 1. はじめに

ステンレス鋼溶接作業では、ヒューム、オゾン等の有害物質および紫外線を発生する。ステンレス鋼溶接作業により発生するヒュームは、Cr Ni, Mn等の諸種の重金属を含んでおり、このヒュームが試験管内でハムスター肺由来のDon株細胞の姉妹染色分体交換 (SCE) 頻度の増加や強い染色体異常を引き起こすことが認められている。(Koshi, 1979) 一方、ステンレス鋼溶接作業者には、咽頭がんが多発するという報告 (Hedenstedt ら, 1977) や、肺がんの発生が期待値の約3倍であるという報告 (Sjogren, 1980) もある。発がん作用の認められているベンゼン, (Forni ら, 1971) や塩化ビニール (Heath ら, 1977) 等に曝露している作業者、サイクロフォスファミドなどの制がん剤に曝露している看護婦では末梢血液リンパ球の染色体異常頻度が高かったり、SCE頻度が増加することが認められている。(Norppa, 1980) そこで、ステンレス鋼溶接作業者の末梢血液リンパ球の染色体に異常があるかどうかを検討した。

### 2. 対象および方法

(1) 被検者：作業者44名は、當時ステンレス鋼溶接作業（被覆アーク溶接および不活性ガスシールド溶接）を行っており、時にはアルミ溶接も行っている。経験年数5～20年、平均12.1年、年齢は25～47歳、平均33.5歳の男子である。対照者は15名で、内7名は同じ工場の事務系職員で年齢30～40歳、平均35.1歳の男子であり、残りの8名は医学部学生で年齢23～25歳、平均23.8歳

の男子である。なお、薬剤服用中のものは除いた。薬剤服用中のものは除いた。

(2) 作業環境；溶接作業場は1974年に作業環境が改善され、換気は局所排気および天井ファンにより充分おこなわれているが、個人サンプラーによって測定された曝露濃度は5～174mg/m<sup>3</sup>と個人の間で大きな変動を示しており、作業による曝露量の変動も大きく、平均曝露量を測定することは困難である。作業者は全員が防じんマスクを装用しており、O<sub>3</sub>に対しても活性炭フィルターを使用しているので、ヒュームの吸入は少ないと考えられるが、個人曝露濃度に大きな差があるので、マスクの漏洩などによりヒュームの吸入を想定できる状況である。

(3) 染色体分析法；染色体の分析は被検者名を伏せすべて番号で行った。被検者の肘静脈から採血した全血をフィトヘマグルチニンを含む10%牛胎児血清添加MEM (minimal essential medium) で72時間培養後、増殖したリンパ球をギムザ染色し、染色体の中期分裂像の構造を観察し、異常所見のあるものおよび異常所見がなくても最低8枚の写真撮影を行った。染色体数は写真から算定した。さらにSCE観察のためには、同上の培養液20μg/mlの5-BrdUを加え同様に培養後、染色体をGotoら(1978)の方法で分染し、各人について25個の中期分裂像を写真撮影し、交換数を算定した。

(4) 臨床血液検査；赤白血球、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血液像、GOT, GPT, LDH, r-GTPは常法にしたがって検査した。

### 3. 結 果

SCE頻度の分析結果を図1に示す。作業者

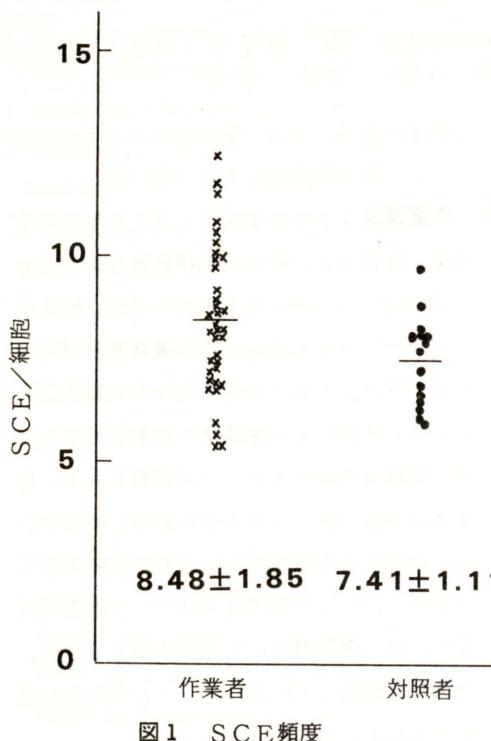


表1 染色体の構造異常出現頻度

	作業者		対照者	
	数	%	数	%
全観察細胞数	2,200		750	
異常中期分裂像	74	3.22*(37)**	16	2.13(9)
染色分体ギャップ	52	2.26(31)	16	2.13(8)
染色体ギャップ	3	0.13(3)	1	0.13(1)
染色分体切断	6	0.26(6)*	0	0(0)
染色体切断	0	0(0)	0	0(0)
染色体断片	9	0.39(8)	1	0.13(1)
染色分体交換	5	0.22(5)*	0	0(0)
環状染色体	2	0.08(2)	0	0(0)
二動原体染色体	2	0.08(1)	1	0.13(1)

( ) 内は染色体異常が認められた人の数

群のSCE頻度の分散は、対照者群のそれに比べて有意に大きい。平均値は作業者でわずかに高いので、作業者群のみにSCE頻度が10をこすものがみられる。染色体の構造異常の出現頻度を表1に示す。染色体異常を認めた人の数からみた場合、染色体異常をもつ中期分裂細胞染色体切断、染色分体交換の出現頻度に有意な差が認められる。作業者中に観察された分裂像の70%以上が47本の染色体をもつものが2名いた。これらの作業者の染色体数の分布を、表2に示す。47本の染色体の核型は図2に示すよう、また、頬部口腔粘膜細胞の約8%にX-クロマチンを認めた。No.2の作業者では、47本以上の染色体をもつ中期分裂像も若干みられたが、過剰な染色体は核型からXによるものと考えられた。

作業者群および対照者群共に、赤白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血液像、GOT, GPT, LDH, r-GTPにとくに異常所見をもつものはなかった。

表2 染色体数の異常者の染色体数の分布

作業者	調査回数	No. 1			No. 2	
		染色体数	I	II	III	I
<46		1/50	2/50	3/50	4/50	4/50
46		3/50	8/50	4/50	6/50	10/50
47		46/50	40/50	43/50	36/50	33/50
>47		0/50	0/50	0/50	4/50	3/50

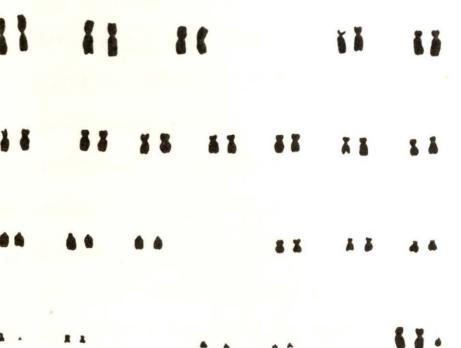


図2 47本の染色体の核型

### 4. 考 察

ステンレス鋼溶接作業者の末梢血液リンパ球の染色体について検討を行い、対照者と若干差のある結果を認めた。

作業環境は1974年に改善され、作業者は個人保護具を使用しているので、現在では集団としての曝露量は少ないと考えられるが、被検者中には改善以前から作業しているものもあり、また、呼吸保護具の効果は個人の装用状態によって著しく異なることがあるので、曝露量、ヒュームの蓄積量は個人差があると考えられる。

試験管内実験の結果(Koshi, 1979)からヒューム中の重金属中で最も染色体異常誘起性が強いと考えられるCrは、被覆アーク溶接から発生するヒュームでは易溶性であるが、不活性ガスシールド溶接から発生するヒュームでは難溶性である。後者の場合には、ヒュームの曝露による蓄積と体内での緩徐な可溶化によ

る長期にわたる影響も考慮する必要があると考える。Husgafvel-Pursiainenら(1982)は、ステンレス鋼被覆アーク溶接作業者の末梢血液リンパ球の染色体を調査し、作業者群と対照者群の間に有意な差がなかったと報告している。

前述したように本調査の作業者とは作業内容が異なるので曝露したヒュームにも相異があるものと考えられる。

作業者群と対照者群について、1日の喫煙本数とSCE頻度との関係を検討したが、作業者群における高いSCE頻度を喫煙量から説明することはできなかった。

### 5. む す び

試験管内でハムスターの培養細胞(Don)に強い染色体異常やSCE頻度の増加をひきおこすステンレス鋼溶接ヒューム等に曝露しているステンレス鋼溶接作業者の末梢血液リンパ球の染色体に異常があるかどうかについて検討を行った。今回の調査では、対照者群の内容が必ずしも十分とはいえないが、作業者群と対照者群の間に染色体の構造異常出現頻度およびSCE頻度に若干の差のあることが示唆された。また、作業者中に46,XY/47,XXYの染色体所見を示すものが2名いた。なお、今後継続して調査を行う予定である。

(謝辞：本研究に御協力頂きました産医研、鈴木薰氏に深謝いたします。)

- Forni, A., Cappelini, A., Pacifico, E. and Vigliani, E.; Chromosome changes and their evolution in subjects with past exposure to benzene: Arch. Environ Health, 23; 385-391 (1971).
- Goto, K., Maeda, S. and Sugiyama, T.: Factors involved in differential giemsa-staining of sister chromatids: Chromosoma (Berl.) 66, 351-359 (1978).
- Heath, C.W. and Dumont, C.R.; Chromosomal damage in men occupationally exposed to vinyl chloride monomer and other chemicals: Environ. Res., 14, 68-72 (1977).
- Hedenstedt, A., Jenssen, D., Lidesten, B.M., Ramel, C., Rannug, U. and Stern, R.M.: Mutagenicity of fume particles from stainless steel welding: Scand. J. Work Environ Health, 3, 203-211 (1977).
- Husgafvel-Pursianen, K., Kalliomäki, P.L. and Sorsa, M.: A chromosome study among stainless steel welders: J. Occup. Med., 24, 762-766 (1982).
- Koshi, K.: Effects of fume particles from stainless steel welding on sister chromatid exchanges and chrom aberrations in cultured Chinese hamster cells: Ind. Health, 17, 39-49 (1979).
- Norppa, H.: Increased sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs: Scand. J. Work Environ Health 6: 299-301 (1980).
- Sjogren, B: A retrospective cohort study of mortality among stainless steel welders: Scand. J. Work Environ Health, 6, 197-200 (1980).

## 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、とく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、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込むものとする。
- 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. 奨励賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行い、将来の成果が期待される研究者（原則として会員）に授与する。
  3. Mutation Research 誌の特別巻を特価で購入配布する。
  4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
  5. 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 本会に次のとお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 國際交流幹事 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より若干名を指名し総会の承諾を得て、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3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 本会に名誉会員をおく。

## 附 記

1. 本会則は昭和57年10月3日より施行する。
2. 本会は事務所を  
静岡県三島市谷田1,111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。

一編集後記

昭和57年10月29日、30日の2日間にわたって修善寺町総合会館で開催されました日本環境変異原学会第11回大会の特集号として、奨励賞受賞のことば・シンポジウム・特別講演につきましては「日本環境変異原研究」第5巻第1号に収録いたしました。

本号は上記大会の一般演題103題の中から、17題を収録させていただきました。本号に掲載されました演題の選択につきましては、大会準備委員の方々の助言を参考にしながら、多分に編集者の独断によるものであり、その責は編集者にあることをお断りしております。他にも収録いたしたい演題が多数ありましたが、紙数の関係で割愛させていただきました。ご執筆をお願いした方々には、ご多用中のところを本号のために原稿をお寄せいただき、大変充実した内容になりましたことを厚くお礼申しあげます。

(黒田行昭)

環境変異原研究 第5巻 第2号

昭和58年11月25日 印刷

昭和58年12月28日 発行

編集責任者 黒田 行昭

国立遺伝学研究所形質遺伝部  
〒411 静岡県三島市谷田1,111  
TEL 0559-75-0771

印刷所 大和印刷所

〒411 静岡県三島市徳倉905-1  
TEL 0559-86-4227

