



環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Sakae Arimoto

Vol.6 Nos.1 & 2 1984

環境変異原研究

第6巻 第1・2号 昭和59年

日本環境変異原学会

環境変異原研究

第6巻 第1・2号 1984年

突然変異原研究

第6巻 第1・2号 1984年

日本突然変異原学会

目次

序	大西 克成
特別寄稿	
化学変異原の突然変異作用にしきい値はあるか — 日産シンポジウムから —	田島弥太郎 …… 3
ヒト癌遺伝子と突然変異	清水 憲二 …… 9
日本と世界の環境変異原研究の比較	松島泰次郎 …… 15
日本における環境変異原研究の動向	
1. 昭和58年度学会奨励賞受賞者論文	
加熱食品中の強力な変異原イミダゾキノリン及びイミダゾキノキサリンの発見	葛西 宏 …… 21
2. シンポジウム「ニトロアレーンの検出, 代謝, 変異原性, 発癌性」	
ニトロアレーンの重要性	
大西 克成, 木内 武美, 真鍋 芳樹, 筒井 英士 …… 29	
ニトロアレーン系変異原の環境分布は何故広いと推定されるのか	
松下 秀鶴, 河合 昭宏, 後藤 純雄, 久松 由東 …… 39	
燃焼生成物中ニトロアレーンの変異原性と1,6-ジニトロピレンの発がん性	
黒本 三男, 中川 礼子, 堀川 和美, 乙藤 武志 常盤 寛, 大塚 久, 大西 克成 …… 49	
ニトロピレンの腸管内嫌気性菌による代謝	
木内 武美, 大西 克成 …… 57	
化学発癌物質の生体内代謝への腸内細菌叢の関与	
諸富 正己, 渡辺 次男, 桜井 稔三, 務台 方彦 …… 67	
変異原性芳香族ニトロ化合物の哺乳動物における還元的代謝機構	
斉藤 和季, 加藤 隆一 …… 73	
培養チャイニーズハムスター肺細胞におけるジフテリア毒素抵抗性 細胞出現を指標とした変異原物質, 発がん物質の検索	
寺田 雅昭 …… 81	
3. 変異原の試験法	
<i>umu-lac</i> 融合遺伝子を利用した環境変異原の短期検索法 (<i>umu</i> -テスト) について	
小田 美光, 中村 清一, 沖 岩四郎, 中田 篤男, 品川日出夫 …… 87	
SOS 反応を指標とした環境変異原の検出系	
太田 敏博, 仲村 直子, 森谷 正明, 白須 泰彦 …… 93	
ショウジョウバエの体細胞染色体の研究法 — 短期 <i>in vivo</i> 染色体試験としての有用性 —	
菊池 康基, 藤川 和男, 木村 善昭, 一ツ町晋也, 劉 美愛 …… 99	

4. 変異原の検出と環境汚染

青綿を用いる環境変異原の検出法 早津 彦哉 117
 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 II —
 村岡 知子, 大下 市子, 安田 公子 125
 クレアチニン, グルコース, アミノ酸混合物の加熱による MeIQx 及び新しい
 変異原 DiMeIQx の生成
 根岸 千恵, 若林 敬二, 津田 充有, 斉藤 肇, 前田 満知,
 佐藤 茂秋, 杉村 隆, Margaretha Jägerstad, 村松めぐみ,
 松島泰次郎 129
 クレアチンと糖, 脂肪酸, アミノ酸等との混合物の加熱による変異原物質の生成
 吉田 大輔 137
 疑変異原性発がん物質の培養細胞に対する変異原性について
 黒田 行昭, 横井山晶子, 賀田 恒夫 143
 1, 1-dichloroethylene の染色体異常誘発性について
 沢田 稔, 祖父尼俊雄, 石館 基 149
 マウス生殖細胞における変異原物質による染色体異常の誘発とその遺伝的影響の分析
 加藤 基恵, 岩原 繁雄 155
 キイロショウジョウバエを用いた D-D の伴性劣性致死試験
 井上 達生, 塚本 令子, 森谷 正明, 白須 泰彦 167
 ショウジョウバエ精子および精原細胞におけるエチルニトロソウレアの摂取量と
 突然変異量の関係 吉川 勲, 綾木 歳一, 大嶋加代子 171
 大気浮遊粒子状物質の変異原性とマウス新生児試験
 佐々木裕子, 遠藤 立一 179
 東京および東南アジア 3 都市における土砂の変異原活性
 西村 哲治, 加藤 幸彦, 松下 秀鶴 185

5. 変異発現の機構と修飾

抗変異原物質の大腸菌 RecA 蛋白質に対する作用 井上 正 193
 変異原物質による遊離ヌクレオチドプールの修飾 根岸 和雄 197
 解熱鎮痛剤フェナセチン, プセチンの代謝活性化機構
 能美 健彦, 石館 基, 渡部 烈 203
 vegetable desmutagens, とくにゴボウについて 賀田 恒夫, 森田 和良 211
 ヒトだ液および血液の変異原不活化とペルオキシダーゼ, カタラーゼ活性
 西岡 一, 布柴 達男 215

付 記

日本環境変異原学会会則 223
 日本環境変異原学会歴代会長および大会準備委員長 224
 日本環境変異原学会昭和59~60年度評議員名簿 225
 日本環境変異原学会入会申込書 226
 日本環境変異原学会学会奨励賞受賞者 228

序

「環境変異原研究」も6年目になりました。原著でもないし、総説でもない、第一線の研究紹介的な論文集のような形に落ちてきたような感じがしています。しかし、子細に検討しますと、毎年少しずつ、その年の編集者の考えで内容が異なっているように思われます。第12回大会の準備委員長ということで、第6巻の編集をしなければならないという話をうかがい、是非とも利用価値が高いもの、つまり、出来るだけ多くの人から読まれるようなものにしたいと思いました。そのためにはある程度論文数を殖やす必要があると考えました。

米国微生物学協会(ASM)が毎年発行しています本に“Microbiology—1984”という、その年の年号がついたものがあります。その年に行われたいろいろなシンポジウムから数個を選び、一つのシンポジウムに数篇から10数篇の論文をまとめたもので、一論文の長さが3~10頁からなっています。大学院に入って研究を始めようという人が、ある分野の研究内容と、現在何が問題になっているのかを知るのによい本だということで、もう10年以上続いており、よく利用されているようです。多くの学会が赤字経営で悩まされているのに、ASMが黒字である理由の一つでもあるようです。このような利用度が高い本を作ることは、学会の低辺を広げる意味でも重要ではないかと思いました。

日本環境変異原学会の目的は会則にありますように、「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」ですが、学会は境界領域の学問を取り扱っており、基礎的研究者は勿論、製薬、食品、化粧品、労働など、化学物質と関係があるいろいろな分野から関心もたれており、会員数700人程度の学会にしては、社会的影響が大きな

学会であります。また、実際に早津教授のヘミンの研究が、直ちに低毒性タバコとして利用されたように、ベンチャービジネスからも注目されています。日本環境変異原学会は、ただいくつかの学会が合同したものではなく、いろいろな学会の研究者が参加することによって、新しいものを生み出し、新たな研究分野が開拓されなければならないと思います。既に12年間の学会活動で、それなりの実りはありましたし、これからも発展するものと思います。それにはまず、現状の把握が第一であり、それなくして将来の発展は考えられないと思います。

以上のようなわけで「日本における環境変異原研究の動向」がわかるようなものにしたいと考えました。そういいましても、全く新しいことは出来ませんので、第12回大会に演題を出された方々を中心に、原稿をお願いしました。変異原性が非常に強いものとして加熱食品中の物質がありますが、その発見の学会奨励賞受賞論文を、また、自動車排ガスなどに含まれる高変異原物質ニトロアレーンについてのシンポジウム関連論文を取りあげました。さらに、変異原の試験法、検出、作用機構、修飾、環境汚染物質などの代表的論文をお願いして、日本における研究の動向がわかるように心掛けました。特別寄稿としては、名誉会員の田島先生にしきい値のシンポジウムについて、清水憲二博士に発癌遺伝子についてのレビュー、さらに、日本だけでなく世界の研究の動向を知ることには最も重要なことですので、その点について松島教授をお願いしました。皆様大変お忙しい中、御協力下さいましたことを深く感謝申し上げます。

大西 克成
 (S. 59. 7. 25)

化学変異原の突然変異作用にしきい値はあるか

—— 日産シンポジウムから ——

蚕品種研究所 田島 弥太郎

1. はじめに

化学物質の生物毒性については、ある用量以下の低量ではその効果が認められない、いわゆる無作用量域（その最高限度がしきい値）が存在することが知られている。突然変異性や発がん性に関してもしきい値があるかどうかは古くから関心の深い問題であったが、放射線などの例から類推してしきい値は無いという考えが定説化しているように思われる。果してそうだろうか。

考えてみると放射線は体内の深部まで容易に透過進入して生物作用をあらわしうるのに対し、化学物質は食物や空気から体内に浸入してから標的器官（細胞）に到達するまでに代謝、分解、吸着、透過阻止、排泄など、さまざまな生物過程に遭遇する。したがって用量が低い場合には効果が認められなくなる可能性は十分考えられる。

それゆえこれらの物質についてしきい値の有無を検討することは環境問題の中でも重要課題の一つである。日産科学振興財団では創立以来一貫してこの分野の研究助成を行ってきたが、既に10数課題が補助を受け、一応の成果が得られたので、これらの成果を評価し、今後進むべき方向を検討するためシンポジウムを開催しようということになり、その世話役を筆者にゆだねられた。もともとこの課題には私自身深い関心を持っていたのでこれをどのような形で組立ようかといういろいろ構想をねった。幸い近藤宗平、加藤隆一、黒田行昭の3氏にも加わっていただいて組織委員会を作り話題とスピーカーの選考に着手した。

構想としては助成研究でよい仕事をしてくれ

た方達のデータ検討から入って、しきい値が存在するものとすれば、その原因として考えられる生体内代謝、DNA傷害の回復、細胞集団間に働く選択効果等がそれにどうからんで居るだろうかを考察して見ることにした。

これまで化学変異原の突然変異作用について用量-効果関係を調べたものは決して少なくないが、それはかなり高い用量範囲について行ったものが多く、しきい値の有無が問題になるような用量域について数個の用量を設定して詳しく調べたものは極めて少ない。したがってしきい値がないというのは調査不充分のためであろうという態度で検討を進めて見ることを計画した。いわば従来の考え方に挑戦しようというわけである。

こんな構想のもとに海外からも専門家を招いて討論することを考えた。また討論のためには互いに相反する立場をとるであろう人達にも参加してもらうこととした。こうして小規模ながら計画ができて上がり、本年5月7日～9日の3日間にわたり経団連会館を会場として、開催されることになった。このシンポジウムは討論参加者を40名程度に限定する閉鎖方式をとった。

ところでしきい値を論ずる場合には、いろいろな点に注意しなければならない。第1は用量の基準を何にするかという問題で、投与量そのものを基準にする場合と、標的器官（細胞）到達量を基準にする場合とが考えられる。前者の場合のしきい値は見かけのしきい値（**apparent threshold**）、後者の場合は真のしきい値（**genuine threshold**）として区別することを筆者はさきに提唱した。また同じしきい値でも用量ゼロからある用量範囲の間、反応曲線の傾斜

が全く変化しない場合と、自然突然変異率と統計的に有意差は認められないが、平均値がある傾斜をもって徐々に上昇傾向をたどる場合とがある筈である。厳密には前者をほんものしきい値 (Authentic threshold), 後者を偽しきい値 (Spurious threshold) と呼ん

で区別することを筆者はこのシンポジウムの冒頭で提唱した。見かけのしきい値にしても、偽りのしきい値にしてもその存在を確認することは、危険度評価の上からは意義のあることである。

PROGRAM

SESSION I ANALYSIS OF DOSE-RESPONSE RELATIONSHIP

Chairman W.L. Russell (Oak Ridge National Laboratory, USA)

- 1) Introductory remarks
Y. Tazima (Chairman of the Organizing Committee)
- 2) Chemically-induced dose-mutation frequency relations obtained in the silkworm.
A. Murakami (National Inst. Genetics, Mishima, Japan)
- 3) Dose-effect relationships of germcell mutations in mice.
U.H. Ehling (Institut für Genetik, Neuherberg, FRG)
- 4) Quantitative studies on mutagenesis, carcinogenesis, and teratogenesis in mice.
T. Nomura (Osaka University, Osaka, Japan)
- 5) Analysis of dose-mutation frequency relations after transplacental treatment.
N. Inui (Japan Tobacco and Salt Public Cooperation, Hatano, Japan)
- 6) Dose responses in the induction of somatic mutations by genotoxic chemicals in the *Tradescantia* stamen.
H. Yamaguchi and S. Tano (University of Tokyo, Tokyo, Japan)

SESSION II MODULATION BY METABOLIC ACTIVATION

Chairman: U.H. Ehling (Institut für Genetik, Neuherberg, FRG)

- 7) Metabolism of aromatic hydrocarbons and their toxicity.
N. Nemoto and S. Takayama (Cancer Institute, Tokyo, Japan)
- 8) Metabolism of aflatoxins and their toxicity.
Y. Ueno and F. Tashiro (Tokyo University of Science, Tokyo, Japan)
- 9) Roles of comutagens, antimutagens and desmutagens in the modification of dose-mutation relationship.
T. Kada (National Institute of Genetics, Mishima, Japan)
- 10) Modulation of dose-response curve due to metabolic changes of chemical substances.
R. Kato (Keio University, Tokyo, Japan)

SESSION III EFFECTS OF REPAIR PHENOMENA

Chairman: M.M. Elkind (Colorado State University, Fort Collins, USA)

- 11) Comparison of dose-response curves for ENU-induced recessive lethal mutations between spermatogonia and spermatozoa in *Drosophila*.

I. Yoshikawa, T. Ayaki and K. Oshima (Nagasaki Univ., Nagasaki, Japan)

- 12) Dose-rate effects of chemicals on mutation induction in mammalian cells in culture.
Y. Kuroda (National Institute of Genetics, Mishima, Japan)
- 13) Thresholds, "single-hit" kinetics, and repair in dose-effect relationships.
M.M. Elkind (Colorado State University, Fort Collins, USA)
- 14) Population dynamics of damaged DNA--Consideration of threshold problem based on a model system.
Y. Husimi (Saitama University, Urawa, Japan)
- 15) The threshold effect in mutagenicity by radiation and chemicals in relation to DNA repair and cell replacement.
S. Kondo (Osaka University, Osaka, Japan)

SESSION IV THRESHOLD PROBLEMS AND RISK EVALUATION

Chairman: F.H. Sobels (University of Leiden, The Netherlands)

- 16) Consideration of threshold problems based on dose-response curves in *Drosophila*.
F.E. Würzler (University of Zürich, Switzerland)
- 17) Dose response, repair, and the threshold problem in mammalian germ-cell mutagenesis.
W.L. Russell (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, USA)
- 18) Risk evaluation for chemical mutagens by ICPEMC.
F.H. Sobels (University of Leiden, The Netherlands)

GENERAL DISCUSSION

Chairman: S. Kondo (Osaka University, Osaka, Japan)

2. プログラム

プログラムの詳細を上を示した。このうち Würzler 教授は突然の病気のために出席できなくなり、原稿だけがとどいたので、藤川和男氏に一晚勉強してもらい、翌日要点だけを紹介してもらった。

3. 議論の要旨

1) 第 I・IV 部会

両部会で行われた議論の要点を便宜上一つにまとめて述べる。

化学変異原はサルモネラ菌や培養細胞ではかなり低い用量まで変異性が検出され、しかもその効果にしきい値がないように見受けられる。しかし、高等生物の生殖細胞突然変異を対象にすると様子が大変違う。大数観察の

容易なカイコの卵色突然変異を標識とした特定座位法を用いて調べると、変異原性の弱い Chlorodiazepoxide などでは 100 µg/g 以下の用量では自然突然変異の変動範囲内に入ってしまった有意な突然変異効果は認められない(村上)。これがマウスになると一層顕著になり、Russell が精原細胞を対象として特定座位法を用いてテストしたところでは、変異原性のよく知られている Hycanthone (住血吸虫駆除剤) についてもまったく突然変異が検出できなかった。そればかりか、他の実験生物で変異原性のよく知られた発がん剤などのデータを合算しても合計 28 万匹のマウスについて有意な突然変異の発生を検出できなかったという。ではマウスの精原細胞系は突然変異検出の目的からはまったく役立た

ずかというそうではなく、ENUでは強烈な変異原性が認められるという。しかも興味あることには、用量-効果曲線が低投与量域で明らかに見かけのしきい値の存在を示すことである。

ここで新たな問題が出てきた。Ehlingはしきい値があるかないかを判断する方法として分割投与方法を用いて、その突然変異率を比較した。すなわちMMS 15mg/kgを1回注射で与えた場合と3mg/kgずつ24時間置きに5回注射した場合とでは、生ずる優性致死突然変異率に差が見られなかったという。(交配後4日ごとのbroodをとって調査したが同順のbrood間で差が認められなかった)。EhlingはMMSの用量や回数、投与間隔(24時間と48時間)等を変えて何回も実験したが、分割投与によって突然変異率が1回投与のそれよりも低下することはなかった。これはこの間隔時間の範囲では前突然変異損傷の回復が起らないことを示す。このことからEhlingはしきい値は存在しないと結論した。

これに対しRussellの特定座位法によるデータは対照的である。RussellはENU 100mg/kg 1回投与(皮下注射)の場合と10mg/kgに分けて1週間に1度ずつ10回投与した場合とを比較した。後者の場合は生ずる突然変異率が前者の15%程度に下がってしまった。これは明に前突然変異損傷に回復が起るため、これによって変異率が下り100mg/kg以上の用量域でえられた用量-効果関係の直線の延長よりも有意に低くなっているものと考えられる。Russellは注意深くこの結果からしきい値があるとは言わなかったが、見かけ上のしきい値の存在を示唆するものである。この問題の決着が投与間隔の問題だけすむかどうかは今後に残された問題である。

このほかこのシンポジウムで明にされた事実としてメチル化合物の用量-効果関係に

しきい値が存在するらしいことがあげられる。その最も顕著な例は山口らがムラサキツユクサについて報告したもので、MNU(N-methyl-N-nitrosourea)では10ng/蓄以下で、DMN(N-nitroso-dimethylamine)では90~100ng/蓄以下で用量-変異率曲線がほとんど横這いになった。これに対してMethylをEthylで置換したENU, DENでは曲線が険しい立上りを示した。

同様な関係は乾によっても全く別の系を用いてえられている。彼は妊娠中のSylian hamsterに薬剤を皮下注射または経口投与で与え子宮内の胎児に対する影響を、その胎児を切り出して、細胞培養系に移し、8-azaguanine抵抗性突然変異の発生率を調べる方法をとって研究した。X線では線量-効果関係は直線を示したが、DMNの場合には投与量の高い処では直線関係を示すが、12.5~25mg/kg辺では自然突然変異レベルとなり、しきい値の存在を示す結果を得た。

以上の結果からメチル化合物の中にはしきい値(少なくとも見かけ上の)が存在する可能性があることが確実になってきた。これは最近Lindahlにより報告された⁶O-Met G-DNA methyl transferaseのようなものがあってMethyl基は除去してしまうが、Ethyl基には作用できないためではないかと近藤は考えている。筆者はカイコについてDMNの変異原性を検討する実験を永年行ったが、どうしても変異性を検出できなかった。このこともカイコの卵細胞にこの酵素が強力に存在するとすれば納得できる。

細胞置換によりしきい値が生ずる機構について近藤は興味ある議論を展開した。マウスやカイコの精原細胞で顕著に認められる放射線の線量率効果はDNAに損傷を受けた細胞が殺されると正常細胞がこれに置き換えられる機構がその一原因ではないかと彼は考えた。

そしてこの考えを支持するための証拠をうる実験を次のように進めた。ショウジョウバエの幼虫の生殖原基(genital disc)にX線を照射し、これを切り出して別の若い幼虫や成熟した幼虫の体内に移殖する。すると若い幼虫に入れた方が成熟幼虫に入れた場合よりも生殖外器の形成が正常化してくることを観察することができた。これは彼が予想した通りの細胞置換による傷害排除のしくみがそなわっている証拠だと彼は考えている。

一方、伏見は損傷を受けたDNAが細胞集団レベルでどのような動態をとるかに

2) 第II部会

第II部会では代謝の過程で変異原の用量-効果関係がどう変化を受けるかを論じた。根本はbenzo(α) pyrene (BP)の代謝過程における内的、外的各種要因による変更の問題を扱った。話の前段ではNADPH依存性P-450によるBPの活性化を問題にして解毒酵素、血清およびヘミンの効果などを、後段ではアラキドン酸を中心としたProstaglandin合成との関連におけるBPの共酸化による活性化を扱い、種々の補助的ならびに抑制的要因が存在することを示した。BPに代表されるがん原物質の活性化にはさまざまな内的、外的要因が関係するので、しきい値はこれらによって大いに影響を受けることが考えられる。

上野はAflatoxinの代謝過程でサイトクロームP-450等がどう働くかについて報告した。特にAFB₁が水酸化されてAFM₁およびAFQ₁になる過程にはP-448型が介在してP-450型により促進を受ける。

賀田は抗変異原や反変異原等の存在が用量-効果関係の変更にどう働くかの問題を扱った。野菜内のdesmutagenの要因について、またヒト胎盤はantimutagen作用を持つが、

これは組織内のCoイオンの量と平行関係を示しこれによって説明できることなどを述べた後、antimutagenの存在する場合でも、一般にしきい値の存在は認められないことを述べた。

最後に加藤はしきい値の存在を考える場合に、代謝活性と下毒とのバランスを考慮する必要があること、この両者はさまざまな要因で変化を受けるが、中でも実験生物の種により、系統により相違が大きいこと、これらの要因は用量-効果曲線に影響を与えるので、化学物質の種類次第では、見かけ上、もしくは実際上のしきい値の原因になることがありうるとしめくくった。

3) 第III部会

ここではDNA損傷の回復現象が用量-効果関係にどう影響するかを問題にした。回復が起れば当然線量率効果が認められるはずである。ところがどうした事かDrosophilaではMullerの実験以来放射線の線量率効果は認められていない。吉川はENUを種々の濃度に砂糖水にとかし、これを飲みこませる方法で体内に取込ませて発生する致死突然変異率を調べた*。完成精子ではENUの取込量に対し直線関係を示したが、精子細胞では低用量域で高用量域でえられた直線の外挿よりも低い変異率が得られ、明に凹型の曲線となった。しかもこの場合伴性致死突然変異よりも第二染色体致死突然変異の方が顕著であった。これはX染色体の致死遺伝子はgerminal selectionを受けるが第二染色体の方はこの影響を受けにくいと考えれば当然期待される場所である。吉川の発見は高く評価される。黒田はヒトの培養細胞を用い細胞致死と突然変異の発生に対するTap-P-1の濃度効果を明にした。

この部会のテーマに真正面から取り組んだのはElkindの報告であった。彼はチャイニー

ヒト癌遺伝子と突然変異

九州大学理学部生物学教室 清水 憲二

ズ ハムスターの培養細胞について *sublethal damage* の回復効果を明にした仕事で有名であるが、今回は X 線照射した V79 細胞を塩の高調液 (0.5 M NaCl) で後処理した場合に *potential damage* の回復が妨げられる現象 (内海との協同研究) を手がかりとして、DNA 傷害の回復が用量-効果関係曲線にどう影響するかを調べた。この *potential lethal damage* は正常細胞の場合正常培養液の中では 1 時間以内に回復する。しかし AT 細胞ではこれが起らない。そこでこの条件下で放射線量と、致死効果の関係を調べて、DNA 損傷の回復は線量-効果関係について効果の大きさは変えるけれども直線性を何等変化させるものでないと結論した。つまり放射線では回復は起ってもしきい値は存在しないという考え方であった。この考えは化学変異原にも適用できるであろう。

このほかショウジョウバエでもしきい値が存在すると見られるデータは今までに得られておらず、とくに修復能の欠除した系統では極めて高い感度で変異原性を検出できるとい

う (Würgler)。

このようなことから、しきい値の有無は物質ごとに実験的に確かめなければならない問題であることがわかる。しかも、少なくとも生きた哺乳動物を用いなければならないから、厄介である。ICPEMC でも、このための特別作業グループを設けて検討したが、ケース・バイ・ケースで確かめなければならないと結論せざるを得なかった。

4. むすび

いずれにせよ、従来化学物質についてはしきい値の存在は認められないと盲信して、確かめようとしなく研究そのものが大変な労力を要するので) で放置されていた問題を明るみに出し、代謝変性、DNA 修復、細胞置換などの可能性を考えながらしきい値問題の解明にせまることができた点でこのシンポジウムの意義は大きかったと思う。

* (注) ENU の摂取量は ^3H でラベルした砂糖を用いる区を別に作りハエに取りこまれた放射活性から推定した。

1. はじめに

第12回本学会大会において、我々のデータを中心として標記の題で講演させていただいた。ヒト癌遺伝子についての研究はその後めざましく進展し、米国だけでなく英、仏などのヨーロッパ諸国や日本でも研究の裾野が広がりつつある。

このような状況から、ここでは特に突然変異に重点を置いて、癌遺伝子研究のその後の発展を含めて紹介し、筆者なりの私見を併せて述べたい。

2. 癌遺伝子の活性化機構

(1) ウイルスによる活性化

a 形質導入

癌遺伝子として初めて認知された *src* をはじめ、約20種類に及ぶレトロウイルス性癌遺伝子の全ては、宿主細胞に存在するそれぞれのプロトオンコジーンがその転写産物を中間体としてレトロウイルスに取りこまれたものであることは良く知られている。取りこまれた *v-onc* は元来の *c-onc* と異なる構造を持つことが多い。また全ての *v-onc* はレトロウイルスの LTR (末端重複配列) に含まれるプロモーターやエンハンサーなどの機能によって著しい発現の促進があるとされている。

b プロモーター挿入

レトロウイルスのゲノムが細胞のプロトオンコジーン近傍に組みこまれたため、眠っていた *c-onc* の発現がウイルス LTR による転写促進を受けて活性化するというものである。実証された例としては、ニワトリリンパ腫における *c-myc* の活性化が知

られている (Hayward ら, 1981)。

(2) ウイルスによらない活性化

a 転座

ヒトパーキットリンパ腫の多くで *c-myc* が本来の第8染色体から転座し、第14、2、22染色体上の免疫グロブリン重鎖や軽鎖の遺伝子近傍に移った結果、その発現が高くなることが知られている。これには B 細胞で特に発現されるエンハンサーの効果を受ける例や、転座の結果、抑制的に作用する制御領域を失ったため、転写や翻訳が昂進したと思われる例など、いくつかの異なった活性化機構が存在するらしい。*c-myc* の他第9染色体に位置する *c-abl* も、ある種のヒト白血病 (CML) に特徴的な第22染色体との転座 (フィラデルフィア染色体) によって活性化されることが知られている (de Klein ら, 1982)。相互転座以外の転位、欠失なども *c-onc* の活性化に関与するものがあると考えられているが、分子レベルでの証明がまだ不十分である。

b 増幅

c-onc のコピー数が増加する結果、その遺伝子の発現が昂進することも知られている。ヒトでは白血病 (APL)、結腸癌、肺癌などの細胞で見出された *c-myc*、白血病 (CML) における *c-abl*、結腸癌や白血病 (AML) における *c-myb*、および神経芽細胞腫や網膜芽細胞腫の多数例に見られる *N-myc* の増幅 (数倍~数百倍) が確認されている。その他ヒトや動物の腫瘍細胞のうちに *Ki-ras* や *N-ras* のコピー数が増えている例も知られている。また染色体自体が数を増していることもある種の癌で見

出されることがある。例えばヒト肺癌では第12染色体 (*Ki-ras* が存在) のトリソミーがかなりの頻度で見られるという。

c 突然変異

これまでに述べた活性化の例はレトロウイルスの *v-onc* をプローブ (標識鎖) として検出されることが多い。これに対し、癌細胞の DNA をマウス胎児由来の NIH3T3 細胞などにトランスフェクションして、癌遺伝子を直接検出する試みが 1979 年頃から始まり、ヒト癌細胞から活性化された幾つかの癌遺伝子が発見された。我々のグループはヒト膀胱癌、神経芽細胞腫、肺癌の各細胞株から計 3 種の癌遺伝子をいずれも他に先がけてクローニングした。講演で詳述したこれらの経過は別に解説したので (清水, 1984), ここでは他のグループによる成果もあわせて要約のみを簡単に述べることにする。

- i) ヒト癌や癌細胞株のうち 5~20% のものがその DNA 中に NIH3T3 細胞をトランスフォームさせる優性に作用する遺伝子を持っている。
- ii) クローニングや Southern プロットによる分析から、そのような遺伝子の殆んどは *B-lym* 遺伝子であることが判った。*ras* 遺伝子には 3 種あり、げっ歯類のレトロウイルスが持つ *Ha-ras* と *Ki-ras* に対応する 2 種のほか、まだレトロウイルスで見出されていない *N-ras* 遺伝子も見出された。
- iii) ヒトを含む全ての動物に上記 3 種の活性 *ras* 遺伝子それぞれに対応する正常 *ras* 遺伝子が存在する。優性に働くヒト活性 *ras* 遺伝子を正常なヒトの *c-ras* 遺伝子と比較すると、*N-*, *Ha-*, *Ki-* 各 *ras* とも、調べた全ての例で、*ras* 蛋白

の N 末端から 12 番目か 61 番目のアミノ酸が置換するような点突然変異によって蛋白自体が活性化されていることが判明した。

IV) 実験動物に発癌剤を投与したり、放射線を照射することによって生じた腫瘍からも 3 種の *ras* 遺伝子のいずれかが活性化されたものが高頻度に検出された。そのうちのあるものはヒト *ras* 遺伝子で見られたと全く同じような点突然変異によって活性化されていることが確認されている。

このように、*ras* 遺伝子族においては点突然変異による活性化がかなり一般的に見られることが判った。*B-lym* 遺伝子に関してはその活性化機構がまだ判明していないので、*ras* についてのみ次章を改めて述べる。

3. *ras* 遺伝子の点突然変異による活性化

(1) 活性 *ras* 遺伝子の検出

当初活性 *ras* 遺伝子は樹立されたヒト癌細胞株から見出されたので、これは細胞株化に伴う二次的効果である可能性があった。しかし間もなく Pulciani ら (1982) の実験を始めとして、実際に患者由来の固型癌や骨髄から活性 *ras* 遺伝子が次々に検出されはじめたので、*ras* 遺伝子は *in vivo* でもヒト癌のいずれかの段階に関与しているという可能性が強くなってきた。

これまでに明らかになった活性 *ras* 遺伝子に関する情報を、未発表のものも含めて表 1 に示す。3 種の *ras* 遺伝子が実に様々な腫瘍において活性化されていること、造血系腫瘍においては *N-ras* の活性化がより高頻度に見られることなどがわかる。動物実験でも興味ある事実が判明している。即ち、放射線や 3-メチルコランズレンによる実験腫瘍では

表 1. 活性 *ras* 遺伝子

<i>ras</i>	特徴	活性 <i>ras</i> 遺伝子が検出されたもの		クローニングされた活性 <i>ras</i> 遺伝子				文献	
		ヒト癌細胞株	ヒト癌	動物実験	由来	変異部位	アミノ酸置換		塩基置換
<i>N-ras</i>	ヒト 第 1 染色体 全長 10 kbp	神経芽細胞腫 (SK-N-SH) 繊維肉腫 (HT-1080) 横紋筋肉腫 (RD) 白血病 APL (HL-60) T リンパ腫 [IM9, MOLT3, 4 RPMI-8402 T-ALL1, P12] バークキリン腫 (AW-Ramos) 肺癌 (SW-1271) 結腸癌 (7060) メラノーマ (3 例) テラトカルシノーマ (PA-1)	結腸癌 (1665) 白血病 (多数例) リンパ腫 (多数例)	マウス リンパ腫	SK-N-SH SW-1271 PA-1 AML 7060 HT-1080 HL-60	#61 #61 #12 #12 #61 ? ?	Gln → Lys Gln → Arg Gly → Asp Gly → Asp Gln → His	C → A A → G G → A G → A A → T	32 34 30 11 35
		膀胱癌 (T24/EJ) 肺癌 (HS-242) メラノーマ (SK-MEL-146) 乳癌 (HS-578T)	結腸癌 (2033) メラノーマ (SK-2) 尿管腫瘍	マウス 皮膚癌 パピローマ ラット 乳癌	T24/EJ HS-242 SK-2 HS-578T ラット乳癌	#12 #61 #61 #12 #12	Gly → Val Gln → Leu Gln → Leu Gly → Asp Gly → Glu	G → T A → T A → T G → A G → A	29,21,31 33 24 15 28
<i>Ha-ras</i>	ヒト 第 11 染色体 最少 3 kbp	肺癌 [Calu-1, Lx-1] SK-LU-1, A427, A2182 結腸癌 [SK-CO-1 SW480, A2233] 膀胱癌 [A1604 A1698] 白血病 (CCRF-CEM)	肺癌 1615 PR371 PR310 LC-10 肉腫 (1085) 膀胱癌 (1189) 卵巣癌 (OVCA-1)	マウス リンパ腫 肉腫	Calu-1 SW480 PR371 PR310 A2182 A1698 LC-10 マウス腫瘍	#12 #12 #12 #61 #12 #12 #12 #12	Gly → Cys Gly → Val Gly → Cys Gln → His Gly → Arg Gly → Arg Gly → Arg Gly → Asp	G → T G → T G → T A → T G → C G → C G → C G → A	25, 2 2 18 19 23 23 23 13

活性 *ras* の検出に関する文献は殆んど省略した。ヒト癌の中にはヌードマウスに移植されたヒト腫瘍組織も含まれている (SK-2, PR371, PR310)。

Ki-ras (Eva & Aaronson, 1983; Guerreroら, 1984), NMUによるマウスのT-リンパ腫では*N-ras* (Guerreroら, 1984), DMBAとTPAによるマウス皮膚癌 (Balmain & Pragnell, 1983) やNMUによるラット乳癌では*Ha-ras* (Sukumarら, 1983), というように, 用いた変異原や標的組織と, 活性化を受ける*ras*遺伝子の種類との間に明らかな相関があるように見えるのである。NMUによるラット乳癌の活性*Ha-ras*遺伝子では, 12番目のアミノ酸をコードする暗号にG→Aトランジションが確認されており, NMUのグアニンへの特異性と合致する。しかし*Ha-ras*遺伝子への特異性までは説明できない, 発癌剤の作用と細胞分化, ホルモン, プロモーションとの関係など, より高次のレベルにおける解析が進めば, このような実験系を用いて癌のイニシエーションやプログレッションの機構, 癌遺伝子の活性化の機構と実際の発癌における役割などがより明確になるであろう。

(2) 点突然変異の分布

これまでに判明した18例の活性*ras*遺伝子全てにおいて, *ras*遺伝子産物の12番目か61番目のアミノ酸置換を起こす点突然変異が活性化の原因になっていることが明らかになった(表1)。これらの中には, 実際に患者の腫瘍組織に由来する知見が5例含まれている。今年になって, 活性*ras*遺伝子が検出された患者の健常組織では同じ*ras*遺伝子が正常のままであること, 即ち活性化に関与する変異が体細胞突然変異であるということが確かめられた(Gambkeら, 1984; Santosら, 1984; Feigら, 1984; Fujitaら, 1984)。このことに関し, 以前これとは異なる結果を報告したMuschelら(1983)の論文はその後撤回されたことを念のためつけ加えておきたい

(3) In Vitro Mutagenesis

Wiglerのグループは, 正常なヒト*c-Ha-*

*ras*遺伝子を次亜硫酸で処理し, それによって生じる活性化を探っている。(Fasanoら, 1984)。それによると, N末端から12, 13, 59, 63番目の各アミノ酸を置換するような変異がこの遺伝子を活性化できることがわかった。この場合, 61番目の領域は次亜硫酸による変異が中立変異かナンセンス変異のみを生じるので検出され得ない。このように*ras*遺伝子は12-13と59-63番目のアミノ酸に対応する2つの領域での変異が優性変異として振舞うことが判ったが, これらの領域は*ras*蛋白がGTPやGDPと相互作用する領域であると考えられている。但し, 13, 59, 63番目のアミノ酸単独の置換変異は12番目単独の場合より活性化の程度が弱いように見える(表2)。これまで実際の癌細胞からこれらの部

表2 ヒト正常*Ha-ras*遺伝子の人為的変異による活性化 (Fasanoら, 1984)

プラスミド	変異部位				形質転換の活性 (相対値)
	12	13	59	63	
pP3	gly	gly	ala	glu	< 0.0001
pT24	val	gly	ala	glu	1.0
EMSH3	arg	gly	ala	glu	0.6
BSS176	asp	gly	ala	glu	0.5
BSS194	ser	gly	ala	glu	0.4
BSS180	gly	asp	ala	glu	0.2
BSS197	gly	ser	ala	glu	0.001
TPO24	gly	gly	ala	lys	0.1
TTO24	val	gly	ala	lys	0.05
TPO87	gly	gly	thr	glu	0.2
TTO87	val	gly	thr	glu	0.8
THRO9	gly	gly	thr	glu	0.6

P T24はヒト膀胱癌T24株由来の活性*Ha-ras*, pP3はヒト正常胎盤由来の正常*Ha-ras*遺伝子を含むクローン。BSS176以下は正常な遺伝子を次亜硫酸で処理して得られた活性*Ha-ras*を含むクローン。下線部が生じたアミノ酸置換を示す。EMSH3は12番目付近をHarvey-*v-ras*のものに入れ替えたキメラ遺伝子。活性化はNIH3T3細胞でのフォーカス定量で測定している。

分の変異した活性*ras*遺伝子が検出されていないのは, これらが*in vivo*では優性の活性を示さないとか, NIH3T3を用いた検出系では明確なフォーカスを作らないなどの可能性が考えられる。想像をたくましくすると, このような程度の弱い活性化遺伝子は発現増強の変異と重なった場合や, 正常遺伝子が失われた(例えばホモ接合体形成や欠失)場合にのみ, その作用が表われるのかも知れない。劣性変異のHomogenizationによる発癌は, 網膜芽細胞腫やWilm's腫瘍などでほぼ確証されつつある。DNAトランスフェクションで陽性にならない大多数のヒト癌の中にはこのようなものも含まれている可能性が考えられる。

(4) 突然変異診断

Feinbergら(1983)は, ヒト*Ha-ras*の12番目アミノ酸領域に変異があれば制限酵素HpaIIとMspIによるパターンが変わることを利用して29例のヒト癌を調べたが検出できなかった。Santosら(1984)もヒト*Ki-ras*の12番目のアミノ酸コドンと同様に調べている。8例のヒト肺癌からこうして見出されたのが表1のLC10で, この癌のDNAはトランスフォーム活性も陽性であった。このような試みは*ras*についてだけでも3種存在する遺伝子それぞれに少なくとも2カ所の活性化領域があることを考えると余り効率の良い方法とは思えない。筆者としてはオリゴヌクレオチドプローブを用いるConnerら(1983)の方法が利用価値が高いと考えている。またSlamonら(1984)によれば, 実際に54例のヒト腫瘍を調べたところ, *fos*や*myc*と共に*ras*遺伝子の発現が増加しているものがあったという。このことは*ras*遺伝子の発現を制御する因子が存在し, その発現の量的変化も重要な要素であることを示唆している。

4. おわりに

点突然変異による癌遺伝子の生成は極めて多様な癌遺伝子活性化の1例にすぎない。突然変異で優性形質を示すような癌遺伝子は種類が限られており, しかもその変異も極めて特異的な部位におこった時にのみ活性化されるという事に留意する必要がある。また癌の悪性化は, InitiationからProgressionまで数多くの段階を経ることは周知の事実である。実験的にも全くの正常細胞を癌化させるには少なくとも2つ以上の異なる癌遺伝子が活性化される必要があるというデータがある(Landら, 1983; Ruley, 1983)。癌遺伝子だけでなく, 特にヒトの場合は, 癌の発症に免疫能やその他の生理的要因が大きく関わっていると考えられている。発癌物質の標的が癌遺伝子となりうる*c-onc*そのものだけであるとは決して言えないので, 我々は虚心に事実を追求してゆかねばならないと考えている。

最後に, 色々と御助言を賜った近藤宗平教授, 遠藤英也教授, 並びに大会で御世話いただいた大西克成教授に心から感謝の意を捧げたい。また未発表のデータを提供して下さいた湯浅保仁博士, M.Wigler, M.Peruchoに感謝する。

文 献

- 1) Balmain, A. & Pragnell, I.B. Nature 303, 72 (1983).
- 2) Capon, D.J., Seeburg, P.H., McGrath, J.P., Hayflick, J.S., Edman, U., Levinson, A.D. & Goeddel, D.V. Nature 304, 507 (1983).
- 3) Conner, B.J., Reyes, A.A., Morin, C., Itakura, K., Teplitz, R.L. & Wallace, R.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 278 (1983).
- 4) de Klein, A., van Kessel, A.G., Grosveld, G., Bartram, C.R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N.K., Heisterkamp, N. Groffen, J. & Stephenson, J.R. Nature 300, 765

日本と世界の環境変異原研究の比較

東京大学医科学研究所 松島 泰次郎

- (1982).
- 5) Eva, A. & Aaronson, S.A. *Science* 220, 955 (1983).
 - 6) Fasano, O., Aldrich, T., Tamanoi, F., Taparowsky, E., Furth, M. & Wigler, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 4008 (1984).
 - 7) Feig, L.A., Bast, R.C., Knapp, R.C. & Cooper, G.M. *Science* 223, 698 (1984).
 - 8) Feinberg, A.P., Vogelstein, B., Droller, M. J., Baylin, S.B. & Nelkin, B.D. *Science* 220, 1175 (1983).
 - 9) Fujita, J., Yoshida, O., Yuasa, Y., Rhim, J.S., Hatanaka, M. & Aaronson, S.A. *Nature* 309, 464 (1984).
 - 10) Gambke, C., Signer, E. & Moroni, C. *Nature* 307, 476 (1984).
 - 11) Gambke, C. & Moroni, C. *CSH Meeting* (1984).
 - 12) Guerrero, I., Calzada, P., Mayer, A. & Pellicer, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 202 (1984).
 - 13) Guerrero, I., Villasante, A., D, Eustachio, P., Corces, V. & Pellicer, A. *CSH Meeting* (1984).
 - 14) Hayward, W.S., Neel, B.G. & Astrin, S.M. *Nature* 290, 475 (1981).
 - 15) Kraus, M., Yuasa, Y. & Aaronson, S.A. *CSH Meeting* (1984).
 - 16) Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. *Nature* 304, 596 (1983).
 - 17) Muschel, R.J., Khoury, G., Lebowitz, P., Koller, R. & Dhar, R. *Science* 219, 853 (1983).
 - 18) Nakano, H., Yamamoto, F., Neville, C., Evans, D., Mizuno, T. & Perucho, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 71 (1984).
 - 19) Perucho, M. (私信)
 - 20) Pulciani, S., Santos, E., Lauver, A.V., Long, L.K., Aaronson, S.A. & Barbacid, M. *Nature* 300, 539 (1982).
 - 21) Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. & Barbacid, M. *Nature* 300, 149 (1982).
 - 22) Ruley, H.E. *Nature* 304, 602 (1983).
 - 23) Santos, E., Martin-Zanca, D., Reddy, E.P., Pierotti, M.A., Porta, G.P. & Barbacid, M. *Science* 223, 661 (1984).
 - 24) Sekiya, T., Hirohashi, S., Nishimura, S. & Sugimura, T. (私信)
 - 25) Shimizu, K., Birnbaum, D., Ruley, M-A., Fasano, O., Suard, Y., Edlund, L., Taparowsky, E., Goldfarb, M. & Wigler, M. *Nature* 304, 497 (1983).
 - 26) 清水憲二, *生物物理* 24, 128 (1984).
 - 27) Slamon, D.J., deKernion, J.B., Verma, I.M. & Cline, M.J. *Science* 224, 256 (1984).
 - 28) Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D. & Barbacid, M. *Nature* 306, 658 (1983).
 - 29) Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C., Weinberg, R.A. Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R. & Chang, E.H. *Nature* 300, 143 (1982).
 - 30) Tainsky, M.A., Cooper, C.S., Blair, D.G., Giovanella, B.C. & Vande Woude, G.F. *CSH Meeting* (1984).
 - 31) Taparowsky, E., Suard, Y., Fasano, O., Shimizu, K., Goldfarb, M. & Wigler, M. *Nature* 300, 762 (1982).
 - 32) Taparowsky, E., Shimizu, K., Goldfarb, M. & Wigler, M. *Cell* 34, 581 (1983).
 - 33) Yuasa, Y., Srivastava, S.K., Dunn, C.Y., Rhim, J.S., Reddy, E.P. & Aaronson, S.A. *Nature* 303, 775 (1983).
 - 34) Yuasa, Y., Gol, R.A., Chang, A., Chiu, I-M., Reddy, E.P., Tronick, S.R. & Aaronson, S.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 3670 (1984).
 - 35) Yuasa, Y. (私信)

「世界における環境変異原研究の動向」について書くように依頼を受けたが、アメリカ、ヨーロッパの幅広い研究をまとめることは無理であるので、それぞれの学会の年会のabstractsを用いて、研究発表の分類項目と研究に用いた試験系を比較してみた。

日本環境変異原学会が実施している演題の分類項目をそのまま用いて、アメリカ、ヨーロッパの変異原学会の年会での発表を分類し集計したものを表1に示す。日本環境変異原学会の1983年度、

のを用いた。14項目に分類されているものを、日本の分類項目に合うように変更して集計した。アメリカ変異原学会(EMS)は1984年2月19~23日にカナダのMontrealで行われた年会のabstractsが*Environmental Mutagenesis*誌6巻377~481頁(1984)に出ているのを用いた。これは分類されていないので日本の分類項目に合うように分類した。従ってEEMSの発表は客観的に分類したが、EMSの研究発表はTitleおよびその内容から主観的に分類したので、多少の誤りが入って来ていることを許して頂きたい。EEMSは東欧圏と西欧圏の諸国が連合して学会を構成しているため、年会は西欧圏と東欧圏で交互に開催されている。東欧諸国の年会への参加は、年会が西欧圏で開催されるときには非常に少ない。1983年度の年会がフランスで開催されているので、USSRからの参加がなく、東欧諸国からは1題ずつである。またフランスからの参加が多いので少し片寄った集計になっている。1984年度の年会がMoscowで開催されたので、2年間の経過をみればこの片寄りを補正することができるかも知れない。1982年度の年会がFinlandで開催されている。1983年度のEEMSの年会への研究発表の国別集計を参考までに表2に示した。

日本をヨーロッパ、アメリカと比較してみると、日本では「検出」に分類されるものが第1位で約半数を占めているのに比べて、ヨーロッパで第1位は「機構」の研究で全体の約40%を占めており、「検出」は第2位で全体の28%と日本よりは少ない。アメリカでは日本と同様に「検出」に分類されるものが第1位であるが、全発表数に占める割合は34%で日本よりも低く、日本とヨーロッパの間である。第2位は「機構」の研究で28%を占めており、日本よりも多い。

表1 環境変異原学会年会での項目別研究発表数とその割合(%)

学会名	日本環境変異原学会		EEMS	EMS
年 度	1983	1984	1983	1984
発表総数	122	112	193	227
項目				
試験法	20(16)	24(21)	32(17)	60(26)
検 出	59(48)	48(43)	53(28)	77(34)
機 構	22(18)	18(16)	80(42)	64(28)
修 飾	6(5)	14(13)	9(5)	3(1)
代 謝	14(12)	6(5)	19(10)	18(8)
情 報	1(0.8)	2(2)	—	5(2)

1984年度の研究発表を、Abstractsに出ている項目分類で集計した。但し1983年度には情報の項が無いが、研究発表にはそれに相当するものが1題あるので補正を行った。ヨーロッパの変異原学会(EEMS)は1983年9月5~9日にフランスのMontpellierで行われた年会のabstractsが*Mutation Research*誌130巻165~263頁(1984)に出ている

表2 第13回ヨーロッパ変異原学会 (EEMS) 年会 (1983) への国別発表数

国名	発表数	国名	発表数	国名	発表数
France	50	Switzerland	5	Yugoslavia	7
Great Britain	25	Norway	4	Bulgaria	1
Italy	22	Austria	3	Hungary	1
FRG	19	Denmark	2	Czechoslovakia	1
The Netherland	19	Spain	2	Poland	1
Belgium	10	Portugal	2	DDR	1
Sweden	8	Greece	1	Brazil	1
Finland	6	Israel	1	Japan	1

表3 研究に用いた試験系の数とその割合(%)

試験系	学会名と年度			
	1983	1984	1983	1984
DNA, Phage, Virus	4(3)	4(3)	20(8)	5(1.8)
Salmonella typhimurium	56(42)	49(41)	51(20)	53(20)
E. coli	12(9)	8(7)	26(10)	13(5)
B. subtilis	5(4)	6(5)	1(0.4)	
Neurospora				3(1.1)
Yeast	1(0.1)	1(0.8)	17(7)	14(5)
Other lower organism			5(2)	3(1.1)
Insect	8(6)	6(5)	8(3)	6(2.2)
Plant	1(0.7)	1(0.8)		7(2.6)
In vitro mammalian culture cell	24(18)	18(15)	76(30)	108(40)
Mutation	5(4)	8(7)	17(7)	39(14)
Chromosome aberration	5(4)	4(3)	10(4)	20(7)
SCE	5(4)	4(3)	19(8)	20(7)
Micronucleus	2(1.4)	0	2(0.8)	3(1.1)
UDS	2(1.4)	1(0.8)	4(1.6)	9(3.3)
Transformation	0	1(0.8)	8(3)	5(1.8)
In vivo mammalian cell	23(17)	27(23)	47(19)	57(21)
Mutation (Sp. Pocus test; Spot test)	3(2.2)	2(1.7)	10(4)	3(1.1)
Cytogenetics (Bone marrow; sperm)	5(4)	5(4)	11(4)	13(5)
SCE	2(1.4)	3(2.5)	6(2.4)	11(4)
Micronucleus	7(5)	8(7)	10(4)	7(2.6)
Dominant lethal	0	1(0.8)	2(0.8)	3(1.1)
UDS	1(0.7)	1(0.8)	0	5(1.8)
Sperm abnormality	0	2(1.7)	3(1.2)	5(1.8)
総数	134	120	251	269

研究に用いられた試験方法の生物系と指標を用いて分類し比較した結果を表3に示す。1つの研究でいくつかの試験系を用いているので、試験系の総数は研究発表数よりも多くなっている。日本では Salmonella を用いた研究が全体の40%近く占めていることが特色で、ヨーロッパおよびアメリカの2倍である。それに比べてヨーロッパ、アメリカでは mammalian culture cell を用いた研究が多いのが特徴的である。In vivo の系では大き

な差は認められていない。また Yeast を用いた研究が日本では少ない。

簡便で迅速な Salmonella 変異原性試験法を活用して、環境変異原の検出が精力的に進められて、新しい変異原が見つけれられたのが日本の特色であったが、これと同時に見出された新しい変異原物質の人への影響を評価する in vitro および in vivo の mammalian cell を用いた研究の発展が重要である。

加熱食品中の強力な変異原イミダゾキノリン 及びイミダゾキノキサリンの発見

国立がんセンター研究所生物学部 葛西 宏

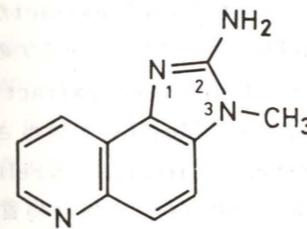
1. はじめに

人がんの原因はそのほとんどが環境中の発がん物質によるものであり、特に食品のしめる比重が大きいと言われている (Wynder と Gori, 1977)。従ってがん予防という目的を達成するためには、環境中に存在している発がん物質を見つけ、どんな物質であるかを知る事が極めて重要である。Nagaoら(1977)は焼魚中にサルモネラ菌TA 98に対する変異原物質が存在する事を初めて報告した。その後アミノ酸やタンパク質の加熱分解により変異原物質が生じる事が判明し、それらの構造が次々と決定された (Sugimuraら, 1977ほか)。Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, Phe-P-1, Lys-P-1, A α C, MeA α C等がその例である。これらの新規ヘテロサイクリックアミンのほとんどが実際の調理食品からも検出され、また動物実験により発がん性も証明された。しかし加熱調理食品中の主要変異原物質がこれらの物質と同一かどうかは不明であった。筆者らは焼魚の塩基性分画の高速液体クロマトグラフィーを行ったところ、主要変異原物質の溶出位置は上記既知ヘテロサイクリックアミン

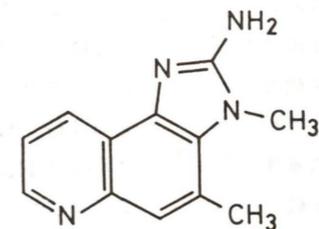
のいずれとも一致せず、新規変異原物質の存在が明らかとなった。(Kasaiら, 1979)。そこで当研究所生化学部と共同でその変異原物質の単離、構造決定を試みた。また加熱調理した牛肉についても変異原物質の同定を行った。本稿ではまず筆者らの行った研究の概略を述べ、次にこれらの化合物に関する国内外の研究グループによる最近の知見について説明したい。

2. 焼魚および焼肉に含まれる主要変異原物質の単離、構造決定

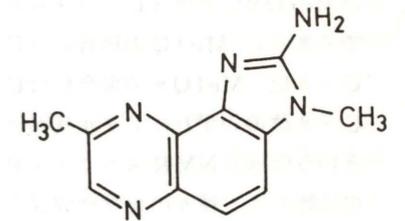
丸干しイワシ10kgを通常の調理法で焼き、メタノール抽出物から、HP-20樹脂吸着、クロロホルム-メタノール-水-分配、種々のカラムクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーにより、TA 98(+S9)を用いたAmes assayを手掛かりに変異原物質を精製した。最終的に2種類の純粋な変異原物質が各々200 μ gずつ得られ、それぞれの構造を質量分析、NMR、化学合成等により2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]キノリン(IQ)および2-アミノ-3,4-ジメチルイミダゾ[4,5-f]キノリン(MeIQ)と決定した



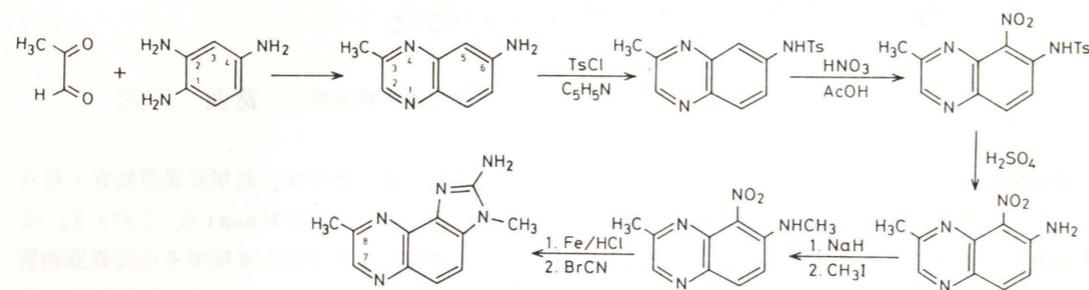
IQ



MeIQ



MeIQx



MeIQx の合成経路

(Kasaiら, 1980c, 1980a, 1980b, 1981b; KasaiとNishimura, 1982)。焼肉についても同様の方法で主要変異原物質の分離、精製を行い約50 μ gの純粋な変異原物質を単離した。機器分析および合成品との比較によりこの物質の構造を2-アミノ-3,8-ジメチルイミダゾ[4,5-f]キノキサリン(MeIQx)と決定した(Kasaiら, 1981c, 1981a)。化学合成は1,2,4-トリアミノベンゼンとメチルグリオキサールとの縮合から出発して図示した経路で達成出来た。これら3種の変異原物質, IQ, MeIQ, MeIQxはすべて新規化合物であった。このようにマイクログラムスケールの微量試量で未知変異原物質の構造を決定出来たのは高速液体クロマトグラフィーによる分離精製技術の進歩および分析機器の進歩のお陰である。これらの物質の構造決定で特に苦労した点はMeIQおよびMeIQxにおけるC-メチル基の位置についてである。MeIQの場合にはC-4位またはC-5位, MeIQxの場合にはC-7位またはC-8位のいずれにメチル基が結合しているかという問題はNMRスペクトル等から推定するのは難しく, 種々の化学合成品との比較により初めて確定する事が出来た。これらの化合物のTA98(+S9)に対する変異原性は今までに知られているヘテロサイクリックアミンの中で

最も強いものであった(IQ, 443,000; MeIQ, 661,000; MeIQx, 145,000 revertants/ μ g)(Kasaiら, 1980a, 1980b, 1981a)。

3. IQ関連化合物に関するその後の研究

変異原性のメカニズムに関してはDNAへの物理的結合の強さがMeIQ>IQ>MeIQxの順になっており変異原性の強さの順と一致する事が明らかとなった。(Watanabeら, 1982) またN-メチル基の存在がIQの関連化合物の変異原性発現のために必須であることが示された(Nagaoら, 1981)。IQの代謝, 活性化については, まずproximate formのN-水酸化体となり(Okamotoら, 1981; Yamazoeら, 1983), さらにultimate formである硫酸エステルを経てDNAと反応すると予想される(Nagaoら, 1983)。IQ関連化合物のうち市販されている食料用beef extractからはIQおよびMeIQxが, またバクテリアの培地として用いられるDifco beet extractからはIQ, MeIQおよびMeIQxが検出されている(HargravesとPariza, 1983)。Feltonら(1984)は焼牛肉中の主要変異原物質はMeIQxである事を認め, さらにIQタイプの未同定変異原物質の存在を報告した。IQの発がん性については当研究所生化学部により研究

され, マウスに経口投与する事により肝臓, 前胃, 肺に腫瘍の発生する事が明らかとなった(Ohgakiら, 1984)。IQ関連化合物の生成のメカニズムについても研究が進められモデル反応としてクレアチニン, グリシンおよびグルコースの混合物を加熱する事により低収率ではあるが主要変異原物質としてMeIQxが生成する事が確かめられた(Jägerstadら, 1984)。生牛肉には0.4%のクレアチン(加熱によりクレアチニンへ変換), 0.1~0.3%の遊離アミノ酸, 0.1%のグルコースが含まれている事から牛肉を加熱する事によりこれらの成分がMaillard反応を起し最終的にMeIQxが生じると推定された。牛肉中の脂肪含量が多い程, 加熱調理により生じる変異原活性が高いという報告(Spingarnら, 1981)や, 加熱調理の際に大豆タンパクや酸化防止剤であるBHAを共存させると変異原の生成が抑制されるという報告(Wangら, 1982)から牛肉の種類, 調理条件を選ぶ事によりこれらのヘテロサイクリックアミンの生成は防ぎ得ると考えられる。

4. おわりに

化学発がん研究の歴史をたどってみると有機化学的研究がその後の進歩のための大きなステップとなっている場合が多い。そのよい例がタール中のベンツピレンの発見であろう。Ames法の普及により我々が毎日のように食べている物の中から変異原物質を探し出す事が可能となった。このような研究を続けるうちにいつか環境中の発がん物質の大半が明らかになりがん予防が実現する日が来る事を願っている。昭和58年本学会総会において名誉ある本学会奨励賞をいただき大変光栄に思う。受賞の機会を与えて下さった学会の諸先生方に感謝の意を表す。本研究は多くの人達との共同研究により初めて実を結んだものであり, このテーマに興味を起こさせて下さった当研究所の杉村所長,

西村生物学部長をはじめ, 生化学部の若林博士, 生物学部の山泉博士らの共同研究者各位に深謝したい。

文 献

- 1) Felton, J.S., Knize, M.G., Wood, C., Wuebbles, B.J., Healy, S.K., Stuermer, D.H., Bjedanes, L.F., Kimble, B.J. and Hatch F.T.: Isolation and characterization of new mutagens from fried ground beef, *Carcinogenesis*, **5**: 95-102 (1984).
- 2) Hargraves, W.A. and Pariza, M.W.: Purification and mass spectral characterization of bacterial mutagens from commercial beef extract, *Cancer Res.*, **43**: 1467-1472 (1983).
- 3) Jägerstad, M., Olsson, K., Grivas, S., Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S. and Sugimura, T.: Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose: *Mutation, Res.*, **126**: 239-244 (1984).
- 4) Kasai, H and Nishimura, S.: Syntheses of 2-amino-3,4-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]-quinoline and its related compounds, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**: 2233-2235 (1982).
- 5) Kasai, H., Nishimura, S., Nagao, M., Takahashi, Y. and Sugimura, T.: Fractionation of a mutagenic principle from broiled fish by high-pressure liquid chromatography, *Cancer Lett.*, **7**: 343-348 (1979).
- 6) Kasai, H., Nishimura, S., Wakabayashi, K., Nagao, M. and Sugimura, T.: Chemical synthesis of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ), a potent mutagen isolated from broiled fish, *Proc. Japan Acad.* **56B**: 382-384 (1980 a).

- 7) Kasai, H., Shiomi, T., Sugimura, T. and Nishimura, S.: Synthesis of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx), a potent mutagen isolated from fried beef, *Chem. Lett.*, 675-678 (1981 a).
- 8) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Spingarn, N.E., Weisburger, J.H., Yokoyama, S. and Miyazawa, T.: A potent mutagen in broiled fish. part 1. 2-Amino-3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoline, *J. Chem. Soc. Perk I*, 2290-2293 (1981 b).
- 9) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Shiomi, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T. and Nishimura, S.: Structure of a potent mutagen isolated from fried beef, *Chem. Lett.*, 485-488 (1981 c).
- 10) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T. and Nishimura, S.: Structure and chemical synthesis of Me-IQ, a potent mutagen isolated from broiled fish, *Chem. Lett.*, 1391-1394 (1980 b).
- 11) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Spingarn, N.E., Weisburger, J. H. and Nishimura, S.: Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditions, *Proc. Japan Acad.* 56 B: 278-283 (1980 c).
- 12) Nagao, M., Fujita, Y., Wakabayashi, K. and Sugimura, T.: Ultimate forms of mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines produced by pyrolysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 626-631 (1983).
- 13) Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T. and Sugimura, T.: Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat, *Cancer Lett.*, 2: 221-226 (1977).
- 14) Nagao, M., Wakabayashi, K., Kasai, H., Nishimura, S. and Sugimura, T.: Effect of methyl substitution on mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline, isolated from broiled sardine, *Carcinogenesis*, 2: 1147-1149 (1981).
- 15) Ohgaki, H., Kusama, K., Matsukura, N., Morino, K., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T.: Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline, from broiled sardine, cooked beef and beef extract, *Carcinogenesis*, 5, in press (1984).
- 16) 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).
- 17) Spingarn, N.E., Garvie-Gould, C., Vuolo, L.L. and Weisburger, J.H.: Formation of mutagens in cooked foods. IV. Effect of fat content in fried beef patties, *Cancer Lett.*, 12: 93-97 (1981).
- 18) Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y., and Itai, A.: Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products, *Proc. Japan Acad.*, 53: 58-61 (1977).
- 19) Wang, Y.Y., Vuolo, L.L., Spingarn, N.E. and Weisburger, J.H.: Formation of mutagens in cooked foods. V. The mutagen reducing effect of soy protein concentrates and antioxidants during frying of beef, *Cancer Lett.*, 16: 179-189 (1982).
- 20) Watanabe, T., Yokoyama, S., Kasai, H., Nishimura, S. and Miyazawa, T.: DNA-Binding of IQ, Me-IQ and Me-IQx, strong mutagens found in broiled foods, *FEBS Lett.*, 150: 434-438 (1982).
- 21) Wynder, E.L. and Gori, G.B.: Contribution of the environment to cancer incidence: An epidemiologic exercise, *J. Natl. Cancer Inst.*, 58: 825-832 (1977).
- 22) Yamazoe, Y., Shimada, M., Kamataki, T. and Kato, R.: Microsomal activation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline, a pyrolysate of sardine and beef extracts, to a mutagenic intermediate, *Cancer Res.*, 43: 5768-5774 (1983).

ニトロアレーンの重要性

徳島大学医学部細菌学教室 大西 克成・木内 武美・真鍋 芳樹
筒井 英士

1. はじめに

areneとは、単環および多環芳香族炭化水素の一般名である。このareneのニトロ化合物であるnitroareneの研究が、人類の健康にとって重要である第一の理由は、nitroareneの中には、dinitropyreneのように変異原性が非常に強いものが含まれていることである。第2の理由は、nitroareneが環境中に広く分布していることであり、しかも、これらのnitroareneが、増加しつつある肺癌など、日本人の死因の第一位である癌の原因の可能性があるのである。

nitroareneは昔から環境中に存在し、産業界でも使われていたものであるが、1978年に、Pittsらが、大気中の多環芳香族炭化水素(PAH)が、NO₂によってニトロ化を受けて、変異原性が強いdirect-acting mutagenになることを指摘して以来注目をあび、研究されるようになった。同じ年の1978年に、Jägerは大気中に、また、Fitchらはcarbon black中にnitroareneの存在を明らかにした。さらに、1980年になると、Löfrothらや、Rosenkranzらが、photocopyの中にnitropyrene(NP)やdinitropyrene(diNP)があることを示し、特に、1,6-diNP

および1,8-diNPの変異原性が非常に強いことを明らかにした。従って、変異原性NP類の研究が盛んになったのは、最近数年間のことである。

それでは、どういうところに変異原性が強いnitroareneが存在しているのか、主としてNP類について、筆者らの研究室で同定、定量した3例を記した後、それらのNP類が生体内に摂取される量を推定して人体に与える影響の評価を試み、nitroareneの重要性を論じてみたい。

2. ディーゼルエンジン排出ガス中のNP類

chassis dynamometer上で、10モードで運転中(平均車速は17.7 km/h)の1982型ディーゼルトラック(排気量5,785 cc)の排出粒子状物質のうちAndersen サンプラーで直径1.1 μm以下の粒子を、テフロンフィルター(Pallflex 型式T60 A 20)上に捕集した。これらのフィルターから、変異原成分をbenzene-ethanol(4:1)で超音波抽出して、preincubation法を用いたAmes法(MaronとAmes, 1983)で変異原性を測定した(表1)。Salmonella typhimurium TA 98株, S9無添加で最も変異原性が高かつ

表1 ディーゼルトラック排出粒子状物質の変異原性

試料	重量 mg(%)	His ⁺ /mg粗抽出物(%)					
		TA 98		TA 100		TA 98NR	
		(-)S9	(+)S9	(-)S9	(+)S9	(-)S9	(-)S9
粗抽出物	200(100)	2860(100)	800	2580	875	970	385
中性画分	80(40.0)	1,680(58.8)	746	2,110	594	220	85
酸性画分	20.4(10.2)	765(26.8)	161	306	95	170	41
塩基性画分	3.0(1.5)	7.2(0.3)	2.6	7.8	6	12.3	6.9
分画画分の合計	103.4(51.7)	2,452.2(85.9)					

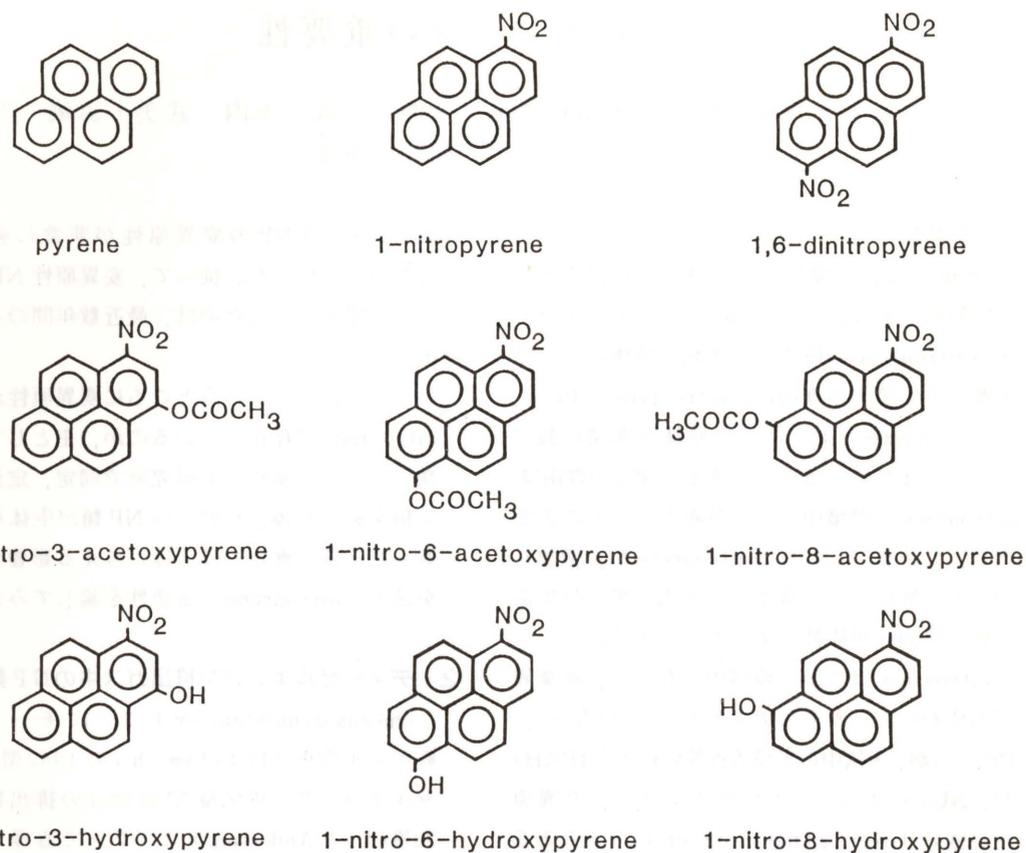


図1 分析した化学物質の構造式

た。さらに、この粗抽出液をdiethyl etherを用いて、中性、酸性、塩基性画分に分画した(Manabeら, 1984)。中性画分では、TA98 NR株およびTA98/1,8-DNP₆株での変異原性が低いことから、この画分には、1-NPおよびdiNPが含まれていることが示唆された。TA98株、(-)S9での変異原性では、中性画分が59%、酸性画分が27%を占めており、これらの画分の変異原性がどのような化学物質によるものかが、重要な課題となってくる。分析した幾つかの化学物質の構造式を図1に示す。

中性画分をZorbax ODSカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分画し、各画分の変異原性を測定すると、1-NPやdiNPが溶出してくるはずの画分以外に、もっと早く

溶出してくる極性画分にも強い変異原活性が出現した。まず、1-NPと1,6-diNPに相当する画分をそれぞれ分取し、*Bacteroides fragilis*から精製したnitroreductase (NRase) IとIII(KinouchiとOhnishi, 1983)とを作用させて、in vitroで還元して、1-aminopyreneと1,6-diaminopyreneとに転換させ、それらの反応液から有効成分を抽出して、再度HPLCのODSカラムにかけ、蛍光性物質に転換したこれらのアミノ体を分析することによって、もとの中性画分に含まれている1-NPと1,6-diNPとを定量した(Manabeら, 1984; 大西と木内, 1983; Ohnishiら, 1983, 1984)(表2)。それらの定量値が示すはずの変異原性は、それぞれ粗抽出液のTA98株、(-)S9に

表2 ディーゼル排出ガス中のニトロアレーン

化学物質	変異原性 His ⁺ /ng	粗抽出物中の濃度 ng/mg	TA98株(-)S9での 全変異原性に占める割合 %
中性画分			
1-nitropyrene	1.69	61.5	3.6
1,6-dinitropyrene	281	0.81	8.0
他の dinitropyrenes			16.0 (推定)
1-nitro-3-acetoxypyrene	54.8	7.45	14.3
1-nitro-6/8-acetoxypyrene	1.10	16.6	0.6
酸性画分			
1-nitro-3-hydroxypyrene	3.77	78.9	10.4
1-nitro-6/8-hydroxypyrene	0.37	12.7	1.6
合計			54.5

おける全変異原性の3.6と8.0%であった。1,3-diNPと1,8-diNPも、1,6-diNPと同じ濃度であると仮定すると、全diNPの変異原性は約24%を占めることになる。

次に、極性画分にある強い変異原物質として、nitroacetoxypyreneを推定し、まず標準物質を合成して、変異原性を測定した(Manabeら, 投稿準備中)。1-nitro-3-acetoxypyreneの変異原性は、TA98株、(-)S9で16,700 His⁺/plate/nmolという高い値を示した。1-nitro-6/8-acetoxypyreneでは336 His⁺/plate/nmolであった。ディーゼル排出ガス中性画分のHPLC分画で、これらのnitroacetoxypyreneが溶出されてくる画分を分取し、Dexsil 400カラムを用いたmass fragmentographyで定量したところ、含まれている1-nitro-3-acetoxypyreneは、7.45 ng/mgで、全変異原性の14.3%を占めた。以上のNP類とnitroacetoxypyrene全体で、合計42.5%の変異原性を説明することができた(表2)。

ディーゼル排出ガスの酸性画分に含まれる変異原については、ほとんどよくわかっていない。酸性画分をZorbax ODSカラムを用いてHPLCで分画し、変異原性を測定すると、非常に強い活性を示す画分がある。nitrohydroxypyreneを

推定して、標準物質を合成し、変異原性を測定した(Manabeら, 投稿準備中)。1-nitro-3-hydroxypyreneの変異原性は、TA98株、(-)S9で992 His⁺/plate/nmolであり、1-NPの2倍の強さであった。1-nitro-6/8-hydroxypyrene(1-nitro-6-hydroxypyreneと1-nitro-8-hydroxypyreneの含有比は約1:1であった)の変異原性は96.4 His⁺/plate/nmolであった。酸性画分のHPLC分画で、1-nitro-3-hydroxypyreneが溶出されるはずの画分を分取し、mass fragmentographyで定量したところ、含有量は78.9 ng/mgであり、全変異原性に占める割合は10.4%であった(表2)。表2に示すように、定量した化学物質全体の変異原性は54.5%になったが、残り45%がどのような化学物質によるものかは不明である。3分画した時の変異原性のrecoveryが85.9%(表1)であるので、少なくとも残り30%の変異原についての化学分析が将来なされなければならない。

3. 石油ストーブ燃焼中の室内空気の変異原性とNP類

普通の人には、1日の80%以上は室内で生活している。しかも、日本の冬には、室内で灯油

表3 石油ストーブから排出される室内粒子状物質の変異原性とニトロピレン濃度

試料 ^a	His ⁺ /m ³ 室内空気			ng/m ³				TA 98 株(-)S 9 での全変異原性に占める割合 %
	TA 98 /			1-NP	1,6-diNP	1-NP	1,6-diNP	
	TA 98	TA 98NR	1,8-DNP ₆					
A (ストーブなし)	1.7	1.2	1.1	n.d. ^b	n.d.	n.d.	n.d.	
B (8時間連続)	34.9	23.7	7.0	0.147	0.025	0.71	2.01	
C (点火時)	23.7	13.3	17.8	1.62	0.149	1.16	17.6	
D (安定燃焼中)	8.9	5.7	4.0	0.044	0.001	0.84	4.4	

- a. 試料Aは、石油ストーブを点火していない部屋で集めた浮遊粒子状物質。
 試料Bは、石油ストーブ点火後8時間、連続燃焼中の部屋で集めたもので、フィルターは20分毎に交換した。
 試料Cは、点火後20分間に採取したもので、消火後20分間換気をして、21回点火時の試料を集めた。
 試料Dは、点火後1時間そのまま換気をした後、安定に燃焼中のものを7時間連続採取した。
- b. n.d.は測定しなかった。

を燃料として石油ストーブを使用することが多いので、石油ストーブ燃焼排出ガスで汚染された室内空気中の粒子状物質について分析した(表3)。

試料Aは、ストーブを燃焼しない場合で、室内空気1m³当たりTA98株、(-)S9で1.7His⁺/

plateであった。ストーブ点火後20分間にハイボリュームサンプラーで集めた室内粒子状物質のbenzene-ethanol抽出物である試料Cでは23.7His⁺/plate/m³と強い変異原性を示した。安定に燃焼中の試料Dでは8.9His⁺/plate/m³で、試料Cの3.8%であり、

表4 焼鳥の変異原性

焼鳥	試料	His ⁺ /プレート/g 焼鳥			TA 98 / 1,8-DNP ₆
		TA 98, (-)S 9	TA 98, (+)S 9	TA 98 NR	
たれ付	粗抽出物	5,610	3,260	3,480	2,820
	中性画分	3,100	650	916	798
	酸性画分	89	32	51	51
	塩基性画分	795	2,170	596	464
たれなし	粗抽出物	2,280	10,900	1,260	1,230
	中性画分	600	252	323	568
	酸性画分	195	45	85	21
	塩基性画分	629	6,880	539	449

1-NPも1,6-diNPも非常に減少していた。点火してから8時間の試料Bの変異原性は34.9His⁺/plate/m³で、1-NPは0.147ng/m³、1,6-diNPは0.025ng/m³であった。これらのNP類は、それぞれ全変異原性の0.71、2.01%を占めており、変異原性におけるdiNPの重要性がわかる(Ohnishiら, 1984)。

4. 焼鳥の変異原性とNP生成

市販の串刺しの鶏肉を、そのまま、または、市販のたれをつけて都市ガスの直火で焼き、benzene-ethanolで超音波抽出して、変異原性を測定した(表4)。さらに、それらの粗抽出液をdiethyl etherで3分画した。表4に示すように、たれをつけない時の塩基性画分が、TA98株、(+)S9で強い変異原性を示しているが、これは、Trp-P-1, Trp-P-2, IQ, MeIQなどによるものと考えられる。ところがたれをつけると、この画分の変異原性が低下し、かわって、中性画分の変異原性がTA98株、(-)S9で増加していた。この中に1-NPが含まれているのではないかと考え、HPLCを用いて、1-NP相当の画分を分取し、NRase Iで還元して、生成した1-aminopyreneを定量した。たれをつけない時は、少し焼き過ぎの7分後でも、焼鳥1g当たり1.34ngの1-NPしか生成されなかったが、たれをつけると3、5、7分間で、それぞれ3.8、19、43ngの1-NPが生成された(Ohnishiら, 1984)。勿論、電気レンジで焼いた時には、1-NPは検出されなかった。市販の他の2種類のたれを用いた時には、7分間焼いても、1-NPはそれぞれ1.2または2.7ngしか生成されなかった。従って、たれの種類、すなわち、たれの成分によって1-NP生成程度が異なるものと思われる。

5. NP類の人体摂取量の推定と人体影響

以上、大気汚染源の代表としてディーゼル排

出粒子状物質、室内空気汚染の代表として石油ストーブ燃焼中の室内空気中の粒子状物質、nitroareneを含む食物の代表として焼鳥をとりあげ、それらの変異原性とnitroareneの定量を行った。これらのものが、実際にどの程度人体に影響を与えるのかを論ずるためには、まず、人体に摂取される量を明らかにしなければならない。

ディーゼルトラック排出ガス13.65m³からの抽出重量は349mgであったので、排出ガス1m³に、1-NPは1.57μg、1,6-diNPは20.7ng含まれていた計算になる。大気中の粒子状物質の変異原性は、TA98株、(-)S9で大気1m³当たり1~100His⁺/plateであり(Tokiwaら, 1983)、ディーゼル排出ガスだと排出ガス1m³当たり10⁴~10⁵His⁺/plateになる(大西と木内, 1983; Ohnishiら, 1984)。実際に測定された大気中の1-NP濃度は、上記のディーゼル排出ガス中の1.6μg/m³の10⁻⁴~10⁻⁵倍である(Gibson, 1981; Tokiwaら, 1983)。以上のことから、大気中のNP類がすべてディーゼル排出ガスによると仮定すると、大気中のNP類の濃度は、ディーゼル排出ガス中の濃度の大体10⁻³~10⁻⁵倍の濃度であると推定される。従って、通常1日10m³の空気を呼吸していると仮定すると、20年間に10m³×365日×20年=7.3×10⁴m³になり、1人の人が20年間に1-NPを約1.2~120μg、1,6-diNPを1.5ng~1.5μg吸入することになる(表5)。1,3-diNPや1,8-diNPも同量混入していると仮定すると、diNPは45ng~4.5μg吸入することになる。同様の計算によって、1-nitro-3-acetoxypyreneは0.16~1.6μg、1-nitro-3-hydroxypyreneは1.7~170μg吸入することになる(表5)。

石油ストーブ点火後、燃焼中の部屋で1日8時間、1年間に3か月間生活すると仮定すると、1人の人が20年間で、1-NPを0.147ng/m³

表5 ニトロアレーンの人体摂取推定量

化学物質	人体摂取推定量 $\mu\text{g}/\text{人}/20\text{年間}$		
	屋外空気	室内空気	焼 鳥
1-nitropyrene	1.2 ~ 120	0.89	30 ~ 500
1,6-dinitropyrene	0.015 ~ 1.5	0.15	
dinitropyrenes	0.045 ~ 4.5	0.45	0.3 ~ 5
1-nitro-3-acetoxypyrene	0.16 ~ 16		
1-nitro-6/8-acetoxypyrene	0.35 ~ 35		
1-nitro-3-hydroxypyrene	1.7 ~ 170		
1-nitro-6/8-hydroxypyrene	2.7 ~ 270		

$\times 10\text{ m}^3 \times \frac{8}{24} \times 91\text{日} \times 20\text{年} = 892\text{ng}$ 吸入することになる。1,6-diNPだと $0.025\text{ng}/\text{m}^3 \times 10\text{ m}^3 \times \frac{8}{24} \times 91 \times 20 = 152\text{ng}$ 吸入することになり、diNPだと 456ng になる(表5)。変異原性も、NP類の濃度も、点火時が最大であり、安定に燃焼中は少ないので、石油ストーブ点火後、しばらく換気することは、健康上非常に重要である。

焼鳥を4週間に1回100g食べるとすると、年13回、20年間で1人の人が焼鳥から摂取する1-NPの量は、 $0.019\mu\text{g}/\text{g} \times 100\text{g} \times 13 \times 20 = 494\mu\text{g}$ であり、たれの種類をかえて、1-NPの生成量が少ない焼鳥を食べた時には、 $0.0012\text{ng}/\text{g} \times 100\text{g} \times 13 \times 20 = 31.2\mu\text{g}$ になり、大体30~500 μg になる。diNPが、1-NPの $\frac{1}{100}$ の濃度と仮定すると、0.3~5 μg のdiNPを20年間で経口摂取することになる(表5)。

以上、1-NPとdiNPとを、outdoor airからそれぞれ最高120 μg と4.5 μg 、indoor airから0.9 μg と0.5 μg 、焼鳥から500 μg と5 μg 摂取する可能性があるものと推定した。これらが、人の発癌の原因になり得るだろうか。

1-NPの発癌性については、発癌性ありという報告(Hiroseら, 1984; Ohgakiら, 1982)

もあるが、2 mg の皮下投与(大西と木内, 1983; Ohnishiら, 1984; Tokiwaら, 1984)、40 mg の皮下投与(大垣, 私信)、1.5 mg の肺内投与(前田ら, 未発表)でも発癌性がなく、陰性の報告(El-Bayoumy, 1982)の方が多い。Ohgakiら(1982)の実験では、diNPが混入していたために陽性に出たのではないかとされている(Ohgakiら, 1984)。従って、1-NPが人の発癌にどの程度関与している可能性があるのかは、現在のところ明らかでない。

常盤らとの共同研究の結果、2 mg の1,6-diNPの皮下注射でBALB/cマウスの50%に悪性線維性組織球腫を発生した(大西と木内, 1983; Ohnishiら, 1984; Tokiwaら, 1984)。高山ら(私信)は、10 mg の1,6-diNPをハムスターの気管内に注入して、扁平上皮化生を伴った腺癌を発生させている。Ohgakiら(1984)の実験では、4 mg の1,3-diNPまたは、1,8-diNPの皮下注射で、100%のF344ラットに肉腫が発生している。さらに、1,8-diNP 400 μg 、または、40 μg の皮下注射でもF344ラットに発癌性があるという(大垣, 私信)。

筆者らは、大塚教授との共同研究で、大気中の粒子状物質が吸入されて、肺に留まって作用する時のモデルとして、150 μg の1,6-diNP

をbeeswaxに混ぜてペレットしてFischer 344ラットの肺に注入した(前田ら, 未発表)。まだ実験途中であるが、28匹中12匹のラット肺に扁平上皮癌が発生した。このペレット注入法によって、少なくとも今までより1桁少ない投与量で発癌することが明らかになった。

上記の仮定で、人は最高5 μg のdiNPを肺から吸入する可能性があるが、肺発癌実験で陽性に出た150 μg の $\frac{1}{30}$ の量であり、喫煙しない日本人の女性の肺癌死亡率が10万人に18人である(平山, 私信)ことを考えると、全くdiNPが関係がないとはいきれないと思われる。さらに、新しく発見された変異原性が強い1-nitro-3-acetoxypyreneを最高16 μg 、1-nitro-3-hydroxypyreneを170 μg も同時に吸入するわけで、これらの物質の発癌性はまだ不明であるが、benzo(a)pyreneなどのPAHと共に複合的に作用して発癌に関与している可能性は十分にあると考えられる。特に、交通が激しい場所・地区で職業上排出ガスにさらされる人にとっては重要な因子になるものと思われる。

6. おわりに

nitroareneの代表としてNP類について、存在している場所・物質について例をあげ、それらの濃度を測定し、人体摂取量を推定した。日本における肺癌死亡数は1983年1年間で25,647人であり、年々増加している。肺癌の原因として喫煙以外のものとしては、outdoorおよびindoor air中のNP類の可能性は否定出来ない。中性の高変異原性物質として1-nitro-3-acetoxypyreneが新たに見つかったが、1-nitro-3-hydroxypyreneと共に早急に発癌性を明らかにしなければならない。特に、nitrohydroxypyreneは、1-NPを生体に投与した時の代謝産物の一つでもある(Ballら, 1984; El-Bayoumyら, 1983; 木内ら, 未発表)。都市ガス燃焼時に排出されるNO₂の濃度はか

なり高いものになるので、都市ガス使用中の家庭での換気が悪いと、相当高濃度のNO₂(250ppb)を吸入することになる(大西ら, 未発表)。NO₂自体による影響も重要であるが、それ以外に、吸入されたNO₂が、肺内にひっかかっている粒子状物質に吸着しているpyreneなどのPAHを、肺内のその場でニトロ化する可能性があり、女性の肺癌の原因の1つになっている可能性がある。食物中にもNP類があることがわかったが、経口摂取されたNP類は、当然腸管内常在細菌によって代謝を受けた後に吸収されるし、また、肺などから吸収されたものも、肝臓を経て、腸肝循環をするので、腸管内常在細菌によるものも含めて、生体内代謝を明らかにすることは、これからの重要な研究課題であろう。

本論文の研究の一部は、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

- 1) Ball, L.M., Kohan, M.J., Inmon, J.P., Claxton, L.D., and Lewtas, J.: Metabolism of 1-nitro [¹⁴C] pyrene in vivo in the rat and mutagenicity of urinary metabolites. Carcinogenesis, submitted (1984).
- 2) El-Bayoumy, K., and Hecht, S.S.: Identification and mutagenicity of metabolites of 1-nitropyrene formed by rat liver. Cancer Res., 43: 3132-3137 (1983).
- 3) El-Bayoumy, K., Hecht, S.S., and Hoffmann, D.: Comparative tumor initiating activity on mouse skin of 6-nitrobenzo[a]pyrene, 6-nitrochrysene, 3-nitroperylene, 1-nitropyrene and their parent hydrocarbons. Cancer Lett., 16: 333-337 (1982).
- 4) Fitch, W.L., Everhart, E.T., and Smith, D.H.: Characterization of carbon black ad-

- sorbates and artifacts formed during extraction. *Anal. Chem.*, **50**: 2122-2126 (1978).
- 5) Gibson, T.L.: Nitro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne and source particulate. General Motors Research Publication GMR-3836 ENV#118, presented to Environmental Protection Agency Diesel Emissions Symposium, Raleigh, North Carolina, October 7 (1981).
- 6) Hirose, M., Lee, M.S., Wang, C.Y., and King, C.M.: Induction of rat mammary gland tumors by 1-nitropyrene, a recently recognized environmental mutagen. *Cancer Res.*, **44**: 1158-1162 (1984).
- 7) Jäger, J.: Detection and characterization of nitro derivatives of some polycyclic aromatic hydrocarbons by fluorescence quenching after thin-layer chromatography: application to air pollution analysis. *J. Chromatogr.* **152**: 575-578 (1978).
- 8) Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 596-604 (1983).
- 9) Löfroth, G., Hefner, E., Alfheim, I., and Møller, M.: Mutagenic activity in photocopies. *Science*, **209**: 1037-1039 (1980).
- 10) Manabe, Y., Kinouchi, T., Wakisaka, K., Tahara, I., and Ohnishi, Y.: Mutagenic 1-nitropyrene in wastewater from oil-water separating tanks of gasoline stations and in used crankcase oil. *Environ. Mutagenesis*, **6**: in press (1984).
- 11) Maron, D.M., and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**: 173-215 (1983).
- 12) Ohgaki, H., Matsukura, N., Morino, K., Kawachi, T., Sugimura, T., Morita, K., Tokiwa, H., and Hirota, T.: Carcinogenicity in rats of the mutagenic compounds 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene. *Cancer Lett.*, **15**: 1-7 (1982).
- 13) Ohgaki, H., Negishi, C., Wakabayashi, K., Kusama, K., Sato, S., and Sugimura, T.: Induction of sarcomas in rats by subcutaneous injection of dinitropyrenes. *Carcinogenesis*, **5**: 583-585 (1984).
- 14) 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**: 335-355 (1983).
- 15) Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., Tsutsui, H., Otsuka, H., Tokiwa, H., and Otofuji, T.: Nitro compounds in environmental mixtures and foods. *Short-Term Genetic Bioassays in the Evaluation of Complex Environmental Mixtures* (edited by M.D. Waters et al.), Plenum Publishing Corporation, New York, in press (1984).
- 16) Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., and Wakisaka, K.: Environmental aromatic nitro compounds and their bacterial detoxification. *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III* (edited by M.D. Waters et al.), Plenum Publishing Corporation, New York, 527-539 (1983).
- 17) Pitts, J.N., Jr., Van Cauwenberghe, K.A., Grosjean, D., Schmid, J.P., Fitz, D.R., Belser, W.L., Jr., Knudson, G.B., and Hynds, P.M.: Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science*, **202**: 515-519 (1978).
- 18) Rosenkranz, H.S., McCoy, E.C., Sanders, D.R., Butler, M., Kiriazides, D.K., and Mermelstein, R.: Nitropyrenes: isolation, identification, and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners. *Science*, **209**: 1039-1043 (1980).
- 19) Tokiwa, H., Kitamori, S., Horikawa, K., and Nakagawa, R.: Some findings on mutagenicity in airborne particulate pollutants. *Environ. Mutagenesis*, **5**: 87-100 (1983).
- 20) Tokiwa, H., Kitamori, S., Nakagawa, R., Horikawa, K., and Matamala, L.: Demonstration of a powerful mutagenic dinitropyrene in airborne particulate matter. *Mutation Res.*, **121**: 107-116 (1983).
- 21) Tokiwa, H., Otofuji, T., Horikawa, K., Kitamori, S., Otsuka, H., Manabe, Y., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: 1,6-Dinitropyrene: mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in BALB/c mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**: in press (1984).

ニトロアレーン系変異原の環境分布は 何故広いと推定されるのか

国立公衆衛生院

松下 秀鶴・河合 昭宏・後藤 純雄
久松 由東

1. はじめに

環境がん(変異)原研究の立場から、近年、ニトロアレーンは強い関心をあつめているが、その主な理由としては次のような事柄を挙げる事が出来る。

- i) ニトロアレーンに属する化合物には変異原性を示すものが多く、しかもジニトロピレンなど極めて変異原性の強いものが種々含まれている。
- ii) 近年、発がん性を示すニトロアレーンの種類が急激にふえつつある。
- iii) ニトロアレーンは環境中に広く分布し、日常生活を通じて、発がん性や変異原性を示すニトロアレーンを体内に取り込んでいく可能性が高い。

このほか、ニトロアレーンは注目されはじめから日が浅いため、その発がん性、変異原性、環境分布やその検出方法などに関して解明すべき多くの問題を残していることも、研究者の関心と意欲をあおっている理由の一つとなっているように思われる。

前述の如く、ニトロアレーンの環境分布は極めて広いと考えられている。しかしながら、ニトロアレーンの環境分布に関する報告はそれ程多くなく、分析方法をも含めてその実態把握には多くの問題を残している、このような状況下で、何故ニトロアレーンの環境分布は広いと考えるべきなのであろうか? 以下、この問題について、我々のデータを中心に私見を述べることにする。

2. ニトロアレーンの環境分布が広いと推定される理由

ニトロアレーンの環境分布を極めて広いとす

る理由は次のように要約することが出来るように思われる。

- i) ニトロアレーンは物質の不完全燃焼によって生成するばかりでなく、大気中での多環芳香族炭化水素とNO₂等との不均一反応によっても生ずる。
- ii) 産業、特に化学工業等において、多種類のニトロアレーン類が大量に使用されている。
- iii) 自然界での窒素循環過程でニトロアレーン等が生成される可能性がある。

従来、ニトロアレーンの環境分布の広さに言及する場合、主に i) の理由が述べられてきた。これは、a) Pittsら(1978)が benzo(a)pyrene 又は perylene に、痕跡量の硝酸を含む 1 ppm (又は 0.25 ppm) の NO₂ を暴露させると direct mutagen である nitro-benzo(a)pyrene や nitro-perylene が生ずることを示して以来、多くの研究者により多環芳香族炭化水素と NO₂ との不均一反応について多くの研究がなされ、この反応により、殆んどの場合、direct mutagen が生じることが確認されたこと。b) 多環芳香族炭化水素や NO₂ は化石燃料を含む有機物質の不完全燃焼によって生ずるため、燃焼行為のなされているまわりの空気には必ず多環芳香族炭化水素や NO₂ などが存在すること。c) 現代社会はエネルギーの大量消費、すなわち化石燃料の大量消費の上に成立しており、燃焼行為は社会の種々の場所で絶えず行われていること。d) 化石燃料等の不完全燃焼によって直接的にニトロアレーンが生成したとする研究報告例は極めて少ないが、ディーゼルエンジンのシリンダー内の燃焼ガスから 1

ーニトロピレンが検出されている(大西ら,1983 a; Duら,1984)。したがって,少なくともディーゼルエンジンのように,酸素過剰の条件下での燃焼ではニトロアレーンが生成されると推定されること。e)トナー(Rosenkrantzら,1980),カーボンブラック(Rosenkrantzら,1980;Ramdahlら,1982)ディーゼル排ガス(Pedersonら,1981;Tejadaら,1982;Xuら,1982;Schuetzleら,1982;Newtorら,1982;Pittsら,1982;Salmeenら,1982;Hendersonら,1983;Schuetzle,1983;Campbellら,1984;Tomkinsら,1984),自動車専用トンネル内の浮遊粉じん(Gorse, Jr.ら,1983),大気浮遊粉じん(Jager,1978;森田ら,1982;Nielsen,1983;松下ら,1983 a),使用済みエンジンオイルとヤキトリ(大西,1983b)灯油燃焼物(常盤,1983)などの環境試料から1-ニトロピレンを中心とするニトロアレーンが検出,又は定量されていること,などの事実に基づいている。

表1はこれらの事実の1例として,多環芳香族炭化水素を10ppmのNO₂又は(NO₂+SO₂)に24時間暴露させたもののサルモネラ菌TA 98株に対するdirect mutagenとしての活性の有無を示したものである。(松下ら,1981,1982,1983b)。表1から,多環芳香族炭化水素はNO₂のみにさらされた場合より,NO₂とSO₂の混合ガスにさらされた場合の方がdirect mutagenに変化しやすいことや,後者の場合,縮合環数2から10までの29種の多環芳香族炭化水素のうち28種類にdirect mutagenの生成が認められることなどが判る。これらの事実は,不完全燃焼によって大気中に放出された殆んどすべての多環芳香族炭化水素は,大気中に共存するNO₂やSO₂と反応してニトロアレーンを含むdirect mutagenに変化する事を示唆している。このほか,このニトロアレーンへの不均一反応は,多環芳香族炭化水素をフィルター上に塗布した場合よりも大気浮遊粉じんやディーゼル車排出粒子上に塗布した方がはるかに進行しやすいこと(松下ら1982;河合ら,1983),当該反応は光照

表1 多環芳香族炭化水素(PAH)とNO₂又は(NO₂+SO₂)との反応生成物の変異原性 (TA98, -S9mix)

PAH	縮合環数	反応生成物の変異原性	
		NO ₂ (10ppm)	NO ₂ +SO ₂ (10ppm,each)
Biphenyl	2	-	+
Naphthalene	2	-	+
β-Naphthol	2	+	+
Fluorene	3	-	+
2-Bromofluorene	3	-	+
p-Terphenyl	3	-	+
Anthracene	3	+	+
Acenaphthene	3	+	+
Acenaphthylene	3	+	+
1-Methylfluorene	3	+	+
Phenanthrene	3	-	+
2-Methylfluorene	3	+	+
9-Methylanthracene	3	-	+
Benz(a)anthracene	4	+	+
9,10-Benzophenanthrene	4	-	+
Chrysene	4	+	+
Fluoranthene	4	+	+
1-Methylpyrene	4	+	+
Pyrene	4	+	+
Benzo(j)fluoranthene	5	-	+
Benzo(a)pyrene	5	+	+
Benzo(e)pyrene	5	+	+
Dibenzo(a,h)anthracene	5	+	+
9,10-Diphenylanthracene	5	+	+
Perylene	5	+	+
Benzo(ghi)perylene	6	+	+
Pyranthrene	8	-	±
Rubrene	8	-	-
Ovalene	10	-	+

射条件下で酸素雰囲気の方が窒素雰囲気下よりも進行しやすいこと(松下ら,1984),フリーラジカル反応のほか,ラジカルカチオンの関与や硝酸や亜硝酸の触媒作用,浮遊粒子表面の状態や含水率等が関与することなどが明らかにされている(Nielsenら,1983;Pitts,1983)。空気は地球のあらゆる場所を蔽っていることや,多環芳香族炭化水素は環境中の殆んどすべてのものに含まれていると考えられていることなども考えあわせると,ニトロアレーンも環境中の殆んどすべての試料中に,多かれ少なかれ,含まれている可能性が高いといっても過言ではないと思われる。

3. 化学工業等で使用されるニトロアレーン類の変異原性

Howardら(1976)は米国におけるニトロアレーン類の使用状況を調査し,約250~300種類が化学工業等において使用され,そのうち約40種類は年間50万ポンド以上,50~100種類は10~50万ポンド消費されていると報告している。これらのニトロアレーン類は縮合環数1ないし2の芳香族ニトロ化合物が大部分であり,主に,染料中間体,農薬,殺菌剤,ゴム老化防止剤,ガソリン添加物,医薬品中間体,爆薬,各種化学製品の中間体や溶剤として使用されている。したがって,これらのニトロアレーンを製造したり,使用したりする労働者はこれらに比較的高濃度に被曝する可能性があり,場合によっては工場周辺の空気はこれらニトロアレーン類によって汚染される可能性がある。

表2は世界主要国における労働環境でのニトロアレーンの規制状況を示したものである。(ILO,1980)。主要18ヶ国で規制されているニトロアレーン類の種類は41種類とそれ程多くなく,また我が国ではわずかに4種類(nitrobenzene, 4-nitrobiphenyl, parathionおよび2, 4, 6-trinitrotoluene)が規制されているにすぎないことなどが判る。規制41物質のうち,発がんとの関連で規制されているのは4-nitrobiphenyl 1種類のみである。

このように規制されているニトロアレーン類の種類が比較的少ないのは,ニトロアレーン類の多くは最終製品としてよりは中間体として製造および使用されているため,これらの職場ではニトロアレーン類のほかに,例えば芳香族アミノ化合物などのように,より最終製品に近いものが共存していることにもよるのではないかと推測される。これまで,発がん性に関する研究も芳香族アミノ化合物の方がニトロアレーン類よりはるかによく行われてきたのも上記理由が一部関与しているように思われる。しかしながら,ニトロアレーンは体内でそれに対応する芳香族アミンやヒドロキシルアミンに変化しうること,芳香族アミンには発がん性を示すものが多種知られていること,さらには近年,発がん性ニトロアレーン類の種類がふえつつあることなどを考えに入ると,産業界等で使用されているニトロアレーン類も発がん性や変異原性の観点から検討する必要があるように思われる。

表2 労働環境で規制されているニトロアレーン類の種類

国名	ニトロアレーン類の種類
日本	4
米国 (OSHA)	14
(ACGIH)	16
ソ連	29
スイス	14
西独	12
18ヶ国+2機関*	41

* オーストラリア, ベルギー, ブルガリア, チェコスロバキア, フィンランド, 西独, 東独, ハンガリー, イタリア, 日本, オランダ, ポーランド, ルーマニア, スウェーデン, スイス, ソ連, 米国 (OSHA; ACGIH), ユーゴスラビア, ヨーロッパ協議会

** 規制されている脂肪族ニトロ化合物...20種類

このように規制されているニトロアレーン類の種類が比較的少ないのは,ニトロアレーン類の多くは最終製品としてよりは中間体として製造および使用されているため,これらの職場ではニトロアレーン類のほかに,例えば芳香族アミノ化合物などのように,より最終製品に近いものが共存していることにもよるのではないかと推測される。これまで,発がん性に関する研究も芳香族アミノ化合物の方がニトロアレーン類よりはるかによく行われてきたのも上記理由が一部関与しているように思われる。しかしながら,ニトロアレーンは体内でそれに対応する芳香族アミンやヒドロキシルアミンに変化しうること,芳香族アミンには発がん性を示すものが多種知られていること,さらには近年,発がん性ニトロアレーン類の種類がふえつつあることなどを考えに入ると,産業界等で使用されているニトロアレーン類も発がん性や変異原性の観点から検討する必要があるように思われる。

このような考えのもとに,我々は産業界で使用されていたり,法的な規制のあるニトロアレーン類を中心に,それらの変異原性をpre-incubation法で検索しつづけている。

表3にこれらの検討結果を示す(松下1983)。脂肪族ニトロ化合物6種類を含む89物質のうち,サルモネラ菌TA 100かTA 98のいずれかに変異原性を示したものは62種類(うち疑陽性8種類を含む)であり,その変異原性の陽性率や強さは,ベンゼン環数1ケのものより2ケ以上のものが,またモノニトロ体よりもジニトロ体の方が高いことを認めた。

また,検索した法的規制物質45種類のうち,サルモネラ菌TA 100またはTA 98のいずれかに変異原性を示したものは30種類(うち疑陽性

表3 化学工業等において製造および使用されているニトロアレーン類とその関連化合物の変異原性

物質名	変異原性			
	TA100		TA98	
	+S9	-S9	+S9	-S9
Nitromethane	-	-	-	-
Nitroethane	-	-	-	-
1-Nitropropane	-	-	-	-
2-Nitropropane	+	+	+	-
1-Nitrobutane	-	-	-	-
2-Nitrobutane	(+)	-	(+)	(+)
Nitrobenzene	-	-	-	-
o-Dinitrobenzene	+	+	-	-
m-Dinitrobenzene	+	(+)	+	+
p-Dinitrobenzene	+	+	+	+
o-Nitroethylbenzene	-	-	-	-
p-Nitroethylbenzene	-	-	-	-
o-Chloronitrobenzene	-	-	-	-
m-Chloronitrobenzene	(+)	-	-	-
p-Chloronitrobenzene	(+)	-	-	-
2,5-Dichloronitrobenzene	+	+	-	-
3,4-Dichloronitrobenzene	+	+	-	-
2,4-Dinitrochlorobenzene	+	+	+	+
PCNB (Pentachloronitrobenzene)	-	-	-	-
o-Nitrophenol	-	-	-	-
m-Nitrophenol	+	+	(+)	+
p-Nitrophenol	-	-	-	-
2,4-Dinitrophenol	-	(+)	-	(+)
2,5-Dinitrophenol	+	+	+	+
2,6-Dinitrophenol	-	-	-	-
2,4,6-Trinitrophenol	+	+	+	+
o-Nitroanisole	+	+	-	-
p-Nitroanisole	+	+	-	(+)
o-Nitroaniline	-	-	-	-
m-Nitroaniline	+	+	+	+
p-Nitroaniline	-	-	-	-
2-Chloro-4-nitroaniline	-	-	+	+
2,6-Dichloro-4-nitroaniline	-	-	(+)	+
2,4-Dinitroaniline	+	+	+	+

物質名	変異原性			
	TA100		TA98	
	+S9	-S9	+S9	-S9
2-Bromo-4,6-dinitroaniline	+	+	+	+
m-Nitrobenzoic acid	+	+	-	-
2,4-Dinitrobenzoic acid	-	(+)	-	-
3,5-Dinitrobenzoic acid	+	+	+	+
m-Nitrobenzene sulfonic acid	-	-	-	-
2,4-Dinitrophenyl thiocyanate	+	+	+	+
3,5-Dinitrobenzoyl chloride	+	+	(+)	+
o-Nitrotoluene	-	-	-	-
m-Nitrotoluene	-	-	-	-
p-Nitrotoluene	(+)	(+)	-	-
2,3-Dinitrotoluene	+	(+)	-	+
2,4-Dinitrotoluene	+	+	-	-
2,6-Dinitrotoluene	+	+	+	+
3,4-Dinitrotoluene	+	+	-	(+)
4-Chloro-2-nitrotoluene	-	-	-	-
α,α,α -Trifluoro-m-nitrotoluene	-	-	-	-
3,5-Dinitro-o-cresol	-	-	-	-
2-Nitro-p-toluidine	-	-	-	-
3-Nitro-o-xylene	-	-	-	-
4-Nitro-o-xylene	(+)	-	-	-
2-Nitro-m-xylene	-	-	-	-
4-Nitro-m-xylene	(+)	-	-	-
5-Nitro-m-xylene	-	-	-	-
2-Nitro-p-xylene	+	-	-	-
2,4-Dinitro-m-xylene	+	(+)	-	-
4,6-Dinitro-m-xylene	+	+	-	-
EPN (Ethyl p-nitrophenyl thionobenzenephosphate)	-	-	-	-
Parathion	+	+	-	-
Nitramine	+	+	+	+
3-Nitrobiphenyl	+	-	+	-
4-Nitrobiphenyl	+	+	+	+
4,4'-Dinitrobiphenyl	+	+	+	+
2,2',4,4'-Tetranitrobiphenyl	+	+	+	+
1-Nitronaphthalene	+	+	+	+
1,3-Dinitronaphthalene	+	+	+	+
1,5-Dinitronaphthalene	+	+	+	+

物質名	変異原性			
	TA100		TA98	
	+S9	-S9	+S9	-S9
1,8-Dinitronaphthalene	+	+	+	+
1-Nitro-2-naphthol	-	-	+	+
2,4-Dinitronaphthol	(+)	-	+	-
1-Nitro-2-naphthylamine	+	+	+	+
4-Nitro-1-naphthylamine	+	-	-	-
1-Nitro-2-methylnaphthalene	(+)	-	-	-
6-Nitroquinoline	+	+	+	+
9-Nitroanthracene	+	+	+	+
5-Nitroacenaphthene	+	+	+	+
4-Nitro-p-terphenyl	+	(+)	+	+
2-Nitrofluorene	+	+	+	+
2,5-Dinitrofluorene	+	+	+	+
2,7-Dinitrofluorene	+	+	+	+
1-Nitroanthraquinone	+	+	+	+
1-Nitropyrene	+	+	+	+
Dinitropyrenes (mixture)	+	+	+	+
6-Nitrochrysene	+	+	+	+

7種類を含む)であり、化学工業等で使用されていることの明らかな物質の場合、30種類中20種類(疑陽性4種を含む)が変異原性を示した。なお、検索した法的規制物質の数の方が世界主要国での規制物質数より多いのは、後者の場合、異性体をまとめて1物質とする場合が多いためである。

規制物質のうち、比較的強い変異原性を与えたものは2,4-dinitrophenylthiocyanate (TA 98, +S9, 63,000 rev/mg), nitramine (TA 100, +S9, 30,000 rev/mg), 4-nitrobiphenyl (TA 100, -S9, 25,000 rev/mg)で、これらの化合物、特に前2者に対する詳細な検討は今後の課題の一つかと思われる。いずれにせよ、ニトロアレーン類が産業界で多量に製造、使用され、これらに暴露する可能性のある労働者数も多いと推定され、かつ、これらには変異原性を示すものが多種含まれているという事実

はニトロアレーン類の研究の重要性を強く支持するように思われる。

4. 自然界での窒素循環過程でのニトロアレーン類生成の可能性

窒素は生体の重要な構成元素の一つであるばかりでなく、生物圏、気圏、水圏、地圏を含む自然界を循環していることはよく知られている。この循環過程で窒素はさまざまな化学形態をとる。図1はこの過程で起る主な反応を示したものであるが、大気中の窒素が窒素固定反応によりアンモニウム(またはアミノ、アミド窒素)となることや、アンモニウムが酸化されて亜硝酸や硝酸に変化したり、硝酸が有機物と反応して窒素、アンモニア、ニトロ化物を生ずることなどが理解出来るであろう。

これらの諸反応のうち、ニトロアレーン類の生成と関係のあるものはフミン酸を含む自然界の芳香族化合物の硝酸(又は亜硝酸)によるニトロ化反応であろう。このような反応によるニトロアレーン類の生成の可能性を探るために、我々はフミン酸を硝酸処理して得た市販のニトロフミン酸の変異原性を調べてみた。

図2はその1例として、ニトロフミン酸のベンゼン・エタノール(3:1, V/V)抽出物のサルモネラ菌に対する変異原性試験結果を示したものである。代謝活性化を行わない条件下でTA 100およびTA 98両菌株に対して比較的強い変異原性を示すが、TA 100NRに対してはそれ程強くないことから、変異原活性にニトロアレーン類が関与することがうかがわれた。

そこで、上記抽出物を一連の液・液分配処理して中性成分を取り出し、その減圧濃縮物を分取型の高速度液体クロマトグラフィー(固定相: Nucleosil, 移動相: n-ヘキサン→ベンゼン; ステップグラジェント)により、主としてモノニトロアレーン(フラクション1)、ジニトロアレーン(フラクション2)及びそれらの酸化

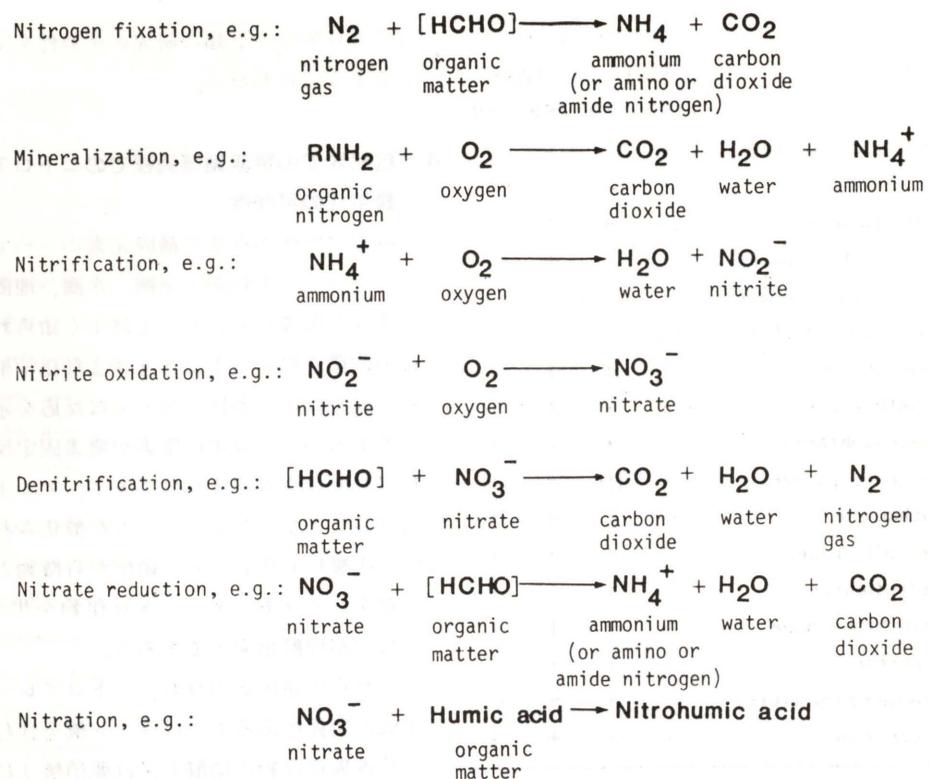


図1 窒素循環過程においておこる主な化学反応

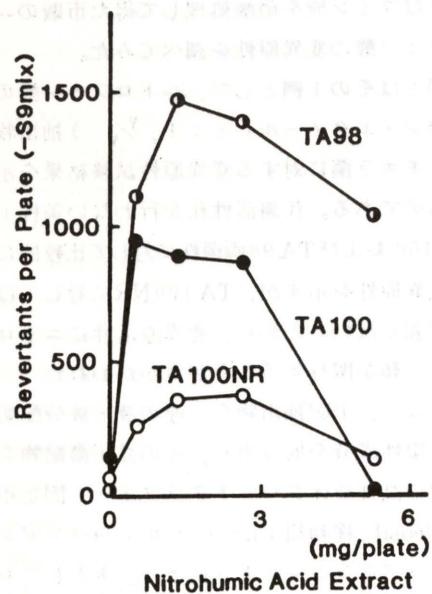


図2 ニトロフミン酸抽出物の変異原性

物等(フラクション3)に大別し、各フラクションの減圧濃縮物をN-PFIDを検出器とするキッピラーガスクロマトグラフィーで分離分析した。図3はその1例を示したものである。モノ硝ロアレン及びジ硝ロアレンに対応するフラクションに数多くのピークの出現が認められている。そして、標準物質の保持時間との対比から、1-nitropyrene, 1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrenes, 2-nitrofluorene, 5-nitroacenaphtheneなどを含む多くの硝ロアレンの存在が示唆された。現在、質量分析方法や還元・高速液体クロマトグラフ法を含む種々の方法で分析を繰り返えし、硝ロアレンの同定をより正確なものとするにつとめているが、上記の実験事実等からみて硝ロフミン酸には硝ロアレン類が含まれているといっ

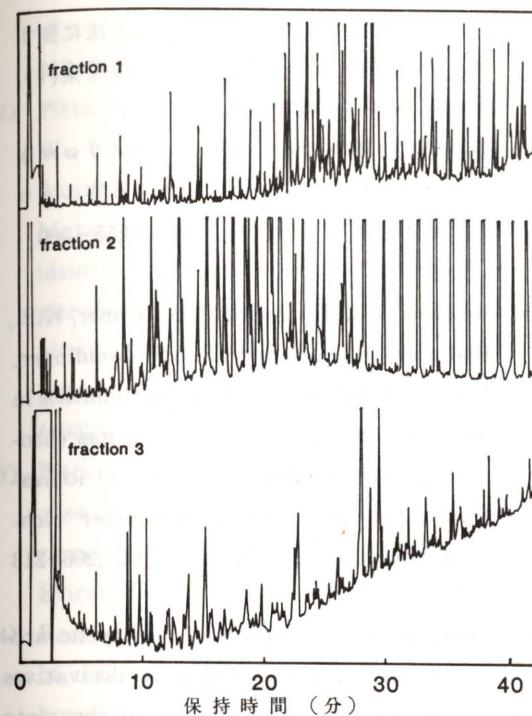


図3 ニトロフミン酸から得た硝ロアレン画分のガスクロマトグラフィー

てもよいであろう。

また、我々は腐葉土や牛糞のdirect mutagenとしての活性は、これらを希硝酸中に70℃、1時間放置するだけでかなり増加することを認めている。したがって、これらの事実は、硝ロアレン類は窒素循環の過程でも一部生成されることを示唆するように思われる。そしてこれらの変異原は生態系における各種微生物等になんらかの影響を及ぼしているのではないかと推測される。

5. おわりに

硝ロアレン類の環境分布は何故広いと考えられるかということ、従来からよく研究されているいわゆる環境汚染としての面からだけでなく、労働衛生や自然界における窒素循環の面からのべた。硝ロアレンには変異原性を

示すものが多く、また最近、発がん性を示すものの種類も増大しつつある。しかしながら、我々を取りまく環境にはおびただしい種類にのぼる硝ロアレン類が存在するが、これらのうち、その変異原性等が検索されたものは極少数にとどまっている。したがって、環境中にはどのような変異原性(又は発がん性)硝ロアレン類が存在し、日常生活を通じて我々はそれらをどの程度体内に取り入れているのか、またそれら硝ロアレン類の主な発生源は何であるかなどを明らかにすることは、発がんに対する硝ロアレン類の寄与を明らかにする上においても、またがん予防対策策定の上においても重要かと思われる。

文 献

- 1) Campbell, R.M. and Lee, M.L.: Capillary column gas chromatographic determination of nitro polycyclic aromatic compounds in particulate extracts, *Anal. Chem.*, **56**: 1026-1030 (1984).
- 2) Du, C.J., Kittelson, D.B. and Zweidinger, R.B.: Measurements of polycyclic aromatic compounds in the cylinder of an operating diesel engine, *SAE Paper No. 840364* (1984).
- 3) Gorse, Jr., R.A., Riley, T.L., Ferris, F.C., Pero, A.M., Skewes, L.M.: 1-Nitropyrene concentration and bacterial mutagenicity in on-road vehicle particulate emissions, *Environ. Sci. Technol.*, **17**: 198-202 (1983).
- 4) Henderson, T.R., Sun, J.D., Royer, R.E., Clark, C.R., Li, A.P., Harvey, T.M., Hunt, D.H., Fulford, J.E., Lovette, A.M. and Davidson, W.R.: Triple-quadrupole mass spectrometry studies of nitroaromatic emissions from different diesel engines, *Environ. Sci. Technol.*, **17**: 443-449 (1983).
- 5) Howard, P.H., Santodonato, J., Saxena, J.,

- Malling, J.E., and Greninger, D.: Investigation of selected potential environmental contaminants—Nitroaromatics, PB-275078, Environmental Protection Agency, Washington, D.C. (1976).
- 6) ILO: Occupational exposure limits for airborne toxic substances, 2nd Ed., Occupational Safety and Health Series No. 37, p.1-290 (1980).
- 7) Jäger, J.: Detection and characterization of nitro derivatives of some polycyclic aromatic hydrocarbons by fluorescence quenching after thin-layer chromatography: Application to air pollution analysis, *J. Chromatogr.*, **152**: 575-578 (1978).
- 8) 河合昭宏, 後藤純雄, 塩崎卓哉, 松下秀鶴: 多環芳香族炭化水素の変異原性に及ぼすディーゼル排ガス暴露の影響, *大気汚染学会誌*, **18**: 496-507 (1983).
- 9) 松下秀鶴, 久松由東, 後藤純雄: 大気不均一反応による変異原生成に関する研究, *環境庁, 昭和55年度環境保全研究成果集(I)*, 9-1~9 (1981), *昭和56年度環境保全研究成果集(I)*, 30-1~8 (1982).
- 10) 松下秀鶴: ニトロアレーン類の生成, 分布, 変異原性, *トキシコロジーフォーラム*, **6**: 356-384 (1983).
- 11) 松下秀鶴, 塩崎卓哉, 藤原美紀, 後藤純雄, 半田隆: キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーによる芳香族ニトロ化合物の分離分析法, *大気汚染学会誌*, **18**: 241-249 (1983 a).
- 12) 松下秀鶴, 久松由東, 後藤純雄, 田辺潔: 大気不均一反応による変異原生成に関する研究, *昭和57年度環境保全研究成果集(I)*, *環境庁*, 9-1~7 (1983 b).
- 13) 松下秀鶴, 久松由東, 西村哲治, 田辺潔, 渡辺征夫: ニトロアレーン系化合物の変異原性, 生成・分解機構及び簡易微量分析方法に関する研究, *昭和58年度環境保全研究成果集(I)*, *環境庁*, 28-1~14 (1984).
- 14) 森田邦正, 深町和美, 常盤寛: ガスクロマトグラフィーによる大気汚染物質芳香族ニトロ化合物の定量, *分析化学*, **31**: 255-260 (1982).
- 15) Newton, D.L., Erickson, M.D., Tomer, K.B., Pellizzari, E.D., Gentry, P. and Zweidinger, R.B.: Identification of nitroaromatics in diesel exhaust particulate using gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry and other techniques, *Environ. Sci. Technol.*, **16**: 206-213 (1982).
- 16) Nielsen, T.: Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitro derivatives in complex mixtures by liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **55**: 286-290 (1983).
- 17) Nielsen, T., Ramdahl, T. and Bjørseth, A.: The fate of airborne polycyclic organic matter, *Environ. Health Persp.*, **47**: 103-114 (1983).
- 18) 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**: 335-355 (1983 a).
- 19) 大西克成: ニトロアレーンの重要性, *日本環境変異原学会第12回大会講演要旨集*, p.151 (1983 b).
- 20) Perderson, T.C., Siak, J-S.: The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts, *J. Appl. Toxicol.*, **1**: 54-60 (1981).
- 21) Pitts, Jr., J.N., Van Cauwenberghe, K.A., Grosjean, D., Schmid, J.P., Fitz, D.R., Belsler, Jr., W.L., Knudson, G.B., and Hynds, P.M.: Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons—Facil formation of mutagenic nitroderivatives, *Science*, **202**: 515-519 (1978).
- 22) Pitts, Jr., J.N., Lokensgard, D.M., Harger, W., Fisher, T.S., Mejia, V., Schuler, J.J., Scorziell, G.M., and Katzenstein, Y.A.: Mutagens in diesel exhaust particulate—identification and direct activities of 6-nitrobenzo(a)pyrene, 9-nitroanthracene, 1-nitropyrene and 5H-phenanthro(4,5-bcd)-pyran-5-one, *Mut. Res.*, **103**: 241-249 (1982).
- 23) Pitts, Jr., J.N.: Formation and fate of gaseous and particulate mutagens and carcinogens in real and simulated atmospheres, *Eviron. Health Persp.*, **47**: 115-140 (1983).
- 24) Ramdahl, T., and Urdal, K.: Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by fused silica capillary gaschromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **54**: 2256-2260 (1982).
- 25) Rosenkrantz, H.S., McCoy, E.C., Sanders, D.R., Butler, M., Kiriazides, D.K. and Mermelstein, R.: Nitropyrenes— isolation, identification and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners, *Science*, **209**: 1039-1043 (1980).
- 26) Salmeen, I., Durisin, A.M., Prater, T.J., Riley, T. and Schuetzle, D.: Contribution of 1-nitropyrene to direct-acting Ames assay mutagenicities of diesel particulate extracts, *Mut. Res.*, **104**: 17-23 (1982).
- 27) Schuetzle, D., Riley, T.L., Prater, T.J., Harvey, T.M. and Hunt, D.F.: Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulates, *Anal. Chem.*, **54**: 265-271 (1982).
- 28) Schuetzle, D.: Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing, *Environ. Health Persp.*, **47**: 65-80 (1983).
- 29) Tejada, S.B., Zweidinger, R.B. and Sigsby, Jr., J.E.: Analysis of nitroaromatics in diesel and gasoline car emissions, *SAE Paper*, No. 820775 (1982).
- 30) 常盤寛: 燃焼産物中におけるニトロアレーンの変異原性, *日本環境変異原学会第12回大会講演要旨集*, p. 153 (1983).
- 31) Tomkins, B.A., Brazell, R.S., Roth, M.E. and Ostrum, V.H.: Isolation of mononitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter by liquid chromatography and determination by gas chromatography with the thermal energy analyser, *Anal. Chem.*, **56**: 781-786 (1984).
- 32) Xu, X.B., Nachtman, J.P., Jin, Z.L., Wei, E.T. and Rappaport, S.M.: Isolation and identification of mutagenic nitro-PAH in diesel-exhaust particulates, *Anal. Chim. Acta*, **136**: 163-174 (1982).

燃焼生成物中ニトロアレーンの変異原性と 1,6-ジニトロピレンの発がん性

福岡県衛生公害センター

徳島大学医学部

黒本 三男・中川 礼子・堀川 和美

乙藤 武志・常盤 寛

大塚 久・大西 克成

1. はじめに

有機物の燃焼過程で生成された種々の芳香族炭化水素 (PAH) は NO_2 , SO_2 , 硝酸等の存在下でニトロ化反応がおこり, 種々のニトロ誘導体 (ニトロアレーン) に変換される。これらのニトロアレーンは一般に石油系燃料が不完全燃焼する際の副産物であるが, 本物質はサルモネラ菌による変異原テストで高い変異原性を示し, しかも燃焼生成物における主要な構成成分であろうと考えられる。

ディーゼル車から排出される粒子状物質は大気汚染の一因と考えられているが, この粒子状物質中には約 100 種以上のニトロアレーンが確認されている (Paputa-peck ら, 1983)。これらのニトロアレーンを分析同定していくと, 変異原性を有する主成分はニトロピレン及びニトロフルオランテン誘導体であることが示唆された (Nakagawa ら, 1983; Salmeen ら, 1984)。またディーゼル排ガスの著しい大気汚染についても, ほぼ同様の結果がえられている Tokiwa ら, 1983)。

一方暖房用灯油ストーブあるいはガス燃焼器具は NO_2 , SO_2 , ホルムアルデヒド, 粒子状物質の排出源であり, 主たる室内汚染源として注目されている (Wade ら, 1975)。この汚染物質中にも変異原物質が存在していることが予測される。

更に検出同定された変異原物質が動物に発がん性を示すか否かも明らかにされねばならない。本報では燃焼生成物中の主要な変異原物質 1-ニトロピレン, 1,6-ジニトロピレン, 2,7-ジ

ニトロフルオレン及び対照として 4-ニトロキノリン-N-オキシドについて, マウスの皮下接種実験を行い, 発がん性を検討した。

2. 灯油不完全燃焼物の変異原性

広く家庭で使用されている灯油ストーブ (開放式石油ストーブ) の燃焼生成物について変異原物質の同定を試みた。生成物の採取方法は図 1 に示した。即ち, 燃焼生成物 (粒子状物質) は冷却装置をとおして, XAD-2 樹脂に吸着捕集した。この XAD-2 樹脂は 2 時間間隔で交換を行うことによって, 樹脂中でのニトロ化合物の生成を最小限にとどめた。捕集した粒子状物質はベンゼン-メタノール (1:1, V/V) を混合溶媒として, 超音波抽出を 3 回繰り返し実施した。

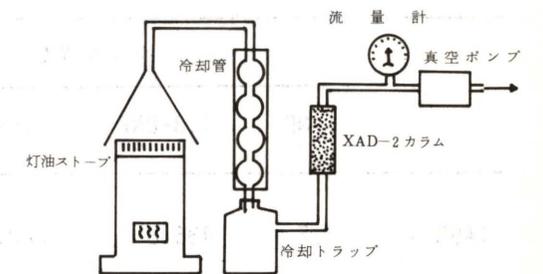


図 1 灯油燃焼生成物の捕集方法

図 2 は粗抽出物の *Salmonella typhimurium* TA 98, TA100, TA 97, TA1538 および *Escherichia coli* WP2uvrA (pKM101) と TA 98/NR, TA 98/1,8 DNP₆ 株に対する S 9 mix 存在下, 非存在下における変異原性の成績である。

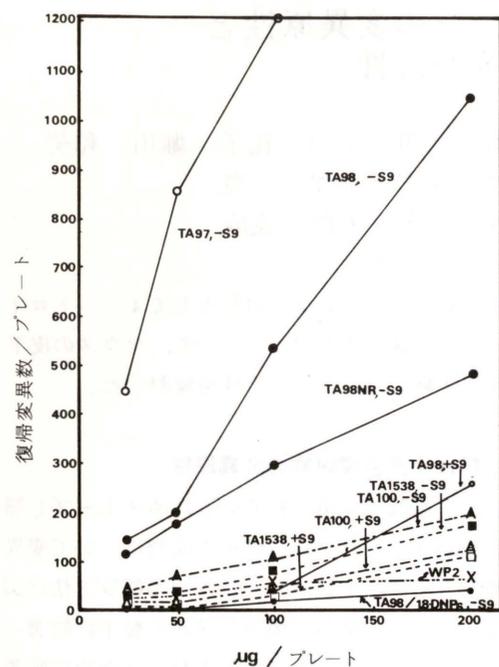


図2 粗抽出物の変異原性
WP2: E. coli WP2uvrA/pKM101-S9

S9 mix非存在下における変異原性はTA98,

表1 *S. typhimurium* TA98, TA97株に対するニトロピレンの変異原性

	復帰変異数 / ng					
	1-NP	1,3-DNP	1,6-DNP	1,8-DNP	Tri-NP	Tetra-NP
TA98	3.7	436.8	229.6	997.5	683.2	34.1
TA97	4.2	1383.3	760.8	2288.3	2430.7	348.0

1-NP, 1-ニトロピレン
1,3-DNP, 1,3-ジニトロピレン
1,6-DNP, 1,6-ジニトロピレン
1,8-DNP, 1,8-ジニトロピレン
Tri-NP, トリニトロピレン
Tetra-NP, テトラニトロピレン

TA97株に対して有意に高く、またニトロレダクターゼ欠損株TA98NR株に対しても突然変異を誘起したが、ジニトロピレン耐性変異株TA98/1,8DNP6株に対して著しく減少していることがわかった。この成績から、粗抽出物中にはニトロアレーン、殊に、ジニトロピレン誘導体の存在が示唆された。TA97株に対する1μgあたりの復帰変異コロニーは12.1, TA98株に対しては5.3の特異活性が認められ、この活性値はすでに報告したディーゼル排ガス抽出物の変異原性に相当している。

一方ニトロピレン各誘導体はDNA塩基対間に挿入することによって、フレームシフト型の突然変異を誘発することが示唆されている(Mermelsteinら,1981)。しかもTA97株はフレームシフト型の変異原を検出する変異株である(Levinら, 1980)。そこでニトロピレン各6種の異性体について、TA98, TA97株に対する変異原性を比較すると、1-ニトロピレンを除いて他の異性体はTA98株よりむしろTA97株に対して変異原性が強いことがわかった(表1)。

3. 変異原物質の同定

(1) 粗抽出物のカラムクロマトグラフィー

粗抽出物中の変異原を精製していくために、濃縮試料(19mg)はイソプロパノールを溶媒として、セファディクスLH₂₀カラム(1.5×40cm)で分画した。図3に示したとおり、各画分はTA98株(-S9 mix)で変異原テストを行った結果、100~110 mlの溶出画分に最も高い変異原性がえられた。この活性画分をプールし、ガスクロマトグラフィー(FTD)で分析すると、最低14種のニトロアレーンを確認することができた(図4)。即ち、検出されたニトロアレーンは、2,4-, 2,6-, 3,4-ジニトロトルエン, m-ニトロビフェニール, 1,5-ジニトロナフタレン, 5-ニトロアセナフテン, 2-ニトロフルオレン, 1,8-ジニトロナフタレン, 9-ニトロアントラセン, 4,4'-ジニトロビフェニール, 2,7-ジニトロフルオレン, 1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレンであった。

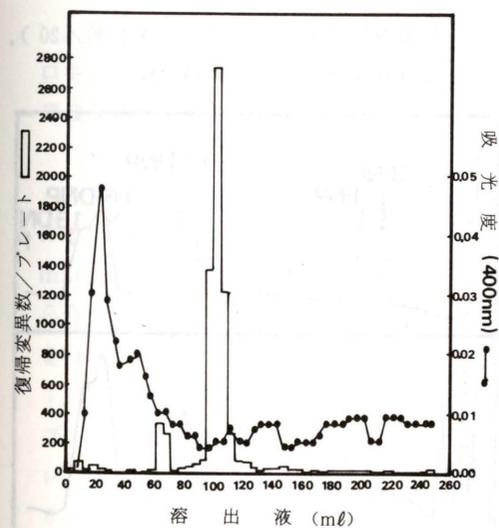


図3 粗抽出物のセファディクスLH₂₀カラムクロマトグラム

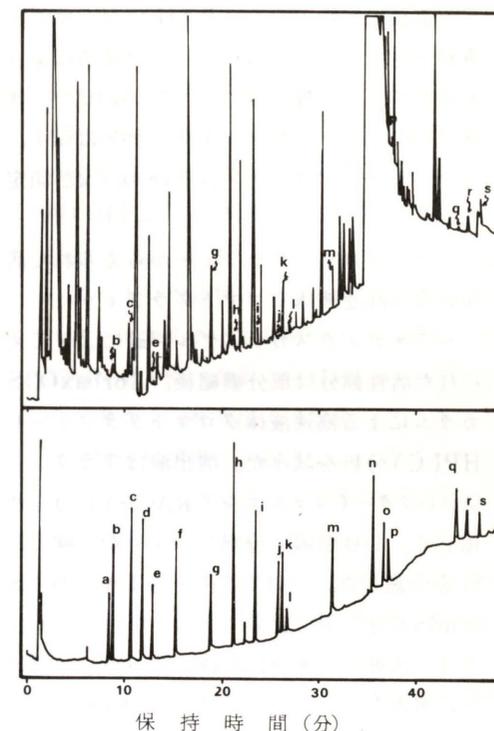


図4 セファディクスLH₂₀活性部分のガスクロマトグラム(FTD)

- a: m-ジニトロベンゼン
- b: 2,6-ジニトロトルエン
- c: 2,4-ジニトロトルエン
- d: 1-ニトロナフタレン
- e: 3,4-ジニトロトルエン
- f: o-ニトロビフェニール
- g: m-ニトロビフェニール
- h: 1,5-ジニトロナフタレン
- i: 5-ニトロアセナフテン
- j: 2-ニトロフルオレン
- k: 1,8-ジニトロナフタレン
- l: 9-ニトロアントラセン
- m: 4,4'-ジニトロビフェニール
- n: 3-ニトロフルオランテン
- o: 1-ニトロピレン
- p: 2,7-ジニトロフルオレン
- q: 1,3-ジニトロピレン
- r: 1,6-ジニトロピレン
- s: 1,8-ジニトロピレン

一方粗抽出物中の主なPAHをシリカゲル薄層クロマトグラフィー、蛍光分光法によって定量すると、抽出物中にベンゾ(a)ピレン含量は0.31, ベンゾ(b)フルオランテンは0.74, ベンゾ(k)フルオランテンは0.46 $\mu\text{g/g}$ が測定された。

(2) カラムクロマトグラフィーからえられた活性画分の高速液体クロマトグラフィー

セファディクスカラムゲル透過によってえられた活性画分は部分濃縮後、Zorbax ODSカラムによる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析を試みた。溶出液はフラクションコレクター(ファルマシア RAC-100)を使用して、30秒間隔で分画し、50分間1.6 μg の試料を分画した。ついで各画分はTA98株でS9 mix非存在下で変異原テストを行った(図5)。活性の大部分は保持時間11~14分の画分に溶出した。この画分はジニトロピレン溶出画分に相当している。そこで、この活性画分中の変異原をガスクロマトグラフィー(ECD)で分析すると、ジニトロピレンの3種異性体(1,3-, 1,6-, 1,8-異性体)が検出された(図6)。しかし、1-ニトロピレン、3-ニトロフルオランテンは検出されなかった。

ガスクロマトグラフィー、HPLCの分析結果から、1,6-, 1,8-ジニトロピレン混合物は粗抽出物あたり、2.1 ppm, 1,3-ジニトロピレンは0.11 ppmであった。

表1の特異活性から、粗抽出物のTA97, TA98株に対する変異原活性への、含有されるジニトロピレンの寄与率を計算すると次のとおりである。

即ち、検出された1,6-, 1,8-ジニトロピレン混合物は2.1 ng/mg (抽出物)である。両物質が1:1で混合していると仮定した場合、混合物のTA98株に対する特異活性は61.36 rev/ng となる。したがって定量値21

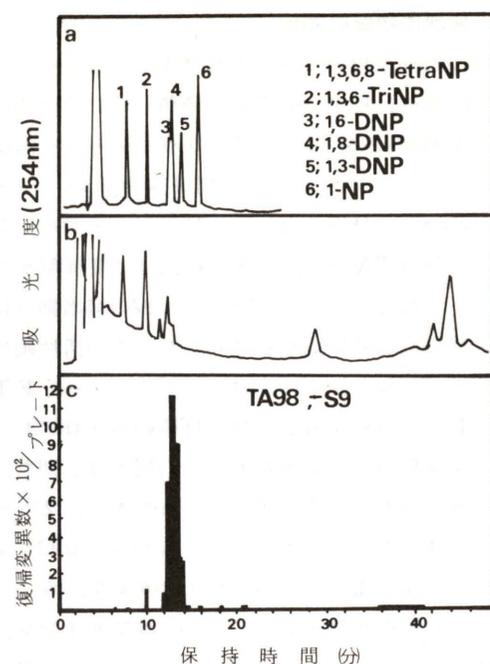


図5 粗抽出物セファディクスLH₂₀活性部分のHPLC分析

a: 標準物質 b: 試料のUV吸収
c: 変異原性

溶出液: アセトニトリル/水(80/20),
カラム: ゴルボックスODS

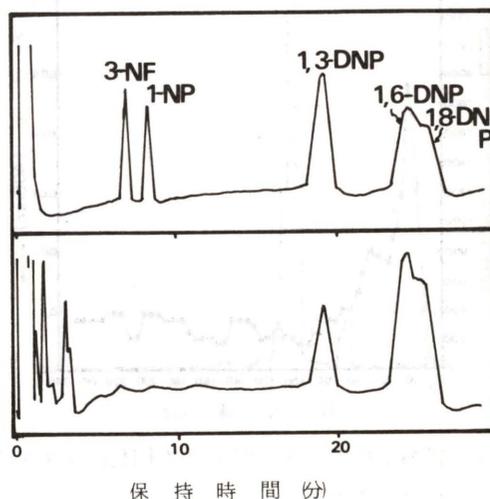


図6 HPLC活性部分のガスクロマトグラム(ECD)

ng/mg を変異原活性で示すと、1,288 rev/mg となる。この活性値は前述の粗抽出物TA98株に対する変異原活性5,300 rev/mg の24%に相当していることになる。またTA97株について同様の計算を試みると、1,6-, 1,8-ジニトロピレンの2.1 ng/mg 量は粗抽出物TA97株に対する変異原活性12,100 rev/mg の26%を寄与していることになる。

一方1,3-ジニトロピレン含有量は0.11 ng/mg である。TA98株に対する1,3-ジニトロピレンの特異活性は436.8 rev/ng , 1,3-ジニトロピレン含有量の活性値は48 rev/mg であり、粗抽出物の変異原活性は5,300 rev/mg であるので、寄与率は0.9%にすぎない。さらにTA97株について計算すると、1.3%の寄与率となった。

これらの成績から、検出されたジニトロピレン変異原性は粗抽出物の活性値の約25~27%を寄与していることになる。

4.1-ニトロピレン, 1,6-ジニトロピレン, 2,7-ジニトロフルオレン及び4-ニトロキノリン-N-オキシドのBALB/cマウス皮下接種実験

1-ニトロピレン, 1,6-ジニトロピレンはRistagnoとShine(1971)及びVollmannら(1937)の方法によってピレンから合成した。合成標品はベンゼンで再結晶化を行い、ついで、トルエン-ヘキサン(5:1, V/V)を溶媒としてシリカゲル薄層プレート上で展開した。ついでニトロピレン相当部分のスポットはかきとり(1,6-, 1,8-ジニトロピレン混合物),トルエンに再浮遊した後Zorbax CNカラム(0.46 $\text{cm i.d.} \times 25\text{cm}$)による分画精製を行った。1-ニトロピレン, 1,6-ジニトロピレンは質量分析計, NMRによって確認同定し、

その純度は99%以上であった。

また2,7-ジニトロフルオレン, 4-ニトロキノリン-N-オキシド(4NQO)はAldrich社製を使用した。2,7-ジニトロフルオレンについてはZorbax ODSカラムを用いHPLCで不純物を除去精製し、高純度標品とした。

各ニトロ化合物は500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合でジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、その0.2 ml を週1回、合計20回BALB/c雄マウス(4週令)の背部皮下に接種した。各ニトロ化合物の接種群は20匹とし、一匹ずつマウスケージに移し、毎週1回体重測定を行った。観察期間は60週間とした。

1,6-ジニトロピレンは接種開始後112日目に最初の腫瘍が接種局所に観察された。表2に示したとおり、20匹中10匹(50%)のマウスに発がん性が認められ、一方4NQOは接種開始105日目に最初の腫瘍が観察され、60週間で18匹中17匹(94.4%)に発がん性が認められた。腫瘍発生の週別経過は図7に示した。接種開始20~40週後に高頻度で腫瘍の発生が認められ、発生頻度は1,6-ジニトロピレンのそれよりやや強いことがわかる。1,6-ジニトロピレン及び4NQO接種群から発生したマウスの腫瘍の組織学的所見はpleomorphic striiform patternが特徴的(図8)であり、悪性線維性組織球腫に一致するものであった。一方、4NQO接種群の組織所見については現在検討中である。なお、1-ニトロピレン, 2,7-ジニトロフルオレンについては腫瘍の発生は認められていない。

5. おわりに

灯油の不完全燃焼物中の変異原物質をカラムクロマトグラフィー, HPLCで精製していくと、変異原性を有する主要成分はジニトロピレンであることが示唆された。抽出物中には1,6-,

表2 BALB/C マウスに対するニトロ化合物の腫瘍発生

実験	化学物質名	総投与量 (mg/mouse)	有効マウス数	皮下腫瘍	
				腫瘍発生マウス数 (%)	発生日
I	1,6-ジニトロピレン	2.0	20	10 (50)	112, 126, 202, 204, 245, 252, 259, 284, 301, 315
	1-ニトロピレン	2.0	20	0 (0)	
	DMSO		20	0 (0)	
II	2,7-ジニトロフルオレン	2.0	20	0 (0)	
	4-ニトロキノリン-N-オキシド	2.0	18	17 (94.4)	105, 126, 126, 154, 175, 182, 182, 189, 203, 211, 211, 224, 224, 231, 245, 259, 265
	DMSO		18	0 (0)	

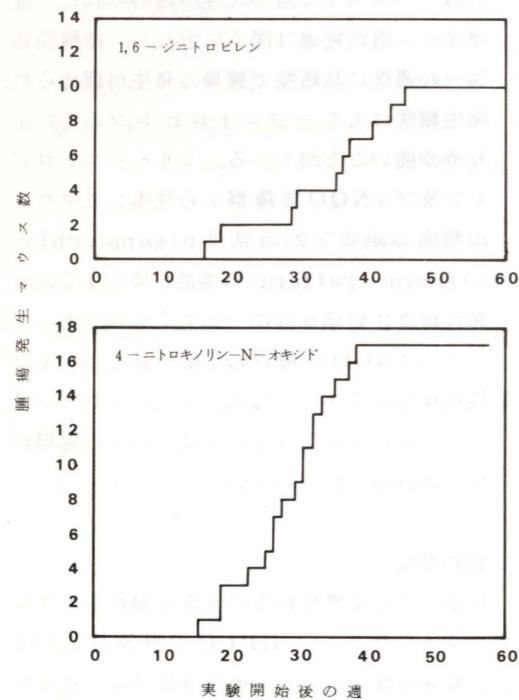


図7 腫瘍発生の週別経過

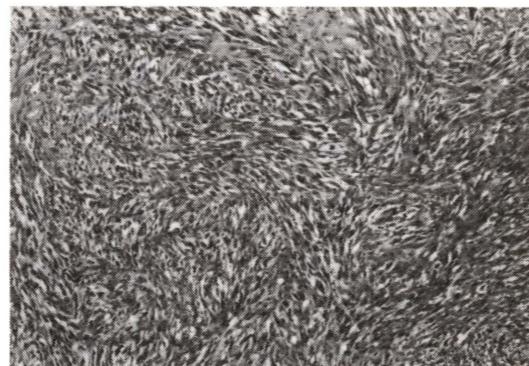


図8 1,6-ジニトロピレン接種マウスに発生した腫瘍の組織像(HE染色, ×120)

1,8-ジニトロピレン混合物が2.1ng/μg, 1,3-ジニトロピレンが0.11ng/μgであった。しかし、種々の灯油燃焼器具から排出される粒子状物質は1時間あたり0.2~0.3μgにすぎない。したがって、有機物の抽出量を30%に見積もると、これらジニトロピレンの1時間あたりの排出量は約

0.2ng以下の微量となる。

一方家庭や事業所に供給されているガス燃焼物についても変異原物質の同定を行った。不完全燃焼によってえられた粒子状物質はサルモネラTA97株に対して高い変異原性を示し、精製同定の結果、灯油燃焼物と類似の結果がえられた。すでに報告したとおり(常盤, 1983), ニトロアレンは、芳香環にNO₂の置換する位置によって、変異原性が異っている。むしろ極性の高いジニトロ誘導体は高い変異原性を示す傾向にある。したがって、ニトロアレンの変異原性を調べると、縮合環数とは無関係に10⁻²~10⁶の強度差の拡がりがあり、これら誘導体の中でジニトロピレンは最も高い変異原性を示している。1-ニトロピレンの発がん性については一部報告されているが(Hiroseら, 1984; Ohgakiら, 1982), 現在では明確ではない。しかし、1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレンについては比較的高い発がん性が予測されている

(Ohgakiら, 1984)。即ち1,3, 1,8-異性体についてはOhgakiら(1984)がF344ラットを使って皮下接種実験を実施した。両物質とも総投与量4mgで、使用した10匹のラットすべてに著明な腫瘍が発生した。組織学的には線維肉腫であった。一方、今回の1,6-ジニトロピレンのマウス(BALB/c)皮下投与実験では、総量2mgを皮下接種したとき50%のマウスに腫瘍が発生した。組織像は悪性線維性組織球腫に一致するものであった。

以上の成績から、1,6-ジニトロピレンの発がん性は4NQOのそれに比較して、やや弱いが、強力な環境化学発がん物質の一つと考えられる。

文 献

- Hirose, M., Lee, M.-S., Wang, C.Y., and King, C.M.: Identification of rat mammary gland tumors by 1-nitropyrene, a recently

recognized environmental mutagen, *Cancer Res.*, **44**: 1158-1162 (1984).

- Levin, D.E., Yamasaki, E. and Ames, B.N.: A new Salmonella tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens, a run of cytosines as a mutational hot-spot, *Mutation Res.*, **94**: 315-330 (1980).
- 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).
- Nakagawa, R., Kitamori, S., Horikawa, K., Nakashima, K. and Tokiwa, H.: Identification of dinitropyrenes in diesel-exhaust particles, Their probable presence as the major mutagens, *Mutation Res.*, **124**: 201-211 (1983).
- Ohgaki, H., Matsukura, N., Morino, K., Kawachi, T., Sugimura, T., Morita, K., Tokiwa, H., and Hirota, T.: Carcinogenicity in rats of the mutagenic compounds, 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene, *Cancer Lett.*, **15**: 1-7 (1982).
- Ohgaki, H., Negishi, C., Wakabayashi, K., Kusama, K., Sato, S. and Sugimura, T.: Induction of sarcomas in rats by subcutaneous injection of dinitropyrenes, *Carcinogenesis*, **5**: 583-585 (1984).
- Paputa-peck, M.C., Marano, R.S., Schuetzle, D., Riley, T.L., Hampton, C.V., Prater, T.J., Skewes, L.M., Jensen, T.E., Ruehle, P.H., Bosch, L.C., and Duncan W.P.: Determination of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in particulate extracts by capillary column gas chromatography with nitrogen selective detection, *Anal. Chem.*, **55**: 1946-1954 (1983).

- 8) Ristagno, C.V. and Shine, H.J.: Ion radicals, xx. Aromatic nitration, A new preparation of 3-nitroperylene and 1-nitropyrene, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**: 1811-1812 (1971).
- 9) Salmeen, I.T., Pero, A.M., Zator, R., Schuetzle, D. and Riley, T.L.: Ames assay chromatograms and the identification of mutagens in diesel particle extracts, *Environ. Sci. Technol.*, **18**: 375-382 (1984).
- 10) Tokiwa, H., Kitamori, S., Nakagawa, R., Horikawa, K. and Matamala, L.: Demon-

stration of a powerful mutagenic dinitropyrene in airborne particulate matter, *Mutation Res.*, **121**: 107-116 (1983).

- 11) 常盤寛: ニトロアレーンの変異原性と発癌性, 代謝, 「癌'83」, **20**: 3-11 (1983).
- 12) Vollman, H., Becker, H., Corell, M. and Streeck, H.: *Ann.*, **53**: 1-159 (1937).
- 13) Wade, W.A. III, Cote, W.A. and Yocom, J.E.: A study of indoor air quality, *J. Air Poll. Control Assoc.*, **25**: 933-939 (1975).

1. はじめに

ヒトの癌の80~90%は、環境中の因子によって発生すると考えられている。環境汚染物質としてその変異原性の強さから最近nitropyrene (NP) 類が注目されており、発癌性も証明されている (Hiroseら, 1984; Ohgakiら, 1982, 1984; Ohnishiら, 1984; Tokiwaら, 1984)。

NPは環境中に広く分布し、自動車排ガス、ゼロックコピーやトナー、給油所排水、使用済エンジンオイル、石油ストーブ燃焼室内空気、焼鳥などのなかに存在していることが明らかになった (Löfrothら, 1980; Manabeら, 1984; Ohnishiら, 1983, 1984; PedersonとSiak, 1981; Rosenkranzら, 1980; Schuetzleら, 1981)。食物中からも検出されたNPは消化管へ入り、腸管内常在細菌叢により一次的に代謝される場合も考えられる。

人の腸管内には、内容物1g当り 10^{11} 個もの非常に多くの細菌があり、その99.9%以上は偏性嫌気性菌が占めている。1人当りでは約 10^{14} 個、100種以上の腸管内細菌がいると言われている。また種々の酵素活性を有し、発癌物質も含めて生体外異物の代謝 (活性化および不活化) に重要な役割を果している (Goldman, 1978; Scheline, 1973)。

本稿では、環境変異原物質1-NPが腸管内の主要構成菌の偏性嫌気性菌により容易に1-aminopyrene (1-AP) へ還元されること、また *Bacteroides fragilis* より nitroreductase (NRase) を精製し、その性状とNP類の代謝活性化にはNRaseが必要なこと、さらに無菌動物と通常動物とを用いて *in vivo* での1-NPの代謝に腸内細菌叢がいかに関与しているかについて述べる。

ニトロピレンの腸管内嫌気性菌による代謝

徳島大学医学部細菌学教室 木内 武美・大西 克成

2. 1-NPの腸管内細菌による代謝

まず、健康人の糞便と1-NPとを混合し、35°C、4日間、嫌気チャンバー内に保温したところ、1-NPの変異原性は6.1%に減少した。次に腸内の常在細菌である *Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *Escherichia coli* それぞれと1-NPとを混合すると、嫌気性菌の前2者では変異原性は減少したが、好気性菌の *E. coli* との保温ではそれほど減少しなかった。

B. fragilis の1-NP NRase活性は、菌体超音波破壊液の100,000 × g, 2時間遠心上清 (S-100) 画分にあった。

1-NPと *B. fragilis* のS-100画分との反応後の代謝産物を薄層クロマトグラフィー、蛍光スペクトル、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) およびマススペクトルによって同定した結果、1-NPの主要代謝産物は1-APであることがわかった (図1)。

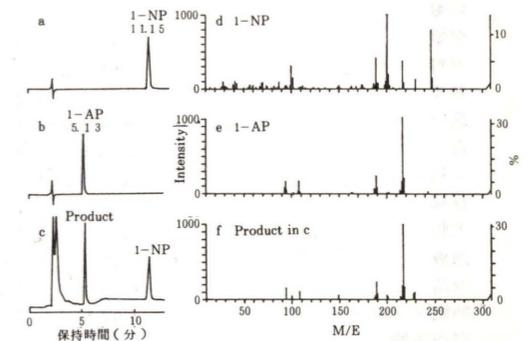


図1 1-nitropyrene (a,d) と 1-aminopyrene (b, e) の標準物質と 1-nitropyrene と *B. fragilis* のS-100画分との反応生成物 (c,f) の高速液体クロマトグラフィー (a-c) とマススペクトル (d-f)。

次に常在細菌叢を形成している嫌気性菌および好気性菌の粗抽出液(9,000 × g, 10分間遠心上清)を用いてNRase活性を測定した。その結果、比活性の高いのは、*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *Fusobacterium mortiferum*, *F. nucleatum*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *Eubacterium lentum*, *E. limosum*, *Peptostreptococcus anaerobius*等の嫌気性菌であり、一般的に好気性菌は低い活性を示した(Kinouchiら, 1982)。これらの菌は人の腸管内の最優勢菌であり、1-NPは容易に腸管内で1-APへ還元されることを示している。

3. 動物体内でのNRase活性の分布

表1 ラット諸臓器, 消化管内容物および腸管内常在細菌のnitroreductase活性

臓器または菌種	酵素活性 (生成 1-AP nmol/h/mg タンパク質)		NADPH/NADH
	NADPH	NADH	
脳	<0.01 (<0.002)	<0.01 (<0.004)	
肺臓	0.11 ± 0.03 (0.025)	0.16 ± 0.01 (0.056)	0.69
心臓	0.22 ± 0.02 (0.051)	0.10 ± 0.004 (0.035)	2.20
肝臓	4.35 ± 0.26 (1.000)	2.85 ± 0.36 (1.000)	1.53
脾臓	0.10 ± 0.01 (0.023)	0.22 ± 0.02 (0.077)	0.46
膵臓	0.10 ± 0.01 (0.023)	0.15 ± 0.01 (0.053)	0.67
腎臓	0.42 ± 0.03 (0.097)	0.28 ± 0.02 (0.098)	1.50
副腎	0.85 ± 0.02 (0.195)	0.73 ± 0.02 (0.256)	1.16
精巣	0.09 ± 0.01 (0.021)	0.07 ± 0.004 (0.025)	1.29
筋肉	0.04 ± 0.01 (0.009)	0.05 ± 0.005 (0.018)	0.80
胃	0.75 ± 0.07 (0.172)	0.39 ± 0.01 (0.137)	1.92
小腸	2.38 ± 0.21 (0.547)	1.18 ± 0.18 (0.414)	2.02
盲腸	0.80 ± 0.18 (0.184)	0.70 ± 0.07 (0.246)	1.14
大腸	1.38 ± 0.06 (0.317)	1.37 ± 0.02 (0.481)	1.01
血液	<0.01 (<0.002)	<0.01 (<0.004)	
血清	<0.01 (<0.002)	<0.01 (<0.004)	
肺胞マクロファージ	<0.03 (<0.007)	<0.03 (<0.011)	
胃内容物	<0.02 (<0.005)	<0.02 (<0.007)	
小腸内容物	1.16 ± 0.16 (0.267)	1.06 ± 0.10 (0.372)	1.09
盲腸内容物	4.79 ± 0.34 (1.10)	4.32 ± 0.28 (1.516)	1.11
大腸内容物	4.24 ± 0.23 (0.975)	3.52 ± 0.20 (1.235)	1.21
<i>Bacteroides fragilis</i>	7.62 ± 0.27 (1.752)	6.09 ± 0.20 (2.137)	1.26
<i>B. thetaiotaomicron</i>	7.62 ± 0.07 (1.752)	7.30 ± 0.18 (2.561)	1.04
<i>Eubacterium limosum</i>	6.01 ± 0.33 (1.382)	5.45 ± 0.59 (1.912)	1.10
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	7.03 ± 0.15 (1.616)	6.90 ± 0.23 (2.421)	1.02
<i>Escherichia coli</i>	0.73 ± 0.14 (0.168)	0.60 ± 0.05 (0.211)	1.22
Aroclor 処理 肝臓	7.00 ± 0.17 (1.609)	3.64 ± 0.23 (1.277)	1.92

芳香族ニトロ化合物のニトロ基還元反応は、一般的によく知られる代謝経路である。しかし、この還元反応によって1-NPは、1-NP → 1-nitrosopyrene → N-hydroxy-1-AP → 1-APと代謝されるが、この過程において見られるN-hydroxy-1-APが変異原性、癌原性の代謝活性体と考えられている(Hawardら, 1983)。そこで1-NPの活性化に関与していると思われるNRase活性の臓器分布をSprague-Dawleyラットを用いて測定した(表1)。各臓器のホモジネートの9,000 × g, 10分間遠心上清を用いて窒素ガス存在下で嫌気的に酵素活性を測定した。空気中で測定すると細菌の場合を除いて活性は著しく低下した。諸臓器の中では、肝臓、小腸および大腸の比活性が高く、大気中の1-NPに暴露されるであろう呼吸器系の臓器(肺、肺

胞マクロファージ)の活性は低かった。消化管内容物(特に盲腸および大腸)にも高い活性がみられたが、これは腸内常在細菌によるものと思われた。(無菌動物の消化管内容物にはNRase活性は検出されなかった。)実際に腸内に常在している嫌気性菌である*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*等の比活性は、肝臓に比べ約1.5倍であった。また、腸管内には0.1%以下しかいない好気性菌の*E. coli*の比活性は嫌気性菌の約 $\frac{1}{10}$ であった。このように生体内代謝においても1-NPの還元腸管内常在細菌が重要な役割を果していることが示唆される。

4. *Bacteroides fragilis*のNRaseの精製

NP類が消化管へ入る可能性が高く、NRase活性が腸管内常在嫌気性菌で高いことから、*B. fragilis*を用いてNRaseの精製を試みた。酵素精製の目的は、①NP類の代謝活性化反応を調べるため、②NRaseの性状、特に基質特異性について調べるため、③NRaseを用いて環境中の混合物に含まれるNP類の定量を行うため等である。サルモネラ菌TA98株でのnitro-

fran耐性菌では1-NPで突然変異が起こりにくくなり、1,8-diNP耐性菌では、1-NPでの変異は親株に比べて約40%は起こるが、1,8-diNPでは2,3%しか起こらずNRaseの特異性が予想された(Rosenkranzら, 1981; RosenkranzとMermelstein, 1983)。

筆者らは、*B. fragilis*のS-100画分を出発材料として硫酸塩折後、DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーを行った。その結果、吸着画分と非吸着画分の両方に2つの酵素活性があらわれた。吸着画分はさらにSephadex G-200ゲルろ過によって2つのピーク(NRase IおよびNRase III)に分かれた。NRase Iはさらにhydroxyapatiteカラムクロマトグラフィーおよびchromatofocusingを行い比活性416倍まで精製した。非吸着画分は、Sephadex 2BとSephadex 6Bのゲルろ過を行い2つの活性ピーク(NRase IIおよびNRase IV)を得た。NRase IIはSephadex 6Bで再クロマトグラフィーを行い比活性178倍まで精製した(表2)。

これら4種のNRaseの基質特異性を変異原性ニトロ化合物の変異原性に与える影響で調べ

表2 *Bacteroides fragilis*のnitroreductaseの精製

精製段階	溶量 (ml)	総活性 (U ^a)	タンパク質 (mg/ml)	比活性 (U/mg of タンパク質)	回収率 (%)	精製 (倍)
粗抽出液	200	13,020	4536	1.4	100	1.0
100,000 × g 遠心上清	200	12,504	3,051	2.1	96.0	1.4
40~60% 硫酸塩折	120	10,864	2,208	4.1	83.4	2.9
DEAE-cellulose						
吸着画分 (I+III)	25	1,988	482	16.5	15.3	11.5
非吸着画分 (II+IV)	65	5,535	813	10.5	42.5	7.3
Sephadex G-200						
(I)	10	1,244	1,91	4.34	9.6	3.02
(III)	5	402	239	3.36	3.1	2.34 ^b
Hydroxyapatite (I)	4.5	1,052	0.69	338.8	8.1	235.3
Chromatofocusing (I)	3.5	881	0.42	599.0	6.8	416.0 ^b
Sephadex 2B (II+IV) fraction	25	3,840	2,92	5.26	29.5	36.5
Sephadex 6B						
(II)	10	2,219	1.50	147.9	17.0	102.7
(IV)	5	494	1.26	78.3	3.8	54.5 ^b
Sephadex 6B (II)	5	1,257	0.98	256.4	9.7	178.1 ^b

a. 1単位は、1-NPから1時間に1nmolの1-APを産生する活性。

b. これらの試料を実験に使用した。

表3 Bacteroides fragilis の nitroreductase の基質特異性

化学物質 (mg/プレート)	残存変異原性(%) (復帰変異集落数) ^a					
	(-) 酵素	S-100	NRase I	NRase II	NRase III	NRase IV
1-NP (0.25)	100 ± 1.1 (427 ± 4.6)	29.3 ± 1.9	18.3 ± 0.4	31.4 ± 1.1	71.7 ± 0.7	63.0 ± 2.1
1,3-diNP (0.002)	100 ± 4.7 (477 ± 22.5)	25.4 ± 1.6	61.4 ± 3.0	35.2 ± 1.8	29.1 ± 2.1	51.6 ± 2.5
1,6-diNP (0.002)	100 ± 0.9 (584 ± 5.3)	25.9 ± 0.4	98.8 ± 0.6	51.9 ± 0.9	36.3 ± 1.1	99.5 ± 1.0
1,8-diNP (0.002)	100 ± 1.8 (706 ± 12.9)	24.9 ± 0.7	90.5 ± 1.5	49.6 ± 3.2	22.1 ± 1.2	92.4 ± 7.8
1,3,6-triNP (0.004)	100 ± 2.5 (382 ± 9.6)	30.1 ± 2.3	83.0 ± 1.2	78.5 ± 1.6	52.4 ± 2.1	91.4 ± 2.6
1,3,6,8-tetraNP (0.025)	100 ± 0.7 (526 ± 3.7)	51.3 ± 1.0	78.7 ± 1.5	81.6 ± 4.1	81.8 ± 1.5	92.4 ± 2.2
2-Nitrofluorene (5)	100 ± 4.2 (635 ± 26.7)	47.2 ± 3.4	73.5 ± 0.7	64.3 ± 2.5	64.6 ± 1.4	78.3 ± 3.3
2-Nitronaphthalene ^b (20)	100 ± 1.9 (186 ± 3.6)	48.4 ± 5.1	144.1 ± 3.3	118.8 ± 6.2	107.5 ± 6.0	97.9 ± 1.8
4-NQO (0.20)	100 ± 2.3 (678 ± 15.4)	10.8 ± 0.5	71.2 ± 2.3	49.4 ± 4.8	97.6 ± 2.1	9.7 ± 1.1
Nitrofurantoin ^b (0.5)	100 ± 5.0 (440 ± 22.1)	24.8 ± 3.0	97.5 ± 2.3	99.3 ± 5.6	103.6 ± 1.8	103.0 ± 3.4
Benzo(a)pyrene ^c (20)	100 ± 3.5 (546 ± 19.2)	84.4 ± 1.7	99.1 ± 5.4	98.2 ± 5.0	97.8 ± 4.4	100.0 ± 3.9
1-AP ^d (10)	100 ± 2.5 (466 ± 11.6)	95.9 ± 3.9	92.3 ± 2.3	90.8 ± 3.8	99.6 ± 5.0	101.5 ± 1.5

a. TA 98 株(-)S9. b. TA 100 株(-)S9. c. TA 100 株(+)S9. d. TA 98 株(+)S9.

た。NRase I は 1-NP を還元して変異原性を著明に減少させた。1,3-diNP には少し影響を与えたが、1,6-diNP および 1,8-diNP にはほとんど影響しなかった。NRase III は diNP の変異原性を非常に減少した。NRase IV は 4-nitroquinoline 1-oxide に特異的であった。しかし NRase II は幅広い基質特異性を示した(表3)。4種のNRase活性は、補酵素(NADPH, NA-

5. NP類のNRaseによるDNAとの結合

Hawardら(1983)は、哺乳動物のNRaseであるxanthine oxidaseを使用して、ヒポキサンチン存在下で³H]1-NPをDNAに結合させた。さらに、そのDNAを酵素的に分解し、生成産物はN-(deoxyguanosin-8-yl)-1-APであることを示し、1-NPの活性体はN-hydroxy-1-APであることを明らかにした。

筆者らは、1-NPに作用するNRase IとdiNPに作用するNRase IIIを使用して補酵素存在下でin vitroで³H]1-NPおよび³H]1,6-diNPとDNAとの結合物を生成した。両化合物ともDNAへの結合は3時間までは直線的で

DH)を必須とし、flavin mononucleotideの添加で活性が上昇した。温度感受性、至適温度、至適pH等においては、4種のNRase活性に相違がみられたが、阻害剤に対する動向はよく似ていた。すなわち、すべての酵素は、Cu⁺⁺, p-chloromercuribenzoic acid (PCMB), o-iodosobenzoic acid, sodium azide等により著しく阻害された(KinouchiとOhnishi, 1983)。

あり、5時間付近からプラトーに達した。1-NPと1,6-diNPの結合度を比べると、1-NPは2本鎖DNAよりも1本鎖DNAによく結合したが、1,6-diNPは1本鎖、2本鎖による結合度の違いはみられなかった。また大腸菌のtRNAへの結合も観察された。この結合は酵素の阻害剤であるPCMB添加で抑制された。もちろんNRaseおよび補酵素なしでは共にDNAに結合しなかった。このことは、NP類の代謝活性化にはNRaseによるニトロ基の還元が必要であることがわかる。

次に反応させる酵素を交換して、すなわち1-NPとNRase III, 1,6-diNPとNRase Iを反応

させると1-NPで結合度は46.2%に、1,6-diNPでは8.9%に減少した。この結果は1-NPと1,6-diNPを活性化する酵素には特異性が存在することを示唆している(表4)。

どの塩基に結合するのかわかるhomopolynucleotideを使って調べたのが表5である。その結果、1-NPはpoly(G)およびpoly(dG)に、

1,6-diNPはpoly(G), poly(X)およびpoly(dG)によく結合した。つまり、NP類の還元活性体は特異的に核酸(DNAおよびRNA)のguanineに結合するものと考えられる。

この1-NP-DNA結合物を酵素的にmononucleosideまで分解し、Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーを行った後、HPLCでの分

表4 種々の条件下での³H]1-nitropyreneおよび³H]1,6-dinitropyreneの大腸菌DNAへの結合

反応条件	結合度(μmol/mol Pヌクレオチド) (%)	
	1-nitropyrene	1,6-dinitropyrene
完全系 ^a	71.2 ± 8.8 (100)	29.47 ± 2.13 (100)
(-)酵素	2.0 ± 1.3 (2.8)	2.1 ± 1.1 (0.7)
(-)NADPH	1.9 ± 0.6 (2.7)	5.9 ± 1.4 (2.0)
(+)PCMB	19.8 ± 1.4 (27.8)	7.38 ± 8.5 (25.0)
2本鎖DNAと下記のものを交換する:		
熱変性(1本鎖)	12.36 ± 7.5 (17.36)	27.87 ± 3.60 (94.6)
<i>E. coli</i> tRNA	5.66 ± 4.6 (7.95)	27.23 ± 1.45 (92.4)
酵素を交換する:		
NRase I	-	2.63 ± 7.5 (8.9)
NRase III	3.29 ± 4.6 (4.62)	-

a. 反応液には、³H]1-nitropyreneまたは³H]1,6-dinitropyrene 40 μM, NADPH 4 mM, glucose-6-phosphate (G-6-P) 5 mM, G-6-P dehydrogenase 1単位/ml, リン酸緩衝液(pH 6.8) 100 mM, 大腸菌DNA(2本鎖) 10 mM, およびBacteroides fragilisのnitroreductase I 21 μg/mlまたはnitroreductase III 239 μg/mlを含む。

表5 ³H]1-nitropyreneおよび³H]1,6-dinitropyreneの活性化酵素反応によるホモポリマーおよびコポリマーへの結合

ポリヌクレオチド	結合度(μmol/mol Pヌクレオチド)	
	1-nitropyrene	1,6-dinitropyrene
poly(A)	5.05 ± 9.2	13.55 ± 16.7
poly(G)	20.03 ± 29.0	54.96 ± 61.2
poly(U)	1.14 ± 2.8	2.70 ± 5.1
poly(C)	1.97 ± 2.0	5.36 ± 9.8
poly(X)	6.51 ± 14.7	52.24 ± 32.9
poly(I)	4.84 ± 12.4	7.67 ± 7.5
poly(dA)	5.65 ± 2.7	9.75 ± 10.4
poly(dG)	24.32 ± 27.3	46.32 ± 29.3
poly(dC)	2.15 ± 0.4	7.59 ± 10.6
poly(dG-dC)	13.99 ± 13.4	22.63 ± 20.5
poly(dG-dC)・poly(dG-dC)	10.43 ± 16.8	24.88 ± 35.1
poly(dG)・poly(dC)	9.86 ± 12.1	23.12 ± 5.3

a. 反応系は表4に示した。

析結果を示したのが図2である。DNAと1-NPの結合物のHPLCパターンでは、保持時間7.25、

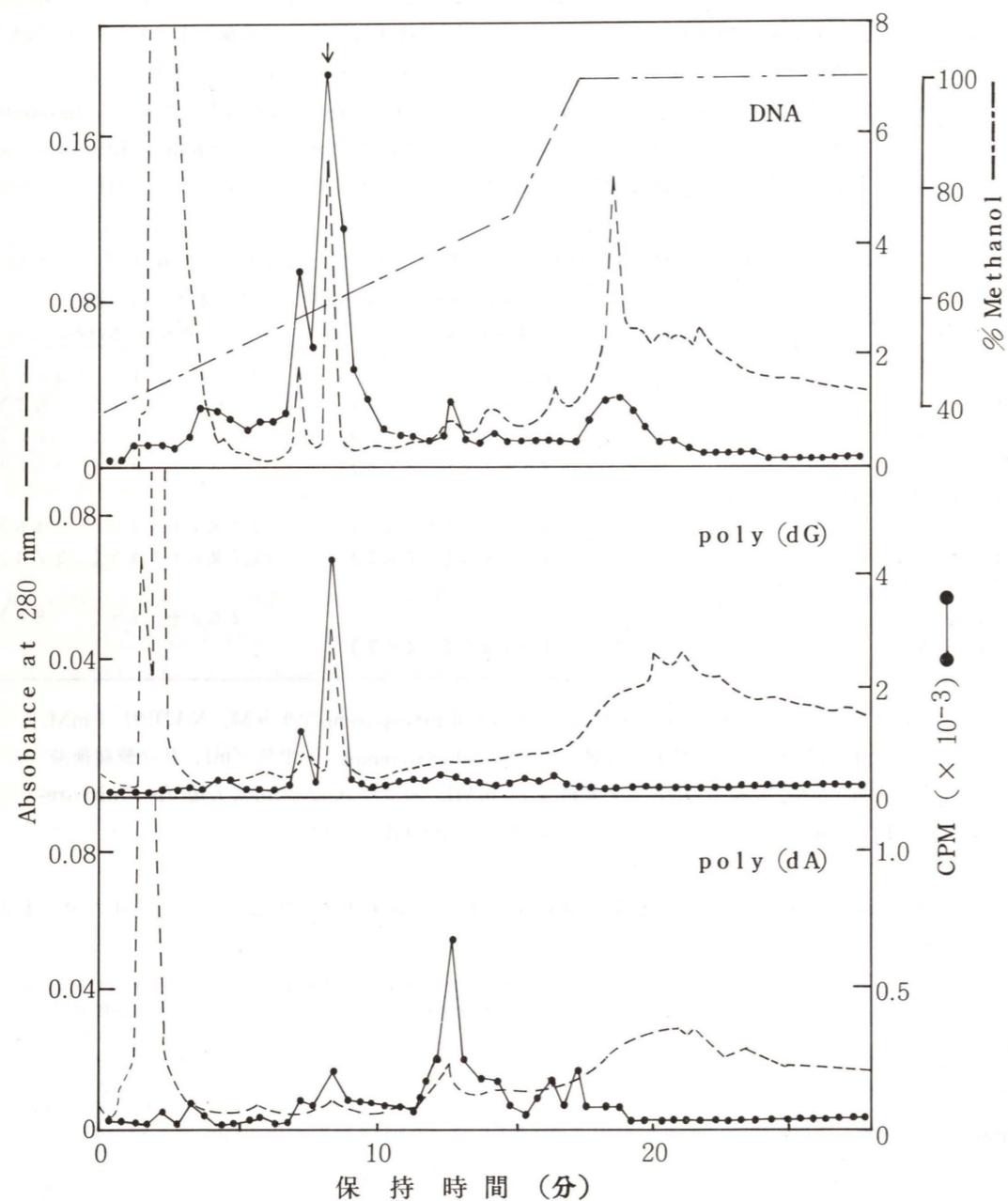


図2 NRase Iによる1-NPとDNA, poly(dG)およびpoly(dA)との結合物の高速液体クロマトグラフィーパターン。各結合物は酵素的に mononucleoside まで分解後 Zorbax ODS カラムを用いメタノール濃度勾配で溶出させた。矢印は、N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-AP の溶出位置を示す。

8.31 および 12.71 分に3本のピークが観察された。同様に処理した poly (dG)-1-NP 結合物および poly (dA)-1-NP 結合物の HPLC パターンとの比較から前2つのピークは poly(dG)-1-NP 結合物に現われ、後ろの小さなピークは poly (dA)-1-NP 結合物に出現した。すなわち、7.25分および8.31分のピークは guanosine 結合物であり、12.71分にみられた小さなピークは adenosine 由来の結合物であると推察される。また、8.31分にみられたメインピークは、N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-AP の溶出位置と一致した。

このように NP 類は NRase によって還元代謝を受けた中間代謝産物ヒドロキシアミノ体が DNA に結合し、変異原性および発癌性を引き起こすものと考えられる。しかし、このようなヒドロキシアミノ体が直接 DNA と結合する場合の他に、もう一段階ヒドロキシアミノ体が他の酵素により代謝され、他の活性体へ変換される場合も考えられる。最近、*Salmonella typhimurium* TA 98 / 1,8-DNP₆ 株で変異原性を発現しないのは、究極活性体へ変換するための esterification enzyme が欠損しているのが原因であるという報告もある (McCoy ら, 1983)。また Saito ら (1983) は、*S. typhimurium* TA 98 株中のアセチル転移酵素がこの究極活性体への変換に関与することを示した。

したがって、NP 類においても、直接ヒドロキシアミノ体が DNA と結合する場合と、ヒドロキシアミノ体の代謝産物が DNA に結合する場合が考えられ、どのように2つの反応がかかりあっているのかを調べることは大切なことだと思われる。

6. 1-NP の生体内代謝への腸内細菌叢の関与

生体内で実際に腸内細菌叢が1-NP代謝に果たす役割を検討するために、無菌動物と通常動物に [³H]1-NP を経口投与し、放射能活性の生

体内分布および代謝産物について検討した。

経口投与後、経時的に断頭屠殺し各臓器の放射能活性を測定すると、通常ラットでは各臓器とも12時間後に最高値を示した後減少していった。無菌ラットでは胃(12時間後)を除いて24時間後に最高値を示した。臓器別に比較すると、両ラットともに肝臓、腎臓および消化管が高い活性を示した。また、消化管内容物、糞便および尿中の放射能活性を調べると、通常ラットでは12時間後に1-NPはすでに結腸、直腸まで移動し、24時間後に大部分が糞便中に排泄された。無菌ラットでは、12時間後に胃、24時間後に盲腸内容物に高い活性がみられた。48時間後の糞便および尿中への放射能活性の排泄は、通常ラットでは投与量の85%が検出されたが無菌ラットでは約50%しかみられず、特に尿中への排泄に大きな差(通常ラットで22%、無菌ラットで8%)がみられた。このことは、腸内細菌叢が1-NPの吸収および排泄に関与していることを示唆している。

糞便を benzene-ethanol (4:1) で超音波抽出し、Ames 法を用いて変異原性を測定した。その結果、通常ラットでは TA 98 株、(+S9) で活性が高く、無菌ラットでは TA 98 株、(-S9) で高い活性を示した。また両ラットとも TA 100 株には高い値を示さなかった。

この抽出物を HPLC で分析すると共に分画し、変異原性の分布を調べた。通常ラットでは、1-AP と 1-NP のピークが観察された。変異原性は、1-AP より保持時間の早い場所(4分付近)に(+S9)で活性化されるものと、1-NP のピークと重なって(-S9)で活性のあるもののがみられた。無菌ラットでは、1-AP のピークが認められず、逆に保持時間6~9分付近に nitrohydroxypyrene 類のピークが観察され、(-S9)での高い活性を示した(図3)。

このように、通常ラットでみられた1-APが無菌ラットで検出されず、逆に無菌ラットでみ

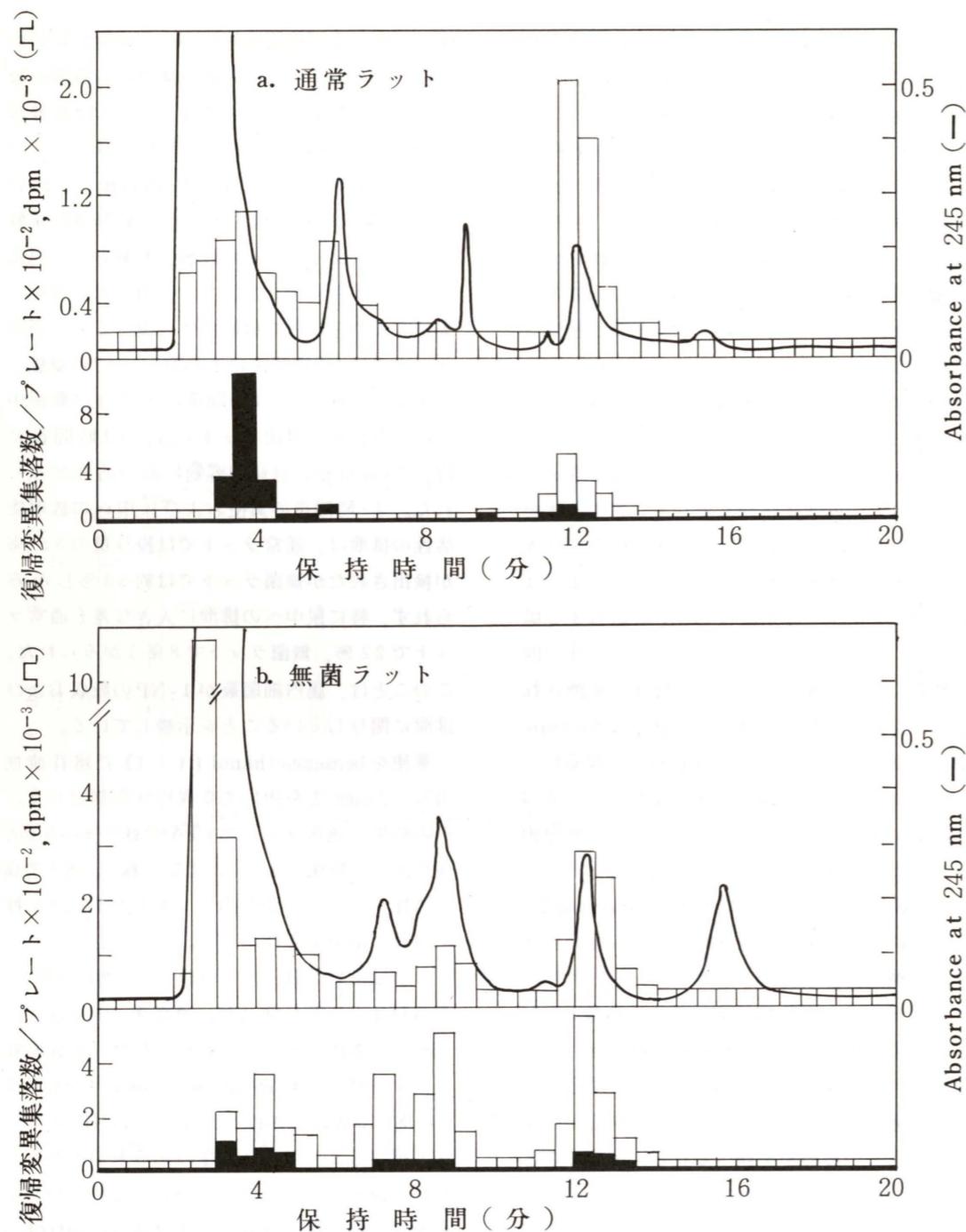


図3 通常ラットおよび無菌ラット糞便抽出物の高速液体クロマトグラフィーパターンと各画分の変異原性活性, Zorbax ODS カラムを用い85%メタノールで溶出させた。

□; TA98株(-)S9, ■; TA98株(+)S9.

られた nitrohydroxypyrene 類が通常ラットで検出されなかったことは, 1-NP は消化管内で腸内細菌叢によって直ちに 1-AP へ還元されており, 生体内へ入った 1-NP はおそらく肝臓で nitrohydroxypyrene 類へ変換されるものと考えられる。

肝臓での代謝産物については, El-Bayoumy と Hecht (1983) が nitrohydroxypyrene 類への変換を報告し, これらの変異原性は 1-NP よりも強いことを示している。

7. おわりに

以上のように腸内細菌叢は直接的には, NP 類のニトロ基の還元作用により代謝活性体への変換を行っている。また, 1-NP の代謝産物の胆汁中へ排泄される抱合体については, 脱抱合作用によって変異原性が上昇する (諸富ら, 1984)。我々の無菌動物を使用した結果より, 経口的に消化管へ入った場合の 1-NP の代謝は, 一次的に腸内細菌叢が関与していることを示した。従って, 両ラットにおける糞便および尿中の代謝産物を同定することにより, 生体内代謝への腸内細菌叢の役割がはっきりするものと思われる。一方, 腸内細菌叢の 1-NP の発癌性を含む毒性の発現への関与を知るために, 代謝産物の変異原性および発癌性を明らかにすることも重要な問題である。

この研究の一部は, 文部省科学研究費補助金, 厚生省がん研究助成金ならびに財団法人日産科学振興財団の援助を受けた。

また, 無菌動物を用いた研究は, 諸富正己, 務台方彦両博士との共同研究の一部である。

文 献

- 1) El-Bayoumy, K., and Hecht, S.S.: Identification and mutagenicity of metabolites of 1-nitropyrene formed by rat liver. *Cancer Res.*, **43**: 3132-3137 (1983).
- 2) Goldman, P.: Biochemical pharmacology of the intestinal flora. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **18**: 523-539 (1978).
- 3) Haward, P.C., Heflich, R.H., Evans, F.E., and Beland, F.A.: Formation of DNA adducts *in vitro* and *Salmonella typhimurium* upon metabolic reduction of environmental mutagen 1-nitropyrene. *Cancer Res.*, **43**: 2052-2058 (1983).
- 4) Hirose, M., Lee, M.S., Wang, C.Y., and King, C.M.: Induction of rat mammary gland tumors by 1-nitropyrene, a recently recognized environmental mutagen. *Cancer Res.*, **44**: 1158-1162 (1984).
- 5) Kinouchi, T., Manabe, Y., Wakisaka, K., and Ohnishi, Y.: Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria. *Microbiol. Immunol.* **26**: 993-1005 (1982).
- 6) Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 596-604 (1983).
- 7) Löfroth, G., Hefner, E., Alfheim, I., and Möller, M.: Mutagenic activity in photocopies. *Science*, **209**: 1037-1039 (1980).
- 8) Manabe, Y., Kinouchi, T., Wakisaka, K., Tahara, I., and Ohnishi, Y.: Mutagenic 1-nitropyrene in wastewater from oil-water separating tanks of gasoline stations and in used crankcase oil. *Environ. Mutagen.*, **6**: in press (1984).
- 9) McCoy, E.C., Anders, M., and Rosenkranz, H.S.: The basis of the insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA98/1,8-DNP₆ to the mutagenic action of nitroarenes. *Mutation Res.*, **121**: 17-23 (1983).
- 10) 諸富正己, 渡辺次男, 桜井稔三, 務台方彦:

化学発癌物質の生体内代謝への腸内細菌叢の関与

ヤクルト本社中央研究所 菌叢生態研究室 諸富 正己・渡辺 次男
桜井 稔三・務台 方彦

- 化学発癌物質の生体内代謝への腸内細菌叢の関与, 環境変異原研究 6: 67-72 (1984).
- 11) Ohgaki, H., Matsukura, N., Morino, K., Kawachi, T., Sugimura, T., Morita, K., Tokiwa, H., and Hirota, T.: Carcinogenicity in rats of mutagenic compounds 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene. *Cancer Lett.*, **15**: 1-7 (1982).
 - 12) Ohgaki, H., Negishi, C., Wakabayashi, K., Kusama, K., Sato, S., and Sugimura, T.: Induction of sarcomas in rat by subcutaneous injection of dinitropyrenes. *Carcinogenesis*, **5**: 583-585 (1984).
 - 13) Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., Tsutsui, H., Otsuka, H., Tokiwa, H., and Otofujii, T.: Nitro compounds in environmental mixtures and foods. *In Short-term Genetic Bioassays in the Evaluation of Complex Environmental Mixtures IV*, edited by Waters, M.D. et al., Plenum Publishing Corp. New York, in press. (1984).
 - 14) 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 Waters, M.D. et al., Plenum Publishing Corp. New York, 527-539 (1983).
 - 15) Pedreson, T.C., and Siak, J-S.: The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts. *J. Appl. Toxicol.* **1**: 54-60 (1981).
 - 16) Rosenkranz, H.S., McCoy, E.C., Mermelstein, R., and Speck, W.T.: A cautionary note on the use of nitroreductase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* for detection of nitroarenes as mutagens in complex mixtures including diesel exhaust. *Mutation. Res.*, **91**: 103-105 (1981).
 - 17) Rosenkranz, H.S., McCoy, E.C., Sanders, D.R., Bulter, M., Kiriazides, D.K.: Nitropyrenes: isolation, identification, and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners. *Science*, **209**: 1039-1043 (1980).
 - 18) 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).
 - 19) Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: Mechanism of activation of proximate mutagens in the Ames' tester strains: The acetyl-CoA dependent enzyme catalyzed DNA binding as the cause of mutagenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**: 141-147 (1983).
 - 20) Scheline, R.R.: Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacol. Rev.*, **25**: 451-523 (1973).
 - 21) Schuetzle, D., Lee, F. S-C., Drater, T.J., and Tejada, S.B.: The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives in mutagenic fraction of diesel particulate extracts. *Inter.J. Environ. Anal. Chem.* **9**: 93-144 (1981).
 - 22) Tokiwa, H., Otofujii, T., Horikawa, K., Kitamori, S., Ohtsuka, H., Manabe, Y., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: 1,6-Dinitropyrene: mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in BALB/c mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**: in press (1984).

1. はじめに

無菌動物と通常の動物とでは、自然発生腫瘍や化学発癌における発癌率や病理組織像に違いがあることから、腸内細菌叢の発癌への関与が指摘されている。しかしその作用機作については cycasin の場合 (Laqueur, 1964) を除いてはほとんどが不明である。

ヒトの腸内には 100 兆を超える細菌が住みついておりその重さは 1 kg にも及ぶ (Moore ら, 1978)。糞便においてはその固形分の 50% 以上は腸内細菌が占めている (Stephen と Cummings, 1979)。腸内細菌叢は多種多様の代謝活性を有しており、生体内で物質代謝を行うことにより、宿主の生理機能に様々な影響を与えている。内因性の物質のみならず医薬品やその他の外因性の化学物質などに対する代謝能をも同時に有しており、腸内細菌による代謝によってその物質の薬効や毒性が大きく変化する例が数多くある。これらの具体例や腸内細菌叢の存在様式などについては最近の解説 (諸富と渡辺, 1984) を参照していただきたい。

今回我々は腸内細菌叢研究の一環として、腸内細菌による環境発癌物質の代謝についての検討を行った。特に、吸収され肝で代謝された後胆汁とともに再び腸管に排泄される発癌物質の代謝産物に対して、腸内細菌がどのように作用しているのかに注目して実験を行った。すなわち種々の環境発癌物質をラットに経口投与した後胆汁を採取しその胆汁の変異原性を Ames 試験を用いて調べた。そして糞便、および腸内細菌菌体抽出液を反応系に添加した場合この変異原性がどう変化するかを調べることで腸内細菌叢の作用をとらえた。ヒト糞便抽出液は植物配

糖体の変異原性を検出するための glucosidase として Ames らのグループによって開発されたものである (Tamura ら, 1980)。腸内細菌は glucosidase のみならず様々な代謝活性を有している。今回のような方法で Ames 試験に糞便抽出液を導入することは、生体内での化学物質代謝へ腸内細菌がどのように関与しているかを研究する上での有用な 1 つの手段であると考えたからである。

この方法での試験の結果、ある種の発癌物質では、これを投与したラットの胆汁は糞便抽出液の添加によってはじめて変異原性を示すようになった。また一方では、糞便抽出液によって変異原性が失われる場合もみられた。最近環境発癌物質として注目されている 1-nitropyrene (1-NP) の場合は、投与ラット胆汁の変異原性は糞便抽出液の添加によって著しく高まった。ここでは 1-NP の場合を中心に、化学発癌物質の生体内代謝に腸内細菌叢がどのように関与しているかを述べることにする。

2. 材料と方法

- (1) 胆汁の採取: F344ラット, 雄, 体重 200 ~ 250 g のものに 1-NP の 4 ~ 50 mg/kg の 0.5 ml のオリーブオイルに懸濁して胃内投与した。対照動物にはオリーブオイルだけを投与した。投与は 1 日 1 回, 3 日間行い, 最後の投与の直後にネブタール麻酔下で胆管ろうを設置し水中の試験管内に胆汁を採取した。胆汁は濾過滅菌した後 -20°C で保存した。
- (2) 糞便抽出液の調製: 3 人の健康成人 (HT, TK, MM) の排便直後の糞便を 9 倍量の 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.0) でホモジナイ

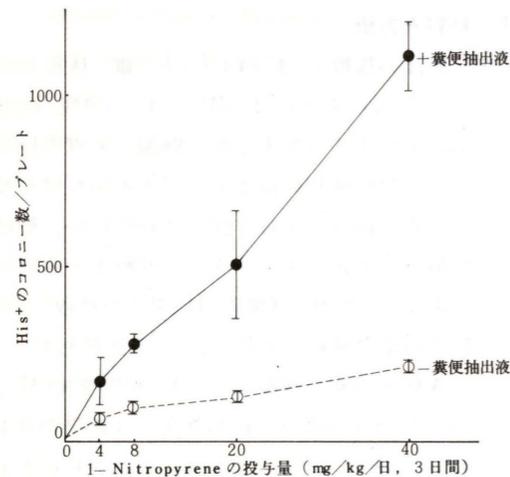
ズした。これを超音波処理した後遠心し、その上澄を濾過滅菌し、 -80°C で保存した。各種腸内細菌の培養菌体についても同様にしてその cell-free extract を調製した。

(3) 変異原性試験： Yahagi ら (1977) の preincubation 法による Ames 試験 (Ames ら, 1975) を用いた。胆汁 0.1 ml を 0.5 ml の嫌氣的に調製した 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.2), および 0.1 ml の糞便抽出液または菌体抽出液と混合し、嫌氣的に 120 分間 37°C で incubate した。これに試験菌である *Salmonella typhimurium* TA 98 または TA 100 を加え、さらに 20 分間 incubate した後通常の方法に従い平板にまいた。48 時間培養後の His⁺ コロニー数を計測した。

表 1 1-Nitropyrene 投与ラットの胆汁の変異原性に対するヒト糞便抽出液の作用

試験条件	糞便抽出液の添加				
	ラットの番号	なし	TK	HT	MM
菌のみ		30 ^a	30	31	33
コントロール胆汁	1	30	39	32	31
	2	37	36	33	33
1-Nitropyrene-胆汁 (50 mg/kg/日)	3	472	3013	2856	2900
	4	390	2820	2498	2172

a) *S. typhimurium* TA 98 の His⁺ コロニー数。その他は図-1 の脚注を参照。



(4) その他： 1-NP は市販のものを精製して実験に用いた。その他の詳細は原著 (Morotomi ら Mutation Res., 投稿中) を参照していただきたい。

3. 結果

(1) 1-NP-胆汁の変異原性： 用いた実験条件下では、糞便抽出液はそれ自身では変異原性を示さなかった。また対照動物の胆汁も糞便抽出液の有無に拘わらず変異原性を示さなかった。これに対し 1-NP 投与ラットの胆汁は胆汁単独でも変異原性を示したが、これは糞便抽出液の添加によって著しく高まった (表 1)。糞便抽出液を 100°C , 10 分加熱するとこの作用は失われた。図 1 は、1-NP

図 1 1-Nitropyrene のラットへの投与量と、胆汁の変異原性との関係。

1 群 2 匹のラットに 1-NP を 0, 4, 8, 20, 40, mg/kg/日, 3 日間投与し胆汁を採取した。胆汁 0.1 ml の *S. typhimurium* TA 98 に対する変異原性を胆汁単独, および糞便抽出液添加で調べた。

の動物への投与量と、その動物の胆汁の変異原性との関係を示したものである。この範囲の投与量では、投与量と胆汁の変異原性に直線関係がみられる。図 2 は 1-NP-胆汁の

量を変化させ、胆汁単独の場合と糞便抽出液添加の場合とでそれぞれ *S. typhimurium* TA 98 と TA 100 に対する反応をみたもので

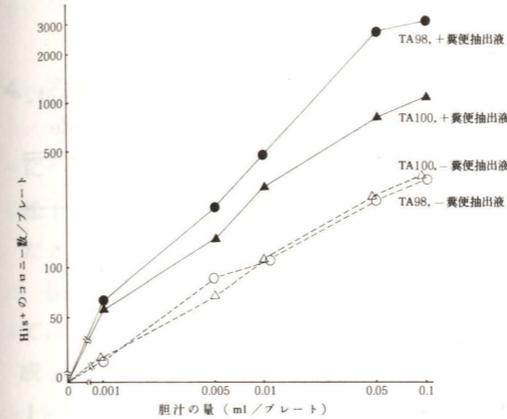


図 2 1-Nitropyrene 投与ラット胆汁の変異原性。1-NP 投与 (50 mg/kg/日, 3 日間) ラット胆汁の *S. typhimurium* TA 98, および TA 100 に対する変異原性を胆汁単独の場合と糞便抽出液を添加した場合とで示した。

表 2 糞便抽出液の β -glucuronidase および aryl sulfatase 活性。

糞便抽出液	β -Glucuronidase		Aryl sulfatase	
	phenol-phthalein-glucuronide	p-nitro-phenyl-glucuronide	phenol-phthalein-sulfate	p-nitro-phenyl-sulfate
TK	1.97 ^a	2.48	— ^b	—
HT	3.47	7.71	—	—
MM	1.17	1.60	—	—

a. $\mu\text{mol/ml/hr}$.
b. 検出限界以下

いずれの検体においても β -glucuronidase 活性が検出されたが aryl sulfatase 活性は検出されなかった。

(4) 腸内細菌菌体抽出液の影響： 1-NP-胆汁の変異原性上昇に対してどのような菌が関与しているかを調べるため、13 属 25 種の腸

ある。糞便抽出液存在下で特に TA 98 に対し強い変異原性を示し、0.001 ml から 0.05 ml/plate の範囲では胆汁量と変異原性との間に直線関係がみられた。

(2) β -Glucuronidase 処理の影響： 1-NP-胆汁は糞便抽出液によって変異原性が高まったが同時に、糞便抽出液との incubation によってその変異原性が酢酸エチル抽出分画に移行するようになった。作用機作として抱合体の脱抱合ということが考えられた。そこで糞便抽出液の代わりに、市販酵素標品である β -glucuronidase と aryl sulfatase をそれぞれ反応系に添加して 1-NP-胆汁の変異原性への影響を調べた。大腸菌由来の β -glucuronidase 標品の添加によって 1-NP-胆汁の変異原性が糞便抽出液添加の場合と同様に上昇したが aryl sulfatase 添加による影響は全くみられなかった。

(3) 糞便抽出液の β -glucuronidase 活性： ここで用いた糞便抽出液の β -glucuronidase 活性と aryl sulfatase 活性を測定した (表 2)。

内細菌から菌体抽出液を調製し、糞便抽出液の代わりにこれを添加して変異原性への影響を調べた。*Bacteroides fragilis* ATCC 12044, *B. vulgatus* ATCC 8482, *B. thetaiotaomicron* ATCC 12290, *Bacteroides sp.* strain 521, *Eubacterium eligens* VPI C15-48,

Peptostreptococcus sp. strain 204, および
Escherichia coli A-5-18 の菌体抽出液に1

-NP-胆汁の変異原性を上昇させる作用が
みられた(表3)。

表3 1-Nitropyrene 投与ラット胆汁の変異原性に対する, 腸内細菌菌体抽出液添加の影響, および
これらの菌体抽出液の β -glucuronidase 活性。

菌 株	1-NP 胆汁の 変異原性 ^a	β -glucuronidase ^b	
		phenolphthalein- glucuronide	p-nitrophenyl- glucuronide
無 添 加	19		
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 12044	171*	4
<i>B. distasonis</i>	VPI 4243	23	- ^c
<i>B. vulgatus</i>	ATCC 8482	56*	-
<i>B. thetaiotaomicron</i>	ATCC 12290	213*	3
<i>Bacteroides</i> sp.	strain 521	165*	8
<i>Eubacterium eligens</i>	VPI C15-48	140*	532
<i>E. aerofaciens</i>	VPI 1003	20	-
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	strain 204	398*	2095
<i>Bifidobacterium breve</i>	YIT 4010	31	-
<i>B. adolescentis</i>	E 194a	29	-
<i>B. bifidum</i>	YIT 4007	23	-
<i>Clostridium difficile</i>	T-2-1	23	-
<i>C. perfringens</i>	PB 6 K	17	-
<i>Fusobacterium varium</i>	ATCC 8501	18	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	W 778	19	-
<i>L. fermentum</i>	YIT 0159	20	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 19433	25	-
<i>S. faecium</i>	ATCC 19434	27	-
<i>S. bovis</i>	ATCC 9809	11	-
<i>S. salivarius</i>	ATCC 9578	19	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	K-42-2	24	-
<i>Escherichia coli</i>	A-5-8	119*	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	A-5-3	23	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C-5-8	24	-
<i>Citrobacter freundii</i>	B-5-1	24	-

a. 1-NP 投与(50 mg/kg/日, 3日間)ラットの胆汁0.0025 mlの*S. typhimurium* TA 98に
対する変異原性をHis⁺コロニー数で示した。自然復帰コロニー数は差し引いてある。*印は
菌体抽出液添加による変異原性の有意な上昇。

b. μ mol/ml/hr

c. 検出限界以下

(5) 菌体抽出液の β -glucuronidase 活性: 上
記の実験に用いた菌体抽出液の β -glucuron-

idase 活性をphenolphthalein-, およびp-
nitrophenyl-glucuronide を基質として測定

した。変異原性上昇作用のみられた菌はすべ
て, 一方の基質, あるいは両方の基質に対
しての β -glucuronidase 活性を有していた
(表3)。変異原性上昇作用のなかった菌は
いずれも β -glucuronidase 活性はなかった。

4. 考察

1-NP の生成, 分布, 変異原性, 発癌性等
については最近の総説(大西と木内, 1983;
松下, 1983; 常盤, 1983)を参照して
いただきたい。

腸内細菌による1-NPの直接的代謝につ
いてはニトロ基が還元され1-aminopyrene が生
成されることが報告されている(Kinouchi ら,
1982; Howard ら, 1983 a)。この反応を
担う酵素として, *Bacteroides fragilis* から1-
nitropyrene nitroreductase が分離精製され,
1-NPとDNAとの結合はこの酵素の存在によ
って行われることが報告されている(Kinouchi
とOhnishi, 1983)。

1-NPの生体内代謝については, Howardら
(1983 b)によれば, 肝で3-, 6-, および
8-hydroxy-1-nitropyrene, および4, 5-di-
hydroxy-4, 5-dihydro-1-nitropyrene に代
謝され, これらはグルクロン酸抱合体として胆
汁に排泄される。上記のhydroxynitropyrene
はいずれも1-NPよりも変異原性が強いと報
告されている(El-BayoumyとHecht, 1983)。

これらの報告と今回の我々の実験結果を考え
合わせると, 糞便抽出液による1-NP-胆汁の
変異原性上昇作用は, 腸内細菌の β -glucuron-
idase による抱合体からのhydroxynitropyrene
の遊離によるものと考えられる。データは示さ
なかったが, 1-NP-胆汁を糞便抽出液, また
は大腸菌由来の β -glucuronidase 標品で処
理した後のエーテル抽出区分をODSカラムで
分画すると, 前記のhydroxynitropyrene の標
品とelution time が一致するピークに強い直接

変異原性がみられている。

1-NP-胆汁の変異原性を上昇させた菌は,
調べた25株のうちの7株で, それらは*Bacte-
roides* (4株), *Eubacterium* (1株), *Pe-
ptostreptococcus* (1株), および*Escheri-
chia* (1株)であった。これらの菌はphenol-
phthalein-glucuronide やp-nitrophenyl-gl-
ucuronide のような合成グルクロン酸抱合体に
対する脱抱合能を有していた。これらの菌によ
る1-NP-胆汁の変異原性上昇作用もやはり
 β -glucuronidase による抱合体からのhydro-
xynitropyrene の遊離によるものと考えられる。
1-NPに対する直接代謝能(1-aminopyrene
への還元)は, 調べた菌のほとんどにその活性
がみられている(Kinouchi ら, 1982; How-
ard ら, 1983)のに対し, 1-NP代謝産物の
抱合体に対する脱抱合能(β -glucuronidase活
性)は, これらの菌種に限られているようである。

1-NPをラットに投与した場合, 無菌動物
では糞便中にhydroxynitropyrene が抱合体と
して検出されるのに対し, 通常の動物ではhy-
droxynitropyrene は遊離体としても検出され
ていない(El-Bayoumy ら, 1983)。データ
は示さなかったが, hydroxynitropyreneをラッ
ト糞便とincubationすると対応するhydroxy-
aminopyrene が生成された。また肝のS9によ
るhydroxynitropyrene の代謝もみられた。1-
NP代謝産物は, 生体内では脱抱合を受けた後
に腸内細菌によってさらに変換されたり, また
は吸収されて肝での代謝を受けるものと思われ
る。

5. おわりに

以上のように腸内細菌叢は体内に入った1-
NPに対して, 直接的には還元作用により, ま
た胆汁中に排泄される抱合体に対しては脱抱合
作用によりその生体内代謝に関与している。腸
内細菌によるこのような代謝が1-NPの発癌性

変異原性芳香族ニトロ化合物の哺乳動物における還元的代謝機構

慶応義塾大学医学部薬理学教室 齊藤 和季・加藤 隆一

1. はじめに

芳香族ニトロ化合物のニトロ基還元反応は、*in vitro* および *in vivo* において一般的に見ら

れる代謝経路である。ニトロ基は、図 1 に示すように、合計 6 電子によって最終的にアミノ基に還元される。この還元的代謝は、同時に芳香

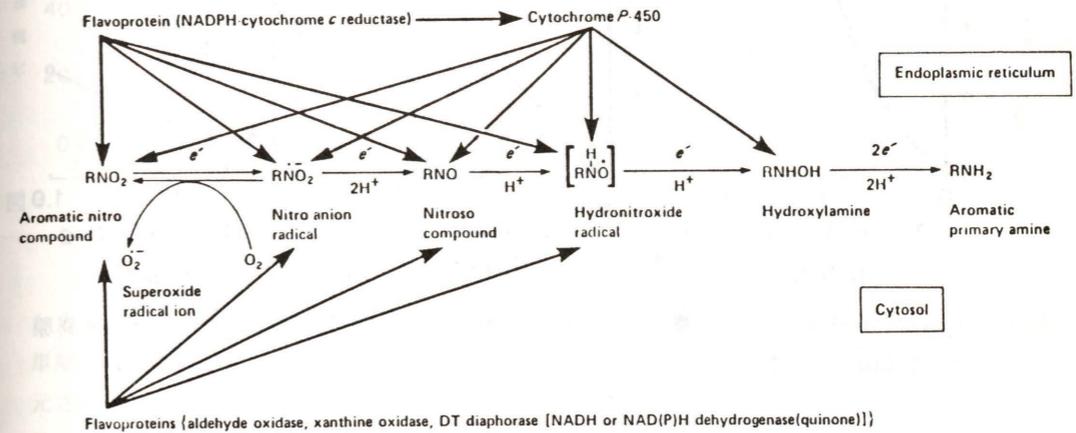


図 1 哺乳動物細胞における芳香族ニトロ化合物の還元。

族ニトロ化合物の毒性発現機構でもある。すなわち、ほとんどの場合、中間体である芳香族ヒドロキシルアミンが、変異原性・癌原性芳香族ニトロ化合物の代謝活性体と考えられている。このようなニトロ基の還元的代謝に関与する哺乳動物細胞内の酵素がいくつか存在することが知られている (Jakoby ら, 1980; Hewick, 1982)。近年、環境変異原として芳香族ニトロ化合物の一種であるニトロアレン類が注目をあつめており、本化合物の代謝的活性化機構は極めて重要な問題と思われる。

本稿では、1-ニトロピレン (1-NP) を含めた変異原性芳香族ニトロ化合物の還元的代謝機構について筆者らの研究を中心に解説する。

2. Trp-P-2 のニトロ誘導体について

筆者らは、強力な変異原物質 Trp-P-2 および Glu-P-1 のアミノ基をそれぞれヒドロキシアミノ基、ニトロソ基、ニトロ基に変換した誘導体を合成し、それらの *Salmonella typhimurium* TA 98 およびニトロ還元酵素欠損株である TA 98 NR に対する直接変異原性を調べた (図 2 Saito ら, 1983 a)。その結果、Trp-P-2, Glu-P-1 の代謝活性体であることが証明されている (Yamazoe ら, 1980) ヒドロキシアミノ体 (以下、N-OH-Trp-P-2, N-OH-Glu-P-1 と略) およびニトロソ体 (NO-Trp-P-2, NO-Glu-P-1) は両株に対して同程度の直接変異原性を有するが、ニトロ体 (NO₂-Trp-P-2, NO₂-Glu-P-1) の TA 98 NR 株に対する直接変異原性は非常に弱いことがわかった。従って、NO₂-Trp-P-2, NO₂-Glu-P-1 はサルモネラ菌体内

に対して総合的にはどのような意味を持つかの判断は今後の研究を待たねばならない。

腸内細菌は我々の腸管内に住みついた単なる寄生体ではなく、生体内での物質代謝への関与を考えると、むしろ臓器の 1 つであるかのような役割をなす場合もある。1-NP の問題に限らず、日常の我々の生活、例えば食事や医薬品の使用などが、腸内細菌叢の作用を通してヒトの健康にいかにか影響しているかさらに研究を続ける必要がある。

文 献

- Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, Y.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome test. *Mutation Res.*, **31**: 347-364 (1975).
- El-Bayoumy, K., and Hecht, S.S.: Identification and mutagenicity of metabolites of 1-nitropyrene formed by rat liver. *Cancer Res.*, **43**: 3132-3137 (1983).
- El-Bayoumy, K., Sharma, C., Louis, Y.M., Reddy, B., and Hecht, S.S.: The role of intestinal microflora in the metabolic reduction of 1-nitropyrene to 1-aminopyrene in conventional and germfree rats and in humans. *Cancer Lett.*, **19**: 311-316 (1983).
- Howard, P.C., Beland, F.A., and Cerniglia, C.E.: Reduction of the carcinogen 1-nitropyrene to 1-aminopyrene by rat intestinal bacteria. *Carcinogenesis*, **4**: 985-990 (1983 a).
- Howard, P.C., Flammang, T.J., and Beland, F.A.: In vivo and in vitro hepatic metabolism of the carcinogen 1-nitropyrene. *Proc. International Symp. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Battele.* (1983 b).
- 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 nitroreductase from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 596-604 (1983).
- Laqueur, G.L.: Carcinogenic effect of cycad meal and cycasin, methylazoxymethanol glycoside, in rats and effects of cycasin in germfree rats. *Fed. Proc.*, **23**: 1386-1388 (1964).
- 松下秀鶴: ニトロアレン類の生成, 分布, 変異原性, *トキシコロジーフォーラム*, **6**: 356-384 (1983).
- Moore, W.E.C., Cato, E.P., and Holdeman, L.V.: Some current concepts in intestinal bacteriology. *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**: s33-s42 (1978).
- 諸富正己, 渡辺次男.: 腸内細菌による化学物質の代謝. *トキシコロジーフォーラム*, **7**: 395-408 (1984).
- 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**: 335-355 (1983).
- Stephen, A.M., and Cummings, J.H.: The microbial contribution to human faecal mass. *J. Med. Microbiol.*, **13**: 45-56 (1979).
- Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A., and Ames, B.N.: Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagen by intestinal flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)*, **77**: 4961-4965 (1980).
- 常盤寛.: ニトロアレンの変異原性と発癌性. *代謝*, **20**: 683-691 (1983).
- Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsu-shima, T., Sugimura, T., and Okada, K.: Mutagenicities of *N*-nitrosoamines on *Salmonella*. *Mutation Res.*, **48**: 121-130 (1977).

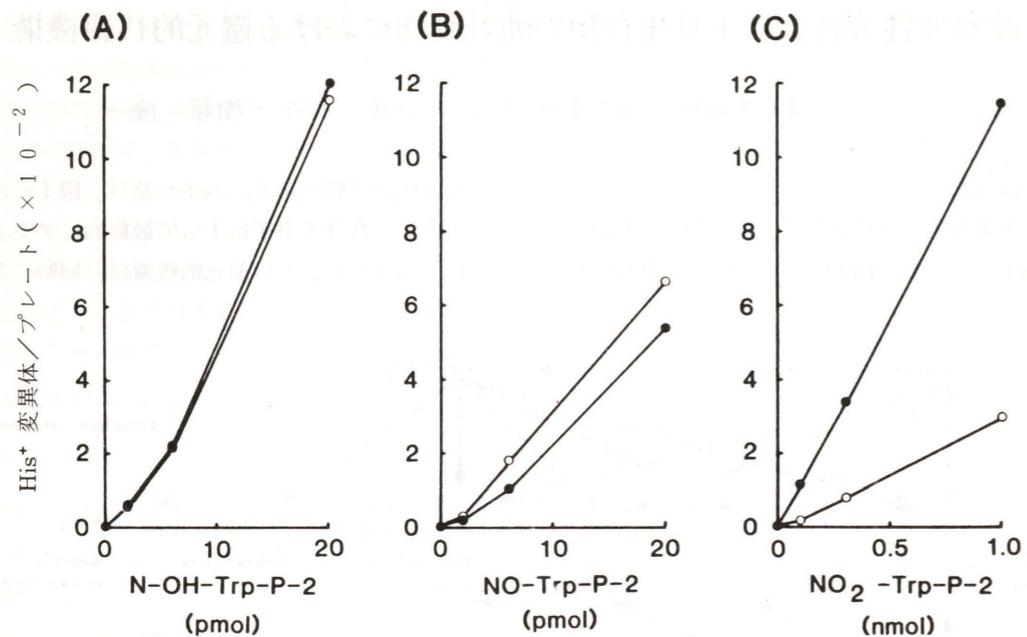


図2 *S. typhimurium* TA 98 (●)と *S. typhimurium* TA 98 NR (○)に対する直接変異原性。(Saitoら, 1983 a)

のニトロ還元酵素によってヒドロキシアミン体に還元され変異原性を発現すると考えられる。また、ニトロ基はグルタチオンなどの細胞内の遊離SH基によって容易にヒドロキシアミノ体に還元されることが示されており(Saitoら, 1983b), この場合もやはりヒドロキシアミノ体が近接活性代謝物と考えられる。そこで、代謝的活性化反応としてのニトロ還元反応を哺乳動物の酵素について実験した。

哺乳動物肝細胞中の芳香族ニトロ還元酵素は、主にミクロゾーム画分と可溶性画分(105,000g上清画分)に存在する。また、これらの酵素活性は一般にNADPHまたはNADHを要求し、酸素によって阻害され、フラビンによって促進される(Katoら, 1969; Katoら, 1978)。そこで、NO₂-Trp-P-2を基質として無処置ラット肝9,000g上清画分(S-9画分)を酵素源として用い、窒素気流下に反応をおこなった(Saitoら, 未発表)。その結果、図3に示す

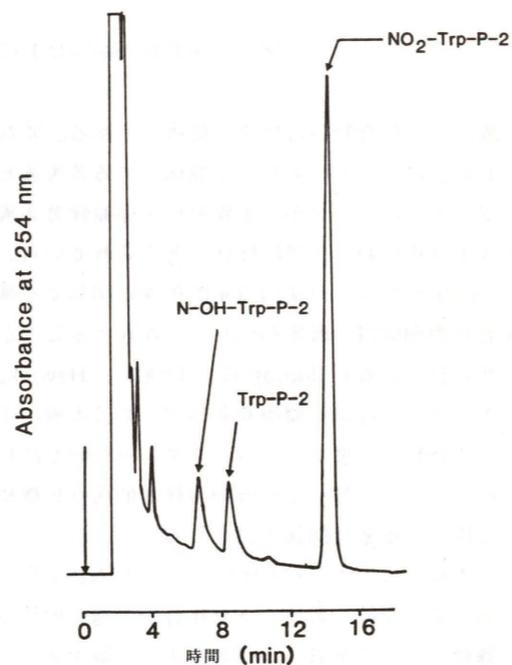


図3 NO₂-Trp-P-2と還元生成物の高速液体クロマトグラフィーによる分離。(Saitoら, 未発表)

ように、N-OH-Trp-P-2とTrp-P-2が還元生成物として得られた。NO₂-Trp-P-2, N-OH-Trp-P-2, Trp-P-2の量的な時間変化(図4)

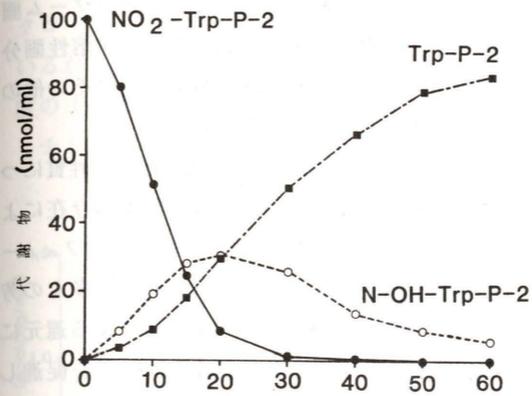


図4 ラット肝S-9画分によるNO₂-Trp-P-2の還元反応。(Saitoら, 未発表)

から、N-OH-Trp-P-2が還元の中間体として単離可能な程度存在し、最終的にTrp-P-2に還元されていることがわかる。芳香族ニトロ化合物を酵素的に還元したとき、*p*-ニトロ安息香酸(Katoら, 1969), ニトロベンゼン(HaradaとOmura, 1980), 4-ニトロキノリン-N-オキシド(Katoら, 1970)の場合のように予想されるヒドロキシルアミンが検出される化合物と、1-ニトロナフタレン, 2-ニトロナフタレン, 4-ニトロビフェニル(PoirierとWeisburger, 1974)の場合のように検出されにくい化合物がある。NO₂-Trp-P-2は、そのヒドロキシアミノ体が検出可能な基質である。次に、各種阻害実験、薬物代謝酵素誘導実験、再構成実験等により、NO₂-Trp-P-2還元酵素活性の諸性質を明らかにした。その結果、この還元反応に関わっている酵素活性は、主にミクロゾーム画分に存在するNADPH-チトクロームP-450還元酵素と可溶性画分に存在するいわゆるニトロ還元酵素によって説明される。また、ヒドロキシアミノ体からアミノ体までの還元反応にはチトクロームP-450が関与しているらしい。この

第2段階の還元反応は、チトクロームcの添加によっても強く促進されることが見出された。フェニルヒドロキシルアミンからアニリンの還元反応もチトクロームP-450によって触媒されるという報告(HaradaとOmura, 1980)とも一致している。

3. 1-NPの還元的代謝

1-NPを含めたニトロアレーン類の毒性発現過程においても、ニトロ基還元反応が重要な代謝的活性化反応であることが示唆されている。そこで、哺乳動物の酵素による1-NPの還元的代謝について酵素的な性質を検討した(Saitoら, 1984 a)。

1-NPをラット肝S-9画分とNADPH, FMNと共に嫌氣的にインキュベートしたところ、生成物として1-アミノピレン(1-AP)のみが得られ、予想される中間体であるN-ヒドロキシ-1-アミノピレンおよび1-ニトロピレンは検出されなかった(図5)。ラットの腸内細菌による代謝でも同様の結果が得られている(Kinouchiら, 1982; Howardら, 1983)。従って、1-NPは1-ニトロナフタレン等の場合と同様に中間体としてN-水酸化体が蓄積せず、さらに還元反応の進んでしまう基質と考えられる。また、芳香族ニトロ化合物を化学的にパラジウム-炭素とヒドラジンで低温で還元した時、通常の基質であるとヒドロキシルアミンの段階で反応を制御できるが(Entwistleら, 1978; Saitoら, 1983 a), 1-NPの場合、N-ヒドロキシアミノピレンと1-APが同時に生成する。一般に化合物の芳香族性が増加すると酸化還元ポテンシャルが減少することが知られており、この場合もヒドロキシルアミンからアミノへの還元がニトロ基還元よりも速くおきるためと考えられる。また、1-APの生成量は1-NPの減少量より少なく、化学量論的に一致していなかった。これは、1-NPの代謝物が反



図5 1-NP とその還元生成物 1-AP の高速液体クロマトグラフィーによる分離。(Saito ら, 1984 a)

表1 1-NP 還元活性のラット肝細胞内分布と阻害(Saito ら, 1984 a)

画 分	1-AP 生成量 (pmol/mg タンパク/min)			
	NADPH	NADH	Hypoxanthine	Acetaldehyde
9,000 × g 上清	132	90	-	-
マイクロゾーム	477	362	-	-

105,000 × g 上清	90	122(100%)	0.56(100%)	23.1(100%)
+阻害剤	-	106(87%) ^a	0.09(16%) ^b	<0.01(0%) ^c

a-c dicoumarol(0.1 mM)(a), allopurinol(0.2 mM)(b), menadione(0.1 mM)(c)を加えた。

表2 ラット肝マイクロゾームにおける 1-NP還元活性(Saito ら, 1984 a)

反応系	1-AP 生成量 (pmol/mg タンパク/min)	(%)
完全系	477	100
+O ₂	28	5.9
+CO	154	21.0
-FMN	31	6.6
+SKF 525 A(1mM)	540	113
+DPEA(0.1mM)	300	62.9
+n-Octylamine(1mM)	317	66.5

応液中のタンパクおよびコファクター等に結合したためと考えられる。

次に、この還元反応を触媒する酵素の細胞内分布を調べた(表1)。活性はマイクロゾーム画分、可溶性画分の両方に見られた。可溶性画分の活性は、アルデヒド酸化酵素およびその他の酵素活性によるものと考えられる。

マイクロゾーム中の 1-NP 還元酵素の性質について詳しく調べた(表2)。酸素の存在によって反応は阻害され、この時 1-NP のフェノール体と考えられるピークが得られた。多くの芳香族ニトロ化合物のマイクロゾームによる還元において見られたように、FMN が反応を促進した。一酸化炭素および、チトクローム P-450 の II 型阻害剤である DPEA, n-オクチルアミン等が阻害効果を示し、I 型阻害剤である SKF-525 A はわずかに反応を促進した。これらの事実は、チトクローム P-450 関与のニトロ還元反応に特徴的である(Sasame と Gillette, 1969)。

次にラットを 3-メチルコラントレン、フェノバルビタール、ポリ塩化ビフェニルなどのチトクローム P-450 の誘導剤で前処置して得たマイクロゾームによる 1-NP の還元活性を測定した(図6)。3種の誘導剤とも 1-NP 還元活性を増加し、この増加の大きさはチトクローム P-450 のそれとよく一致していた(相関係数

0.995)。従って 1-NP の還元酵素はチトクローム P-450 であることが示唆される。3種の誘導剤によってそれぞれ異なる分子種のチトクローム P-450 の誘導されることが知られているが、これらのアイソザイムはそれぞれ同程度の 1-NP 還元活性をもっていると考えられる。チトクローム P-450 の関与をより明らかに

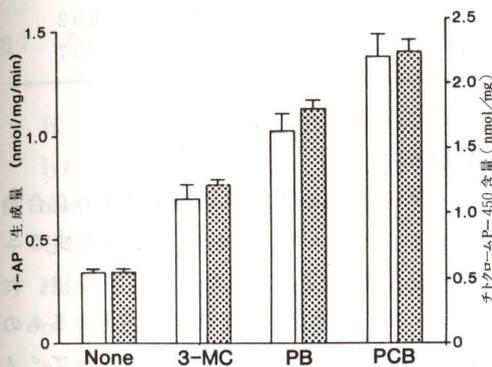


図6 各種チトクローム P-450 誘導剤前処置による 1-NP 還元酵素の誘導。

3-MC 3-メチルコラントレン; PB, フェノバルビタール; PCB, ポリ塩化ビフェニル。□, 1-AP 生成量; ▨, チトクローム P-450 含量(Saito ら, 1984 a)。

するために、NADPH-チトクローム P-450 還元酵素と PCB 前処置ラットより精製した4種の P-450 (Kamataki ら, 1982) による再構成実験をおこなった。その結果、表3に示したように、NADPH-チトクローム P-450 還元酵素だけでは反応は非常にわずかしか進行しないが、P-450 の添加により反応は強く促進された。また、チトクローム c の添加ではまったく促進されなかった。P-450 の分子種による活性の差は酸化反応の場合ほど顕著ではなかった。しかし、4種の P-450 のうち P-448 Id の 1-NP 還元活性が最も高く、このアイソザイ

表3 精製チトクローム P-450 により再構成した系による 1-NP の還元(Saito ら, 1984 a)。

反応系	1-AP 生成量 (pmole/min/ml)
NADPH-チトクローム P-450 還元酵素(0.5unit)	5
+チトクローム P-450 Ic*	85
+チトクローム P-450 Id	101
+チトクローム P-450 IIa	106
+チトクローム P-450 IIb	164
+チトクローム c	5

*それぞれのヘムタンパクは 0.2 nmole/ml の濃度で反応系に加えた。

ムは多環芳香族炭化水素の水酸化活性も最も高い分子種であり、本酵素の基質結合部位の親和性が多環芳香族炭化水素誘導体に対して高いのかもしれない。

次に、各種哺乳動物肝マイクロゾームを用いて、1-NP 還元活性の種差を検討した(表4)。その結果、モルモットの活性が最も強く、ウサギ、ハムスター、マウス、ラットの順であり、これは、肝マイクロゾーム中のチトクローム P-450 の含量とよく相関していた(相関係数 0.928)。Kitamura ら(1983)もウサギ肝マイクロゾーム還元酵素におけるチトクローム P-450 の関与を示唆している。また、ヒトのマイクロゾームを用いて 1-NP 還元活性を調べたところ、実験動物の活性よりも低い、活性を検出できた。

In vivo におけるチトクローム P-450 による 1-NP の還元的代謝を評価することは、酸素阻害などの問題がありむずかしい。しかし、チトクローム P-450 アイソザイムの 1-NP 還元活性の特異性は少ないので、ある程度 *in vivo* において普遍的に還元されているのではと考えられる。また、代謝活性体と考えられる

表4 ミクロゾーム中の1-NP還元酵素の種差(Saitoら, 未発表)

動物種	1-AP生成量 (pmol/mg/min)	cytochrome P-450 含量(nmol/mg)
ラット (オス, n=5)	338 ± 18	0.55 ± 0.03
ウサギ (オス, n=3)	1,280 ± 230	2.25 ± 0.06
モルモット (オス, n=5)	1,348 ± 74	1.72 ± 0.08
ハムスター (オス, n=4)	817 ± 139	0.79 ± 0.03
マウスCDF ₁ (オス, n=6)	593 ± 97	1.01 ± 0.07
(メス, n=6)	670 ± 53	0.91 ± 0.04
C57BL/6N(オス, n=3)	399 ± 64	0.46 ± 0.02
DBA/2N (オス, n=3)	383 ± 47	0.49 ± 0.07

N-ヒドロキシ-1-アミノピレンは非常に反応性に富んでおり(Howardら, 1983; Saitoら, 未発表), わずかに生成しても有効に生体成分を修飾し毒性を発現すると推測される。

4. ニトロピレン類および関連化合物によるDNA一本鎖切断

In vivo の系により近い実験系として, 哺乳動物の培養細胞であるチャイニーズハムスターV79を用いニトロピレン類によるDNA一本鎖切断活性を検討した(Saitoら, 1984b)。その結果, 細菌および培養細胞に対する変異原性が1-NPよりも強力な1,6-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレンの方がDNA切断活性は1-NPより弱かった。これはマウス単離肝細胞を使った実験とも一致している(MøllerとThorgeirsson, 1984)。また1-NPの代謝活性体と考えられるN-ヒドロキシ-1-アミノピレンに至る中間体の1-ニトロソピレンも1-NPよりDNA切断活性が低かった。これは, 1-ニトロソピレンはグルタチオンのようなSH化合物と容易に付加体を生成し1-アミノピレンに還元されることが*in vitro*の実験により示され, このことが細胞内においても解毒機構として働いたためと思われる。

5. おわりに

1-NPをはじめとする芳香族ニトロ化合物は, チトクロームP-450をはじめとするニトロ還元酵素によって還元的代謝をうけ, ヒドロキシアミノ体となって毒性を発現するものと考えられる。しかし, このヒドロキシアミノ体もさらに他の酵素, 特に抱合酵素によって代謝活性化され, より反応性に富んだ化学種となって生体成分を修飾する可能性がある。著者らは, *S. typhimurium* TA 98の可溶性画分に存在するアセチル転移酵素がある種の芳香族ヒドロキシルアミンを究極活性体で代謝的活性化しており, この酵素がこれらの化合物の変異原性発現に直接関わっていることを明らかにした(Saitoら, 1983c)。最近本酵素の部分精製にも成功している。また, 哺乳動物肝可溶性画分にも同様の活性が存在することを見い出し, 本酵素の諸性質についても検討している(図7)。これらの, いわば第2段階の代謝活性化系が1-NPなどのニトロアレン類の毒性発現にどのように関わっているか, きわめて興味深い問題であり, 今後検討されなければならないと考えられる。

文 献

1) Entwistle, I.D., Gilkerson, T., Johnstone,

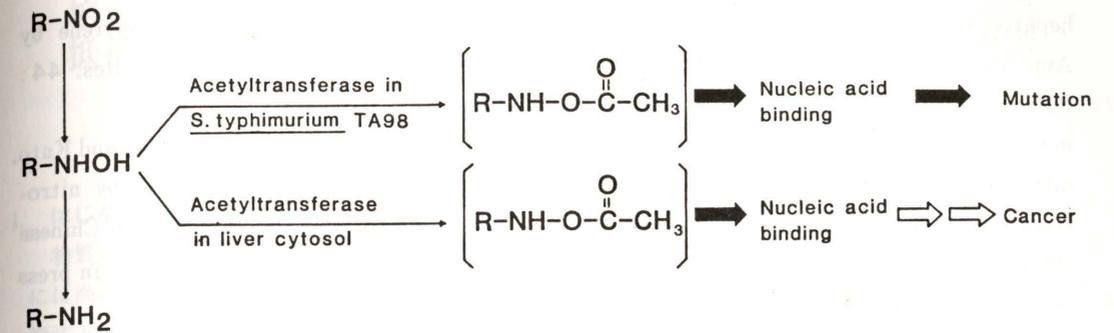


図7 芳香族ニトロ化合物の可能な代謝的活性化経路。

- R.A.W., and Telford, R.P.: Rapid catalytic transfer reduction of aromatic nitro compounds to hydroxylamines. *Tetrahedron*, **34**: 213-215 (1978).
- Harada, N. and Omura, T.: Participation of cytochrome P-450 in the reduction of nitro compounds by rat liver microsomes. *J. Biochem.*, **87**: 1539-1554 (1980).
 - Hewick, D.S.: Reductive metabolism of nitrogen-containing functional groups, *in* *Metabolic Basis of Detoxication*, Academic Press, pp. 151-166 (1982).
 - Howard, P.C., Beland, F.A., and Cerniglia C.E.: Reduction of the carcinogenic 1-nitropyrene to 1-aminopyrene by rat intestinal bacteria *Carcinogenesis*, **4**: 985-990 (1983).
 - Jakoby, W.B.: *Enzymatic Basis of Detoxication*, Academic Press, (1980). 加藤隆一, 佐藤哲男, 高仲正, 鎌滝哲也, 監訳 薬物の解毒・活性化機構の生化学 I, II. 清至書院 (1983).
 - Kamataki, T., Yoshizawa, H., Ishii, K., and Kato, R.: Separation and purification of multiple forms of cytochrome P-450 from PCB-treated rat and human livers, *in* *Microsomes, Drug Oxidations and Drug Toxicity*, Japan Science Society Press and Wiley-Interscience, pp. 99-100 (1982).
 - Kato, R., Iwasaki, K., and Noguchi, H.: Reduction of tertiary amine N-oxides by cytochrome P-450, mechanism of the stimulatory effect of flavins and methyl viologen. *Molec. Pharmacol.*, **14**: 654-664 (1978).
 - Kato, R., Oshima, T., and Takanaka, A.: Studies on the mechanism of nitro reduction by rat liver. *Molec. Pharmacol.*, **5**: 487-498 (1969).
 - Kato, R., Takanaka, A., and Oshima, T.: Characteristics of nitro reduction of the carcinogenic agent 4-nitroquinoline N-oxide. *Biochem. Pharmacol.*, **19**: 45-55 (1970).
 - Kinouchi, T., Manabe, Y., Wakisaka, K., and Ohnishi, Y.: Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria. *Microbiol. Immunol.*, **26**: 963-1005 (1982).
 - Kitamura, S., Narai, N., Hayashi, M., and Tatsumi, K.: Rabbit liver enzymes responsible for reduction of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**: 776-779 (1983).
 - Møller, M. and Thorgeirsson, S.S.: Genotoxicity of nitropyrenes in primary mouse

- hepatocytes and rat hepatoma cells. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 25: 110 (1984).
- 13) Poirier, L.A. and Weisburger J.H.: Enzymatic reduction of carcinogenic aromatic nitro compounds by rat and mouse liver fraction. Biochem. Pharmacol., 23: 661-669 (1974).
- 14) Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: Syntheses of hydroxyamino, nitroso and nitro derivatives of Trp-P-2 and Glu-P-1, amino acid pyrolysate mutagens, and their direct mutagenicities towards *Salmonella typhimurium* TA98 and TA98NR. Carcinogenesis, 4: 1547-1550 (1983 a).
- 15) Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: Activation and detoxication of N-hydroxy-Trp-P-2 by glutathione and glutathione transferases. Carcinogenesis, 4: 1551-1557 (1983 b).
- 16) Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: Mechanism of activation of proximate mutagens in Ames' tester strains: The acetyl-CoA dependent enzyme in *Salmonella typhimurium* TA98 deficient in TA98/1,8-DNP₆ catalyzes DNA-binding as the cause of mutagenicity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 116: 141-147 (1983 c).
- 17) Saito, K., Kamataki, T., and Kato, R.: Participation of cytochrome P-450 in reductive metabolism of 1-nitropyrene by rat liver microsomes. Cancer Res. 44: 3169-3173(1984 a).
- 18) Saito, K., Mita, S., Kamataki, T., and Kato, R.: DNA single-strand breaks by nitropyrenes and related compounds in Chinese hamster V79 cells. Cancer Lett : in press (1984 b).
- 19) Saito, K., et al.: Metabolic reduction of the nitro derivative of Trp-P-2. in preparation.
- 20) Sasame, H.A. and Gillette, J.R.: Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes. Molec. Pharmacol., 5: 123-130 (1969).
- 21) Shinohara, A., Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: DNA binding of N-hydroxy-Trp-P-2 and N-hydroxy-Glu-P-1 by acetyl-CoA dependent enzyme in mammalian liver cytosol. submitted. (1984).
- 22) 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).

培養チャイニーズハムスター肺細胞におけるジフテリア毒素抵抗性細胞出現を指標とした変異原物質、発がん物質の検索

国立がんセンター研究所血清部 寺田 雅昭

1. はじめに

物質の変異原性の有無と発がん性の有無の間には高い相関関係があり、発がん物質の短期検策法としてはサルモネラ菌を用いた変異原性テストが広く用いられている (McCann et al., 1975; Sugimura et al., 1976, Purchase et al., 1976; Magao et al., 1978)。しかし、哺乳動物細胞は細菌とはクロモゾームの構造、DNA損傷修復、代謝、輸送などの点でことなっている。我々は培養チャイニーズハムスター肺 (CHL) 細胞におけるジフテリア毒素抵抗性 (DT^r) 細胞出現を指標とする哺乳動物細胞を用いた変異原物質、発がん物質の検索法を確立し、この系を用いて種々の環境中の変異原、発がん物質の検索を行って来た。(Nakayasu et al., 1982; Nakayasu et al., 1983a Nakayasu et al., 1983b; Terada et al., 1983; Nakasato et al., 1984)。本稿ではこの系を紹介すると共に現在までこの系で得られた結果についてまとめて述べる。

ジフテリア毒素は分子量 62,000 の蛋白質であり A と B のフラグメントよりなる。ジフテリア毒素は毒素感受性のある細胞の細胞膜レセプターを介し、細胞内に入り、elongation factor 2 (EF-2) を ADP-リボシル化する。ADP-リボシル化された EF-2 はその活性を失い、その結果蛋白合成は停止し、細胞に致死効果を与える (Pappenheimer, 1977; Van Ness et al., 1980)。

2. 変異原性の測定法

エチールメタンサルホネイト (EMS), メチールメタンサルホネイト (MMS), メチールニトロソウレア (MNU), N-メチル-N'-ニトロ-N-

nitrosoguanidine (MNNG) などアルキール化剤と CHL 細胞を 3 時間培養した後、細胞を変異原を含まない培養液で 7 日間培養する。その後、細胞をジフテリア毒素を 0.1 Lf/ml の濃度で含む培養液で更に 7 日間培養し、ジフテリア毒素存在下でもコロニーを形成する DT^r 細胞のコロニー数を測定するとアルキール化剤の濃度に依存して、DT^r 細胞数の増加を認めた。ジフテリア毒素は 0.01 Lf/ml の濃度で CHL 細胞に致死効果を示すことが予備実験でわかっており、通常 0.1 Lf/ml の濃度のジフテリア毒素を用いることにしている (Nakayasu et al., 1982)。ベンツピレン (BP) ジメチールニトロソアミンが変異原性をもつためには S9 mix による代謝活性化が必要である。また、S9 の濃度も物質によりその至適濃度が異なるため、夫々の物質に関して、至適濃度を予め求める必要がある。至適濃度の S9 mix の存在下では BP も DMNA もその濃度に依存して DT^r 細胞の数が増加する (Nakayasu et al., 1983a)。

CHL 細胞が DT^r 細胞になるには大別して細胞膜のレセプターの変化と EF-2 そのものの変化によるものとの 2 つの形式が考えられる。変異原物質と培養することにより、得られた DT^r 細胞がこのいずれによるものかを明らかにするために EMS 処理により得られた DT^r 細胞より EF-2 を含む細胞分画をとり、試験管内でジフテリア毒素による EF-2 の ADP-リボシル化反応を行った。その結果、もとの CHL 細胞の EF-2 はジフテリア毒素により ADP-リボシル化されるのにこの系で得られた DT^r 細胞の EF-2 はジフテリア毒素により ADP-リボシル化されないことが明らかとなった (Nakayasu et al.,

1982)。この結果は我々が用いている測定系で得られたDT^F細胞の少くとも大部分は細胞膜のジフテリア毒素に対するレセプターの変化によるものではなく、EF-2そのもの変化によるものであることを示している。

培養哺乳動物細胞を用いた変異原物質検索法としては従来チオグアニン抵抗性細胞、ウァバイン抵抗性細胞出現を指標とする方法が用いられる。そこでDT^F細胞出現を指標とする方法とこれらの方法とを比較した。CHL細胞を種々の濃度のEMSに3時間曝露したのち、DT^F細胞、チオグアニン抵抗性細胞、ウァバイン抵抗性細胞の数を測定した。同じ濃度のEMSで出現するDT^F細胞はチオグアニン抵抗性細胞に比較して3~5倍、ウァバイン抵抗性細胞に比較して20~30倍多く、このDT^F細胞出現を指標とする方法が秀れていることが明らかとなった。またDT^F細胞出現を指標とする方法では特殊な培養液を必要とせず、またジフテリア毒素も安く入手可能であるという利点もある。

上述の如く、CHL細胞のDT^F細胞出現を指標とする変異原物質検索法を確立した後、環境中に存在する種々の未知、既知の変異原物質、発がん物質の変異原性を測定した。

3. ニトロピレンの変異原性

ニトロピレンはジーゼルエンジン、火力発電などにより産生され、我々の環境中には広く存在していると考えられる。ジニトロピレンのサルモネラ菌TA 98に対する変異原性は特に強く、S9による活性化を必要としない変異原物質の中では1,8-ジニトロピレンはもっとも強い変異原性を有する(Rosenkranz et al., 1980)。種々のニトロピレンをS9 mixなしの条件下でCHL細胞と培養し、DT^F細胞の出現を測定した。その結果、1,6-ジニトロピレンの変異原性がもっとも強く、つづいて、1,8-ジニトロピレン、1,3-ジニトロピレン、1,3,6-トリニトロピ

レンの順で変異原活性が弱くなることがわかった。サルモネラ菌の系とことなり、1-ニトロピレン、1,3,6,8-テトラニトロピレンの変異原性はこの系では検出できなかった。1-ニトロピレンに関しては、種々の濃度のS9を加えてその変異原性の有無を検討したが、変異原性は検出できなかった。尚、3種のジニトロピレン及びトリニトロピレンの μg あたりの変異原性の強さはほぼ4NQOの強さに匹敵し、MMS, MNUなどより強いことが明らかとなった(Nakayasu et al., 1982)。ニトロピレンのニトロ基がサルモネラ菌内に存在する還元酵素により還元されて活性化され、サルモネラ菌に対して変異原性をもつと考えられている。ジニトロピレン、トリニトロピレンがCHL細胞に対して、強い変異原性を示すことは、CHL細胞の中にニトロ基を還元する酵素が存在することを強く示唆している。

4. アミノ酸、蛋白質加熱分解物質及び加熱食品中に含まれる変異原、発がん物質の変異原性

アミノ酸、蛋白質加熱分解物質及び加熱食品中より多くのヘテロサイクリックアミンの構造をもった変異原物質、発がん物質が分離同定されている(Sugimura, 1982)。3-アミノ-1,4-ジメチル-5-H-ピリド〔4,3-b〕インドール(Trp-P-1)、3-アミノ-1-メチル-5-H-ピリド〔4,3-b〕インドール(Trp-P-2)、2-アミノ-6-メチルジピリド〔1,2-a:3',2'-d〕イミダゾール(Glu-P-1)、2-アミノ-9-H-ピリド〔2,3-b〕インドール(AaC)、2-アミノ-3-メチルイミダゾ〔4,5-f〕キノリン(IQ)、2-アミノ-3,4-ジメチルイミダゾ〔4,5-f〕キノリン(MeIQ)及び2-アミノ-3,8-ジメチルイミダゾ〔4,5-f〕キノキサリン(MeIQx)についてCHL細胞に対する変異原性を至適濃度のS9 mix存在下で測定した。 μg あたりの変異原性はTrp-P-2がもっとも強く、次いで、IQ, MeIQ, Trp-P-1, AaC, MeIQx, Glu-P-1, Glu-

P-2の順に弱かった。この変異原性の強さの順序はこれらの物質のサルモネラ菌に対する変異原性の強さは順序とことなっていた。Trp-P-2の変異原性の強さはBPの変異原性の強さよりも大きく、また、サルモネラ菌に対する変異原性とことなり、IQやMeIQxよりも強かった(Nakayasu et al., 1983a)。

9-H-ピリド〔3,4-b〕インドール(ノルハルマン)及び1-メチル-9-H-ピリド〔3,4-b〕インドール(ハルマン)はトリプトファン加熱分解物、蛋白質の加熱分解物、タバコのタールに含まれている。ノルハルマンとハルマンはそれ自体、サルモネラ菌に対して変異原性をもっていない。このノルハルマンまたはハルマンを変異原性をしめさないある種の物質、例えばアニリン、*o*-トルイジンに加えると変異原性を示すようになる。すなわち、ノルハルマン、ハルマンは“co-mutagenic”の作用があり、注目をあびている。このノルハルマンまたはハルマンのCHL細胞に対する変異原性を測定したところ、S9 mixなしでCHL細胞に対して変異原性を示すことがわかり、サルモネラ菌の系での結果とはことなつた結果を得た。また、このCHL細胞に対する変異原性はS9 mixを加えることにより消失した(Nakayasu et al., 1983b)。

5. その他の物質の変異原性

ケルセチンは広く植物界に存在し、我々の日常食品中に含まれている。ケルセチンはサルモネラ菌に対して変異原性を示すにもかかわらず、我国で精力的に行われた発がん実験の結果では発がん性はしめされなかった。ケルセチンのCHL細胞に対する変異原性をDT^F細胞出現を指標として、検討した結果、CHL細胞に対してもS9 mixなしで変異原性を示していることがわかった。コーヒーはサルモネラ菌に対して変異原性を示すが、CHL細胞に対しても変異原性を示す。すなわち、市販インスタントコーヒーと

CHL細胞を培養して、その後、DT^F細胞の出現を測定すると、インスタントコーヒーの濃度に依存して、DT^F細胞の数が増加することを見出した。尚、このインスタントコーヒーの変異原性の大部分はコーヒー中に存在することが知られているメチルグリオキサールによるものではないことを明らかにしている。このように、インスタントコーヒーのような混合物でもこの系ではその変異原性が測定できる。(Nakasato et al., 1984)。

6. むすび

CHL細胞におけるDT^F細胞出現を指標とした哺乳動物細胞に対する変異原性測定法を確立し、環境中に存在する種々の変異原物質・発がん物質の変異原性を測定した。この測定法は哺乳動物細胞を用いた変異原物質検索法として操作が容易であり、再現性もたかく、感受性もよい。CHL細胞に対する変異原性の比活性を物質1 μg を細胞に曝露した際、 10^6 個の生存細胞数あたりに生じるDT^Fの細胞数であらわすと、Glu-P-2の0.3からMNNGの4000まで約 10^4 倍の比活性の差があった。測定した変異原物質の比活

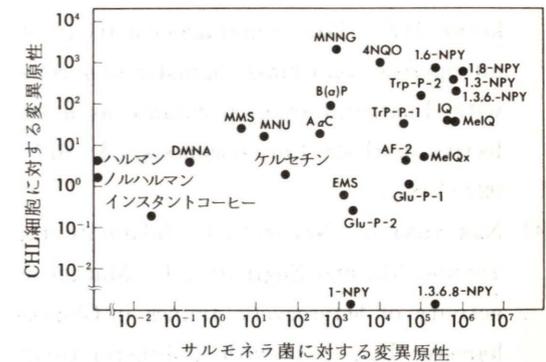


図1 CHL細胞に対する変異原性とサルモネラ菌に対する変異原性の比較。CHL細胞に対する変異原性は夫々の物質を1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で3時間細胞と培養した際生じるDT^F細胞数を 10^6 個の生存細胞数あたりで計算してあらわした。サルモネラ菌に対する変異原性は夫々の物質1 μg でえられる復帰細胞数であらわした。NPY;ニトロピレン。

性はこの間の値をしめす。物質のCHL細胞に対する変異原性の強さは必ずしもサルモネラ菌に対する変異原性の強さとは相関関係をしめさない。また、ノルハルマン、ハルマンのようにサルモネラ菌に対しては変異原性を示さないにもかかわらずCHL細胞には変異原性を示す物質があり、逆に、1-ニトロピレン、1,3,6,8-テトラニトロピレンのようにサルモネラ菌には変異原性を示すが、CHL細胞には変異原性を示さない物質もあった(図1)。今後CHL細胞に対する変異原性の強さと発がん性の強さの間に相関関係があるか検討していく必要がある。

文 献

- 1) Nagao, M., Sugimura, T., and Matsushima, T.: Environmental mutagens and carcinogens. *Annu. Rev. Genet.*, **12**: 117-159(1978).
- 2) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Ames, B.N.: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**: 5135-5139 (1975).
- 3) Nakayasu, M., Sakamoto, H., Wakabayashi, K., Terada, M., Sugimura, T., and Rosenkranz, H.S.: Potent mutagenic activity of nitropyrenes on Chinese hamster lung cells with diphtheria toxin resistance as a selective marker. *Carcinogenesis*, **3**: 917-922 (1982).
- 4) Nakayasu, M., Nakasato, F., Sakamoto, H., Terada, M., and Sugimura, T.: Mutagenic activity of heterocyclic amines in Chinese hamster lung cells with diphtheria toxin resistance as a marker. *Mutat. Res.*, **118**: 91-102 (1983 a).
- 5) Nakayasu, M., Nakasato, F., Sakamoto, H., Terada, M., and Sugimura, T.: Mutagenic activity of norharman and harman in Chinese hamster lung cells in assays with diphtheria toxin resistance as a marker. *Cancer Lett.*, **17**: 249-255 (1983b).
- 6) Pappenheimer, A. M. Jr.: Diphtheria toxin. *Annu. Rev. Biochem.*, **46**: 69-94 (1977).
- 7) Purchase, I.F.M., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Levere, P.A., and Westwood, F.R.: Evaluation of six Short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendation for their use. *Nature*, **264**: 624-627 (1976).
- 8) Rosenkranz, H.S., McCoy, E.C., Saunders, D.R., Butler, M., Kiriazides, D.K., and Mermelstein, R.: Nitropyrenes: isolation, identification and reduction of rnutagenic impurities in a carbon black in toners. *Science*, **209**: 1039-1043 (1980).
- 9) Sugimura, T.: Mutagens, carcinogens and tumor promoters in our daily food. *Cancer*, **49**: 1970-1984 (1982).
- 10) Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M., and Kawachi, T.: Overlapping of carcinogens and mutagens. In; P.N. Magee et al. (eds.), *Fundamentals in Cancer Prevention*, pp. 191-215, Japan Scientific Society Press, Tokyo/University Park Press, Baltimore (1976).
- 11) Terada, M., Nakayasu, M., Sakamoto, H., Nakasato, F., and Sugimura, T.: Induction of diphtheria toxinresistant cells by mutagenic carcinogens. In; M. Miwa et al. (eds.), *ADP-ribosylation, DNA Repair and Cancer*, pp277-286, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/VNU Science Press, Utrecht (1983).
- 12) Van Ness, B.G., Howard, J.B. and Bodley, J.W.: ADP-ribosylation of elongation factor2 by diphtheria toxin. *J.Biol. Chem.*, **255**: 10710-10716 (1980).

3. 変 異 原 の 試 験 法

umu — lac 融合遺伝子を利用した環境変異原の短期検索法 (umu-テスト) について

大阪府立公衆衛生研究所
大阪大学微生物病研究所

小田 美光・中村 清一・沖 岩四郎
中田 篤男・品川 日出夫

1. はじめに

我々の生活環境中には、多くのがん原物質が存在する。これらの大部分は、DNA に作用し突然変異を起こすことから、細胞のがん化は遺伝子の機能変化・発現調節の異常等、遺伝子 (DNA) レベルの反応が関与していると考えられている。

最近、我々は、DNA の損傷によって誘導される SOS 反応を利用した環境変異原の短期検索法 (umu-テスト) を開発した。ここに、umu-テストの概略と umu-テストで得られた結果を紹介する。

2. 試験菌株の作成

大腸菌では、DNA の損傷によって SOS 反応と呼ばれる一連の反応が誘発されることが知られている (Witkin, 1976; Little と Mount, 1982)。品川ら (1983) は、SOS 反応のひとつであり、突然変異誘発に直接関与している umu オペロンの umuC' 遺伝子とラクトースオペロンのひとつである lacZ' 遺伝子を結合させた umuC' — lacZ' 融合遺伝子を持つプラスミド pSK 1002 を作成した (図 1)。このプラスミドでは、umuC'

と lacZ' の継ぎ目のフレームを調節した結果、UmuC' 蛋白と LacZ' 蛋白の融合した β-ガラクトシダーゼ活性を持つ雑種蛋白が作られる。したがって、umuC' — lacZ' 融合遺伝子の発現は、lac オペロンのプロモーターではなく、umu オペロンのプロモーターの調節下に行われることになり、融合遺伝子にコードされている β-ガラクトシダーゼの活性を測定することにより、umu オペロンの発現、すなわち、突然変異誘発に直接関与するオペロンの発現が検出されることになる。我々は、このプラスミドを形質転換法により導入した大腸菌を利用した DNA 損傷の検出系を開発した。しかし、この検出系は、代謝活性化を必要とする化学物質に対して十分な感度が得られなかった。これは、宿主大腸菌の細胞膜の性質によるものと考えられた。そこで、さらに感度の良い試験菌株を作成するため、化学物質の膜透過性が極めて良く、除去修復能を欠き、ラクトース遺伝子群を持たない Ames のネズミチフス菌 TA 1535 にプラスミド pSK 1002 を形質転換法によって導入した菌株を作成した。

3. 試験方法

- (1) 用いた菌株：ネズミチフス菌 TA 1535 にプラスミド pSK 1002 を導入した TA 1535/pSK 1002 を使用した。
- (2) 培養液および緩衝液：細菌の一夜培養には、アンピシリン (20 μg/ml) を含む LB 培地 (バクトトリプトン 10 g, 塩化ナトリウム 5 g, イーストエキス 5 g を蒸留水 1 ℓ に溶解, pH 7.0 に調整) を用いた。TGA 培地は、T-ブ

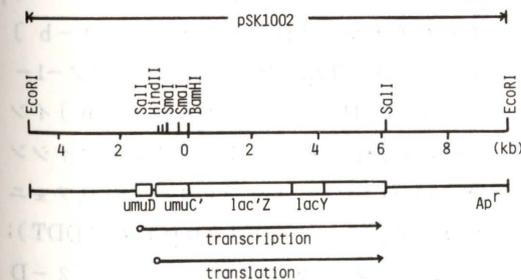


図 1 プラスミド pSK 1002 の構造

ロス(バクトトリプトン10g, 塩化ナトリウム5gを蒸留水1ℓに溶解)にグルコース(終濃度0.2%)とアンピシリン(終濃度20μg/ml)を加えて作成した。Z-緩衝液は、0.04Mリン酸1ナトリウム, 0.06Mリン酸2ナトリウム, 0.01M塩化カリウム, 0.001M硫酸マグネシウムの組成で作成し, 0.05M 2-β-メルカプトエタノールを使用直前に添加した。S9および補酵素は, オリエンタル酵母製を使用した。

(3) 化学物質の処理: アンピシリンを含むLB培地で一夜培養した菌液をTGA培地で50倍に希釈し, 37°CでOD₆₀₀が0.25~0.3に達するまで培養した。この菌液2.9mlを試験管にとり(S9 mixによる代謝活性化を必要とする場合には, 菌液2.4mlに50μlのS9を含んだS9 mix 0.5mlを加える。), これに適当な濃度の被験化学物質0.1mlを加えて37°Cで2時間振盪培養した。その後, 菌液0.2mlをβ-ガラクトシダーゼ活性の測定に, 残りを菌液の濁度(OD₆₀₀)の測定に使用した。

(4) β-ガラクトシダーゼ活性の測定: Miller(1972)の方法を若干修正して行った。すなわち, Z-緩衝液1.8mlに前記の2時間培養の菌液0.2mlを加えた。これにトルエンをパスツールピペットで1滴加えて強く攪拌し, 37°Cで40分間振盪してトルエンを蒸発させた。28°Cで5分間静置し, 温度が安定したところでβ-ガラクトシダーゼの基質として4mg/mlの2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド(0.1Mリン酸緩衝液, pH 7.0に溶解)0.2mlを加え, 酵素反応を行わせた。反応が進み, 十分に黄色を呈した時(10~30分), 1M炭酸ナトリウム1mlを加え, 反応を停止させた。分光光度計によりOD₄₂₀およびOD₅₅₀を測定し次式により酵素活性を算出した。

$$\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性 (unit)} =$$

$$1000 (\text{OD}_{420} - 1.75 \text{OD}_{550})$$

$$t \cdot v \cdot \text{OD}_{600}$$

ただし, tは反応時間(分), vは反応液中の菌液量の比率(この場合は0.1)を示す。

(5) 化学物質: 使用した化学物質は, 以下の通りである。9-アミノアクリジン(9-AA); 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(AF-2); プレオマイシン(BLM); 硫酸ジメチル(DMS); 塩酸ドキシソルピシン(DR); エチルメタンсульフォネート(EMS); 5-フルオロウラシル(5-FU); ホルムアルデヒド(FA); 過酸化水素(H₂O₂); 2-メソキシ-6-クロロ-9-(2-クロロエチルアミノ)プロピルアミン)アクリジン(ICR-191); 重クロム酸カリウム(K₂Cr₂O₇); マイトマイシンC(MMC); メチルメタンсульフォネート(MMS); N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG); メチルニトロソ尿素(MNU); 亜硝酸ナトリウム(NaNO₂); ニトロソシメチジン(NC); 4-ニトロキノリン1-オキサイド(4-NQO); β-プロピオラクトン(β-PL); パラコート(PQ); スレプトゾトシン(SZ); 2-アミノアントラセン(2-AA); アフラトキシンB₁(AFTB₁); ベンツ(a)ピレン(B(a)P); ジエチルニトロサミン(DEN); 7,12-ジメチルベンツ(a)アントラセン(DMBA); 3-メチルコランズレン(3-MC); クエルセチン(QC); 3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-b]インドール(Trp-P-1); 3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド[4,3-b]インドール(Trp-P-2); アクチノマイシンD(AMD); 1,1-ジ(4-クロロフェニル)-2,2,2-トリクロロエタン(DDT); 1,2-ジメチルヒドラジン(1,2-DMH); 窒化ナトリウム(NaN₃); ポリ塩化

ビフェニール KC-500(PCB); サフロール(SR); チオアセタミド(TA)の38種類であった。

4. 試験結果

(1) 化学物質によるβ-ガラクトシダーゼ誘発能の経時変化

被験化学物質添加後の培養時間を定めるためβ-ガラクトシダーゼ産生のキネティクスを調べた。図2に示す如く, 菌体内のβ-ガラクトシダーゼ活性は, AF-2(0.01μg/ml)の添加後, 約120分でほぼ平衡に達した。また, 2-AA(1μg/ml)は, S9による代謝活性化によってβ-ガラクトシダーゼの産生を誘発し, 培養後120分で最大値を示した。B(a)PおよびAFTB₁でも同様な結果が得られた。これらの結果から, 以後の実験では被験化学物質と菌体との培養時間は, 代謝活性化の有無にかかわらず原則として2時間で行った。

(2) 化学物質のSOS誘発能における用量-反応関係umu-テストにおいて, 化学物質が濃度に

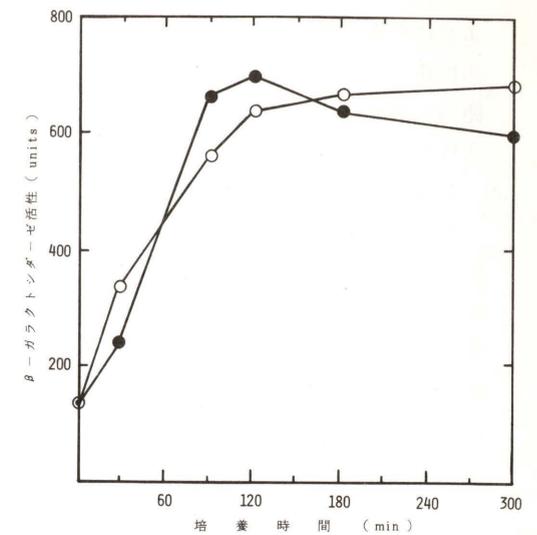


図2 AF-2および2-AAによるβ-ガラクトシダーゼ誘発能の経時的変化

○—○: AF-2, 0.03 μg/ml,
●—●: 2-AA, 1 μg/ml

依存してβ-ガラクトシダーゼを誘発するかどうかを調べた。その結果, 図3に見られる

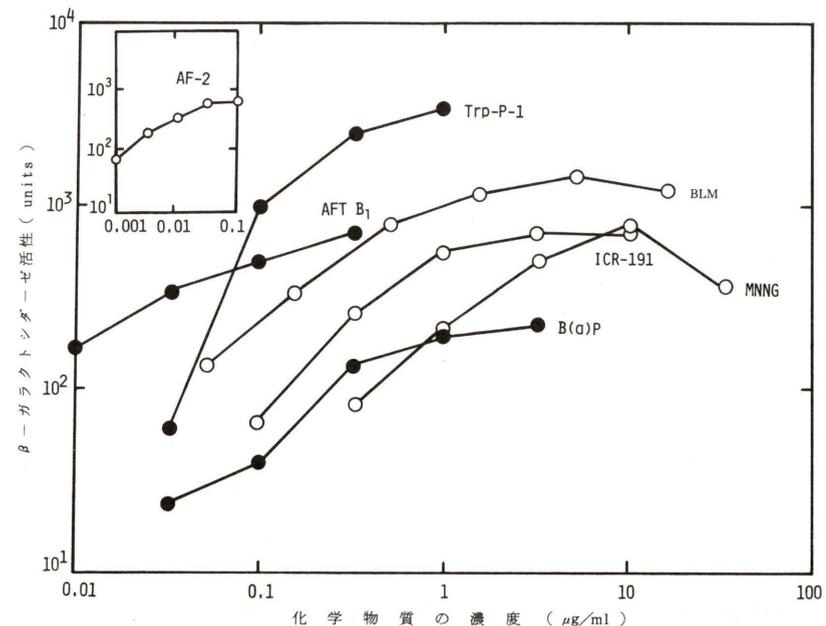


図3 種々の化学物質の濃度とβ-ガラクトシダーゼ活性との関係

○—○: 代謝活性化を必要としない化学物質の場合, ●—●: 代謝活性化を必要とする化学物質の場合, β-ガラクトシダーゼ活性は, 対照のレベルを差し引いてある。

ように代謝活性化を必要としない物質，代謝活性化を必要とする物質共に，一定の濃度範囲内で濃度に依存したβ-ガラクトシダーゼ活性の上昇が見られた。

(3) 各種化学物質のSOS誘発能

種々の化学物質について，umu-テストを行い対照の2倍のβ-ガラクトシダーゼ活性を示すのに必要な化学物質の菌液中の濃度を求めた(最小検出濃度)。また，最小検出濃度を示し得る物質をumu-テスト陽性，示し得ない物質を陰性とした。結果を表1に示す。テストした38種類の化学物質のうち，22

物質が代謝活性化なしに陽性を示し，9物質が代謝活性化により陽性となった。これに対してアクチノマイシンD，DDT，1，2-ジメチルヒドラジン，窒化ナトリウム，PCB，サフロール，およびチオアセタミドの7種類の化学物質は，代謝活性化の有無にかかわらず陰性であった。

(4) SOS誘発能と変異原性およびがん原性の関係

umu-テストの結果をAmesテストによる変異原性試験の結果と比較した(表1)。表1に示す如く，Amesテストで変異原性が認

表1 化学物質のumu-テストとAmesテストとの比較

化学物質	S9	最小濃度(μg/ml) ³⁾	umu-テスト	Amesテスト	がん原性
9-AA ¹⁾	-	9	+	+	?
AF-2	-	0.002	+	+	+
BLM	-	0.07	+	- ⁴⁾	+
DMS ¹⁾	-	38	+	+	+
DR	-	0.6	+	+	+
EMS	-	2300	+	+	+
5-FU ¹⁾	-	26	+	-	?
FA ¹⁾	-	18.6	+	- ⁴⁾	+
H ₂ O ₂	-	45	+	- ⁴⁾	+
ICR-191	-	0.22	+	+	?
K ₂ Cr ₂ O ₇ ¹⁾	-	76	+	+	+
MMC	-	0.046	+	-	+
MMS	-	27	+	+	+
MNNG	-	0.6	+	+	+
MNU	-	103	+	+	+
NaNO ₂ ¹⁾	-	2200	+	+	+
NC ¹⁾	-	66	+	+	?
4-NPD	-	4.9	+	+	+
4-NQO	-	0.08	+	+	+
β-PL	-	8.3	+	+	+
PQ ¹⁾	-	1000	+	-	?
SZ	-	0.13	+	+	+
2-AA	+	0.1	+	+	+
AFT B ₁	+	0.01	+	+	+
B(a)P	+	0.3	+	+	+
DEN ²⁾	+	5100	+	+	+
DMBA	+	0.9	+	+	+
3-MC	+	0.75	+	+	+
QC	+	100	+	+	-
Trp-P-1	+	0.01	+	+	+
Trp-P-2	+	0.15	+	+	+
AMD	±	(0.16-16) ⁵⁾	-	-	+
DDT	±	(10-100)	-	-	+
1, 2-DMH	±	(10-333)	-	-	+
NaN ₃	±	(1-100)	-	+	-
PCB	±	(10-100)	-	-	+
SR	±	(10-100)	-	-	+
TA	±	(100-10000)	-	-	+

1) 37°Cで5時間培養， 2) 37°Cで3時間培養， 3) 対照の2倍以上のβ-ガラクトシダーゼを誘発する濃度， 4) TA 102で陽性(Levinら，1982)， 5) ()の中の数字は，濃度範囲を示す。

められているにもかかわらず，umu-テストで反応が見られなかったのは，窒化ナトリウムのみであった。これに対して，Amesテスト陰性でumu-テスト陽性の物質は，プレオマイシン，5-フルオロウラシル，ホルムアルデヒド，過酸化水素，マイトマイシンCおよびパラコート[®]の6物質であった。このうち，プレオマイシン，ホルムアルデヒド，過酸化水素およびマイトマイシンCについては，Amesテストでも新しい菌株TA 102により変異原性が認められたことが報告されている(Levinら，1982)。また，umu-テストおよびAmesテストで陽性を示したいくつかの物質について，その感度を最小検出濃度より比較したところ両者の感度は，ほぼ同程度であった。さらにSOS誘発能とがん原性との結果を比較した(表1)。テストした38種類のうち，31種類が動物実験によりがん原物質とされていた。このうち，25物質がumu-テスト陽性，6物質がumu-テスト陰性であった。

5. おわりに

umu-テストと同じSOS反応を利用した変異原検査法としては，プロフェージの誘導によるInductest(Moreauら，1976)，λ-lacZ融合遺伝子によるBiochemical induction assay(Elespuruら，1979)およびsfiA-lacZ融合遺伝子によるSOS chromotest(Quillardetら，1982)が報告されている。これらのテスト系は，umu-テストと同様にひとつの菌株で種々のタイプの物質をテストできるうえ，Amesテストにくらべて短時間でしかもヒスタジンの影響を受けずにテストできるという利点を持っている。これらのSOS反応を利用したテスト系の中で，umu-テストは，umu C 遺伝子という突然変異に直接関与している遺伝子の発現を見ているという点で突然変異現象の本質により近づいた方

法であると考えられる。

今回，報告したumu-テストは，大腸菌のSOS反応を利用したものであり，塩基置換型，フレームシフト型の変異原だけでなくクロスリンク剤にも反応する。また，酸化的変異原，アルデヒド類，重金属，紫外線，ガス状物質，その他，アミノ酸の加熱処理によって生じる物質に対して有効であった。さらに，umu-テストは，(1)操作が簡単なうえ短時間(5~7時間)で結果が得られる，(2)Amesテストとほぼ同程度の感度を持つ，(3)ヒスタジンを含まない物質でもテストできる等の利点を持った利用度の高い変異原検査法であると考えられる。今後，umu-テストの応用面を広げると共に，多くのデータを蓄積しより完成したテスト系にしたい。

本研究の初期段階は，杉田一之(大阪警察病院)，牧野耕三(阪大・微研)，加藤武司(阪大・医)の諸先生との共同研究によって行われた。また，本研究に当初より多くの御助言を下された当研究所，国田信治所長に感謝いたします。

本研究の一部は，大同生命厚生事業団医学助成金の援助によるものである。

附記：umu-テストで使用しているネズミチフス菌TA 1535/pSK 1002の分与を御希望の方は，下記まで連絡下さい。

〒537 大阪市東成区中道1丁目3-69
大阪府立公衆衛生研究所 病理課
小田 美光 宛

文 献

1) Ames, B.N., McCann, J., and Yamazaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31: 347-364 (1975)
2) Elespuru, R.K., and Yarmolinsky, M.B.: A

SOS 反応を指標とした環境変異原の検出系

残留農薬研究所

太田 敏博・仲村 直子・森谷 正明
白須 泰彦

1. はじめに

我々の環境中には数多くの変異原物質が存在する。これら変異原物質の検出に Ames テストや染色体異常試験などが有力な手段として利用されているのは周知のことである。

最近、大腸菌の SOS 反応 (DNA 損傷に対する誘導的反應) を簡便に検出する系が国内外ではほぼ同時期に開発された (Quillardet ら, 1982; 品川ら, 1982)。いずれも SOS 遺伝子の一つに *lac* 遺伝子を連結させ、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することにより変異原性を検出しようとするものである。この方法は一菌株を用いるだけで、しかも 4~5 時間で結果が得られるなどの特徴を有する。本稿では Quillardet ら (1982) によって開発された SOS Chromotest の系について当研究室での検討結果 (Ohta ら, 1984) をもとに紹介する。

2. SOS 反応と突然変異

大腸菌を放射線や変異原物質で処理して DNA に損傷を与えたり DNA 複製を阻害させると種々の DNA 修復能の活性化、プロファージの誘発、細胞分裂の阻害 (フィラメント化)、突然変異の生成など多様な一連の反応が起きる。この反応は SOS 反応と呼ばれ、SOS 反応によって発現が誘導される遺伝子を SOS 遺伝子と言う。現在、大腸菌の主染色体上の *recA*, *lexA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *sulA* (*sfiA*), *himA*, *dinA*, *dinB*, *dinD*, *dinF*, *umuC*, *umuD*, *ruv* の 14 個の遺伝子が、また、プラスミド pKM 101 上の *mucA*, *mucB* 遺伝子が SOS 遺伝子として知られている。これらの SOS 遺伝子群は *lexA* 遺伝子産物である LexA リプレッサーとプロテアーゼ活性を持つ RecA 蛋白

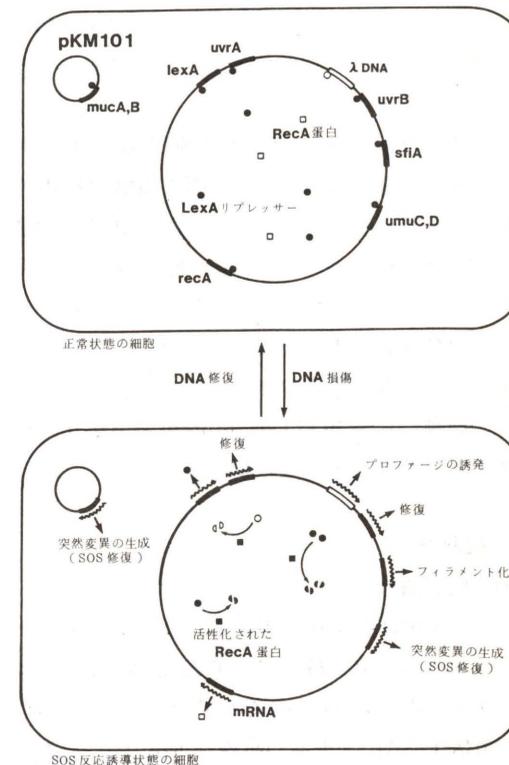


図1 SOS 調節機構のモデル

(*recA* 遺伝子産物) によってその発現の調節を受けている (図1)。DNA に損傷が生じると RecA プロテアーゼが活性化され LexA リプレッサーを切断する。その結果、SOS 遺伝子群の発現が起こる訳である。また、 λ フェージの溶原菌ではフェージの CI リプレッサーが同様に RecA プロテアーゼで切断されるためにプロファージの誘発が起こる。

ところで、SOS 遺伝子群のなかで *umuC*, *D* 遺伝子は大腸菌の SOS 修復 (この DNA 修復系は修復過程で誤りを生じやすく error-prone repair とも呼ばれる) に直接関与する遺伝子で

colorimetric assay of lysogenic induction designed for screening potential carcinogenic and carcinostatic agents. Environ. Mutagen., 1: 65-78 (1979)

- 3) Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A., and Ames, B.N.: A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 79: 7445-7449 (1982)
- 4) Little, J.W., and Mount, D.W.: The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell, 29: 11-22 (1982)
- 5) Miller, J.H.: Experimentals in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 352-355 (1972)
- 6) Moreau, P., Bailone, A., and Devoret, R.: Prophage λ induction in *Escherichia coli* K12 *envA uvrB*: A highly sensitive test for potential carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 73: 3700-3704 (1976)
- 7) Nakamura, S., Oda, Y., Sugita, K., Nakata, A., and Shinagawa, H.: A new test system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens: I. Characterization of tester strain of *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. 投稿準備中
- 8) 中村清一, 小田美光, 沖岩四郎, 加藤武司, 品川日出夫: *umu-lac* 遺伝子を用いた変異原検出系 (III) -代謝活性化法の検討-, 日

本環境変異原学会第12回大会講演要旨集, 39 (1983)

- 9) 小田美光, 中村清一, 沖岩四郎, 杉田一之, 加藤武司, 牧野耕三, 中田篤男, 品川日出夫: *umu-lac* 遺伝子を用いた変異原検出系 (II) -ネズミチフス菌 TA1535 を宿主に用いることによる感度の改良-, 日本環境変異原学会第12回大会講演要旨集, 39 (1983)
- 10) Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R., and Hofnung, M.: SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 79: 5971-5975 (1982)
- 11) 品川日出夫, 杉田一之, 牧野耕三, 加藤武司, 小田美光, 中村清一, 沖岩四郎, 中田篤男: *umu*-テストを用いた変異原検出系, 日本環境変異原学会第11回大会講演要旨集, 38 (1982)
- 12) Shinagawa, H., Kato, T., Ise, T., Makino, K., and Nakata, A.: Cloning and characterization of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. Gene, 23: 167-174 (1983)
- 13) 杉田一之, 品川日出夫, 牧野耕三, 中村清一, 小田美光, 沖岩四郎: *umu-lac* 融合遺伝子を用いた変異原検出系の開発, 大阪府立公衛研所報, 21: 91-94 (1982)
- 14) Witkin, E.M.: Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. Bacteriol. Rev., 40: 869-907 (1976)

あり、突然変異生成過程で重要な役割を果たしている。一方、プラスミド pKM 101 上に存在する *mucA*, *B* 遺伝子は上記の *umuC*, *D* 遺伝子機能を相補することができ、遺伝子産物の分子量も同一であることから両者は進化的に同一起源であると考えられている。Ames テストで用いられているサルモネラ菌にプラスミド pKM 101 を導入すると変異原物質に対する感度が高まるのはこのためである。

SOS Chromotest の原理は SOS 遺伝子の発現を酵素レベルで測定して DNA 損傷の検出を行うものである。λ プロファージの誘発を指標とする Inductest の原理も基本的には同じであるが、RecA プロテアーゼによる λ リプレッサーの分解反応は LexA リプレッサーの場合よりもはるかに遅いことが知られている。したがって、原理的にも SOS Chromotest の方が Inductest より感度が良いことになる。

3. 試験方法

(1) 使用菌株

大腸菌 PQ 37 株を用いる。ラクトース・オペロンの一部 (構造遺伝子 *lacZ*, *Y*, *A*) とトランスポゾン Tn 3 由来のアンピシリン耐性遺伝子 (Ap^r) をもつ特殊な Mu ファージ、

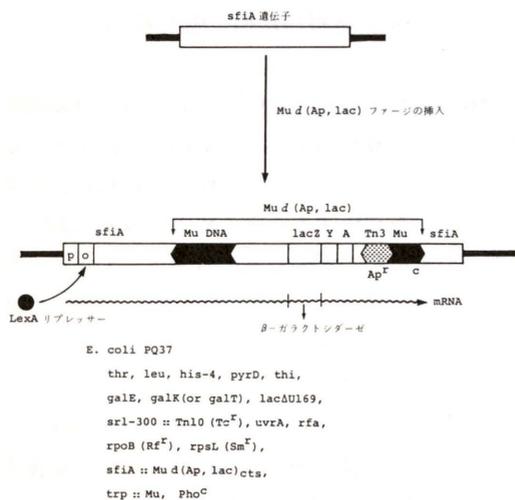


図2 大腸菌 PQ 37 株の説明図

Mu d(Ap, lac), が大腸菌の主染色体上の *sulA* (以前は *sfIA* と呼ばれていた) 遺伝子内に挿入された株である (図2参照)。宿主の大腸菌にはラクトース・オペロンの欠損株 (*lacΔU169*) を用いているため、*lacZ* 遺伝子の発現は SOS 遺伝子である *sulA* 遺伝子の発現に依存している。したがって、変異原物質による DNA 損傷により LexA リプレッサーが不活性化され *sulA* 遺伝子の発現が起きると、その量を *lacZ* 遺伝子産物の β-ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することにより容易に定量することが出来る。遺伝子の発現過程の mRNA 合成や蛋白質合成が阻害を受けにくい様に RNA ポリメラーゼの β サブユニット (*rpoB*) およびリボゾーム蛋白 (*rpsL*) に変異を入れ、各々リファンピシン耐性 (Rf^r), ストレプトマイシン耐性 (Sm^r) となっている。さらに変異原物質に対する感度を高めるために除去修復変異 (*uvrA*), 膜透過性変異 (*rfa*) が導入されている。また *trp* 遺伝子内にも野生型の Mu ファージが挿入されているが、これは Mu d(Ap, lac) ファージのリプレッサーが温度感受性 (ts) であるため野生型ファージのリプレッサーで高温でのプロファージ誘発を防ぐ意味で挿入されている。その他、PQ 37 株ではアルカリホスファターゼの合成が誘導型から構成型になっている (Pho^c)。

菌の前培養には 20 μg/ml アンピシリン含有の LB 培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 1% NaCl, pH 7.2) を用いる。

(2) 変異原処理

LB 培地で培養した対数増殖期の菌液 (OD₆₀₀ = 0.3 ~ 0.4) 1 ml を試験管に分注し、種々の濃度で変異原物質 5 ~ 50 μl を加える。代謝活性化を行う場合にはあらかじめ菌を遠心により 10 倍濃縮しておき、菌濃縮液 0.1 ml に S9 mix 0.9 ml を加える。37 °C で 1 時間処理

した後、新しい培地で 10 倍希釈し (0.2 ml を 1.8 ml LB 培地に加える), さらに 2 時間培養を続け *lacZ* 遺伝子の発現を行わせる。菌濃度 (OD₆₀₀) の測定と β-ガラクトシダーゼ, およびアルカリホスファターゼの酵素活性の測定を行う。

Quillardet らの原法では変異原処理を 2 時間行い直ちに酵素活性を測定しているが, 上記の希釈操作を加えた方が生育阻害作用の強い物質の場合には適しており, また, 酵素活性測定のためのクロロホルム処理の際に生じる S9 蛋白の沈殿も少なくなるため遠心分離の操作が省略できる。なお, 色調の強い試験薬剤の場合でも希釈操作を行うことにより実際上ほとんど問題はないが, 薬剤の色の影響を完全に除きたければ処理後遠心, 洗浄を行う。

(3) 酵素活性

a. β-ガラクトシダーゼ活性

菌液 0.1 ml を 0.9 ml の Z-緩衝液 (60 mM Na₂ HPO₄, 40 mM NaH₂ PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.0) に加える。

0.1% SDS 50 μl とクロロホルム 50 μl を添加して直ちに強く攪拌し, 菌の透過障壁を破壊する。28 °C に 10 分間放置した後 0.2 ml の基質 ONPG (4 mg/ml) を加えて反応を開始する。28 °C で 5 ~ 60 分間反応させた後 1 M Na₂ CO₃ を 1 ml 加えて反応を止

表1 Bleomycin の SOS 反応誘発活性

Bleomycin (μg/ml)	菌濃度 OD ₆₀₀	β-ガラクトシダーゼ (β)			アルカリホスファターゼ (p)			(β)/(p)	SOS Induction Factor
		OD ₄₂₀	OD ₅₅₀	Unit	OD ₄₂₀	OD ₅₅₀	Unit		
0	0.329	0.155	0.014	66	1.076	0.015	532	0.124	1
0.2	0.207	0.436	0.009	338	0.701	0.007	554	0.610	4.9
0.5	0.153	0.598	0.009	634	0.437	0.004	468	1.35	10.9
1	0.094	0.963	0.011	1673	0.255	0.003	442	3.78	30.5
2	0.074	1.123	0.016	2466	0.172	0.005	368	6.70	54.0

$$\text{Unit} = \frac{\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}}{t \times v \times \text{OD}_{600}} \times 1000, \quad t = \text{反応時間 (min)}, \quad v = \text{反応に用いた菌液量 (ml)}$$

める。黄色に呈色した反応液の OD₄₂₀ および OD₅₅₀ での吸光度を測定する。OD₅₅₀ は菌の濁りによる OD₄₂₀ の値への影響を補正するためのものである。

b. アルカリホスファターゼ活性

Z-緩衝液の代わりにトリス緩衝液 (1 M Tris-HCl, pH 8.8) を用い PNPP (*p*-nitrophenyl phosphate, 4 mg/ml) を基質として β-ガラクトシダーゼの場合と同様の操作を行う。反応は 0.5 ml の 2 M HCl を加えて止める。酸性側では黄色の呈色が消えるため 5 分後に再度 0.5 ml の 2 M Trizma base を添加する。

c. その他

SDS・クロロホルム処理法の代わりにトルエン処理法を用いることもできるが, トルエンの蒸発操作 (37 °C, 40 ~ 60 分) が必要である。酵素量 (unit) は Miller の計算式により算出する。

$$\text{unit} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t は反応時間 (min.), v は反応に用いた菌液量 (ml)

4. 変異原物質の SOS 反応誘発活性

(1) Ames テストで陽性の変異原物質

Bleomycin での結果を表 1 に示す。β-ガ

ラクトシダーゼの単位菌体当りの酵素量 (unit) は Bleomycin 濃度に比例して著しく上昇するが、アルカリホスファターゼ量は漸次減少している。アルカリホスファターゼの合成は PQ 37 株においては構成型 (constitutive) であるので本来は一定の値を示すはずである。したがってアルカリホスファターゼ量の減少は mRNA や蛋白質合成の阻害を意味する訳で、当然 β -ガラクトシダーゼの誘導合成にもこの阻害作用の影響は現われていることになる。この β -ガラクトシダーゼ量の過少評価を補正するために両者の比 (β/p) を計算する。対照群での値を 1 とした時の処理群の値を計算したものが SOS induction factor と呼ばれている値である。しかし、単なる変異原物質のスクリーニング目的ならばこの値まで求める必要はなく、 β -ガラクトシダーゼ量のみを測定するだけで充分である。

代謝活性化には Ames テストで用いる S9 mix と同じ組成のものでよいが、S9 分画

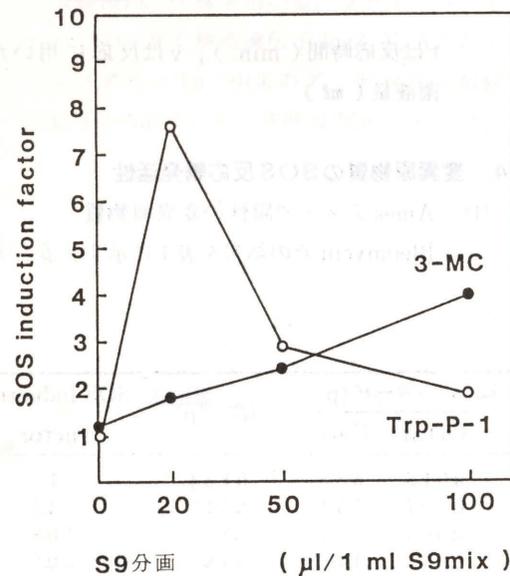


図3 代謝活性化におけるS9分画量の影響
●; 50 $\mu\text{g/ml}$ 3-methylcholanthrene
○; 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Trp-P-1

の至適濃度が変異原物質によって異なるのは Ames テストの場合と同様である。図3にその一例を示す。しかし、Trp-P-1の場合でも用量を高くすれば10%のS9量でも充分検出されるので、一般のスクリーニングにはS9分画10%含有のS9 mixを用いれば問題ないと思われる。

42種の変異原物質について調べた結果39化合物にSOS反応誘発活性が認められた。この中にはアルキル化剤をはじめICR-170, ICR-191のような代表的なフレームシフト型変異原, Mitomycin Cのようなcross-linking剤も含まれている。結果の詳細については文献(Ohtaら, 1984)を参照されたい。このように一菌株で種々のタイプの変異原を検出できることは注目に値する。Amesテストにおいては前述のBleomycinはTA102株でしか変異原性が検出されない。これはAmesテストでは個々の突然変異の結果を指標としており、SOS Chromotestでは大部分の突然変異の前提となるSOS反応(SOS修復)を指標としているからである。

一方、9-Aminoacridine, Ethidium bromide, 4-Nitro-o-phenylenediamineの3種の変異原物質についてはSOS反応誘発活性が認められなかった。上記のフレームシフト型変異原が陰性であったことは、これらの変異原によって誘発される突然変異がSOS修復の際の修復ミスによって生じるのではなく、複製の際の塩基の対合ミスなどによって生じていることを強く示唆している。

(2) Amesテストで陰性の変異原・ガン原物質

Actinomycin D, Ethionine, Griseofulvin, Methotrexate, Thioacetamide, および5種の有機塩素系農薬について調べ

表2 種々の農薬におけるSOS反応誘発活性

薬剂	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	S9mix	β -ガラクトシダーゼ (unit)	SOS反応誘発活性
Captan	0	-	59	+
	5	-	243	
	10	-	392	
	20	-	500	
Captafol	0	-	59	+
	0.2	-	235	
	0.5	-	403	
	1	-	514	
Dexon (DAPA)	0	-	59	+
	20	-	483	
	50	-	659	
	100	-	862	
1,2-Dibromo-3-chloropropane (DBCP)	0	+	46	+
	20	+	93	
	50	+	197	
	100	+	227	
1,2-Dibromoethane (EDB)	0	-	60	+
	500	-	131	
	1000	-	164	
	2000	-	164	
2,4-Dinitrophenyl thiocyanate (NBT)	0	-	58	+
	20	-	158	
	30	-	205	
	40	-	234	
Vamidothion	0	-	56	+
	10000	-	93	
	20000	-	131	
	30000	-	138	
Chlorobenzilate	0	-	46	-
	1000	-	48	
	5000	-	40	
	0	+	46	
	1000	+	42	
p,p'-DDT	0	-	59	-
	1000	-	53	
	5000	-	29	
	0	+	52	
	1000	+	56	
Dieldrin	0	-	56	-
	1000	-	54	
	5000	-	43	
	0	+	42	
	1000	+	40	
Griseofulvin	0	-	50	-
	200	-	60	
	2000	-	63	
	0	+	48	
	200	+	50	
Pentachloro-nitrobenzene (PCNB)	0	-	59	-
	1000	-	46	
	5000	-	31	
	0	+	52	
	1000	+	38	
Trifluralin	0	-	59	-
	1000	-	60	
	5000	-	44	
	0	+	52	
	1000	+	47	
	5000	+	54	

たが全て陰性であった。農薬での結果の一部を表2に示した。

5. おわりに

以上、SOS Chromotest について当研究室での検討結果を中心に述べてきたが、この試験系は単に変異原物質の検出系としてだけでなく抗突然変異因子の検索、さらには突然変異誘発機構の研究にも役立つと思われる。また、極めて短時間に微量のサンプルで行える特徴を有するため、食品、天然物、環境汚染物質などの混合物からの変異原物質の分離、精製においても有力な手段となり得るであろう。

文 献

- 1) Ohta, T., Nakamura, N., Moriya, M., Shirasu, Y. and Kada, T.: The SOS-function-

inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, 131: 101-109 (1984).

- 2) 品川日出夫, 杉田一之, 牧野耕三, 加藤武司, 小田美光, 中村清一, 中田篤男: umuテストを用いた変異原検出系, 日本環境変異原学会第11回大会講演要旨集, 38 (1982).
- 3) 杉田一之, 品川日出夫, 牧野耕三, 中村清一, 小田美光, 沖岩四郎: umu-lac 融合遺伝子を用いた変異原検出系の開発, 大阪府立公衛研所報, 公衆衛生編 第21号, 91~94 (1983).
- 4) Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R. and Hofnung, M.: SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 79: 5971-5975 (1982).

ショウジョウバエの体細胞染色体の研究法 ——短期 in vivo 染色体試験としての有用性——

武田 薬品工業株式会社中央研究所

菊池 康基・藤川 和男

木村 善昭・一ツ町晋也

大阪大学医学部放射線基礎医学教室

劉 美愛

1. はじめに

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の幼虫の体細胞染色体に対する、放射線や化学物質の作用を検出する試みは、以前より行われている (Gatti, 1974; DeMarco と Polani, 1983 参照)。これらの研究においては3令幼虫の神経節を用いて、古典的な押しつぶし法 (squash method) により染色体標本作製している。このため、良好な標本作製には多大の経験が必要とする上、得られた分裂中期の染色体像は必ずしも鮮明でなく、異常の解析に問題を残す。また、標本は長期間保存できず、さらに各種分染法の応用にも難点があるなどの欠点があり、改良の余地が残されていた。

一方、ショウジョウバエ属の体細胞染色体の空気乾燥法 (air-drying method) による標本作製は、Tonomura と Tobar i (1978) によって試みられ、SCE 観察へも応用されている (Tsuji と Tobar i, 1979)。

著者らは、マウス受精卵や初期胚の染色体研究に乳酸・酢酸混液処理による air-dry 法を行っている (木村ら, 1983)。この方法をショウジョウバエの体細胞にも応用したところ、良好な成績を得た (木村ら, 1984) ので、その概要を述べるとともに、放射線や二三の化学変異原処理による染色体異常の誘発について紹介し、短期 in vivo 染色体試験としての有用性について言及したい。

2. 染色体標本の作製法

キイロショウジョウバエの3令幼虫を使用し

た。実験目的に応じ、Oregon R, *mei-9*, あるいは付着 X (XX), リング X, イソ染色体など異常染色体維持システムを使用した。

標本の作製法は下記に示す。

- (1) 孵化後48~96時間後の3令幼虫の脳と神経節を生理食塩水 (0.9% NaCl) 中でピンセットを用いて摘出する。
- (2) 摘出組織は小型シャーレまたはホールグラスに移し、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の colchicine を含む生理食塩水中に室温で90分間浸す。
- (3) 低張液処理として、0.075 M KCl 水溶液に20分間室温で浸す。
- (4) Acetic acid-ethanol (1:3) で2~24時間、前固定する。
- (5) 50% lactic acid と acetic acid の 1:4 混合液に浸し、組織片がほぼ透明になるまで処理し、スライドグラス上へ移す。
- (6) 実体顕微鏡の低倍で観察しながら、解剖針を用いて組織をほぐし細胞を拡散させる。細胞が十分に広がったことを確認したらば、自然乾燥する。
- (7) Acetic acid-ethanol を1滴滴下して再固定する。
- (8) 乾燥後、3% Giemsa (pH5.8) で30分間染色し、水洗後乾燥する。

なお、本法により作製した標本から、Cバンド染色も容易に行える。染色法は Sumner (1972) の BSC 法に準じればよい。上記(7)までの処理を終えた標本を、50°C の 5% Ba(OH)₂ 水溶液に5分間浸し水洗後、60°C の2倍濃度の SSC (0.3M NaCl + 0.03M sodium citrate) で

1時間処理し、流水で洗って、3%Giemsaで2時間染色する。

3. 観察結果と考察

1) キイロショウジョウバエの染色体：3令幼虫の神経節と脳では、細胞分裂の頻度がきわめて高く、良好に作製された標本では、1個体につき500以上の分裂中期像が観察された。これまで、染色体の観察には神経節が多用さ

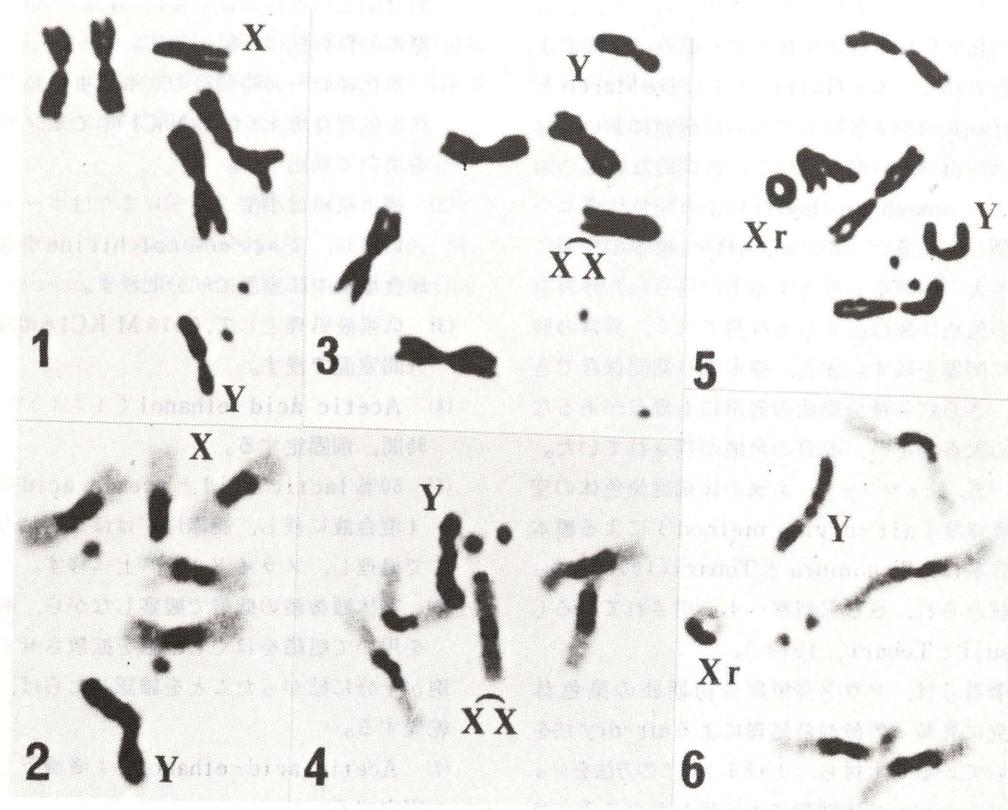


図1～6 キイロショウジョウバエの体細胞染色体。1, Oregon Rの雄のGiemsaによる通常染色。X染色体はアхроセントリック, Yはサブメタセントリック, 常染色体No.2とNo.3はメタセントリック, No.4は点状染色体。2, 雄のCバンド。X染色体は動原体を含む約1/2が, Yはほぼ全長にわたり, 濃染されている。濃染部はheterochromatinで, 不活性な部分と考えられている。Nos.2と3の常染色体では動原体の付近にそれぞれ特有のバンドが出現する。3～6, 異常染色体維持系統の染色体。3と4, 付着X(2個のX染色体の転座で, \widehat{XX} と表現されている)を持つ系のGiemsa染色とCバンド。唾腺染色体の観察からすでに明らかにされていることではあるが, Cバンドのパターンからも \widehat{XX} が単純な転座ではなく, 欠失や逆位を伴っていることが推測される。5と6, リングX(X_r)を持つ系。

れているが, 幼虫の脳組織も細胞分裂が活発で, 神経節と一緒に処理できるので, 多数の中期分裂像の観察が要求される実験には好適である。

図1, 2にキイロショウジョウバエの雄の正常な染色体を示した。常染色体は2対のメタセントリック(Nos.2,3)と1対の点状染色体(No.4)からなり, X染色体はアхроセントリック, Y染色体はサブメタセントリック

である。乳酸・酢酸混液を用いるair-dry法では, 個々の染色体が鮮明に染まり, 核板の乱れも少ないので詳しい観察が容易である。今回紹介した方法に類似した乳酸・酢酸混液を用いたair-dry法はTonomuraとTobari(1978)によって, すでに*D. pseudoanassae*の核型分析に用いられているが, ここで述べた著者らの方法は固定処理が確実で, 染色性もよく, また再現性も優れているものと考えられる。

図2はCバンド染色で, Y染色体はそのほぼ全域, Xでは動原体に近い約1/2の部分濃染されている。常染色体の動原体の部分にもCバンドが現れている。この濃染部はcen-

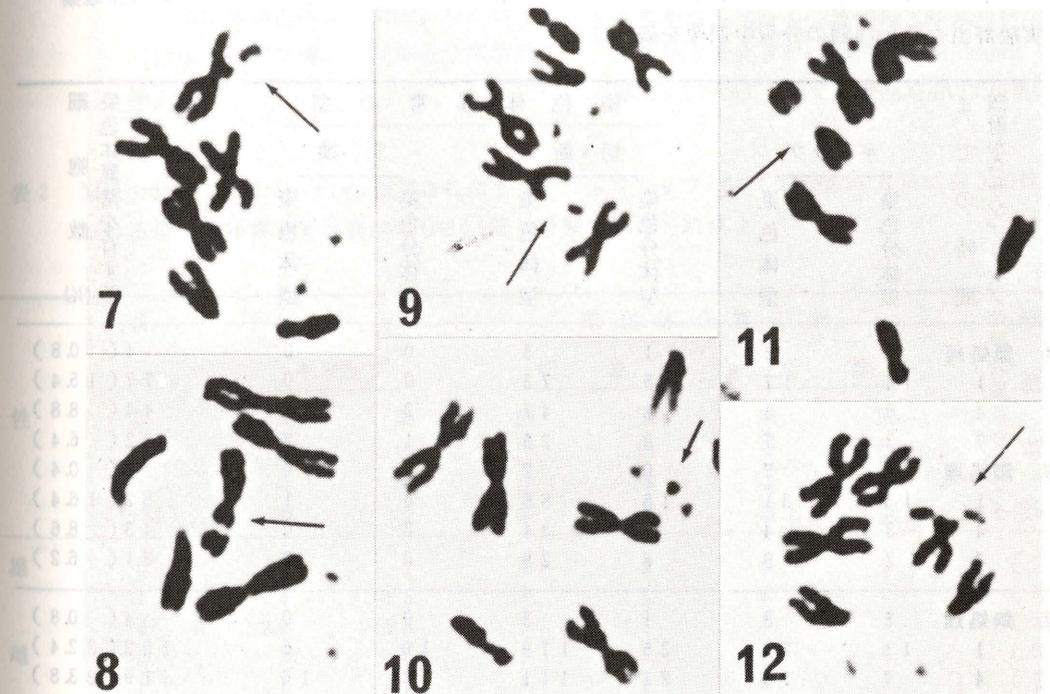


図7～12 X線(1,000R)により誘発された染色体異常(矢印), 使用系統はOregon R。7, ギャップ(染色体型)。8, ギャップ(染色体型)。9, 切断(染色体型)。10, 染色体断片, 11と12, 切断(染色体型)。

tromeric heterochromatinであり, 唾腺染色体ではchromocenterを構成する。Cバンドのパターンは個々の染色体に特有であり, 付着X(\widehat{XX}), リングX(図3～6), あるいはイソ染色体などの同定や解析にも有用であることが判明した。

2) 変異原により誘発される染色体異常: Oregon R系統の3令幼虫にX線500または1,000Rを照射し, 1,4および7時間後に, 上述の方法に従って標本作製し, 染色体異常を観察した(表1)。同系統, 同令の幼虫にmitomycin Cを1または2mM飼料に混ぜて与え, 5時間後に標本作製した場合を表2に示した。X線による染色体異常は, 照射直後

が最も高率で、以後経時的に減少した。異常としては染色分体(chromatid)型よりも染色体(isochromatid)型が多く出現した。1,000 R照射群では、染色体切断の増加と共に、ダイセントリック、リングなどの交換型異常が増加した。この結果は、Gattiら(1974)の押しつぶし標本の観察データとよく一致した。ただし、彼らはOregon Rでは異常の誘発に雌雄差があると報告しているが、今回の観察では、性差は全く認められなかった。一方、mitomycin C処理群では、観察された異常のほとんど全てがギャップと切断であった。X線誘発の染色体異常を図7~16に例示したが、変異原処理によるこれらの染色体異常の観察は、本法によって極めて容易に実施できることが判明した。

表1 X線照射を受けたキイロショウジョウバエ(Oregon R系幼虫)の体細胞における染色体観察(実験群当たり500個の分裂中期像を観察)

照射量(R)	性別	照射からサンプルリング間	ギャップ		染色体異常の型				染色体異常を有する細胞数(%)
			染色分体型	染色体型	切断		交換		
					染色分体型	染色体型	染色分体型	染色体型	
500	雄	無処理	5	3	1	3	0	0	4(0.8)
		1	14	17	15	73	0	0	77(15.4)
		4	6	3	2	47	2	1	44(8.8)
	雌	無処理	4	7	0	2	0	0	2(0.4)
		1	13	31	15	86	3	1	82(16.4)
		4	3	4	9	34	3	0	43(8.6)
		7	2	8	6	28	0	2	31(6.2)
1,000	雄	無処理	5	3	1	3	0	0	4(0.8)
		1	11	24	25	179	10	6	162(32.4)
		4	7	16	21	111	2	10	119(23.8)
	雌	無処理	4	7	5	60	6	10	60(12.0)
		1	17	26	34	204	10	3	169(33.8)
		4	5	16	19	148	7	14	142(28.4)
		7	1	7	1	59	3	8	51(10.2)

3) DNA 損傷修復能欠損株における染色体異常: 次に、除去修復能欠損株における染色体異常の出現様相を調べるため、*mei-9^a*幼虫と正常な修復能をもつ*C(1)DX,yf*幼虫を飼育している培地表面にmethyl methanesulfonate (MMS)の0.05あるいは0.2%水溶液1mlを滴下し、5時間摂食させた後、標本作製した。修復能欠損の幼虫(*mei-9^a*)では、正常な修復能を持つ幼虫に比べ、無処理群でも染色体異常が多発しており、MMS処理群では切断を主体とする異常が著しく増加した(図17,表3)。これら異常は染色分体型が多く、X線やmitomycin Cの結果と相違がみられた。このようなDNA傷害の修復能欠損株を使用して染色体異常を調べることができるのは哺乳動物のin vivo試験では



図13~16 X線(1,000R)により誘発された交換型異常(矢印)。13, 転座による異常染色体。14, リング染色体と断片。15, 四方射状転座。16, ダイセントリック(2動原体染色体)と断片。13, 14と16は染色体型交換, 15は染色分体型交換。

表2 Mitomycin Cをin vivo投与されたキイロショウジョウバエ(Oregon R系幼虫)の体細胞における染色体観察(実験群当たり500個の分裂中期像を観察)

性別	濃度(mM)	ギャップ		染色体異常の型				染色体異常を有する細胞数(%)
		染色分体型	染色体型	切断		交換		
				染色分体型	染色体型	染色分体型	染色体型	
雄	0	2	2	2	2	0	0	4(0.8)
	1	14	45	7	12	0	0	19(3.8)
	2	34	58	8	14	0	0	22(4.4)
雌	0	2	5	0	1	0	0	1(0.2)
	1	29	37	5	9	0	0	14(2.8)
	2	33	56	8	15	1	0	23(4.6)

真似のできない、ショウジョウバエならではの特色といえよう。

4. おわりに

今回の実験における、もう一つの大きな特色としては、Mitomycin CやMMSの処理をin vivoで実施したことである。これまでの報告では摘出した神経節を化学変異原の溶液につけin vitroで処理を行っていた。変異原を飼料に混ぜ、幼虫に経口的に摂取させて、染色体異常を検出できたことは、ショウジョウバエの体細胞染色体試験がin vivoの変異原検出系として十分に成立することを示したものと見える。

キイロショウジョウバエは、環境変異原の検出に世界的に広く用いられている、すでに、伴性劣性致死法、相互転座法など、生殖細胞を対象とした遺伝毒性の検出法が確立されている。また最近になって、体細胞突然変異検出のための新法が開発されつつある(Fujikawaら,1983; 藤川ら,1984)。従って、体細胞を用いて染色体異常の

表3 Methyl methanesulfonate をin vivo投与されたキロシヨウジョウバエの除去修復能欠損株 (*mei-9^a*) 幼虫における染色体観察

系	濃度 (%)	観察細胞数	染色体異常の型						染色体異常を有する細胞数 (%)
			ギャップ		切断		交換		
			染色分体型	染色体型	染色分体型	染色体型	染色分体型	染色体型	
除去修復能欠損幼虫 (<i>mei-9^a</i>)	0	1,000	26	5	29	10	0	2	40 (4.0)
	0.05	500	16	11	23	25	1	1	48 (9.6)
	0.2	500	59	18	65	39	3	0	97 (19.4)
修復能正常な幼虫	0	500	1	1	1	1	0	0	2 (0.4)
	0.05	500	4	5	0	3	0	0	3 (0.6)
	0.2	500	32	13	14	7	1	0	22 (4.4)

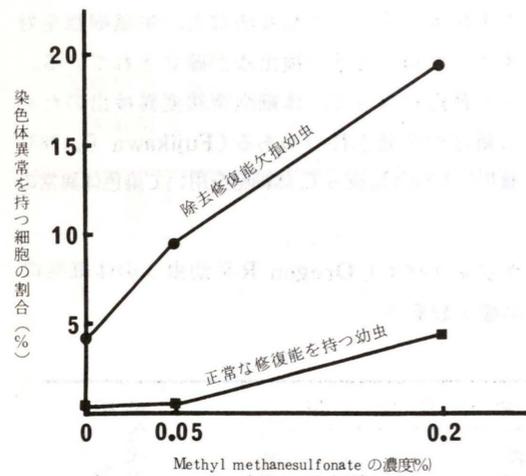


図17 Methyl methanesulfonate の染色体異常誘発作用に対する除去修復能欠損 *mei-9^a* 幼虫の反応

検出系が確立されれば、同一種について、DNA傷害、生殖細胞における突然変異、体細胞突然変異と染色体突然変異とを比較研究することが可能となり、変異原研究への寄与は大きいものと考えられる。また、哺乳動物を用いた in vivo, in vitro 染色体試験あるいは小核試験と、ショウジョウバエにおける染色体試験とを比較検討

することによって、本法の有用性を追求することも重要である。今後、幼虫の処理方法（投与方法）、細胞周期、染色体異常の経時変化と至適サンプリング時間、濃度依存性、系統の感受性など、染色体試験を実施する上の基礎的問題について解明してゆく予定である。

文献

- 1) DeMarco, A., and Polani, S.: Induction of chromosome aberrations by chemical mutagens in neural ganglia of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 107: 93-102 (1983).
- 2) Fujikawa, K., Inagaki, E., Uchibori, M., and Kondo, S.: Comparative induction of somatic eye-color mutation and sex-linked recessive lethals in *Drosophila melanogaster* by tryptophan pyrrolisates. *Mutat. Res.*, 122: 315-320 (1983).
- 3) 藤川和男, 梁治子, 近藤宗平: ハエの翅毛スポットテスト - 近ごろ注目されている短期試験法 - 環境変異原研究, 6: 107-113 (1984).
- 4) Gatti, M., Tanzabella, C., and Olivieri, G.:

Analysis of the chromosome aberrations induced by X-rays in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 77: 701-719 (1974).

- 5) 木村善昭, 山本好一, 一ツ町晋也, 菊池康基: 優性致死作用解析のためのマウス初期胚における染色体観察法. *染色体*, II-29: 900 (1983).
- 6) 木村善昭, 一ツ町晋也, 鮫島顕二, 菊池康基, 藤川和男: ショウジョウバエの体細胞染色体観察法. *染色体*, II-33: 1037 (1984).
- 7) Sumner, A. T.: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell Res.*, 75: 304-306 (1972).
- 8) Tonomura, Y., and Tobari, Y. N.: Karyotype variations in *Drosophila pseudoananassae* from Kandy, Sri Lanka. *Jpn. J. Genet.*, 53: 63-66 (1978).
- 9) Tsuji, H., and Tobari, I.: Detection of sister chromatid exchanges in vivo in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 62: 389-392 (1979).

ハエの翅毛スポットテスト

—— 近ごろ注目されている短期試験法 ——

武田薬品工業株式会社中央研究所 藤川 和男
 大阪大学医学部放射線基礎医学教室 梁 治子・近藤 宗平

1. はじめに

最近、チューリッヒ大学の研究者達によって、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下ハエ) の体細胞突然変異検出系が新たに開発された (Grafら, 1983)。これは翅毛スポットテスト系と呼ばれており、今までのハエの系には類例が無い程使いやすい試験系である。この翅毛スポットテスト系は、細菌を用いる変異原性試験の結果を検証する *in vivo* 系として有用であるかもしれない。このような期待が昂じて本稿を草した。

2. ハエの体細胞突然変異

まず、翅毛スポットテスト系を理解する上で重要と思われる事柄について述べておこう。

(1) 成虫原基と体細胞突然変異

図1に示しているように、25℃の恒温条件下では、ハエの受精卵はおよそ10日後には

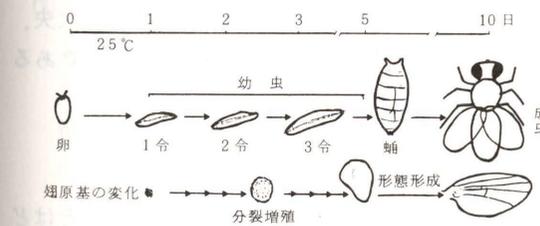


図1 ハエの発生と翅原基の変化

成虫になる。その間、外見が大きく変化する。蛹から成虫への変化は特に顕著である。この変化は幼虫の体の激しい形変わりのように見えるかもしれない。しかし、幼虫の体を構成

していた器官や組織の大部分は成虫が羽化する前に破壊されてなくなってしまうのである。蛹の時期にホルモンの影響で大変態を起こして成虫の体の特徴づけるいろいろな器官をつくるのは成虫原基である。成虫原基とは、胚期に将来成虫の体の一部になるべく運命づけられた未分化な細胞群の総称で、幼虫の体の内部をよく調べてみると、そこかしこで見つけることができる。図1には、成虫原基の1例として翅原基を取り上げ、その変化の様子を示した。この例で代表されるように、成虫原基の多くは幼虫期間中(一部は蛹化開始直後)、細胞分裂を繰り返して大きくなり、変態に備える。幼虫は成虫原基の培養器で、成虫の外見は成虫原基のなれの果てと言える。

成虫原基の細胞も「成虫原基のなれの果て」の細胞も典型的な体細胞である。しかし、「成虫原基のなれの果て」では、もはや細胞分裂は行われないので、いくら強い変異原を成虫に投与しても、突然変異は生じない。体細胞突然変異を誘発するには、適当な「成虫原基の培養器」に変異原を加えなければならない。1個の細胞に生じた突然変異は、成虫体表面で、異常形質の斑紋(スポット)として検出される(図2参照)。ちょうどAmesテストにおいて、細菌1個がHis⁺に変異し、その菌が分裂増殖して大集落を形成したものを突然変異として検出するのと同様である。

(2) 体細胞突然変異検出系

図2には、現在よく使われているハエの体細胞突然変異検出系とそれらを用いて検出で

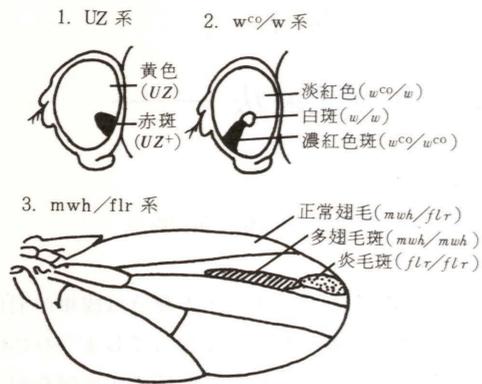


図2 ハエの体細胞突然変異検出系
UZ系の赤斑は体細胞遺伝子突然変異の結果。w^{co}/w系の白斑と濃紅色斑およびmwh/flr系の多翅毛斑と炎毛斑は、隣接して出現しているため、体細胞染色体組換えの結果(図3参照)。

きるスポットの例を示した。各検出系の名称は用いる幼虫の遺伝子型を指す。別の呼び方をすれば、UZ系やw^{co}/w系は眼色スポットテスト系、mwh/flr系は問題の翅毛スポットテスト系である。これら3つの系の中でUZ系は眼色の復帰変異を指標にする遺伝子突然変異検出系でトランスポゾンを利用している(Rasmusonら, 1978)。このUZ系のように遺伝子突然変異のみを検出する系は、ここ半世紀の間に、ハエの体細胞における遺伝的変化を検出するために開発された多くの系の中では例外的なものである。ハエの体細胞突然変異検出系といえば、通常は、体細胞染色体組換えが検出できる系を意味する。図中のw^{co}/w系やmwh/flr系はこのような系である。

体細胞染色体組換えとは、成虫原基の細胞で、図3に示しているように、父方由来と母方由来の相同な染色体の間で染色分体レベルの交叉が生じ、両親にはみられない新しい組合せの染色体ができることである。その検出のための系では、父方由来の染色体と母方

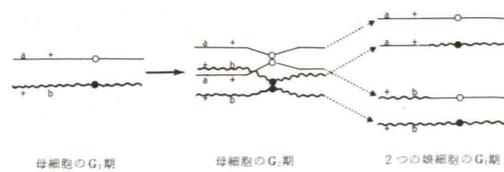


図3 体細胞染色体組換え検出系の原理
直線と波線は相同な染色体。aとbは各々の染色体を標識する劣性遺伝子。遺伝子型は母細胞がa/b、2つの娘細胞の一方がa/a、他方がb/b。

由来の染色体を異なるマーカーで標識し(図3, aとb)、両親の染色体をそのまま持っている細胞のクローン(遺伝型, a/b)と、新たな組合せの染色体を持つ細胞のクローン(遺伝子型 a/aあるいはb/b)が目で見えて区別できるような工夫がなされている。例えば、w^{co}/w系ではw^{co}/wが淡紅色、w/wが白斑、w^{co}/w^{co}が濃紅色斑のように、眼色の発現のしかたによって遺伝子型がわかるようになっている(Becker, 1966, 図2-2)。生物作用が未知な化学物質が細胞核内で遺伝的に有害な効果をもたらすか否かを手っ取り早く知るには、遺伝子突然変異のみを検出する系よりもこのような細工がほどこされている系の方が便利である。変異マーカーで標識された相同染色体を利用する系では、染色体組換えのみならず、遺伝子突然変異、欠失、染色体不分離なども検出できるからである(図5参照)。

3. 翅毛スポットテスト系

さて、翅毛スポットテストは、他の系とはどのような点で異なり、実際には、どのように使って、いったい何がわかるのであろうか。以下、具体的に述べる。

(1) 特色

mwh/flr系もw^{co}/w系も前述したように、同じ原理を利用し、検出しようとする遺伝的変化の

種類も同じである。しかし、別の観点から、翅毛スポットテスト系とw^{co}/w系を比較すると、次のような特色が明らかになる。

① 翅1枚には30000本の毛が密生しているので、変異形質の検出単位はハエ1匹当たり60000個となり、w^{co}/w系(個眼数/ハエ=1600個)よりスポットの検出感度ははるかに高い。これは比較的少数の個体を用いて実験が行えることを意味する。事実、発がん物質 hexamethylphosphoramide の変異原性を確認するのに要したハエの数は、w^{co}/w系を用いた場合には5000(Vogel, 1984)、mwh/flr系ではわずか100であった(Würglerら, 1984)。

② 翅毛スポットテスト系で利用する標識遺伝子mwh(multiple wing hair, 多翅毛)は、その名の如く、1個の細胞から複数の毛を分化させ、flr(flare, 炎毛)は毛の形をロウソクの炎のように変える。これらの変化はいずれも正常翅毛から容易に区別することができる。変異形質が形の異常であることと、その異常が発現する組織(翅)が平面構造体なので、観察に必要な翅の永久プレパラートが簡単につくれる。すなわち、実験結果の信頼性と客観性を保障することができる。

(2) 実験手順

図4には翅毛スポットテストに必要な交配を具体的に示した。図中の遺伝子型が一見複雑なのは、株の維持や、目的とするmwh/flr型の子孫の判別をスムーズにまわがいがなく行えるように細工がほどこされた結果である。大切なことは、mwh遺伝子を持つ株(mwh株)とflr遺伝子を持つ株(flr株)を交配すれば必要な幼虫が得られるということである。実際には、正しい株を入手して、一目でわかる体色のみを頼りに実験を行えばよい。以下、図中の番号に従って実験手順を概説する。

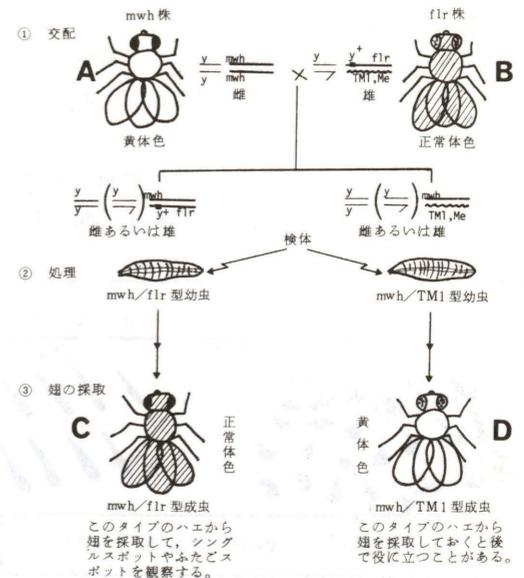


図4 翅毛スポットテストのための交配

- A. X染色体上に体色を黄色にする劣性突然変異遺伝子yellow(y)と第3染色体上にmwh遺伝子を同型接合でもっているため、黄色体・多翅毛を表現する。
- B. この株もy遺伝子をもっているが、第3染色体上にその対立遺伝子(優性)y⁺が挿入されているため、黄色体は発現せず正常な茶かっ色を呈す。TM1は複雑な逆位をもつ第3染色体。Me(Moiré)はそれを標識する優性突然変異遺伝子で眼色の濃淡差による雲状紋様眼を発現せしめる。flr遺伝子もTM1染色体も同型接合(flr/flr, TM1/TM1)で個体致死なので常にy⁺flr/TM1, Meの状態を維持される。
- C. 正常体色なのでflrを持っている。
- D. 黄色体なのでflrを持っていない。TM1の確認は雲状紋様眼で行う。

① 交配: 培地 10 mlを入れた管びん(4.5 cm² × 8 cm程度)中に、mwh株の処女バエ(A, 黄色いハエ)とflr株の雄バエ(B, 正常体色のハエ)を入れて交配・産卵させる。1びん当たり各々のタイプのハエを10匹ずつ入れて24時間後それらをびんから出し、さらに24時間経つと、培地上には十分な

数(100匹以上)の *mwh/flr* 型幼虫が生育している。1つの検体を1つの濃度でテストするには、このようなびんを2本用意すればよい(1本は陰性対照用)。

② 検体を幼虫に投与する: 投与可能な期間はふ化直後から蛹化直前までの4日間であ

る(図1参照)。最も簡単でかなり効率がよい投与法は、幼虫が生育している培地上に検体を含む溶液を1びん当たり0.25 mlずつ滴下する方法である。溶液にしにくい検体は、培地に混入すればよい。エサを喰わない幼虫は成虫にはなれない。幼虫の成長

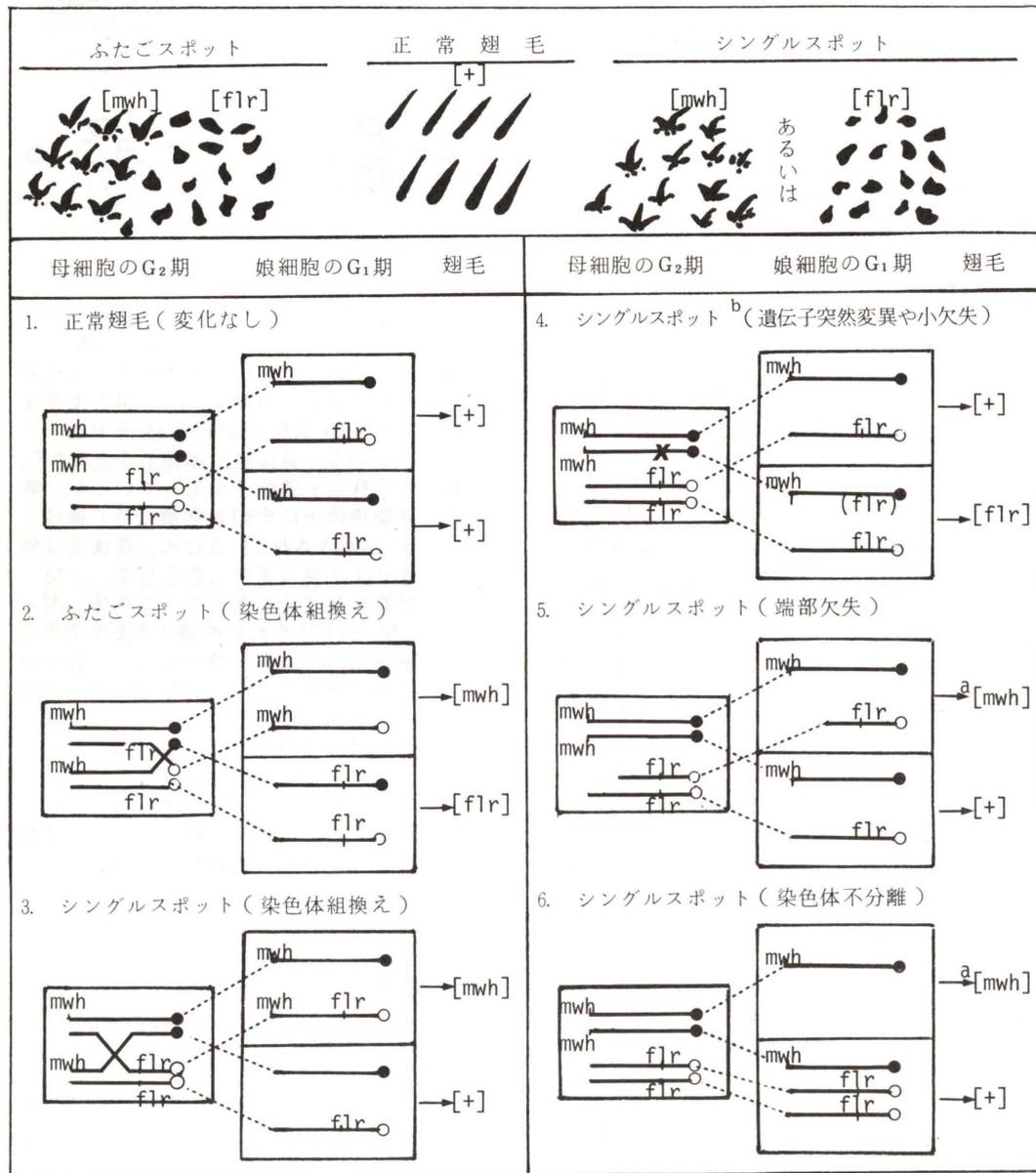


図5 翅毛スポットの分類と成因 a. 比較的小さなスポットとして出現。b. *mwh* の正常な対立遺伝子に生じた場合には多翅毛のシングルスポットになる。

に伴って気管系が発達してくるので、3令幼虫をガス状検体で処理することもできる。呼吸を拒否した幼虫も成虫にはなれないのでこれもごく自然な投与方法である。

③ 翅の採取: 幼虫期には *mwh/flr* 型個体は判別できないが、成虫になるとそのような個体Cは正常体色を呈すので問題はない。成虫が得られるとすぐに翅をむしって標本にしてもよいが、暇がなければ、*mwh/flr* 型(C)とか *mwh/TM1* 型(D)とかにこだわらずまとめて、70%アルコール中に保存しておけばよい。本当に必要なのは黒っぽい翅であるが *mwh/TM1* 型の黄色い翅も役に立つことがある。

なお、実験手順の詳細に関しては Graf ら(1984)を参照されたい。

(3) スポットの分類と成因

正常体色のハエ(*mwh/flr*型)からとった翅の標本ができあがると、顕微鏡(×400)でスポットを探す。図5に示しているように、検出されるスポットは炎毛の集落[flr]と多翅毛の集落[mwh]が隣接して出現する「ふたごスポット」と多翅毛あるいは炎毛のみからなる「シングルスポット」に分類できる。前者のスポットは染色体組換えが生じた証拠とみなすことができる(図5, 2)。一方、「シングルスポット」は、染色体組換えのみならず、遺伝子突然変異や小欠失、端部欠失、および染色体不分離からも生ずる(図5, 3-6)。これらの遺伝的変化のうち、端部欠失や染色体不分離による異数体は、細胞の分裂能を著減させたり細胞死の原因となる。それ故、そのような変化を持った細胞の多くは、たとえ生き残ったとしても、異常毛1~2本からなる「小さなシングルスポット」として出現するしかない。換言すれば、異常毛3本以上からなる「大きなシングルスポット」の主な成因は染色体組換えと遺伝子突然変異や小欠失

である。

調べた検体が遺伝子突然変異や小欠失を誘発する効果をもっているかどうかをはっきりさせる必要が生じた場合には、同じ処理実験で得られた黄色いハエ(図4D, *mwh/TM1*型)の翅も観察すればよい。複雑な逆位を持つTM1染色体と逆位を持たない *mwh* 染色体の間で染色体組換えが生じて、致死性あるいは細胞分裂能を著減させるような組換え体しかできない。黄色翅の表面には、染色体組換えに起因する大きな多翅毛集落は出現しないのである。従って、そこで「大きなシングルスポット」が検出できれば、その大部分は遺伝子突然変異や小欠失の結果とみなすことができる。

4. 翅毛スポットテストの意義

前章で紹介した翅毛スポットテスト系を用いてすでに100種近くの化学物質の変異原性が確認されている(Würglerら, 1984; Grafら, 1984; Würgler, 私信)。その中には、サルモネラ菌株のTAシリーズや大腸菌のWP2系統の株のいずれにおいても復帰変異を誘発しないものも含まれている(坂本1984, 坂本, 私信)。主な物質名を列挙する。

Benzene, Caprolactam, Hexamethylphosphoramide, Methotrexate (MTX), Procarbazine (PCZ), Safrole, o-Toluidine, Vinblastine

これらの内、MTXとPCZ以外は、枯草菌を用いるDNA損傷性試験(生存菌計数Rec-assay)においても、何ら生物学的効果が検出できない(坂本, 私信)。図6に、同様な例として5-FUのマスク化合物tegafurに関して得られた結果をまとめている。この物質は細胞内で代謝されて、チミジル酸合成阻害剤として作用する。イーストにおいて、チミジル酸欠乏は、遺伝子突然変異は誘発しないが、染色体組換え頻度を

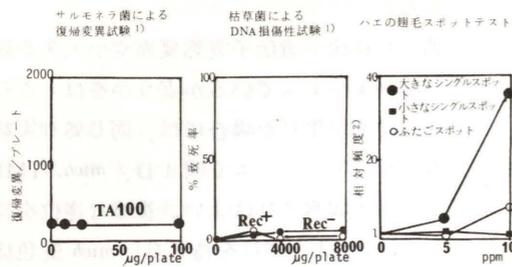


図6 細菌とハエにおける tegafur の変異原性効果 1) 坂本(1984)より。2) 対照群における翅1枚当たりのスポット数を1とする。3) 培地中の濃度。

著増させる(Haynesら, 1982)。tegafurによる翅毛スポットの誘発は, もしかしたら, イーストの場合と同様な機構によるものかもしれない。この点は今後の研究で明らかにしたい。

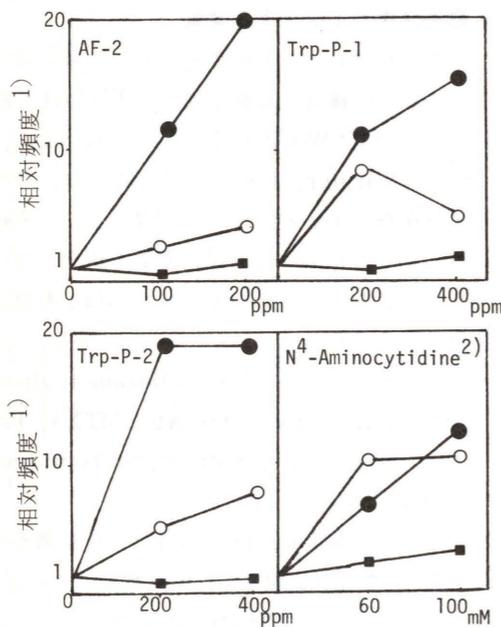


図7 細菌を用いる復帰変異試験で強い効果を示す化学物質の翅毛スポット誘起能 1) 対照群における翅1枚当たりのスポット数を1とする。2) 根岸友恵(岡山大)との共同研究より。N⁴-amino-cytidineは3令幼虫が生育している培地上に, この溶液を滴下して処理。他の検体は培地中に混入, ●大きなシングルスポット, ■小さなシングルスポット, ○ふたごスポット

ただ, 翅毛スポットテスト系が, 染色体組換えを利用しているため, 真核生物の細胞に対してしか生物学的作用を示さない物質が, この系で検出できることは期待してもよい。

しかし, 現実問題として, 簡便な in vivo テスト系に求められるのは, 細菌の試験において見つかった変異原が, 高等真核生物においてはどのような効果を示すかの検証である。図7には, サルモネラ菌あるいは大腸菌に対して, きわめて強い遺伝子突然変異誘起作用をもつ AF-2 (KondoとIchikawa-Ryo, 1973), トリプトファン加熱分解物 Trp-P-1, Trp-P-2, (Nagaoら, 1977) および N⁴-aminocytidine (Negishiら, 1983) に関して得られた翅毛スポットテストの結果をまとめている。この図より, これらはいずれもハエ翅原基細胞においても, 変異原性効果を示すことがわかる。しかし, super mutagen とはみなせない。原核生物における変異原性の強弱の概念は, 真核生物多細胞系においてはそのまま通用しないのである。

ハエの翅毛スポットテスト系は, バクテリアを用いる復帰変異試験の疑陰性結果を補い, さらに陽性結果の過大評価をチェックする上ですぐれた短期 in vivo 試験系として期待してもよさそうだ。

5. おわりに

ハエの翅毛スポットテストのことをチューリッヒ大学の研究者達は SMART と称している。Somatic Mutation And Recombination Test の略である。このテスト系を用いるとわれわれ自身がスマートになるような気がするから不思議だ。バクテリアの試験で得られた結果だけで一喜一憂する時代は過ぎつつある。

文 献

1) Becker, H. J.: Genetic and variegation mosaics in the eye of *Drosophila*. *Curr. Topics*

Develop. Biol., 1: 155-171 (1966).

2) Graf, U., Juon, H., Katz, A. J., Frei, H. J., and Würgler, F. E.: A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutation Res.*, 120: 233-239 (1983).

3) Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., and Kale, P. G.: Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6: 153-188 (1984).

4) Haynes, R. H., Little, J. G., Kunz, B. A., and Barclay, B. J.: Non-DNA primary target for the induction of genetic change. In, *Environmental Mutagens and Carcinogens* (Sugimura, T., Kondo, S., and Takebe, H. eds.) Univ. of Tokyo Press, 121-128 (1982).

5) Kondo, S., and Ichikawa-Ryo, H.: Testing and classification of mutagenicity of furylfuramide in *Escherichia coli*. *Jpn. J. Genet.*, 48: 295-300 (1973).

6) Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., Seino, Y., Honda, M., Matsukura, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Tsuji, K., and Kosuge, T.: Mutagens in foods, and especially pyrolysis products of protein. In, *Progress in Genetic Toxicology* (Scott, D., Bridges, B.

A., and Sobels, F. H., eds.) Elsevier North Holland, 259-264 (1977).

7) Negishi, K., Harada, C., Ohara, Y., Oohara, K., Nitta, N., and Hayatsu, H.: N⁴-Aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity. *Nucleic Acid Res.*, 11: 5223-5229 (1983).

8) Rasmuson, B., Svahlin, H., Rasmuson, Å., Montell, I., and Olofsson, H.: The use of a mutationally unstable X-chromosome in *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing. *Mutation Res.*, 54: 33-38 (1978).

9) 坂本豊: 抗腫瘍性薬物の変異原性複合試験系の検討。大阪大学医学部博士論文 (1984).

10) Würgler, F. E., Graf, U., and Frei, H.: Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. In, *Collaborative Study of Short-Term Test for Carcinogens* (Ashby, J., de Serres, F. J., Draper, M., Ishidate, M. Jr., Margolin, B., Matter, B., and Shelby, M. D., eds.) Elsevier North Holland (in press).

11) Vogel, E. W.: Activity of 10 compounds in the *Drosophila* somatic recombination and mutation (SRM) using the w-w^{CO} system. *Ibid.* (in press).

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

4. 変異原の検出と環境汚染

Faint, illegible text at the bottom right of the page.

青綿を用いる環境変異原の検出法

岡山大学薬学部 早津 彦哉

1. はじめに

ブルーコットン(青綿, あおわた)は, 脱脂綿を青色素, 銅フタロシアニン誘導体, で染めたものであり, 多環式有機化合物を特異的に強く吸着する性質があるため環境中の変異原物質の分離検索に用いられる。どのような経過でこの新吸着剤が開発されるに至ったか, どのような利用ができるか, などを以下のべたい。

2. チョークの中の変異原性

私は大学に勤務しているので, 講義をする義務がある。講義は, 黒板に字を書いては消し, 書いては消し, の作業である。いつもその際に気にかかっていたことは, チョークの粉末を吸い込むことである。そこである時, 黒板のチョーク受けに貯った粉を集めて実験室へ持ち帰り, その変異原活性を調べることにした。講義室から持ち帰ったチョークの粉をメタノールで抽出し, 抽出液についてサルモネラ菌 TA98, +S9, によって変異原性を調べたところ, 陽性の結果を得た。この粉はいろいろな色のチョークの混りである。そこで, どの色のチョークがこの変異原性の原因となっているかを次に調べた。すると青チョークが, 原因であることがわかった。白チョークが陰性なので, 青チョーク中の青色素に変異原が存在することはすぐ想像された。色々なブランドの青チョークを買い集めてテストしたところ, 全部ではないが大部分のものが変異原性を示した。結局, これら陽性を示したチョーク製造に用いられた青色素に問題があることがわかり, 製造元の工場の人と対策を協議することとなった。この色素は銅フタロシアニンであるが, 純品の銅フタロシアニンには変異原性はないこともわかった。従って, 色素の

製造過程で混入してくる不純物が原因であろうということになった。実際, この色素をメタノールで抽出すると, 無色の物質が得られ, 強い変異原性が認められた。この変異原物質の正体は何かということも興味ある問題であり, すでに解決しているが, ここではふれない(Hayatsuら, 1984)。この物質は銅フタロシアニン製造の際の副産物として微量に出来てくるものであり, 製造工程を変えることによって, 生成を防げることがわかった。こうして, 現在では青チョークには変異原性はなくなった(Hayatsuら, 1983a)。

この一連の経過の中で, 染料や色素について勉強する必要が生じ, 銅フタロシアニンの構造式(図1)を眺めることとなった。そこでふと気がついたことは, この化学構造がポルフィリン化合物, ヘミン(図1)とよく似ていることである。私達は, 次にのべるような理由でヘミンの性質に興味を抱いていた。

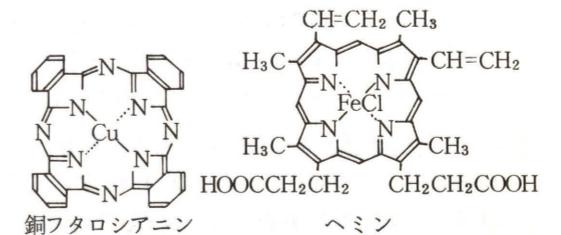


図1 銅フタロシアニンとヘミン

3. ヘミンは多環性変異原と複合体を作ることによって変異原活性の発現を妨害する

5年程以前にさかのぼるが, 私達は, 変異原が生体内のいろいろな分子との相互作用によってその活性が変る様子を知りたいと思い, Amesテストを行う時に生体構成成分を添加してみることにした。対象とする変異原としては, タン

パク質を焼いたときに生ずる強い変異原物質であるTrp-P-1, 発がん物質の代表のように思われているベンゾ(a)ピレン, その他いくつかのものを選んだ。また添加する修飾剤としては生体内低分子物質をとりあげスクリーニングしていった。すると血色素由来のヘミンが変異原性の抑制作用があることがわかった(Arimotoら, 1980a; Arimotoら, 1980b)。この抑制作用は, Trp-P-1, ベンゾ(a)ピレンそのほかの三環以上の縮合多環化合物に対して強く起る。しかし4NQO, AF2, ニトロソジメチルアミンなど, 二環以下の物質の活性には影響しなかった。ヘミンは広い平板状の構造であり, 他の多環平板状の化合物と板の積み重なったような形をした複合体を作るのではないかと想像された。ヘミンとTrp-P-1, 9-アミノアクリジン, 2-アミノアントラセンなどを混ぜると, ヘミンの吸収スペクトルに大きな変化が生ずるところから, 水溶液中でヘミンとこれら多環物質が相互作用していることは明らかである。このことからヘミンが多環性変異原物質と複合体を作ることによって変異原の働きを妨害するものと考えたとよいことがわかった。ところでAmesテストでは, これらの変異原の活性はTA98菌でS9存在下で検出する。すると, S9の働きに対する妨害かも知れないという可能性がある。そこでTrp-P-2の活性型として知られるN-OH-Trp-P-2に対するヘミンの作用を調べたところ, Trp-P-2に対する同等に強い阻害がかかった。ヘミンとN-OH-Trp-P-2の混合物のスペクトルからも両者が相互作用していることは明らかであった。これらの実験事実から, ヘミン分子は, 多環化合物とくっつく性質があり, 多環物質がもし変異原ならば, その活性を妨げると考えられた。

4. 銅フタロシアニン誘導体も多環性変異原と複合体を作る

銅フタロシアニンの構造がヘミンに似ていて, なおかつその構造の平面部分が広いところから, これも多環化合物とくっつくのではないかと想像された。銅フタロシアニンそのものは水に全く溶けないので, 水中に溶けている変異原物質との相互作用を見ようとするのに都合が悪い。フタロシアニン骨格にスルホン酸基を入れて, 水に溶けるようにした誘導体があるので, これを用いてヘミンの場合と同様に吸収スペクトル変化で検討したところ, 期待したように, 多環化合物とだけ相互作用が起ることがわかった。

5. 銅フタロシアニン-スルホン酸誘導体を固着したセルロースは多環性化合物を強く吸着する

このように, ヘミンや銅フタロシアニンは多環性化合物と特異的にくっつく性質があることがわかったので, この性質を利用すれば, 多環性変異原物質の吸着剤を作ることができるだろうと考えた。幸い銅フタロシアニン-スルホン酸誘導体は, いろいろと知られており, これを適当な支持体の上に共有結合で付けることは容易に行い得ると思われた。支持体として何を選ぶかが大きな問題であるが, セルロース, それも脱脂綿を選んだ。脱脂綿は止血に用いることは誰でも知っているが, これは表面積が大きいことによる。脱脂綿を水につけると大きく膨潤するので水中の試料を吸着しようとする場合には接触効率がよいと考えられる。また, 試料液からとり出すのも簡単なので, バッチ方式で操作が出来るなどの利点もある。

脱脂綿にReactive blue 21を働かせると, 図2に示す反応が起って, セルロースの水酸基が銅フタロシアニンと結合した。この結合はエーテル結合なので, 容易には切断されない安定なものである。また, 綿という固体上での反応は再現性にとぼしい恐れがあったが, 幸い反応

条件を一定にすると再現性よく1gの綿当たり約10 μ molの銅フタロシアニン残基が結合したものが得られた。

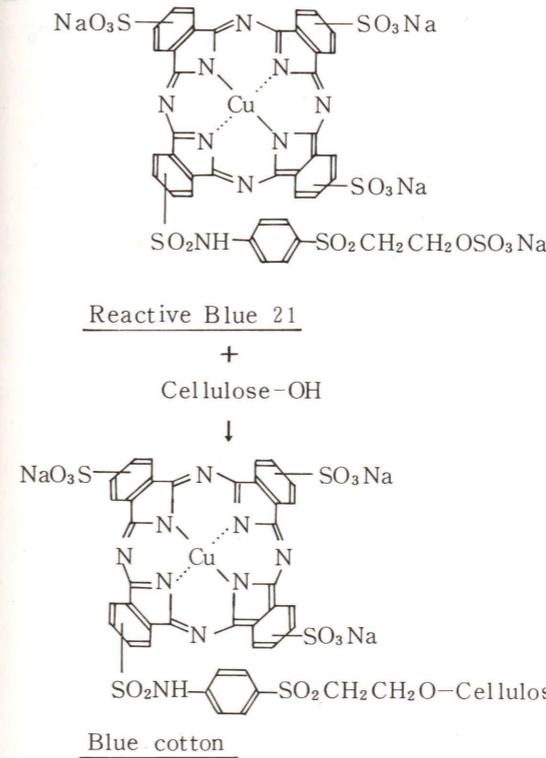


図2 青綿の製造法

こうして得られた青色の綿は, 期待通り多環性の平面構造を持つ化合物を非常によく吸着した。変異原物質を中心として多数の化合物について吸着度を調べた。また, 対照実験としては, 単なる脱脂綿(白綿), および青綿製造の過程で弱アルカリ処理を行うので, そのような処理を(色素なしで)ほどこした脱脂綿を用いて吸着を行った。吸着した化合物を青綿から脱着して溶かし出すのは, いろいろ試みた結果, メタノールにアンモニア水を少量加えた液を用いるのがよいことがわかり, それによって行った。

表1にいくつかの代表的な例を示してある。これで見るとわかるように, 芳香環が3つ以上

縮合(fuse)した形の化合物はよく吸着し, それが2つ以下になると, 急激に吸着率は悪くなる。また白綿にもある程度吸着は起るが, その率は青綿に比べて格段に低い。白綿を弱アルカリ処理しても元の白綿と変わらない結果を与えた。このことは吸着が青色素依存的に起っていることを示している。表にはないが, このほか数十種類の化合物をテストした結果, 3環以上の化合物で, 平面性構造を持つものは殆んどすべて強く吸着された。この中にはアフラトキシンB₁のように, 一部分 alicyclic な構造を持ち, 完全に平面的な構造というわけではないものも含まれている(Hayatsuら, 1983b; 早津, 1983)。

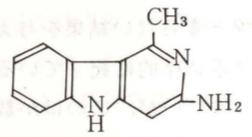
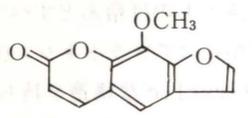
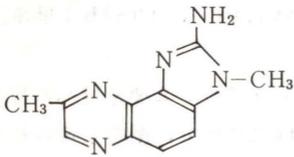
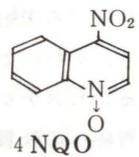
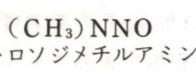
Amesテストはヒスチジン非要求性への復帰変異を観察する実験系なので, 菌を生育させる寒天培地にはヒスチジンは極く微量しか添加していない。もし変異原性を調べる未知試料中にヒスチジンが入っていると, それによって偽陽性の答えを得る恐れがある。ヒスチジンは芳香性5員環が一個あるが, 青綿への吸着度は低いと予想される。これを放射性ヒスチジンを利用して調べてみると, 0.1%以下の吸着度であり, 殆んど問題とならない程度であるとわかった(KobayashiとHayatsu, 1984)。

6. 青綿を用いて環境変異原を簡単に検出できる

上にのべた吸着は, 多環性変異原が希薄に溶解している水溶液中で起る。Trp-P-1について液性の変化, 塩濃度の影響, 吸着の起る速度など調べると, pH4-9で変化しないこと, 食塩の濃度は変えても影響はないこと, 吸着は1分間以内に急速に起ることなど, 都合のよい点が明らかとなった。

環境中の変異原物質の多くはごく微量にしか存在しないため, それらを分離, 検出するのは容易でない場合が多い。さらに共存物質によって変異原活性がマスクされてしまう場合もある。

表1 代表的な変異原物質の青綿と白綿(脱脂綿)への吸着

化合物	濃度 (μM) (生理食塩水)	青綿への 吸着率	白綿への 吸着率	青綿から抽出 して得られる 総回収率
 Trp-P-2	0.2	93%	33%	93%
 メトキシフラベン	100	98%	8%	98%
 MeIQx	4	92%	6%	89%
 4NQO	50	11%	0%	—
 ニトロソジメチルアミン	0.1	0%	—	—

多環構造を持つ変異原は多数あり、知られている変異原全種類のうち約1/4を占めている。とくに、食べ物の加熱調理で生成する変異原は人間が摂取するため関心が持たれているが、一連の構造既知のものは殆んどすべて三つの縮合環を持っていて、青綿への吸着が強く起る。従って青綿を用いて、食べ物など環境のサンプル中の変異原の有無、その強さを容易にモニターできると考えられる。図3に、混合物中からの多環性変異原の分離の原理を示してある。

7. 染毛剤の変異原性

青綿を用いると有効な一例をあげよう。染毛剤には変異原物質が入っていることが以前から知られている。市販の染毛剤をスーパーマーケットで買って来て調べてみた。色素液と酸化液に分れているタイプのものであったが、色素液そのものを1滴(50 μl)あるいはその1/10としてAmesテスト(TA98, +S9)しても陰性であった。しかしこれを水でうすめてから青綿を少量使って吸着し、メタノール-アンモニアで抽出したところ、1滴分でHis⁺復帰コロニー数が3,400出た。またその1/10でも320コロニー



図3 青綿への変異原の吸着と脱着

が出現し、強い陽性を示した。もとの液で陰性なのは、共存している化合物による妨害と考えられる。この実験では、操作中の光酸化の可能性を除くため、暗所で操作を行っている。この青綿処理は、操作が簡単で、時間もごく短かくて済む。ほんのわずかの時間で、変異原性が検出できるようになった例である。

8. 喫煙者の尿の変異原性

タバコを吸う人の尿には変異原性があることが知られている。Amesら(1974)およびCommonerら(1974)は、別の目的で尿そのものをサルモネラ菌とまぜてテストしていたが、喫煙者の尿では変異原性が低いためその方法では検出できない。そこでYamasakiとAmes(1977)はAmberlite XAD-2樹脂(スチレン-ジビニルベンゼン共重合体)をカラムにつめて、尿を通し、非極性化合物(変異原を含む)を吸着させ、カラムを水洗したのちアセトンで溶出する方法を案出した。この方法によって喫煙と尿中変異原性との因果関係を明らかにしたのである。

その後、多くの研究者が尿の変異原性を調べるようになった(根岸と早津, 1983)。喫煙以外の要因として例えば薬剤曝露との関係(Falckら, 1979; Nguyenら, 1982)、食事との関係(Bakerら, 1982)、なども研究対象となっている。しかしながら、変異原性テストのための前処理が時間と労力を要するため、多数のサンプルを調べることは容易ではない。また一日分の尿を集めて処理するような場合、カラムを通過させる時間も長くなる。喫煙開始と尿中変異原出現との経時的追跡のような場合、多数のサンプルを短時間で処理する必要があるため、研究遂行が困難となる。青綿を用いればこの「前処理」はごく簡単になるので、このような目的の研究が行える。図4は私達が行った経時的追跡の結果の一つである。こ

のように尿中の変異原性は、喫煙に対する急性の応答であることがわかった。長い年月喫煙していた人が禁煙して、半年以上経過した場合の尿をいくつか調べたが、いずれも陰性であったことも上の結果と矛盾しない。XAD法との感度の比較も行ったが、6例中5例について青綿法の方が高感度であった(表2)。なお、Sep-Pak法も比較してみたが、これは感度が非常に低かった(KobayashiとHayatsu, 1984)。

青綿法は、XAD-2法とちがって、予じめカラムを作る手間が不要である。大容量の尿の多数のサンプルを処理するのに適している。例えば、100ml以上の尿5サンプルを、実験者1人で前処理して変異原性テストの段階までもっ

表2 喫煙者の尿の変異原性。青綿法とXAD-2樹脂法の比較

サンプル	尿100mlによるHis ⁺ 復帰コロニー数 (サルモネラ菌TA98, +S9)					
	A-1	A-2	A-3	B	C	D
青綿	190	216	274	480	392	674
XAD-2	30	175	491	386	158	497

A-Dの喫煙者の午後3時頃の尿。各200mlを2等分して青綿法あるいはXAD-2法で処理した。

ていくのに、4時間以内で完了することができる。

9. 食品の変異原性の検索

焼いた牛肉中の変異原性を調べたり、変異原物質を抽出濃縮するのに青綿は役に立つ。牛のひき肉をフライパンでこげ目がつくまで焼き、お湯で煮出す。この煮出し液に青綿を入れて吸着を行うと、生肉2.5g当り300-400His⁺復帰コロニーが得られた。この抽出で得られる油状物質は、再び水にかし直して青綿吸着する操作をくり返すことによって、変異原性をあまりロスしないで精製することができる。この

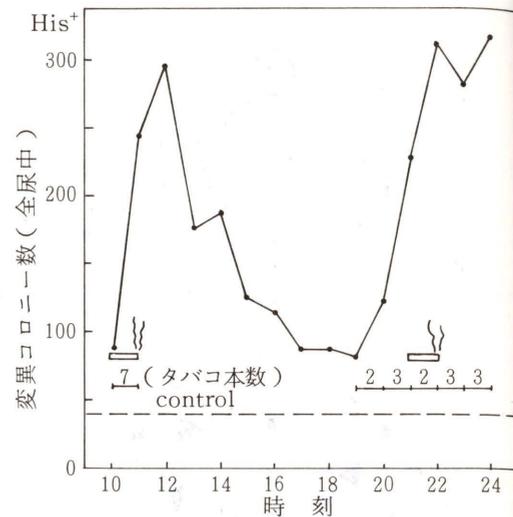


図4 喫煙と尿中の変異原性出現との時間的關係(22歳男子が禁煙2日後に実験)

ような青綿処理サイクルを3回行うと、200g生肉から1㍉以下の抽出物が得られ、変異原の回収率は初めの青綿処理後のものの約50%であった(Hayatsuら, 1983c)。

食品の変異原性をスクリーニングしたい時、大量の共存物質の影響で検出困難ことが多い。青綿は簡便な方法なのでこのような目的に用いるのに好適であると思われる。固型物が混っていたり、かゆ状のものであっても、青綿を水透過性の袋(ティーバッグのようなもの)に入れて使えば、あまり能率を落さないで吸着ができる。

国立がんセンターの佐藤茂秋, 杉村隆両博士

らは、最近アミノ酸、糖およびクレアチニンの混合物を焼いて得た「こげ」から、新しい構造の変異原物質dimethyl IQxを単離することに成功したが、この実験で青綿が役立っている(Negishiら, 1984; Jägerstadら, 1984)。

10. 環境の水域の変異原性

河川の水質の被検項目の一つとして、変異原性がしばしば取り上げられる。今後、工場の排水、プール水、海水なども調査対象となることが多くなるとされる。青綿はこのような目的にも応用できる。対象とする水をくみ上げて調べる場合にも利用できるであろうが、もっと簡単な使い方は、直接その水域に青綿を浸す方法である。例えば、岡山市を流れる旭川について上流から河口近くまで多くの地点に青綿各1gをつるし、24時間後集めて調べたところ、TA98, +S9でのHis⁺復帰コロニー数が市域へ入る少し上流で40、市域に入ると400、河口付近の工場地域で1,000-2,000という値を示した(Hayatsuら, 1983b)。このように、環境水域の変異原性を簡単にモニターできる。高い汚染水域を見つけたいような場合、最適の方法であろう。

11. 綿以外の担体

セルロースパウダーにも、綿の場合と同様にこの色素が固着できる。これをカラムにつめてクロマトグラフィーを行うと、銅フタロシアニンに対するアフィニティの強さの差によって、変異原相互の分離が可能である(石津ら, 1983)。この技術は、現在さらに開発中である。

またシリカゲルに銅フタロシアニンを固着することもできるので、高速液体クロマトグラフィーのカラムとすることもできる。これを用いた変異原相互の分離が可能と考えられ、すでに

かなりの成果をあげることができた(小林ら, 1984)。

12. おわりに

青綿は思わざる経緯で、たまたま発見された新しい素材である。その利用は、これからいろいろと収穫をもたらす可能性を持っている。実際、青綿を利用することによって、いろいろなところに変異原性が見つかりはじめている。一方、青綿は万能ではなく、変異原全体の一部しかつかまえられる。ニトロソアルキルアミンなど、青綿で捕捉できないものを目標にして研究を進めることも大切である。

文 献

- 1) Arimoto, S., Ohara, Y., Namba, T., Negishi, T., and Hayatsu, H.: Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem, Biophys. Res. Comm.*, **92**: 662-668 (1980 a).
- 2) Arimoto, S., Negishi, T., and Hayatsu, H.: Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Letters*, **11**: 29-33 (1980 b).
- 3) Baker, R., Arlauskas, A., Bonin, A. and Angus, D.: Detection of mutagenic activity in human urine following fried pork or bacon meals. *Cancer Letters*, **16**: 81-89 (1982).
- 4) Commoner, B., Vithayathil, A.J., and Henry, J.I.: Detection of metabolic carcinogen intermediates in urine of carcinogen-fed rats by means of bacterial mutagenesis. *Nature*, **249**: 850-852 (1974).
- 5) Durston, W.E., and Ames, B.N.: A simple method for the detection of mutagens in urine. Studies with the carcinogen 2-acetyl-

- aminofluorene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 737-741 (1974).
- 6) Falck, K., Grohn, P., Sorsa, M., Vainio, H., Heinonen, E., Holsti, L.R.: Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. Lancet, 1250-1251 (1979).
- 7) 早津彦哉: 変異原の吸着. トキシコロジー, フォーラム, 6, No. 3: 40-47 (1983).
- 8) Hayatsu, H., Matsui, Y., Ohara, Y., Oka, T., and Hayatsu, T.: Characterization of mutagenic fractions in beef extract and in cooked ground beef. Use of blue-cotton for efficient extraction. Gann, 74: 472-482 (1983 c).
- 9) Hayatsu, H., Ohara, Y., Hayatsu, T., and Togawa, K.: Mutagenicity of chalks. A case in which the test results led to the improvement of the quality of commercial goods. Mutation Res., 124: 1-7 (1983 a).
- 10) Hayatsu, H., Ohara, Y., Murano, A., and Nakai, K.: Characterization of a mutagen that was present in blue-chalk as impurity (abstract of a paper presented at the 12th annual meeting of the environmental mutagen society of Japan, 28-29 October 1983, Tokushima). Mutation Res. in press (1984).
- 11) Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H., and Arimoto, S.: Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfocopper-phthalocyanine. Mutation Res., 119: 233-238 (1983 b).
- 12) 石津由美子, 小林浩, 小原淑子, 早津彦哉: ブルーセルロースによる変異原の分離. 日本環境変異原学会第12回大会講演要旨集, p.55 (1983).
- 13) Jägerstad, M., Olsson, K., Grivas, S., Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., and Sugimura, T.: Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose. Mutation Res. 126: 239-244 (1984).
- 14) Kobayashi, H., and Hayatsu, H.: A time-course study on the mutagenicity of smoker's urine. Gann, 75: 489-493 (1984).
- 15) 小林浩, 石津由美子, 早津彦哉: 多環性変異原を分離するための高速液体クロマトグラフィーの開発 - ブルーシリカ担体の利用. 日本薬学会第104年会講演要旨集, p. 619 (1984).
- 16) Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., Sugimura, T., Saito, H., Maeda, M., and Jägerstad, M.: Formation of 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline, a new mutagen, by heating a mixture of creatinine, glucose and glycine. Mutation Res., 140: 55-59 (1984).
- 17) 根岸友恵, 早津彦哉: ヒト排泄物および体液中の変異原物質. 代謝, 20, 臨時増刊号「癌'83」p. 41-49 (1983).
- 18) Nguyen, T.V., Theiss, J.C., and Matney, T.S.: Exposure of pharmacy personnel to mutagenic antineoplastic drugs. Cancer Res., 42: 4792-4796 (1982).
- 19) Yamasaki, E., and Ames, B.N.: Concentration of mutagens from urine by adsorption with nonpolar resin XAD-2. Cigarette smokers have mutagenic urine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 3555-3559 (1977).

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 II ——

山陽学園短期大学家政学科食物栄養 村岡 知子・大下 市子*
安田 公子

1. はじめに

発がんと食生活の関連性が疫学的な研究からも強く示唆されている現在(富永 1984)実際に即した一般食品のもつ変異原性の測定を通して危険度の高い食品の, または, 調理方法の洗出しの必要性が, 高まって来た。これら多くの調理食品の変異原活性測定結果を蓄積することによって, より安全な食生活を守るため, 安全な食卓の調達のためにどのような配慮が望ましいかを考える指標を見出すことが可能になるはずである。

食品構成成分や, 食品材料, 調理食品などに存在する変異原物質の研究は, モデル実験などを通して多くの研究者によって進められ, 報告されている。(長尾 1982, 若林 1982, 全米科学アカデミー 1982)しかし, 多種多様な食品材料の組み合わせや調理方法の変化によって特徴づけられている調理食品の変異原性についての研究は今だ数少ない。それ故に, 我々は実際の食品の変異原活性について測定して来た。

食品中の変異原活性を微生物を用いて測定するに当たって, 我々が直面する事は, 混在する脂質と繊維質の処理方法である。幸い Hayatsu (1983)らによって, 考案された青綿法は, フレームシフト型変異原物質の回収に有効で, これらの混在物の障害が軽減され, 再現性高く測定出来るので, この方法により, 調理食品中のフレームシフト型の変異原活性を昨年に続いて測定し, 調理方法の相違により活性値の変動が示されることを調べたので報告する。

*現在, 大下学園短期大学家政学科

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 15 食分, 主食 6 種, スープ類 7 種, 副食 14 種, デザート 2 種。

家庭調理の手法に従って調製した, 27 種の調理食品を用いた。

(2) 変異原物質の抽出および測定

調理食品 1 食分について, 早津らの青綿吸着法(1982)を調理食品用に一部変更した抽出法(村岡 1982)を用い, 抽出物を 100 μ l のジメチルスルホキシドに溶解して試料とした。

変異原活性の測定には, *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。S-9 は, ラット肝にフェノバルビタールと, 5.6.ベンゾフラボン処理したラット肝から調製し 50 μ l を使用した。

3. 集団給食食品の変異原活性

成人女子昼食用に調製された大量調理食品 30 種の変異原活性を表 1 に示す。

TA 98 S-9 mix 存在下での His⁺ の復帰突然変異菌数は, ほとんど食品で 1 食当り, 100 個以下で, 自然突然変異数の 2~3 倍以内であり, 副食食品中に, メルルーサのたつた揚げ, スコッチエッグ, チキンチーズフライの 3 品のみが 100 個以上の変異原活性を示していたにすぎなかった。これらの結果は, 前年の測定値に比べて, 著しい相違はみられず, 有意の活性を示すものは認められなかった。

表1 成人女子昼食用集団給食食品の変異原活性

食品名	His ⁺ rev (TA98 +S-9)
主食	
雑煮	26
カレーライス	38
焼そば	62
スパゲティミートソース	38
マカロニグラタン	40
サンドイッチ(玉子・ハム・レタス)	21
スープ	
中華風スープ	93
さやいんげんとウィンナーのスープ	34
ポタージュ	36
コーンスープ	37
ほうれん草のスープ	48
あさりのチャウダー	42
にんじん入りスープ	57
副食	
サラダ	38
マカロニサラダ	38
ツナポテトサラダ	38
変わりハンバーグ(豆腐)	32
メルルーサのたつた揚げ	117
メルルーサのホイル焼き	29
ポークビーンズ	42
レバーのしょうが焼き	42
スコッチエッグ	182
肉(合びき) ダンゴ串焼き	45
チキンチーズフライ	137
ビーフストロガノフ	38
肉そぼろ(韓国風冷めん用)	82
とり肉のクリームコロッケ	72
デザート	
ミルクゼリー	42
カスタードプリン	33

表2 調理方法による比較

食品名	重量 g	突然変異コロニー数/1食 (TA98 +S-9)				
		焼く		煮る		
		塩焼き	照り焼き	ムニエル	みそ	しょう油
うなぎ	68.5		427			
ぶり	87.8	185	369			
		131	99			
さわら	56		61			
		50	222			
		55	284			
さんま	46.5		194			
		77	780			
		114				
さば	64.3	600		294		
		466		320		
	60			68		
	68.4			86		
かれい	68				69	44
					60	60
舌びらめ	125					54
						61
豚肉	55					
		1835 (ソテー)				
	105		1233 (しょう油ステーキ)			

これらの比較の高い変異原活性を示した食品は、昨年同様タンパク質を主材料とするもので調理方法は、揚げ物であった。

4. 調理方法による変異原活性の比較

一般家庭調理では、材料の性質によって、加熱調理方法が選択され、同じ材料でも多種の調理食品となって供される。この家庭料理の手法を用いて、我々の研究室で調製した食品について測定した変異原活性を表2に示す。

一般に焼いた食品と、煮た食品とでは、その活性には、加熱温度の影響が明らかに示されていた。

煮魚に比較して、焼いた魚の活性は、2~10倍のひらきがあり、焼き方によっても、活性物質の生成量に差が示された。直に素焼きにする場合に比べて、照り焼きにした場合に活性が低下する食品と、むしろ高く示される食品の2通りの結果が得られた。材料タンパク質とたれの成分により生成される変異原活性物質の多様性が示された。

塩焼きとムニエルでは、ムニエルの活性が明らかに低く、調理方法の違いが、活性物質生成に大きく影響を及ぼすことを示唆している。ムニエルにおいては、材料表面を小麦粉で被い油を用いて天板上で加熱調理するので、材料の受ける加熱温度は、直網焼きに比べて低温になる。その上、小麦粉による材料表面の被膜が水分蒸散を防ぎ、熱伝導を妨げるために、活性物質の生成量が、低下するものと考えられる。また、小麦粉糖質の役割りも同時に考えられる。

5. 付け合せ食品による変異原活性の変動

主菜に添えられる食品が、主たるタンパク性

食品のもつ活性に与える影響をみるために、両食品を一括物質液として活性測定した結果を表3に示す。

焼いた魚に添える大根オロシは、焼き魚の活性を抑制する効果を示した。しかし、この抑制効果は、一定ではなく、ここでも調理食品中に生成する活性物質の多様性が示唆された。

一方、集団給食で、1人分として配膳された食品を一括して総活性を測定した場合、一般に単品でみられた、その変異原活性が、そこに存在する食品相互作用によって抑制されていることが観察されたが、逆に調理食品相互での活性増強は示されなかった。

表3 添え物による影響

	重量 g	突然変異コロニー数/1食		添え物
		対照	添え物付	
豚肉 ソテー	105	1,835	143	大根
トンカツ	157	81	48	キャベツ
		52	38	
マグロ水煮 (マヨネーズ)	50	76	50	玉ネギ
		59	46	
塩焼き				
あじ	73.9	529	352	大根
			182	
	42.4	334	265	"
			266	
いとより	46	427	729	"
さけ	40	391	423	"
さんま	77	114	49	"
さば	91	268	117	"
たい	60	1,520	282	"
照り焼き				
ぶり	56	220	851	"
焼きなす	70	60	106	肉入りみそ

6. おわりに

以上、実際に自分達が食した食品を、一方で処理してそのフレームシフト型変異原活性を測定した結果を記したが、各食品中に生成する変

異原物質は、特に動物性タンパク食品の高温加熱時に顕著に生成され、同じ材料でも、調理条件・組み合わせる他の食品材料などによって、活性に変動が示されることが実証され、調理食品

クレアチニン, グルコース, アミノ酸混合物の加熱による MeIQx 及び新しい変異原 DiMeIQx の生成

国立がんセンター研究所

ルンド大学

東京大学医科学研究所

根岸 千恵・若林 敬二・津田 充宥
齊藤 肇・前田 満和・佐藤 茂秋
杉村 隆

Margaretha Jägerstad
村松めぐみ・松島泰次郎

1. はじめに

各種アミノ酸や蛋白質の加熱物, 又は焼魚や焼肉から分離されたヘテロサイクリックアミンは, サルモネラ菌や培養哺乳動物細胞に対し著明な変異原性を有している。(Nagaoら, 1983; SugimuraとSato, 1983 a,b) 更に, マウスにおいてテストされた7種のヘテロサイクリックアミンのすべてに, 発癌性が証明され, (Matsukuraら, 1981; Ohgakiら, 1984 a,b) ラットにおいても, そのいくつかに発癌性が証明されつつある。(Takayamaら, 1984 a,b) これらのヘテロサイクリックアミンのうち, IQ, MeIQ, MeIQxは, イミダゾキノリン又は, イミダゾキノキサリン骨格をもち, 亜硝酸処理により, 変異活性が失活しない等(Tsudaら, 1982) 他のヘテロサイクリックアミンとはやや異なる性質を示す。この3種の強力な変異原は, 最初, 焼肉や焼魚より単離され, (Kasaiら, 1980 a,b, 1981) 更に牛肉エキス等にもそれらの存在が確認されている。(Feltonら, 1984; Hargravesら, 1983; Hayatsuら, 1983a; Tureskyら, 1983) その前駆体については, 共通の骨格であるイミダゾール環は, 魚や肉に含まれるクレアチニン, 更にキノリン, 又はキノキサリン環は, アミノ酸と糖との加熱時のMaillard反応の生成物であるピリジン, 又はピラジンであることが推察された。(Jägerstadら, 1983; Matsushimaら, 1982) そこで, クレアチニン, グルコース及びアミノ酸(グリシン, スレオニン, アラニン)を含む

モデル混合物を加熱したときに, 実際これらのヘテロサイクリックアミンが生成されるかを検討した。

2. 材料及び方法

(1) モデル混合物及び加熱条件

クレアチニン, グルコース, グリシン又はスレオニンは, モル比として, 1.0:0.5:1.0の割合で14%の水を含むジエチレングリコール中で, 128℃ 2時間加熱した。アラニン混合物の場合は, 17%の水を含むジエチレングリコール中で125℃, 3時間加熱した。

(2) 変異原の精製

グリシン及びスレオニン混合物の場合は, 加熱混合物を水で10倍に稀釈し, XAD-2カラムに変異原を吸着させ, アセトンで溶出した。アセトン画分を, 酸塩基分配して, 塩基性画分をとり, セファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーで分画後, 活性部分を青綿(銅フタロシアニン系色素結合綿, Hayatsuら, 1983 b)に吸着させ, その吸着物質を, メタノール・アンモニア水混合液で溶出し, HPLCでさらに精製した。HPLCは, LS-410 ODS カラムを用い, 10 mMリン酸緩衝液:メタノール(55:45)で溶出した。アラニンの場合は, LH-20カラムクロマトグラフィーの後, シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び, MicroPak MCH-10カラムを用いたHPLCで精製した。

中の変異原物質の本体が, かなり多種多様であることを示唆していた。

本年度の発表の中に, 食品成分として, 常に存在するクレアチン, グルコース, グリシンを原料として, 加熱によりMeIQx, diMeIQxの生成すること(根岸1983)また, クレアチン, プロリンによりIQが, 生成すること(吉田1983)が示されたが, これらの結果は, 加熱食品中に生成するフレームシフト型変異原物質の多様性を裏付けるものであり, 賀田ら(1983)によって示された, Trp-p-1などの活性物質が野菜類の繊維を強く吸着して活性を除去すること, しかも一度吸着した活性は, 容易に遊離されないというモデル実験は, 我々の焼き魚や, 焼き肉で見られる活性の大根オロンによる低下の現象や食卓上に整えられた食品相互の活性の変動と一致することが示された。

今後, より広範囲の食品材料や調理方法の組み合わせによって, 実際に即した活性値のスクリーニングを続けていく一方で, 単に現象を追うだけでなく, 比較的高い活性を示した調理食品中の原因物質の化学的性質を究明する必要性を強く考えている。

この研究を進めるために, 青綿を提供して下さい, 数々の御指導と御助言を頂いた岡山大学薬学部・早津彦哉教授に感謝いたします。

また, 材料としての集団給食食品を提供して下さい, 調理食品調製に当って, 助言指導を下さった本学大橋良子教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Ames, B., McCann, J., and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalianmicrosome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31: 347-364 (1975)
- 2) Committee on Diet, Nutrition and Cancer, Assembly of Life Science, National Research Council, Diet, Nutrition and Cancer, National Academic Press, Washington, D. C., (1982)
- 3) Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, T., Hayatsu, S.T., Kobayashi, H., and arimoto, S.: Adsorption of mutagens to cotton brearing covalently bound trisulfocopper-phtalocyanine. *Mutation Research Letters*. 119, 233-238 (1983)
- 4) 賀田恒夫・加藤雅之・桐山修八; 野菜繊維の変異原吸着性について, 日本環境変異原学会・講演要旨集 144 (1983)
- 5) 村岡知子・大下市子; 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 — *環境変異原研究* 5: 22-24 (1983)
- 6) 長尾美奈子; 加熱分解によって生ずる変異原物質, 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ック, 128-150 (1980)
- 7) 根岸千恵・津田充有・若林敬二・佐藤茂秋・杉村隆; クレアチニン・グルコース・グリシン混合物の加熱による MeIQx 及び新しい変異原の生成, 日本環境変異原学会・講演要旨集 35 (1983)
- 8) 富永祐民・田島和雄・岡田啓; 癌の疫学の基礎資料(その2)癌の原因・リスクファクター, *トキシコロジフォーラム* 7: 177-186 (1984)
- 9) 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)
- 10) 吉田大輔・斎藤豊・水崎茂暢; クレアチン・アミノ酸混合物の加熱による 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] Quinoline (IQ) の生成, 日本環境変異原学会・講演要旨 109 (1983)
- 11) 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)

3. 結果

(1) クレアチニン、グルコース、グリシン混合物の加熱により生ずる変異原

この加熱混合物は、クレアチニン含有量 70 m mole のとき、 3.7×10^7 rev の変異活性を示した。また XAD-2 カラムから溶出した変異活性の大部分は、亜硝酸抵抗性であり、次亜塩素酸処理により失活した。青綿による精製までで、変異原の比活性は 7600 倍に上昇し、回収率 33% であった。HPLC での溶出パターンを図 1 に示す。変異活性は、大きく 2 つに

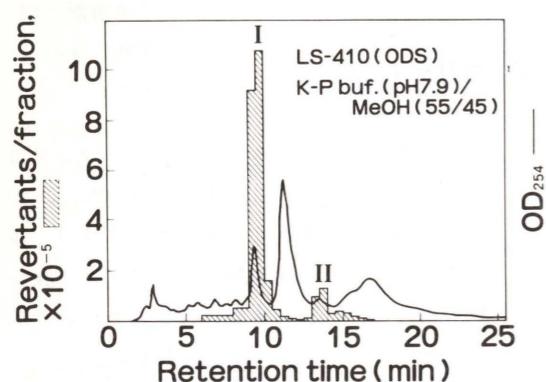


図 1 クレアチニン、グルコース、グリシン混合物の加熱により生ずる変異原の HPLC パターン

分れ、(ピーク I 及び II)、その比は、10:1 であった。ピーク I は、UV 吸収ピークとよく一致し、またその溶出位置は MeIQx と一致した。紫外吸収スペクトルも MeIQx と一致し、最大吸収は、214, 274, 及び 340 nm に認められた。質量スペクトル及び NMR スペクトルを、図 2 及び図 3 に示す。両スペクトルとも、MeIQx と一致した。なお、NMR スペクトル上の高磁場側の大きなピーク、その他のピークは、HPLC のカラムよりの溶出物や溶媒によるものと考えられる。これらの結果より、ピーク I は、MeIQx と同定した。

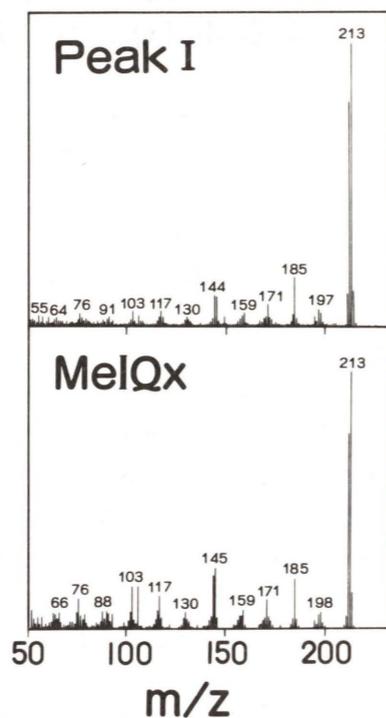


図 2 グリシン混合物のピーク I と MeIQx の質量スペクトル

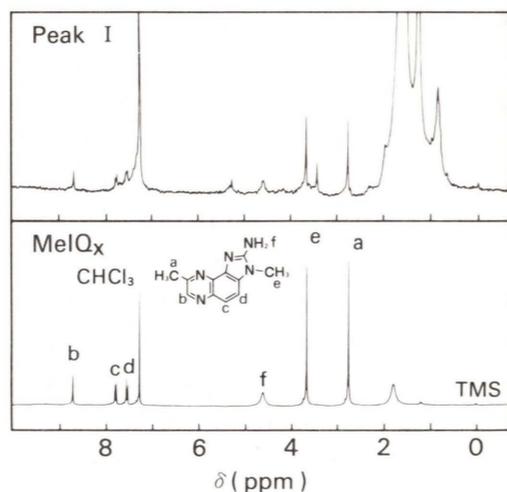


図 3 グリシン混合物のピーク I と MeIQx の NMR スペクトル

(Jägerstad ら, 1984) この物質の回収率は、17.7 g の混合物当り、約 60 μ g であり、サルモネラ菌 TA 98 に対する変異比活性は、 1.3×10^5 rev/ μ g と、標品のそれに近いものであった。

ピーク II の溶出位置は、IQ 及び MeIQ のそれには一致しなかった。この段階では、精製が十分でなかったため、ピーク I の同定の場合の 50 倍量の混合物より始め、3 回の HPLC により約 40 μ g の精製物質を得た。この物質の変異活性は、亜硝酸抵抗性で、次亜塩素酸処理により失活することによりイミダゾキノリン又は、イミダゾキノキサリン骨格を有する新変異原と推察された。質量分析の結果、分子量は 227 であった。NMR スペクトルで

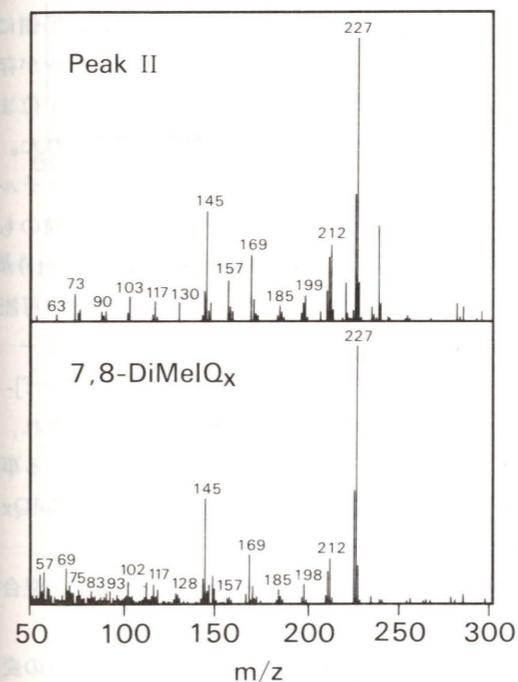


図 4 グリシン混合物のピーク II と 7,8-DiMeIQx の質量スペクトル

は、MeIQx のものより、メチル基のシグナルが 1 つ増え、低磁場側のシングレットが消え、ダブルレットが保存されていた。これらの結果より、MeIQx の 7 位にメチル化が起った構造が考えられた。そこで、MeIQx に硫酸及び硫酸第一鉄存在下で、*t*-butylhydroperoxide を用いて、選択的ラジカルメチル化を行い、標品の 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (7,8-DiMeIQx) を合成した。紫外吸収スペクトルは、MeIQx によく似ていたが、最大吸収は、217, 273, 及び 340 nm にあり、精製物質と標品でよく一致していた。質量分析(図 4)、NMR (図 5)の結果もよく一致し、ピーク II を、7,8-DiMeIQx

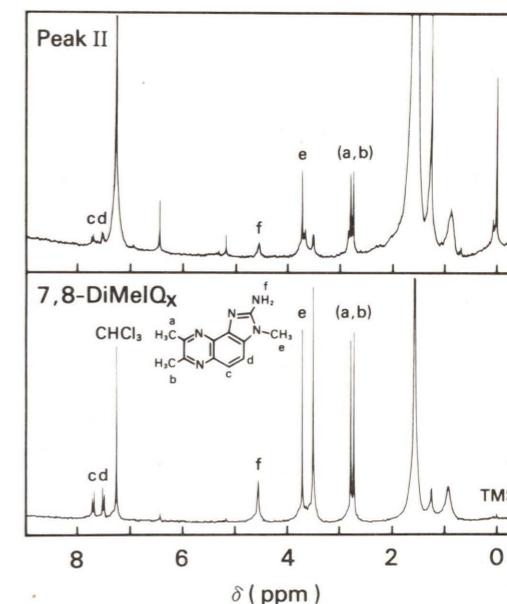


図 5 グリシン混合物のピーク II と 7,8-DiMeIQx の NMR スペクトル

と同定した。(Negishiら, 1984)この物質のサルモネラ菌TA 98に対する変異比活性は、 $1.63 \times 10^5 \text{ rev}/\mu\text{g}$ であった。すなわち、グリシン混合物からは、MeIQx(図6, I)と新変異原7,8-DiMeIQx(図6, II)が分離、同定されたわけである。

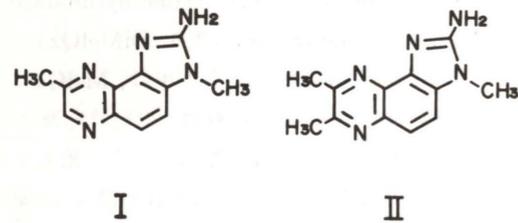


図6 グリシン混合物より生成した変異原の構造
I. MeIQx II. 7,8-DiMeIQx

(2) クレアチニン, グルコース, スレオニン混合物の加熱により生ずる変異原

この加熱物は、クレアチニン含有量 70 mmole のとき、 $2.08 \times 10^8 \text{ rev}$ の変異活性を示した。HPLCの前までで、約 3370 倍の比活性の上昇がみられた。HPLCでの溶出パターンを、図7に示す。変異活性は、大きく2つのピークに分れ、その比は、約 1 : 3 であった。ピーク I の溶出位置は、MeIQx と一致し、ピーク II は、グリシンの場合得られた 7,8-DiMeIQx と一致した。ピーク I, II 共に亜硝酸抵抗性で、次亜塩素酸により失活した。ピーク I は、その紫外吸収、質量分析、NMR スペクトルより、MeIQx と同定した。混合物 22.5g より、約 50 μg が回収された。

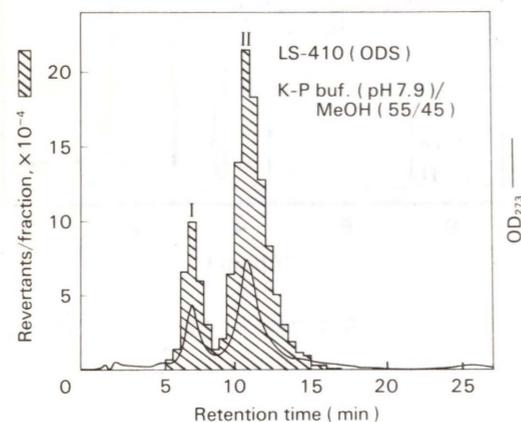


図7 クレアチニン, グルコース, スレオニン混合物の加熱により生ずる変異原のHPLCパターン

ピーク II の紫外吸収スペクトルは、7,8-DiMeIQx によく似ていたが、最大吸収は 2 ~ 5 nm 長波長側に移動していた。質量分析より分子量は 227 であった。(図8, 上段)ピーク II と、7,8-DiMeIQx の違いは、NMR スペクトルで明確に現われた。(図9, 上段)7,8-DiMeIQx でみられた 4 位と 5 位のプロトンに対応するダブルレットが消え、低磁場側にシングレットが 2 つ現われた。高磁場側には、メチル基に対応する 2 つのシグナルが存在した。これらの結果より、MeIQx の 4 位または 5 位のメチル化体の構造が推定された。3 位のメチル基を照射した時、2 つのメチル基に対応するシグナルのうち、高磁場側のものに、NOE (nuclear Overhauser effect) が観察されたことにより、4 位メチル化の可能性が強くなった。更に、標品としての 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo-[4,5-f]-quinoxaline (4,8-DiMeIQx) が合成され、各種スペクトルが、これと完全に一致する事により、(図8, 9)ピーク II を 4,8-DiMeIQx (図10) と同定した。

(3) クレアチニン, グルコース, アラニン混合物の加熱により生ずる主な変異原
精製の最終段階である HPLC 上、5 つの変異活性を有するピークが認められ、2 番目のピークは、MeIQx と同定した。4 番目の主たるピークは、その UV 吸収、質量分析(図8, 中段), 及び NMR (図9, 中段)の結果から、やはり 4,8-DiMeIQx と同定した。

精製の最終段階である HPLC 上、5 つの変異活性を有するピークが認められ、2 番目のピークは、MeIQx と同定した。4 番目の主たるピークは、その UV 吸収、質量分析(図8, 中段), 及び NMR (図9, 中段)の結果から、やはり 4,8-DiMeIQx と同定した。

精製の最終段階である HPLC 上、5 つの変異活性を有するピークが認められ、2 番目のピークは、MeIQx と同定した。4 番目の主たるピークは、その UV 吸収、質量分析(図8, 中段), 及び NMR (図9, 中段)の結果から、やはり 4,8-DiMeIQx と同定した。

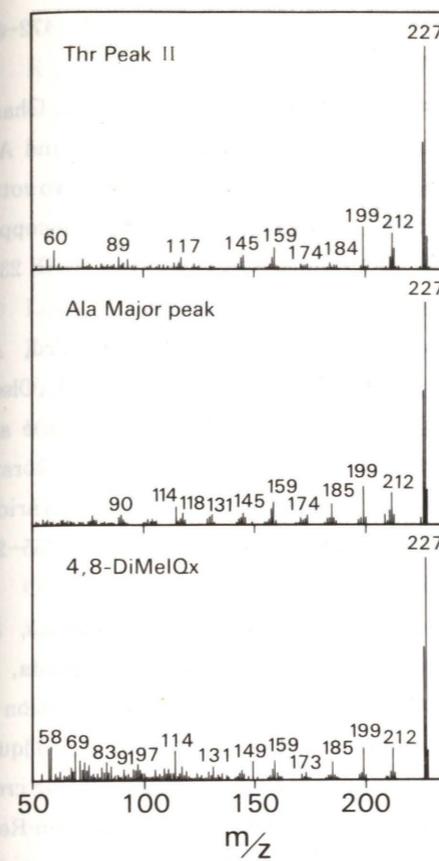


図8 スレオニン混合物のピーク II, アラニン混合物の主変異原と、4,8-DiMeIQx の質量スペクトル

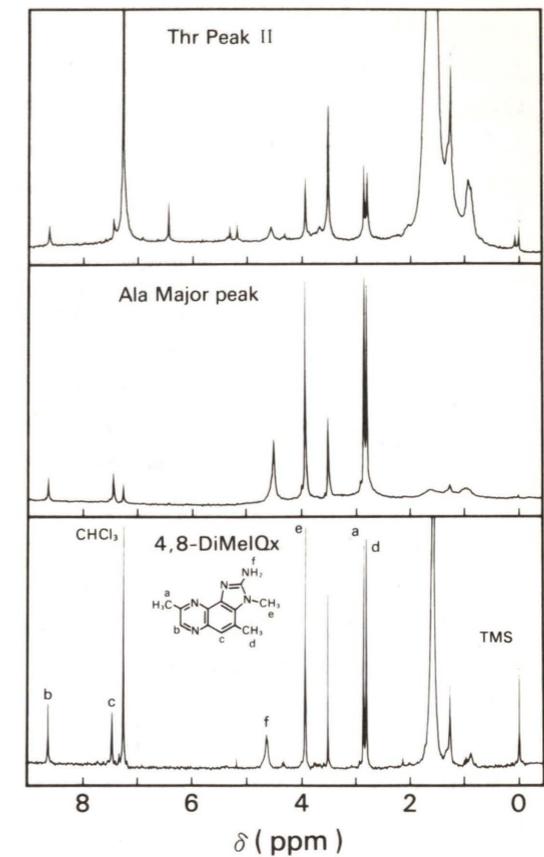


図9 スレオニン混合物のピーク II, アラニン混合物の主変異原と、4,8-DiMeIQx の NMR スペクトル

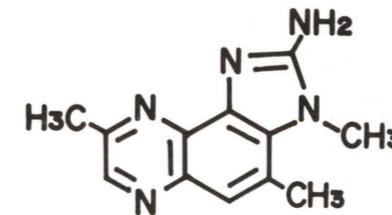


図10

4. おわりに

クレアチニン, グルコース及びアミノ酸(グリシン, スレオニン又はアラニン)を、通常の調理温度に近い温度で加熱すると、MeIQx 及び

前者より 7,8-DiMeIQx, 後者 2 つより 4,8-DiMeIQx と、少なくとも 3 種類のイミダゾキノキサリン構造をもつ変異原が生成した。この内、7,8-DiMeIQx と 4,8-DiMeIQx は、新変異原

である。以前、焼肉中より、MeIQ_xを分離、同定した際、HPLC上、DiMeIQ_xに相当する溶出位置に変異活性が認められており、最近、調理した牛肉中にも分子量227の変異原があることが報告されている。(Feltonら, 1984)なお、スレオニンは、このモデル系で最も高い変異活性を示したアミノ酸であり、グリシン、アラニンがそれに次ぐ。(Jägerstadら, 1983)また、この条件下では、混合物のどの成分を除いても変異活性を示さないで、これら3種の物質すべてが、前駆体として関与していると考えられる。肉や魚中には、種々のアミノ酸、糖及びクレアチンが存在する。(Jones, 1958; Laser Reuteswärdら, 1981; Sulser, 1978)クレアチンは、保存又は加熱によりクレアチニンに変化するので、これらの物質が前駆体となって、実際の調理時にMeIQ_xやDiMeIQ_xが生成されている可能性が強いと思われる。今後、新しい変異原性ヘテロサイクリックアミンであるDiMeIQ_xの発癌性等の生物活性を追求していく予定である。

文 献

- 1) Felton, J.S., Knize, M.G., Wood, C., Wuebbles, B.J., Healy, S.K., Stuermer, D. H., Bjeldanes, L.F., Kimble, B.J., and Hatch, F.T.: Isolation and characterization of new mutagens from fried ground beef. *Carcinogenesis*, **5**: 95-102 (1984).
- 2) Hargraves, W.A., and Pariza, M.W.: Purification and mass spectral characterization of bacterial mutagens from commercial beef extract. *Cancer Res.*, **43**: 1467-1472 (1983).
- 3) Hayatsu, H., Matsui, Y., Ohara, Y., Oka, T., and Hayatsu, H.: Characterization of mutagenic fractions in beef extract and in cooked ground beef. Use of blue-cotton for

efficient extraction. *Gann*, **74**: 472-482 (1983 a).

- 4) Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H., and Arimoto, S.: Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine. *Mutation Res.*, **119**: 233-238 (1983 b).
- 5) Jägerstad, M., Laser Reuteswärd, A., Olson, R., Grivas, S., Nyhammar, T., Olsson, K., and Dahlqvist, A.: Creatin(in)e and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds: Effect of various amino acids. *Food Chem.*, **12**: 255-264 (1983).
- 6) Jägerstad, M., Olsson, K., Grivas, S., Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., and Sugimura, T.: Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose. *Mutation Res.*, **126**: 239-244 (1984).
- 7) Jones, N.R.: The estimation of free sugars in skeletal muscle of codling (*Gadus callarias*) and herring (*Clupea harengus*). *Biochem. J.*, **68**: 704-708 (1958).
- 8) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Shiomi, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., and Nishimura, S.: Structure of a potent mutagen isolated from fried beef. *Chem. Lett.*, 485-488 (1981).
- 9) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., and Nishimura, S.: Structure and chemical synthesis of Me-IQ a potent mutagen isolated from broiled fish. *Chem. Lett.*, 1391-1394 (1980 a).

- 10) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Spingarn, N.E., Weisburger, J.H., and Nishimura, S.: Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditions. *Proc Jpn. Acad.*, **56B**: 278-283 (1980 b).
- 11) Laser Reuteswärd, A., Johansson, G., Kullmar, B., and Ruderus, H.: Influence of low-voltage stimulation on post-mortem biochemistry in normal and DFD beef. *Proc. 27th Eur. Meat Research Workers*, Vienna, A: 43 (1981).
- 12) Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., Sugimura, T., and Takayama, S.: Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolyzate. *Science*, **213**: 346-347 (1981).
- 13) Matsushima, T.: Mechanisms of conversion of food components to mutagens and carcinogens, in: *Molecular Interrelations of Nutrition and Cancer*, Raven, 35-42 (1982).
- 14) Nagao, M., Sato, S., and Sugimura, T.: Mutagens produced by heating foods, in: *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*, ACS Symposium Series 215, American Chemical Society, 521-536 (1983).
- 15) Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., Sugimura, T., Saito, H., Maeda, M., and Jägerstad, M.: Formation of 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, a new mutagen, by heating a mixture of creatinine, glucose and glycine. *Mutation Res. Lett.*, **140**: 55-59 (1984).
- 16) Ohgaki, H., Kusama, K., Matsukura, N., Morino, K., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S., and Sugimura, T.: Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, from broiled sardine, cooked beef and beef extract. *Carcinogenesis*, **5**: 921-924 (1984).
- 17) Ohgaki, H., Matsukura, N., Morino, K., Kawachi, T., Sugimura, T., and Takayama, S.: Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from glutamic acid and soybean globulin pyrolysates. *Carcinogenesis*, **5**: 815-819 (1984).
- 18) Sugimura, T., and Sato, S.: Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res. (suppl.)*, **43**: 2415s-2421s (1983 a).
- 19) Sugimura, T., and Sato, S.: Bacterial mutagenicity of natural materials, pyrolysis products and additives in foodstuffs and their association with genotoxic effects in mammals, in: *Developments in the Science and Practice of Toxicology*, Elsevier, 115-133 (1983 b).
- 20) Sulser, H.: *Die Extraktstoffe des Fleisches*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1978).
- 21) Takayama, S., Masuda, M., Mogami, M., Ohgaki, H., Sato, S., and Sugimura, T.: Induction cancers in the intestine, liver and various other organs of rats by feeding mutagens from glutamic acid pyrolysate. *Gann*, **75**: 207-213 (1984 a).
- 22) Takayama, S., Nakatsuru, Y., Masuda, M., Ohgaki, H., Sato, S., and Sugimura, T.: Demonstration of carcinogenicity in F344 rats of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline from broiled sardine, fried beef and beef extract. *Gann*, **75**: 467-470 (1984 b).
- 23) Tsuda, M., Nagao, M., Wakabayashi, K., Hirayama, H., Kawachi, T., and Sugimura, T.: Inactivation of pyrolysate mutagens

by nitrite and chlorinated tap water. *Eisei Kagaku*, 28: 40 (1982).

24) Turesky, R. J., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S.R., Pfund, R.A., and Bucki, G.H.: Quali-

tative and quantitative characterization of mutagens in commercial beef extract. *Carcinogenesis*, 4: 864-866 (1983).

クレアチンと糖、脂肪酸、アミノ酸等との混合物の加熱による変異原物質の生成

日本専売公社中央研究所 吉田 大輔

1. はじめに

アミノ酸、たん白質の加熱によって強い変異原性が発現することをわれわれは明らかにしたが (Matsumoto ら, 1977; Matsumoto ら; 1978, Yoshida ら, 1978) この場合、加熱温度 400°C から変異原性が検出され、500~600°C に最も高い活性が得られた。食品の調理を考えた場合、加熱方法や材料によって温度はまちまちである。直火で魚や肉を焼いたときには表面はかなり高温になるが、一方フライパンの上で焼いたときや油であげたときなど 200°C 程度かそれ以下のことが多く、そのような条件の調理中にも変異原性があらわれることがわかっており (Commoner ら; 1978, Spingarn ら; 1979, Rapaport ら, 1979) アミノ酸、たん白質以外の物質の加熱によって生成する変異原物質、あるいは食品成分相互の反応によって生成する変異原物質が食品の調理中に生成する可能性も考えられた。

魚や肉の中にはクレアチンが比較的多く含まれているが (Sakaguchi ら, 1982), クレアチンと魚や肉の中の他の成分との加熱中の反応によって変異原性物質が生成することを明らかにしたのでその概要を紹介する。

2. クレアチンと糖の加熱による変異原物質の生成

魚や肉の中に含まれる各種窒素成分と糖との混合物の加熱による変異原物質の生成について調べた結果を表 1 に示した。(Yoshida ら, 1980a) アルブミンやアデニンとグルコースの混合物の加熱物は変異原性を示さなかったが、アミノ酸混合物とグルコースの加熱物とクレアチンとグルコースの混合物の加熱物は変異原性

を示した。とくにクレアチンとグルコースの混合物からはかなり高い変異原性が検出された。その変異原性は *Salmonella typhimurium* TA 100 と比べ TA 98 により高い感受性を示し、検出のためには S-9 mix による代謝活性化が必要であった。(表 1)

表 1 各種窒素化合物とグルコースとの混合物を 150°C, 1 h 加熱した場合の変異原性

反 応 構 成	変異コロニー数* (窒素化合物 1 g 当たり)	
	TA 98	TA 100
アルブミン+グルコース	0	0
アデニン+グルコース	0	0
アミノ酸混合物+グルコース	3,014	0
クレアチン+グルコース	14,432	8,360
アルブミン	0	0
アデニン	0	0
アミノ酸混合物	1,332	0
クレアチン	0	0

* +S9mix の値, -S9mix では変異原性は検出されない。

クレアチンとグルコースの混合物は 100~125°C 1 h 加熱では変異原性を示さず、150°C で最高の変異原性を示し、200°C を越すと変異原性は低下した。このような温度範囲は食品の調理中に認められるものであり、クレアチンが魚や肉の調理中の変異原物質の生成の基質になる可能性が考えられた。

肉汁は変異原性を示すが、肉汁調製時のように長時間煮沸状態でもクレアチンとグルコースの共存状態で変異原物質が生成する。各アミノ

酸及びクレアチンとグルコースの混合物の水溶液を10時間、還流冷却器をつけて煮沸した場合、クレアチンとグルコース及びアルギニンとグルコースの混合物の煮沸試料から変異原物質の生成が認められた。(Yoshidaら, 1980b)アルギニンとクレアチンはともにグアニジン基をもつ物質であり、グアニジン由来の変異原物質が魚や肉の調理中に生成している可能性が大きい。

なお加熱食品中の変異原物質を測定する際には抽出物全量を用いてサルモネラ菌による検定を行うことは困難であるので、一般に塩基性フラクションを用いることが多い。本報ではすべてモデル反応物の塩基性フラクションを検定試料としている。

3. クレアチンと脂肪酸の加熱による変異原物質の生成

魚や肉の主要成分の1つの脂肪酸とクレアチンとの混合物を調理温度の範囲で加熱したときの変異原物質の生成について調べた結果を表2に示した。(Yoshidaら, 1980c)

表2 クレアチンとオレイン酸との混合物加熱物の変異原性

加熱温度 (°C)	変異コロニー数* (クレアチン1g当たり)	
	TA98	TA100
100	0.07 x 10 ⁴	0
125	0.33 "	0
150	0.95 "	0
175	1.75 "	0
200	8.0 "	0.21 x 10 ⁴
225	16.9 "	0.24 "
250	35.2 "	1.93 "

* +S9mixの値、-S9mixでは変異原性は検出されない。

クレアチンとオレイン酸混合物の加熱物では100°Cから変異原性が検出され、温度の上昇とともに著しく変異原性が上昇した。表1のクレアチンとグルコースの混合物の場合の150°Cのときの変異原性と表2のクレアチンとオレイン酸の混合物の場合の225°Cのときの変異原性とがほぼ同程度の値となっている。オレイン酸の場合もクレアチンとグルコース混合物加熱物の変異原性と同様、TA98に感受性高く、S-9mixによる代謝活性化が必要である。リノール酸、オレイン酸など不飽和脂肪酸とクレアチンとの混合物加熱物の方が、ステアリン酸、パルミチン酸など飽和脂肪酸とクレアチンとの混合物加熱物よりも変異原性は高かった。

アミノ酸混合物とオレイン酸との混合物の加熱物も変異原性を示したが、クレアチンの場合よりは低かった。たん白質とオレイン酸の混合物の加熱では変異原性は検出されなかった。

フライによる調理の場合、油の温度は180°C程度になるが、脂肪酸とクレアチンの反応による変異原物質生成の可能性がある。

4. クレアチンとアミノ酸の加熱による変異原物質の生成

魚や肉の中には遊離のアミノ酸も含まれているのでクレアチンとアミノ酸との混合物を200°C 1h加熱したものの変異原性を測定した結果を表3に示した。(Yoshidaら, 1982)ほとんどのアミノ酸についてクレアチンと共に加熱したときに変異原性が検出されたが、クレアチン当たりの生成した変異原性の強さで比較すると、シスチンとクレアチンの混合物加熱物の変異原性は、グルコースとクレアチン混合物の場合と比べ約10倍も変異原性が高く、スレオニン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、バリン、プロリンなどとの場合はグルコースとクレアチンの混合物の場合とほぼ匹敵する変異原性を示した。

表3 クレアチンとアミノ酸混合物の加熱物(200°C, 1h)の変異原性

反応構成	変異コロニー数* アミノ酸1mmol 当たり
シスチン + クレアチン	65.5 X 10 ⁴
スレオニン	13.5 "
フェニルアラニン	11.2 "
メチオニン	10.7 "
トリプトファン	9.5 "
バリン	4.9 "
プロリン	4.7 "
セリン	2.1 "
リジン	0.77 "
グルタミン酸	0.52 "
アラニン	0.34 "
アルギニン	0.12 "
アスパラギン酸	0.11 "
グリシン	0.10 "
ヒスチジン	0.10 "
ロイシン	0.08 "
チロシン	0.08 "

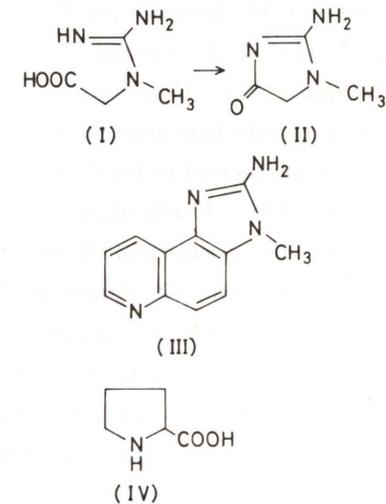
* TA98, +S9mixによる。

5. クレアチン, 糖, アミノ酸混合物の加熱物からIQなどの検出

クレアチンから生成する変異原物質はクレアチンが環化した形のイミダゾール化合物である可能性が高い。葛西らが焼き魚や焼き肉の中から分離し変異原物質として報告しているIQ, MeIQ, MeIQxなどはすべてイミダゾール化合物である。(Kasaiら, 1980, Kasaiら, 1981)われわれがクレアチンと糖の混合系の加熱による変異原性の発現について報告してから2年後に、Jägerstadらはクレアチニン, 糖, アミノ酸の混合物の加熱によりIQ化合物が生成する経路を提唱し, これらの加熱物から変異原物質としてIQ化合物の分離を試みたが,

成功しなかった。(Jägerstadら, 1983)われわれもクレアチンと糖, あるいは脂肪酸, クレアチン, グリシン, グルコースの3種混合物の加熱物中のIQの分離を試みたが検出することはできなかった。これらの加熱物にはIQ以外の変異原物質が含まれているものと思われる。

クレアチンとアミノ酸の混合物も表3に示したように加熱により変異原性を示したので, おのおのの加熱物中のIQの分離を行ったところ, クレアチンとプロリンの混合物の加熱によりIQが生成されることを見出した。(Yoshidaら, 1984)



クレアチン(I), クレアチニン(II), IQ(III), プロリン(IV)の構造

プロリンは魚や肉の中に含まれているので, (Penetら, 1983)このような形でIQの生成が調理中に起こっている可能性がある。一方クレアチニン, グリシン, グルコース3種混合物の加熱物中からMeIQxが最近検出されている。(Jägerstadら, 1984)

6. おわりに

魚や肉の調理中に生成する変異原物質は, 魚や肉の中に含まれるクレアチンに由来し, 共存

する糖、脂肪酸、アミノ酸などを加熱中に反応して生成する可能性について指摘したが、実際の食品の場合には成分の種類、量ともにまちまちであり、また加熱方法もかなり幅があるので、変異原物質の生成状況は複雑であると思われる。

文 献

- 1) Commoner, B., Vithayathil, A. J., Dolora, P., Nair, S., Madyastha, P., and Cuca, G.C.: Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking, *Science*, **201**:913-916 (1978).
- 2) Jagerstad, M., Reutersward, A.L., Oste, R., and Dahlquist, A.: Creatinine and mailard Dahlquist, A.: Creatinine and mailard reaction products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef, in: G.R. Waller and M.S. Feather(Eds), *The Mailard Reaction in Foods and Nutrition*, ACS Symposium Series 215, American Chemical Society, Washington, DC, pp, 507-519 (1983).
- 3) Jägerstad, M., Olsson, K., Grivas, S., Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., and Sugimura, T.: Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose. *Mutation Res.*, **126** : 239-244 (1984).
- 4) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Spingarn, N.E., Weisburger, J.H., and Nishimura, S.: Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditions: *Proc. Japan Acad.*, **56**, Ser. B: 278-283 (1980).
- 5) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Shiomi, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T. and Nishimura, S.: Structure of a potent mutagen isolated from fried beef. *Chem. Lett.*, 485-488 (1981).
- 6) Matsumoto, T., Yoshida, D., Mizusaki, S., and Okamoto, H.: Mutagenic activity of amino acid pyrolyzates in *Salmonella typhimurium* TA 98, *Mutation Res.*, **48**: 279-286 (1979).
- 7) Matsumoto, T. Yoshida, D., Mizusaki, S., and Okamoto, H.: Mutagenicities of pyrolyzates of peptides and proteins, *Mutation Res.*, **56** : 281-288 (1978).
- 8) Penet, C.S., Worthington, R.E., Phillips, R.D., and Moon, N.J: Free amino acids of raw and cooked ground beef and pork, *J. Food Sci.*, **48** : 298-299 (1983).
- 9) Rappaport, S.M., McCartney, M.C., and Wei E.T.: Volatilization of mutagens from beef during cooking, *Cancer Lett.*: **8**, 139-145 (1979).
- 10) Sakaguchi, M., Murata, M., and Kawai, A: Changes in free amino acids and creatine contents in Yellowtail(*Seriola quinqueradiata*) muscle during ice storage, *J. Food Sci.*, **47** : 1662-1666 (1982).
- 11) Spingarn N.E., and Weisburger J.H.: Formation of mutagens in cooked foods. I. Beef, *Cancer Lett.*, **7** : 259-264 (1979).
- 12) Yoshida, D., Matsumoto, T., Yoshimura, R., and Matsuzaki, T.: Mutagenicity of amino- α -carboline in pyrolysis products of soybean globuline, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83** : 915-920 (1978).
- 13) Yoshida, D., and Okamoto, H.: Formation of mutagens by heating creatine and glucose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96** : 844-847 (1980 a).
- 14) Yoshida, D., and Okamoto, H.: Formation of mutagens by heating the aqueous solution of amino acids and some nitrogenous compounds with addition of glucose. *Agric. Biol. Chem.*, **44**: 2521-2522 (1980 b).
- 15) Yoshida, D., and Okamoto, H.: Formation of mutagens by heating creatine and amino acids with addition of fatty acids. *Agric. Biol. Chem.*, **44** : 3025-3027 (1980 c).
- 16) Yoshida, D., and Fukuhara, Y.: Formation of mutagens by heating creatine and amino acids. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 1069-1070 (1982).
- 17) Yoshida, D., Saito, Y., and Mizusaki, S.: Isolation of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline as mutagen from the heated product of a mixture of creatine and proline. *Agric. Biol. Chem.*, **48** : 241-243 (1984).

疑変異原性発がん物質の培養細胞に対する 変異原性について

国立遺伝学研究所

個体遺伝研究系形質遺伝研究部門 黒田 行昭

分子遺伝研究系変異遺伝研究部門 横井山晶子, 賀田 恒夫

1. はじめに

最近10年間ばかりの間に、サルモネラなどの微生物の系に、動物肝ミクロソーム分画を加えた系で環境中に存在する種々の変異原物質が効率よく、また鋭敏に検出されるようになった。しかし、一方では微生物の系で変異原性が検出された物質でも実験動物に対しては発がん性がみられなかったり、逆に実験動物で発がん性が見出された物質が微生物では変異原性が検出されない場合もかなり存在する。

われわれは、哺乳動物の培養細胞系を用いて、これまで多くの化学物質の突然変異誘発作用についてしらべてきたが (Kuroda, 1975a, b; Sugiura ら, 1978), とくに微生物では変異原性の検出されない発がん物質の中で, aniline やいくつかの芳香族化合物について, その変異原性を検出した (黒田と浅倉, 1982)。本研究では, さらに世界保健機構 (WHO) の「化学物質の安全性に関する国際プログラム」(IPCS)でも取上げられた微生物では変異原性の検出されない発がん物質のいくつかについて, チャイニーズ・ハムスターV79細胞のHGPRT (6-thioguanine 抵抗性)を指標として, その変異原性をしらべ, これらの発がん物質が哺乳動物細胞に与える影響を明らかにし, 発がん物質検定のための哺乳動物細胞の突然変異原性検出法の有用性を検索した。

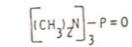
2. 実験材料と方法

チャイニーズ・ハムスターV79細胞のクローン系を用いた。この細胞を10%牛胎児血清を含

むEagleのMEM培養液を用いて大量に増殖させ, 多数のアンフルに分注して凍結し, 各アンフルの細胞を融解後, HAT培養液で培養し, 細胞集団中に存在するHGPRT欠損細胞を除去し, 正常培養液中で増殖させ, 4週間以内の細胞を用いた。

調べた化学物質は, hexamethylphosphoramide (HMPA), o-toluidine, benzene, safrole, phenobarbitalの5種の発がん物質と caprolactam, benzoinの2種の非発がん物質である。これらの化学構造は図1に示した。

発癌物質



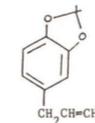
Hexamethylphosphoramide
分子量 = 179.2



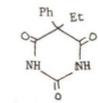
O-Toluidine
分子量 = 107.15



Benzene
分子量 = 78.11



Safrole
分子量 = 162.18

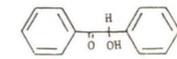


Phenobarbital
分子量 = 232.23

非発癌物質



Caprolactam
分子量 = 113.16



Benzoin
分子量 = 212.22

図1 本研究に用いた5種の発がん物質および2種の非発がん物質の化学構造

化学物質の細胞生存率に対する影響は60mmのプラスチックシャーレに 10^2 個の細胞をまき、正常培養液中で20時間培養後、種々の濃度の化学物質で3時間細胞を処理し、正常培養液に戻して6日間培養し、形成されたコロニー数を算定し、非処理の対照のコロニー数と比較して、細胞生存率を算定した。

化学物質の突然変異誘発作用は、 2×10^5 個の細胞を100mmのシャーレにまき、正常培養液中で20時間培養後、化学物質で細胞を3時間処理し、正常培養液中で6日間の突然変異発現時間培養する。細胞を解離して新しいシャーレに 2×10^5 個ずつの細胞をまいて、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の6-thioguanine (6TG)を含む培養液中で2週間培養し、形成された6TG抵抗性(HGPRT欠損)の細胞コロニーを算定した。細胞再播種の際、60mmのシャーレに 10^2 個の細胞をまき、正常培養液中で7日間培養してコロニー形成率を測定し、 10^5 生存細胞当たりの突然変異率を算定した。これから非処理の対照の突然変異率を除いて誘発突然変異率を算定した。

代謝活性化のためにラット肝S-9分画(オリエンタル酵母工業)にMgCl₂, KCl, glucose-6-リン酸, NADPH, NADHおよび磷酸ナトリウムを添加したS-9 Mixを用いた。

3. 細胞生存率に対する作用

チャイニーズ・ハムスターV79細胞の細胞生存率に対する検定した化学物質の作用は図2に示した。発がん物質であるHMPAやo-toluidine, benzeneおよび非発がん物質であるcaprolactamは使用した $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まではほとんど細胞生存率に対する影響はみられなかった。これに対して、発がん物質であるsafroleと非発がん物質であるbenzoinはかなり強い細胞毒性を示し、それぞれ $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で生存コロニーは見出されなかった。phenobarbitalは $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ で細胞

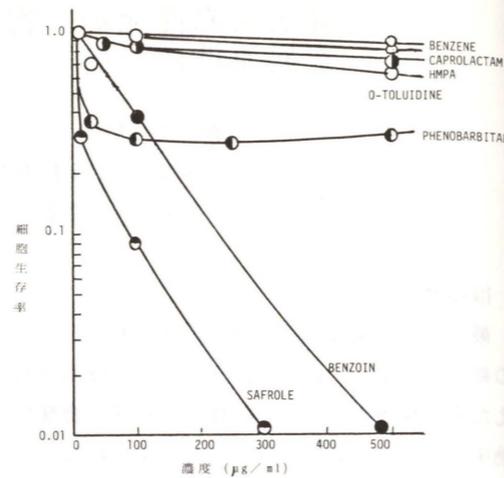


図2 各化学物質のチャイニーズ・ハムスターV79細胞の生存率に対する作用

生存率を $1/2$ に低下させるが、それより高い濃度においてもほとんど同じ程度の細胞毒性を示し、それ以上細胞生存率の低下はみられなかった。

4. 突然変異誘発作用

チャイニーズ・ハムスターV79細胞の6TG抵抗性突然変異誘発に対する検定した発がん物質の作用は図3(HMPA), 図4(o-toluidine), 図5(benzene), 図6(safrole), 図7(phenobarbital)に示した。また、非発がん物質の作用は図8(caprolactam)および図9(benzoin)に示した。

HMPAは $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度で弱いながらも、突然変異誘発作用が認められた。o-toluidineは今回使用した発がん物質の中では最も強い突然変異誘発作用が認められ、 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 5.5×10^5 の誘発突然変異率を示した。それより高い濃度ではかえって突然変異率が低下した。S-9 Mixの添加により、o-toluidineの突然変異誘発作用は消失した。

benzeneはS-9 Mixを添加しない場合に $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ でごく低い誘発突然変異が検出されたが、対照とほとんど有意差はな

く、S-9 Mixを添加しても突然変異率の上昇はみられなかった。safroleは $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でやや高い突然変異率が見出され、phenobarbitalは $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで、ほぼ濃度に依存して突然変異の上昇が観察された。

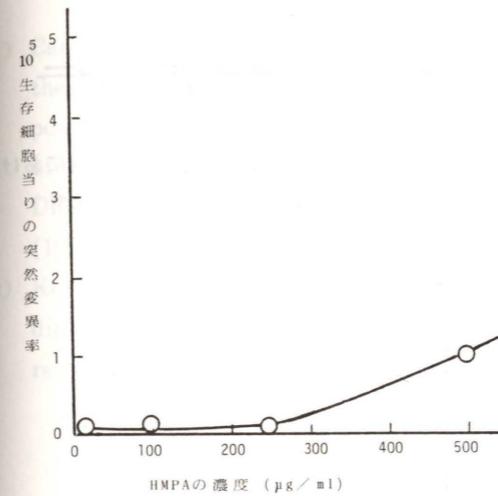


図3 チャイニーズ・ハムスターV79細胞におけるHMPAの突然変異誘発作用

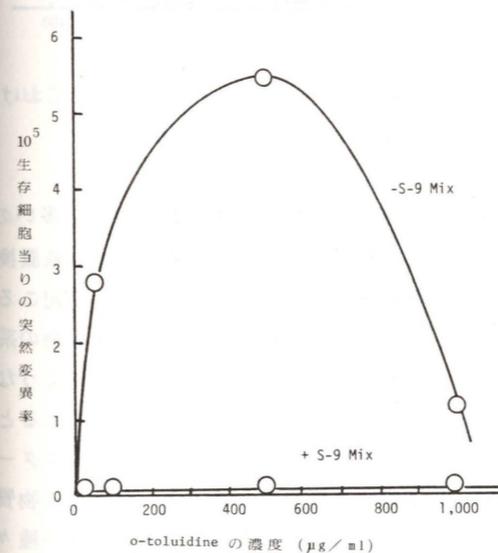


図4 チャイニーズ・ハムスターV79細胞におけるo-toluidineの突然変異誘発作用

以上のように5種の発がん物質の中でbenzeneを除いて他の4種はいずれもチャイニーズ・ハムスターV79細胞の突然変異誘発作用が見出された。

非発がん物質としてしらべた2種の中でcaprolactamは $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でもS-9 Mixの有無にかかわらず突然変異はまったく誘発されなかった。これに対して同じく非発がん物質であるbenzoinはS-9 Mixなしでは突然変異誘発作用が認められないが、S-9 Mix存在下では濃度依存性の突然変異率の上昇が見られた。

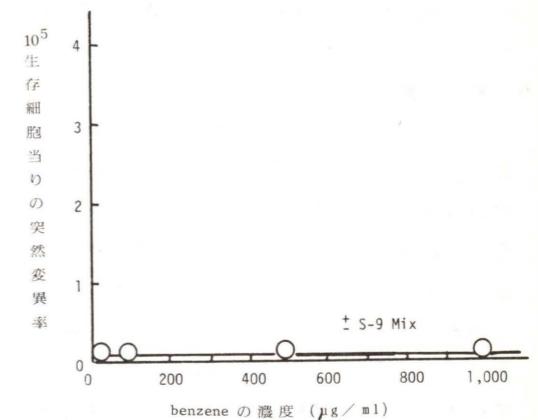


図5 チャイニーズ・ハムスターV79細胞におけるbenzeneの突然変異誘発作用

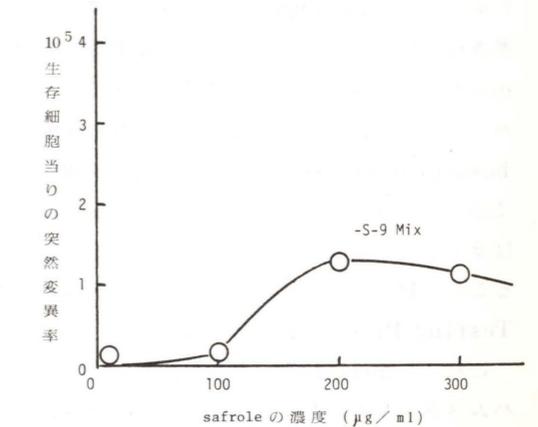


図6 チャイニーズ・ハムスターV79細胞におけるsafroleの突然変異誘発作用

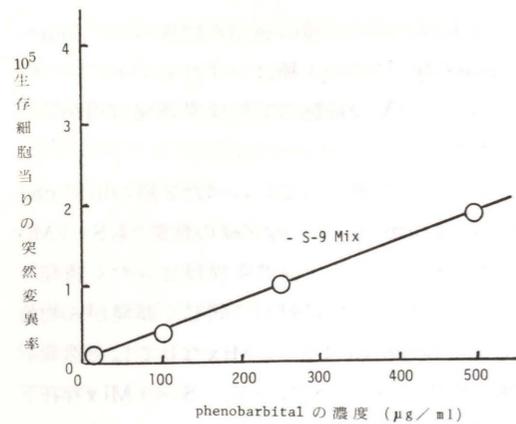


図7 チャイニーズ・ハムスターV79細胞におけるphenobarbitalの突然変異誘発作用

5. 考察

本研究において使用された5種の発がん物質はいずれも実験動物で発がん性が認められ、またDNAとの反応性が知られているにもかかわらず、微生物の系では変異原性が検出されないか、結果が疑わしいものである。これらの発がん物質はチャイニーズ・ハムスターV79細胞の系では上に述べたようにbenzeneの場合を除いていずれもS-9 Mixの添加なしに6TG抵抗性突然変異の誘発作用が認められた。

著者らはすでにチャイニーズ・ハムスターV79細胞の8-azaguanine抵抗性を指標に、芳香族化合物として微生物の系では変異原性が検出されないanilineとその誘導体であるo-, m-, p-chloroaniline, nitrobenzene, hexachlorobenzeneなどの変異原性を検出しており(黒田と浅倉, 1982), とくにanilineはラットで脾臓や下垂体, 副腎に腫瘍を形成することが報告されている(Carcinogenesis Testing Program, 1978)。

これらのaniline系化合物は, チャイニーズ・ハムスターV79細胞でouabain(OUA)抵抗性突然変異はほとんど誘発されなかった。6TG抵抗性や8AG抵抗性突然変異は,

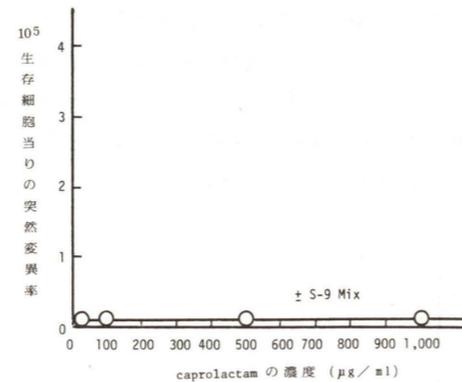


図8 チャイニーズ・ハムスターV79細胞におけるcaprolactamの突然変異誘発作用

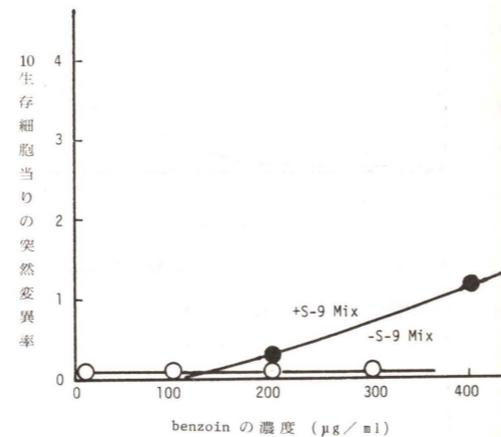


図9 チャイニーズ・ハムスターV79細胞におけるbenzoinの突然変異誘発作用

主として種々の程度の欠失を含むものが多いのに対して, OUA抵抗性突然変異は, 塩基置換型や塩基移り型の変異によって起こるとされている。Amesの系をはじめ微生物の系で検出されない多くの発がん物質はこのように塩基置換型や塩基移り型以外の変異によると考えられ, 本実験でチャイニーズ・ハムスターV79の細胞で変異原性が検出された発がん物質もおそらく, HGPRT遺伝子のDNAの種々の部分の欠失を生じさせる作用をもつものと考えられ, これらの発がん物質がS-9 Mixの添

加なしに突然変異誘発作用を示し, また2種の非発がん物質はいずれもS-9 Mixの添加なしに突然変異誘発作用が認められなかったことは, この系を用いた発がん物質の検索がきわめて有用であることを示すものと考えられる。

文献

- 1) Carcinogenesis Testing Program, Report on the bioassay of aniline hydrochloride for possible carcinogenicity, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, NIH, DHEW Publication No. 78-1385: 1-53 (1978).
- 2) Kuroda, Y.: Mutagenesis in cultured human diploid cells. III. Induction of 8-azaguanine-resistant mutations by furylfuramide.

Mutation Res., 30: 229-238 (1975 a).

- 3) Kuroda, Y.: Mutagenesis in cultured human diploid cells. IV. Induction of 8-azaguanine resistant mutations by phloxine, a mutagenic red dye. Mutation Res., 30: 239-248 (1975 b).
- 4) 黒田行昭, 浅倉真澄: 哺乳類培養細胞に対する化学物質の突然変異誘発作用—特にアニリン系化合物について, 組織培養研究, 1(1): 30-31 (1982).
- 5) Sugiura, K., Goto, M. and Kuroda, Y.: Dose-rate effects of ethyl methanesulfonate on survival and mutation induction in cultured Chinese hamster cells. Mutation Res., 51: 99-108 (1978).

1, 1-Dichloroethylene の染色体異常誘発性について

国立衛生試験所・変異原性部 沢田 稔・祖父尼俊雄
石館 基

1. はじめに

1, 1-dichloroethylene (別名 vinylidene chloride, 以下 1, 1-DCE と略す) は、環境汚染との関連で注目されている物質の一つであり、またその重合体はプラスチックの材料として広く用いられている。1, 1-DCE の変異原性については、大腸菌 K12 株に対し、マウスのマイクロソーム共存下で陽性結果を示すことが報告されている (Greim ら, 1975)。また、気体状で暴露した場合、*Salmonella typhimurium* TA1530, TA1535 及び TA100 において、マウスあるいはラットの S9 mix 共存下で変異原性を示すことが知られている (Bartsch ら, 1975; Simmon ら, 1977; Jones と Hathway, 1978 a)。さらにイースト *Saccharomyces cerevisiae* においても、マウス S9 mix 共存下で、gene conversion 及び point mutation を誘発する (Bronzetti ら, 1981)。一方、哺乳類細胞の in vitro 系では、チャイニーズ・ハムスター V79 細胞を用いる 8-アザグアニン耐性及びウアバイン耐性誘発試験で、ラット肝 S15 mix 共存下で致死作用を示すが、ラット肝 S15 あるいはマウス肝 S15 のいずれを添加しても陰性と報告されている (Drevon と Kuroki, 1979)。

本稿では、1, 1-DCE とその異性体である *cis*-並びに *trans*-1, 2-DCE について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞に対する染色体異常及び姉妹染色分体交換 (SCE) の誘発性について検討した結果について述べる。さらに、マウスを用いる小核試験の結果についても併せて報告する。

2. 染色体異常及び SCE の誘発性

(1) 実験方法

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞 CHL 株を用いた。この細胞は、10% の仔牛血清を含む Eagles' MEM 中で単層に増殖し、倍加時間は約 15 時間である。25 cm² のガラス製培養びんに約 10⁵ 個の細胞を播種し、2 日後に培養液で希釈した S9 mix とともに被験物質を 6 時間作用させた。被験物質は DMSO で希釈したが、揮発性のため、処理時間中はシリコンゴム栓で培養びんを密閉した。S9 は PCB を投与した Fischer ラットの肝臓から調製し、S9 mix の組織は Natarajan ら (1976) に従った。処理後 PBS で洗い、さらに 18 時間培養して染色体標本を作製した。

SCE の場合は、被験物質で 6 時間処理 (S9 mix 併用を含む) した後、PBS で洗い、さらに 24 時間培養した。BUdR は最終濃度 7 μM で 30 時間作用させた。分染は Sakaniishi と Takayama (1977) に従い、75°C の Na₂HPO₄ (1 M) で 2 分間処理した後ギムザ液で染色し、各点につき 50 個の細胞を観察した。

(2) 実験結果

1, 1-DCE は S9 mix 非共存下では高濃度まで加えても顕著な致死作用を示さず、また、染色体異常の誘発も認められなかった。S9 mix 共存下では、1, 1-DCE の濃度に依存して細胞致死作用が明らかとなり、染色体異常を有意に増加させた。その際、添加する S9 の濃度に依存して異常を持つ細胞の頻度が上昇し、比較的高濃度の S9 共存下で明瞭な陽

性結果を示したため、以後の実験ではすべて S9 濃度を 15% とした。本条件下では 1,1-DCE 0.25 mg/ml の濃度で陽性となり、1.5 mg/ml で約 50% の細胞に異常が観察された (表 1)。誘発された異常の大部分は染色分

表 1 CHL 細胞における染色体異常誘発性

濃度 (mg/ml)	S9 mix	異常細胞 (%)				
		ctg	ctb	cte	dic	Total
1,1-DCE						
0	+	1	1	0	0	2
0.125	+	2	0	6	0	8
0.25	+	5	4	6	1	14
0.5	+	7	16	20	0	29
1.0	+	12	20	32	1	41
1.5	+	16	27	35	0	54
2.0	+	Toxic				
0	-	2	0	0	0	2
0.125	-	1	0	0	0	1
0.25	-	1	0	0	0	1
0.5	-	0	0	0	0	0
1.0	-	0	1	1	0	2
1.5	-	1	0	0	0	1
2.0	-	1	1	0	0	2
cis-1,2-DCE						
0	+	0	0	0	0	0
0.5	+	0	0	0	0	0
1.0	+	0	0	0	0	0
2.0	+	0	0	0	0	0
0	-	2	0	0	0	2
0.5	-	1	0	0	0	1
1.0	-	1	0	1	0	2
2.0	-	2	0	0	0	2
trans-1,2-DCE						
0	+	0	0	0	0	0
0.5	+	0	0	1	1	1
1.0	+	0	1	0	0	1
2.0	+	0	0	0	0	0
0	-	1	0	0	0	1
0.5	-	0	0	1	0	1
1.0	-	0	0	0	0	0
2.0	-	3	0	0	0	3

ctg : 染色体ギャップ, ctb : 染色体切断
cte : 染色体交換, dic : 2動原体

体型で、ギャップや切断に加えて交換型も高頻度に出現した。これに対し、cis-並びに trans-1,2-DCE については、最高 2 mg/ml まで加えても、S9mix の有無に拘らず染色体異常の誘発は認められなかった。なお、今回用いた 1,1-DCE (Aldrich, 99%) には安定剤として 200 ppm の p-methoxyphenol が含有されているが、この化合物は S9mix 共存下で 20 μg/ml 加えても陰性であった。ま

た、先に挙げた Ames 試験の論文では、気化させた 1,1-DCE をデシケーターなどの中で暴露することによって陽性の結果が得られているが、我々の実験系においても、培養びんを密閉せずに処理した場合やシャーレで実験を行った場合は陰性の結果に終わった。これは 1,1-DCE の沸点が低い (約 32°C) ことに起因すると考えられる。

次に SCE 誘発能についてみると、図 1 に示すように、S9mix 共存下で 1,1-DCE の濃度に依存して細胞当たりの SCE 数が有意に増加した。しかし、分染可能な最高濃度 (0.1

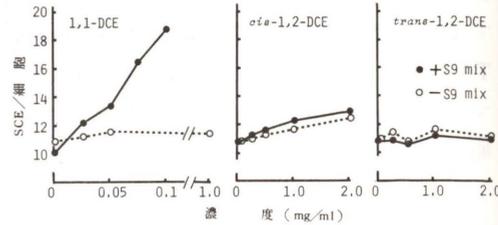


図 1 CHL 細胞における SCE 誘発性

mg/ml) で対照群の値 (10.0/細胞) の約 1.8 倍であり、その活性は比較的弱いと考えられる。cis-並びに trans-1,2-DCE では 2 mg/ml においても観察可能であったが、S9mix の有無に拘らず SCE の有意な増加は見られなかった。cis-あるいは trans-1,2-DCE に関する変異原性試験の報告は少ないが、先に挙げた Greim ら (1975) の論文では、大腸菌 K12 株に対して陰性と報告されている。

3. 代謝活性化との関係

1,1-DCE の生体内での代謝・解毒について、Jones と Hathway (1978 b) は、マウス及びラットを用いる実験から図 2 に示すような経路を提唱し、1,1-DCE から生成すると考えられるエポキシド (1,1-DCE oxide)、あ

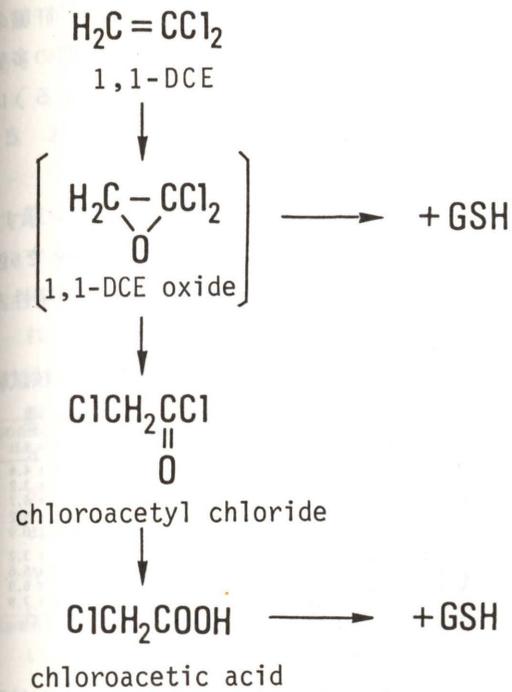


図 2 1,1-DCE の代謝経路 (Jones と Hathway, 1978 b より)

るいはさらに非酵素的に生ずる chloroacetyl chloride が、毒性を発揮するうえで重要な中間代謝物であると指摘している。また、in vitro の変異原性試験系においても、ミクロソーム中の酵素によって vinyl chloride が生成する可能性も指摘されているが (Bartsch ら, 1975)、一般的には、チトクローム P-450 によって生成される 1,1-DCE oxide が変異原性を示す本体であろうと想定されている (Bartsch ら, 1975 及び 1979; Henschler, 1980)。但し、1,1-DCE oxide そのものは、極めて寿命が短いと考えられており、マウス肝 S9 を組み込んだ捕集装置においても検出されていない (Bartsch ら, 1979)。また合成されていないため、直接その変異原性を調べた報告は見当たらない。

そこで我々は、チトクローム P-450 阻害物質の 1 つである metyrapone、あるいは生体内

でエポキシドの解毒に重要な役割を果しているグルタチオン (GSH) を添加することによって、CHL 細胞に対する染色体異常の誘発性がどのように変化するかについて検討した。S9mix とともに種々の濃度の metyrapone あるいは GSH を添加し、次に 1.5 mg/ml の 1,1-DCE を加えて 6 時間作用させ、細胞を洗って 18 時間後に標本を作製した。図 3 に示すように、染色体異常を有する細胞の頻度は、metyrapone の濃度に依存して顕著に減少し、1 mM では 10% 以下のレベルにまで抑えられた。GSH を加えた場合も同様に著しい抑制効果が認められた。次に、

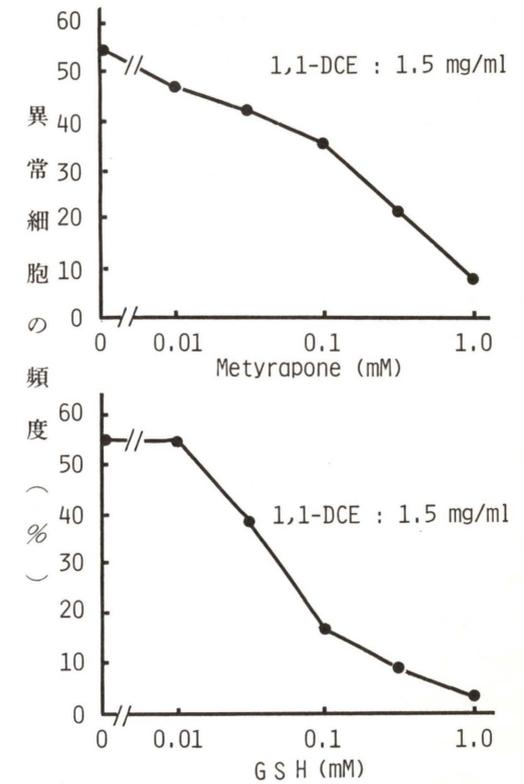


図 3 1,1-DCE による染色体異常誘発に及ぼす metyrapone 並びに GSH の添加効果

生体内での中間代謝物と考えられる (図 2)

chloroacetyl chlorideとchloroacetic acid について、染色体異常及びSCEの誘発能を検討したところ、いずれにも細胞致死作用が認められたが、結果は陰性であった。以上の結果は、S9 mix 共存下で出現する1,1-DCEの変異原活性が1,1-DCE oxideに起因するものであろうとする仮説を支持するものとする。

4. 小核試験

生体内での1,1-DCEによる細胞遺伝学的効果を検討するために、マウスを用いる小核試験を行った。骨髄を用いる通常の方法に加えて、胎子を用いる試験も試みた。後者は、近年 Coleらの手で開発され、化学物質の種類によっては前者よりも感度が高い場合のあることが報告されている (Coleら, 1980)。

(1) 実験方法

骨髄を用いる試験については、1群6匹の8週令雄 ddY マウス (体重27~30 g) に、オリーブ油に溶かした1,1-DCEをゾンデを用いて経口投与し、24時間後に大腿骨の骨髄から標本作製した。用量と標本作製時期は予備実験によって決定した。小核の観察は、ギムザ染色標本から、1匹当たり1,000個の多染性赤血球について行った。さらに連投の効果についても検討するために、1,1-DCEを24時間間隔で4回経口投与し、最終投与から24時間後に標本作製した。この場合には、1,000個の多染性赤血球のほかに、1,000個の正染性赤血球についても観察した。

胎子を用いる場合には、1群2,3匹の妊娠18日目のICRマウスに、オリーブ油に溶かした1,1-DCEを腹腔内投与した。24時間後に胎子を取り出し、頸部を切断して末梢血から標本作製するとともに、切り出した胎子の肝臓に牛胎仔血清を少量加えてピペッキングした後に標本作製した。標本はアクリジン・オレンジで染色し (Hayashiら,

1983), 蛍光顕微鏡下で、末梢血と肝臓の各々につき胎子1個体当たり1,000個の多染性赤血球 (この場合は赤色蛍光を発する) について観察した。

(2) 実験結果

骨髄を用いる小核試験の結果は表2に示す。1回投与の場合、最高用量200 mg/kgで6匹中3匹が死亡したが、小核を有する多染性赤

表2 マウス骨髄を用いる1,1-DCEの小核試験

用量 (mg/kg×回数)	死亡 個体数	MNPCE (%) 平均±S.D.	MNNE (%) 平均±S.D.	PCEの割合 (%) 平均±S.D.
0 X 1	0	0.22 ± 0.12		55.4 ± 4.4
25 X 1	0	0.15 ± 0.16		52.7 ± 3.2
50 X 1	0	0.22 ± 0.10		51.3 ± 6.7
100 X 1	0	0.17 ± 0.10		57.1 ± 5.2
200 X 1	3	0.23 ± 0.06		42.6 ± 10.9
0 X 4	0	0.22 ± 0.10	0.10 ± 0.11	50.6 ± 3.2
25 X 4	0	0.03 ± 0.05	0.08 ± 0.08	53.0 ± 5.6
50 X 4	0	0.17 ± 0.12	0.10 ± 0.13	56.7 ± 6.9
100 X 4	1	0.12 ± 0.08	0.12 ± 0.08	46.4 ± 7.9

MNPCE: 小核を有する多染性赤血球, MNNE: 小核を有する正染性赤血球

血球の頻度は、いずれの用量においても対照群 (0.22%) との間に有意な差は認められなかった。同様に、4連投の場合も、最高用量100 mg/kg × 4回の群で6匹中1匹が死亡したが、多染性、正染性いずれの赤血球においても小核の誘発は見られなかった。また、赤血球全体に占める多染性赤血球の割合にも大きな変化は観察されなかった。

胎子を用いる小核試験においても、表3に示すように、25, 50, 100 mg/kgのいずれ

表3 マウス胎子を用いる1,1-DCEの小核試験

用量 (mg/kg)	観察 胎仔数	MNPCE (%) 平均±S.D.	PCEの割合 (%) 平均±S.D.
0	4	肝 0.28 ± 0.15 末梢血 0.13 ± 0.13	74.3 ± 3.9 69.9 ± 7.1
25	4	肝 0.35 ± 0.13 末梢血 0.23 ± 0.10	75.0 ± 6.2 68.3 ± 6.4
50	6	肝 0.27 ± 0.12 末梢血 0.22 ± 0.10	75.7 ± 6.3 72.2 ± 3.9
100	6	肝 0.25 ± 0.12 末梢血 0.22 ± 0.15	78.7 ± 2.8 74.2 ± 5.5

MNPCE: 小核を有する多染性赤血球

の用量でも対照群の値 (肝臓中で0.28%, 末

梢血中で0.13%) と比べて有意な増加は認められなかった。

5. おわりに

今回の実験結果から、1,1-DCEはCHL細胞に対してS9 mix 共存下で染色体異常を誘発すること、またその活性がmetraponeやGSHの添加によって抑えられることが示された。これらの結果は、Ames試験などで報告されている結果と対応すると考えられるが、他方V79細胞において、8-アザグアニン耐性及びウアバイン耐性誘発試験で陰性という報告があり、この化合物の培養細胞に対する活性についてはさらに検討すべき点があると考えられる。また、Ames試験ではラットのS9に比べてマウスのS9を用いた方が、より効果的であるとされているが (Bartschら, 1975; JonesとHathway, 1978 a), 培養細胞系でもこれらの種差についての検討が必要であろう。一方、生体内での効果を検討するために行った小核試験の結果は、いずれも陰性であった。これは恐らく生物活性を示す代謝産物の寿命が短いためか、あるいは生体内での解毒作用が大きく関係しているものと考えられる。

(本研究は、厚生省環境衛生局・水道環境部・水質管理強化対策費の援助による)

文 献

- Bartsch, H., Malaveille, C., Montesano, R., and Tomatis, L.: Tissue-mediated mutagenicity of vinylidene chloride and 2-chlorobutadiene in *Salmonella typhimurium*. *Nature*, **255**: 641-643 (1975).
- Bartsch, H., Malaveille, C., Barbin, A., and Planche, G.: Mutagenic and alkylating metabolites of halo-ethylenes, chlorobutadienes and dichlorobutenes produced by rodent or human liver tissues. *Arch. Toxicol.*, **41**: 249-277 (1979).
- Bronzetti, G., Bauer, C., Corsi, C., Leporini, C., Nieri, R., and del Carratore, R.: Genetic activity of vinylidene chloride in yeast. *Mutat. Res.*, **89**: 179-185 (1981).
- Cole, R.J., Taylor, N., Cole, J., and Arlett, C.F.: Short-term tests for transplacentally active carcinogens I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *Mutat. Res.*, **80**: 141-157 (1981).
- Drevon, C., and Kuroki, T.: Mutagenicity of vinyl chloride, vinylidene chloride and chloroprene in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, **67**: 173-182 (1979).
- Greim, H., Bonse, G., Radwan, Z., Reichert, D., and Henschler, D.: Mutagenicity in vitro and potential carcinogenicity of chlorinated ethylenes as a function of metabolic oxirane formation. *Biochem. Pharmacol.*, **24**: 2013-2017 (1975).
- Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M., Jr.: An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **120**: 241-247 (1983).
- Henschler, D.: Mutagenic effects of chlorinated aliphatic hydrocarbons; Influence of metabolic activation and inactivation. in: Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens (Norpoth, K.H., and Garner, R.C., eds.), Springer, 325-332 (1980).
- Jones, B.K., and Hathway, D.E.: Tissue-mediated mutagenicity of vinylidene chloride in *Salmonella typhimurium* TA1535. *Cancer Letters*. **5**: 1-6 (1978 a).
- Jones, B.K., and Hathway, D.E.: Differences in metabolism of vinylidene chloride between mice and rats. *Br. J. Cancer*, **37**: 411-417 (1978 b).

- 11) Natarajan, A.T., Bates, A.D., Van Buul, P.P.W., Meijers, M., and de Vogel, N.: 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. *Mutat. Res.*, 30: 83-90 (1976).
- 12) Sakanishi, S., and Takayama, S.: A simple

Giemsa method for the differential staining of sister chromatids with a note on the presumptive mechanism involved. *Proc. Japan Acad.*, 53: 143-146 (1977).

- 13) Simmon, V.F., Kauhanen, K., and Tardiff, R.G.: Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water. in: *Progress in Genetic Toxicology* (Scott, D. et al., eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 249-258 (1977).

マウス生殖細胞における変異原物質による染色体異常の誘発とその遺伝的影響の分析

食品薬品安全センター 加藤 基恵・岩原 繁雄

1. はじめに

環境変異研究の目的の1つにヒトにおける次世代へと伝達される各種の遺伝的障害の事前評価がある。遺伝的障害の事前評価において、生殖細胞を対象にしたマウスの *in vivo* の遺伝的障害に関する研究は示唆に富むと考えられる。

遺伝的障害は遺伝子と染色体レベルの2種類の障害に大別できる。マウス生殖細胞の遺伝子突然変異の検出系としては主に特定座位試験があり、染色体異常の検出系としては精原細胞や精母細胞を用いた染色体、優性致死、転座試験などが知られている。しかし、雄生殖細胞における各種の変異原物質の処理により、特に減数分裂を終了した細胞のDNAに障害が誘発され、かつそれらが受精に授かった場合、どのような染色体異常として検出されるのか未だ明らかでない。さいわいマウスの1細胞期胚においては雄由来と雌由来の染色体が区別できる利点がある。

本論ではX線を基準に、各種の化学物質を雄マウスに処理し、精子形成過程に誘発された障害を1細胞期胚の雄由来の染色体の分析で検出し、その結果を併せて他の遺伝的障害との関係について検討し、その結果、2・3の知見を得たのでここに紹介する。

2. 材料と方法

(1) 動物：本実験に用いたマウスは静岡県実験動物農業協同組合から購入したSlc-BDF₁ (C57BL/6 × DBA/2)を用いた。変異原物質は9週齢の雄に処理し、また交配には9週齢の雌を用いた。

(2) 変異原物質：Procarbazine hydrochloride

(Procarbazine) (日本ロシュ(株)), Mitomycin C (MC) (協和醸酵工業(株)), Methyl methanesulfonate (MMS) (Eastman Kodak Co.), Cyclophosphamide (CPA) (Sigma Chemical Co.), Trimethylphosphate (TMP) (和光純薬工業(株)), Nitrogen mustard-N-oxide hydrochloride (Mustard) (吉富製薬(株)), isoPropyl methanesulfonate (iPMS) (Eastman Kodak Co.), Fosfestrol (*a,a'*-Diethyl-4, 4'-stilbene-diol diphosphoric acid ester; DSDP) (杏林薬品(株))。それぞれの化学物質の投与量は最大耐量に近い濃度を用いた。X線の照射は診療用の装置 (NEC Co. Japan) を用い線源から80 cmの距離 (200 rad/min) で500 rad照射した。

(3) 1細胞期胚の染色体標本作製方法与優性致死試験：1細胞期胚の染色体標本作製はKatohとTanaka (1980)の方法に従った。交配に用いるマウスは交配開始前の3週間、短い暗時間 (10:00~18:00)の照明条件下で飼育し、雌マウスにおける排卵時刻 (18:00前後)を一定にした。それぞれの物質は雄マウスの腹腔内に1回投与し、投与直後より雌マウスと交配させた。投与後の交配期間は各々の変異原物質により3週間 (Mustard), 5週間 (CPA, iPMS, DSDP), 6週間 (Procarbazine, MC, MMS, TMP, X線)おこなった。交配方法は毎週1匹の雄マウスに対し2匹の雌マウスを同居させ、毎日暗時間終了後に膣栓を確認した。この実験群を2群に分けて実験を行った。1細胞期胚の染色体標本作製は暗時間終了後15時間後に膣栓

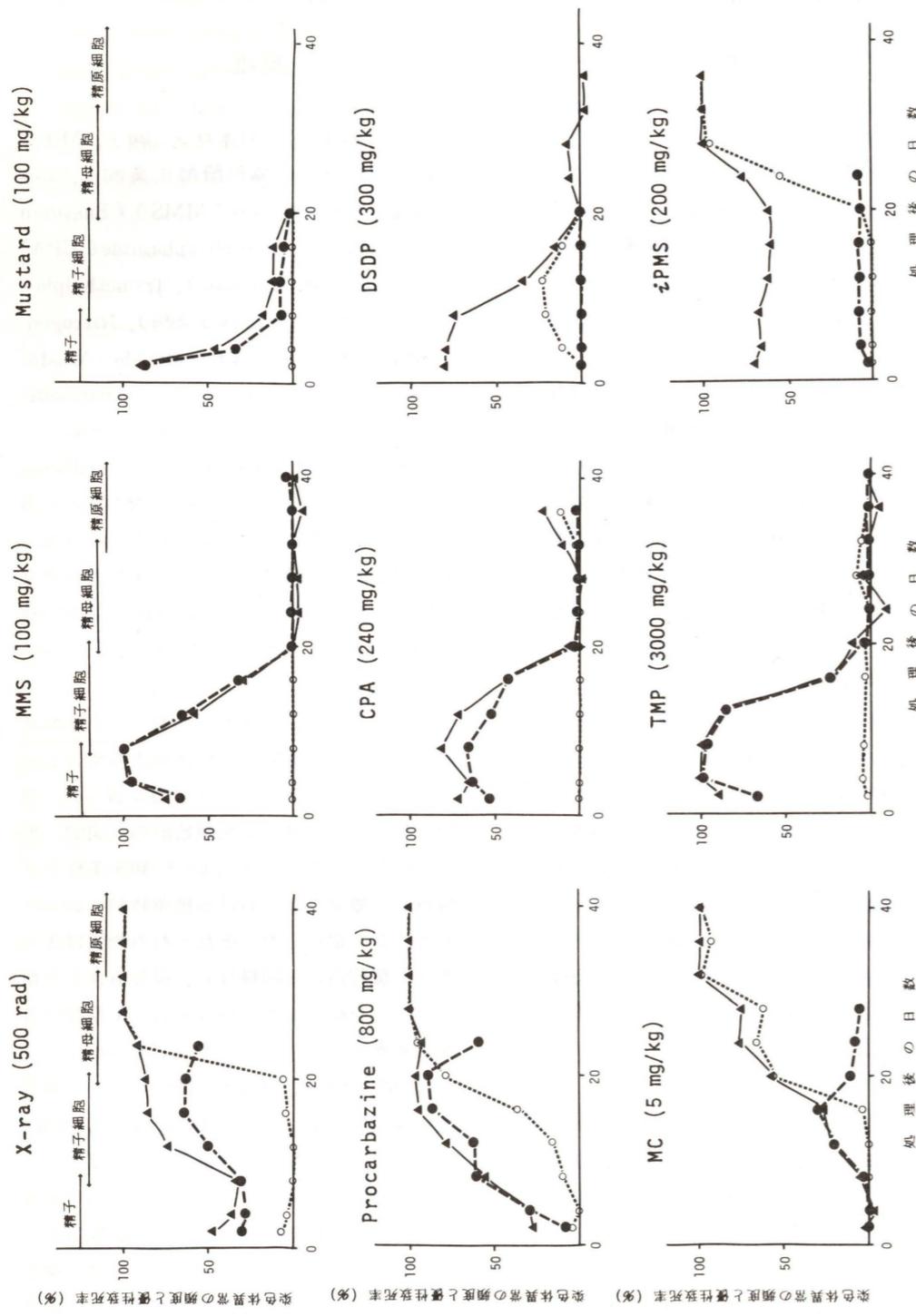


図1 精子形成過程に各種の変異原物質処理により、1細胞期胚で検出された染色体異常の頻度(●—●)と、優性致死率(▲—▲)および不受精卵率(○—○)との関係

の確認された雌マウスの腹腔内にコルヒチン 4 mg/kgを投与し、投与後3~7時間後に屠殺し、卵管膨大部より卵を回収し、それらの卵は低張処理後固定し、スライドガラス上で染色体を広げ、染色し、観察に供した。1細胞期胚の染色体分析は雄由来の染色体についてのみおこなった。第2減数分裂中期で停止した卵は不受精卵と判定した。優性致死試験では腔栓確認後13日目頃に雌マウスを剖検し、生存胎児数と着床後の死胚数を観察した。優性致死率は次式により算出した。

$$\text{優性致死率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{処理群の腔栓の確認された雌当りの生存胎児数}}{\text{対照群の腔栓の確認された雌当りの生存胎児数}} \right) \times 100$$

(4) 不定期DNA合成(UDS)の検出: 精子形成過程のUDSの検出はSega(1974)の方法を多少修正し行った。雄マウスの腹腔内に物質(MMS, ProcarbazineおよびMC)を投与し、同時に1睾丸当り30 μCi(比活性: 40~60 Ci/m mole)のThymidine-methyl-H3 ([³H]dT, New England Nuclear Co.)を睾丸内に投与した。MMSおよびMC投与群においては投与後1~40日、Procarbazine投与群においては投与後12~24日の間、4日ごとに3匹ずつ解剖し、精管内の精子を回収した。回収した精子は生理食塩液で4回洗い、スライドガラス上に塗抹して乾燥させ、オートラジオグラフを作製し、精子頭部上の銀粒子数を観察し、UDSの有無を判定した。

3. 各種の変異原物質と染色体異常との関係
染色体に対する放射線と化学物質の作用の違いは、放射線は細胞周期と無関係に染色体異常を誘発するのに対し、化学物質はどの細胞周期に処理しても染色体異常を誘発するには処理した細胞がDNA合成期を経過する必要がある、

そこに誘発される異常は染色分体型であると言われてきた。しかし、著者らは化学物質を雄マウスの精子細胞あるいは精子に処理し、受精後1回目のDNA合成を経過した1細胞期胚の染色体分析をおこなった結果、体細胞の場合とはかなり異なることを報告してきた(KatohとTanaka, 1980; Katohら, 1981; Katohら, 1982 a; Katohら, 1982 b; Katohら, 1983 a; KatohとIwahara, 1983 b; 加藤と岩原, 1983 c)。第1図に各種の変異原物質を精原細胞, 精母細胞, 精子細胞および精子に処理し、1細胞期胚の染色体分析で検出された染色体異常の頻度(染色体異常を有した卵の頻度)を図示した。

また第1表にそれらの変異原物質を精子細胞と精子に処理し、1細胞期胚の染色体分析で検出された染色体の構造異常をタイプ別に要約した。

その結果、第1図にみられるようにDSDP以外の物質は精子細胞あるいは精子に対し顕著な染色体異常を誘発し、その染色体異常誘発頻度(感受性)は生殖細胞の発育に伴って顕著に左右し、物質によって感受性が変動することが分かる。X線の精子細胞に対する感受性は精子のそれに比較して高い。MCの作用は前期精子細胞から後期精子細胞にかけて感受性が減少し、精子に至って殆んど感受性がみられなくなる。Procarbazineの感受性はMCと類似するが精子に対して感受性が認められた。MMS, CPAおよびTMPは類似した感受性の傾向がみられ、前期精子細胞から後期精子細胞にかけて感受性は増加し、後期精子細胞から精子にかけて最大に達する。Mustardによる感受性は他の変異原物質と比較して後期精子細胞から精子にかけて極端に増加し、投与直後の精管内の精子に対して最も感受性が高くなる特徴が観察された。iPMSの精子細胞と精子に対する感受性は低く、生殖細胞の発育に伴って顕著な変動を示さな

後の日数に伴って増加せず、逆に極端に減少する傾向がみられた。以上の考察から、化学物質を精子細胞や精子に処理した場合、染色体異常の誘発は貯蔵効果によるとする見解とは異なり、染色体異常の誘発と貯蔵効果との関係については今後さらに検討する計画である。

4. UDS の誘発と染色体異常との関係

変異原物質を雄マウスの精母細胞、精子細胞、精子に処理した場合、UDS の誘発は精母細胞および精子細胞において観察され、ところが精子においては誘発されないことが知られている (Sega, 1974 ; Sega ら, 1976 ; Sega ら, 1978 ; Sotomayor ら, 1978 ; Katoh ら, 1978 ; Katoh と Tanaka, 1980 ; 加藤と岩原, 1983 b)。この UDS の誘発と染色体異常の結果とを比較検討した。Procarbazine, MMS, CPA, Mustard, iPMS および X 線を精母細胞と精子細胞、精子に処理した場合、UDS は精母細胞と精子細胞に誘発されるが、MC 処理の場合には誘発されない。MMS, CPA および Mustard を精子細胞および精子に処理した場合、UDS を誘発する精子細胞よりも UDS を誘発しない精子において染色体異常の誘発頻度が高かった。この結果からみると UDS と染色体異常の誘発時期には逆相関係のあることが示唆される。Procarbazine および X 線を処理した場合、UDS を誘発しない精子よりも UDS を誘発する精子細胞において、染色体異常の誘発頻度が高い傾向がみられた。また MC を処理した場合、精子細胞と精子に UDS の誘発は観察されないが、精子細胞に対してのみ染色体異常が誘発された。この点に関して Sega (1979) も論じているように、精子形成過程における遺伝的障害の減少と UDS の誘発とは直接関係のないことが推察された。また UDS の誘発と染色体異常の誘発との差異は検出される遺伝的障害の差異によるものと考えられる。いずれにせ

よ染色体異常と UDS との関係は明らかでなく今後詳細に検討する必要性が痛感された。

5. 優性致死と染色体異常との関係

精原細胞および精母細胞に Procarbazine, MC, iPMS および X 線を処理し、1細胞期胚の染色体分析および優性致死試験をおこなった結果、不受受精卵と優性致死の出現頻度が一致し、両生殖細胞におよぼす優性致死効果はおもに不受受精卵によるものであることが分かる (図 1)。不受受精卵の出現に関しては前述したように修復不可能な染色体レベルの大きな障害を受けた大部分の精母細胞が減数分裂の過程で選択・淘汰されること、あるいは精原細胞期での有糸分裂が阻害されることにより精子減少症や無精子症をひきおこし、その結果不受受精卵が出現するものと推察される。一方、Procarbazine, MC, MMS, CPA, TMP および Mustard を精子細胞および精子に処理した場合、それぞれの変異原物質による染色体異常の誘発頻度は優性致死率と大部分一致し (図 1)、精子細胞および精子におよぼす優性致死は明らかに 1細胞期胚の雄由来の染色体において検出された染色体異常に起因するものと考えられ、染色体異常は優性致死の主な原因であることが改めて確認された。しかし、iPMS (Katoh と Iwahara, 1983 a) と DSDP (加藤ら, 1980) にみられるように例外があるので以下の節で改めて論じたい。

(1) 1細胞期胚の雄由来の染色体異常と無関係な優性致死突然変異 : iPMS を精子細胞および精子に処理し、染色体分析と優性致死試験をおこなった結果、優性致死突然変異誘発率は 65.3% で、一方、染色体異常の誘発頻度は 7.6% と低く、優性致死突然変異と染色体異常とは一致しないことが分かった。この iPMS による優性致死事象の特徴は、他の変異原物質と異なり着床後の胚死亡が主であった。これらの事象から、iPMS の高頻度の優

性致死突然変異、特に着床後の胚死亡は 1細胞期胚の雄由来の染色体異常に起因するものではなく、光学顕微鏡下では検出できない微小な染色体の構造的異常に起因していると考えられる。このような微小な染色体の構造的異常は数回またはそれ以上の DNA 合成サイクルを経た胚にはじめて染色体異常として検出されうる可能性 (菊池ら, 1982) が考えられる。

(2) 染色体異常を伴わない胚の致死事象 : 雄マウスに Diethylstilboestrol の誘導体である DSDP を腹腔内に 1 回投与し、無処理の雌マウスと交配させ、優性致死試験、1細胞期胚の染色体分析、排卵 72 時間後の卵割状態の観察や卵の回収部位、射出精液からホルモン物質の検出などをおこなった。その結果、優性致死試験では投与後 0~8 日において未着床胚が高頻度誘発されたが、1細胞期胚の染色体分析では染色体異常が検出されなかった (表 1, 図 1)。なお、排卵 18 時間後の剖検では子宮が溶媒投与群と異なり膨満し帯白色の液が貯留し発情前期の子宮の状態であった。排卵 72 時間後の卵は通常子宮から回収されるはずであるが、本薬剤の処理の場合、卵管膨大部や卵管下部より回収された。なお、回収された卵において顕著な分割遅延事象は観察されなかった。また DSDP を精子細胞および精子に処理し、処理後経時的に精管より精子を回収した場合、精子の形態異常は検出されなかった。さらに射出精液を卵巣摘出雌マウスの腔内に注入した結果、エストロゲン作用が検出された。また交尾直後の雌マウスに低濃度の DSDP を投与し優性致死試験をおこなった場合も未着床胚が高頻度に検出された。以上のような現象は DSDP を雄マウスに投与した場合、投与した DSDP が何らかの形で射出精液を介して雌マウスに持ちこまれた後、母体に作用し、その結果、胚の着床阻害

が誘発されたものと推察された。化学物質、特にホルモン作用のある薬剤の優性致死試験の結果の評価においては、精液を介した薬剤の雌マウスへの持ちこみという現象をも考慮する必要がある。なお、上述の現象はこれまで私の知る限り報告がないことを付記する。

6. 転座ヘテロ個体の誘発と染色体異常との関係

変異原物質を精原細胞および精母細胞に処理した場合、検出された大部分の大きな染色体異常は減数分裂の過程で選択・淘汰されてしまう可能性はよく知られた事実で、それらの細胞に処理した場合、F₁ において検出される転座ヘテロ個体の出現頻度は非常に低いと考えられる。一方、精子細胞や精子に処理し、障害を受けたそれらの細胞由来の雄配偶子は染色体異常を保有したまま受精に授かるので転座を保有した F₁ の転座ヘテロ個体が出産されやすいことが予測される。そこで変異原物質を精子細胞あるいは精子に処理し、染色体分析において主に検出された染色体異常のタイプと出産した F₁ の雄マウスにおいて検出された転座ヘテロ個体の出現頻度との関係を比較検討し、その結果を第 2 表に要約した。第 2 表から明らかなように Procarbazine および MC は染色体異常が主に誘発されるが、転座ヘテロ個体の誘発頻度が低い傾向にある。一方、染色体異常を主に誘発する MMS, CPA, TMP, Mustard および X 線は出産した F₁ において高頻度に転座ヘテロ個体を誘発する。第 1 表に示したように Procarbazine および MC によって誘発された染色体異常の中で転座ヘテロ個体の誘発と関連する交換型異常はほとんど染色体型でそれらは染色体型の相称性の交換型異常より派生したものである。ただ、この相称性の交換型異常を有した 1細胞期胚が卵割様式により 50% の確率で生存可能な染色体構成を有する 2細胞期胚 (正常な染色体構成を有する細胞と相互転座

表2 変異原物質を精子細胞あるいは精子に処理し1細胞期胚の染色体分析において主に検出された染色体異常のタイプとF₁の雄において検出された転座ヘテロ個体の出現頻度との関係

変異原物質の種類	処理時期	染色体分析の結果		転座試験の結果	
		処理濃度 (mg/kg)	染色体異常のタイプ	処理濃度 (mg/kg)	転座ヘテロ個体の出現頻度(%)
X-ray	精子 精子細胞	500 rad	染色体異常	300 rad	5.1 % ^a 2.17 % ^a
MMS	精子と精子細胞	100 mg/kg	染色体異常	40 mg/kg	1.1.2 % ^b
TMP	精子細胞	3000 mg/kg	染色体異常	1500 mg/kg	1.4.3 % ^b
CPA	精子 精子細胞	240 mg/kg	染色体異常	300 mg/kg	1.7.1 % ^b 4.0.5 % ^b
Mustard	精子	100 mg/kg	染色体異常	25 mg/kg	1.6.0 % ^b
iPMS	精子 精子細胞	200 mg/kg	染色体異常	75 mg/kg	2.7 % ^b 0.8 % ^b
Procarbazine	精子細胞	800 mg/kg	染色体異常	400 mg/kg	2.2 % ^a
MC	精子細胞	5 mg/kg	染色体異常	2.5 mg/kg	0.4 % ^a

a : F₁の雄の細胞遺伝学的分析において検出された転座ヘテロ個体の出現頻度
b : F₁の雄の妊性試験において検出された転座ヘテロ個体の出現頻度

7. おわりに

染色体を構成する細胞)に卵割し、F₁として出産した場合、このF₁はモザイクになると推察される。一方、転座ヘテロ個体を高頻度誘発するMMS, CPA, TMP, MustardおよびX線により誘発された染色体型の非相称性あるいは相称性の交換型異常は第1表に示したようにProcarbazineやMCに比べ非常に低く、F₁においての高頻度の転座ヘテロ個体の誘発は染色体型の相称性の交換型異常より派生しているとは考えにくく、むしろ1細胞期胚に染色体型の異常が高頻度観察されることより(表1)、1細胞期胚においてすでに効率よく相互転座染色体が形成される可能性があるため、F₁において転座ヘテロ個体が高頻度に出産してくるものと推察される。ところでiPMSは染色体型異常を誘発するにもかかわらず転座ヘテロ個体の誘発頻度は低い。この事実はiPMSが染色体異常を誘発しにくく(表1)、1細胞期胚で生存可能な転座染色体を形成する機会が少ないものと考察される。

以上の結果から、一般に化学物質を精子細胞や精子に処理した場合、X線と同様に染色体型異常を誘発しやすく、その結果、F₁において転座ヘテロ個体が高頻度に誘発されることが示唆された。したがって、1細胞期胚の染色体分析で検出される染色体異常のタイプによってF₁の転座ヘテロ個体の誘発頻度はある程度予測できうるものと考えられる。なお、このような転座染色体の形成は1細胞期胚に至るいかなる時期に形成されるかについて、現在のところ明らかではない。転座染色体の形成が修復の結果と考えるならば、精子細胞や精子の傷害が受精後の卵内において修復される報告(Generosoら, 1979)があり、転座染色体の形成も受精後の1細胞期胚の卵内において生じされると想像される。

染色体はDNAを梱包するタンパク質からなりたっているため、染色体の構造異常には当然のことながらDNA分子に何らかの変化が生起していることを意味している。すなわち精子細胞や精子のDNA分子に誘発された何らかの障害は受精後の1回のDNA合成期を経過した1細胞期胚において染色体異常へと拡大され、さらに転座ヘテロ個体あるいは優性致死突然変異として検出されうることを示唆している。

ところで体細胞および生殖細胞のいずれにおいても*in vitro*の染色体試験の結果からでは、次世代への伝達される遺伝的障害の危険性を十分に事前評価することは困難とされてきた。しかし、本報に記述した観察・分析結果からも明らかのように、マウスの生殖細胞を用いた*in vivo*の染色体異常あるいは優性致死事象の研究は、ヒトへの遺伝的障害の事前評価に大きく寄与されることが期待される。

本稿の執筆に当り、ご校閲をいただいた国立遺伝学研究所村上昭雄博士に深く感謝いたします。

この研究は厚生科学研究費補助研究事業によって行われた。

文 献

- 1) Adler, I. -D.: New approaches to Mutagenicity studies in animals for carcinogenic and mutagenic agents. 1. Modification of the heritable translocation test, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 1: 75-86 (1980).
- 2) Bürki, K., and Sheridan, W.: Expression of TEM-induced damage to postmeiotic stages of spermatogenesis of the mouse during early embryogenesis, Mutation Res., 52: 107-115 (1978).
- 3) Generoso, W.M., Cain, K.T., Krishina, M.,

- and Huff, W.: Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 435-437 (1979).
- 4) Generoso, W.M., Huff, S.W., and Cain, K.T.: Relative rates at which dominant-lethal mutations and heritable translocations are induced by alkylating chemicals in postmeiotic male germ cells of mice, Genetics, 93: 163-171 (1979).
- 5) Generoso, W.M., Cain, K.T., Cornett, C.V., Russell, E.W., Hellwing, C.S., and Horton, C.Y.: Difference in the ratio of dominant-lethal mutations to heritable translocations produced in mouse spermatids and fully mature sperm after treatment with triethylenemelamine(TEM), Genetics, 100: 633-640 (1982).
- 6) Katoh, M., Shibuya, T., Tanaka, N., Murota, T., and Iwahara, S.: Detection of chemically damaged DNA in the germ cells of male mice exposed *in vivo* to MMS and MC, Mutation Res., 54: 241 (1978).
- 7) Katoh, M., and Tanaka, N.: Relationship between chromosome aberrations in the first cleavage metaphases and unscheduled DNA synthesis following paternal MMS treatment, Jpn. J. Genet., 55: 55-65 (1980).
- 8) 加藤基恵, 田中憲穂, 岩原繁雄, 川上静夫, 紫野正雄, 大地隆温: Fosfestrol 投与雄マウスの受精結果について, 家畜繁殖学雑誌, 26: 51 (1980).
- 9) Katoh, M., Tanaka, N., and Iwahara, S.: Chromosome aberrations induced by mitomycin C treatment in early spermatids of male mice, Jpn. J. Genet., 56: 357-363 (1981).
- 10) 加藤基恵, 田中憲穂, 岩原繁雄: 生殖細胞での染色体異常形成 - Nitrogen mustard-N-oxide hydrochloride による染色体型異常誘発 -, 日本環境変異原学会第11回大会講演要旨集, 8 (1982 a).
- 11) Katoh, M., Tanaka, N., and Iwahara, S.: Formation of chromosome-type aberration after treatment with cyclophosphamide in postmeiotic stages of male mice, Jpn. J. Genet., 57: 676-677 (1982 b).
- 12) Katoh, M., and Iwahara, S.: Relationship between chromosome aberrations at the first cleavage metaphases and postimplantation loss in dominant lethal mutations induced by isopropyl methanesulfonate, Jpn. J. Genet., 58: 345-351 (1983 a).
- 13) Katoh, M., Tanaka, N., and Iwahara, S.: X-ray-induced chromosome aberrations in postmeiotic stages of mice, Jpn. J. Genet., 58: 337-344 (1983 b).
- 14) 加藤基恵, 岩原繁雄: 塩酸プロカルバジンによる雄マウス生殖細胞での染色分体型異常の誘発, 日本環境変異原学会第12回大会講演要旨集, 48 (1983 c).
- 15) 菊池康基, 木村善昭, 山本好一, 一ツ町晋也: 6-Mercaptopurineの優性致死作用ならびに染色体異常の発現機構について, 日本環境変異原学会第11回大会講演要旨集, 27 (1982).
- 16) Lang, R., and Adler, I. -D.: Heritable translocation test and dominant-lethal assay in male mice with methyl methanesulfonate, Mutation Res., 48: 75-88 (1977).
- 17) Léonard, A., and Deknudt, G.H.: The sensitivity of various germ-cell stages of the male mouse to radiation induced translocations, Can. J. Genet. Cytol., 10: 495-507 (1968).
- 18) 佐々木有, 手塚英夫, 井上円, 内田敦子, 森谷正明, 白須泰彦: Trimethylphosphate に関する遺伝性相互転座試験, 日本環境変異原学会第12回大会講演要旨集, 111 (1983).
- 19) Segal, G.A.: Unscheduled DNA synthesis in the germ cells of male mice exposed *in vivo* to the chemical mutagen ethyl methane-sulfonate, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 71: 4955-4959 (1974).
- 20) Segal, G.A., Owens, J.G., and Cumming, R.B.: Studies on DNA repair in early spermatid stages of male mice after *in vivo* treatment with methyl, ethyl, propyl, and isopropyl methanesulfonate, Mutation Res., 36: 193-212 (1976).
- 21) Segal, G.A., Sotomayor, R.E. and Owens, J.G.: A study of unscheduled DNA synthesis induced by X-rays in the germ cells of male mice, Mutation Res., 49: 239-257 (1978).
- 22) Segal, G.A.: Unscheduled DNA synthesis (DNA repair) in the germ cells of male mice its role in the study of mammalian mutagenesis, Genetics, 92: s49-s58 (1979).
- 23) Sotomayor, R.E., and Cumming, R.B.: Induction of translocations by cyclophosphamide in different germ cell stages of male mice: Cytological characterization and transmission, Mutation Res., 27: 375-388 (1975).
- 24) Sotomayor, R.E., Segal, G.A., and Cumming, R.B.: Unscheduled DNA synthesis in spermatogenic cells of mice treated *in vivo* with the indirect alkylating agents cyclophosphamide and mitomen, Mutation Res., 50: 229-240 (1978).

キイロショウジョウバエを用いたD-Dの伴性劣性致死試験

残留農業研究所 井上 達生・塚本 令子・森谷 正明
白須 泰彦

1. はじめに

殺線虫剤D-Dは1, 2-dichloropropaneと1, 3-dichloropropeneを成分としている。これら2成分は我々が先に報告したDBCP(1,2-dibromo-3-chloropropane)(Inoueら, 1982)と同じハロゲン化炭化水素であること, またD-Dはサルモネラ菌を用いたAmes試験で陽性の結果を得ている(Moriyaら, 1983)ことから, さらに高等なショウジョウバエの系を用いて変異原性試験を行った。

2. 試験材料および方法

(1) 供試薬剤: D-D (混合剤)

- 1, 2-dichloropropane
- 1, 3-dichloropropene
- 1, 2-dibromo-3-chloropropane (DBCP)

(2) 供試系統: Samarkand 野生型

Basc 系統

(3) 暴露方法:

原液 20 μl を濾紙に浸せ管びん中で揮発させた後, ハエを入れ, パラフィルムで封入し, 薬剤の気体を吸入させた。暴露時間は数分間行って, ハエを新しい飼育びんに取出し回復させた。

(4) 伴性劣性致死試験

図1に示した標準の交配様式に従って(Würglerら, 1984), 各実験群の野生型雄をBasc 処女雌と交配する(p-交配)。さらに, 得られたF₁の雌1匹ずつをF₁雄と交配し(F₁-交配)。それぞれのF₁雌よりF₂子孫を得る。

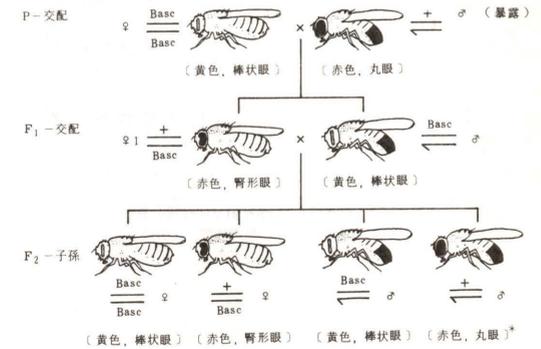


図1 伴性劣性致死試験の交配計画。雌雄の性染色体を遺伝子型で表わし, []内にその表現型: 複眼の色と形態を示す。もし雄の生殖細胞に自然発生あるいは誘発によって致死突然変異がX染色体上に少なくとも1個生ずれば, F₂の雄に野生型(赤色, 丸眼)*は出現しない。

試験されたX-染色体が致死突然変異を持つか否かの判定は単雌飼育によってF₂子孫が少なくとも20匹以上出現した飼育びんで行い, 野生型雄が存在しないかあるいは1匹以下のものを致死突然変異陽性と判定する。F₂子孫が20匹未満の飼育びんはF₂のヘテロ接合体の雌を単雌飼育し再試験した。再試験において判定可能であった個体は計算に入れたが, 再度20未満のものは除外した。

精子形成の各時期を勘案し, 気体暴露した野生型雄を順次新たなBasc 処女雌に交配し, 突然変異の誘発性を各時期ごとに検索するブルード分析を行った。親の交配は雄1匹に5匹の雌を与え, 3日間隔で3回ないし4回繰り返した。

致死突然変異頻度の対照群と暴露群での比較はKastenbaumとBowman(1970)の表に

よって統計学的検定を行った。

3. 結果と考察

Basic 試験はD-Dの暴露試験と各成分での単独暴露試験の2回行った。

D-DのBasic試験の結果を表1にまとめた。D-Dの暴露時間は3分、5分行い、陰

表1 D-D気体吸入による伴性劣性致死突然変異の頻度

Treatment time	Brood (days)	Fertility of P-males (%)	No. of chromosomes tested	No. of lethal mutations	% ^a	
D-D	0 min	I(0-3)	9.3.3	2.7.9	0	0.0
		II(3-6)	10.0.0	2.7.6	0	0.0
		III(6-9)	9.6.7	2.7.5	0	0.0
		Total		8.3.0	0	0.0
	3 min	I(0-3)	6.0.0	3.4.5	4	1.1.7
		II(3-6)	4.6.7	2.6.8	1	0.3.8
		III(6-9)	4.1.4	2.1.9	1	0.4.2
		Total		8.3.2	6	0.9.1*
	5 min	I(0-3)	1.8.5	9.3	1	1.0.0
		II(3-6)	2.8.6	1.0.3	2	1.6.7
		III(6-9)	3.6.2	1.2.3	1	0.7.1
		Total		3.1.9	4	1.0.0**
DBCP	5 min	I(0-3)	9.6.7	2.7.5	3	1.0.3
		II(3-6)	9.3.3	2.7.6	0	0.0
		III(6-9)	9.0.0	2.6.1	5	1.8.9
		Total		8.1.2	8	0.9.4*

a: 重みなし平均
*, **: 危険率それぞれ p<0.05, p<0.01 で有意差あり。

性対照群および陽性対照群(DBCPを暴露)を設けた。D-D暴露群では処理した雄成虫の妊性に影響が認められ、F₁雌を産んだ雄親の割合を妊性率として表中に示した。D-Dによる妊性率の低下は暴露時間5分の方が3分よりも顕著にみられた。致死突然変異の出現頻度は両群で、陰性対照群よりも有意に増加していた(p<0.01, p<0.05)。また陽性対照のDBCP暴露群でも致死突然変異が認められた(p<0.05)。

D-Dは致死突然変異を誘発すると考えられたので各成分での単独暴露試験を行った。その結果を表2にまとめた。雄親の妊性率の低下は1,2-dichloropropane 5分暴露,

表2 D-Dの成分単独暴露による伴性劣性致死突然変異の頻度

Treatment time	Brood (days)	Fertility of P-males (%)	No. of chromosomes tested	No. of lethal mutations	% ^a	
Control	0 min	I(0-3)	10.0.0	1.3.4	0	0.0
		II(3-6)	10.0.0	1.4.6	0	0.0
		III(6-9)	9.3.3	1.4.0	0	0.0
		IV(9-12)	9.2.3	1.1.1	1	0.9.3
	Total		5.3.1	0	0.1.7	
1,2-Dichloropropane	3 min	I(0-3)	9.6.7	2.3.1	1	0.4.9
		II(3-6)	9.3.1	2.4.4	1	0.3.7
		III(6-9)	9.6.3	2.6.5	0	0.0
		IV(9-12)	9.3.1	2.1.6	0	0.0
	Total		9.5.6	2	0.2.2	
5 min	I(0-3)	3.0.0	1.3.7	0	0.0	
	II(3-6)	6.6.7	3.7.6	0	0.0	
	III(6-9)	6.2.1	3.2.1	0	0.0	
	IV(9-12)	7.3.3	3.6.9	0	0.0	
Total		12.0.3	0	0.0		
1,3-Dichloropropene	15 min	I(0-3)	10.0.0	2.3.8	1	0.3.3
		II(3-6)	9.3.1	2.6.1	1	0.3.7
		III(6-9)	10.0.0	2.5.8	0	0.0
		IV(9-12)	9.6.2	2.2.0	0	0.0
	Total		9.7.7	2	0.1.8	
3 min	I(1-3)	3.0	2.0	0	0.0	
	II(3-6)	2.5.8	1.5.4	3	1.8.8	
	III(6-9)	5.1.6	2.5.2	4	1.2.8	
	IV(9-12)	3.6.7	1.7.8	2	0.9.1	
Total		6.0.4	9	1.3.4**		

a: 重みなし平均
*, **: 危険率それぞれ p<0.05, p<0.01 で有意差あり。

1,3-dichloropropene 3分暴露の両実験群で認められた。致死突然変異頻度の有意な増加は1,3-dichloropropeneの3分暴露群で認められた(p<0.01)。

誘発突然変異と生殖細胞(精子)の発生時期との関係を調べるためにブルード分析を試みた。誘発突然変異を検出したD-D暴露群と1,3-dichloropropene 3分暴露群において、誘発突然変異のブルード別での出現傾向は一樣ではなく、また雄親の妊性が低下することから明確な結論は下せないものと考えられた。

4. おわりに

気体の急性暴露試験において、D-Dはキロシウジョウバエ雄の生殖細胞に致死突然変異を誘発し、その作用性は成分の1,3-dichloropropeneに起因すると考えられた。

文 献

- Inoue, T., T. Miyazawa, N. Tanahashi, M. Moriya and Y. Shirasu: Induction of sex-linked recessive lethal mutations in *Drosophila melanogaster* males by gaseous 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP). Mutation Res., 108: 89-94 (1982).
- Kastenbaum, M.A. and K.O. Bowman: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Res., 9: 527-549 (1970).
- Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato and Y. Shirasu: Further mutagenicity studies on pesticide in bacterial reversion assay systems, Mutation Res., 116: 185-216 (1983).
- Würgler, F.E., F.H. Sobels and E. Vogel: *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes, in: Kilbey, B.J., M. Legator, W. Nichols and C. Ramel edited, Handbook of mutagenicity test procedures. 2nd ed. Elsevier Sci. Pub. (1984).

ショウジョウバエ精子および精原細胞におけるエチルニトロソウレアの摂取量と突然変異量の関係

長崎大学医学部原爆後障害 吉川 勲・綾木 歳一・大嶋加代子
医療研究施設遺伝学部門

1. はじめに

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では生殖細胞に生じる遺伝的変化—染色体異常・点突然変異—を巧妙な交配実験によって正確に検出できる (Abrahamson and Lewis, 1971)。なかでも、劣性致死突然変異を検出する方法は高感度な点突然変異検出法としてよく知られている (Lee ら, 1983)。

ところで、ショウジョウバエ生殖細胞を用い、化学物質の変異原性の検討を行う場合、化学物質を経口投与する処理方法が広く用いられている。しかし、この方法で得られる化学物質の投与濃度 (mM, ppm) —突然変異量関係は、その物質の突然変異誘発機構を考察するには、不明確であることが多い (Lee, 1979; 吉川ら, 1984)。そこで、餌溶液として与えられた化学物質、エチルニトロソウレア (N-ethyl-N-nitrosourea; ENU), の体内摂取量を測定し、同時に精子時期における誘発性劣性致死突然変異量との関係を調べた (Ayaki ら, 1984a)。

化学変異原の遺伝的影響評価の立場からみれば、精母細胞から精子の間の時期で起こった突然変異は一過性であり、それを持つ精子が受精にあずからない限り、後代に対して何ら影響を及ぼさない。これに対して精原幹細胞に生じた突然変異は、その個体が生殖年齢にある間、突然変異を持った精子を排出しつづける。したがって、精原幹細胞時期における化学物質摂取量—突然変異量に関する資料が重要である (近藤, 1982)。そこでショウジョウバエ精原細胞の ENU に対する反応をその摂取量をもとにし、X—および第 2 染色体上に誘発される劣性致死

突然変異を指標として検討した (Yoshikawa ら, 1984)。

2. ENU の投与濃度と摂取量および誘発突然変異量

一般に、化学物質を溶液としてハエに投与する場合、次の二通りの方法が用いられる。1つは餌溶液として経口的に与える方法であり、他の 1つは腹腔内に直接溶液を注入する方法である。腹腔内注入法で得られる化学物質の投与量—突然変異量関係は、経口投与法による投与濃度—突然変異量関係に比較して、明瞭な直線性が得られる。しかし、この方法は比較的高度な技術を必要とし、大量の個体を処理することは難しい。またハエの体表組織の特性から注入した溶液の漏出が起りやすく、再現性のある実験結果を得ることが困難である。ハエの摂食行動に頼る経口投与法は大量個体の処理が可能なこと、また実験結果の再現性が比較的高いことなどから広く用いられている。しかし、この方法における投与濃度—突然変異量関係は明瞭でない。主な要因として投与濃度が体内に摂取された量を正確に反映していないことが考えられる。

そこで、³H で標識したショ糖を ENU—ショ糖溶液に少量添加、成虫に経口投与した後、ハエ体内に存在する ³H を測定し、これにもとづき摂取 ENU—ショ糖溶液量を求め、経口的に取り込まれた ENU 量を推定した。この摂取 ENU 量と伴性劣性致死突然変異誘発量との関係を検討した。

(1) 経口投与法による摂取 ENU 量の推定

a. 方法

1% ショ糖を含むリン酸緩衝液 (pH6.0) に ^3H で標識したショ糖を少量添加し、ENU濃度 0, 0.03, 0.3, 1.0 mM の溶液を調製した。図1 左側に示した方法により、摂取

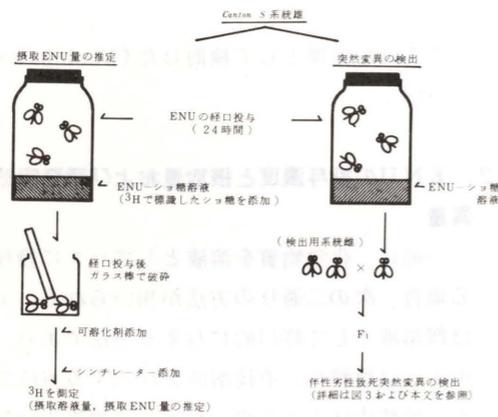


図1 経口投与によるENUの体内摂取量の推定と伴性劣性致死突然変異の検出

ENU量を推定した。各種濃度のENU-ショ糖溶液 8 cc をキムワイブを敷いた牛乳ビンに注入し、羽化後2日のCanton-S (野生型) 系統雄 30 頭に 25°C 暗中で24時間摂食させた。なお、溶液の摂食を全個体にわたり円滑に行わせるため、投与前3時間絶食させた。投与終了後直ちにハエを蒸留水で洗浄し、20頭をランダムにサンプルした。それをガラス棒で細かく破碎、可溶化剤ハイアミン 1 cc を加え、37°C で24時間溶解させた。シンチレーターを加え、低温 (5°C) 下に一夜放置した後 ^3H を測定した。

b. ENUの投与濃度と摂取量の関係

^3H の測定値から各投与濃度における摂取ショ糖溶液量を算出することができる。図2に投与濃度に対する溶液摂取量、および図中の式にもとづいて推定された摂取ENU量を示した。ENUの投与濃度が高くなるにしたがい溶液の摂取量が減少する。

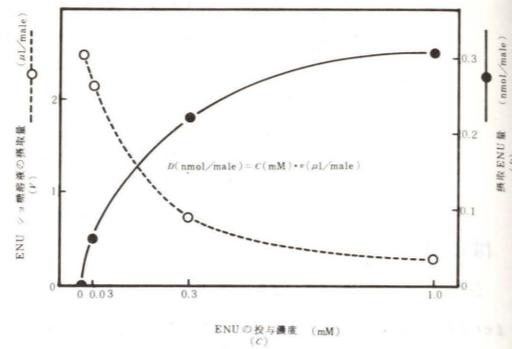


図2 ENU-ショ糖溶液をショウジョウバエに24時間経口投与した時、投与濃度と個体当りの溶液摂取量および摂取ENU量の関係

減少のパターンは投与濃度と摂取ENU量の間、直線関係が存在しないことを示している。投与濃度が0.3mMから1.0mMと、約3倍になっても、摂取ENU量は37%増加するだけである。ENU溶液に対するハエの拒食反応は、化学物質の投与濃度にもとづく突然変異誘発頻度の表現が、適切でないことを示唆している。

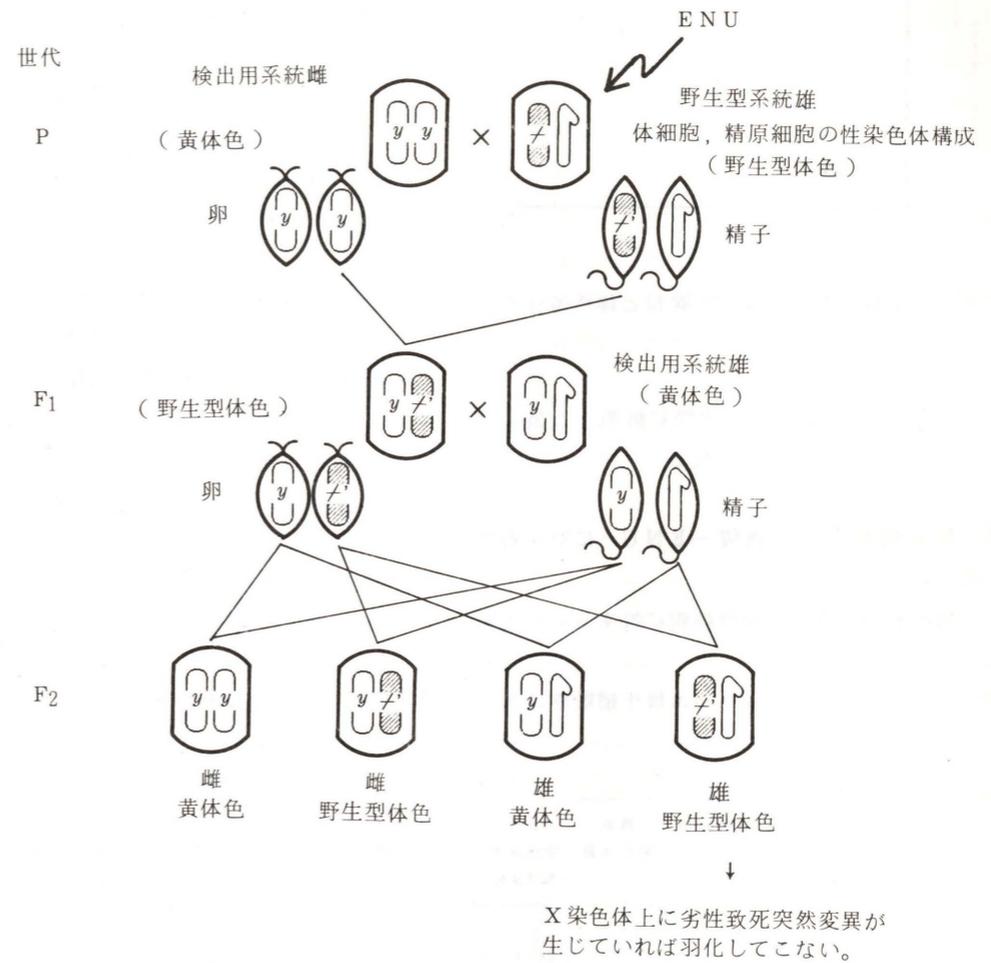
(2) 摂取ENU量と誘発突然変異量の関係

a. 突然変異の検出

前述した条件でENU-ショ糖溶液をCanton-S系統雄に経口投与し、精子に誘発される伴性劣性致死突然変異を調べた (図1 右側)。24時間の経口投与後、雄は直ちに突然変異検出用系統 ($y^{sc^{S1}} In49^{sc^8}; bw; st p^D$, 以下O-1と記す) 雌に1日間交配し、図3に示した検出方法によって、2世代後に致死突然変異を検出した。

b. 結果

摂取ENU量に対する致死突然変異頻度を図4に示した。摂取ENU量と突然変異量の間には明瞭な直線関係が成り立っている (χ^2 linearity = 1.29, $p > 0.10$)。したがって、この方法によって推定される摂取



劣性の標識遺伝子, *yellow*, と全長にわたる逆位をもつX染色体。

yellow に対する野生型遺伝子 y^+ を持つX染色体。この染色体上に誘発される劣性致死突然変異を検出する。

Y染色体。

図3 伴性劣性致死突然変異の検出

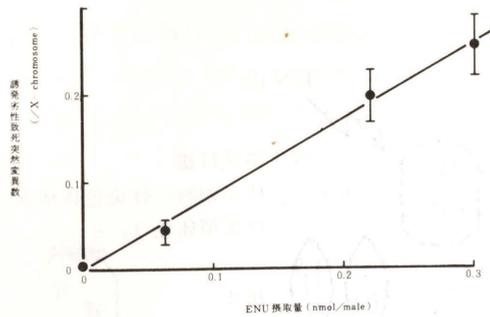


図4 個体当りのENU摂取量と伴性劣性致死突然変異率

ENU量は、ハエが実際に摂取した量に近い値であると考えられる。

3. 精原細胞の化学物質-ENU-に対する反応

精原細胞，特に精原幹細胞に対する化学変異

表1 キイロショウジョウバエ雄生殖細胞におけるENU誘発劣性致死突然変異

投与濃度 (mM)	摂取ENU量 (nmol/fly)	処理を受けた細胞時期	X-染色体			第2染色体		
			調査染色体数	致死染色体数 (%±S.E.)	染色体当りの注1) 致死突然変異数	調査染色体数	致死染色体数 (%±S.E.)	染色体当りの注1) 致死突然変異数
0.0	0.0	精子	737	5 (0.68±0.30)	0.0068	214	2 (0.93±0.66)	0.0094
		精原細胞	1008	1 (0.10±0.10)	0.0010	184	0 (—)	—
0.03	0.064	精子	776	39 (5.03±0.78)	0.0516	230	30 (13.04±2.22)	0.1398
		精原細胞	970	13 (1.34±0.37)	0.0135	198	7 (3.54±1.31)	0.0360
0.3	0.221	精子	525	106 (20.19±1.75)	0.2255	214	90 (42.06±3.37)	0.5457
		精原細胞	1340	66 (4.93±0.59)	0.0505	188	57 (30.32±3.35)	0.3612
1.0	0.302	精子	648	166 (25.62±1.71)	0.2959	196	104 (53.06±3.56)	0.7563
		精原細胞	1205	55 (4.56±0.60)	0.0467	166	48 (28.92±3.52)	0.3413

注1) 誘発された劣性致死突然変異遺伝子は染色体上にポアソン分布すると仮定して計算した。

原の遺伝的影響をマウスとショウジョウバエで比較することは、ヒトへの危険度評価の立場から重要である (Russell, 1982)。そこで前述した摂取ENU量を基準に、伴性および常染色体 (第2染色体) 性劣性致死突然変異を指標とし、精子および精原細胞の反応を検討した。

(1) 伴性劣性致死突然変異を指標とした精子および精原細胞の反応

a. 方法

伴性劣性致死突然変異の検出は前章で述べた方法による。精子時期に処理を受けた精子における突然変異の検出は、投与後0-1系統雌と1日間の交配から、また精原細胞時期に処理を受けた精子での検出は、投与後15日~18日目の交配から生じた子供について行われた。

b. 結果

結果は表1の4~6欄と図5に示した。

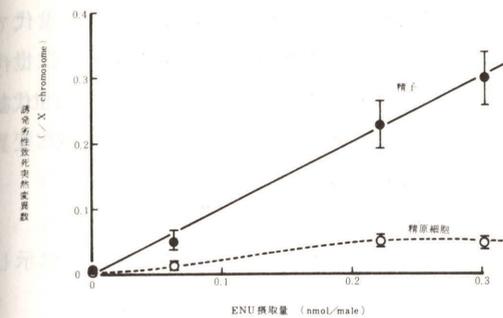


図5 X染色体上に誘発される劣性致死突然変異を指標とした精子及び精原細胞のENUに対する反応

摂取量-突然変異量関係における精子の反応は先に述べたと同様、直線がよくあてはまる (χ^2 linearity=1.38, $P>0.10$)。しかし、精原細胞の反応は直線関係から有意に隔たっている (χ^2 linearity=7.60, $0.025>P>0.01$)。しかも、突然変異率は精子のそれと比較してかなり低い。

(2) 第2染色体上に生じる劣性致死突然変異を指標とした精子および精原細胞の反応
精原細胞における伴性劣性致死の低い突然変異率は、それを持つX-染色体の選択的な

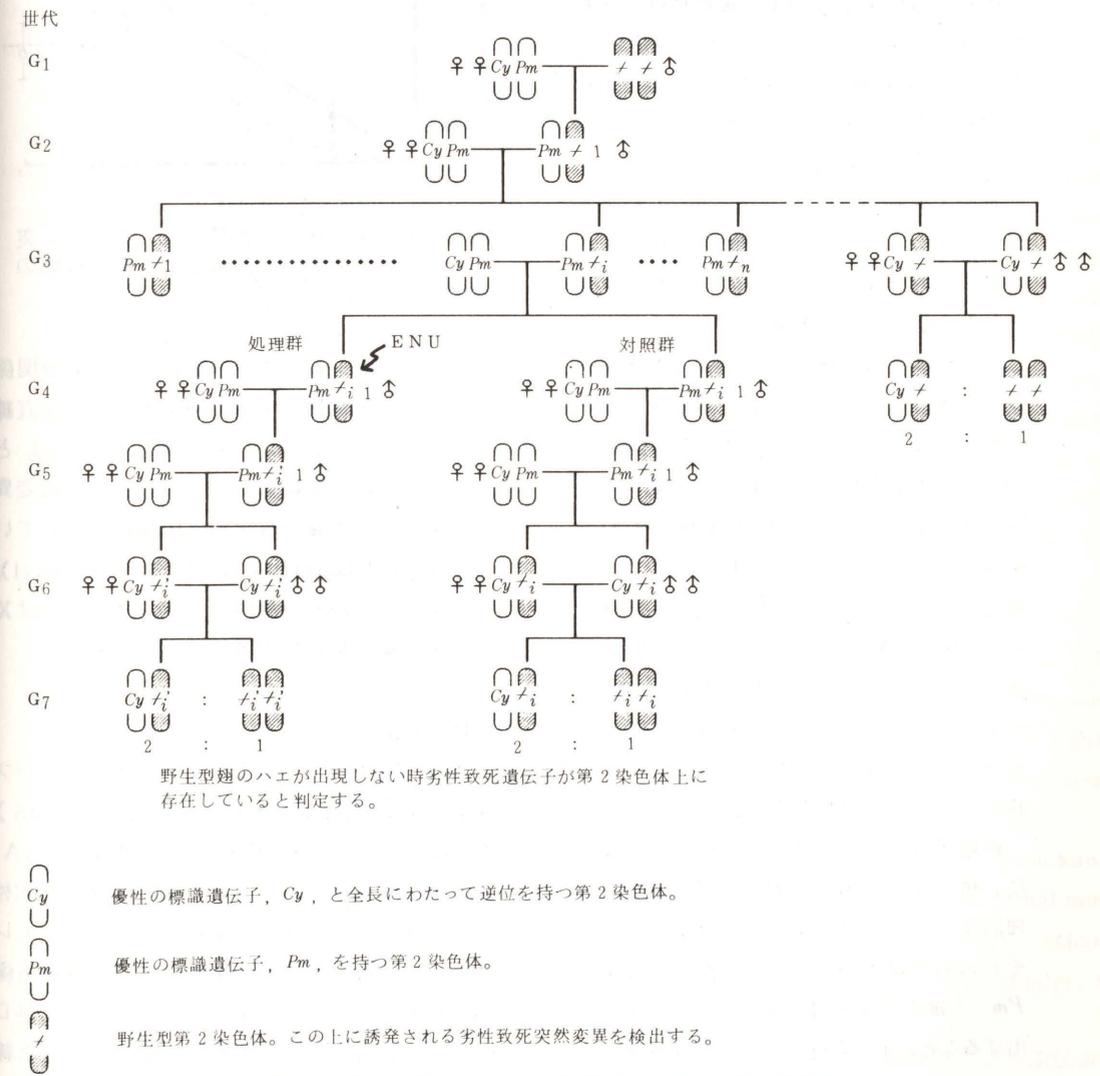


図6 第2染色体上に生じる劣性致死突然変異の検出

淘汰によると思われる。したがって、この可能性を除去するため、第2染色体上に生じる劣性致死突然変異を指標とし、精原細胞の化学物質-ENU-に対する反応を調べた。

a. 方法

第2染色体上に誘発される劣性致死突然変異の検出は、Cy法(Wallace, 1956)により行った。図6に検出方法を示す。実験に供する1本の正常なCanton-S系統由来の第2染色体を抽出するため、同系統雄を標識遺伝子系統, Cy/Pm, に交配した。この標識遺伝子系統の第2染色体はいずれも多重逆位染色体で、一方は優性遺伝子Curly(Cy; 曲翅), 他方は同じく優性遺伝子Plum(Pm; 暗紫色の眼)によって標識されている。次世代(G₂)においてPm/+の雄を1頭抽出した。この雄を再びCy/Pm雌に交配し、G₃世代で多数のPm/+_i雄(約250頭)を得た。これはG₂世代で抽出した+染色体を多数複製したことになる(+染色体系統の確立)。抽出した+染色体上に劣性致死あるいは有害遺伝子がないことを確認するため、G₃世代の同胞中、Cy/+の雌雄を集めて交配し、次世代で+染色体をホモにもつ個体の生存力を調べた。致死あるいは有害遺伝子を持たないことを確認した後、G₃世代のPm/+_i雄個体をCy/Pmに交配し、G₄世代で各染色体系統ごと処理群に相当する数のPm/+雄を集めた。染色体系統内雄のそれぞれに0, 0.03, 0.3, 1.0mMのENU-ショ糖溶液を前述の方法で経口投与した。

被処理雄は1頭ずつCy/Pm雌と交配した。精子時期に処理された精子の抽出は処理直後の3日間の交配から、精原細胞期それは処理後15~18日の交配から生じるPm/+雄を各染色体系統ごとに1頭だけ抽出することによって行われた。雄は再度Cy/

Pm雌に交配した(G₅世代)。G₆世代でCy/+の処理雌及び雄を選び交配、次世代における表現型の分離比(図6のG₇世代参照)より第2染色体上の劣性致死突然変異の存在を確認した。

b. 結果

結果は表1の7~9欄および図7に示し

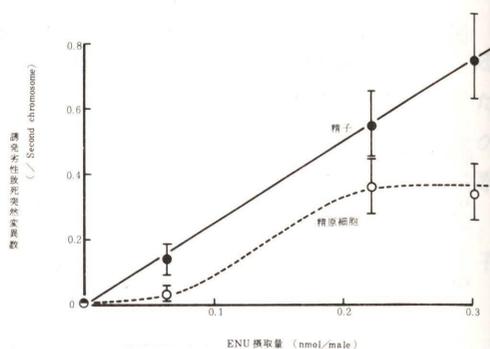


図7 第2染色体上に誘発される劣性致死突然変異を指標とした精子及び精原細胞のENUに対する反応

た。精子における摂取量-突然変異量関係は伴性劣性致死突然変異のそれと同様直線である(χ^2 linearity = 0.46, $P > 0.10$)。ところが精原細胞における摂取量-突然変異量関係は明確なS字型反応曲線を示している(χ^2 linearity = 12.39, $0.005 > P > 0.001$)。精子に比較した精原細胞の突然変異率はX-染色体の場合ほど低くはない。

4. おわりに

AaronとLee(1978)はエチルメタンスルフォネイト(ethyl methanesulfonate; EMS)をショウジョウバエに経口投与し、精子のDNAに生じたアルキレーションの量と誘発伴性劣性致死突然変異の頻度との関係を調べ、アルキレーションの量と突然変異頻度との間に直線関係が存在することを報告している。しかし、経口投与したEMS濃度と突然変異量の間には直線

的な関係の存在を述べることは難しい。多くの化学変異原の投与濃度に対する誘発突然変異頻度の反応曲線はまちまちである(cf. Vogel and Natarajan, 1979)。以上の事実は、摂食行動にたよる経口投与方法の場合、投与濃度とそれが生体内に取り込まれる量との間に直線的な関係が成り立っていないことをうかがわせる。

我々はENU溶液に添加するショ糖の一部を³Hで標識したショ糖で置きかえ、摂食後、体内に存在する³Hの量から摂取されたENU量を推定した。この摂取ENU量と精子の誘発突然変異量の関係が直線であることから、推定した摂取量はショウジョウバエが実際に取り込んだ量に近いものであると考えられる。さらにEMSを用いて本報告と同様の実験を行ったところ、摂取EMS量と突然変異量の間には明確な直線関係が成り立つことを再確認した(Ayakiら, 1984b)。

マウスに対する化学物質の投与方法は腹腔内あるいは静脈への注入が一般的である。したがって、化学物質の変異原性についてマウスとショウジョウバエの実験結果を比較検討するためには、ハエの化学物質体内取り込み量を正確に測定し、生殖細胞における突然変異誘発頻度との関係を明らかにする必要がある。

摂取ENU量と突然変異量の間をX-および第2染色体上の劣性致死突然変異を指標として調べた結果、精子に比較して精原細胞の突然変異率は低く、その傾向はX-染色体上の致死遺伝子を指標にした場合、一層顕著である。X-染色体上に致死遺伝子を持つ精原細胞は精子形成過程において選択的な淘汰を受けることを示唆している。一方、ENUはマウス精原細胞において精子よりも高い突然変異誘発能を示す(Russell, 1982)。ところがショウジョウバエでは精子の方が精原細胞より高い。にもかかわらず、ENUの精原細胞における摂取量-突然変異反応曲線はRussellら(1982)によって報

告されているマウスのそれとよく類似している。Russellらはマウスの結果について次のように述べている。“低線量域における直線関係から期待されるよりも低い突然変異率は、精原細胞が化学変異原による遺伝的な損傷修復の能力を持っていることを示している。”

我々が得たショウジョウバエ精原細胞におけるENU誘発突然変異と摂取量との関係は、マウスの結果にもとづくRussellらの解釈によって説明できると考えられる。すなわちショウジョウバエ精原細胞もENU誘発DNA損傷を修復することができるようである。

文 献

- 1) Aaron, C.S., and Lee, W.R.: Molecular dosimetry of the mutagen ethyl methane-sulfonate in *Drosophila melanogaster* spermatozoa: Linear relation of DNA alkylation per sperm cell (dose) to sex-linked recessive lethals. *Mutation Res.*, **49**: 27-44 (1978).
- 2) Abrahamson, S., and Lewis, E.B.: The detection of mutation in *Drosophila melanogaster*, *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection* (A. Hollaender, ed.), Plenum Press, New York-London, Vol. 2. 461-487 (1971).
- 3) Ayaki, T., Ohshima, K., Okumura, Y., Yoshikawa, I., and Shiomi, T.: The relationship between the lethal mutation yield and the intake of ethylnitrosourea (ENU) in *Drosophila melanogaster*, *Environmental Mutagenesis*, **6**: 483-488 (1984 a).
- 4) Ayaki, T., Ohshima, K., and Yoshikawa, I.: Linear relationship between lethal mutation yield and intake of ethyl methane-sulfonate in *Drosophila melanogaster*, (in preparation) (1984 b).
- 5) 近藤宗平: 化学物質と放射線による遺伝毒性

大気浮遊粒子状物質の変異原性とマウス新生児試験

東京都公害研究所保健部 佐々木裕子・遠藤 立一

- の相違 - 放射線相当量RECはよくない -, 環境変異原研究, 4 (1): 37-40 (1982).
- 6) Lee, W.R.: Dosimetry of alkylating agents, Banbury Report 1. Assessing chemical mutagens, The risk to humans. (V. McElheny and S. Abrahamson, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, 191-200 (1979).
 - 7) Lee, W.R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Hall, E.S., Würigler, F.E., and Zimmering, S.: The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 123: 183-279 (1983).
 - 8) Russell, W.L.: Factors affecting mutagenicity of ethylnitrosourea in the mouse specific-locus test and their bearing on risk estimation, Environmental Mutagens and Carcinogens (T. Sugimura, S. Kondo, and H. Takebe, eds.). Proc. of the 3rd International Conference on Environmental Mutagens, Tokyo, Mishima and Kyoto, University of Tokyo Press, Tokyo, and Alan R. Liss, Inc., New York, 59-70 (1982).
 - 9) Russell, W.L., Humsicker, P.R., Raymer, G. D., Steele, M.H., Stelzner, K.F., and Thompson, H.M.: Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia, Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 3589-3591 (1982).
 - 10) Vogel, E., and Natarajan, A.T.: The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila*, Mutation Res., 62: 51-100 (1979).
 - 11) Wallace, B.: Studies on irradiated populations of *Drosophila melanogaster*, J. Genetics, 54: 280-293 (1956).
 - 12) Yoshikawa, I., Ayaki, T., and Ohshima, K.: Comparative studies of dose-response curves for recessive lethal mutations induced by ethylnitrosourea in spermatogonia and in spermatozoa of *Drosophila melanogaster*, Environmental Mutagenesis, 6: 489-496 (1984).
 - 13) 吉川 勲, 綾木 歳一, 大嶋 加代子: 化学物質の遺伝的影響を検索する系としてのショウジョウバエ生殖細胞, トキシコロジーフォーラム, 7: 409-420 (1984).

1. はじめに

近年, 大気中癌原物質の短期検索法の一つとして Ames らの開発したサルモネラと哺乳動物の肝ミクロソーム系を組み合わせる変異原性試験が広く用いられ, 我国においても種々の報告がなされている (Teranishi ら, 1978: Tokiwa ら, 1980: Fukino, 1982: 後藤ら, 1982)。これらの検討結果から, 特に, 都市域において大気中汚染物質に高い変異原性が検出され, ヒトへの影響が憂慮されている。Ames 法は癌原物質の最終判定法ではないが, 大気の変異原活性と肺癌死亡率との関連を示唆する報告もあり (Walker, 1982), 季節変動・地域変動の大きい大気の状態を, 少量の検体採取によって容易に判定できる有用な方法と言える。しかしながら, 大気中変異原物質が癌原物質であるか否かを評価するためには, 動物実験が不可欠である。そこで, 我々は Ames 法を用いて都市大気中の汚染物質の変異原性を検討する一方, 成熟期の動物に比較して感受性が高く (Pietra, 1959), 検体量も少なく済む新生児の動物を用いて癌原性試験を行い, 変異原性と癌原性の結果の比較を試みたので報告する。

2. 大気中浮遊粒子状物質の変異原性

都公害研究所 (東京都千代田区) 屋上において, 1982年6月-1983年4月まで隔月に, 月間延7日の割合でハイボリュームエアサンプラーを用いて石英濾紙 (Pallflex Type 2500) 上に大気浮遊粒子状物質の捕集を行った。捕集した浮遊粒子状物質はベンゼン-エタノール混合液 (4:1, V/V) で超音波抽出を行い, 減圧下で溶媒を留去した。得られたタ

ールおよびタールの一部を液々分配して得た中性・酸性・塩基性画分のタールは, DMSO に溶解し, 濾過滅菌して検体とした。変異原性試験は, *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 (Ames ら, 1975) 並びに, TA 98 NR, TA 98/1.8 DNP₆ (Rosenkranz, 1983) の4株を用い, プレインキューベーション法で行った。なお, 代謝活性化には, PCB (KC-500) 誘導のラット肝の S9 を用いた。その結果, 大気 m³ 当りの変異原活性は, TA 100, TA 98 ± S9 で, 夏期に比べ秋・冬期に高いという季節変動が認められた (図1)。

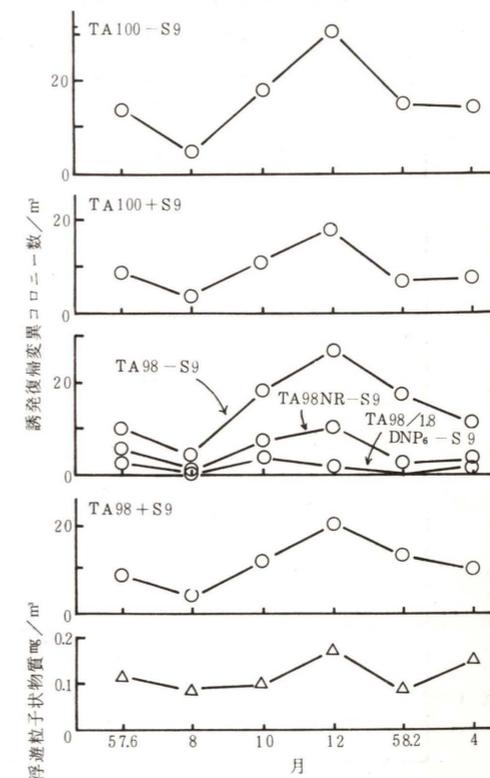


図1 東京都における単位空気量当りの変異原活性および浮遊粒子状物質量の年間変動

特に、S9 mix 非存在下での変異原活性の変動幅は大きく、最も高い活性を示した12月は、8月に比べ両株共に約7倍の変異原活性を示した。測定月ごとのTA100, TA98 ± S9の各変異原活性の比較では、菌株による違いはほとんど認められなかったが、代謝活性化の有無では両株ともに年間を通じて直接変異原性の方がいくらか高いという傾向がうかがえた。S9 mix 非存在下でのTA98株とTA98 NR, TA98 / 1.8 DNP₆ 両株の変異原活性の比較では、TA98 NRとTA98 / 1.8 DNP₆を用いた場合に、年間を通じて、復帰コロニー数の減少が見られた。採取時に濾紙上で産生したのも一部ある(Risbyら, 1983)とは考えられるが、この結果は、本調査の高い直接変異原活性にニトロアレン類が寄与していることを推測させた。次に、浮遊粒子状物質 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 当りの変異原活性もTA100, TA98 ± S9で、夏期に低く、秋冬にかけて高いという結果が得られ(図2), 大

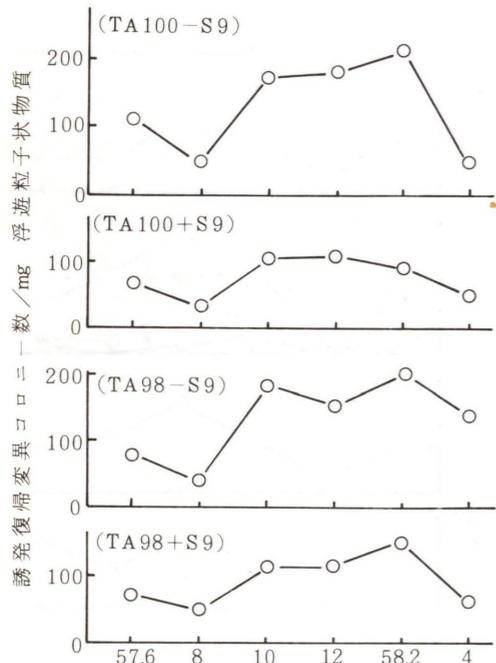


図2 東京都における単位浮遊粒子状物質当りの変異原活性の年間変動

気中浮遊粒子状物質の変異原性に関して、量だけでなく質の面でも季節変動があることが明らかとなった。また、 μg 当りの変異原活性では秋から冬にかけてほとんど変動が認められず、この時期の m^3 当りの変異原活性は、浮遊粒子状物質の量に依存することが示唆された。

図3に、中性・酸性・塩基性の各画分の m^3 当りの変異原活性を示した。3画分のうち、中性画分はタール量、変異原活性共に、年間を通して全浮遊粒子状物質抽出物の主体を占めた。更に、中性画分は他の画分に比較して顕著な季節変動を示し、年間の全変異原活性の変動が、この画分の変動によるものであることが示唆された。一方、酸性・塩基性画分は、年間を通して変異原性は検出されるものの、全変異原活性に占める割合は少なく、活性の変動幅も小さかった。

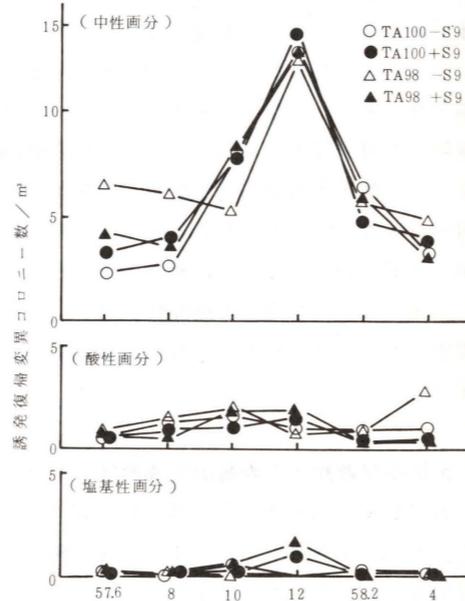


図3 東京都における単位空気量当りの分画別変異原活性の年間変動

3. 大気中浮遊粒子状物質の新生児試験

同所において、1980年11月-1981年2月

まで、ハイボリュームエアサンプラーを用いて、ガラス繊維濾紙(東洋濾紙, GB100R)上に大気浮遊粒子状物質を連続捕集した。捕集した浮遊粒子状物質は、前述の方法で抽出および分配操作を行い、タールとその中性・酸性・塩基性画分を得、検体とした。

癌原性の検討には、SPFのマウス(ICR-JCL)238匹を6群(タール, 中性画分, 酸性画分, 塩基性画分, 溶媒単独, 無処置)に分け、用いた。無処置群のマウスを除き、出生後24時間以内のマウスの頸背部皮下にオリーブ油(局方)に懸濁した検体10 μg を投与した。観察は最長1年間行い、定期的(3, 6, 12カ月)に解剖を行った。また、投与直後のへい死(食殺等)のマウスを除き、途中へい死のマウスも検討の対象として用いた。対象臓器は、気管(支)、肺、肝、腎、脾、心、膵、副腎、胸腺、乳腺、皮膚(投与部)および各附属淋腺とし、採材後、ホルマリン固定、薄切、染色(H・Eおよび必要に応じPAS, AZAN)を行い、光学顕微鏡により組織学的に観察した。

なお、各検体の一部は、TA100, TA98株を用いて前述の方法で変異原性試験を行った。表1に、タールおよびその3画分の大気 m^3 当りとタール μg 当りの誘発変異コロニー数を示した。タールとその画分からは、いずれもTA100, TA98両株で代謝活性化の有無にかかわらず変異原性が検出された。なかでも、中性画分のタールは、前述の1982-1983年の結果と同様に、他の2画分に比較して著しく高い変異原性を示した。また、4種のタールの示した大気 m^3 当りの変異原活性は、いずれも1982-1983年の変動幅内であった。

マウス新生児試験では、対照の2群(溶媒単独, 無処置)を除き、投与後数日以内かなりのへい死が観察された。特に、酸性画分, 塩基性画分群では、離乳までの死亡率が50%以上となった。今回の実験は、各群の検討対象動物数

表1 大気浮遊粒子状物質抽出物の変異原性

%	復帰変異コロニー数/ μg タール		復帰変異コロニー数/ m^3 空気	
	TA100	TA98	TA100	TA98
	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9
タール	565	1225	713	759
中性画分	48.0	379	753	789
酸性画分	32.2	205	75	158
塩基性画分	19.8	88	85	43

* 各画分のタールに対する割合

にバラツキが生じたため、今後は投与量・方法を更に検討する予定である。

図4に、雌雄別に6実験群の平均体重推移を示した。その結果、酸性画分群が雌雄共に最も平均体重の増加が著しかった。また、タール, 中性画分, 塩基性画分群も、対照の2群に比較して、平均体重の増加が認められた。この体重増加と変異原物質(≠癌原物質)との関連性については現在明らかではない。

組織学的な検討の結果は、表2に見る通り、酸性画分群を除き、全群に腫瘍の発生が認められた。見出された腫瘍の種類は、リンパ性白血病並びに上皮性の肺腫瘍で、検体投与部位には何ら組織変化は認められなかった。このうち、白血病の発生率は0~18%で、非特異的に各群に発生しており、タールまたはその画分の投与の影響は認め難かった。一方、肺腫瘍の発生は、発生率並びに組織像から、タールおよびその画分の投与の影響が強く示唆された。6実験群の中で中性画分群が最も発生率が高く、マウス25例中7例に有意(χ^2 検定: $P < 0.01$)に腺腫の発生が見られた。うち2例は形態学的に悪性であり、残り5例も悪性化の傾向を示した。更に、この群にのみ複数の肺腫瘍を持つマウス2例が見出された。他の画分に比較し極めて高い変異原性を示す中性画分を投与したマウスに、有意に肺腫瘍の発生が見られたことは、変異原性と癌原性の関連が、大気汚染物質でも高いこと

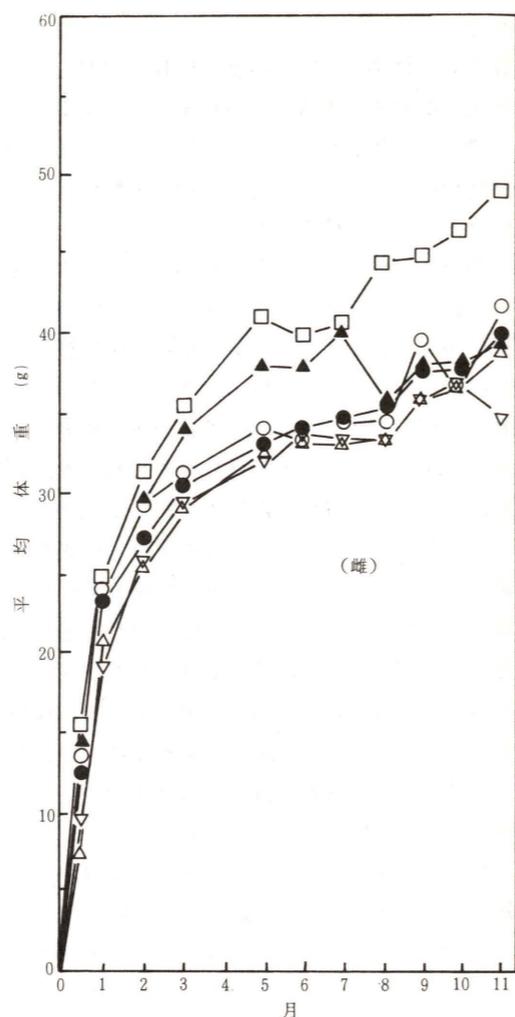
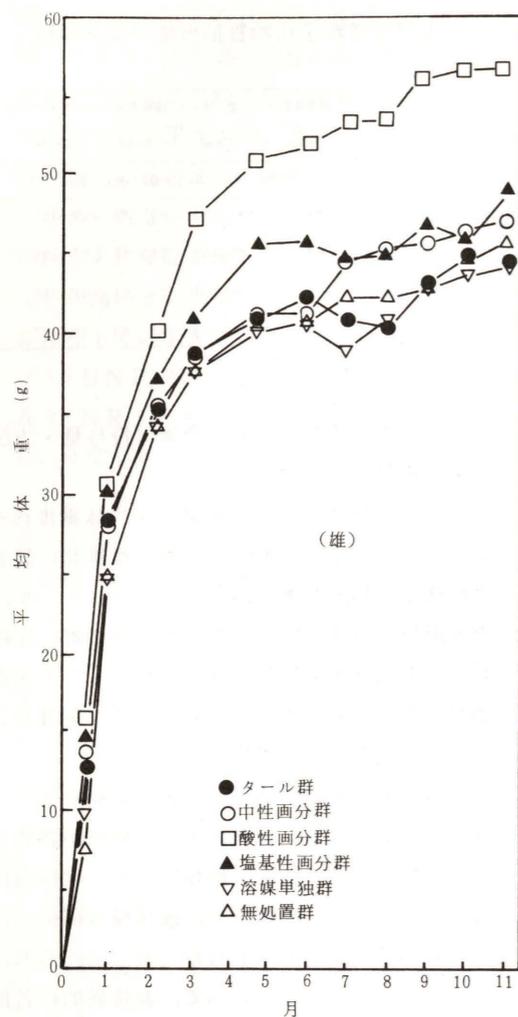


図4 マウスの雌雄別・群別平均体重推移

表2 腫瘍発生数

実験群	供試検対象頭数		肺腫瘍		白血病		計	
	頭数	頭数*	発生数	発生率*	発生数	発生率*	発生数	発生率*
タール	40	25	4	16%	2	8%	6	24%
中性画分	42	25	9(2) ³	36%	3	12%	10 ⁴	40%
酸性画分	41	20	0	0%	0	0%	0	0%
塩基性画分	26	11	1(1)	9%	2	18%	3	27%
溶媒単独	42	39	2	5%	1	3%	3	8%
無処置	47	47	3	6%	8	17%	10 ⁴	21%

*1 離乳前のへい死(食殺等)マウスを除く。
 *2 腫瘍発生頭数/検対象頭数(%)。
 *3 ()内は、腫瘍中形態学的に悪性化した腫瘍数。
 *4 複数の腫瘍を持つマウスを含む。

を示唆している。タール群では、25例中に4例の悪性化の傾向を示す腺腫の発生が認められた。なお、この群の中性画分群に比べての発生率の低下は、タール中の中性画分の量に依存したと考えられる。塩基性画分群の場合は、多数のへい死のため十分な検討が行えなかったが、11例中に1例形態学的に悪性化した腺腫の発生が観察された。この群並びに今回腫瘍の発生が見られなかった酸性画分群への投与検体は、中性画分より弱いもののいずれも変異原性を示し、癌原性を持つ可能性は否定できないため、

改めて検討する予定である。対照群では、溶媒単独群39例中2例、無処置群47例中3例に腺腫が観察されたが、いずれも悪性化の傾向は認められなかった。

今回の結果を直ちにヒトに外挿するには、新生児試験には問題点もあるが、大気中浮遊粒子状物質抽出物の標的臓器が肺であったことは、肺癌との関連を考える上で興味深い。

4. おわりに

肺癌による死亡率の増加の原因として、現在、喫煙に加え大気汚染が問題にされている。そのため、B(a)Pなど既知の癌原物質の検索に加え、未知の癌原物質の検索、同定も進められている。(Leoら, 1973; Pittsら, 1978; Daiseyら, 1979; Ramdahlら, 1982)。更に、大気汚染物質の癌原性を総合的に評価しようとする試みが、Epsteinら(1966, 1979), Asahinaら(1972)によって行われている。しかし、大気汚染物質は量および質の変動が大きく、かつ大量採取が困難など、むずかしい問題を含んでいる。

今回の実験から：

- (1) 大気中浮遊粒子状物質の変異原活性は、単位空気量当り、単位重量当り、いずれも秋冬期に高く、夏期に低く、春期にはその中間の値を示した。
- (2) 年間を通じ、TA100, TA98株共に直接変異原性の方が、活性が高く、また変動幅も大きかった。
- (3) 年間を通じ、TA100, TA98±S9いずれの場合も、中性画分が、大気汚染物質の変異原活性の主体であり、タール略当りでも、他の画分に比べ著しく高い変異原活性が認められた。
- (4) 新生児試験においても、中性画分投与で有意に高い肺腫瘍の発生が観察された。
 (3), (4)から、Ames法で得られた大気中変異原物質に関する情報が、動物実験の結果と関連

することが推測された。そこで、今後とも動物実験の結果との関連性の把握に努めつつ、大気汚染の状況を、Ames法で検討していく予定である。

文献

- 1) Ames, B.N. et al: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* /mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31: 347-364 (1975).
- 2) Asahina, S. et al: Carcinogenicity of Organic fraction of particulate pollutants collected in New York city and administered subcutaneously to infant mice, *Cancer Res.*, 32: 2263-2268 (1972).
- 3) Daisey, J.M., et al: Thin-layer gas chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in airborne particulate matter, *Anal. Chem.*, 51: 24-26 (1979).
- 4) Daisey, J.M., et al: Seasonal variation in the bacterial mutagenicity of airborne particulate organic matter in New York city, *Environ. Sci. Technol.*, 14: 1487-1490 (1980).
- 5) Epstein, S.S. et al: Carcinogenicity of organic particulate pollutants in urban air after administration of trace quantities to neonatal mice, *Nature*, 17: 1305-1307 (1966).
- 6) Epstein, S.S. et al: Carcinogenicity of a composite organic extract of urban particulate atmospheric pollutants following subcutaneous injection in infant mice, *Environ. Res.*, 19: 163-176 (1979).
- 7) Fukino, H. et al: Mutagenicity of airborne particles, *Mutation Res.*, 102: 237-247 (1982).
- 8) 後藤純雄ら：大気浮遊粉じんの変異原性の経

東京および東南アジア 3 都市における土砂の変異原活性

国立公衆衛生院・地域環境衛生学部 西村 哲治・加藤 幸彦
松下 秀鶴

- 日変動, 大気汚染学会誌, 17: 295-303 (1982).
- 9) Leo, R.C., et al: Application of a gas chromatograph-mass spectrometer data processor combination to the analysis of the polycyclic aromatic hydrocarbon content of airborne pollutants, Anal. Chem., 45, 908-915 (1973).
- 10) Pietra, G. et al: Response of newly born mice to a chemical carcinogen, Nature, 183, 1689 (1959).
- 11) Pitts, Jr. J.N. et al: Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: Facile formation of mutagenic nitro derivatives, Science, 202: 515-519 (1978).
- 12) Ramdahl, T and Urdal, K: Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by fused silica capillary gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry, Anal. Chem., 54: 2256-2260 (1982).
- 13) Risby, T.H. and Lestz, S.S.: Is the direct mutagenic activity of diesel particulate matter a sampling artifact?, Environ. Sci. Technol., 17: 621-624 (1983).
- 14) 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).
- 15) Teranishi, K. et al: Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* mutants of the benzene-soluble organic matter derived from air-borne particulate matter and its five fractions, Mutation Res., 102: 237-247 (1978).
- 16) Tokiwa, H. et al: Mutagenic and chemical assay of extracts of airborne particulates, Mutation Res., 77: 99-108 (1980).
- 17) Walker, R.D. et al: Correlation of mutagenic assessment of Houston air particulate extracts in relation to lung cancer mortality rates, Environ. Res., 28: 303-312 (1982).

1. はじめに

自動車等の移動発生源や工場排煙等の固定発生源から大気中に放出された粒子状物質は、やがては地表に落下する。このため、大気汚染のはげしい地区ほどその地表の土砂の汚染度は大きいと考えられる。事実、環境中の代表的発がん物質である benzo(a) pyrene (以下 BaP と略す) については、この関係が示されている (松下ら, 1977, 1980; Blumer ら, 1977)。従って、地表の土砂に含まれる変異 (癌) 原性物質の量はその地区の大気の変異 (癌) 原性物質による汚染状況を反映する可能性が高い。また、大気浮遊粉じんの採取に比べ土砂の採取は極めて容易である。

このような考えのもとに、東京、マニラ、チェンマイ、バンコクの種々の地区から土砂を採取し、60メッシュ以下の試料について BaP 含量と変異原性を調べた。

2. 実験方法

土砂は、1982年および1983年の春2回、東京、マニラ、チェンマイ、バンコクの4都市の各地の道路近傍の表層から掃き集めて採取し、60メッシュのふるいにかけて土砂試料とした。この土砂試料に含まれるタール状物質を、ethanol: benzene (1:3, v/v) を用いる超音波抽出法 (後藤ら, 1982) によって抽出し、減圧乾固した。この乾固物に ethanol を加えて滅菌処理を行い、その後 ethanol を留去した。少量の ethyl ether で溶解し、さらに一定量の dimethyl sulfoxide (以下 DMSO と略す) を加えて攪拌した。減圧下で ethyl ether を留去して DMSO 溶液を得た (西村ら, 1984)。

変異原性試験は、サルモネラ菌 TA100, TA98 両菌株を用い (McCann ら, 1975), プレインキューベーション法 (Yahagi ら, 1977) に従い各試料溶液について2回づつ行った。S-9 mix は、Ames らの方法 (Ames ら, 1973) に従って調製した。

なお、各土砂試料に対する変異原性試験は、土砂約 0.62 g に対応する抽出物およびその 1/2, 1/4, 1/10 量をそれぞれ変異原性試験に供することにより行った。これらの抽出物に対する量-反応曲線を2次回帰分析して土砂 0.375 g に対する復帰変異コロニー数を算出した。

BaP 含量は、上記の方法を用いて超音波抽出したタール状物質を用いて、松下らの方法 (1977) により二層一次元薄層クロマトグラフィ-分光けい光光度法によって求めた。

3. 土砂試料の変異原性の評価

土砂試料の変異原性の1例として、図1に東京都葛飾区から得た試料についての量-反応曲線を示した。TA100, TA98 両菌株について S-9 mix 添加の有無にかかわらず、プレート当りの土砂 DMSO 抽出物量が増加するにつれて復帰変異コロニー数が増大することがわかる。

このような量-反応関係を被験 240 試料についてそれぞれ求め、量-反応関係が認められ、しかも復帰変異コロニー数が自然復帰コロニー数の2倍以上であった場合を変異原陽性とし、その他の場合を陰性とした。

陰性と判定された試料でも、そのほとんどすべての試料で復帰コロニー数は量依存性を示した。また、本実験での最高投与量は土砂約 0.62 g に対応する抽出物であった事と考え合わせる

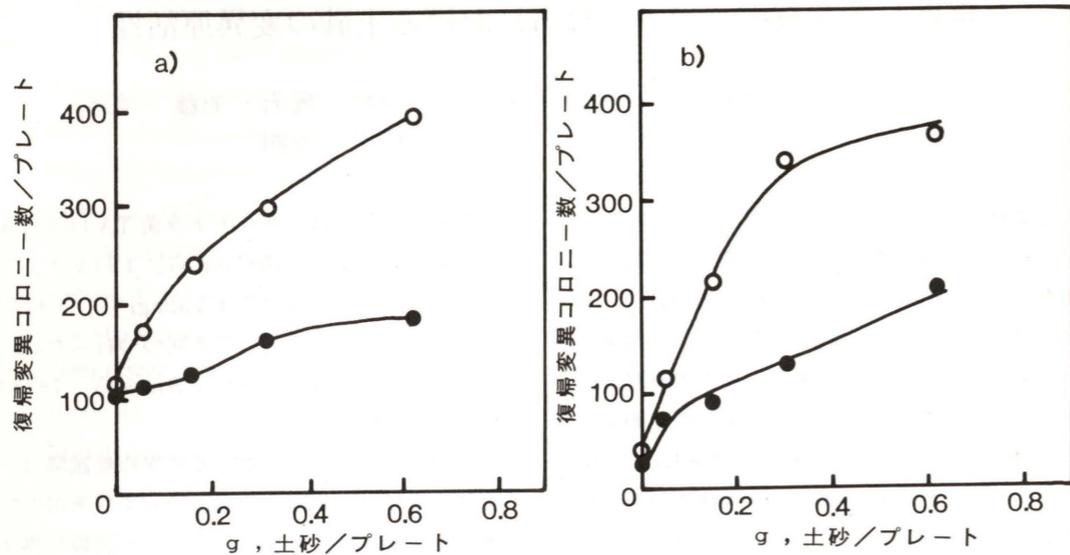


図1 工業地区から採取した土砂試料中の有機成分の量一反応曲線 (東京都葛飾区)

a) TA100 菌株 ○+S-9 mix
b) TA98 菌株 ●-S-9 mix

と、最高投与量をふやすと陽性と判定される試料の数は増加する可能性がある。このような考えのもとに、各試料の変異原比活性の算出は試料の陽性・陰性にこだわらず量一反応関係を与えたすべての試料について行った。表示は土砂1g当りの復帰コロニー数として表わした。

4. 東京の土砂試料の変異原性

東京都で採取した土砂試料のうち1982年採取の51試料について工業、商業および住宅地区の3地区に区別して変異原性を調べた。表1に変異原性陽性と判定された土砂試料の出現頻度を地区別にまとめて示す。TA100菌株では、S-9 mix 添加条件下で51試料中25試料が陽性になったのに対して、S-9 mix 無添加条件下では陽性例は認められなかった。また、TA98菌株では、S-9 mix 添加条件下で51試料中46試料、S-9 mix 無添加条件下で51試料中44試料が陽性を示した。さらに、TA100, TA98両

表1 東京の工業、商業および住宅地区の変異原性陽性頻度

地区	試料数	TA100		TA98		総合評価
		+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	
工業地区	17	9/17	0/17	16/17	15/17	17/17
商業地区	9	6/9	0/9	8/9	9/9	9/9
住宅地区	25	10/25	0/25	22/25	20/25	23/25
全地区	51	25/51	0/51	46/51	44/51	49/51

菌株のいずれかに陽性の変異原性を示したものは51試料中49試料であった。しかし、工業、商業および住宅地区による変異原性の陽性頻度には統計的な有意差はみられなかった。また、変異原比活性を標準偏差を考えに入れて考察した場合も地区別の有意差は認められなかった。これらの事実から、東京都内から採取したほとんどすべての表層土砂試料に変異原物質が含まれていること、この中には少なくとも塩基対交換

型の変異に対する pro-mutagens とフレームシフト型の変異に対する direct mutagens が含まれていることが示唆された。

図2は、変異原活性の分布の1例として、TA98菌株, S-9 mix 無添加条件下における

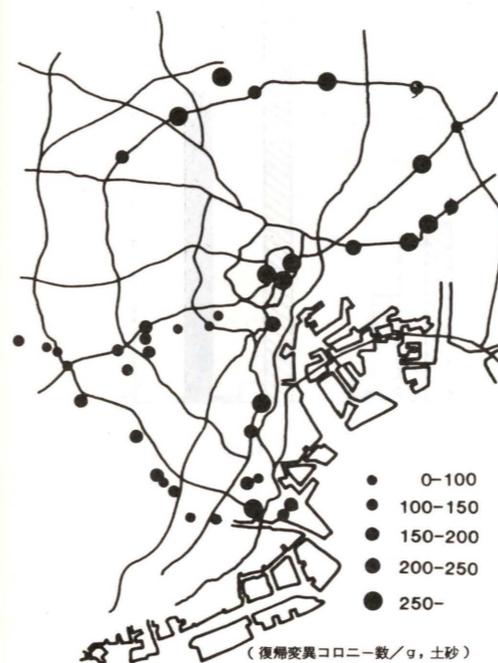


図2 東京都から採取した土砂試料中の有機成分の変異原比活性の分布

変異原比活性(土砂1g当りの復帰変異コロニー数)を5段階にわけ、地図上にプロットしたものである。図2には主として幹線道路を明示した。幹線道路付近や東京の中心部が高い変異原活性を示す傾向が認められた。なお、これと同様の傾向は、TA100菌株やTA98菌株のS-9 mix 添加条件下の試験結果でも認められた。

5. 東京および東南アジア3都市の変異原性

表2は、変異原性陽性と判定された土砂試料の出現頻度を都市別にまとめて示したものである。TA100菌株では、S-9 mix 添加条件下で

表2 東京, マニラ, チェンマイおよびバンコクの変異原性陽性頻度

都市名	試料数	TA100		TA98		総合評価
		+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	
東京	107	62/107	0/107	98/107	93/107	104/107
マニラ	66	15/66	8/66	41/66	41/66	53/66
チェンマイ	20	4/20	0/20	14/20	13/20	16/20
バンコク	47	0/47	0/47	8/47	12/47	17/47

東京では107試料中62試料, マニラでは66試料中15試料, チェンマイでは20試料中4試料が陽性を示したのに対して、S-9 mix 無添加条件下ではマニラの8試料を除いて陽性例は認められなかった。また、TA98菌株では、S-9 mixの有無にかかわらず陽性頻度については同程度の割合であった。すなわち、変異原性が陽性となる頻度はTA100菌株よりもTA98菌株の方が高いこと、TA100菌株ではS-9 mix 添加条件下の方がS-9 mix 無添加条件下より陽性となる頻度ははるかに高いのに対し、TA98菌株ではほぼ同程度で陽性となる頻度が高いことがわかる。都市別の比較では、東京の土砂試料での陽性頻度が最も高く、マニラ、チェンマイ、バンコクの順になっている。

図3は、4都市のTA100, TA98両菌株のS-9 mix 添加、無添加条件下の変異原比活性とBaP含量の算術平均値を表示したものである。変異原比活性は、TA100菌株のS-9 mix 添加条件下を除いて、東京、マニラ、チェンマイ、バンコクの順であり、S-9 mix 添加条件下のTA100菌株の場合は、東京、マニラ、バンコク、チェンマイの順であることが判る。なお、算術平均値の順序は、変異原性陽性頻度の順序と同じであった。

東京の試料の場合、S-9 mix 添加条件下で変異原性が陽性となる頻度が高かったのは、図3のBaP含量が高いことから推察されるように多環芳香族炭化水素類の含量が多いためではない

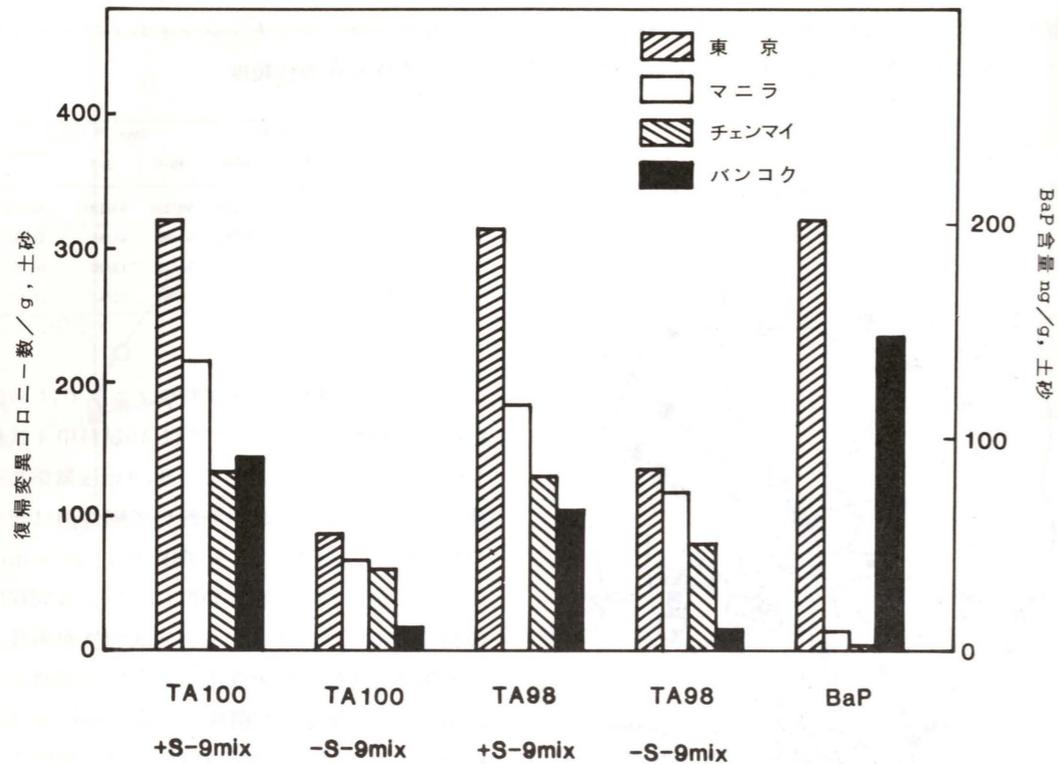


図3 東京、マニラ、チェンマイおよびバンコクの変異原比活性とBaP含量

かと考えられる。マニラの試料の場合、BaP含量は低かったのに対し、TA98菌株のS-9mix無添加条件下で高頻度の変異原性を認めた。このことは、マニラでは陸上交通はもっぱら自動車にたよっており、しかもディーゼル車(バス及びジプニー)の比率が高いことにより、排出される芳香族ニトロ化合物等が関与している可能性が示唆される。

6. おわりに

表層土砂試料の多くに変異原性物質が含まれていることがわかった。

東京の土砂試料について採取地区別に変異原性を解析した結果、幹線道路付近や交通渋滞のはげしい付近から採取した土砂は変異原活性が高い傾向にあった。また、固定発生源の影響がほぼ同等であると考えられる近接地区で自動車

走行量の多い場所と少ない場所では、前者の方が後者より高い傾向にあった。

更に、土砂中のBaPの含量、BaPは化石燃料等の不完全燃焼により発生すること(松下ら、1980)、土砂中の多環芳香族炭化水素含量に対して自動車が大きく影響すること(松下、1980)などを考えに入れると、土砂中の変異原性物質は自動車排出物を含む不完全燃焼の所産とこれら大気中ならびに土砂中での反応生成物を主体とする可能性が高い。

この可能性の検証や土砂中の汚染物質の検索は今後明らかにしていかなければならない問題である。

文 献

- 1) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D.: Carcinogens are mutagens: a

simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci., 70: 2281-2285 (1973).

- 2) Blumer, M., Blumer, W., Reich, T.: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of a Mountain Valley: Correlation with Highway Traffic and Cancer Incidence. Environ. Sci. Tech., 11: 1082-1084 (1977).
- 3) 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 (1982).
- 4) McCann, J., Spingarn, N.E., Kobori, J., Ames, B.N.: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Stains with R

Factor Plasmids. Proc. Nat. Acad. Sci., 72: 979-983 (1975).

- 5) 松下秀鶴, 嵐谷奎一, 小谷野道子: 土砂中の多環芳香族炭化水素の簡易分析法. 大気汚染研究, 11: 352-359 (1977).
- 6) 松下秀鶴, 加藤幸彦, 久松由東: 都市地区における土砂中のベンゾ(a)ピレンの分布. 大気汚染学会誌, 15: 348-352 (1980).
- 7) 松下秀鶴: 多環芳香族炭化水素, 環境汚染物質と毒性, 有機物篇, 化学の領域, 増刊129号 pp 115-134 (1980).
- 8) 西村哲治, 後藤純雄, 加藤幸彦, 奥貫正美, 松下秀鶴: 東京都の土砂中の変異原性とBaP含量. 大気汚染学会誌, 19: 228-238 (1984).

5. 変異発現の機構と修飾

抗変異原物質の大腸菌 Rec A 蛋白質に対する作用

国立遺伝学研究所 井上 正

1. はじめに

Ames 法に代表される種々の突然変異原性検出系により、我々をとりまく環境中には、極めて多数の変異原性物質が存在することが明らかになった。併し、同時に、突然変異生成を抑制する因子も数多く見出されてきた。化学物質による突然変異の抑制という現象は古くより観察されていたが、近年、ある種の抗突然変異原物質についてはその作用機構が明らかにされつつあり、また環境変異原の研究という側面からみても、これら抗突然変異原物質の研究は重要な意味を持つと考えられるようになった。

本稿では、我々の研究グループで見出されたいくつかの抗突然変異物質につき、その作用機構を Rec A 蛋白質との関連から推定した結果につき述べる。

2. 大腸菌 Rec A 蛋白質

大腸菌の rec A 遺伝子は、普遍的組換え、突然変異誘発、DNA 修復、細胞分裂制御、プロフェージ誘導等の多くの重要な細胞機能に関与する遺伝子であり、古くより、遺伝学的検討が加えられてきた。これらの多面的機能発現の機構の全貌が、精製された Rec A 蛋白質の *in vitro* の性質を検討することにより、近年明らかにされつつあり、いわゆる SOS 修復に於ける Rec A 蛋白質の役割については、分子レベルの理解が完成したといってもよい段階にある。(SOS 修復については Warker (1984) の総説を参照されたい)。

Rec A 蛋白質の *in vitro* の機能は、様々の活性測定系を用いて、測定することができるが、それらは以下の 3 つに分類することができる。(a) 相同な DNA 同志を対合させる活性。この活

性により、遺伝的組換え、あるいは組換え修復が生ずると考えられる。(b) 種々のリプレッサー蛋白質を分解不活化する蛋白分解酵素活性。rec A 遺伝子が極めて多面的な遺伝子発現をする理由は、Rec A 蛋白質が、多くのリプレッサー蛋白質を分解して、これらのリプレッサーにより制御されている遺伝子群——それらのうちの 1 つに、error-prone な修復を行う酵素の遺伝子もある——を発現させるからと考えられる。(c) 上の 2 つの反応を触媒する為に必要なエネルギーを供給する ATP 分解活性。

これらの諸活性は、それぞれ独立に測定可能であり、特に (a) の相同 DNA の対合反応は、いくつかの部分反応に分けて、詳細な解析がなされている。

3. 抗突然変異原物質と Rec A 蛋白質

(1) 桂皮アルデヒドの場合

突然変異の誘発は、多くの細胞機能の有機的発現によって完成するものであり、Rec A 蛋白質は、その一部を担っているにすぎない。(Rec A 蛋白質が全く関与しないで、突然変異が惹起される場合も、もちろんあろう)。よって抗突然変異原の標的として Rec A 蛋白質を検討の対象とするには、それなりの *in vivo* の実験結果が必要である。我々が、その機能発現に Rec A 蛋白質が関連するのではないかと考えた最初の抗突然変異原物質は桂皮アルデヒドであった。桂皮アルデヒド (cinnamic aldehyde, $C_6H_5(CH)_2CHO$, 以下 CinA) は香料肉桂の主要成分であり、独特の芳香を発する油状物質である。CinA の強い抗変異原性は、Ohta 等 (1983a) によって、突然変異剤で処理した大腸菌を用いて示された。

種々の突然変異原を用いてCinAの効果を検討すると、CinAは4NQO等のいわゆるUV型の傷害を生ずる変異原に対して、強い抗変異原性を示し、MNNG等のアルキル化剤に対しては、あまり効果を示さなかった。さらにUV型変異原による細胞致死がCinAの後処理によって回復し、この効果は、 $recA^+$ の場合にのみ現れ、SOS修復に関与する $umcC$ には依存しないことも示された(Ohtaら1983b)。これらの実験結果から導き出されるCinAの抗変異原性発現機構に関する最も簡単な作業仮説は、CinAが $recA$ に依存するerror-freeな修復活性を上昇させるというものであろう。組換え修復は、 $recA$ 遺伝子に依存し、またerror-freeと考えられるので、我々は $RecA$ 蛋白のDNA対合反応に対してCinAがいかなる効果を有するかを検討することとした。

相同なDNAの対合反応の測定のためには、いくつかの系が改変されている。最も簡単な原理によるものは、熱処理等で変性したDNAを基質として、これを再びもとの二重鎖に戻す速度を測定するものである。あるいは、二重鎖DNAと、そのどちらかの鎖と相同な塩基配列をもつ一本鎖DNAを基質として、後者が前者の一部と置きかわって、いわゆるDisplacement loop(D-loop)を形成する速度を測定する方法もある。大腸菌 $RecA$ 蛋白によるD-loop形成反応の諸条件については、この蛋白の精製に成功したShibata等(1983)によって詳細な記述がなされているので、それらに順じて行った。実際に用いた基質は一本鎖DNAを有する大腸菌のファージ $\phi X174$ やfdから調整したDNAとそれらの2本鎖複製型である閉環状二本鎖RFIDNAである。測定の原理は以下による。即ち、高塩濃度条件下では、二本鎖DNAはメンブランフィルターに吸着しないが、一本鎖DNAはトラッ

プされる。よって、二本鎖DNAを 3H 等で標識しておけば、D-loopを形成した二本鎖DNAのみが、一本鎖部分を有するので、フィルターにトラップされる。このトラップされた放射能の量を測定することにより、D-loopの形成量を測定できる。

D-loopの形成は Mg^{2+} 濃度に依存し、またRFIDNAを基質とした場合は、 $RecA$ 蛋白によってD-loopの形成にひきつづいて、その解離もおこる為、複雑なKineticsを示すことが知られている(Ohtani等, 1982)。そこで我々は、様々な Mg^{2+} 濃度で、D-loopの形成の初速度、あるいは、解離の速度を調べたが、予想に反して、いかなる測定条件下でも、CinAによる $RecA$ 蛋白の活性化を観察することができなかった。併し、D-loop形成反応に於る Mg^{2+} 至適濃度がCinAにより変化することが明らかになり、 $RecA$ 蛋白の活性がCinAにより修飾される可能性は依然として残されている。

(2) 塩化コバルト($CoCl_2$)の場合

塩化コバルトの抗突然変異原性は、MNNG処理をした大腸菌に対する効果として、最初に見出された(KadaとKanematsu, 1978)。その後この金属化合物が、その他の種々の化学突然変異原や放射線で処理した細胞に対して著明な抗変異原を示すことが明らかになりまた大腸菌のみならず枯草菌や培養動物細胞に対しても効果を持つことが示された。コバルトが、シアノコバラミンに含まれ、種々の酵素反応に関与することはよく知られている。また細胞中では、コバルトは色々な生体物質と錯体を形成しやすく、ある種の生体反応に於ては、 Mg^{2+} 等の二価金属とも置換可能であり、このことはこの金属イオンが種々の生理的効果をもたらすことを示唆する。そこで我々は、前述の $RecA$ 蛋白によるD-loop生成反応に対する塩化コバルトの影響につき

調べてみた。

先にも述べたが、基質として、RFIDNAを用いると、 $RecA$ 蛋白は、D-loopの形成とともに、その解離も触媒し、この2つの反応は、反応液中の $RecA$ 蛋白濃度を適当に選択することにより区別することができる。極めて低い濃度の $RecA$ 蛋白を存在させ、D-loopの形成のみが起こり、解離が殆んど起こらないような条件下に、種々の濃度の塩化コバルトを加えたところ、コバルトの濃度に依存して、D-loop形成速度の上昇がみられ、1.5mMでは対照の3倍以上となることが観察された。次に、過剰の $RecA$ 蛋白存在下に、一度生成したD-loopが解離する過程に対するコバルトの効果をみたところ、この場合も、コバルトは、効果を示し、D-loopの解離を促進させた。以上のような実験を様々な条件下で行った結果、D-loop形成/解離に対して、1~2mMのコバルトが、 $RecA$ 蛋白の比活性を2~3倍高めることが確認された。

ところで、 $RecA$ 蛋白は、その機能を発現する為のエネルギー源として、ATPを分解するが、試験管内に於ける $RecA$ 蛋白によるATPの分解は、一本鎖DNAに依存する条件と、RFIDNAに依存する条件の2つを互いに独立に選択することができる。そこで、これら2つの条件下に於けるATP分解活性に対するコバルトの影響を検討してみたところ、RFIDNAに依存する活性は1.5mMのコバルトにより2倍程度上昇するのに対し、一本鎖DNAに依存する活性は約50%の阻害を受けることが判った。

$RecA$ 蛋白によるD-loopの形成に関するShibata等のモデル(Shibataら, 1984)によれば、RFIDNAに依存するATPの分解は、RFIDNAのまきもとどしと深く関連しているとされている。 $RecA$ 蛋白によりD-loopが形成される際には、RFIDNAはまきもと

されねばならないので、上に述べた2つの実験結果、即ちコバルトによるD-loopの形成/解離の促進とRFIDNA依存ATP分解の促進は、互いに支持しあうと考えられる。

$RecA$ 蛋白の試験管内の性質に関する上記の実験事実は、コバルトの抗変異原性が、 $RecA$ 蛋白を活性化して、error-freeである組換え修復機能を促進することにより発揮されているとの仮説を支持するが、もしそうならば、(修復機能が促進しているのだから)、突然変異原による致死効果はコバルトにより抑制されるはずである。実際に、例えば、突然変異誘発に用いられるよりずっと高い線量の紫外線を照射した大腸菌の生存率が、コバルトの後処理によって有意に上昇することが確認され、この抗突然変異原の作用機構の少なくとも一部は、 $RecA$ 蛋白によるerror-freeな修復機構の促進によることが強く示された。

上述のように、コバルトは $RecA$ 蛋白の機能を修飾することは、おそらく間違いないが、この両者が直接に関与しているか否かについては未だ不明であり、コバルトは実は、DNAと結合し、その結果、 $RecA$ 蛋白の機能が変化している可能性も否定できない。また、この金属イオンが、 $RecA$ 蛋白以外の突然変異生成に関与する蛋白質にも同時に作用している可能性ももちろんある。これらの疑問に対しては、in vivo, in vitroの両面からの、より深い検討が必要であろう。

文 献

- 1) Kada, T. and Kanematsu, N.: Reduction of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced mutation by cobalt chloride in *Escherichia coli*. Proc. Jpn. Acad., 54: 234-237 (1978).
- 2) Ohta, T., Watanabe, K., Moriya, M., Shirasu, Y. and Kada, T.: Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical

変異原物質による遊離ヌクレオチドプールの修飾

岡山大学薬学部 根岸 和雄

- mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, **107**: 219-227 (1983 a).
- 3) Ohta, T., Watanabe, K., Moriya, M., Shirasu, Y. and Kada, T.: Analysis of the antimutagenic effect of cinnamaldehyde on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **192**: 309-315 (1983 b).
- 4) Ohtani, T., Shibata, T., Iwabuchi, M., Nakagawa, K. and Ando, T.: Hydrolysis of ATP dependent on homologous double-stranded DNA and single-stranded fragments by recA protein of *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **91**: 1767-1775 (1982).
- 5) Shibata, T., Osber, L. and Radding, C.M.: Purification of recA protein from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, **100**: in press (1983).
- 6) Shibata, T., Makino, O., Ikawa, S., Ohtani, T., Iwabuchi, M., Shibata, Y., Maeda, H. and Ando, T.: Roles of processive unwinding in recombination reactions promoted by recA protein of *Escherichia coli*: A study using a monoclonal antibody. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **49**: in press (1984).
- 7) Waker, G.C.: Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **48**: 60-93 (1984).

1. 変異原と細胞内遊離ヌクレオチドとの化学反応

一般に変異原は、あるものは直接、あるものは代謝活性化を経てDNAを化学的に修飾すると考えられている。例えば、メチル化剤であるメチルニトロソウレア(MNU)は、まずO⁶-メチルグアニンなどのメチル化塩基を始めとして、DNAの種々の部位をメチル化する。その傷が最終的に突然変異を引起こすと考えられる。ところで細胞内には、DNAの前駆体である遊離ヌクレオチド、すなわちヌクレオチドプールが存在している。これらも変異原物質と当然反応していると考えられる。例えば、MNUが細胞内に入れば、DNA中のグアニン塩基と反応するだけでなく、デオキシグアノシン5'-トリリン酸(dGTP)とも反応してO⁶-メチルdGTPなど、DNA中グアニンと同様の反応生

成物を生ずるはずである。このO⁶-メチルdGTPがDNA合成の際に取込まれれば、O⁶-メチルグアニンを含むDNAが生ずることになり、変異へと導かれる事が期待される。この興味深い可能性は、最近、TopalとBaker(1982)により指摘された。彼らは、マウス胚線維芽細胞をMNUで処理し、遊離デオキシリボヌクレオチドを分析した。その結果、DNA中のヌクレオチドよりも前駆体であるヌクレオチドプールの方が190~13,000倍メチル化を受け易いことを見出した。DNAに含まれるヌクレオチドが前駆体として存在するものの1,000倍ないし2,000倍あることを計算に入れても遊離メチル化ヌクレオチドの量はかなりのものである(表1)。なお、細胞内プールの大部分はトリリン酸であるので、ここでは、トリリン酸とプールとはほぼ同義としてよいと思われる。

表1 MNUによる前駆体プール、あるいは、DNA中のヌクレオチドのメチル化結合したメチル基(10⁶ Cells当りのpmol)

修飾塩基	プール	DNA	プール/DNA	プールヌクレオチドの反応し易さ
1Me Ade	0.069	0.011	6.3	13,000
3Me Ade	0.028	0.056	0.50	1,000
7Me Gua	0.069	0.502	0.13	190
O ⁶ Me Gua	0.013	0.047	0.28	400
その他*	0.644	0.146	4.4	5,000

* 主にリン酸のメチル化

(Topal and Baker 1982)

次の問題は、これらのメチル化されたトリリン酸がDNA合成の際に取込まれるのか、さらにはそれが突然変異の原因となるのかどうかという問題である。Topalら(1982)は、N-1、または、N-3がメチル化されたdATPの混

合物がdATPの10⁻²から10⁻³の頻度で取込まれることを示した。メチル化塩基のうち、最も重要なものはO⁶-メチルグアニンと考えられている。そこで、これがDNA中に取込まれるかどうかは最も興味深い点である。Dodsonら

(1982)はバクテリオファージT7のDNAを用いて、これに *in vitro* で O^6 -メチル dGTP を取込ませ突然変異頻度が上昇するかどうかを測定した。彼らは、通常の4種のトリリン酸の存在下、その約1/100の O^6 -メチル dGTP を存在させると新たに合成されたDNAの塩基のうち約1/1,000が O^6 -メチルグアニンとなることを見出した。さらに、突然変異の頻度も上昇した。また、Eadieら(1984)はこの過程を大腸菌プラスミッド上のアンピシリン耐性遺伝子を用いて、詳しく解析した。その結果、野性株の大腸菌では、変異頻度の上昇は観察されなかったが mismatch repair を欠く *mutH* 株では頻度の上昇が観察された。変異株の塩基配列を8例について決定したところ、いずれもが A・T 塩基対から G・C 塩基対へのトランジション変異が起きていた。このことから彼らは、 O^6 meG・T $\xrightarrow{\text{脱メチル酵素}}$ G・T $\xrightarrow{\text{DNA複製}}$ G・C

という変異メカニズムを提唱している。しかし、確かな証拠はない。一方、同じメチル化剤である MNNG を大腸菌に作用させた場合、起こされる変異は主に G・C 塩基対 \rightarrow A・T 塩基対というものであり、AT \rightarrow GC の10~20倍の頻度で起る事が既に示されている(Coulondre and Miller, 1977)。それ故、前駆体の修飾による突然変異の寄与は大きいとは言えないと思われた。しかし、この報告は、比較的大量の MNNG を与えた時のものであるで MNNG 量が少ない場合には前駆体プールのメチル化がより重要である可能性があるとして Eadie は考えている。一方、Hall と Saffhill (1983) は合成デオキシヌクレオチドや仔牛胸腺 DNA を用いて O^6 -メチル dGTP の取込みを測定した。その結果、 O^6 -メチル dGTP は poly(dA-dT) や胸腺 DNA の様に鋳型に "T" を含む場合は取込まれるが、"T" を含まない poly(dG-dC) には取り込まれにくいこ

とを示した。これは、前述の結果とよく一致している。

メチル化ピリミジンヌクレオチドとしては O^6 -メチルグアニンと同様に水素結合に参与する酸素原子が修飾されている O^4 -メチルチミンが重要と考えられている。この塩基が DNA のメチル化によって生成することは既に知られているが、細胞内で O^4 -メチル dTTP ができるかどうかは未だ確かめられていない。一方、 O^4 -メチル dTTP の *in vitro* での取込みに関してはすでに調べられている。しかし、Singer ら(1983)が poly(dA-dT) に取込まれるものに対して Hall と Saffhill (1983) は "G" の相手にのみ取込まれると報告しており相反する結果が得られている。また、 O^4 -メチルチミンについては、次の様な興味深い知見が得られている。V79 細胞に対して培地中に O^4 -メチルチミンを添加すると DNA への O^4 -メチルチミンの取込みが観察された。しかし、突然変異の誘発は認められなかった。(Brennand ら, 1982)。これは、この細胞内で O^4 -メチルチミンはリン酸化され O^4 -メチル dTTP を生じ、DNA 合成の基質となる事を示している。しかし、 O^4 -メチル dTTP が dCTP の替りに見込まれ、そのまま "C" として挙動するために突然変異に導かれなくとも考えられる。なお、この場合、 O^2 -メチルチミンあるいは 3-メチルチミンは取込まれなかった。

2. 修飾ヌクレオチド(塩基)の変異原性

変異原として最も古典的なものであるプロモウラシルや 2-アミノプリンは、細胞内でトリリン酸となって DNA に取込まれ変異を引き起こされることが考えられる。そこで、われわれは、種々の修飾ヌクレオチドの変異原性を検索した。このような変異原性試験は、細胞内プールの修飾を調べる事よりずっと簡単である。また、プール中に

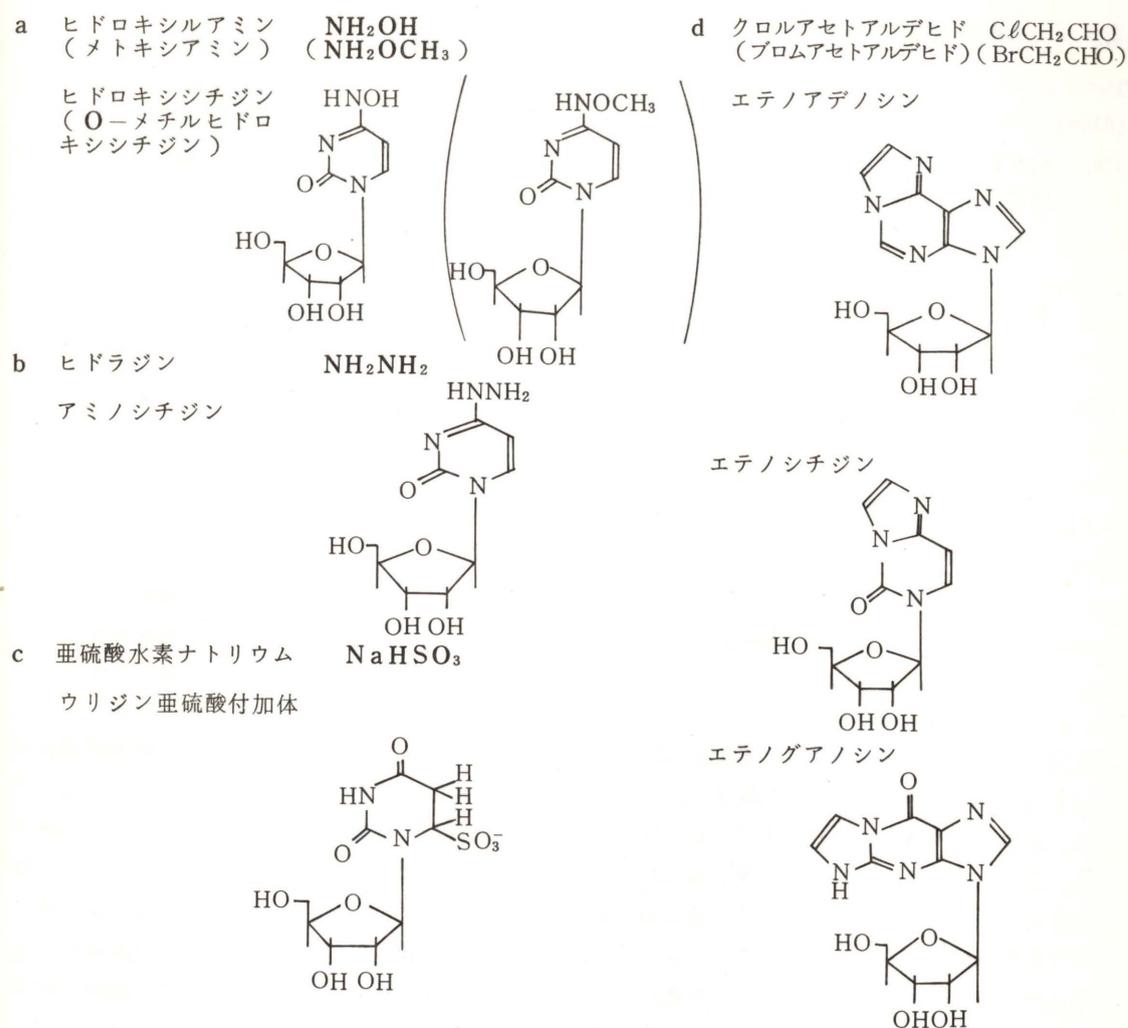


図1 一本鎖核酸特異的修飾剤と反応生成物

修飾ヌクレオチドが検出されても、それが DNA に取込まれ変異を誘発するという証明にはならない。しかし、そのヌクレオチドに変異原性があればこの点は確かとなる。

ここで、どのような変異原、すなわち、核酸修飾剤が DNA より遊離ヌクレオチドと反応しやすいか考えてみると、二本鎖 DNA に対する親和性を持たないもの、とりわけ一本鎖特異的な化学物質である。これには、前述のメチル化剤を始めとするアルキル化剤の他、ヒドロキシル

アミン(メトキシアミン)、ヒドラジン、亜硫酸塩、およびクロル(ブロム)アセトアルデヒドなどが考えられる。図1にこれらの変異原とそのヌクレオチドとの反応生成物を示す。これらの化学物質は一本鎖核酸に特異的に反応するので通常の DNA、すなわち、二本鎖 DNA にはほとんど反応しない。それ故、遊離ヌクレオチドの方がずっと反応しやすいことが予想される。図1に示した修飾ヌクレオチドおよび大腸菌 WP2 *uvrA* 株での変異原活性を表2に示す。

表2 一本鎖選択的核酸修飾剤とその反応主成物の変異原性

	サルモネラ菌 TA100	大腸菌WP 2 uvrA
MNU	7 rev/nmole	0.1 rev/nmole
MNNG	300	10
NH ₂ OH	—	—
N ⁴ -ヒドロキシシチジン	0	0.5
N ⁴ -ヒドロキシデオキシシチジン	0	0
NH ₂ NH ₂	—	0.04
N ⁴ -アミノシチジン	60	160
N ⁴ -アミノデオキシシチジン	2.4	3.5
亜硫酸塩	0	—
ウリジン	0	—
ウリジン付加体	0	—
クロルアセトアルデヒド	0.2	0.02
ブロムアセトアルデヒド	0	0
エテノアデノシン	0	0
エテノデオキシアデノシン	0	0
エテノシチジン	0	0
エテノデオキシシチジン	0	0

これらのヌクレオシド類のうち著しく活性が高いものは最近、我々が見出したN⁴-アミノシチジンである(Negishiら, 1983)。続いて、N⁴-アミノデオキシシチジン、N⁴-ヒドロキシシチジンが強い活性を持っている。他には、変異原活性は検出されなかった。エテノシチジン、および、エテノデオキシシチジンは市販のもの、あるいは常法に従って調製したものに変異原活性が検出された。しかし、さらに詳しく検討したところ混在する不純物に活性があることが明らかになった。

これらの事から、ヒドロキシルアミン、あるいは、ヒドラジンで処理した細胞中に対応する修飾ヌクレオチドが存在するかどうかは興味深い問題である。エテノ化ヌクレオチドや亜硫酸付加体は変異原性を示さなかった。しかし、トリリン酸の状態では、DNAに取込まれる可能性がある。これを知るには、*in vitro*で直接DNAへの取込みを測定する必要がある。

メチル化ヌクレオチドに関しては前述の様に

O⁴-メチルチミジンが取込まれるが変異原性を示さないことが知られている。O⁶-メチルグアニンは、V79細胞に対して変異原性を持つ事が報告された(Kaina他, 1983)。しかし、O⁶-メチルグアニンはDNAに全く取込まれず、さらに精製したO⁶-メチルグアニンを用いたところ活性は検出されなかったため、前報は取消された(Kaina and Aurich, 1984)。N⁷-メチルグアニン、N³-メチルアデニンも同様にV79細胞に対して変異原活性はない。

3. 変異原によるヌクレオチドプールのアンバランス

DNAポリメラーゼによるDNA複製反応は非常に誤りの少ない反応である。しかし、4種のトリリン酸の割合が不均衡になると、誤りの頻度が上昇する。また、動物細胞ではヌクレオチドプールのバランスが異常となったためにミューター変異株となっているものがある。変異原は、DNA合成を止

めたり、その他のヌクレオチド代謝を混乱させたりすることが予想される。そこで、ヌクレオチドプールの不均衡が引き起こされ、突然変異の一因となっている可能性がある。実際、UVや化学変異原をCHO細胞(Newman and Miller, 1983)やV79細胞(Dasら1983)に作用させると、ヌクレオチドプールの変化が起った。V79細胞をUVやMNNGなどの化学変異原で処理するとdATPとdTTPレベルが2~3倍上昇した。dGTPとdCTPはほとんど変化しなかった。そこで、ヌクレオチドの量比は、正常とは異なる事になる。

4. おわりに

変異原物質が遊離ヌクレオチドプールに作用して突然変異を引き起こすことは変異原の主要な作用メカニズムとはいえないとしても、前述のような場合には、実際、変異に関与している可能性が高い。しかし、現在までのところはっきり証明された例はない。この証明は今後の興味深い問題ではないかと思われる。

文 献

- Brennand, J., Saffhill, R. and Fox, M.: The effects of methylated thymidines upon cultures of V79 cells and the mechanism of incorporation of O⁴-methylthymidine into their DNA. *Carcinogenesis*, **3**, 219-222 (1982).
- Coulondre, C. and Miller, J.H.: Genetic studies of *lac* repressor IV. Mutagenic specificity in the *lac* gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **117**, 577-606 (1977).
- Das, S.K., Bendiff, E.P. and Loeb, L.A.: Rapid changes in deoxynucleoside triphosphate pools in mammalian cells treated with mutagens. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **114**, 458-464 (1983).
- Dodson, L.A., Foote, R.S., Mitra, S. and Masker, W.E.: Mutagenesis of bacteriophage T7 *in vitro* by incorporation of O⁶-methylguanine during DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 7440-7444 (1982).
- Eadie, J.S., Conrad, M., Toorchen, D. and Topal, M.D.: Mechanism of mutagenesis by O⁶-methylguanine. *Nature*, **308**, 201-203 (1984).
- Hall, J.A. and Saffhill, R.: The incorporation of O⁶-methyldeoxyguanosine and O⁴-methyldeoxythymidine monophosphates into DNA by DNA polymerase I and α . *Nucleic Acids Res.*, **11**, 4185-4193 (1983).
- Kaina, B., Heindorff, K. and Aurich, O.: O⁶-Methylguanine, but not N⁷-methylguanine or N³-methyladenine, induces gene mutation, sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster cells. *Mutation Res.*, **108**, 279-292 (1983).
- Kaina, B., and Aurich, O.: Mutagenic and genotoxic effects of O⁶-methylguanine: a revision. *Mutation Res.*, **139**, 149-154 (1984).
- Negishi, K., Harada, C., Ohara, Y., Oohara, K., Nitta, N. and Hayatsu, H.: N⁴-Aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 5223-5233 (1983).
- Newman, C.N. and Miller, J.H.: Mutagen-induced changes in cellular deoxycytidine triphosphate and thymidine triphosphate in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **114**, 34-40 (1983).
- Singer, B., Sagi, J. and Kusmieriek, J.T.: *Escherichia coli*, polymerase I can use O²-methyldeoxythymidine or O⁴-methyldeoxy-

thymidine in place of deoxythymidine in primed poly(dA-dT)·poly(dA-dT) synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 4884-4888 (1983).

12) Topal, M.D. and Baker, M.S.: DNA precursor pool: A significant target for N-methyl-N-nitrosourea in C3H/10T 1/2

clone 8 cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 2211-2215 (1982).

13) Topal, M.D., Hutchison III, C.A. and Baker, M.S.: DNA precursors in chemical mutagenesis: novel application of DNA sequencing. Nature, 298, 863-865 (1982).

解熱鎮痛剤フェナセチン、ブセチンの代謝活性化機構

国立衛生試験所変異原性部
東京薬科大学第2衛生化学教室

能美 健彦・石館 基
渡部 烈

1. はじめに

Phenacetin(I)は1930年代から世界的に使用されてきた優れた解熱鎮痛剤であり、現在でも市販されている風邪薬の多くは、phenacetinの脱エチル化体であるacetaminophen(VI)を主成分に用いている。しかし、phenacetinに関しては、使用当初から濫用者または後述する代謝異常者の中に①腎毒性②メトヘモグロビン血症③膀胱および腎臓に癌を発生する者の多いことが報告されてきた。従って、phenacetinの薬理効果および毒作用に関する論文は多く、1950年代以降現在までに、phenacetinに関連する論文は1000報以上にのぼっている。

Phenacetinが示す薬効や毒性のうち、その作用機序がこのものの生体内での代謝との関連で、最初に明確になったのは、その解熱鎮痛効果であった。すなわちBrodieとAxelrod(1949)は、phenacetin(I)のヒト生体内における主代謝経路が脱エチル化であり、脱エチル化により生じたacetaminophen(VI)がphenacetinの解熱鎮痛作用の活性本体であることを明らかにした(図1)。Acetaminophen(VI)は高用量ではヒ

トおよび実験動物に肝毒性をおこすが、常用量ではphenacetinに比べメトヘモグロビン血症をおこしにくいことから、現在phenacetinに代って風邪薬の主成分として広く用いられている。

解熱鎮痛作用と同様、phenacetinの示すメトヘモグロビン血症も、その代謝産物によって引き起こされる。メトヘモグロビン血症とは、ヘモグロビンに含まれる四つのヘム鉄が2価から3価に酸化される(メトヘモグロビン生成)ため、赤血球の酸素運搬機能が減少するとともに、その際生成する活性酸素によって赤血球膜の破壊がおこり、貧血や脾臓障害をおこす病気である。Heymannら(1969)は、ミクロソーム・アミダーゼの阻害剤であるbis-(*p*-nitrophenyl)-phosphateをラットに投与しておく、phenacetinによって起るメトヘモグロビン血症は顕著に抑制されるが、phenetidine(III)によって誘発されるメトヘモグロビン血症は抑制されないことを示し、phenacetinによって起るメトヘモグロビン血症はphenetidine(III)を経て発現することを示唆した。同年、ShahidiとHemaidan(1969)は、常用量のphenacetinを投与しただけで重いメトヘモグロビン血症を起す二人の患者について調べ、脱エチル化活性が顕著に低いことを見出した。この結果は、phenacetinの主代謝経路が図1に示すように脱エチル化であることを考えると、これらの患者はphenacetinの脱エチル化活性が遺伝的に低下しているために、phenacetinが通常以上に脱アセチル化(I→III)とN-水酸化(III→IV+V)の経路に回り(メタボリック・スイッチング)、正常よりも重いメトヘモグロビン血症を起すも

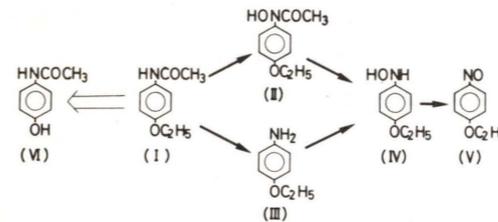


図1 フェナセチンの主な代謝経路(図中の黒太線矢印がハムスター肝ミクロソーム中の代謝活性化経路)

のと解釈された。最近では、phenacetin のメトヘモグロビン血症誘起本体は、phenetidine (III)より生成する*N*-hydroxyphenetidine(IV)であることが、強く示唆されている。こうして、phenacetinのメトヘモグロビン血症と代謝との関連も、1960年代後半に明確になった。

これに対しphenacetinの発癌性と代謝との関連は、有効な生物検定法が無かったために、1970年代になっても明確にはならなかった。こうした状況に一つの活路を開いたのが、各種変異原試験法、特に*Salmonella*/マイクロソーム変異原試験法(Amesら、1975)の開発であった。1974年、我国の厚生省癌研究班は、Ames試験あるいは哺乳動物細胞を用いる染色体異常誘発試験など各種の試験法によって、phenacetinの変異原性を検索した。その結果、phenacetinはチャイニーズ・ハムスター培養細胞に対しては染色体異常を誘発するが、*Salmonella*に対しては変異原性を示さないことが結論された。しかし、翌1975年から開始された発癌試

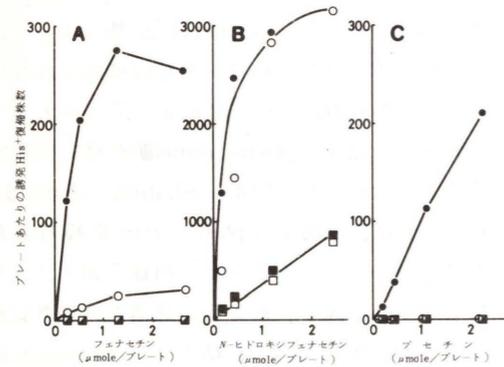


図2 フェナセチン(A)、*N*-ヒドロキシフェナセチン(B)、ブセチン(C)の*Salmonella typhimurium* TA100に対する変異原性。NADPH産生系を加えると変異原活性が減少するので、(B)はS9だけを磷酸緩衝液に懸濁して試験を行った。
●—● PCBハムスターS9
○—○ 無処理ハムスターS9
■—■ PCBラットS9
□—□ 無処理ラットS9

験の結果、phenacetinはラットの鼻腔粘膜に平扁平上皮癌を発生させることが明らかになった(Isakaら、1979)。このため、当時phenacetinは、発癌性はありながらAmes試験に陽性結果を与えない物質の一つと考えられた。しかし、Matsushimaら(1980)およびBartschら(1980)は、通常のAmes試験に用いられるラットのS9の代わりにハムスターのS9を用いると、phenacetinはTA100株に変異原性を示し(図2A)、phenacetinの代謝活性化にはラットとハムスターの間で“種差”があることを明らかにした。

2. フェナセチンの変異原性発現とS9の種差

「ラットとハムスターの変異原性発現能の差は、phenacetinの代謝活性化経路のどの段階に起因しているのであろうか」この問題を我々は、HPLC分析とAmes試験を併用して検討した(Nohmiら、1983、1984)。

最初にphenacetinの代謝産物の変異原性についてAmes試験を用いて調べ、その変異原性を相互に比較した(表1)。*N*-Hydroxyphenacetin(II)およびphenetidine(III)はS9の共存下においてのみTA100に変異原性を示し、その活性はそれぞれphenacetinの11倍および2倍であった。そしてphenetidineの*N*-水酸化体(IV)とニトロソ体(V)は、S9による代謝活性化なしに強い変異原性を示し、しかもその変異原活性はphenacetinの70~110倍であった。脱エチル化体であるacetaminophen(VI)は、S9の有無にかかわらず変異原性を示さなかった。Acetaminophen(VI)については、*N*-水酸化体(*N*-hydroxyacetaminophen)その脱水体(*N*-acetylbenzoquinonimine)についても変異原性が調べられているが、いずれもS9の有無にかかわらず“陰性”と報告されている(Shudoら、1978; Wirthら、1980; Camusら、1982)。

PhenacetinをPCBで処理したハムスターのマイクロソームで代謝させ、その産物をHPLCで

表1 フェナセチン、ブセチンとその代謝産物の変異原性

番号	名称	構造式	変異原活性 (誘発His ⁺ 復帰株数/ μmole/プレート)	
			-S9mix	+S9mix ^{a)}
(I)	Phenacetin	<chem>CC(=O)Nc1ccc(Oc2ccccc2)cc1</chem>	0	208
(II)	<i>N</i> -Hydroxyphenacetin	<chem>CC(=O)N(O)c1ccc(Oc2ccccc2)cc1</chem>	0	2300 ^{b)}
(III)	Phenetidine	<chem>Nc1ccc(Oc2ccccc2)cc1</chem>	0	430
(IV)	<i>N</i> -Hydroxyphenetidine	<chem>N(O)c1ccc(Oc2ccccc2)cc1</chem>	15400	1740
(V)	<i>p</i> -Nitrosophenetole	<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(Oc2ccccc2)cc1</chem>	22300	1520
(VI)	Acetaminophen	<chem>CC(=O)Nc1ccc(O)cc1</chem>	0	0
(VII)	Bucetin	<chem>CC(C)C(O)C(=O)Nc1ccc(Oc2ccccc2)cc1</chem>	0	100
(VIII)	<i>N</i> -Hydroxybucetin	<chem>CC(C)C(O)C(=O)N(O)c1ccc(Oc2ccccc2)cc1</chem>	0	32 ^{b)}
(IX)	<i>N</i> -(β-Hydroxybutyryl)- <i>p</i> -aminophenol	<chem>CC(O)C(=O)Nc1ccc(O)cc1</chem>	0	0

^a PCB処理したハムスターのS9を用いた

^b NADPH産生系を加えると変異原活性が減少するので、PCB処理ハムスターS9だけを磷酸緩衝液に懸濁して試験に用いた

分析すると、表1に示した化合物はいずれも実際にphenacetinの代謝産物として生成していた。直接変異原性を示すphenetidineの*N*-水酸化体(IV)とニトロソ体(V)は、phenetidine(III)ばかりでなく、*N*-hydroxyphenacetin(II)の代謝産物中からも検出された。以上の結果に基づき、phenacetinのハムスター肝マイクロソームにおける代謝活性化経路は、図1に示すように*N*-hydroxyphenacetin(II)およびphenetidine(III)を経て直接作用性変異原(NとV)に至るものと推定した。

つぎに、無処理およびPCB処理したラットとハムスターの肝臓から4種類のマイクロソーム

を調製し、それぞれがphenacetinの代謝活性化経路の各ステップをどの程度触媒するかを調べた。その結果、*N*-水酸化体(III→IV+V, I→II)には大きな種差は見られなかったが(図3B, D)、脱アセチル化活性には顕著な種差が見られ、*N*-hydroxyphenacetinの脱アセチル化(II→IV+V)で20倍、phenacetinの脱アセチル化(I→III)で10倍ハムスターがラットよりも高い活性を示した(図3A, C)、実際*N*-hydroxyphenacetin(II)の変異原活性は、ハムスターのS9を用いたときの方がラットのS9を用いたときより10倍高い(図2B)。これらの結果から、変異原試験の際に見られる

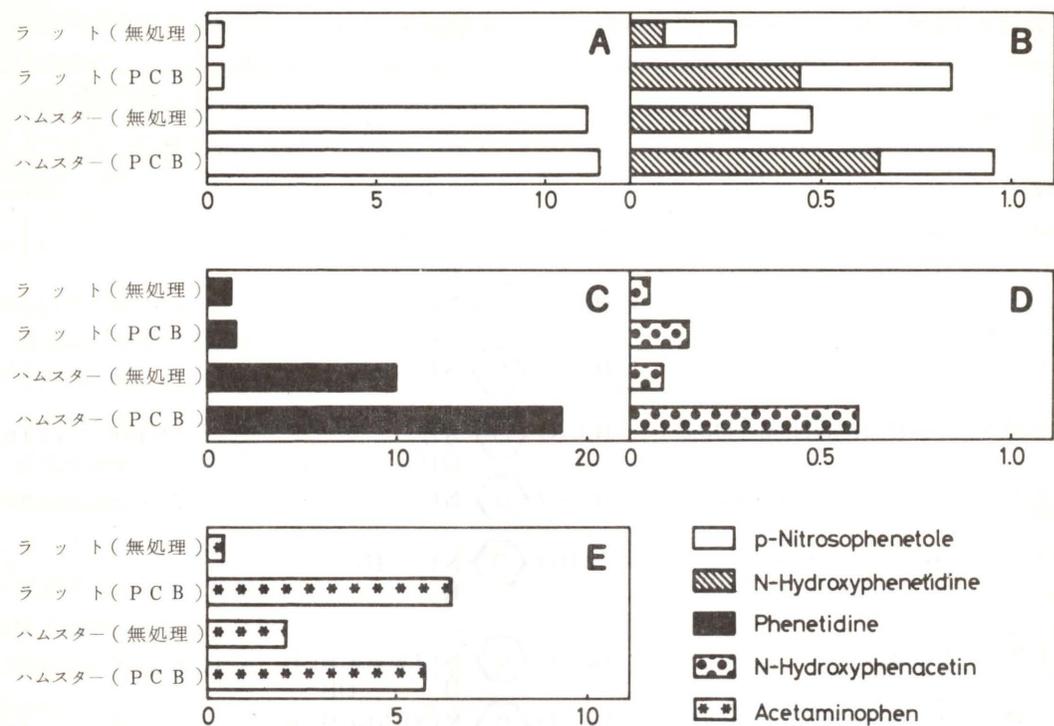


図3 ラットとハムスター肝ミクロソームのN-ヒドロキシフェナセチン脱アセチル化活性(A), フェネチジンN-水酸化活性(B), フェナセチン脱アセチル化活性(C), フェナセチンN-水酸化活性(D), フェナセチン脱エチル化活性(E)
活性の単位は nmole 代謝産物/分/μgタンパク

ラットとハムスターの変異原性発現能の差は、両者の脱アセチル化能の差によるものと結論した。

Ames 試験とならんで汎用されている変異原試験の一つに、哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常誘発試験がある。Phenacetinはこの試験系に対しても、+S9 mixの条件下で陽性の結果を与えるが、染色体異常を指標にしたときには、ラット、ハムスターいずれのS9を用いても同程度の異常が現れる(Matsuokaら, 1979)。これはphenacetinの脱エチル化体であるacetaminophen(VI)が、phenacetinの染色体異常誘発作用の活性本体であるためと思われる。Acetaminophen(VI)は、上述したようにSalmonella

物培養細胞に対してはS9なしに染色体異常を起こすことが知られている(Yoshidaら, 1980)。そこでphenacetinの脱エチル化活性を4種のミクロソームについて比較してみると、ラットとハムスターの間に顕著な差は見られなかった(図3E)。従って、バクテリアの突然変異原性を指標にしたときは異なり、脱エチル化(I→VI)が染色体異常誘発の律速段階になっているため、この試験系を用いたときにはラットとハムスターの間に“種差”が現れなかったものと推察した。

3. ブセチンの代謝活性化機構

「変異原試験の際に見られるラットとハムスターS9の種差は、phenacetinだけに特有な

現象なのであろうか」この点を明かにするため、我々はbucetin(VII)の代謝活性化と変異原性について検討した。Bucetin(VII)はphenacetinと同程度の解熱鎮痛作用を有しながら、毒性がphenacetinよりも低いため、現在phenacetinに代って用いられている解熱鎮痛剤の一つである。

まずラットとハムスターのS9を用いてbucetin(VII)のTA100に対する変異原性を調べた(図2C)。Bucetin(VII)はphenacetinと同様ハムスターのS9を用いたときにのみ変異原性を示し、その変異原活性はphenacetinの1/2であった(表1)。

つぎに、PCBで処理したハムスターの肝ミクロソームでbucetin(VII)を代謝させ、その代謝産物をHPLCで分析し、代謝産物としてN-(β-hydroxybutyryl)-p-aminophenol(IX), N-hydroxyphenetidine(IV), phenetidine(III), p-nitrosophenetole(V)を検出した。Bucetin(VII)の脱エチル化体であるXは、S9の有無にかかわらずTA100に変異原性を示さなかったが、III, IV, Vはいずれもphenacetinの代謝産物中からも検出された変異原性代謝産物である。特にN-hydroxyphenetidine(IV)とp-nitrosophenetole(V)は、S9による活性化なしに強い変異原性を示し、その活性はbucetin(VII)の150~220倍であった(表1)。これらの結果から、bucetin(VII)のハムスター肝ミクロソームにおける代謝活性化は、phenetidine(III)を経てその

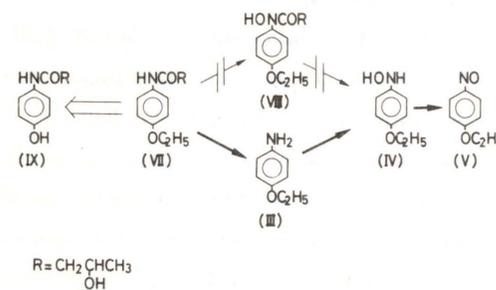


図4 ブセチンの主な代謝経路(図中の黒太線矢印がハムスター肝ミクロソーム中の代謝活性化経路)

N-水酸化体(V)とニトロソ体(V)に至るものと推定した(図4)。N-Hydroxybucetin(VII)は代謝産物中から検出されず、しかもその変異原活性は母化合物であるbucetin(VII)の1/3であることから、bucetin(VII)の代謝活性化はN-hydroxybucetin(VII)を経ずに進むものと思われる。

変異原試験の際に見られるラットとハムスターのbucetin代謝活性化能の差の原因を明らかにするため、無処理およびPCB処理したラットとハムスターのミクロソーム計4種を調製し、それぞれのbucetin脱アシル化活性(VII→III)を測定した。その結果、bucetinの脱アシル化には顕著な種差が存在し、その差をPCB処理群同士で比較すると、ハムスターがラットよりも180倍高い活性を持つことが明らかになった(表2)。PhenetidineのN-水酸化活性(III→IV+V)には種差が見られないことから(図3B)、ラットとハムスターのbucetin代謝活

表2 ラットとハムスター肝ミクロソームのブセチン脱アシル化活性

動物種	前処理	ブセチン脱アシル化活性
ラット	無処理	0.02
ラット	PCB	0.02
ハムスター	無処理	1.95
ハムスター	PCB	3.55

単位: nmole フェネチジン/分/μgタンパク

性活性化能の差は、phenacetinのときと同様、両者の脱アシル化能の差によるものと結論した。

Phenacetinとbucetin(VII)の構造-活性相関を明確にするため、N-butylphenetidine(X)を合成し3者の脱アシル化速度を比較した。その結果、脱アシル化速度はN-butylphenetidine(X) > phenacetin(I) > bucetin(VII)の順であった(図5)。このことは、①bucetin(VII)の脱アシル化速度が低いのは、アシル基の末端から

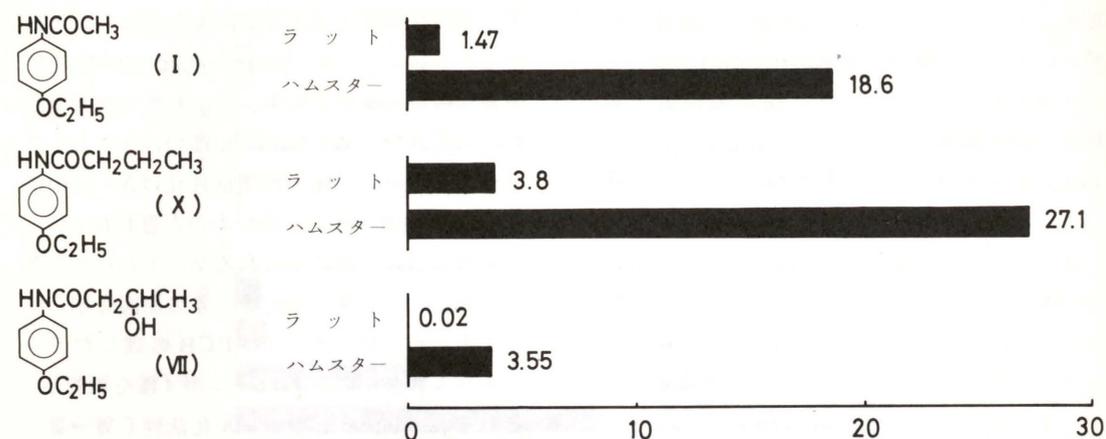


図5 フェナセチン(I), *N*-ブチルフェネチジン(X), ブセチン(VII)のPCB処理ラットおよびハムスター肝ミクロソームによる脱アシル化速度

二つ目の水酸基に原因があること②bucetin(VII)の変異原性がphenacetinに比べ低いのは、phenetidine(III)の生成が抑えられるためであることを示唆している。

4. おわりに

以上、phenacetin, buccetinの代謝活性化と変異原性について検討し、①ラットとハムスター-S9の間に見られる種差が両者の脱アシル化能の差によること②脱アシル化と*N*-水酸化によって生ずるphenetidineの*N*-水酸化体とニトロソ体が、これら解熱鎮痛剤から生ずる直接作用性の変異原であることを明らかにした。Phenetidineのニトロソ体については、Uehleke(1969)がphenetidineを投与したイヌの血中からこれを単離している。このことは、少なくともphenetidineを経由する代謝活性化経路(図1, 4)が、*in vitro*のみならず生体内(*in vivo*)においても存在しうることを示唆している。

変異原性を指標にして、phenacetinのように発癌性が明白な物質の代謝活性化機構を検索・確立することは、他の化学物質の発癌試験結

果をヒトへ外挿する場合、また変異原試験系相互の結果の異同を考察する際に有用であると思われる。今後も、環境化学物質の代謝活性化と突然変異誘発について研究を進め、これを安全性評価の一助として行きたい。

(本研究の一部は、文部省奨励研究費、日米医学協力研究費によって行った。)

文 献

- Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31: 347-364 (1975).
- Bartsch, H., Malaveille, C., Camus, A.M., Martel-Planche, G., Brun, G., Hautefeuille, A., Sabadie, N., Barbin, A., Kuroki, T., Drevon, C., Piccoli, C., and Montesano, R.: Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. typhimurium* strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems, *Mutat. Res.*, 76: 1-50 (1980).

- Brodie, B.B., and Axelrod, J.: Fate of acetophenetidin (phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 97: 58-67 (1949).
- Camus, A.M., Friesen, M., Croisy, A., and Bartsch, H.: Species-specific activation of phenacetin into bacterial mutagens by hamster liver enzymes and identification of *N*-hydroxyphenacetin *O*-glucuronide as a pro-mutagen in the urine, *Cancer Res.*, 42: 3201-3208 (1982).
- Heymann, E., Krisch, K., Buech, H., and Buzello, W.: Inhibition of phenacetin and acetanilide-induced methemoglobinemia in the rat by the carboxylesterase inhibitor bis-(*p*-nitrophenyl) phosphate, *Biochem. Pharmacol.*, 18: 801-811 (1969).
- Isaka, H., Yoshii, H., Otsuji, A., Koike, M., Nagai, Y., Koura, M., Sugiyasu, K., and Konabayashi, T.: Tumors of Sprague-Dawley rats induced by longterm feeding of phenacetin, *Gann*, 70: 29-36 (1979).
- Matsuoka, A., Hayashi, M., and Ishidate, M. Jr.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutat. Res.*, 66: 277-290 (1979).
- Matsushima, T., Yahagi, T., Takamoto, Y., Nagao, M., and Sugimura, T.: Species differences in microsomal activation of mutagens and carcinogens, with special reference to new potent mutagens from pyrolysates of amino acids and proteins, *Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis*, Academic Press, 1093-1102 (1980).
- Nohmi, T., Yoshikawa, K., Nakadate, M., and Ishidate, M. Jr.: Species differences in the metabolic activation of phenacetin by rat and hamster liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 110: 746-752 (1983).
- Nohmi, T., Yoshikawa, K., Ishidate, M. Jr., Hiratsuka, A., and Watabe, T.: Mechanism of species difference in *N*-hydroxyphenacetin mutagenicity: The role of deacetylation by rat and hamster liver microsomes, *Chem. Pharm. Bull.*, in press.
- Shahidi, N.T., and Hemaidan, A.: Acetophenetidin-induced methemoglobinemia and its relation to the excretion of diazotizable amines, *J. Lab. Clin. Med.*, 74: 581-585 (1969).
- Shudo, K., Ohta, T., Orihara, Y., Okamoto, T., Nagao, M., and Sugimura, T.: Mutagenicities of phenacetin and its metabolites, *Mutat. Res.* 58: 367-370 (1978).
- Uehleke, H.: *N*-Hydroxylierung von *p*-Phenetidin *in vivo* und durch isolierte Mikrosomen aus Lebern und Nieren: Stimulierung durch Phenobarbital-Vorbehandlung, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.*, 264: 434-461 (1969).
- Wirth, P.J., Dybing, E., Von Bahr, C., and Thorgeirsson, S.S.: Mechanism of *N*-hydroxyacetylarylamine mutagenicity in the Salmonella test system: Metabolic activation of *N*-hydroxyphenacetin by liver and kidney fractions from rat, mouse, hamster and man, *Mol. Pharmacol.*, 18: 117-127 (1980).
- Yoshida, S., Nawai, S., and Hiraga, K.: Cytogenetic studies of acetaminophen and its related compounds, *Tokyo-toritsu Eisei Kenkyusho Kenkyu Nempo*, 31-32: 102-108 (1980).

Vegetable desmutagens, とくにゴボウについて

国立遺伝学研究所 賀田 恒夫
鐘紡生化学研究所 森田 和良

1. 緒 言

野菜類が蛋白質、アミノ酸の加熱分解生成物の変異原類を防除すること (Kadaら 1978; Moritaら 1978) を見出して以来その活性因子は何か、その作用機構は如何ということが興味深い問題であった。この点、キャベツやブロッコリーに関しては、これからパーオキシダーゼの活性を有する酵素が分離、精製され (Inoueら, 1981; Moritaら, 1982) これが Trp-P-1などを酸化的に不活化することが分かった。ところが、このような酵素因子で説明出来ない例も多い。何よりも、酵素は蛋白質があるので、加熱によって失活する筈である。そこで、生野菜はよいが、野菜をいためたり、お汁の中に入れて煮たものは Desmutagen として効力がないのではないかという質問をたびたび受けた。実際に、われわれの分離したキャベツのパーオキシダーゼはかなり熱に対して強いので、野菜を多少いためてもなかなか失活しないと思われる

が、煮沸には耐えられないと思われる。

実験の示すところによると、かなりの野菜類は耐熱性の Desmutagens を含んでいる。そこで、このような活性としてもっとも強いゴボウについて追求を続けた。その結果、分子量が30万以上の高分子物質が分離された。さらに、ゴボウの繊維は強い変異原吸着性を有することがわかった。ゴボウのみならず、他の種々の野菜繊維も多少の吸着性を有していた。

2. ゴボウの活性粗分画について

ゴボウをホモジェネートして得たジュースを 9,000 × g で 30分間遠心にかけて得られた上澄について、種々な変異原に関する不活化作用を調べた結果 (Moritaら, 印刷中) を表 1 に示した。変異原の DMSO に溶液 20 μl とゴボウジュース 500 μl とを混合し、37°C で 30分作用させた後、100°C で 10分加熱殺菌したものを、

表 1 種々な変異原に対するゴボウ因子の影響⁵⁾

Mutagen	S-9 Mix	Dose (μg/Plate)	Number of revertants/Plate		Effects
			-B-Factor	+B-Factor	
4-NO ₂ -1, 2-DAB	-	40	1,487	584	+
4-NO ₂ -1, 2-DAB	+	40	909	392	+
2-NO ₂ -1, 4-DAB	-	80	272	49	++
2-NO ₂ -1, 4-DAB	+	80	614	46	++
AF-2	-	0.2	349	402	-
Ethidiumbromide	+	10	909	32	+++
2-aminoanthracene	+	4	2,832	61	+++
Trp-P-1	+	0.2	1,186	53	+++
Trp-P-2	+	0.2	1,046	52	+++

表2 ゴボウ因子の熱耐性⁵⁾

2-NO ₂ -1, 4-DAB	Treatment	His ⁺ revertants per plate
200	None	1,021
0	None	41
200	Burdock juice	217
0	Burdock juice	41
200	Boiled Burdock juice	245
0	Boiled Burdock juice	35

通常のエームス試験にかけた。AF2には無効であるが、4-NO₂-1, 2-DAB, Ethidium bromide, 2-AA, Trp-P-1, Trp-P-2などには著効を示している。この活性がジュースを100℃で15分加熱しても全く不変であることは、表2に示す通りである。

3. 粗抽出物の性質

この活性因子の精製のためには、80%硫酸アンモニアによる塩析、メンブランフィルターX-300による限外濾過の繰返しによって、分子量30万以下の物質は除去された。さらに活性因子は、DEAE-Celluloseカラムに強く吸着されるに対し、CM-Celluloseには吸着されないことが分かった。そこで、活性因子は強いアニオン性の“polyelectrolyte”であることが示された。

上記の粗抽出物の種々な量を2-NO₂-1, 4-DABに作用させた後ガスクロマトグラフィーにかけて変異原の消失を測定する一方、エームス試験を行うと、これに平行して変異原の低下が起こることが示された(図1)。このような変異原の化学的消失は、Trp-P-2によっても示された(図2)。

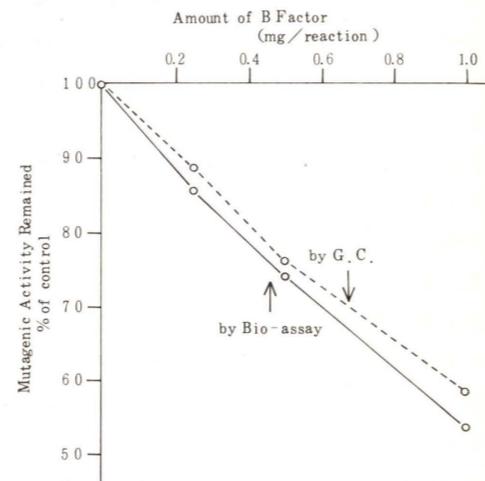


図1 ゴボウ因子による2-NO₂-1, 4-DABの不活化

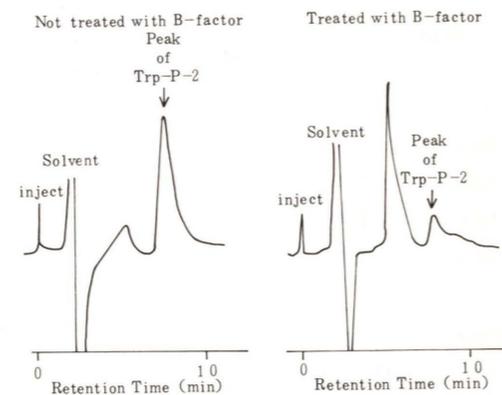


図2 ゴボウ因子によるTrp-P-2の不活化

4. 繊維による変異原吸着

ゴボウの有するDesmutagen活性が、このような高分子物質であることは、変異原に対する化学的不活化というよりも、吸着のような現象であることが示唆された。そこで、精製された野菜繊維類(Takedaら, 1979)に関して、その吸着性の実験を行った。Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1などのpyrolysate mutagensの各々を含む水溶液の中に、各繊維を重量として1~5%程度秤量して加え、よく混合して室温に放置した。混合物の一部を採取して遠心にかけて、上澄の変異原活性を測定した(Kadaら, 印刷中)。多数の試料のうちとくにキャベツ, ゴボウ, ダイコン, ニンジン, ピーマン等が強い活性を示した。その中でも、ゴボウの活性が著しく強かった。ゴボウ繊維によるTrp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-2, IQなどの変異原性抑制の時間的経過を図3に示した。

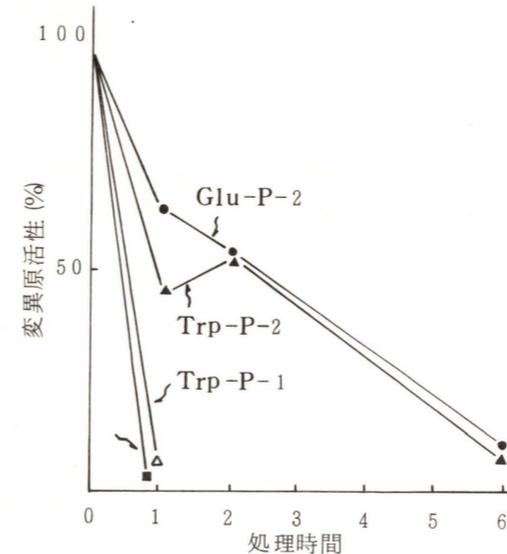


図3 野菜繊維による変異原の吸着

このような現象が繊維による変異原の吸着によるものではないかという推測は、処理後の繊維を集めて、種々な溶媒での溶出による変異原の回収の結果による。磷酸緩衝液ではほとんど

溶出されないが、特殊な有機溶媒による長時間の処理によって部分的に回収された。

5. 考察

高分子物質——繊維による吸着ということで、野菜のDesmutagen作用の秘密の大部分が明らかになった。野菜繊維が他のどのような変異原を吸着するのか、また、われわれの腸内ではどのような働きをしているのかなどを知ることは、極めて興味深い点であり、研究をすすめている。

6. 謝辞

本研究の一部は並木満夫教授(名古屋大学農学部)および桐山修八教授(北海道大学農学部)との協同研究として行われた。御協力を深謝する。また、Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, IQを御供与下さった国立がんセンター研究所の佐藤茂秋博士と杉村隆博士に厚く御礼申し上げる。

文献

- 1) Inoue, T., Morita, K., and Kada, T.: Purification and properties of a plant desmutagenic factor for the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 345-353 (1981).
- 2) Kada, T., Kato, M., and Kiriyama, S.: Adsorption of pyrolysate mutagens by vegetable fibers. *Proc. 12th Ann. Meeting of EMS Japan*, Abst. in press *Mutation Res.*
- 3) 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).
- 4) Morita, K., Hara, M., Kada, T.: Studies on natural desmutagens: Screening for

vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.*, **42**: 1235-1238 (1978).

- 5) Morita, K., Kada, T., and Namiki, M.: A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium Lappa Linne*). *Mutation Res.* (in press).
- 6) Morita, K., Yamada, H., Iwamoto, S., Sotomura, M., and Suzuki, A.: Purification

and properties of desmutagenic factor from broccoli (*Brassica oleracea var. Italica plenck*) for mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Jour. Food Safety* **4**: 139-150 (1982).

- 7) Takeda, H., and Kiriya, S.: Correlation between the physical properties of dietary fibers and their protective activity against amaranth toxicity in rats. *J. Nutrition* **109**: 388-396 (1979).

ヒトだ液および血液の変異原不活化とペルオキシダーゼ, カタラーゼ活性

同志社大学生化学研究室 西岡 一, 布柴 達男

1. はじめに

環境変異原の遺伝毒性や発ガン性のより正確な危険度評価は、極めて重要であるが、そのためには、生体内の各器官における修飾因子について十分な理解が必要である。

我々はすでに、だ液・血液による変異原の修飾に関する研究を行い、その結果、多くの変異原が不活化されることを報告している(Nishiokaら, 1981; Nishioka, 1981)。又、それらに含まれる不活化因子として、酵素、ビタミンなどを個別に調べた結果、ペルオキシダーゼ、アスコルビン酸にその能力があり、特に、ペルオキシダーゼにはその能力の高いことが判明している(Nishioka, 1981)。さらに、現在までに個人差、不活化機構などの研究を進め、いくつかの知見が得られたのでここに報告する。

2. だ液および血液による変異原不活化

我々は、だ液がAF-2, MNNG, 4NQO

ケルセチンなどのサルモネラ菌TA 98, TA 100に対する変異原性を不活化すること、又、代謝活性を必要とする変異原/発ガン物質、アフラトキシンB₁, B(a)P, Trp-P-1に対しても、同様の効果を示すことを報告した。今回は、新たにTrp-P-1以外の加熱分解物である、Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, AαC, MeAαCについても検討した。変異原性の測定およびその不活化の方法については、既に報告した(Nishiokaら, 1981)。その結果、表1に示すように、Trp-P-2, AαC, MeAαCは、30~50%の不活化が認められたが、Glu-P-1, Glu-P-2に関しては、全くその効果はみられなかった。

次に、だ液の変異原不活化能の個人差を知るため、40人のだ液の不活化能を比較した。図1は、AF-2 (0.04 μg/plate), 4NQO (0.2 μg/plate)の変異原性に対するだ液の不活化能と各提供者の年齢・性別の関係を示したものである。これによると、各提供者について、だ液

表1. ヒトだ液による蛋白質加熱分解物の変異原性不活化 (TA98+S9mix)

変異原試料	濃度 (μg/plate)	His ⁺ 復帰変異コロニー数/プレート 無処理	His ⁺ 復帰変異コロニー数/プレート だ液処理	不活化能(%) ^a
コントロール		17	19	
Trp-P-1	0.5	1,106	207.5	82.7
Trp-P-2	0.5	1,674	1,133	32.7
Glu-P-1	0.5	1,939	1,668	14.2
Glu-P-2	2.0	527	539	—
AαC	1.0	455	265	43.8
MeAαC	1.0	537	338	38.7

a 不活化能は、以下のように計算された。

$$\text{不活化能(\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A; 無処理の場合の復帰変異コロニー数

B; だ液・血清などで処理した場合の復帰変異コロニー数

但し、A, Bは自然突然変異コロニー数をあらかじめ引いてある。

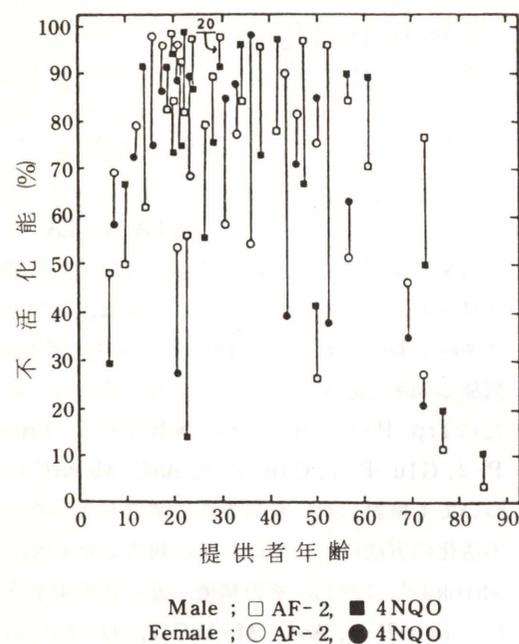


図1 (トキシコロジーフォーラム p592, 図2)
40人の各だ液提供者の年齢および性別とAF-2および4NQOの変異原性に対する不活化能の関係

の不活化には、明瞭な個人差が認められた。例外も含まれるが、一般的に不活化能の低い提供者の多くは、幼年(10歳以下)あるいは、老年(60歳以上)に見られる傾向がある。他の変異原に対してもだ液の不活化能の個人差が判明している。又、性別の差はないように思われた。

だ液同様、血液についても、その変異原不活化能が見出された。血液は、各年齢の健康な提供者および癌患者から個別に採取された。腕の静脈から注射筒(19号針)により採血し、30分間静置、血餅除去後、25°Cで30分間3,000r.p.m.で遠心分離した。その上清を血清として実験に用いた。変異原試料0.2 mlに対し、血清1.8 mlを加え、37°Cで30分間処理し、変異原性試験にかけた。不活化能は、だ液の場合同様、Ames法における復帰変異コロニー数の減少を指標とした。図2は、AF-2(0.06 μg/plate),

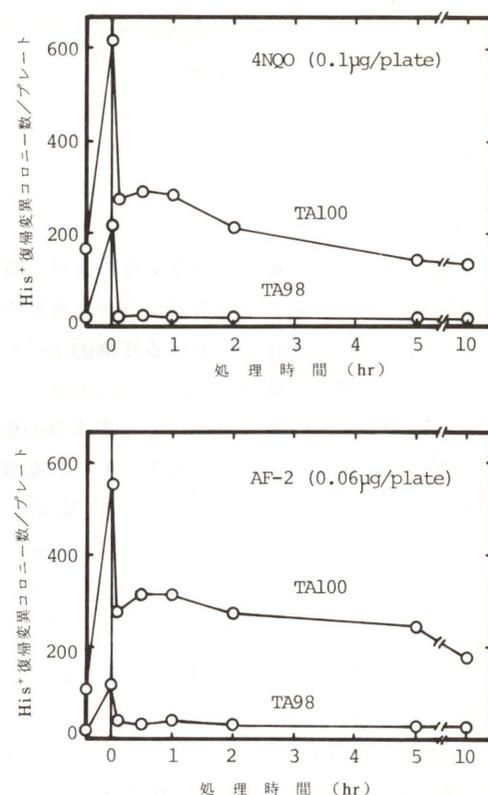


図2 4NQOおよびAF-2の変異原性に対する血清の処理時間の効果

4NQO(0.1 μg/plate)の変異原性に対する血清の処理時間の効果を示したものである。これによると、どちらの変異原も10分間の血清処理でほとんど不活化されることがわかる。そこで、この実験の処理時間を、充分な不活化の時間を与えること、又、薬物が体内で比較的長時間血液中に溶け込んでいることなどを考慮し、30分と設定した。以上の方法により種々の変異原の血清による不活化を調べ、表2に示した。これによると、血清はAF-2, 4NQO, B(a)Pの変異原性を著しく不活化し、又、ケルセチンやK₂Cr₂O₇に対しても約60%の不活化を示すことが観察された。しかしながら、加熱分解物に対してあまり不活化されず、むしろ、活性化しているものもあった。だ液がTrp-P-1の

表2 ヒト血清による各種変異原試料の変異原性不活化

変異原試料	濃度 (μg/plate)	菌株	S9 mix	His ⁺ 復帰変異コロニー数/プレート		不活化能(%)
				無処理	血清処理	
コントロール		TA98	-	1 2	1 3	
			+	1 7	1 6	
		TA100	-	1 0 7	1 2 0	
			+	1 1 2	1 2 6	
AF-2	0.04	TA100	-	6 0 2	2 3 4	7 7.0
4NQO	0.2	TA100	-	7 5 7	2 0 6	8 6.8
Quercetin	2 0 0	TA100	-	6 3 2	3 2 7	6 0.6
K ₂ Cr ₂ O ₇	5	TA100	-	2 9 8	1 8 7	6 4.9
B(a)P	2 0	TA100	+	7 0 0	2 4 4	8 0.0
Trp-P-1	0.5	TA98	+	1, 1 0 6	1, 1 8 2	-
Trp-P-2	0.5	TA98	+	1, 6 7 4	8 0 2	5 2.6
Glu-P-1	0.5	TA98	+	1, 9 3 9	2, 0 1 7	-
Glu-P-2	2.0	TA98	+	5 2 7	6 8 6	-
AαC	1 0	TA98	+	4 5 5	6 2 7	-
MeAαC	1 0	TA98	+	5 3 7	5 1 0	5.0

変異原性を著しく不活化し、その他の加熱分解物についても不活化しているのに対し、血清はわずかTrp-P-2についてのみ、50%の不活化がみられるにすぎず、必ずしもその能力を持たないことは興味深い。これは、だ液と血清の不活化のメカニズム、あるいは含有する成分の相違によると考えられた。

図3に示すように、8人の健康人(H₁~H₈)および9人の癌患者(C₁~C₉)の血清により4NQO(0.2 μg/plate), AF-2(0.04 μg/plate)の不活化の個人差を検討した。健康人から得られた血清がいずれも、4NQO, AF-2の変異原性を著しく不活化し、個人差がみられなかったのに対し、癌患者の血清は、その不活化能に顕著な個人差がみられた。特に、C₃およびC₉の血清の場合、4NQOに対して異常に低い不活化能を示すことは注目される。C₉は、AF-2についても低い不活化能であった。しかしながら、これらの癌患者の血清の不活化能が、生まれつきこのように低いのかどうかを知ることが不可能であり、又、健康人提供者より

高年齢であること、末期癌であるためあらゆる生体機能が低下していること、制ガン剤など高度の投薬処置が行われていることなどの影響も考えられることより、不活化能の低い人が癌になりやすいというには、更に検討が必要である。

3. 変異原不活化能とペルオキシダーゼ

変異原不活化の因子として、だ液や血清に含有される酵素、ビタミンなどについて、その不活化能を調べた。その結果、ペルオキシダーゼ(実験には、西洋ワサビペルオキシダーゼ; HRP 25 unit/mlを用いた)は、AF-2, 4NQOの変異原性に対して約50%の不活化能を有し、Trp-P-1に対しては、ほぼ完全に不活化した。又、アスコルビン酸(0.2 mg/ml)もそれぞれに対し、40~60%の不活化能をもつことが明らかとなっている(Nishioka, 1983)。しかしながら、H₂O₂をH₂OとO₂に分解するという点でペルオキシダーゼに類似のカターゼをはじめ、他の成分では有意な効果は認めら

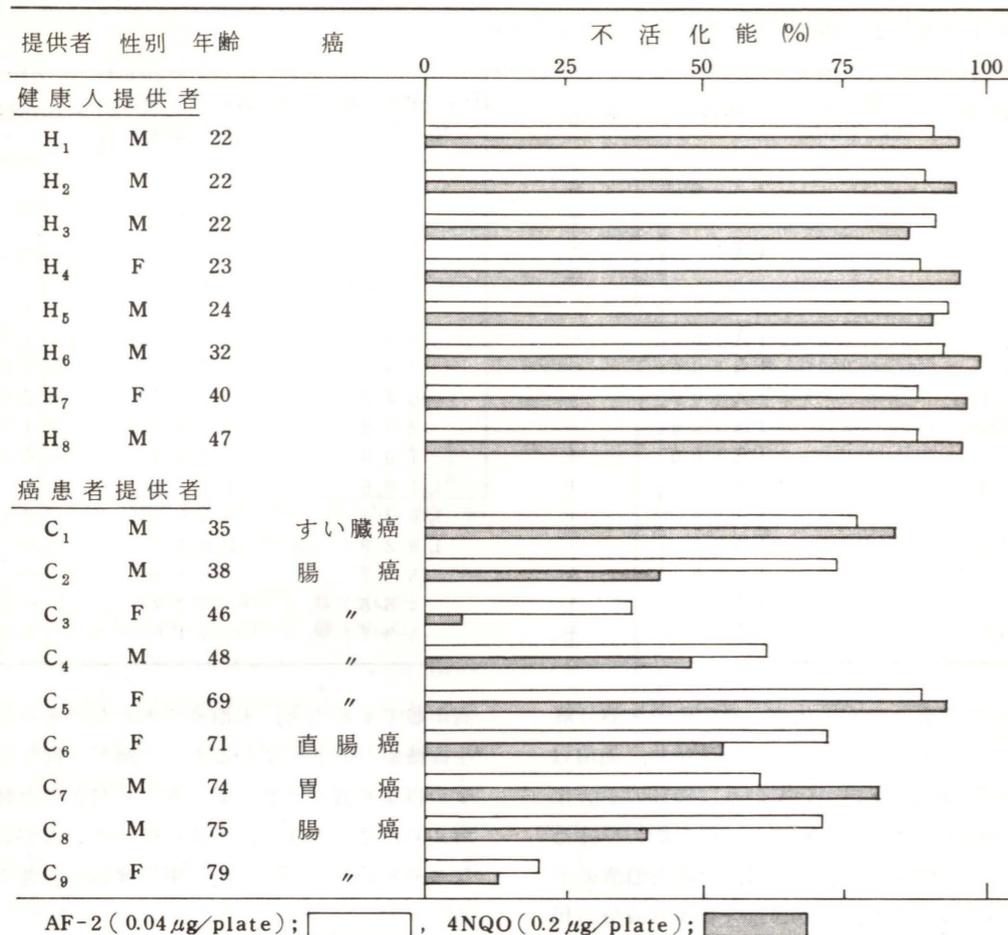
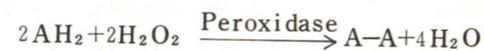


図3 (トキシコロジーフォーラム p596 図4)
健康人と癌患者の血液提供者から得た血清の
AF-2および4NQOの変異原性に対する
不活化能の比較

れていない。表3は、HRPとカタラーゼの加熱分解物の変異原性不活化能を調べたものである。これによると、HRPはいずれの加熱分解物の変異原性を極めて顕著に不活化するのに対し、カタラーゼは、MeAαCを60%不活化するにすぎないことがわかる。このことは、すでに述べた、だ液と血液の不活化能の差が含有成分の相違に基づくという仮説を支持する。

ペルオキシダーゼは、一般に、H₂O₂または、CH₃OOH存在下で基質(水基供与体、AH₂)

の酸化を触媒する酵素で、



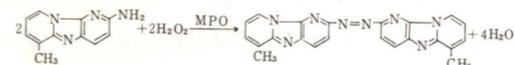
というような反応をする。今回実験に用いたHRPは、200種以上の基質が知られている。

白血球に存在するミクロペルオキシダーゼは、H₂O₂存在下で加熱分解物の変異原性を抑制するという報告がある(Yamadaら, 1979)。例えば、Glu-P-1は、H₂O₂存在下でミクロペルオキシダーゼにより酸化され、次のような反

表3 ペルオキシダーゼ又は、カタラーゼによる蛋白質加熱分解物の変異原性不活化
(TA98,+S9 mix)

変異原試料	濃度 (µg/plate)	His ⁺ 復帰変異コロニー数/プレート			不活化能(%)	
		無処理	ペルオキシダーゼ	カタラーゼ	ペルオキシダーゼ	カタラーゼ
コントロール		17	115	11		
Trp-P-1	0.5	1,106	57	1,095	95.8	0.5
Trp-P-2	0.5	1,674	37	1,694	98.5	—
Glu-P-1	0.5	1,939	27	1,990	99.2	—
Glu-P-2	2.0	527	31	607	96.2	—
AαC	1.0	455	120	431	75.2	4.1
MeAαC	1.0	537	23	219	97.8	60.0

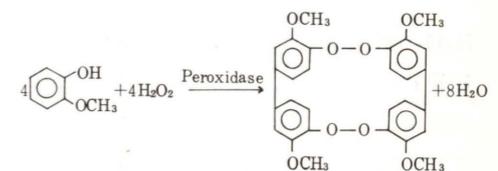
応が考えられた。



我々の実験系には、H₂O₂の存在する可能性が少なく、すなわち、HRPによる各種加熱分解物の変異原性不活化は、本来ペルオキシダーゼとしてでなく、他の機構によることも考えられた。我々の用いたHRPは、1分子中に1個のプロトヘムをもつヘムタンパク質であり、そのヘムは、解離することが知られている。又、ヘミンおよびその類縁化合物が加熱分解物の変異原性を抑制するとの報告(Arimotoら, 1980)があり、我々の結果は、これを支持するものと考えられる。一方、だ液に含まれるペルオキシダーゼをはじめとし、動物性ペルオキシダーゼは、ヘムの解離はないといわれており、だ液による不活化は、極微量存在する過酸化物質やH₂O₂により酵素的に行われているものと考えられる。

表1と表3からわかるだ液とHRPの変異原性不活化能の相違は、それぞれのペルオキシダーゼの構造、存在状態、あるいは不活化機構の違いなどによると思われる。又、用いたHRPは、0.2 mg/ml (25 unit/ml)とだ液の含有量は

るかに上まわっており、そのことも考慮する必要がある。そこで実際にだ液中に含有するペルオキシダーゼの活性を測定することを試みた。だ液中のペルオキシダーゼ活性の測定は、グアイヤコールを基質とし、H₂O₂存在下でのペルオキシダーゼの働きにより生成されたテトラグアイヤコールを470nmにおける吸収の増大をSpectrophotometer (Hitachi Perkin Elmer UV-VIS Spectrophotometer Model 139)で測定し、それよりペルオキシダーゼの活性を求める方法(George, 1953)を採用した。このときの反応を以下に示す。



10mM Na-P緩衝液(pH 7.0)2mlをCuvetteにとり、20mMグアイヤコール水溶液1mlだ液又はHRP 0.1mlを加え、25°CでSpectrophotometerにセットした。2.0mMH₂O₂ 0.1mlを攪拌しながら注入し、同時に測定開始時間とした。酵素反応速度は、基質濃度、酵素濃度、温度、pHなどに依存しており、だ液に含有するペルオキシダーゼ濃度を考慮し、グアイヤコール、

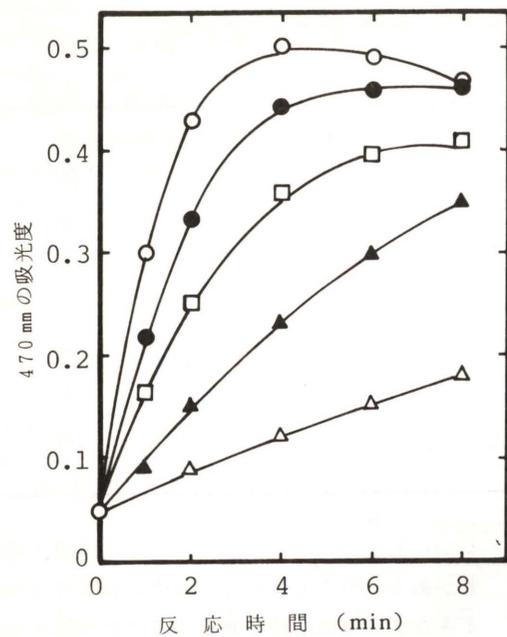


図4 グアイヤコールの酸化反応におけるHRPの活性と470nm波長の吸光度の関係

- : 2.0 unit/ml HRP
- : 1.0 unit/ml HRP
- : 0.5 unit/ml HRP
- ▲: 0.2 unit/ml HRP
- △: 0.1 unit/ml HRP

H₂O₂濃度を決定した。図4は、数種の活性値のHRP溶液を用い、反応時間を470nmの吸収の関係を示したものである。これによると、いずれの活性値のHRPもある時間までは、一次的に反応するが、それ以後は次第に遅れがみられる。これは、反応初期には、速度は時間のみに依存するが、反応の進行に伴い、基質濃度の減少、生成物の増加などが関与してくるためと思われる。従って、酵素活性のできる限り初期すなわち、直線性の得られる範囲での単位時間あたりの吸光度の変化を測定することにより求める必要がある。図5は、初速度(ΔA/min)

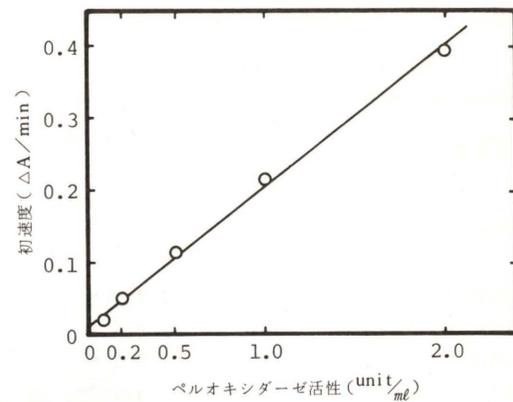


図5 HRP活性とグアイヤコール酸化反応の初速度(ΔA/min)の関係

とHRP活性(unit/ml)の関係を示したものである。これらは、ほぼ対応しており、個人のだ液のペルオキシダーゼ活性測定の検量線とした。個人のだ液のペルオキシダーゼ活性を測定すると同時に、Trp-P-1の変異原性を不活化する能力を調べ、その関係を検討したのが図6表4である。図5に示されるように、サンプル数は限られているが、ヒトだ液中のペルオキシダーゼ活性は、HRP活性の0.2~0.5 unit/mlに相当し、中には、1.5 unit/mlという強い活性のものもあった。また、Trp-P-1不活化能とは、概ね相関関係が得られた。このことは、ペルオキシダーゼがだ液による変異原不活化機構に大きく関わっていること、又、不活化能の個人差は、そのだ液のもつペルオキシダーゼ活性に依存することを示唆している。すべての変異原に関して適応できるかどうかは、なお検討を要するが、個人のだ液中のペルオキシダーゼ活性を測定することにより、比較的多くの変異原に対するそのだ液の不活化能を推定することができると思われる。

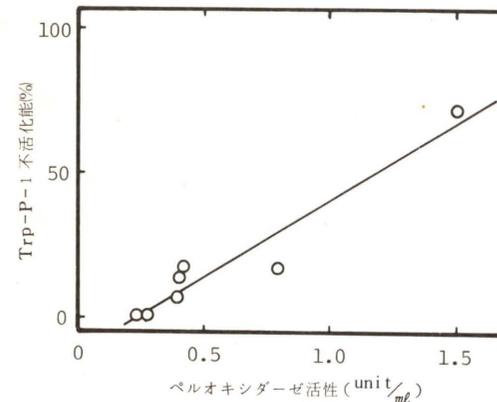


図6 グアイヤコールの酸化反応におけるHRP活性に対応する個人のだ液のペルオキシダーゼ活性とそのだ液のTrp-P-1の変異原性に対する不活化能

表4 個人のだ液のペルオキシダーゼ活性とTrp-P-1の変異原性に対する不活化能の関係

提供者	ペルオキシダーゼ活性 (unit/ml)	変異原性不活化能(%)
1	0.66	NT ^a
2	0.40	13
3	0.34	NT
4	0.28	0
5	0.23	0
6	0.41	16
7	0.79	16
8	0.39	6
9	1.51	71
10	0.39	6

a: NT Not tested

4. おわりに

ペルオキシダーゼ活性の低いだ液を分泌する人は、ある種の発ガン物質を不活化していない状態で胃腸などの消化器官に送り込む可能性が

高い。だからといって直ちに、この人が癌にかかりやすい体質だと判定するためには、なお多くの研究が必要である。また、最近、我々の研究で、同一提供者でも、だ液採取時の体調、例えば、極度に疲労したときなどで、ペルオキシダーゼ活性が低下するという結果も得られている。これらの結果から、食物をよく噛み、規則正しい生活を送ることは、健康の維持のみならず、癌の予防にもつながる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Arimoto, S., Ohara, Y., Namba, T., Negishi, T., and Hayatsu, H.: Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **92**: 662-668 (1980).
- 2) George, P.: Intermediate compound formation with peroxidase and strong oxidizing agents. *J. Biol. Chem.*, **201**: 413-426 (1953).
- 3) Nishioka, H., Nishi, K., and Kyokame, K.: Human saliva inactivates mutagenicity of carcinogens. *Mutation Res.*, **85**: 323-333 (1981).
- 4) Nishioka, H.: だ液が発ガン物質を失活する。環境変異原研究, **3**: 33-39 (1981).
- 5) Nishioka, H.: Antimutagenic activity of human saliva and serum. *Carcinogens and Mutagens in the Environment, Vol. II*, CRC Press, 77-83 (1983).
- 6) Yamada, M., Tsuda, M., Nagao, M., Mori, M., and Sugimura, T.: Degradation of mutagens from pyrolysates of tryptophan, glutamic acid and globulin by myeloperoxidase. *Bioche. Biophys. Res. Comm.*, **90**: 769-776 (1979).

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、本会事務所に申込みものとする。
- 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
国際交流幹事 1名
会計監査 2名、および評議員若干名。

評議員は正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59年10月13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** 誌の特別巻を配布を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

日本環境変異原学会歴代会長

- 初代会長 田島 弥太郎 (国立遺伝研)
昭和47年～52年
- 第2代会長 杉村 隆 (国立がんセンター研)
昭和53年～56年
- 第3代会長 賀田 恒夫 (国立遺伝研)
昭和57年～

日本環境変異原学会(研究会)大会(研究発表会)

回数	開催場所	会期	準備委員長
第1回 (講演会)	国立教育会館(東京)	47. 8. 21	田島 弥太郎
第2回 (研究発表会)	国立遺伝学研究所(三島)	48. 9. 22	田島 弥太郎
第3回	東京医科歯科大学(東京)	49. 9. 28	外村 晶
第4回	同志社大学(京都)	50. 9. 26～27	菅原 努
第5回	東大医科研(東京)	51. 10. 26	杉村 隆
第6回	武田薬品研修所(大阪)	52. 9. 16～17	梶原 彊
第7回 (学会に改組)	国立遺伝学研究所(三島)	53. 10. 19～20	田島 弥太郎
第8回	箱根観光会館(箱根)	54. 11. 27～28	岩原 繁雄
第9回	岡山県総合福祉会館(岡山)	55. 11. 28～29	早津 彦哉
第10回	東條会館(東京)	56. 12. 3～4	石館 基
第11回 (大会に改名)	修善寺総合会館(修善寺)	57. 10. 29～30	黒田 行昭
第12回	徳島大学医学部(徳島)	58. 10. 28～29	大西 克成
第13回	農協ビル(東京)	59. 10. 12～13	白須 泰彦

日本環境変異原学会昭和59～60年度評議員名簿

(五十音順)

氏名	所属
石 館 基	国立衛生試験所
乾 直 道	日本専売公社生物実験センター
岩 原 繁 雄	食品薬品安全センター
大 西 克 成	徳島大学医学部
賀 田 恒 夫	国立遺伝学研究所
菊 地 康 基	武田薬品工業(株)中央研究所
黒 木 登 志 夫	東京大学医科学研究所
黒 田 行 昭	国立遺伝学研究所
近 藤 宗 平	大阪大学医学部
杉 村 隆	国立がんセンター
佐 々 木 正 夫	京都大学放射線生物研究センター
佐 藤 茂 秋	国立がんセンター研究所
白 須 泰 彦	残留農薬研究所
祖 父 尼 俊 雄	国立衛生試験所
武 部 啓	京都大学医学部
田 ノ 岡 宏	国立がんセンター研究所
土 川 清	国立遺伝学研究所
長 尾 美 奈 子	国立がんセンター研究所
西 岡 一	同志社大学工学部
早 津 彦 哉	岡山大学薬学部
松 島 泰 次 郎	東京大学医科学研究所
村 上 昭 雄	国立遺伝学研究所
吉 川 邦 衛	三菱化成総合研究所安全性センター

以上23名

日本環境変異原学会入会申込書

昭和 年 月 日

日本環境変異原学会長殿

フリガナ	
氏名	㊟
ローマ字つづり	
生年月日	年 月 日

貴学会に入会いたしたく必要事項を書き添え、評議員の推薦を添えて申し込みます。

勤務先および職名 (和) _____

(英) _____

〒

勤務先所在地 (和) _____ TEL _____ ex _____

(英) _____

最終学校と卒業年次 _____

研究 歴 (現在行っている研究の動向や興味のある点について数行記入のこと)

加入学会名 (本学会以外の)

日本環境変異原学会賞受賞券

研究 領域 (下記のとてはまる項の 2, 3 を○で囲んでください)

1. 変異原 2. 検出系 3. 毒性 4. 発生異常 5. 汚染
6. 疫学 7. 遺伝 8. がん 9. 微生物 10. 高等動物
11. 高等植物 12. 食品 13. 気体・粉じん 14. 医薬品 15. 農薬
16. 代謝 17. 分子機構
18. その他 ()

ここに記入して下さい

推 薦 者 (日本環境変異原学会評議員)

勤務先および職名

氏名 (署名) _____ ㊟

入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

日本環境変異原学会奨励賞受賞者

- 第1回 昭和54年度
長尾美奈子 「食品の変異原因子に関する研究」
- 第2回 昭和55年度
石館基 「環境変異原および癌原物質の染色体異常によるスクリーニング」
常盤寛 「大気中の変異原性汚染物質の実体と調査の研究」
- 第3回 昭和56年度
賀田恒夫 「環境変異原検出に関する Rec-assay の開発とその応用」
- 第4回 昭和57年度
松島泰次郎 「変異原性検出による化学物質の発がん性評価についての研究」
早津彦哉 「環境中の変異原物質の作用機作に関する化学的研究」
- 第5回 昭和58年度
葛西宏 「加熱食品中の強力な変異原イミダゾキノリンおよびイミダゾキノキサリンの発見」
- 第6回 昭和59年度
大西克成 「環境中のニトロピレン類の検出および代謝に関する研究」

編集後記

昭和58年10月28日、29日の2日間にわたって徳島大学医学部で開催されました日本環境変異原学会第12回大会の演題を中心に特別寄稿3編、「日本における環境変異原研究の動向」について28編を収録いたしました。演題の選択につきましては、黒田庶務幹事の御助言を参考にしながら選ばせていただきました。他にも収録したい内容のものもありましたが全て収録するわけにもいかず、割愛させていただきましたこととお許し下さい。

若葉の頃より編集作業にとりかかり、約7ヶ月間紅葉の頃に一段落致しました。編集作業不慣れのため発行までに手間どりましたこととお詫び申し上げます。御執筆をお願いした先生方には、ご多用中のところ貴重な原稿をお寄せいただきましたことを厚く御礼申し上げます。お陰様で200ページを越す内容となりました。(木内 武美, 大西 克成)

環境変異原研究 第6巻 第1・2号 1984年

昭和59年11月20日 印刷

昭和59年11月30日 発行

発行者 日本環境変異原学会

編集責任者 大西克成

徳島大学医学部細菌学教室

〒770 徳島市蔵本町3丁目18-15

TEL 0886-31-3111 内線2260

印刷所 徳島印刷センター

〒770 徳島市八万町内浜174番地

TEL 0886-25-0135

有元佐賀恵