



環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol.7 No.1 1985

環境変異原研究

第7巻 第1号 1985年

目次

1. 昭和59年度学会奨励賞受賞者論文

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 大西 克成…………… 1

2. 第13回大会シンポジウム「食品, 蛋白質, アミノ酸の加熱により生ずるヘテロサイクリックアミン」

ヘテロサイクリックアミンの変異原性 長尾美奈子……………11

人排せつ物中の変異原と食事との関係 早津 彦哉……………19

ヘテロサイクリックアミンの発がん実験 高山 昭三, 大垣比呂子, 佐藤 茂秋……………27

加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの定量 若林 敬二……………35

3. 第13回大会特別講演要旨

New Views in Chemical Carcinogenesis : Distinct Effects of
Genotoxic and Non-genotoxic Carcinogens John H. Weisburger…43

4. 公開シンポジウム「変異原性試験に関連する規制と諸問題」

変異原性試験法の適用に関する国内外の動向 石館 基……………47

企業の立場からの問題点

——医薬品における変異原性試験の現状—— 菊池 康基……………57

微生物試験について 賀田 恒夫……………63

5. 研究会ニュース

哺乳動物変異原性試験研究会ニュース 祖父尼俊雄……………69

6. 付記

日本環境変異原学会会則……………74

日本環境変異原学会昭和61～62年度評議員名簿……………75

日本環境変異原学会入会申込書……………76

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

徳島大学医学部細菌学教室 大西 克 成

1 はじめに

10年前に、サルモネラ菌TA98株とTA100株が出現し(McCannら, 1975), 細菌による突然変異試験としてAmes法が確立して以来, 大気中の浮遊粒子状物質, さらにその原因物質としての自動車排ガスの変異原性を測定し始めた(Ohnishiら, 1980)。そして, 文部省の特定研究「排気浄化」の班(1976-1978)に入れていただき, その後の著者らの研究が進展した(大西, 1980; 大西と常盤, 1979)。

1978年にPittsらは, 大気中の多環芳香族炭化水素(PAH)が大気中の二酸化窒素によってニトロ化され, ラット肝臓抽出液(S9)による代謝活性化を必要としない直接変異原に変換する可能性があることをScienceに発表した。このニトロPAHは, 変異原性が非常に強いこと, さらに, 人体内で代謝され不活化される前に活性化されて, 細胞DNAに作用する場合が考えられることなどから, 重要であると考えた。いろいろなニトロ化合物の変異原性を測定したところ, dinitropyrene(diNP)の変異原性が非常に強いことが明らかになった(Tokiwaら, 1981)。その頃, すでにLoffrothら(1980)やRosenkranzら(1980)は, ゼロックスコピーやそのトナー中に高変異原性のnitropyrene(NP)やdiNPの三異性体を検出同定し, それらの変異原性の強さを明らかにしていた。

その後, 環境中のNP類を検出, 定量し始めたが, その一部および細菌による代謝については詳しく昨年の本誌に記述した(木内と大西, 1984b; 大西ら, 1984)ので, これらについてはできるだけ重複しないように述べ, さらに, 1-NPの生体内代謝について述べる。

2 1-NPと1,6-diNPの定量方法の確立

環境中の混合物中の1-NPとdiNPとを定量する場合に, 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使っても, 1-NPに相当する画分には幾多の化合物が含まれており, 正確に定量することは非常に困難であった。それでGibsonら(1981)は, HPLCで溶出してくる1-NP相当画分を化学的に還元して蛍光性の1-aminopyrene(1-AP)に変換し, 再度HPLCにかけて, 1-APを定量する方法を開発した。著者らは, 1-NPの還元には, なお一層特異性のある酵素を使用した。

細菌の中では, 嫌気性の腸管内常在細菌である*Bacteroides*の1-NP nitroreductase(NRase)活性が最も強く(Kinouchiら, 1982; 大西ら, 1981), ラット肝臓のNRaseより比活性が高いことを明らかにした(木内と大西, 1984b)。さらに*Bacteroides fragilis*から四種のNRaseを精製し(KinouchiとOhnishi, 1983; 木内と大西, 1983), 基質特異性を調べた。その結果, NRase Iは1-NPに, NRase IIIはdiNPに特異的に作用した(KinouchiとOhnishi, 1983; 木内と大西, 1984aとb)ので, 1-NPを定量する時にはNRase Iを使用し, 1-NP相当画分を還元して1-APに変換し, また, 1,6-diNPを定量する場合には, 1,6-diNP相当画分を分取してNRase IIIを作用させ, 1,6-diAPに変換し, 共に, 再度HPLCで分析することによって定量した。両者の検出感度は, それぞれ 1.1×10^{-2} と 1.3×10^{-2} pmolであった(Manabeら, 1984と1985)。

3 環境中のニトロピレン類の定量

上記の方法などで定量した気圏, 水圏および食物中に広く存在しているNP類の定量値を表1に示した。

表1 各種試料の変異原性と nitropyrene 類含有量およびその全変異原性に占める割合

試料	変異原性 TA98株,(-)S9 His ⁺ /プレート	含有量 ng	TA98株,(-)S9 での全変異原性 に占める割合 %
ディーゼルトラック排ガス	2,720 (抽出物 1 mg 当り) 69,700 (排ガス 1 m ³ 当り)		
1-nitropyrene		62 (抽出物 1 mg 当り)	3.6
1,6 dinitropyrene		0.81 (")	8.0
1-nitro-3-acetoxypyrene		6.3 (")	12.0
1-nitro-3-hydroxypyrene		70 (")	9.0
ディーゼル小型エンジン排ガス	3,240 (抽出物 1 mg 当り) 135,000 (排ガス 1 m ³ 当り)	(")	
1-nitropyrene		71 (")	3.7
1,6 dinitropyrene		1.03 (")	8.9
ディーゼルエンジン内燃焼ガス (クランク角 15° の時)	612 (抽出物 1 mg 当り)		
1-nitropyrene		50 (")	15.0
石油ストーブ燃焼中の室内空気 (点火時より 8 時間連続)	35 (室内空気 1 m ³ 当り)		
1-nitropyrene		0.147 (室内空気 1 m ³ 当り)	0.71
1,6 dinitropyrene		0.025 (")	20.1
給油所排水	53~8.75×10 ⁶ (排水 1 ℓ 当り)		
1-nitropyrene		4.2~25,600 (排水 1 ℓ 当り)	0.3~58.5
使用済エンジンオイル			
(1) ガソリン乗用車 (3200km 走行)	55,800 (オイル 1 ml 当り)		
1-nitropyrene		138 (オイル 1 ml 当り)	0.45 (中性画分の)
1,6 dinitropyrene		2.0 (")	2.7 (")
(2) ディーゼル乗用車 (4600km 走行)	73,700 (")		
1-nitropyrene		349 (")	0.9 (")
1,6 dinitropyrene		31 (")	12 (")
焼鳥			
(1) たれ付	7 分焼いた時	5,610 (焼鳥 1 g 当り)	
1-nitropyrene	3 分 "	3.8 (焼鳥 1 g 当り)	3.0
	5 分 "	19 (")	2.7
	7 分 "	43 (")	1.3
(2) たれなし	7 分 "	2,280 (")	
1-nitropyrene	7 分 "	1.4 (")	0.1

(1) エンジン排ガス

ディーゼルトラック (排気量 5,785 ml) 排出粒子状物質中の 1-NP および 1,6-di NP の定量値は表 1 に示すとおりだが, 1,3-di NP と 1,8-di NP も 1,6-di NP と同量含有されているものと仮定すると, これら四種の化合物の総量

が示す変異原性は, 排ガス中粒子状物質の粗抽出液が示すサルモネラ菌 TA98 株, (-)S9 で測定した全変異原性の約 28% であった。従って, 変異原性が強い他のものがまだ含有されているものと考えた。粗抽出液を diethylether 溶性中性, 酸性, および塩基性画分に三分画して変異

原性を Ames 法で測定すると, それぞれ, 全変異原性の 59, 27, 0.3% を示した。中性画分を HPLC で分画し, 各画分の変異原性を測定すると, 1-NP や di NPs 相当画分より極性の画分に強い変異原があり, この高変異原性物質は 1-nitro-3-acetoxypyrene であった (図 1)。この定量は mass fragmentography で行なったが, その含量は, 全変異原性の 12% を占めた (Manabe ら, 1985)。1-nitro-6/8-acetoxypyrene も存在していたが, 分子量が同じである nitroacetoxylfluoranthene と区別がつかず, 正確な定量ができなかった。酸性画分の変異原についてはほとんど報告がないが, 表 1 に示すように 1-nitro-3-hydroxypyrene が含有されており, 全変異原性の 9% を占めていた (Manabe ら, 1985)。

発電機用の小型ディーゼルエンジン (排気量 269 ml) 排ガス (Ohnishi ら, 1982) 中にも同程度の 1-NP と 1,6-di NP とが含有されていた (大西と木内, 1983)。また, ディーゼルエンジン内燃焼ガス (Hayano ら, 1985) にも 1-NP は検出された (大西と木内, 1983)。

(2) 石油ストーブ燃焼中の室内空気

石油ストーブ点火時には, di NP の排出が多くなるので, 室内排気型の石油ストーブの点火直後の換気が重要であることを指摘した (大西ら, 1984; Ohnishi ら, 1985)。

(3) 給油所排水

自動車整備も行なっている給油所からの排水は, 時々, 強い変異原性を示し, 中に 1-NP を含んでいることが明らかになり, 本誌にも発表した (Manabe ら, 1984; Ohnishi ら, 1983; 大西ら, 1983)。給油所の排水は油水分離槽に蓄えられて, 油分は一般下水道へは排出されないことになっているが, 給油所により, また, 時によっては排出されているので, 監視が必要であろう。

(4) 使用済エンジンオイル

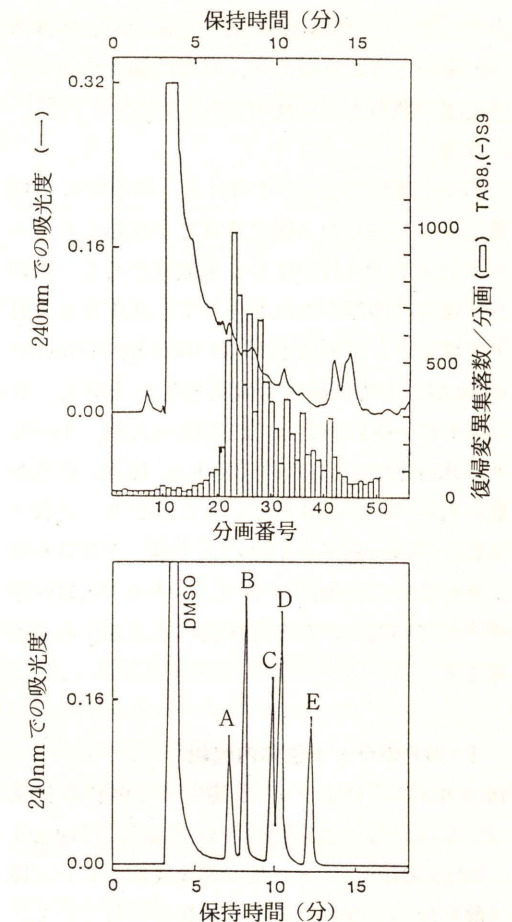


図1 ディーゼルトラック排出粒子状物質を benzene-ethanol (4:1) で抽出後, 分画した diethyl ether 溶性中性画分の HPLC 分析。Zorbex ODS カラム (4.6 mm i.d. × 250 mm) を使用し, 移動相として 85% methanol を用いて 1.0 ml / 分で溶出した。上図は試料を, 下図は標準物質を溶出したもので, A は 1-nitro-6/8-acetoxypyrene, B は 1-nitro-3-acetoxypyrene, C は 1,6-dinitropyrene, D は 1,8-dinitropyrene, E は 1-nitropyrene である。

表 1 に示すように非常に強い変異原性を示し, 特にディーゼルエンジンオイルは, diNP を沢

山含んでいた (Manabeら, 1984)。給油所排水の汚染源と考えられるが、通常は蓄えられて公衆浴場の燃料として使用されている。

(5) 燒鳥

不完全燃焼で生じたPAHと、都市ガスの燃焼によって生じた二酸化窒素とが反応して、ニトロ化したPAHが生じる可能性がある。串刺しの鶏肉に市販のたれを付けて、都市ガスの直火で焼くと、たれを付けない時に比べてdiethyl ether 溶性の中性画分の変異原性が上昇し、この画分に1-NPが含まれていた(大西, 1985a; Ohnishiら, 1985)(表1)。最近、紅茶の葉にも1-NPが含まれていることがあると報告された(Dennisら, 1984)。今後、PAHを沢山含んでいる食物について、ニトロPAHが生成されていないのかどうか調べる必要があると考えている。

4 1-NPのラット生体内代謝

in vitro におけるラット肝臓での 1-NP の代謝についてはかなりよく研究されており (Belandら, 1985 参照), ニトロ基の還元反応とピレン環の水酸化反応とが起ることが報告されている。しかし, 反応条件によっては代謝産物の傾向が異なっており, 窒素やアルゴン存在下では, ニトロ基還元反応が主たるものとなる。実際に *in vivo* で, ラット肝臓でニトロ還元反応が起っているのかどうかは, 無菌ラットを使用して調べてみればわかる。また, 無菌ラットを使用することによって腸内常在細菌の役割も明らかになる。

30 μ mol (7.4 mg) の [3 H] 1-NP (3.3 mCi/mmol) を無菌および通常 Wistar 雄ラットの胃内に投与し、経時的に糞便と尿とを採取し、また、各臓器の放射能を測定した (Kinouchi ら, 1985)。通常ラットでは吸収・排泄が早く、各臓器の放射能は投与後12時間で最高になったが、無菌ラットでは24時間後に最高値を示した。両ラットとも、肝臓、腎臓、脂肪組織および消化管壁で高い放射

能を示した。24時間後に通常ラットでは、糞便に投与量の52.4%，尿に18.1%，計70.5%，無菌ラットでは、糞便に8.9%，尿に4.0%，計12.9%が排泄された。

各臓器の高分子物質へ共有結合した放射能を調べると、肝臓と腎臓とでは通常ラットの方が無菌ラットより有意に大であり（肝では $p < 0.01$ 、腎では $p < 0.05$ ）、腸管壁では無菌ラットの方が有意に大であった（ $p < 0.01$ ）。肝臓と腸管壁の NRase 活性は高いが、腎臓では高くないので、高分子物質への共有結合度は、NRase 活性に依存していないようであった。また、無菌ラット腸管壁での共有結合度が大きいのは、 $[^3\text{H}]$ 1-NP の腸管内通過時間が長いと、代謝産物の違いによるものと思われる。両ラット間で代謝産物が異なっているのは、糞便の変異原性が、無菌ラットでは TA 98 株、(-)S 9 で、通常ラットでは TA 98 株、(+)S 9 で高いことから明らかであった。つまり、代謝産物の違いは腸管内細菌の存在によって生じていることがわかる。

通常動物の糞便は、中のグルクロン酸および硫酸抱合体が腸管内で既に脱抱合されているので、酵素処理はせず、他の試料については β -glucuronidase または arylsulfatase 処理を行なった後に、代謝産物を HPLC で分析し、その保持時間、可視・紫外線吸収スペクトル、質量スペクトルについて標準物質と比較して同定した。

無菌ラットの1-NP投与後48時間の糞便には、多い順に1-nitro-3-hydroxypyrene（投与量の5.7%）＞1-NP（素通りで、抱合体でない）＞1-nitro-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene（4,5-dihydrodiol）＞1-nitro-6-hydroxypyrene＞1-nitro-8-hydroxypyreneのグルクロン酸抱合体が検出された（表2）。尿も1-NPを除く同様の成分であったが、4,5-dihydrodiolの抱合体が多かった。このように無菌ラットでは、1-APや1-acetylaminopyreneのようなニトロ還元体のグルクロン酸抱合体は検出されなかったので、*in vivo*

表2 $[^3\text{H}]$ 1-nitropyrene 胃内投与無菌ラットの糞便と尿中に排泄された代謝産物の分析

代 謝 産 物	投与量の百分率 (β -glucuronidase 処理後の diethyl ether 抽出液中の百分率)					
	0—12 時間			0—48 時間		
	糞 便	尿	合計	糞 便	尿	合計
1-nitro-4,5-dihydro- 4,5-dihydroxypyrene	0.25 (17.8)	0.10 (36.7)	0.35	3.12 (19.0)	0.45 (38.3)	3.57
1-nitro-6-hydroxypyrene	0.09 (6.4)	0.02 (4.5)	0.11	1.17 (7.1)	0.04 (3.6)	1.21
1-nitro-8-hydroxypyrene	0.06 (4.1)	0.01 (2.4)	0.07	0.61 (3.7)	0.02 (1.8)	0.68
1-nitro-3-hydroxypyrene	0.44 (30.2)	0.04 (7.9)	0.48	5.66 (34.5)	0.07 (6.3)	5.73
1-nitropyrene	0.47 (32.6)	0.01	0.47	4.20 (25.6)	0.03	4.20
合 計	1.31 (91.1)	0.17 (51.5)	1.48	14.76 (89.9)	0.61 (50.0)	15.37

では *in vitro* とは違って、肝臓ではニトロ還元反応は起こらず、腸管内常在細菌によって行なわれるものと考えられる。

通常ラットの48時間糞便には、素通りの1-NP (投与量の22.5%)の他に、1-AP (8.3%) > 1-acetylamino-8-hydroxypyrene > 1-acetylamino-6-hydroxypyrene > 1-acetylamino-3-hy-

droxypyrene 検出された (表 3)。また, 12 時間糞便には投与量の 1% 以下だが, 1-amino-3- または-6-または-8-hydroxypyrene も含まれていた。糞便抽出液の間接変異原性は, 主として 1-acetylamino-6-hydroxypyrene によるものであった。48 時間尿には, 1-acetylamino-6- または-8-hydroxypyrene のグルクロン酸抱合体が検

表3 $[^3\text{H}]$ 1-nitropyrene 胃内投与通常ラットの糞便と尿中に排泄された代謝産物の分析

代 謝 産 物	投与量の百分率 (β -glucuronidase 処理後の diethyl ether 抽出液中の百分率)					
	0—12 時間			0—48 時間		
	糞 便	尿	合計	糞 便	尿	合計
1-acetylamino-6-hydroxypyrene	0.13 (0.89)	0.77 (25.5)	0.90	4.56 (8.6)	2.95 (57.9)	7.51
1-amino-6-hydroxypyrene	0.04 (0.27)	0.01	0.04	0.41	0.08	0.49
1-acetylamino-8-hydroxypyrene	0.75 (4.99)	0.56 (18.7)	1.31	6.39 (12.1)	0.88 (17.4)	7.27
1-amino-8-hydroxypyrene	0.15 (1.02)	0.01	0.15	0.48	0.05	0.53
1-acetylamino-3-hydroxypyrene	0.09 (0.63)	0.01	0.09	0.98 (1.9)	0.02	0.98
1-amino-3-hydroxypyrene	0.03 (0.20)	0.01	0.03	0.26 5.	0.01	0.27
1-aminopyrene	0.86 (5.70)	0.01	0.86	8.34 (15.8)	0.01	8.34
1-nitropyrene	11.12 (74.1)	0.01	11.12	22.54 (42.7)	0.01	22.54
合 計	13.17 (81.8)	1.33 (44.2)	14.50	42.81 (81.1)	3.83 (70.8)	46.64

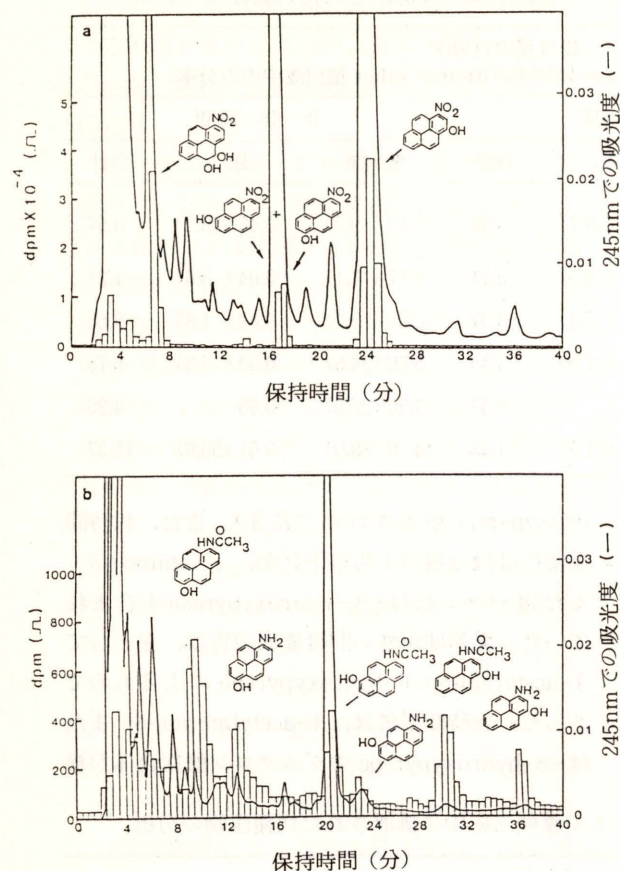


図2 $[^3\text{H}]$ 1-nitropyrene 投与通常ラットの0-6時間胆汁を β -glucuronidase処理し、その抽出試料のHPLC分析。a図ではZorbax ODSカラムを使用し、移動相は70% methanolで、1ml/分の速度で溶出した。a図の保持時間2-5分の画分を再クロマトしたのがb図であり、移動相として50% methanolを使用した。

出された。

通常ラットの胆汁中には、図2に示したものと同様に、投与後6時間から12時間の間にも10種類のグルクロン酸抱合体が排泄されており、多い順に1-nitro-3-hydroxypyrene>1-nitro-6/8-hydroxypyrene>4,5-dihydrodiol>1-acetylaminopyrene

ino-8-hydroxypyrene>1-acetylaminopyrene>1-acetylaminopyrene>1-amino-6-hydroxypyrene>1-amino-3-hydroxypyreneであった(表4)。0-6, 6-12, 12-24および24-48時間胆汁中のnitrohydroxypyreneのグルクロン酸抱合体は、それぞれ71.2, 54.8, 47.2, 22.1%であり、初期胆汁に多く、aminohydroxypyrenesとacetylaminohydroxypyrenesのグルクロン酸抱合体は5.1, 10.6, 16.7, 17.2%であり、還元体は後期胆汁に多かった。

グルクロン酸抱合体以外に、量は少ないが硫酸抱合体も形成されており、両ラットとも酵素処理後の成分はグルクロン酸抱合体の場合と大体似ていた。ただ通常ラット胆汁中には、nitrohydroxypyrenes 4種と1-acetylaminopyrene-6-または-8-hydroxypyreneとで計6種の硫酸抱合体が検出された。

以上の結果から1-NPのラット生体内代謝経路を推定すると図3に示すようになる。通常ラットでは、腸肝循環が起こっており、上部腸管から吸収された1-NPは、門脈を通過して肝臓に行き、そこでピレン環の水酸化反応、グルクロン酸および硫酸抱合反応が起こり、胆汁中に排泄される。さらに、下部腸管でニトロ還元反応と脱抱合反応が起こり、一部は糞便中に排泄されるが、大部分は再吸収され、肝臓でN-アセチル化反応と抱合反応とが起こる。そして、尿中に排泄されるか、再度胆汁中に排泄される。腸管内でaminohydroxypyreneがN-アセチル化反応を受ける可能性は十分にあるが、糞便中に1-APは検出されるのに、acetylaminopyreneは検出されないで、N-アセチル化反応は主として肝臓で行なわれているものと考えられる。一方、腸管に入った1-NPは、下部腸管でニトロ還元反応を受け、1-APとなり、そのまま糞便中に排泄されるが、一部は吸収されて肝臓でN-アセチル化反応と抱合反応とが起こり、尿中や胆汁中に排泄されるものと考え

表4 $[^3\text{H}]$ 1-nitropyrene胃内投与通常ラットの胆汁中に排泄された代謝産物の分析

代謝産物	(β -glucuronidase処理後のdiethyl ether抽出液中の百分率)			
	0-6時間	6-12時間	12-24時間	24-48時間
1-acetylaminopyrene-6-hydroxypyrene	1.68	2.81	2.87	4.03
1-amino-6-hydroxypyrene	0.86	0.93	1.06	1.74
1-acetylaminopyrene-8-hydroxypyrene	0.54	4.19	5.06	2.14
1-amino-8-hydroxypyrene	0.61	2.08	4.54	7.86
1-acetylaminopyrene-3-hydroxypyrene	0.92	0.38	1.66	0.67
1-amino-3-hydroxypyrene	0.50	0.23	1.48	0.75
1-nitro-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene	21.70	14.26	12.47	11.54
1-acetylaminopyrene	1.25	0.66	1.25	1.28
1-aminopyrene	1.31	1.35	1.16	1.75
1-nitro-6-または-8-hydroxypyrene	14.86	17.02	18.40	5.78
1-nitro-3-hydroxypyrene	34.68	23.49	16.37	4.73
1-nitropyrene	0.58	0.21	0.34	0.99
1-nitrosopyrene	0.50	0.14	0.15	0.85

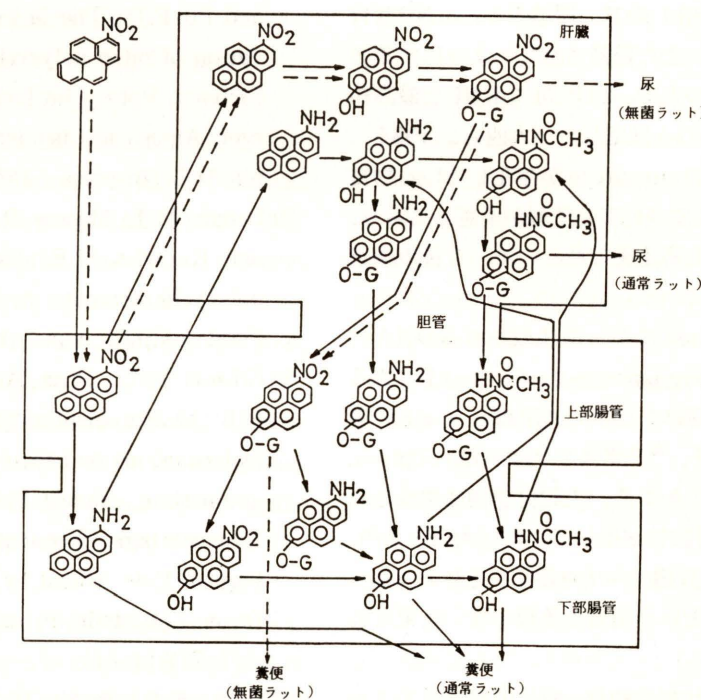


図3 1-nitropyrene 経口投与ラットにおける代謝経路。ニトロ還元反応は主として下部腸管で腸管内常在細菌によって、ピレン環の水酸化反応は主として肝臓で行なわれる。O-GはO-glucuronidaseを示し、腸管内細菌の β -glucuronidaseによって脱抱合され、再吸収されて、肝臓でN-アセチル化される。硫酸抱合体については、胆汁中にaminohydroxypyrene抱合体が検出されていないが、ほぼ同様の代謝経路である。実線は通常ラット、点線は無菌ラットの代謝経路を示す。

られる。以上のことから、肝臓ではピレン環の水酸化反応、N-アセチル化反応、および抱合反応が起こり、腸管内常在細菌ではニトロ還元反応と脱抱合反応とが起こっていることがわかる。

これまでに同定された物質は、無菌ラットの糞便に排泄された放射能の49%、尿で10%、通常ラットの糞便で69%、尿で19%、胆汁で33%であり、残りが何であるかは不明であるので、今後、グルタチオン抱合体について検索する予定である。

5 おわりに

環境中のNP類の検出と、1-NPの生体内代謝について述べた。

diNPの変異原性が強く、しかも150 μ gの1,6-diNPで肺癌を誘発することが明らかになった(Maedaら, 1985)ので、環境中の、diNP含有物質を減少させ、また暴露されないようにする必要がある。一人の人で、20年間にdiNPを最高約10 μ g摂取するものと推定した(大西ら, 1984)が、まだこれらのnitroareneが存在している物質や、それらの濃度についての情報が不足しており、従って、暴露量も不正確であるので、今後の調査研究が要求されている。

*in vitro*でNRaseによって生成されるDNA付加物はN-(deoxyguanosin-8-yl)-1-APである(Howardら, 1983)が、1-NP投与ラット肝臓のDNA付加物を、³²Pポストラベル法(Guptaら, 1982)で調べたところ、上記付加物は生成されておらず、別の付加物が生じていた(大西と木内, 1985)。これは、肝臓でニトロ還元反応は*in vitro*では起こらないという結論と矛盾しない結果である。

1-NPの生体代謝産物は、胆汁中だけでもグルクロン酸抱合体が10種類、硫酸抱合体が6種類も存在していた。1-NPは発癌性がないと結論した(大西と木内, 1983; Ohnishiら, 1985; Tokiwaら, 1984)が、あるという報告もあり(Hiroseら, 1984; 大西, 1985b参照)、今後、代謝

産物のどれが生体影響に最も重要であるかを明らかにしなければならない。

今回の学会奨励賞受賞は、多くの方々の御協力によるものであり、「文献」に引用してある論文の共同研究者の方々に感謝申し上げます。また、歴代の日本環境変異原学会長の田島先生、杉村先生、賀田先生はじめ評議員の先生方、さらに多くの学会員の方々に御助言、御指導いただきました。また、文部省、厚生省、および財団法人日産科学振興財団から多くの研究費の援助を受け、研究を推進させることができました。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Beland, F. A., Heflich, R. H., Howard, P. C., and Fu, P. P.: The *in vitro* metabolic activation of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons. Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, American Chemical Society, Washington, D. C., in press (1985).
- 2) Dennis, M. J., Massey, R. C., McWeeny, D. J., and Knowles, M. E.: Estimation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. Food Addit. Contam., 1: 29-37 (1984).
- 3) Gibson, T. L., Ricci, A. I., and Williams, R. L.: Measurement of polynuclear aromatic hydrocarbons and their reactivity in diesel automobile exhaust. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemical Analysis and Biological Fate (edited by M. Cooke and A. J. Dennis), Battelle Press, Columbus, Ohio, 707-717 (1981).
- 4) Gupta, R. C., Reddy, M. V., and Randerath, K.: ³²P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. Carcinogenesis 3: 1081-1092 (1982).
- 5) Hayano, S., Jang-Ho, L., Furuya, K., Kikuchi, T., Someya, T., Oikawa, C., Iida,

- Y., Matsushita, H., Kinouchi, T., Manabe, Y., and Ohnishi, Y.: Formation of hazardous substances during diesel combustion process and their mutagenicity. Atmospheric Environ., in press (1985).
- 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) Howard, P. C., Heflich, R. H., Evans, F. E., and Beland, F. A.: Formation of DNA adducts *in vitro* and in *Salmonella typhimurium* upon metabolic reduction of the environmental mutagen 1-nitropyrene. Cancer Res., 43: 2052-2058 (1983).
- 8) Kinouchi, T., Manabe, Y., Wakisaka, K., and Ohnishi, Y.: Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria. Microbiol. Immunol., 26: 993-1005 (1982).
- 9) Kinouchi, T., Morotomi, M., Mutai, M., Fifer, E. K., Beland, F. A., and Ohnishi, Y.: Metabolism of 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats. Cancer Res., to be submitted (1985).
- 10) Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. Appl. Environ. Microbiol., 46: 596-604 (1983).
- 11) 木内武美, 大西克成: *Bacteroides fragilis* の nitroreductase について - 基質特異性及び DNA との結合作用 - 嫌気性菌感染症研究, 13: 148-153 (1983).
- 12) 木内武美, 大西克成: *Bacteroides fragilis* の nitroreductase による変異・癌原物質ニトロピレンの代謝活性化. 嫌気性菌感染症研究, 14: 112-116 (1984a).

- 13) 木内武美, 大西克成: ニトロピレンの腸管内嫌気性菌による代謝. 環境変異原研究, 6: 57-66 (1984b).
- 14) Löfroth, G., Hefner, E., Alfheim, I., and Møller, M.: Mutagenic activity in photocopies. Science, 209: 1037-1039 (1980).
- 15) Maeda, T., Izumi, K., Otsuka, H., Manabe, Y., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: Induction of squamous cell carcinoma in the lung of rats by 1,6-dinitropyrene. J. Natl. Cancer Inst., submitted (1985).
- 16) Manabe, Y., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: Identification and quantification of highly mutagenic nitroacetoxypyrenes and nitrohydroxypyrenes in diesel exhaust particles. Mutation Res., in press (1985).
- 17) 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: 669-681 (1984).
- 18) McCann, J., Spingarn, N. E., Kabori, J., and Ames, B. N.: Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72: 979-983 (1975).
- 19) 大西克成: 変異原と生物影響. 自動車エンジンの排気浄化, 326-332 (1980).
- 20) 大西克成: 変異原性物質と腸内菌叢. ヘルシスト, 9 (50): 113-117 (1985a).
- 21) 大西克成: ニトロピレン. 医科学大事典 1985 年版補遺 2 「医科学の進歩 1985」印刷中 (1985b).
- 22) Ohnishi, Y., Kachi, K., Sato, K., Tahara, I., Takeyoshi, H., and Tokiwa, H.: Detection of mutagenic activity in automobile exhaust. Mutation Res., 77: 229-240 (1980).

ヘテロサイクリックアミンの変異原性

国立がんセンター研究所発癌抑制研究室 長 尾 美奈子

1 緒言

変異原・癌原物質としてのヘテロサイクリックアミンの研究は、焼魚および焼肉に変異原性の発見から出発して、先ず1976年“Origin of Human Cancer”というテーマで行なわれた Cold Spring Harbor Symposium で発表された (Sugimura ら, 1976)。McCann ら (1975) により TA100 および TA98 のテスト株が開発され、癌原物質検出のための Ames らの assay 法が確立されてから (Ames ら, 1975; Sugimura と Nagao, 1980), 食品の粗抽出液に応用されたのはじめての例である。

魚や肉の構成成分のうち蛋白質やアミノ酸を加熱分解すると、TA98に+S9 mix で強い変異原性が生ずることがわかり、アミノ酸や蛋白質の加熱

分解物中から変異原物質が精製され構造決定された。表-1 に示すようにそれらはすべてヘテロサイクリックアミンであった。これら多数の変異原物質の構造決定が行われたことを振り返ってみると、Ames 法が簡単で、再現性のある優れた方法であると同時に、構造決定に関する機器の進歩および分析、合成技術の進展を痛感せずにはおれない。

食品中に存在する強い変異原に、はたして癌原性があるか、人体に対してどのような影響を与えるかは、きわめて重要な問題であり、国の内外で精力的に研究が進められ、現在も尚、新しい変異原物質が焼肉などから精製されている (Felton et al, 1984)。

表-1 加熱分解物より得られた変異原物質

Chemical name	Abbreviation	Structure	Source of isolation
3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	Trp-P-1		Tryptophan pyrolysate
3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	Trp-P-2		Tryptophan pyrolysate
2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole	Glu-P-1		Glutamic acid pyrolysate
2-Aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole	Glu-P-2		Glutamic acid pyrolysate
3,4-Cyclopentenopyrido[3,2-a]carbazole	Lys-P-1		Lysine pyrolysate
4-Amino-6-methyl-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranthene	Orn-P-1		Ornithine pyrolysate

- 23)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).
- 24)大西克成, 木内武美: 環境中におけるニトロピレンの存在およびその代謝. 代謝, **22**: 臨時増刊号「癌'85」印刷中 (1985).
- 25)大西克成, 木内武美, 真鍋芳樹, 筒井英士: ニトロアレーンの重要性. 環境変異原研究, **6**: 29-37 (1984).
- 26)Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., Tsutsui, H., Otsuka, H., Tokiwa, H., and Otofujii, T.: Nitro compounds in environmental mixtures and food. Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV (edited by M.D. waters et al.), Plenum Publishing Corp., New York, 195-204 (1985).
- 27)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 Corp., New York, 527-539 (1983).
- 28)大西克成, 木内武美, 真鍋芳樹, 脇坂和見, 田原功, 秋本茂: 給油所排水中の1-ニトロピレン. 環境変異原研究, **5**: 54-58 (1983).
- 29)大西克成, 木内武美, 脇坂和見: 腸管内細菌による1-nitropyrene の変異原性の低下. 環境変異原研究, **3**: 41-44 (1981).
- 30)Ohnishi, Y., Okazaki, H., Wakisaka, K., Kinouchi, T., Kikuchi, T., and Furuya, K.: Mutagenicity of particulates in small engine exhaust. Mutation Res., **103**: 251-256 (1982).
- 31)大西克成, 常盤寛: 自動車排出ガスの変異原性. 変異原と毒性, **2**(3): 4-16 (1979).
- 32)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).
- 33)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).
- 34)Tokiwa, H., Nakagawa, R., and Ohnishi, Y.: Mutagenic assay of aromatic nitro compounds with *Salmonella typhimurium*. Mutation Res., **91**: 321-325 (1981).
- 35)Tokiwa, H., Otofujii, T., Horikawa, K., Kitamori, S., Otsuka, H., Manabe, Y., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: 1,6-Dinitropyrene: mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and carcinogenicity in BALB/c mice. J. Natl. Cancer Inst., **73**: 1359-1363 (1984).

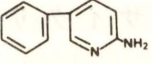
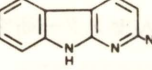
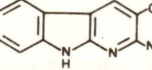
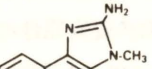
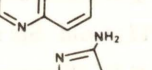
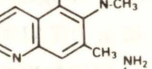
2-Amino-5-phenyl-pyridine	Phe-P-1		Phenylalanine pyrolysate
2-Amino-9H-pyrido-[2,3-b]indole	AαC		Soybean globulin pyrolysate
2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole	MeAαC		Soybean globulin pyrolysate
2-Amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline	IQ		Broiled sardine
2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoline	MeIQ		Broiled sardine
2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline	MeIQx		Fried beef

表-2 加熱分解物より得られた変異原および典型的な発癌物質の変異活性

	Mutagenic activity (revertants/μg)	
	TA98	TA100
Pyrolysis product		
MeIQ	661,000	30,000
IQ	433,000	7,000
MeIQx	145,000	14,000
Trp-P-2	104,200	1,800
Orn-P-1 ^a	56,800	-
Glu-P-1	49,000	3,200
Trp-P-1	39,000	1,700
Glu-p-2	1,900	1,200
AαC	300	20
MeAαC	200	120
Lys-P-1	86	99
Phe-P-1	41	23
Typical carcinogen		
AF-2	6,500	42,000
AFB ₁	6,000	28,000
4NQO	970	9,900
B[a]P	320	660
DEN	0.02	0.15
DMN	0.00	0.23

変異活性は至適量のS9を用いた。

a: S9 150 μl/plate

2 バクテリアにおける変異原性

ヘテロサイクリックアミンは典型的な変異原・癌原物質と比較してみても極めて強い変異原性を示すことが表-2から容易にわかる。いずれもS9 mixを必要とする。サルモネラ菌TA98に対して比活性の比較的弱い Glu-P-2, AαC, Lys-P-1 および Phe-P-1 をのぞいては、すべて塩基置換型のTA100に対する変異原性の10倍以上の活性をフレームシフト型のTA98に示す。

IQについて変異活性におよぼす pKM101の効果を調べたところ、TA98と isogenic であるが、pKM101を持たない TA1538では約80%の活性を示すが、TA100の pKM101を持たない株 TA1535では変異原性は全く認められなかった。大腸菌 WP2 *uvrA* pKM101 (トリプトファン要求性の塩基置換型) はサルモネラ菌 TA100に比べて約1/5の感受性しか示さなかったが、pKM101プラスミドを入れてない株でも pKM101を持つ株の約半分の活性を示した。サルモネラ菌 TA1535株は、誤りがち修復能を全く欠いた変異株であるのに対し、大腸菌の WP2 株は、誤りがち修復能を持つため、このような差が現れたものと考えられる。

大腸菌の溶原ファージ入の誘導能を Moreau らのインダクテストⅢ(1977)で調べたところ Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, MeAαC, AαC, IQ および MeIQ に+S9mixで活性が認められた(Nagao et al, 1983)。

3 構造と変異活性との相関

ヘテロサイクリックアミンの主なもの、α, βおよびγ-カルボリン、ジピリドイミダゾール、イミダゾキノリンおよびイミダゾキノキサリン類に1級アミンがついたものである。これらの基本構造にメチル基が1~3コついた誘導体を得られている。種々の誘導体が東大薬学の首藤教授や国立がんセンター葛西研究員らにより合成され、それらの変異活性を調べたところ、メチル基の有無および位置の変異活性におよぼす影響がきわめて

表-3 3-アミノ-γ-カルボリンのアルキル誘導体の変異活性

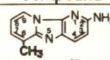
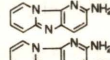
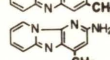
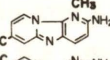
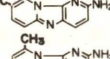
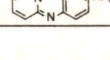

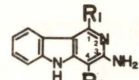
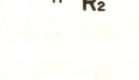
S. typhimurium TA98		
Compound		Revertants/n mole
 Glu-P-1 (6-Me-Glu-P-2)		3,680
 Glu-P-2		189
 3-Me-Glu-P-2		1.4
 4-Me-Glu-P-2		2,550
 7-Me-Glu-P-2		538
 8-Me-Glu-P-2		715
 9-Me-Glu-P-2		267

表-4 2-アミノジピリドイミダゾールのメチル異性体の変異活性

S. typhimurium TA98			
Substitution		Revertants/nmol	
R ₁	R ₂		
CH ₃	H	Trp-P-2	26,800
H	H		19,200
C ₂ H ₅	H		3,840
C ₃ H ₇	H		3,040
	H		224
	H		32
CH ₃	CH ₃	Trp-P-1	10,200
CH ₃	C ₂ H ₅		2,390
H	CH ₃		1,050
H	C ₂ H ₅		214

大きいことがわかった。表-3に3-アミノ-γ-カルボリンのアルキル誘導体の変異活性を示す(Nagao ら, 1980)。表-4に2-アミノジピリドイミダゾール (Glu-P-2) のメチル異性体の変異活性を示す。6位にメチル基のある Glu-P-1 に比べてメチル基のない Glu-P-2 の変異活性は著しく弱い。また、3位にメチル基を導入したもので、Glu-P-2 の1/100以下に減少する(Takeda ら, 1980)。

表-5に示すようにIQの誘導体では、1位または3位にメチル基があることが変異活性発現のためにきわめて重要で、いずれにもメチル基のないものの変異活性は1/1000以下になる。4位のメチル基はわずかながら活性を上昇させ、5位のメチル基は低下させる傾向がある(Nagaoら, 1981)。

MeIQxのメチル異性体やメチル基がさらに1コ導入された誘導体の変異原性を表-6に示す。MeIQxは表-1に示したように焼肉から単離構造決定されたものであるが、その前駆体の研究を行なっているうちに、クレアチニン、グルコースおよびアミノ酸の加熱生成物より7,8-DiMeIQxおよび4,8-DiMeIQxが変異原として単離構造決定された。現在得られているMeIQxおよびDiMeIQxでメチル基の位置の異なる異性体では、各々ほぼ同じ変異活性を示した。各々MeIQの1/4および1/3の活性を示した(Negishiら, 1984; Negishiら, 1985; Kasaiら, 1981)。

次にアミノピリドインドール誘導体において、ピリジン環のNの位置の効果を比較検討してみた。いずれもピリジン環のNに隣接した位置にアミノ基を持つもので、メチル基を1つ持つものおよびメチル基を持たないもので比較すると表-7に示すように、 α 、 β および γ -カルボリンで変異原性が著しく異なることがわかる。この様に活性に著しい差が現われる理由については、現在わかっていない。

4 トランスアセチラーゼ欠損株に対する変異原性

ヘテロサイクリックアミンの代謝活性化にはチトクロームP448が関与していることがわかってきている(Mitaら, 1981)。Trp-P-2のN-OH体の活性化にはラット肝ではプロリン-tRNA合成酵素が関与しているので、N-O-Proryl-Trp-P-2が最終活性体であることが示唆されている(Yamazoeら, 1985)。トランスアセチラーゼ

表-5 2-アミノイミダゾキノリンのメチル誘導体の変異活性

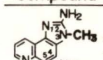
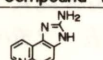
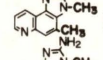
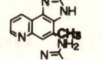
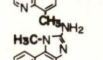
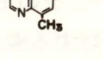
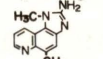
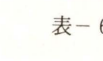
S.typhimurium TA98			
Compound	Revertants/nmole	Compound	Revertants/nmole
 IQ	85,700		55
 MeIQ	140,000		79
	30,100		6
	159,000		
	98,100		

表-6 MeIQxのメチル誘導体の変異活性

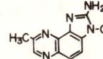
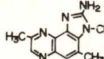
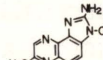
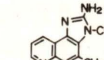
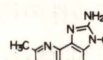
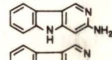
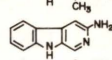
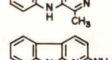
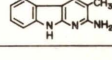
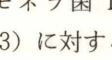
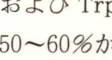
S.typhimurium TA98			
Compound	Revertants/nmol	Compound	Revertants/nmol
 MeIQx	31,000	 4,8-DiMeIQx	42,000
	31,000	 MeIQ	140,000
	37,000		

表-7 アミノ- α 、 β 、 γ -カルボリン化合物の変異活性

Carboline	Structure	TA98, +S9 mix Mutagenicity (revertants/nmol)
γ -Carboline		19,200
3-Amino- γ -carboline		1,050
β -Carboline		0.1
3-Aminonorharman		0
α -Carboline		55
AαC		39
MeAαC		

に欠損のあるサルモネラ菌 TA98/1,8-DNP6 (McCoy et al, 1983) に対する変異原性を調べたところ、Trp-P-1 および Trp-P-2 では TA98 に対する変異原性の50~60%がみとめられたが、Glu-P-1, IQ, MeIQx の変異原性は、TA98/1,8-DNP6 では全く認められなかった。すなわち、Glu-P-1, IQ, MeIQx では最終活性型はアセチ

ルエステルであることが示唆された(Nagaoら, 1983)。

5 動物培養細胞に対する作用

チャイニーズハムスター肺培養細胞を用いて、ジフテリア毒素に対する抵抗性変異をマーカーに用いて活性を調べた。表-8に示す様に調べたものにはいずれも変異活性がみとめられた。この変異は蛋白合成の際に必要なEF-2因子に関連した遺伝子におこったものをみているのであるが、標的遺伝子は未だ明らかでない(Nakayasuら, 1983)。

シリアンゴールデンハムスター胎児細胞の primary culture で Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 にトランスホーミング活性がみとめられている(Takayamaら, 1979, 1977)。IQはBalb 3T3細胞クローンA31-1-1をトランスホームする活性を示した(Cortesi and Dolara, 1983)。

染色体異常、姉妹染色分体交換活性、小核試験等試みられている。

表-8 ヘテロサイクリックアミンのCHL細胞に対するジフテリア毒素抵抗性変異発能

Chemical	DT ^r cells/μg ^a
IQ	40
MeIQ	38
MeIQx	5.7
Glu-P-1	1.2
Glu-P-2	0.3
Trp-P-1	33
Trp-P-2	160
AαC	20

S 9 mix 存在下に、10⁶細胞をケミカルで3h処理した。同じ条件でベンゾ[a]ピレンおよびジメチルニトロサミンは90および40であった。

6 昆虫の突然変異

ショウジョウバエ翅毛スポットテストではTrp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, AαC, MeAαC, IQ, MeIQ および MeIQx に遺伝子変異および体細胞組換えが誘発された(Yooら, 1985)。Yooらはその遺伝子変異活性の強さは動物に対する発癌性の強さに、サルモネラ菌 TA98より相

関性があると述べている。

7 おわりに

ヘテロサイクリックアミンの、主に微生物に対する変異原性について述べたが、Trp-P-1, Trp-P-2については、IARC出版のオレンジブック vol. 31に遺漏なくデータが報告されているので参考にされたい。またその他のヘテロサイクリックアミンについても現在編纂中であり、間もなく出版されることであろう。

ヘテロサイクリックアミン類は、後に高山らが述べるように、マウスおよびラットの種々の臓器に腫瘍を誘発する。IQで誘発された肝癌5例について、どのようながん遺伝子が活性化されているかを調べたところ、1例ではHa-rasが(Ishikawaraら, 1985a), 1例ではraf(Ishikawaraら, 1985b)が活性化されていた。どのようなDNA変化によりこれらががん遺伝子が活性化されているかについては、まだ解析が済んでいない。しかし少なくともHa-rasの活性化には、これまでの多くのデータから考えて塩基置換が起っているものと考えられる。

またGlu-P-2で誘発された小腸および大腸がんのがん遺伝子を調べたところ、1例でN-rasが活性化されていた。N-rasの活性化にも塩基置換型の変異が関与していると考えられる。IQで誘発された肝がんでは、ras, raf, new 以外の未同定のがん遺伝子が少なくとも1つ活性化されている。ヘテロサイクリックアミンによる変異誘発には、error prone repair が関与しているであろうし、また、人がんの原因物質たり得ることから考えて、どのようながん遺伝子に作用し、どのようなDNA変化で活性化されるのかを明らかにすることは、今後の課題として重要であり、また大変興味深い問題である。

環境中には未だ、サルモネラ菌など一次スクリーニングに用いられている系では変異原性は弱い、その割に発癌性の強い物質の存在の可能性もある。

それらをどのように検出していくかは今後に残された重要な問題である。

文 献

- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella / mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31: 347—364 (1975).
- Cortesi, E. and Dolara, P.: Neoplastic transformation of BALB3T3 mouse embryo fibroblasts by the beef extract mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline. *Cancer Lett.*, 20: 43—47 (1983).
- 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 ground beef, *Carcinogenesis*, 5: 95—102 (1984).
- Ishikawa, F., Takaku, F., Nagao, M., Ochiai, M., Hayashi, K., Takayama, S. and Sugimura, T.: Activated oncogenes in a rat hepatocellular carcinoma induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline. *Jpn. J. Cancer Res.*, (Gann), 76: 425—428 (1985a).
- Ishikawa, F., Takaku, F., Ochiai, M., Hayashi, K., Hirohashi, S., Terada, M., Takayama, S., Nagao, M. and Sugimura, T.: Activated *c-ras* gene in a rat hepatocellular carcinoma induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1985b) in press.
- 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).
- McCann, J., Spingarn, N. E., Kabori, J. and Ames, B.: Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial strains with R factor plasmids, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72: 978—983 (1975).
- 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).
- Mita, S., Yamazoe, Y., Kamataki, T. and Kato, R.: Metabolic activation of a tryptophan pyrolysis product, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2) by isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett.*, 14: 261—266 (1981).
- Moreau, P., Baline, A. and Devoret, R. Pro-phage λ induction in *Escherichia coli* K12 *envA uvrB*: A highly sensitive test for potential carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 73: 3700—3704 (1976).
- 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).
- 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. *Mutation Res.*, 118: 91—102 (1983).
- Nagao, M., Sato, S. and Sugimura, T.: Mutagens produced by heating food, in "The Maillard Reaction in Foods and Nutrition" American Chemical Society, pp. 521—536 (1983).
- Nagao, M., Takahashi, Y., Yahagi, T., Sugimura, T., Takeda, K., Shudo, K. and Okamoto, T.: Mutagenicity of *r*-carboline derivatives related to potent mutagens found in tryptophan pyrolysates. *Carcinogenesis*, 1: 451—454 (1980).
- 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*]quinoxaline, isolated from broiled sardine. *Carcinogenesis*, 2: 1147—1149 (1981).
- 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, Selected Abstracts of Papers presented at the 13th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, 12—13 October, 1984, Tokyo (Japan), *Mutation Res.*, in press.
- Sugimura, T. and Nagao, M.: Modification of mutagenic activity in "Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection". Plenum Press. vol. 6. 41—60 (1980).
- Sugimura, T., Nagao, M., Kawachi, T., Honda, M., Yahagi, T., Seino, Y., Sato, S., Matsukura, N., Matsushima, T., Shirai, A., Sawamura, M. and Matsumoto, H.: Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods in "Origins of Human Cancer". Cold Spring Laboratory, pp. 1561—1577 (1977).
- Takayama, S., Hirakawa, T., Tanaka, M., Kawachi, T. and Sugimura, T.: *In vitro* transformation of hamster embryo cells with a glutamic acid pyrolysis product. *Toxicol. Lett.* 4: 281—284 (1979).
- Takayama, S., Katoh, Y., Tanaka, M., Nagao, M., Wakabayashi, K. and Sugimura, T.: *In vitro* transformation of hamster embryo cells with tryptophan pyrolysis products. *Proc. Jpn. Acad.*, 53B: 126—129 (1977).
- Takeda, K., Shudo, K., Okamoto, T., Nagao, M., Wakabayashi, K. and Sugimura, T.: Effect of methyl substitution on mutagenicity of 2-aminodipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole, Glu-P-2. *Carcinogenesis*, 1: 889—892 (1980).
- Yamazoe, Y., Shimada, M., Shinohara, A., Saito, K., Kamataki, T. and Kato, R.: Catalysis of covalent binding of 3-hydroxy-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole to DNA by a L-proline and adenosine triphosphate-dependent enzyme in rat hepatic cytosol. *Cancer Res.*, 45: 2495—2500 (1985).
- Yoo, M.A., Ryo, H., Tada, T., and Kondo, S.: Mutagenic potency of heterocyclic amines in the *Drosophila* wing spot test and its correlation to carcinogenic potency. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 76: 468—473 (1985).

人排せつ物中の変異原と食事との関係

岡山大学薬学部 早 津 彦 哉

1. はじめに

人間の排せつ物, すなわち, 糞便ならびに尿の変異原物質については, 最近研究が盛んである(Uenitt, 1982; 根岸と早津, 1983)。糞便については, 腸管内の変異原物質が大腸がんの原因物質であるという可能性が考えられ, 研究が行なわれている。最近fecapentaenes という物質がサルモネラ菌TA 100 に対して代謝性化なしに強い変異原性を示す物質として人間の糞便から単離された(Hirai ら, 1982; Gupta ら, 1983)。このfecapentaenesは腸内細菌の産生する物質であるが, 多勢の人々について fecapentaenes の糞便中含量を調べた結果, 大腸がんとの関連性はみつからなかった(Baptista ら, 1984)。さらに大腸がんの原因は食物にあるのではないかと考えられているけれども(Committee on Diet, Nutrition and Cancer, National Research Council, 1982), 特定の食べ物を糞便中の変異原物質の原因として明らかにした報告はなく, ただ菜食主義者の糞便中の変異原性が非菜食主義者のそれに比べて統計的に低いという研究が報告されているだけである(Kuhnlein ら, 1981)。

一方, 尿については, 喫煙者の尿の変異原性が高いことはよく知られているが(Yamasaki と Ames, 1977; Kobayashi と Hayatsu, 1984), 食べ物と尿中変異との関係についてはわずかにBaker らの報告, すなわち飢餓状態においた1人の人間が焼いたベーコンあるいは焼いた豚肉を食べることによって尿中の変異原性が上昇するという報告があるのみである(Baker ら, 1982)。

肉を焼くと変異原物質が生じ, その際強い変異原物質2種類が生ずることが明らかにされてきている(Kasai ら, 1981a; Spingarn ら, 1980; Sugimura ら, 1981; Sugimura と Sato, 1983; Fel-

ton ら, 1984; Hargraves と Pariza, 1983; Hayatsu ら, 1983 a)。すなわち, 主要なものとしてMeIQx (2-amino-3, 8-di methylimidazo [4, 5-f] quinoxaline) (Kasai ら, 1981 a)ならびにIQ (2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline) (Kasai ら, 1981 b) の2種類が分離同定されている。これらの強い変異原物質を含有している焼いた肉を摂取すれば, 排せつ物中の変異原性がこれらに由来して上昇するものと期待される。われわれは, 最近, ブルーコットン (Hayatsu ら, 1983 b) およびcarboxy methyl celluloseカラムクロマトグラフィーを組合せた方法により, 焼肉中のこれら変異原物質を簡単に分離定量する方法を確立した (Hayatsu ら, 1983 a)。今回この方法を用いて人排せつ物, 人糞便ならびに尿中の変異原性を調べたところ焼いた牛挽肉を摂取することによってこれら変異原性が上昇することがわかった。また, この変異原物質はいずれも焼肉中の主要変異原であるMeIQx は高速液体クロマトグラフィーでの溶出位置が異なっているので, 代謝によって変化を受けた物質であるということも明らかになった (Hayatsu ら, 1985 a; Hayatsu ら, 1985 b)。

2. 実験方法

(1) 糞便からの変異原の抽出

新鮮な糞便 100g~200g を水 350ml と混ぜ, ブレンダーの中で5分間ホモジナイズした。この後にこれを遠心分離 (9000回転, 20°C, 30分) を行った。傾斜して得られるスラリーをブルーコットン処理した。ブルーコットンは, 1g 次いで0.5g を用い各30分間振りまぜた。ブルーコットンを集め, 水で洗い次いでメタノール-アンモニア (50:1, 130 ml × 2) で溶出を行なった。溶

出液を減圧下で濃縮乾固し、残渣を dimethylsulfoxide (0.6 ml) に溶かし水 50 ml と混ぜた。この溶液に対し再びブルーコットン 0.1 g × 2 で変異原物質を吸着した。ブルーコットンをメタノール・アンモニア混液 (30 ml × 2) で抽出し、抽出液を蒸発した後に、残留物を carboxymethyl-cellulose カラムクロマトグラフィーにかけた。

(2) 尿からの変異原物質の抽出

尿 1 l 当りにしてブルーコットンを 3 g 用いて抽出を行なった。ブルーコットンは 2 g 及び 1 g の 2 回に分けて操作をした。ブルーコットンから吸着物質をメタノール・アンモニア混液により溶出し、ブルーコットン再吸着操作を糞便の場合と同様に行なった。再吸着には、1 l 当り 0.2 g のブルーコットンを 2 回用いて行なった。こうして得られたブルーコットン吸着物を carboxymethyl cellulose カラムクロマトグラフィーにかけた。

このカラムクロマトグラフィーについての詳細は原報にあるが (Hayatsu ら, 1983 a) 簡単に述べると、先ずうすい酸溶液 pH 3 によって溶出を行ない次いで水で洗い、さらに 50% メタノールで溶出した。最後に 50% メタノール・アンモニア混液 pH 11 で溶出を行なった。各フラクションは 3 ml ずつ集め、エイムステストをサルモネラ菌 TA 98+S 9 で行なった。この論文では、バックグラウンドのリバタント数すなわち、ノプレート当り 28 ± 5 の値を観察されたリバタント数から引いた値を記載した。

(3) 牛肉ハンバーガーの調製と変異原物質の抽出

牛の挽肉 (1 kg) を細切した玉ねぎ (330 g)、卵 1 コ (50 g)、パン粉 (30 g)、塩 (5 g) と混ぜ少量のコショウとナツメグを加えて味付をしたものを用意した。これをよく混ぜハンバーガーを 20 個作製した。それぞれが約 1 cm の厚みにした。そしてこれらのハンバーガーを鉄のフライパンでガスレンジの上で焼いた。サーモカップルにより加熱の温度を調べた。ハンバーガーの加熱に当たっては、1 分間ごとにひっくり返り、8 分間かけて

ウェルダンの状態になるよう調理した。フライパンと肉との接触点返くの温度は最初の 5 分間で 80~90° であった。また、次の 3 分間では 90~110° であった。生のハンバーガーが 65 g であったものがこの調理の後には 39 g になった。このハンバーガーを食事に供した。また、このハンバーガーから変異原を既報に従って抽出した (Hayatsu ら, 1983 a)。

3. 結果と考察

(1) 糞便中の変異原物質

健康な日本婦人 (A と名付ける: 45 才) が加熱

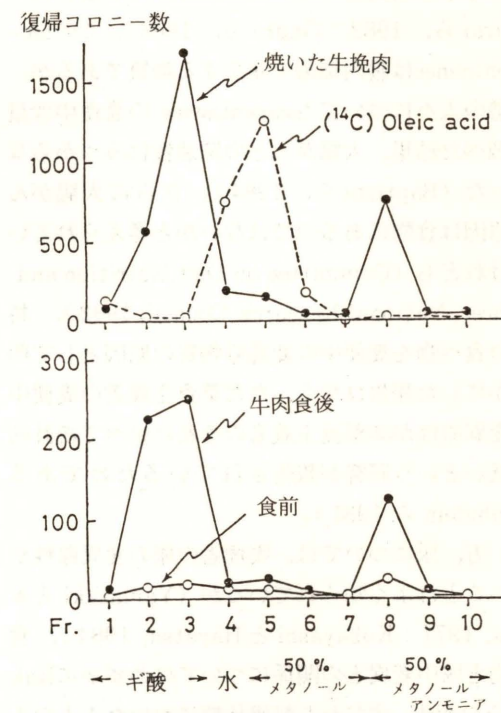


図1 焼いた牛肉を摂取した後の糞便中の変異原物質 (下図), および焼肉中の変異原物質 (上図)。カルボキシメチルセルロースカラムクロマトグラフィーによる分離。オレイン酸は標品サンプルについて行なった結果を示してある。変異原性はサルモネラ菌 TA 98, +S 9 で検出した。

した肉や魚を含まない食事を 3 日間摂取した。第 4 日目の夕食に生肉 150 g に当る牛挽肉ハンバーガーを食べた。その後、第 8 日目まで再び調理タンパク欠損食を摂取した。第 3 日目から第 8 日目までの全糞便を集め、それぞれ分析した。図 1 には、牛肉食の摂取前および摂取後の糞便からの抽出物を carboxymethyl cellulose カラムによって分画した結果を示してある。フラクション 2, および 3 が食前には変異原活性がなかったのに対し、食後の便では変異原活性が非常に高くなっていることがわかる。また、牛ハンバーガーからの抽出物をこのカラムにかけると、フラクション「2, 3」にその変異原の主要部分があらわれており、それは MeIQx によるものであるということがすでにわかっている (Hayatsu ら, 1983 a)。

変異原活性の妨害物質であるオレイン酸 (Ha-

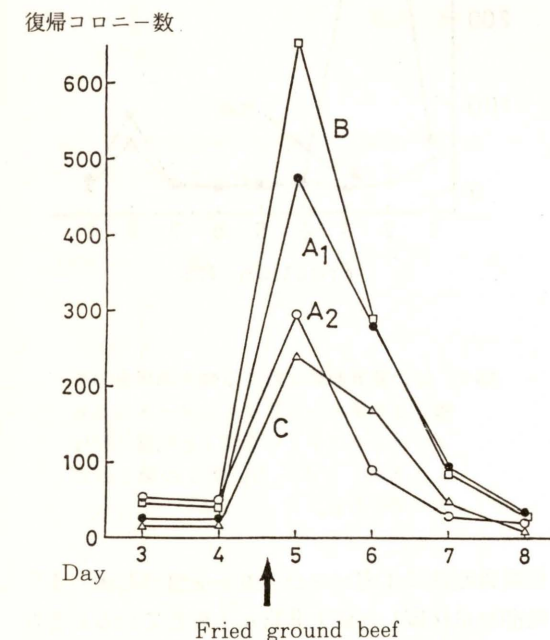


図2 糞便中の変異原性に対する焼牛肉摂取の影響。経時変化を示してある。A, 日本女性; B, 日本男性; C, アメリカ白人男性。

yatsu ら, 1985 a) はこのカラムクロマトグラフィーでフラクション 4 にあらわれており、変異原物質から分離されていることがわかる。

図 2 の曲線 A₁ はこのフラクション「2, 3」の経時変化を示したものである。第 3 日および第 4 日の糞便の変異原性のレベルはほとんどゼロであるが、第 5 日目および第 6 日目で高くなっていることが観察される。そして、徐々に下っていき、第 8 日目において、元の低いレベルにまでもどることが明らかである。この結果は同一の人に対してよい再現性があることがわかった。(曲線 A₂) 他の 2 人の人間に対して行なった実験からほぼ同様の結果が得られた (曲線 B, C)。B は日本人男性 49 才であり、C はアメリカ白人男性、55 才である。フラクション 8 は IQ に対するフラクションであるがこれも牛肉ハンバーガー摂取によって上昇がみられた。しかしながら、この上昇はフラクション「2, 3」に対してさほど大きくなかった。

この変異原物質について、本体を調べるために糞便サンプルを多数、A および B のドナーから集めた。そしてそれぞれの糞便サンプルから、フラクション「2, 3」を調製した。こうして得られたフラクション「2, 3」を集めたものについて、まず、その変異原性の性質について調べた。すなわち、サルモネラ菌 TA 98 および TA 100 で S 9 存在および非存在下での変異原活性を調べた。フラクション「2, 3」は TA 98+S 9 の条件でのみ活性を示した。TA 98, -S 9 あるいは TA 100, +もしくは -S 9 ではいずれも変異原活性は認められなかった。フラクション「2, 3」を高速液体クロマトグラフィーにかけて分析を行なった。逆層のカラムを用いたものである。図 3 に示すように、変異原活性を示すフラクションは MeIQx の標品とは一致しなかった。少なくとも 2 つの変異原活性物質が含まれていることがわかる。すなわち MeIQx よりも早く溶出するフラクション (おそらくは、MeIQx よりも極性の高い物質) ならびに他の 1 つのフラクション、すなわち 100% メタノール

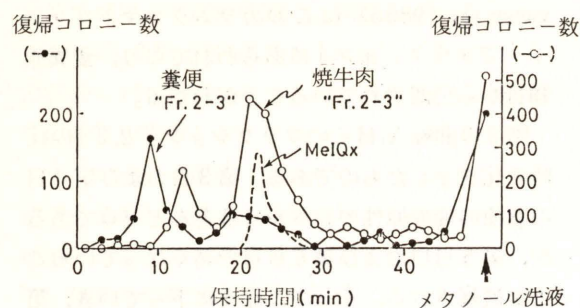


図3 焼牛肉摂食により糞便中に現れた変異原の高速液体クロマトグラフィーによる分画。カラムは、Nucleosil C₁₈, 溶出液は、10 mM, ammonium formate, pH 6.45, 33% メタノール液で洗浄した。溶出速度は、1 ml/min である。

洗液中に溶出してくる、おそらくはMeIQxよりも脂溶性の化合物である。摂取した牛肉ハンバーガーそのものを分析すると、活性の約50%がMeIQxに対応するピークを与え、そして一部分MeIQxよりも早く溶出する位置に変異原活性があることがわかる。しかしながら、これは糞から得られた変異原物質とは一致しなかった。この糞便から得られた変異原物質の本体についてはさらに研究が必要である。

摂取した焼肉中の変異原活性と糞便から回収された変異原活性との比較をしてみると、次のことがわかる。すなわち曲線A₁の実験では、摂取した変異原物質の活性が17,070のリバート数に当るが、回収された変異原活性は856すなわち5.5%であった。また曲線A₂の場合には、摂取した変異原活性が7028 His⁺ 復帰コロニー数に当るのに対し、回収した変異原性は413すなわち5.9%の回収率であった。

(2) 牛肉ハンバーガーの摂取による尿中変異原性の上昇

尿の実験は3名の日本人成人について行なった。D (男, 50才), E (女, 46才) および F (男, 35才) の3名はいずれも非喫煙者である。これら

の人達に2日間にわたり、加熱タンパクを含まない食事をとってもらったのち、130 g 生肉にあたる牛肉ハンバーガーを摂取してもらい、次いで自然排尿した尿中の変異原性の時間経過を追った。各全尿を集め、各々につき変異原活性を調べた。食事は、一度牛肉食をとったのちは再び調理タンパク欠損食に戻した以外何の制約も加えていない。図4に示すように、牛肉ハンバーガーを食べる前のフラクション「2,3」は、糞便の場合と同様、ほとんど変異原性はなかった。このフラクション

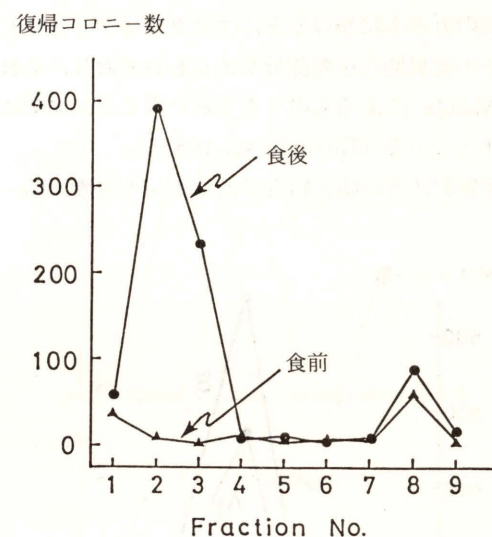


図4 尿の変異原性に対する焼牛肉摂食の影響。カルボキシメチルセルロースカラムクロマトグラフィーを図1と同様に行なったもの。ドナーD, 図5の第2点のデータである。

の変異原性は牛肉ハンバーガーを食べた後、1.5時間後に採取した尿で非常に上昇していることが観察される。図5には、尿提供者、DとFが昼食に牛肉ハンバーガーを摂取した時の変異原性の時間的経過を示している。また、図6はDとEが牛肉ハンバーガーを夕食に食べた後の時間経過を示している。図5と6の各データの点は、尿採取

したその時まで前採取時から膀胱内にたまった変異原性を表わしていると考えてよい。これらの図からわかるように、この変異原性は牛肉ハンバーガー摂取により急速に上昇し、次いで徐々に下降していくが、12時間後には、ほとんど元の低いレベルに戻る事がわかる。たとえば図5では

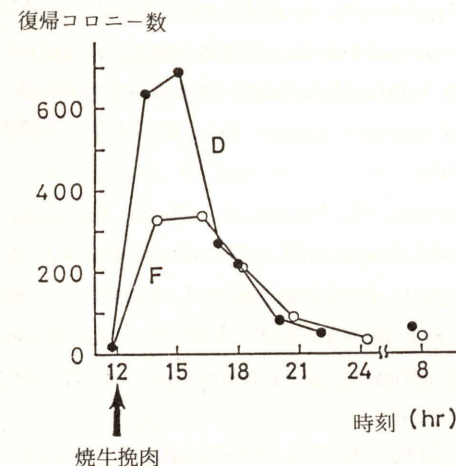


図5 尿変異原性の経時変化。昼食に焼牛肉を摂取した場合。

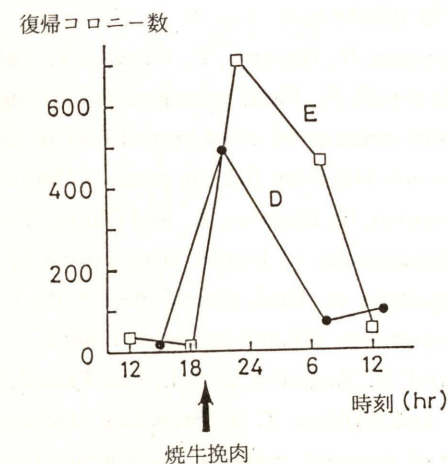


図6 尿変異原性の経時変化。夕食に摂取した場合。

昼に焼肉を摂取しているが、深夜には低いレベルになっている。また、夕食に摂取した場合には、翌朝までにほとんど排せつが完了していることがわかる。これらの牛肉中の変異原性が尿中にどの位出てきているか、変異原活性の比較をしてみると、図5の曲線1では、摂取した量の28%, 曲線2では14%, また、図6の曲線1では8%, 図6の曲線2では15%に対応していた。ここで注目すべきことは、同一人についてそれぞれの実験で、変異原性の尿中排せつ率が変化していることである(図5の曲線1と図6の曲線1)。

一方、別の実験でドナーDとEからフラクション「2,3」を集めて、これを高速液体クロマトグラフィーにかけた。高速液体クロマトグラフィーは糞便の場合のものと同一の条件である。図7に示すように、主要な変異原性部分は、MeIQxの標準品よりも早く溶出する部分にあらわれることがわかった。MeIQx自身はほとんど存在していな

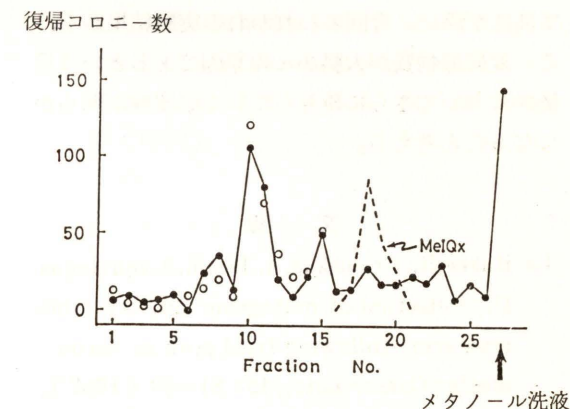


図7 焼牛肉摂取により尿中に現れた変異原物質の高速液体クロマトグラフィー。実験条件は図3と同様である。
● 尿からの変異原物質。
○ 尿変異原物質と標品MeIQxとの混合物(尿変異原とMeIQxが異なることを確認するための実験。この実験はまた、フラクション10-12に変異原物質が溶出することを再現している。)

いようにみえた。このMeIQx より前に溶出している物質が糞便の場合に認められた物質と同一であるかは今後の課題であるが、その溶出位置が非常に似ているのでおそらく同一のものと推定される。以上の結果から、通常の食事の間に牛肉ハンバーガーを食べると尿中の変異原性が顕著に増大することが明らかになった。

4. おわりに

糞便ならびに尿の変異原性は、牛肉ハンバーガー摂取によって顕著に増加することが明らかになった。興味あることは、その時間経過が糞便では比較的ゆるやかであり牛肉ハンバーガー摂取後3日目の糞便にもまだ有意に高い変異原性が認められるのに対し、尿では排せつが早く起り、12時間後には、ほぼ排せつが終了するようにみえることである。この事実は、牛肉ハンバーガー由来の変異原性の貯留時間が腸内においては膀胱内においてより長いのではないかということを示唆していて興味が深い。今回のわれわれの実験結果から、この変異原物質が大腸がんの原因であるという可能性についてさらに研究していく必要性が明らかになったと考える。

文 献

- 1) Baker, R., Arlauskas, A., Bonin, A. and Angus, D.: Detection of mutagenic activity in human urine following fried pork or bacon meals: *Cancer Lett.*, **16**: 81-89 (1982).
- 2) Committee on Diet, Nutrition and Cancer, National Research Council: Diet, Nutrition, and Cancer: National Academy press, Washington, D.C. (1982).
- 3) Felton, J. S., Knize M., Wood, C., Wuebbles, B., 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).

- 4) Gupta, I., Baptista, J., Bruce, W. R., Che, C. T., Furrer, R., Gingerich, J. S., Grey, A. A., Marai, L., Yates, P. and Irepinsky, J. I.: Structure of fecapentaenes, the mutagens of bacterial origin isolated from human feces: *Biochemistry*, **22**, 241-245(1983).
- 5) Hargraves, W. A. and pariza, M.W.: Purification and mass spectra characterization of bacterial mutagens from commercial beef extract: *Cancer Res.*, **43**, 1467-1472 (1983).
- 6) 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 (1983a).
- 7) 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 (1983b).
- 8) Hayatsu, H., Hayatsu, T., Wataya, Y. and Mower, H. F.: Fecal mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human: *Mutation Res.*, in press (1985a).
- 9) Hayatsu, H., Hayatsu, T. and Ohara, Y.: Mutagenicity of human urine caused by ingestion of fried ground beef: *jpn.j. Cancer Res. (Gann)*, in press (1985b).
- 10) Hirai, N., Kingston, D. G. I., Van Tassell, R. L. and Wilkins, T. D.: Structure elucidation of a potent mutagen from human feces: *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6149-6510(1982).
- 11) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, 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-3H-imidazo [4,5-f] quinoline: *J. Chem. Soc.*, 2290-2293 (1981b).

- 12) 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 (1981a).
- 13) Kobayashi, H. and Hayatsu, H.: A time-course study on the mutagenicity of smoker's urine: *Gann*, **75**, 489-493(1984).
- 14) Kuhnlein, U., Bergstrom, D. and Kuhnlein, H.: Mutagens in feces from vegetarians and non-vegetarians: *Mutation Res.*, **85**, 1-12(1981).
- 15) 根岸友恵と早津彦哉: 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」41-49 (1983).
- 16) Spingarn, N. E., Kasai, H., Vuol, L. L., Nishimura, S., Yamaizumi, Z., Sugimura, T., Matsushima, T. and Weisburger, J. H.:

Formation of mutagens in cooked foods. III. Isolation of a potent mutagen from beef: *Cancer Lett.*, **9**, 177-183(1980).

- 17) Sugimura, T., Nagao, M. and Wakabayashi, K.: Mutagenic heterocyclic amines in cooked food, in: H. Egan, L. Fishbein, M. Castegnaro, I.K. O'Neil, H. Bartsch and W. Davis(Eds.), *Environmental Carcinogens-Selected Methods of Analysis*(IARC Scientific publications No. 40, IARC, Lyon), 251-267 (1981).
- 18) Sugimura, T. and Sato, S.: Mutagens-carcinogens in foods: *Cancer Res.(Suppl.)*, **43**, 2415s-2421s (1983).
- 19) Venitt, S.: Mutagens in human feces. Are they relevant to cancer of the large bowel? : *Mutation Res.*, **98**, 265-286 (1982).
- 20) Yamasaki, E. and Ames, B.N.: Concentration of mutagens from urine by adsorption with non-polar resin XAD-2. Cigarette smokers have mutagenic urine.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3555-3559 (1977).

ヘテロサイクリックアミンの発がん実験

国立がんセンター研究所 高山 昭三・大垣比呂子・佐藤 茂秋

1. はじめに

各種のアミノ酸、蛋白質の加熱分解物や焼魚、加熱調理した牛肉などから、細菌に対する変異原性を指標として、種々のヘテロサイクリックアミンが分離、同定され、化学的に合成もされている^(2-4, 6, 10, 11, 17, 18)。加熱食品中から見出された変異原物質の動物での発がん性を調べることは、人が⁽¹⁾ん発生要因の約35%が食物に起因しているということからしても意義は大きい。現在までにトリプトファンの加熱分解物から3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1)と3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2)⁽¹⁰⁾が、グルタミン酸の加熱分解物から2-amino-6-methyldipyrido[1,2- α :3',2'-d]imidazole(Glu-P-1)と2-aminodipyrido[1,2- α :3',2'-d]imidazole(Glu-P-2)⁽¹⁷⁾が、大豆グロブリンの加熱分解物から2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole(MeA α C)と2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole(A α C)⁽¹⁸⁾、また焼いた丸干い⁽⁴⁾わしから2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ)⁽²⁾や2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline(MeIQ)⁽⁴⁾が、加熱調理した牛肉から2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline(MeIQx)⁽³⁾などが同定され、化学的に合成されている。ここでは化学的に合成されたヘテロサイクリックアミンを用い、ラット、マウスに経口投与した実験を中心に報告する。

2. 実験材料及び方法の概略

実験にはナード研究所(大阪)において合成されたTrp-P-1 acetate, Trp-P-2 acetate, MeA α C acetate, A α C acetate, IQ 及び MeIQ, 桂化学(東京)にて合成されたGlu-P-1-HCl と Glu-P-2-HCl を使用した。夫々の化合物は表1

に示すような濃度で基礎飼料(CE-2, CLEA 東京)にまぜ経口投与した。

動物はCDF₁マウス[(BALB/c AnN x DBA/2N)F₁, チャールスリバー, 厚木]及び同じくチャールスリバーより購入したF-344 ラットを使用した。マウスは生後6~7週から、ラットは8週目から実験飼料の経口投与を開始した。この実験に使用したラット、マウスの例数、投与したヘテロサイクリックアミンの用量及び各実験の実験期間は表1に示した。

3. マウスの発がん実験

(1) Trp-P-1 及び Trp-P-2 の成績⁽⁵⁾

表2に示したように、Trp-P-1, Trp-P-2を経口投与したマウスでは、肝腫瘍が高率に発生した。肝腫瘍は雌群に高頻度にとめられた。組織学的には肝細胞がんが大部分で、肺転移もみられた。また、Trp-P-2により誘発された肝細胞がんを同系マウスに移植したところ継代移植が可能であった。その他、肺、胸腺にも少数例の腫瘍が発生したが、対照群に比して差を認めなかった。

(2) Glu-P-1 及び Glu-P-2 の成績⁽⁹⁾

Glu-P-1 及び Glu-P-2 を投与したマウスには、肝腫瘍の他に肩甲骨間の皮下褐色脂肪組織由来の血管内皮腫が形成された。血管内皮腫の70~90%が肩甲骨間に発生し、胸腔、腹腔内、腋下などにも少数例にとめられた。肝腫瘍は肝細胞がん又は肝腺腫と形態学的に診断され、Trp-P-1, Trp-P-2 投与群と同様雌群に高頻度であった。

Glu-P-1 投与群と Glu-P-2 群の肝腫瘍発生までの期間を比較してみると、Glu-P-1 群が雌雄とも10~20週早かった。この事実は Glu-P-1 の発がん性は Glu-P-2 より強いことを示唆している。その他の臓器に発生した少数の腫瘍は対照

表1 実験に用いた化合物、濃度、実験期間の一覧表

	CDF ₁ マウス			F344 ラット		
化 合 物	動物数・性	濃 度	実験期間	動物数・性	濃 度	実験期間
Trp-P-1	40 ♂	200ppm	621	40 ♂	150ppm	341 } 717
	40 ♀			200ppm		
Trp-P-2	40 ♂			200ppm		
	40 ♀					
Glu-P-1	40 ♂	500ppm	402	42 ♂	500ppm	472 } 717
	40 ♀		475	42 ♀		
Glu-P-2	40 ♂		588	42 ♂		
	40 ♀		580	42 ♀		
A α C	40 ♂	800ppm	685	20 ♂	800ppm	-
	40 ♀		685	20 ♀		
MeAαC	40 ♂		516	20 ♂	500ppm	-
	40 ♀		588	20 ♀		
IQ	40 ♂	300ppm	675	40 ♂	300ppm	510
	40 ♀			40 ♀		

に比して有意な差をみとめなかった。

(3) MeAαC 及び AαC の成績

本実験群も Glu-P-1 及び Glu-P-2 投与群と同様に肝腫瘍と血管内皮腫の形成がみとめられた。肝腫瘍は、肝細胞がん又は肝腺腫で雌にやや高率にみとめられた。

MeAαC 投与群における血管内皮腫は、肩甲骨間皮下にみられたが、AαC 投与群では約40%が腹腔内に発生し、雄が有意に高かった。血管内皮腫の発生までの期間を MeAαC と AαC の両群について比較してみると、雌雄とも MeAαC 投与群の方が約20週早く、MeAαC の発がん性は AαC よりやや強いことが示唆された。

(4) IQ の成績

マウスに0.03%IQ 含有食を経口投与したところ、Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2,

MeAαC, AαC などを投与した群と同様肝細胞がんおよび肝腺腫がみとめられ、雌に高率であった。その他特徴的なことは前胃及び肺にも腫瘍がみとめられたことである。前胃の腫瘍は組織学的にはパピローマは扁平上皮がんと診断され、うち一例は肝や肺に転移を形成した。肺腫瘍は腺腫及び腺がんで、腺がん例は細気管支への浸潤発育していた。CDF₁ マウスの自然発生腫瘍は約10~20%であるので、本実験で誘発された肺腫瘍は IQ の投与によるものと考えられた。

(5) MeIQ の成績

MeIQ の実験は目下進行中である。IQ と同様に肝細胞がんの他に前胃の扁平上皮がんを83週までに剖検した38例中の21例にみとめ、うち10例は肝へ転移を形成した。又、この他肝腫瘍、小腸、大腸腫瘍も認められている。

表2 ヘテロサイクリックアミン投与による CDF₁ マウス発がん実験成績

		有 効	腫 瘍 を も つ 動 物 数 (%)			
		匹 数	肝 腫 瘍	血 管 腫 瘍	前 胃 腫 瘍	肺 腫 瘍
Trp-P-1	♂	24	5(21)	0	0	3(13)
	♀	26	16(62)	0	0	1(4)
Trp-P-2	♂	25	4(16)	0	0	11(44)
	♀	24	22(92)	0	0	4(17)
Glu-P-1	♂	34	4(12)	30(88)	0	6(18)
	♀	38	37(97)	31(82)	0	4(11)
Glu-P-2	♂	37	10(27)	27(73)	1(3)	8(22)
	♀	36	36(100)	20(56)	0	1(3)
MeAαC	♂	37	21(57)	35(95)	0	5(14)
	♀	33	28(85)	28(85)	0	2(6)
A α C	♂	38	15(39)	20(53)	0	4(11)
	♀	34	33(97)	6(18)	0	4(12)
IQ	♂	39	16(41)	0	16(41)	27(69)
	♀	36	27(75)	0	11(31)	15(42)
Control	♂	97	4(4)	0	2(2)	22(23)
	♀	102	3(3)	0	0	13(13)

ControlはTrp-P-1, Trp-P-2の実験のcontrol, Glu-P-1, Glu-P-2, MeAαC およびAαCの実験のcontrol, IQの実験のcontrolを加えたもの

4. ラットの発がん実験

(1) Trp-P-1 及び Trp-P-2 の成績⁽¹²⁾

予備実験の結果から、F-344 ラット雄は Trp-P-1 に感受性が強く、3 カ月で体重減少を来したため、雄には Trp-P-1 150ppm 含有食、雌には Trp-P-1 200ppm 含有食を投与した。その結果、肝細胞がんが雄40例中30例、雌40例中37例に認められた。その他雄2例の大腸、雄雌1例ずつ小腸にそれぞれ腺がんの発生をみた。Trp-P-2 を投与した実験群は、投与開始後50~70週で肺炎による死亡例が雄群で40%に達したため再実験を行う予定である。

(2) Glu-P-1 及び Glu-P-2 の成績⁽¹³⁾

Glu-P-1 及び Glu-P-2 の500ppm 含有食を経口投与した実験では、肝、小腸、大腸、Zymbal 腺、外陰核腺など多臓器に腫瘍が誘発された。

肝細胞がんは Glu-P-1 投与群では雌42例中24例、雄42例中35例に発生し、数例は肺に転移を形成した。また小腸腫瘍は雌42例中10例、雄42例中26例にみとめられ、部位は回腸末端部に多発した。大腸腫瘍は雌に7例、雄に19例みとめられ、大部分が下部直腸に発生し、何れも人に認められるものと同じ形態の腺がんであった。外陰核腺の腫瘍は扁平上皮がんと診断された。

Glu-P-2 も Glu-P-1 同様多臓器発がん性を示したが、500ppm 含有食で比較する限り Glu-P-1 の腫瘍の発生率は Glu-P-2 より高かった。また Glu-P-1、Glu-P-2 共少数例ではあったが脳腫瘍の形成をみとめた。Glu-P-1 で形成された回腸末端部の腺がんを同系幼若ラット4例の皮下に移植したところ、2~3ヶ月で拇指頭大に発育し、移植可能であった。組織学的には粘液産生の顕著な腺がんが原発腫瘍に類似していた。

(3) MeA α C 及び A α C の成績⁽¹⁵⁾

マウスに肝腫瘍や血管内皮腫を形成した MeA α C や A α C を、ラットに経口投与した実験は、A α C 投与群のみ終了した。MeA α C を投与した

ラットでは、唾液腺（舌下腺及び顎下腺）に著明な萎縮または消失がみられ、再実験を行っている。

実験には F-344 ラット雌20、雄20、計40例を用い A α C 800ppm 含有食及び MeA α C の800ppm 含有食をそれぞれ経口投与した。

A α C 800ppm 含有食を経口投与した群は途中の死亡例も少なく、実験2年で生存ラットを剖検した。しかし、この高濃度にも拘らず肝及び腎に少数の腫瘍発生が認められたにすぎなかった。

MeA α C 800ppm 含有食を投与した群では、唾液腺（特に舌下腺並びに顎下腺）の萎縮が顕著で衰弱が著しく、37週で生存ラットを剖検した。その結果、雌20例中11例、雄19例中8例の唾液腺は完全に萎縮し、肉眼的にみとめられなかった。また形態学的に強度な唾液腺の萎縮は、雌4例、雄5例に夫々みられた。また同時に脾臓の萎縮が雌20例中12例に、雄19例中9例にみとめられた。現在 MeA α C の700ppm 及び500ppm 含有食で追加実験を行っているが、これらの群にも唾液腺や脾臓の萎縮がみとめられている。

唾液腺の萎縮ないし消失、脾臓の萎縮は、マウスではみられず、ラットに特徴的な所見であった。この原因については今後検討を加える。

(4) IQ の成績⁽¹⁴⁾

300ppm IQ 含有飼料を F-344 ラットに投与すると、Glu-P-1、Glu-P-2 同様肝臓、大腸、小腸、口腔内、皮膚に腫瘍を誘発した。Zymbal 腺腫瘍は、雄40例中36例、雌40例中27例と高率に発生し、組織学的には扁平上皮がんであった。肝腫瘍は雄27例、雌18例に発生し、組織学的には分化型の肝細胞がんであった。大腸腫瘍は、雄25例、雌9例に、小腸の腫瘍は雄12例、雌1例に発生した。これらの腫瘍は肉眼的に多中心性で、形態はポリープまたは皿状で腺がんと診断された。その他、皮膚、口腔内、及び外陰核腺に扁平上皮がんが発生した。また、実験終了時に剖検した1例の雌ラット前胃に扁平上皮がんがみとめられた。

表3 ヘテロサイクリックアミン投与によるF344ラット発がん実験成績

	有効 例数	性	腫瘍をもった動物数(%)									
			肝	臓	大	腸	小	腸	腎	Zymbal	外陰核腺	膀胱
Trp-P-1	40	♂	30(75)	2(5)	1(3)	0	0	0	0	0	0	0
	40	♀	37(93)	0	1(3)	0	0	0	0	0	0	0
Glu-P-1	42	♂	35(83)	19(45)	26(62)	0	0	0	0	18(43)	-	0
	42	♀	24(57)	7(17)	10(24)	0	0	0	0	18(43)	5(12)	3(7)
Glu-P-2	42	♂	11(26)	6(14)	14(33)	0	0	0	0	1(3)	-	0
	42	♀	2(5)	8(19)	8(19)	0	0	0	0	7(17)	11(26)	0
A α C	18	♂	1(6)	0	0	1(6)	0	0	0	0	0	0
	17	♀	3(18)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IQ	40	♂	27(68)	25(63)	12(30)	0	0	0	0	36(90)	-	0
	40	♀	18(45)	9(23)	1(3)	0	0	0	0	27(68)	20(50)	0
対	200	♂	5(3)	0	0	0	0	0	0	0	-	0
照	200	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

対照はTrp-P-1のcontrol, Glu-P-1, Glu-P-2のcontrolを加えたもの

(5) 5種類のヘテロサイクリックアミンの同時投与実験⁽¹⁶⁾ :

複数のヘテロサイクリックアミンを同時に動物に与えた場合の発がん性を調べるために、加熱食品中に存在が確認されている5種類のヘテロサイクリックアミンを基礎食に混じ、F-344ラットに投与する実験を行っている。実験に用いた各化合物の濃度は、各化合物単独で投与した化合物のそれぞれ1/5量ずつ (Trp-P-1 30ppm, Trp-P-2 40ppm, IQ 60ppm, A α C 160 ppm, Glu-P-2 100ppm) をえらび、これらを一緒にして基礎食に混ぜた。実験には、F-344ラット8週令の雌雄夫々50例を使用した。実験開始14カ月までに、雄9例、雌6例を培養した。腫瘍は、肝臓、大腸、小腸、Zymbal腺及び陰核腺などに発生した。肝臓の腫瘍は現在雄3例、雌1例にみとめられている。何れも肝細胞がんと診断された。大腸腫瘍は雄2例、雌2例、小腸腫瘍は雌2例に発生し、大腸腫瘍のうち1例は大腸全長にわたり多発性の腫瘍形成をみとめた。

5. おわりに

今回用いた7種のヘテロサイクリックアミンはラットにおけるMeA α C, A α Cの実験を除き、CDF₁マウス、F-344ラットの何れにも発がん性を示した。すべての実験群に共通してみとめられたのは肝腫瘍で、マウスでは特に雌における発生率が雄より高かった。また、Glu-P-1, Glu-P-2, MeA α C, A α Cはマウスでは肝腫瘍の他に背部肩甲骨間の褐色脂肪組織に血管内皮腫を、またIQ投与で肝腫瘍、肺腫瘍と前胃の扁平上皮がんの発生をみた。MeIQもやはり前胃の扁平上皮がんを誘発し、肝転移が高率にみられた。Trp-P-1, Glu-P-1, Glu-P-2, IQをラットに経口投与したところ、肝細胞がんのみならず小腸、大腸、Zymbal腺、外陰核腺及び皮膚など多臓器に悪性腫瘍が誘発された。同じ化合物でもマウスとラットで標的臓器が異なる点は興味あることである。

ヘテロサイクリックアミンは加熱食品中やタバコタールからも証明されており、実際に人が日常摂取している。それ故様々な加熱食品中に含まれているヘテロサイクリックアミンの量を正確に測定し、人に対する危険度を評価することが重要である。また人と実験動物の代謝の違いを明らかにする事もその危険度を評価する際必要であろう。

各々のヘテロサイクリックアミンの発がん性の強さをTD₅₀値を算出して示す方法がある。この値は飼料にまぜて実験動物の生涯を通じ連続的に与えた場合、50%の動物に腫瘍を発生させる発がん物質の量を、1日、体重kg当りで表したものである。計算の結果、今回実験に用いたヘテロサイクリックアミンのTD₅₀値の平均値は、マウス、ラット共に約8mg/kg/日で、この値はアフラトキシンB₁の8000倍、ジメチルニトロサミンの30倍である。

これまでに得られた情報から、人が毎日摂っているヘテロサイクリックアミンの総量は最大1.5 μ g/kg位と計算される。若し、ヘテロサイクリックアミンの動物実験における用量-反応曲線が0を通る直線であると仮定すると、VSD, (Virtually safe dose, 実質安全濃度) は約15ng/kg/日となる。この実質安全濃度というのは、人が生涯を通じ、その濃度の物質を連続して摂取した場合、それによる発がん頻度の上昇が100万人に一人であることを示すものである。人が実際に摂取しているヘテロサイクリックアミンの推定量は約1.5 μ g/kg/日であるから、この量は実質安全濃度の約100倍である。このように比較多量の物質を人間が摂取していた例は、これまであまり認識されていない。

今後は新しく合成される発がん性ヘテロサイクリックアミンの単体の発がん実験に加えて、できれば複数投与による実験が望まれる。

更に、ヘテロサイクリックアミン投与の後に種々の環境プロモーターを投与してその結果を調べることもヒトへの危険度を考える際重要である。

文 献

1. Doll, R. and Peto, R.: The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States Today, 1256—1260 (1981)
2. 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 (1980a)
3. Kasai, H., Shiomi, T. Sugimura, T. and Nishimura, S.: Synthesis of 2-amino-3,8-demethylimidazo[4,5f]quinoxaline (MeIQx), a potent mutagen isolated from fried beef. Chem. Lett. 675—678 (1981a)
4. 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. 915—920 (1978)
5. 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)
6. Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T. and Sugimura, T.: Mutagenicities of smoke condensate and the charred surface of fish and meat. Cancer Lett. 2: 221—226 (1977)
7. Ohgaki, H., Hasegawa, H., Kato, T., Suenaga, M., Ubukata, M., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T.: Induction of tumors in the forestomach and liver of mice by feeding 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ). Proc. Japan Acad. in press (1985)
8. Ohgaki, H., Kusama, K., Matsukura, M., 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 (1981)
9. 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)
10. 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)
11. Sugimura, T., Nagao, M., Kawachi, T., Honda, M., Yahagi, T., Seino, Y., Sato, S., Matsukura, N., Matsushima, T., Shirai, A., Sawamura, M. and Matsumoto, H.: Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. In: Origins of Human Cancer, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1561—1577 (1977)
12. Takayama, S.: Carcinogenicity of heterocyclic amines in Fischer rats. The 1984 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii (December 16—21, 1984) (1984)
13. Takayama, S., Masuda, M., Mogami, M.,

加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの定量

国立がんセンター研究所生化学部 若林 敬二

- Ohgaki, H., Sato, S. and Sugimura, T.: Induction of cancers in the intestine, liver and various other organs of rats by feeding mutagens from glutamic acid pyrolysate. *Gann* 75: 207-213 (1984)
14. Takayama, S., Nakatsuru, Y., Masuda, M., Ohgaki, H., Sato, S. and Sugimura, T.: Demonstration of cacinogenicity in F-344 rats of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline from broiled sardine, fried beef and beef extract. *Gann* 75: 467-470 (1984)
15. Takayama, S. (未発表)
16. Takayama, S. (未発表)
17. Yamamoto, T., Tsuji, K., Kosuge, T., Okamoto, T., Shudo, K., Takeda, K., Iitaka, Y., Yamaguchi, K., Seino, Y., Yahagi, T., Nagao, M. and Sugimura, T.: Isolation and structure determination of mutagenic substances in L-glutamic and pyrolysate. *Proc. Japan Acad.* 54B: 248-250 (1978)
18. Yoshida, D., Matsumoto, T., Yoshimura, R. and Matsuzaki, T.: Mutagenicity of amino- α carbolines in pyrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 915-920 (1978)

1. はじめに

肉や魚を加熱調理すると変異原物質が生成する。ガスコンロ上で焼いた丸干しイワシから 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ)及び 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline(MeIQ)が、電熱式ホットプレート上で焼いた牛肉から 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(MeIQx)が変異原物質として単離された(Kasaiら, 1980, 1981a,b)。又、アミノ酸及び蛋白質の加熱分解物中より変異原物質として単離された一連のヘテロサイクリックアミンも各種の加熱食品中に存在していることが報告されている(Yamaguchiら, 1980a, b; Yamaizumiら 1980; Matsumotoら 1981; Hargravesら 1983; Feltonら 1984)。

加熱食品中に存在する変異原物質であるヘテロサイクリックアミンの発癌実験はマウス及びラットを用いて行なわれた。その結果、現在までに 8 種類のヘテロサイクリックアミンに発癌性が証明されている(Matsukuraら 1981; Ohgakiら 1984a, b, 1985; Takayamaら 1984a, b)したがって、加熱食品の人体に対する影響を知る上で、加熱食品中の変異原・癌原物質であるヘテロサイクリックアミンの含量を測定することは非常に重要である。しかし、現在までに報告されている加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの量は、部分精製段階での回収率で補正せずに、実測値で表示されている。又、その測定方法は煩雑である。さらに、加熱食品中の主要な変異原・癌原物質である aminoimidazoquinoline 及び aminoimidazoquinoxaline 化合物を高感度に検出する方法も知られていない。そこで、我々は加熱食品中に含まれているヘテロサイクリックアミンを簡単にかつ精度高い方法で定量することを検討した。

2. 部分精製

加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの含量は微量である。したがって、ヘテロサイクリックアミンを正確に定量するために、対象となる試料中のヘテロサイクリックアミンを部分精製する必要がある。

Bacto牛肉エキス(Difco, Lot 0126-01)及び食用牛肉エキスの各々 25g の試料は 1000ml の水に溶解した。ガスコンロ上で焼いた牛肉及び鶏肉、及び電熱式ホットプレート上で焼いた牛肉の各々 25g の試料は 250ml の 0.1N 塩酸で 3 回抽出し、5% のトリクロル酢酸で除蛋白した。6N 水酸化ナトリウムを用いて抽出液の pH を 6-7 にした後、水を加えて 1000ml にした。

次に、早津ら(1983a,b)が開発したブルーコットンを用いて精製した。1000ml の抽出液にブルーコットン 2g を加え、1 時間振盪した後、ブルーコットンを取り除いた。新たにブルーコットン 2g を抽出液に加え、上記と同様な操作を 2 度くり返した。コットンに吸着した化合物をメタノール:アンモニア水(50:1, v/v)で抽出し、減圧乾固した。この試料を 250ml の水にとかし、再度ブルーコットン 1g で 2 度処理しヘテロサイクリックアミンを精製した。次に、ジクロロメタン 0.1N 塩酸で液々分配し、酸性及び中性化合物を取り除いた。得られた塩酸層を 45℃ で減圧乾固した。残渣を 0.25% のアンモニア水を含むメタノール:クロロホルム(3:7, v/v) 5ml に溶かし、SEP-PAK シリカカートリッジにかけた。カートリッジを再度同じ溶媒 5ml で洗浄し、溶出液を減圧乾固した(Takahashiら 1985b)。

Bacto牛肉エキス及び食用牛肉エキスから得られた各分離段階での試料の重量を表 1 に示す。IQ

表1 牛肉エキスの各部分精製段階での重量と¹⁴C標識化合物の回収率

	Bacto牛肉エキス			食用牛肉エキス	
	重量 mg	回収率%		重量 mg	回収率%
		¹⁴ C-IQ	¹⁴ C-MeIQx		¹⁴ C-MeIQx
	25000	100	100	25000	100
第1回目ブルーコットン処理	13.2	83	83	23.1	85
第2回目ブルーコットン処理	3.0	67	68	2.5	71
0.1NHCl-CH ⁶ Cl ⁶ 分配	2.6	65	67	2.4	70
SEP-PAKシリカカートリッジ による分離	1.6	63	63	2.2	67

及びMeIQxの各分離段階での回収率は、実測値と同量の¹⁴C-IQ及び¹⁴C-MeIQxを牛肉エキスを添加し調べた。4段階の部分精製で25gの牛肉エキスは1.6-2.2mgに濃縮され、添加した¹⁴C-IQ及び¹⁴C-MeIQxの回収率は63-67%となり、効率良くIQ及びMeIQxが分離精製できた(表1)。

3. 電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによるヘテロサイクリックアミンの分析

Aminoimidazoquinoline 及び aminoimidazoquinoxaline化合物は強い蛍光を持たない。又、これら化合物はガスクロマトグラフィーのカラムに強く吸着するため、ガスクロマトグラフィー/マスマスペクトロメトリー(GCMS)での検出感度は低い。一方、電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー(LCEC:Liquid chromatography with electrochemical detection)を用いた場合、IQ, MeIQ, MeIQx, 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(4,8-DiMeIQx),2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(7,8-DiMeIQx)の検出限界量は各々0.1ngであり、高感度に検出できた。そこで、LCECを用い、部分精製した試料中に含まれるaminoimidazo-quinoline及びaminoimidazoquinoxaline化合物の分析を行なった。

SEP-PAKシリカカートリッジで分離した試料(¹⁴C-IQ及び¹⁴C-MeIQxを添加していない試料)

をまずODSカラムを用いたLCECで分析した。標品のヘテロサイクリックアミンの保持時間に一致するピークフラクションを分取し、そのフラクションを陽イオン交換カラムを用いたLCECで再度分析し、二重の測定をした。ODSカラムを用いたLCECの条件を以下に示す。

カラム:TSKgel ODS-120A(4.6×250mm Toyo Soda)

IQ及びMeIQの溶離液:3.8%アセトニトリル-25mMリン酸緩衝液(pH2.0)

MeIQxの溶離液:10%アセトニトリル-25mMリン酸緩衝液(pH2.0)

4,8-DiMeIQx及び7,8-DiMeIQxの溶離液:12%アセトニトリル-25mMリン酸緩衝液(pH2.0)

流速:1ml/min

検出器:Yanaco VMD-501(Yanagimoto), +1000mV

温度:室温

陽イオン交換カラムを用いたLCECの条件は以下の様であった。

カラム:TSKgel SP-2SW (4.6 × 300mm, Toyo Soda)

IQ及びMeIQの溶離液:50%アセトニトリル-100mMリン酸緩衝液(pH3.0)

MeIQxの溶離液:30%アセトニトリル-100mMリン酸緩衝液(pH3.0)

4,8-DiMeIQx及び7,8-DiMeIQxの溶離液:20%アセトニトリル-100mMリン酸緩衝液(pH3.0)

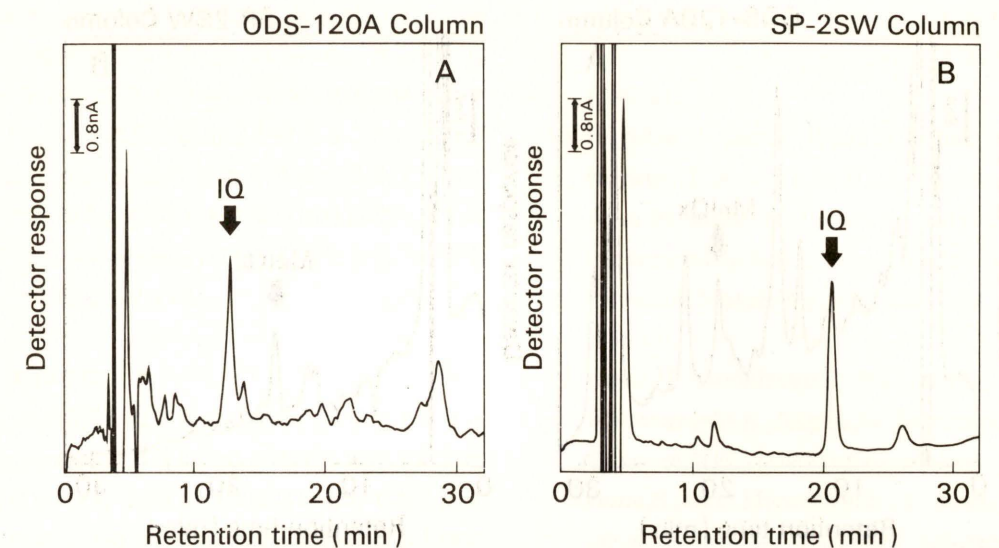


図1. ODSカラム(A)及びSP-2SWカラム(Bを用いたLCECによるBacto牛肉エキス中のIQの分析。矢印は、標品のIQの保持時間を示す。

流速:0.8ml/min

検出器:Yanaco VMD-501,+1000mV

温度:室温

Bacto牛肉エキスの部分精製した試料を、ODSカラムを用いたLCECで分析したところIQの保持時間(13分)に一致するピークが認められた(図1A)。このフラクションを分取し、陽イオン交換カラムであるSP-2SWを用いたLCECで分析した。図1Bに示す如く、保持時間20.5分にIQに相当するピークが認められた。ピーク面積より計算されたIQの量はODS及びSP-2SWカラムの系ではほぼ同じであり、Bacto牛肉エキス1g当り26.2ngであった。この結果は、ODSカラムからのIQの回収率はほぼ100%であることを示している。尚、標品のIQ及びMeIQx各1ngを用いた実験でも、ODSカラムからのこれら化合物の回収率はほぼ100%であることが確認された。

Bacto牛肉エキス中には、IQのみならず、MeIQx、及びクレアチニン、グルコース及びスレオニン混合物の加熱により生ずる変異原である4,8-DiMeIQx(Negishi,1985)も存在していることがわかった。MeIQx及び4,8-DiMeIQxの測定値

は、Bacto牛肉エキス1g当り、各々37.0ng及び7.0ngであった。尚、4,8-DiMeIQxの部分精製段階での回収率は、LCECにより測定された値と同量の4,8-DiMeIQxを牛肉エキスを添加し調べた。その結果、その回収率は70%であることがわかった(Takahashiら, 1985a)。

食用牛肉エキスの部分精製した試料をODSカラムを用いたLCECで分析したところ、保持時間20分にMeIQxに相当するピークが認められた(図2A)。しかし、このピークは他の化合物のピークと重なり合っていた。そこで保持時間18-21分のフラクションを分取し、SP-2SWカラムを用いたLCECで分析した。図2Bに示す如く、MeIQxの保持時間である16分に単一のピークが認められた。ピーク面積より計算されたMeIQxの測定値は、食用牛肉エキス1g当り2.1ngであった。

Bacto及び食用牛肉エキス中から検出されたIQ, MeIQx及び4,8-DiMeIQxの絶対含量を表2に示す。これらの値は、3つのヘテロサイクリックアミンの実測値を各化合物の部分精製過程の回収率で補正したものである。又、牛肉エキス中に

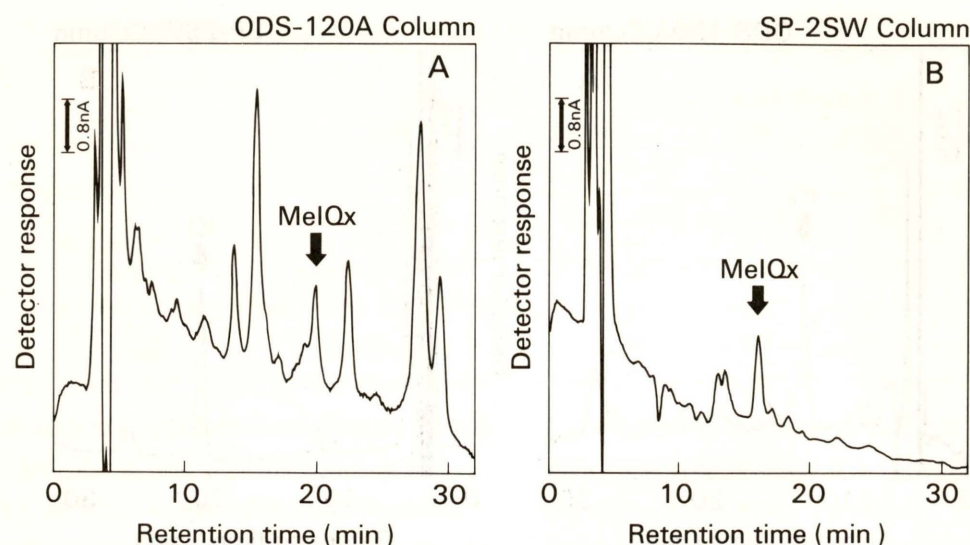


図. ODSカラム (A) 及び SP-2SW カラム (B) を用いた LCEC による食用牛肉エキス中の MeIQx の分析。矢印は、標品の MeIQx の保持時間を示す。

表2 牛肉エキス中のヘテロサイクリックアミン含量

	含量(ng/g)				
	IQ	MeIQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	7,8-DiMeIQx
Bacto牛肉エキス	41.6 ^a	<1.6	58.7 ^a	10.0 ^a	<0.8
食用牛肉エキス	<0.2	<0.2	3.1 ^a	<0.3	<0.3

^a実測値を部分精製過程の回収率で補正してある。

検出できなかった aminoimidazoquinoline 及び aminoimidazoquinoxaline 化合物の検出限界量もあわせて表2に示した。

Bacto牛肉エキス及び食用牛肉エキスを水に溶かし、XAD-2カラムで分離した試料の変異原性をサルモネラ菌TA98を用いて+S9mixで調べた。その結果、Bacto牛肉エキス及び食用牛肉エキスは1g当り、各々24000及び1600の復帰コロニーを誘導することがわかった。IQ、MeIQx及び4,8-DiMeIQxが同じ突然変異試験の条件下で示す変異活性より計算すると、Bacto牛肉エキス中のIQ、MeIQx及び4,8-DiMeIQxで説明できる変異原性の割合は、各々40%、27%及び9%であった。すなわち、これら3つのヘテロサイクリックアミン

でBacto牛肉エキスの全変異原性の76%を説明できることになる。食用牛肉エキス中のMeIQxの場合は、全変異原性の21%を説明できた。

ODS及びSP-2SWカラムを用いたLCECによりガスコンロ上で焼いた牛肉及び鶏肉、及び電熱式ホットプレート上で焼いた牛肉中からもMeIQxが検出できた。各々の測定値は、焼いた肉1g当り0.5ng、2.1ng及び0.3ngであった。これら加熱食品中からのMeIQxの回収率及び他のaminoimidazoquinoline及びaminoimidazoquinoxaline化合物の測定は現在行なわれている。

トリプトファン及び大豆グロブリンの加熱分解物中より単離された変異原・癌原物質であるaminopyridoindole化合物 (Sugimuraら1977;

Yoshidaら1978)も、先述した部分精製法で効率よく分離精製できることがわかった。さらに、ODS及びSP-2SWカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーに蛍光検出器を備えることにより、aminopyridoindole化合物を非常に高感度に検出できた。現在、牛肉エキス及び加熱調理した牛肉及び鶏肉中のaminopyridoindole化合物の分析もあわせて行なっている。

4. おわりに

我々が開発した加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの定量方法は、これまでに報告された他の方法に比べ、簡便かつ精度高いものである。この方法により得られる成果は、加熱食品の人体に対する影響を知る上に重要な資料になり得るものである。しかし、環境中には変異原・癌原物質であるヘテロサイクリックアミンの活性を修飾する因子が数多く存在する。したがって、活性ヘテロサイクリックアミンの人体に対する実際の暴露量を知る為には、ヘテロサイクリックアミンと蛋白質又はDNA等との結合物に対するモノクローナル抗体による測定法の開発も必要である。

文 献

- 1) Felton, J.S., Knize, M.G., Wood, C., Wubbles, B.J., Healy, S.K., Stuermer, D.H., Bjeldanes, L., 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, T.: Characterization of mutagenic fractions in beef extract and in cook-

ed ground beef. Use of blue-cotton for efficient extraction. *Gann*, 74: 472-482 (1983a).

- 4) 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. *Mutat. Res.*, 119: 233-238 (1983b).
- 5) 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-3H-imidazo[4,5-f]-quinoline. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 2290-2293 (1981a).
- 6) 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 (1981b).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) Matsumoto, T., Yoshida, D., and Tomita, H.: Determination of mutagens, amino- α -carbolines in grilled foods and cigarette smoke condensate. *Cancer Lett.*, 12: 105-110 (1981).

- 10) Negishi, C., Wakabayashi, K., Yamaizumi, Z., Saito, H., Sato, S., Sugimura, T., and Jagerstad, M.: Identification of 4,8-DiMeIQx, a new mutagen, *Selected Abstracts of Papers presented at the 13th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan*, 12—13 October 1984, Tokyo (Japan), *Mutat. Res.*, in press (1985).
- 11) Ohgaki, H., Hasegawa, H., Kato, T., Suenaga, M., Ubukata, M., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T.: Induction of tumors in the forestomach and liver of mice by feeding 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline (MeIQ). *Proc. Jpn. Acad.*, 61B: 137—139 (1985).
- 12) 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 (1984a).
- 13) 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 (1984b).
- 14) 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. Jpn. Acad.*, 53: 58—61 (1977).
- 15) Takayama, S., Masuda, M., Mogami, M., Ohgaki, H., Sato, S. and Sugimura, T.: Induction of cancers in the intestine, liver and various other organs of rats by feeding mutagens from glutamic acid pyrolysate. *Gann*, 75: 207—213 (1984a).
- 16) 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 (1984b).
- 17) Takahashi, M., Wakabayashi, K., Nagao, M., Yamaizumi, Z., Sato, S., Kinae, N., Tomita, I. and Sugimura, T.: Identification and quantification of 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (4,8-DiMeIQx) in beef extract. *Carcinogenesis*, in press (1985a).
- 18) Takahashi, M., Wakabayashi, K., Nagao, M., Yamamoto, M., Masui, T., Goto, T., Kinae, N., Tomita, I. and Sugimura, T.: Quantification of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in beef extracts by liquid chromatography with electrochemical detection (LCEC). *Carcinogenesis*, 6: 1195—1199 (1985b).
- 19) Yamaguchi, K., Shudo, K., Okamoto, T., Sugimura, T., and Kosuge, T.: Presence of 2-aminodipyrido[1,2-*a*: 3',2'-*d'*]imidazole in broiled cuttlefish. *Gann*, 71: 734—744 (1980a).
- 20) Yamaguchi, K., Shudo, K., Okamoto, T., Sugimura, T., and Kosuge, T.: Presence of 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido-[4,3-*b*]indole in broiled beef. *Gann*, 71: 745—746 (1980b).
- 21) Yamaizumi, Z., Shiomi, T., Kasai, H., Nishimura, S., Takahashi, Y., Nagao, M., and Sugimura, T.: Detection of potent mutagens, Trp-P-1 and Trp-P-2, in broiled fish. *Cancer Lett.*, 9: 75—83 (1980).
- 22) Yoshida, D., Matsumoto, T., Yoshimura, R., and Matsuzaki, T.: Mutagenicity of amino- α -carbolines in pyrolysis products of soybean globulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83: 915—920 (1978).

NEW VIEWS IN CHEMICAL CARCINOGENESIS: DISTINCT EFFECTS OF GENOTOXIC AND NON-GENOTOXIC CARCINOGENS.

J.H. Weisburger and G.M. Williams
American Health Foundation, Valhalla, N.Y.
10595-1599, U.S.A.

Research in carcinogenesis has documented that neoplastic conversion involves a permanent genetic change. Chemical carcinogens can damage the normal cellular genetic apparatus and through subsequent complex molecular mechanisms, involving translocation of codons such as oncogenes, yield a tumor cell. Chemicals may act as alkylating agents attacking DNA directly, or as procarcinogens requiring host-mediated metabolic activation to reactive electrophiles that interact with nucleophilic DNA. Such reactive genotoxic electrophiles are mutagenic in procaryotic and eucaryotic organisms, or induce DNA repair in mammalian cells, and can thus be detected.

In addition, there are chemicals that participate in the carcinogenic process by controlling the growth, development, and differentiation of transformed cells. Such chemicals do not react covalently with DNA, but exert their effects through epigenetic mechanisms. This category of chemical includes promoters. Epigenetic agents may be important in the overall carcinogenic process and, in some instances, exert a decisive role as to whether or not malignant cancer occurs.

We have classified chemical carcinogens into two major types: (1) DNA-reactive genotoxic carcinogens and (2) agents operating by epigenetic mechanisms (Table 1). We propose a systematic "decision point approach" (Table 2) for the detection of genotoxic carcinogens that involves (1) structure-activity relationships, (2) tests for induction of DNA repair in eukaryotes, (3) mutagenicity assays in prokaryotes, (4) mutagenicity assays in eukaryotes, (5) chromosome tests (6) cell transformation. Not all of these have equal sensitivity, specificity, and reliability. In addition, now under development are tests for promoters, based on their effects on cell to cell communication. This *in vitro* sequence permits preliminary decision making. Further, we propose limited, relatively rapid, *in vivo* assays involving: (1) induction of early lesions in rodent liver; (2) skin tumor induction in mice; (3) lung tumor induction in mice; (4) breast cancer induction in rats. These rapid tests can be designed to detect promoters for specific target organs by utilizing suitable low dosages of an appropriate genotoxic carcinogen as initiator. The data obtained through this set of tests are considered for decision making and health risk analysis. A traditional chronic bioassay may be needed only for extremely important environmental products in which case the test should be conducted with a number of dose levels, including the maximally-tolerated dose and an equivalent of the highest expected human exposure level.

Current concepts indicate that individual carcinogens require a specific qualitative and quantitative health risk analysis because of the differences in basic mechanisms and other parameters such as absorption, metabolism, etc. Genotoxic carcinogens at very low dosages may have practical threshold, no-effect levels, but, nevertheless, because of their

mechanism of action they are regarded as a qualitative hazard. In contrast, the action of epigenetic agents of the promoter class is highly dose-dependent and reversible, and thus, a distinctly different health risk analysis is required for these agents to take account of their quantitatively lesser hazard. Promoters should be studied at 4-6 dose levels, following a short course of an initiating carcinogen, so as to pinpoint a possible threshold effect.

The combined results from the systematic and economic battery of *in vitro* and *in vivo* tests constitute a sound basis for effective rational health risk analysis.

The systems approach we are proposing to detect those agents that can be promoters, in contrast to genotoxic carcinogens, is important. Indeed, there is evidence now showing that a number of widely used agricultural chemicals and food components that were found to be carcinogenic are epigenetic agents of the promoter class. This includes chlorinated hydrocarbons such as DDT, chlordane, aldrin, heptachlor. It involves also agents such as the artificial sweetener saccharin, the hormones estradiol and diethylstilbestrol, and the antioxidants BHT and BHA. Of even greater relevance, in relation to the etiology of major types of cancer currently afflicting man, is the fact that promoting agents play a key role in their occurrence. For example, the adverse effect of tobacco smoke involves promoting elements found in the acidic portion, accounting for the progressively lower risk of lung cancer upon cessation of smoking due to the reversibility of promotion. Furthermore, cancer of the colon, breast, prostate, ovary, and endometrium relate to the dietary fat level through promoting elements that are also reversible. This reversibility justifies the recommendations for public health action and intervention through cessation of smoking and the institution of nutritional practices lower in fat and higher in cereal fiber. Thus, conceptual advances in the mechanisms of carcinogenesis and their practical application to the public, when successfully implemented, should lead to a lower incidence of these major types of cancers. In Japan, efforts should be made to maintain the customary low fat diets (omitting, however, highly salted and pickled foods) to avoid increasing the risk for cancers and also heart disease, so common to the Western world.

READING REFERENCES

- Reddy, B.S., Cohen, L.A. McCoy, G.D. et al.: Nutrition and its relation-ship to cancer. *Adv. Cancer Res.* 32:237-345, 1980.
- Weisburger, J.H., Williams, G.M.: Carcinogen testing: Current problems and new approaches. *Science* 214:401-407, 1981.
- Williams, G.M. Liver carcinogenesis: The role for some chemicals of an epigenetic mechanism of liver tumor promotion involving modification of the cell membrane. *Food Cosmet. Toxicol.* 19:577-583, 1981.
- Williams, G.M., Weisburger, J.H.: Systematic carcinogen testing through the decision point approach. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21:393-416, 1981.
- Weisburger, J.H., Horn, C.L.: Nutrition and cancer: Mechanisms of geno-toxic and epigenetic carcinogens in nutritional carcinogenesis. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 58:296-312, 1982.
- Weisburger, J.H., Wynder, E.L., Horn, C.L.: Nutritional factors and etio-

Table 1. Classes of Chemicals Involved in the Carcinogenic Process

TYPE	MODE OF ACTION	EXAMPLE
	Genotoxic Carcinogens	
1. Direct-acting	Electrophile, organic compound, genotoxic, interacts with DNA	Ethylene imine, ethylnitrosourea
2. Procarcinogen	Requires conversion through metabolic activation by host or in vitro to electrophile	Vinyl chloride, benzo(a)pyrene, 2-naphthylamine, dimethylnitrosamine
3. Inorganic carcinogen	Some may be electrophiles, but others appear to lead to changes in DNA by selective alteration in fidelity of DNA replication	Nickel, chromium
4. Cytotoxin	Epigenetic Agents Chronic cell killing which leads to increased proliferation may be involved	Nitrotriacetic acid, polychlorinated hydrocarbons
5. Solid-state carcinogen	Physical form vital; may involve cytotoxicity	Polymer or metal foils; asbestos
6. Cocarcinogen	Enhances effect of type 1 or type 2 agent when given at the same time. May modify conversion of type 2 to type 1	Phorbol esters, pyrene, catechol, ethanol, n-dodecane, SO ₂
7. Promoter	Augments effect of type 1 or type 2 agent when given subsequently; also may enhance development of "spontaneously" transformed cells into neoplasms	Phorbol esters, phenol, anthralin, bile acids, tryptophan metabolites, saccharin
8. Hormone	Mainly alters endocrine system balance and differentiation; often acts as promoter	Estradiol, diethylstilbestrol
9. Immunosuppressor	Appears to stimulate "virally induced" transformed cells	Azathioprine, 6-mercaptopurine

Table 2. DECISION POINT APPROACH TO CARCINOGEN TESTING

Stage A. Structure of chemical
Stage B. Short-term tests in vitro
1. Mammalian Cell DNA repair
2. Bacterial mutagenesis
3. Mammalian mutagenesis
4. Chromosome tests
5. Cell transformation
Decision point 1: Evaluation of all tests conducted in stages A and B
Stage C. Tests for promoters
1. In vitro
2. In vivo
Decision point 2: Evaluation of results from stages A through C
Stage D. Limited in vivo bioassays
1. Altered foci induction in rodent liver
2. Skin neoplasm induction in mice
3. Pulmonary neoplasm induction in mice
4. Breast cancer induction in female Sprague-Dawley rats
Decision point 3: Evaluation of results from stages A, B, and C and the appropriate tests in stage D
Stage E. Long-term bioassay
Decision Point 4: Final evaluation of all the results and application to health risk analysis. This evaluation must include data from stages A, B, C to provide basis for mechanistic considerations

logic mechanisms in the causation of gastrointestinal cancers. Cancer 50:11-19, 1982.

Weisburger, J.H., Williams, G.M.: Bioassay of carcinogens: In vitro and in vivo tests. ACS Monogr. 173 "Chemical Carcinogens," 2nd ed., C.E. Searle, ed., in press, 1984.

変異原性試験法の適用に関する国内外の動向

国立衛生試験所・安全性生物試験研究センター・変異原性部 石 館 基

1. はじめに

環境中に存在する種々の化学物質のなかには、がんの発生や遺伝的障害の原因となり得るものが含まれている。そこで、疑わしい物質をなるべく早く検出するために、従来の長期動物実験に代り得る、短期試験法の開発が重要なテーマとなってきた。微生物その他を材料とする変異原性試験は、そのための有用な手段であり、近年、諸外国においては、発がん性物質のスクリーニングに広く起用されているばかりではなく、薬品、食品添加物その他の生活関連物質の安全性を評価する上でも、重要な役割を果たしてきた。

変異原性試験は指標の違いによって、遺伝子レベルの変化、染色体レベルの変化並びに、DNA傷害などに大別される。(表1参照) このうちのどれか一種類の試験で陽性の結果が得られた場合には、一般に変異原性があると判断される場合が多い。しかしながら、そこにはまだ問題が残されている。例えば、細菌に対して突然変異が誘発されたとしても、哺乳類の細胞に対して同じような変化が起こるとは限らない。逆に、哺乳類細胞に対して染色体異常を誘発したとしても微生物に対して遺伝子突然変異を誘発するとは限らない。さらに in vitro 系試験で陽性となったとしても、in vivo 系試験で陰性に終る化合物も多く知られている。まして、短期試験法で陽性となったからといって、長期動物実験で同じような障害が現われるとは限らない。

従来までに得られた実験によれば、ある特定な化合物の変異原性の有無を判定するためには、少くとも、指標の異なる2つ以上の試験系を組み合わせる必要があるとされる。さらに、ヒトへの危害を予測するためには in vitro 試験系のみならず、in vivo 試験系で得られた結果を考慮に加え

表1 変異原性試験の種類

- | |
|--|
| <p>1. 遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験</p> <p>(1) 微生物を用いる遺伝子突然変異試験</p> <p>(2) 哺乳類の培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験</p> <p>(3) ショウジョウバエを用いる試験</p> <p>(4) マウスを用いるスポット試験</p> <p>(5) マウスを用いる特定座位試験</p> <p>2. 染色体異常誘発性を指標とする試験</p> <p>(1) 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験</p> <p>(2) げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験</p> <p>(3) げっ歯類を用いる小核試験</p> <p>(4) げっ歯類の生殖細胞を用いる染色体異常試験</p> <p>(5) げっ歯類を用いる優性致死試験</p> <p>(6) マウスを用いる相互転座試験</p> <p>3. DNA 損傷性を指標とする試験</p> <p>(1) 細菌を用いるフェージ誘発試験</p> <p>(2) 細菌を用いる DNA 修復試験</p> <p>(3) 哺乳類の細胞を用いる不定期 DNA 合成 (UDS) 試験</p> <p>(4) 哺乳類の細胞を用いる姉妹染色分体交換 (SCE) 試験</p> <p>4. その他の試験</p> <p>(1) 酵母を用いる体細胞組換え及び遺伝子変換試験</p> <p>(2) マウスを用いる精子形態異常試験</p> |
|--|

る必要がある。生体内における複雑な代謝機構の全てが in vitro 系で反映できるとは限らないからである。

現在、本邦の労働安全衛生法（労衛法）には、新規化学物質（中間体を含む）の登録に際して、微生物を用いる復帰変異試験が義務付けられている。どのような試験をどのような目的に起用し、その結果をどのように行政に反映して行くべきかという問題は極めて重要である。現在、労働省のみならず、厚生省、通産省、農林水産省においても、独自の立場でその適用について検討中である。特に、OECD（経済開発機構）によって、各種毒性試験法のガイドラインが作製されて以来、国際間の非関税障壁にからむ問題として、諸外国においても、その対応に頭を痛めているのが現状である。

本項では、本邦をはじめ、諸外国で検討されている変異原性試験法ガイドラインを参考とし、そこに示されている基本的な考え方について解説を加える。

2. OECDのガイドライン

OECDの遺伝毒性に関する試験法ガイドラインは、数年前より専門家グループの手で準備されてきた。1979年のオタワ会議以来、遺伝毒性（遺伝学的障害性）に関する試験の重要性が指摘され、その背景となる文書（Background Document on Genetic Toxicology）がまとめられた。1980年の東京会議では、変異原性および発がん性を評価するための基本的な考え方が公表された⁽¹⁾。それによると、まず第1に、変異原性試験は遺伝毒性並びに発がん性の有無を予測するために極めて重要な手法であること、第2に、本試験で得られた結果は、他の毒性試験、例えば、代謝、吸収、排泄などの薬理学的所見あるいは、動物による一般毒性試験、さらに、その物質の化学構造に関する情報を考え合せた上で、総合的に評価されるべきであること、などが強調されている。後者の問題は、ヒトへの安全性を評価する際に重要であり、

ともすると変異原性試験の結果が、他の毒性試験と無関係に一人歩きする危険性に対する警告とも受けとめられる。同時に、基本的な考え方のなかには、変異原性試験は固定されたものではなく、この分野の研究の発展によって、将来さらに改善される可能性のあることも付記されている。変異原性試験で得られた結果は、あくまでも可能性を示唆するものであり、従って、結果によっては、さらに、必要な試験を追加すべきであるという考え方は注目に値する。

現在、国内外で起用されている変異原性試験の種類は多い。このうちで、どのような種類の試験を選択し、ガイドラインに掲載するかは重要な問題である。OECDでは、まず、最初に着手すべき査定（Initial assessment）として、なるべく操作が簡単であり、再現性に富み、種々の化学物質に対して感受性があり、安価で、しかも、過去に豊富なデータのある試験法であることを条件としている。

変異原性試験の第一段階（Preliminary assessment）としては、まず、2つの指標、すなわち、遺伝子突然変異（gene mutation）と染色体異常（chromosomal aberration）に関する情報を得る必要があるという。前者では原核細胞（prokaryotic cells）を用いる手法、例えば、サルモネラ菌（ネズミチフス菌、*Salmonella typhimurium*）を用いる方法（Ames test）及び、大腸菌（*E. coli*）を用いる手法をあげている。後者では、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が好ましいが、生体内骨髓細胞を用いる染色体試験（bone marrow cytogenetics）あるいは小核試験（micronucleus test）などでも受け入れられるとしている。上記の指標の異なる2種類の試験から1種類ずつ行う必要があるという。

以上の第一段階で得られた結果は、さらに次のような試験で確認することができる。すなわち、遺伝子突然変異に関しては、真核微生物（eukaryotic microorganisms、例えば酵母菌など）

を用いる試験、哺乳類の培養細胞を用いる試験（体細胞突然変異試験とも呼ばれる）、ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験（sex-linked recessive lethal test）、およびマウスを用いるスポット・テスト（spot test）などをあげている。一方、染色体異常に関しては、骨髓細胞を用いる生体内染色体試験（in vivo cytogenetics）あるいは小核試験などの体細胞（somatic cells）を用いるもの、または生殖細胞（germ cells）を用いる染色体試験、および、げっ歯類を用いる優性致死試験（dominant lethal test）をあげている。これらの試験はいずれも、従来からのデータがかなり蓄積されており、変異原性試験法として良く知られたものである。

被検物質に本来の意味での遺伝毒性、すなわち、子孫に遺伝的障害を与えるかどうかについては、上記試験では必ずしも断言することはできない。さらに、遺伝子レベルでは、マウスを用いる特定座位試験（mouse specific locus test）、染色体レベルでは、遺伝性転座試験（heritable translocation test）を行う必要がある。特に前者は、発がんに関していわば長期の発がん実験に相当するものであり、かなりの動物数と経費を要する。

DNA損傷に関する試験（DNA修復を含む）、姉妹染色分体交換（SCE）、精子形態異常（sperm abnormality test）、あるいは、酵母を用いる体細胞組換えおよび遺伝子交換試験（mitotic recombination and gene conversion in yeast）などは、追加指示試験（indicator test）として掲載されている。これには、枯草菌（胞子を含む）を用いる rec-assay や、哺乳類培養細胞、特に、ラットの肝細胞を用いる不定期DNA合成（UDS）など、極めて重要な試験法も含まれている。これらの試験はいずれも、他の変異原性試験の補足的役割を果たすと同時に、機構の解明に役立つ。

遺伝毒性とは別に、発がん性物質のスクリーニングの目的には、従来の実績から、細菌を用いる遺伝子突然変異試験が最も有用と考えられるが、

他の変異原性試験を併用することによってその検出能力はもっと高まる。特に、発がん性と直接関連を持っている in vitro 細胞形質転換法（cell transformation test）は、極めて有効な手段であるが、残念ながら現在ではまだ技術的に問題が残されており確立された手法とはいえない。

以上の基本的考え方は、あくまでも原則的なものであり、特別な理由のある限り、他の試験法で置き換え得るという柔軟性も考慮に入れられている⁽²⁾。1984年3月までにOECDの理事会を通過した試験法ガイドラインは次に示す8種類である。（括弧内の番号は毒性ガイドラインの通し番号に相当する）。

- (1)サルモネラ菌を用いる復帰変異試験（471）
- (2)大腸菌を用いる復帰変異試験（472）
- (3)培養細胞を用いる染色体異常試験（473）
- (4)げっ歯類を用いる小核試験（474）
- (5)骨髓細胞染色体異常試験（475）
- (6)培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験（476）
- (7)ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験（477）
- (8)げっ歯類を用いる優性致死試験（478）

3. 英国環境変異原学会ガイドライン

1982年英国では環境変異原学会に属する専門家メンバーによって特別小委員会が設けられた。ここでは、GLPのガイドラインに沿って行われるべき変異原性試験の最少項目並びに、それぞれの試験結果の評価に関する学問的基準について検討が行われた。これは1981年に既に、英国の社会保健局（DHSS）で作製した化学物質の変異原性試験ガイドライン（Guidelines for the Testing of Chemicals for mutagenicity）の見直しにあたる。

本ガイドラインでは、試験法の基本的組み合わせ（basic package）として以下の4種類をあげている⁽²⁾。

- 1)細菌を用いる遺伝子（点）突然変異試験

2) 培養細胞を用いる染色体異常試験

3) 培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験, または, ショウジョウバエを用いる優性致死試験

4) 骨髓細胞を用いる生体内染色体異常試験, 小核試験のいずれか, または, げっ歯類を用いる優性致死試験

これらの4つの試験法には特に順位があるわけではない。いずれも指標が異なり, しかも in vitro 法と in vivo 法の両者を取り入れ, 全体として総合的に評価しようとするものである。当然のことながら, in vitro 法では適切な代謝活性化法を併用するよう指示されている。

1) の所謂 Ames テストでは, 試験菌として TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA98および TA 100, さらに大腸菌の WP 2 *uvr* A を補足株として加えている。従って, 本邦における労働法の考え方に近い。OECD のガイドラインでは TA 1538が削除されているが(新しい労働法でも削除された), 当委員会の意見では, TA98よりも使い易い利点を持っているという。食品成分などにはヒスチジンを含む場合があるため栄養要求性を指標とする試験系では検出しにくい場合がある。表2に変異原性を検出するために有用な指標菌の例を示す。本ガイドラインによれば, データの統計処理のため少くとも用量当り3枚のプレートを使用すべきだという。

2) の in vitro 染色体異常試験では, ヒトのリンパ球あるいはチャイニーズ・ハムスター由来の線維芽細胞(CHO など)などを材料とする。各用量当り, 3枚のプレートを使用し, プレート当り100ケの分裂中期像を観察する。ここでは細胞当りの異常(ギャップを除く)を記録するように指示されているが, ギャップを含め異常を持つ細胞の出現頻度を記録する方が合理的かと思われる。in vitro の試験系では, in vivo の試験系よりもかなり高用量の被検物質を加え得るという利点を持っている。染色体異常は一般に, 細胞致死濃度に近い用量で発現する場合が多いので, in

vitro 系で陽性となっても必ずしも in vivo 系試験で陽性となるとは限らない。逆に, in vitro 系で陰性であり, in vivo 系ではじめて陽性となる場合は極めて稀であるという。

3) に関する詳細については割愛する。

4) のうち, 小核試験の概略は OECD ガイドラインと大差はないが, 多少説明を加えておこう。本試験法では, Schmid (1975) の原法が必ずしも適切なものではなく, 1回投与後, 時間を追って標本作製する必要性を指摘している。被検物質の最高用量は, 動物が投与4日以降に死亡する用量の50%から80%の間とするべきであるという。公比2で2段階以上の用量を用いる。動物数は同じ性の場合1群5匹以上, 両性の場合各々4匹以上が必要である。1個体につき, 500ケの多染性赤血球を観察するが, 未処理動物で小核が, 0.4%以上出現しない動物系を選ぶべきであるとしている。また, 正染性赤血球に対する多染性赤血球の比は大略0.4~1.0を正常範囲とするという。1回投与の場合は投与後, 24及び48時間目に標本作製するが, 場合によっては連続投与も必要かも知れない。

小核試験は骨髓細胞の染色体異常試験の様に, コルヒチン処理の操作が不要であるばかりではなく, 細胞遺伝学的基礎知識を持たない技術者でも扱えるという利点を持っている。

以上4種の試験は被検物質の変異原性の有無を定量的というよりは, むしろ定性的に把握するための最少項目ということができる。OECD の場合と同様, 本ガイドラインにも上記の第一段階で得られた試験結果をさらに確認するための補足的実験法が記載されている。これらについては将来改めてガイドラインが作製される可能性もある。

本ガイドラインに興味あることは, 試験結果の評価を如何にすべきかという点に触れていることである。4種の最少要求試験項目で得られた結果をまとめると次のようになる。

1) 全試験項目で陽性となった場合

表2 変異原性を検出するための指標菌例 (UKEMS ガイドラインより)

菌 株	遺 伝 子 座	開 発 者
サルモネラ TA	his ⁻ →his ⁺	Ames ら (1975)
サルモネラ TA	Azg ^s →Azg ^r	Skopek ら (1978)
サルモネラ SV-3	ara ^s →ara ^r	Ruiz-Vazquez ら (1978)
大腸菌 WP 2 系	trp ⁻ →trp ⁺	Green, Muriel (1976)
大腸菌 K-12 343/113	多遺伝子座	Mohn ら (1974)
大腸菌 K-12	lac operon	Clarke, Wade (1975)
枯草菌	多遺伝子座	McGregor, Sacks (1976)
肺炎桿菌	str ^s →str ^r	Voogd ら (1974)
サイトロバクター	str ^s →str ^r	Voogd ら (1974)
霊菌 A 13; A 21	his ⁻ →his ⁺ leu ⁻ →leu ⁺	Propping ら (1972)

本検体は間違いなく変異原性があると判断され, ヒトに対する遺伝毒性あるいは発がん性を疑ってよい。従って, さらに他の変異原性試験を追加することは必要ないと判断される。

2) 少くとも2種類の in vitro 試験系で陽性であり, in vivo 染色体異常あるいは優性致死試験で陰性であった場合

この場合には, 本検体には本来変異原性はあるが, その作用が生体内で同様に発現するかどうかについてさらに検討する必要がある。検体が生体内で分解, 代謝され, 無害となる場合もあろう。また, 試験系の標的臓器あるいは細胞に到達していない可能性もあろう。検体の代謝物の分布状態あるいは, 血清または尿中の変異原活性について検索する必要がある。ただし, 米国の食品安全審議会 (Food Safety Council) が, 1978年に発表したところによれば, 食品関連物質の場合たとえ in vitro 系試験でも, 微生物のみならず, 高等動物細胞系で共に陽性となった場合には動物生体(3)対しても変異原性を疑うべきであるとしている。

3) 単一の in vitro 試験系だけで陽性となった場合
細菌に特異的に働く場合もあり, また, 哺乳類細胞に特異的に作用する場合もあろう。両者細胞間では薬物代謝に関与する酵素の所在が異なっている可能性もある。細菌を用いる宿主経由試験 (host-mediated assay), 哺乳類細胞を用いる UDS 法あるいは SCE 法などを追加する必要がある。一般に, 哺乳類培養細胞だけに遺伝子突然変異を起す物質は少い。しかし, 染色体異常を起すが, 細菌に突然変異を起さないものは多い。特に, 細胞分裂毒のように, 染色体数を倍化(倍数体の形成)させるような物質は細菌を用いる手法では検出されにくい。このような現象は遺伝毒性と無関係ではあり得ないため, さらに in vivo 試験法によって再検討する必要がある。生体に検体を投与した後, 適当な組織細胞を培養し染色体異常その他の影響を観察する方法 (in vivo-in vitro 法とも呼ばれる) を採用することもできる。また, 体細胞のみではなく生殖細胞に対する影響を調べておく必要もあろう。いずれにせよ, in vivo の

データなしに in vitro のデータだけでヒトへの安全性を評価することは避けなければならない。

in vitro 試験で陰性であり、in vivo ではじめて陽性となるような物質は極めて稀である。例えば、ベンゼンは骨髓細胞に染色体異常を起すが、in vitro 系では細菌や培養細胞に対して遺伝子突然変異を起しにくい。

以上、英国のガイドラインの大略を示したが、まず、4種類の試験を並行して行った上で、改めて必要に応じて他の試験を追加して行こうという考え方である。学会に所属する委員会が作製したものであり、必ずしも行政的規制というわけではないが、英国はもとより、欧州諸国での遺伝毒性 (genotoxicity) に関する基本的な考え方を代表するものと思われる。

4. 試験法の開発に関する国際協力

発がん性物質の短期スクリーニング法の開発は、国際間における共通した関心事でもある。まず、その試験法は、既知発がん物質を洩れなく捕え得るものでなければならない。1978-1981 年にかけ米国と英国が中心となり、IPESTTC (International Collaborative Program for Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens) と呼ばれる国際事業が発足した。ここでは、発がん性物質と非発がん性物質を組合せて、合計42種類の化合物について、約62種類の短期試験法が実施された。これらの結果の詳細については1981年に出版された単行本を参照されたい⁽⁴⁾。ここではまず、サルモネラ菌を用いる Ames テストの有用性が再確認された。しかしながら、同時に、既知発がん性物質のあるものは、Ames テストでは検出されないか、あるいは、極めて検出されにくい事実も浮き彫りにされた。従って、少なくとも発がん性物質を洩れなく拾い上げて行くためには、ある特定の試験法だけでは、残念ながら、Ames テストを十分に補足し得る他の試験法を見出すことはできなかった。

そこで、1982年、WHO/IPCS (国際化学物質安全性計画) の活動の一つとして、改めて CSSTT (Collaborative Study on Short-Term Tests for Genotoxicity and Carcinogenicity) と呼ばれる事業が計画された⁽⁵⁾。本事業は第1部と第2部から成り立っている。第1部では、主に真核生物 (eukaryote) を用いる in vitro 試験系を中心とするものであるが、本邦を含め15ヶ国から合計62名の研究分担者が参加している。試験法の種類は大略表3の如くである。それぞれの試験項目について世話人 (括弧内) を設け実験プロトコルの調整にあたっている。各分担者は、下記に示す化合物について1年以内にデータを提出することになっている。

表3 CSSTT/IPCS/WHO 計画による
Part 1 グループの試験項目

試験項目	(世話人)
1. 細胞形質転換	(J. Ashby, 米国)
2. in vitro 染色体異常	(B. J. Dean, 英国)
3. in vitro 体細胞突然変異	(C. Garner, 英国)
4. ショウジョウバエ突然変異	(E. Vogel, オランダ)
5. in vitro 代謝協同阻害	(C. Garner, 英国)
6. DNA 損傷	(G. Williams, 米国)
7. 酵母菌突然変異	(J. M. Parry, 英国)
8. Ames テスト (追加)	(S. Venitt, 英国)

検体	略名
1) Hexamethylphosphoramide	(HMPA)
2) o-Toluidine	(TOL)
3) Benzene	(BEN)
4) Safrole	(SAF)
5) Caprolactam	(CAP)
6) Acrylonitrile	(ACN)
7) Diethylhexylphthalate	(DEHP)
8) Benzoin	(ZOIN)
9) Diethylstilbestrol	(DES)
10) Phenobarbital	(PB)

これらのうち、CAP および ZOIN は、非発がん性物質であるが、その他の8種類のものは発がん性が知られているにもかかわらず、Ames テストで検出することが難しいものである。上記第1部の事業は既に終了しており、去る1983年10月に米国においてその最終報告会が開催された。同じ試験項目でも、材料や実験法の違いによって、必ずしも同じような結果が得られているわけではないが、大略の結果を要約すると表4のようになる。

すなわち、今回改めて Ames テストを追加したグループでは、TOL, ACN および PB に弱いながら変異活性があることが確められた。特に PB は、肝がんのプロモーターとして知られている物質であるが、従来、この物質には変異原性は認められていなかった。今回の実験では、さらに酵母

を用いる試験、あるいは哺乳類培養細胞を用いる試験でも陽性となることがわかった。BEN は Ames テストにはかからないが、酵母を用いる試験並びに培養細胞を用いる DNA 傷害あるいは染色体異常試験で明らかに陽性となる。

既知発がん性物質のうち、どの位のものが陽性となるか (感受性) について比較すると、培養細胞を用いる染色体異常試験が最も高く (88%) 次いで体細胞変異 (75%), DNA 傷害 (63%) あるいは SCE (63%) の順となる。

もっとも、10種類に満たない検体について行った結果から、にわかに結論を出すことは危険である。しかしながら、今回の結果から、少なくとも、Ames テストで陰性であったものが、他の指標を持つ試験系で陽性となり得ることは確かである。従って、環境中の発がん性物質を短期スクリーニ

表4 CSSTT/IPCS/WHO 計画による Part 1 グループの結果の要約

試験系 (グループ)	Ames テスト (8)	イースト (7)	ショウジョウ ウエ (4)	DNA 損傷 (6)	UDS (6)	染色体 異常 (2)	SCE (2)	体細胞 変異 (3)	細胞形 質転換 (1)	代謝 協同阻害 (5)
HMPA	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
TOL	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BEN	-	+	±	+	-	+	-	±	±	-
SAF	-	-	+	+	+	+	+	+	±	±
ACN	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
DEHP	-	-	±	-	-	-	-	-	+	+
DES	-	-	-	+	-	+	-	+	±	-
P B	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
CAP	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
ZOIN	-	-	-	+	-	+	-	+	±	±
感受性 ^{*1}	38	50	38	63	25	88	63	75	50	38
正確性 ^{*2}	50	50	50	60	40	70	70	70	50	40

* 1 陽性の数/発がん性物質 (%)

* 2 偽陽性・偽陰性を考慮した場合 (%)

ング法で検索する際には、Ames テストのみならず、それを補足し得る他の試験系を併用すべきことが示唆される。本事業の実験結果の詳細については、すでに単行本として出版されている⁽⁶⁾。

第2部の計画では、benzo(a)pyrene 及び pyrene あるいは 2-acetylaminofluorene 及び 4-acetylaminofluorene 合計2対の化合物を対象とし、特に in vivo 系の変異原性試験を行う。その結果は1985年の5月にフランスで開催される最終報告会で発表された。

本事業では、17ヶ国合計120名近くの研究者が参画した。その結果は、恐らく1986年の初頭に単行本として出版されることになろう。現在までに報告されたデータを通覧すると、発がん性と非発がん性を見分けるのに、マウスを用いる小核試験がかなり良い成績を示している。従って、本邦における医薬品、あるいは一般化学物質の変異原性試験ガイドラインに本試験を採用していることは国際的に見ても妥当であるように思われる。

本事業は、Ames テストを補足するための有用な試験法を見出すことを目的としている。有用な試験法として以下に示すような諸条件を満足する必要があるという。

- 1) 試験法は特殊なものではなく、既に多くの実験室で行われてきたものであり、従って文献が容易に入手できるもの。
- 2) 今回配布した8種類の発がん性物質に対してできるだけ陽性の結果が得られるもの。

さらに、2種類の非発がん性物質 (CAP, ZON) に対して、できるだけ、陰性の結果が得られるもの。

- 3) 陽性結果は、疑いのないものであり、用量依存性および再現性があること。
- 4) 同じ試験項目を取り扱った研究室間である程度の共通した結果が得られること。
- 5) 短期スクリーニング法として簡便な方法であり、あまり特別な施設がなくても実施可能なもの。

5. 本邦におけるガイドラインの動き

本邦においては、既に労働法に Ames テスト (大腸菌を含む) が採用されていることについては既に触れた。化学物質 1 mg 当り 1000 ケ以上の復帰変異コロニーが出現した場合、一応、変異活性の比較的高い物質として取り扱い注意を勧告するように聞いている。単独な試験でかなり活性が高い場合には、職業がん予防のため、適切な指導を行う必要がある。しかし、活性が比較的低い場合にはどのように取り扱うべきかについてはなお異論の多いところである。労働省としては、今後、Ames テストの結果によっては、他の短期試験項目を追加する方向の検討を進めている。

化審法にあっても、新規化学物質に対して変異原性試験を要求することになっている。最近準備されたガイドラインによると、その内容は医薬品の場合と殆ど変りがなく、また、OECD の基本的考え方がとり入れられている。

農林水産省にあっても、独自の立場で、農薬の申請に必要な試験法ガイドラインを作製している。農薬は食品中に残留する危険性があるため、食品添加物の場合と同様、かなりきびしく試験項目を要求すべきであろう。

医薬品に関しては、1984年2月に新しい毒性試験法ガイドラインが発表された。

変異原性試験のデータはすべての新薬について要求される。試験項目として次の3種類が採用されている。

- 1) 細菌を用いる復帰突然変異試験
- 2) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
- 3) げっ歯類を用いる小核試験

これらのうち、1) は所謂 Ames テストに相当するが、その内容は本邦における労働法と大差はない。2) および 3) は共に染色体レベルの変化を指標とするものであり、いずれを選択してもよいことになっているが、特別な理由のない限り、2) の方法を優先するよう指示されている。これ

は、前者が in vitro 法であり、種々薬物の細胞に対する直接的効果を見る上で重要であるばかりでなく、後者 in vivo 法に比較して感度が高い理由によるものである。最も感受性が高いと思われる 1) 及び 2) の試験で陰性の結果が得られた場合には、同じ指標をもつ他の試験系でも陰性となる確率は極めて高い。一方、1) あるいは 2) の試験のいずれかまたは両者の試験で陽性となった場合には、3) の試験を追加しなければならない。実際に生体内で同様な効果が見られるかを確認するためである。医薬品である以上、生体内で副作用を重視しなければならないことは当然である。本ガイドラインにおいては、in vitro 試験のみで陽性となったとしても、その結果を参考資料とするとどまり、その時点で、医薬品の安全性を評価することを避けている。従って 3) の試験を追加し、その結果によって総合的に評価しようとするものである。以上の試験系で変異原性が疑われた場合には、他の毒性情報あるいは薬理作用を加味した上で、必要に応じてさらに別の変異原性試験が追加要求される場合も予想される。

医薬品の開発に伴い、ヒトへの安全性を保証することは国側の責任であり、同時に生産者側の責任でもある。本ガイドラインに示された試験項目は最少項目であり、その安全性の評価にあたっては、なるべく多くの信頼すべきデータが必要であることはいうまでもない。なるべく指標の異なった試験系を組み合わせることによって、より多くのデータを提出するよう心がけるべきである。なお、今後新しい試験法の開発によって、上記ガイドラインの内容は逐次改良されて行く可能性もあろう。

6. おわりに

変異原性試験は発がん物質の短期スクリーニング法として利用されてきた。しかしながら、本来の目的は、ヒトに対する遺伝的障害性を予測するところである。発がん性物質の殆んど全てのものに変異原性が認められているが、たとえ発がん性

がなくとも、子孫に悪影響を及ぼすような遺伝毒性物質も存在するかも知れない。米国の毒性計画 (NTP) では、莫大な予算のもとに、発がん性と並行してこの遺伝毒性の問題に取り組んでいる。

本邦においても、発がん性に興味を持つ研究者は多いが、遺伝毒性を真剣に取り上げている研究者の数はごく限られている。がんの問題は社会的にも表面に現われ易いが、遺伝の問題はあまり目立たないためであろう。

変異原性に関する研究の歴史はまだ浅い。幸いなことに、いずれの試験法も従来の動物実験と比較すれば、安価であり、操作も簡単である。しかしながら、操作が簡単であればある程、そこで得られた結果の評価は慎重に行うべきであろう。当初、変異原性があれば、発がん性があると誤解される向きもあった。また、ヒトにも遺伝的障害性があると決めつける向きもあった。現在までに蓄積されたデータによれば、これらの結論は必ずしも妥当ではない。たとえ変異原性があっても、発がん性を実証できるものはそのほんの一部に過ぎない。また、変異原性があっても、その影響が我々の生殖細胞に到達し、受精を介して悪い影響が受け継がれなければ、本来の遺伝毒性は発現してこない。これらの機構の解析は、今後に残された重要な研究課題である。将来、変異原性に関するデータは増加して行くであろう。これらのデータを行政にどのように反映して行くべきか。がん学者、遺伝学者が協力して考え直す時期にきているように思われる。

文 献

- 1) OECD : Short-Term and Long-Term Toxicology Groups ; Principle for the Evaluation of the mutagenic and Carcinogenic Potential of Chemicals, Expert Committee in Tokyo, 1980
- 2) UKEMS : Report of the UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity

企業の立場からの問題点

—医薬品における変異原性試験の現状—

武田薬品工業株式会社中央研究所 菊池 康基

1. はじめに

医薬品の安全性評価の一つとして、いかなる変異原性試験を実施すべきかについて、日本製薬工業協会（製薬協）では1976年に検討課題としてとり上げた。しかし、当時は変異原性試験を実施している企業は少なく、問題提起にのみとどまった（製薬協報告1977）。

その後の研究の進展とともに、欧米においては、医薬品をはじめ種々の化学物質の安全性評価のために、変異原性試験に関する各種ガイドラインが提示されている。わが国においては、1979年に労働安全衛生法に基づく新規化学物質の有害性調査として、復帰変異試験が義務づけられたのが、行政レベルでの規制の最初である。また最近では、一般化学物質、食品添加物、農薬、畜産医薬品などについてもガイドラインが定められつつある。

医薬品については、「医薬品のための毒性試験法ガイドライン」（厚生省薬審118号、1984）に変異原性試験が収載され、新医薬品について必須の試験となった。1982年夏にこのガイドラインの原案が提示されたのに伴い、製薬協・医薬品評価委員会にガイドライン検討のための特別小委員会が設置され、変異原性試験についても分科会で討議が重ねられた。この過程で、企業における安全性研究として、変異原性試験を実施するには多くの問題があり、各企業の変異原性試験の現状と動向を分析する必要にせまられた。

そこで、1984年4～5月にかけて、製薬協・医薬品評価委員会加盟会社88社、ならびに国内受託研究機関44社を対象に変異原性試験に関するアンケート調査を実施した。この調査結果はすでに公表（製薬協報告、1985）したが、今回はその概略について述べるとともに、いささかの私見を混じ

えて解説する。

なお、アンケートの回収率は製薬企業78%（69/88社）、受託研究機関35%（14/40社）であった。

2. 変異原性試験の保有状況

(1) 製薬企業（回答数67社）

変異原性試験の実施経験を有する企業は60社で、うち51社では何らかの試験を自社で実施していた。

製薬企業における試験の保有状況を表1にまとめた。保有率の高い試験は、復帰変異試験が76%、小核試験と修復試験（rec-assay）がともに61%であり、申請用にも最も多く用いられている。In vitro 染色体試験（45%）、優性致死試験（31%）、in vivo 染色体試験（27%）、SCE試験（21%）の4種がこれに続いている。また、変異原性試験の技術を修得中あるいは保有予定の企業の多いことが表1からうかがえる。

試験技術を全く保有しない企業は14社あり、これらを除く1社あたりの平均保有試験数は4種となる。試験の組合せとしては、復帰変異試験、修復試験および小核試験のセットが33社と最も多く基本的な組合せといえる。今後の保有計画から3年後についてみると、保有試験数の平均は1社あたり5種となった。試験の基本的な組合せとしては、復帰変異試験、小核試験およびin vitro 染色体試験となり、ガイドラインに対応するための計画が示されている。

(2) 受託研究機関（回答数11社）

10社が変異原性試験を実施しているが、受託した全試験を自社で実施しているのは6社で残りの2社は受託の一部を、また2社は全てを提携機関へ外注している。

保有率の高い試験は、復帰変異試験、修復試験、小核試験、in vivo および in vitro 染色体試験である。今後の保有計画においてもこの傾向に変わりはなく、in vitro 突然変異試験と優性致死試験が追加される程度である。

試験を実施している 8 社の平均保有数は 7.6、3 年後の計画では 9 種の試験となる。

表 1 製薬企業 67 社における変異原性試験の保有状況（ここに掲げた 17 社の試験は医薬品の毒性試験法ガイドラインに準じた）

試験の種類	各試験における技術の保有状況			
	保有している	3 年以内に保有の予定	保有の予定なし	未定
1. 遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験法				
1) 復帰変異試験	51 (76.1)	5 (7.5)	3 (4.5)	8 (11.9)
2) in vitro 突然変異試験	12 (17.9)	9 (13.4)	11 (16.9)	35 (52.2)
3) ショウジョウバエを用いる試験	2 (3.0)	0	20 (29.9)	45 (67.1)
4) マウススポットテスト	0	7 (10.4)	19 (28.4)	41 (61.2)
5) 特定座位試験	0	1 (1.5)	25 (37.3)	41 (61.2)
6) その他	0	0	4 (6.0)	63 (94.0)
2. 染色体異常誘発性を指標とする試験法				
1) in vitro 染色体試験	30 (44.8)	16 (23.9)	3 (4.5)	18 (26.9)
2) 骨髓染色体試験	18 (26.9)	9 (13.4)	6 (9.0)	34 (50.7)
3) 小核試験	41 (61.2)	10 (14.9)	4 (6.0)	12 (17.9)
4) 生殖細胞染色体試験	5 (7.5)	4 (6.0)	13 (19.4)	45 (67.1)
5) 優性致死試験	21 (31.3)	3 (4.5)	13 (19.4)	30 (44.8)
6) 相互転座試験	1 (1.5)	1 (1.5)	21 (31.3)	44 (65.7)
7) その他	0	0	4 (6.0)	63 (94.0)
3. DNA 損傷性を指標とする試験法				
1) 細菌を用いるファージ誘発試験	4 (6.0)	2 (3.0)	23 (34.2)	38 (56.7)
2) 細菌を用いる修復試験	41 (61.2)	2 (3.0)	8 (11.9)	16 (23.9)
3) UDS 試験	4 (6.0)	8 (11.9)	13 (19.4)	42 (62.7)
4) SCE 試験	14 (20.9)	10 (14.9)	10 (14.9)	33 (49.3)
5) その他	1 (1.5)	0	3 (4.5)	63 (94.0)
4. その他の試験				
1) 酵母を用いる試験	7 (10.4)	0	17 (25.4)	43 (64.2)
2) 精子形態異常試験	3 (4.5)	4 (6.0)	13 (19.4)	47 (70.1)
3) その他	1 (1.5)	0	3 (4.5)	63 (94.0)

- a) umu テスト
b) ハムスター肺細胞を用いた metabolic cooperation 阻害試験

() 内は％を表わす。

3. ガイドラインへの対応

ガイドラインで指定された 3 種の試験、復帰変異試験、in vitro 染色体試験および小核試験についての対応について調査した。

(1) 製薬企業（回答数 67 社）

復帰変異試験医薬品と小核試験については、自社実施がそれぞれ 31 社と 32 社で、これに委託

表 2 受託研究機関 11 社における変異原性試験の保有状況

試験の種類	各試験における技術の保有状況			
	保有している	3 年以内に保有の予定	保有の予定なし	未定
1. 遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験法				
1) 復帰変異試験	8 (72.7)	1 (9.1)	2 (18.2)	0
2) in vitro 突然変異試験	4 (36.4)	2 (18.2)	2 (18.2)	1 (9.1)
3) ショウジョウバエを用いる試験	0	2 (18.2)	3 (27.3)	4 (36.4)
4) マウススポットテスト	1 (9.1)	2 (18.2)	2 (18.2)	4 (36.4)
5) 特定座位試験	0	1 (9.1)	3 (27.3)	4 (36.4)
6) その他	10 (9.1)	10 (9.1)	1 (9.1)	1 (9.1)
2. 染色体異常誘発性を指標とする試験法				
1) in vitro 染色体試験	6 (54.5)	2 (18.2)	2 (18.2)	1 (9.1)
2) 骨髓染色体試験	6 (54.5)	1 (9.1)	2 (18.2)	1 (9.1)
3) 小核試験	7 (63.6)	1 (9.1)	2 (18.2)	1 (9.1)
4) 生殖細胞染色体試験	0	3 (27.3)	2 (18.2)	5 (45.5)
5) 優性致死試験	3 (33.3)	2 (18.2)	2 (18.2)	3 (27.3)
6) 相互転座試験	0	1 (9.1)	4 (36.4)	4 (36.4)
7) その他	0	0	1 (9.1)	1 (9.1)
3. DNA 損傷性を指標とする試験法				
1) 細菌を用いるファージ誘発試験	3 (27.3)	1 (9.1)	4 (36.4)	1 (9.1)
2) 細菌を用いる修復試験	8 (72.7)	0	2 (18.2)	0
3) UDS 試験	0	1 (9.1)	3 (27.3)	5 (45.5)
4) SCE 試験	2 (18.2)	2 (18.2)	2 (18.2)	3 (27.3)
5) その他	0	0	1 (9.1)	1 (9.1)
4. その他の試験				
1) 酵母を用いる試験	0	1 (9.1)	5 (45.5)	4 (36.4)
2) 精子形態異常試験	0	0	3 (27.3)	6 (54.5)
3) その他	0	0	1 (9.1)	1 (9.1)

- a) 宿主経由試験 b) 線虫を用いる試験
() 内は％を表わす。

との併用で対処するとの答を併せると 52 社および 48 社となり、70％を超える。一方、in vitro 染色体試験は自社実施 23 社、委託との併用が 16 社に対し、全て委託に廻す社が 20 社、未定が 10 社であった。

3 種の試験をガイドラインに従って実施する場合、30～44％の社では種々の問題をかかえている。これらの試験に共通した問題としては、まず G L P (Good Laboratory Practice) への対応がある。とくに in vitro 系の 2 試験で G L P 対応が十分でない傾向がみられる。次に試験に従事する要員が十分に確保されていないことがある。遺伝あるいは染色体の基礎を候得した技術者の不足が大きなネックとなっていることがうかがえる。専門技術者の確保あるいは教育がこれからの問題といえる。

個々の試験では、in vitro 染色体試験に問題点が多い。G L P、要員以外にも、技術的あるいは設備面に関する遅れも目立っている。おそ

らく、これまで実施経験の少ないことが原因であろう。

(2) 受託研究機関（8 社）

製薬企業における本調査結果から、変異原性試験を委託に廻すウェイトがかなり高いことがうかがえた。しかし、今回の調査では、3 種の試験について、ガイドラインへの対応が整っている受託研究機関は復帰変異試験 6 社、in vitro 染色体試験 5 社、小核試験 5 社であり、今後の新規参入も少ないようである。ガイドラインの施行に伴って委託試験の需要増加が予想されるが、国内における受託能力の伸展はあまり期待されない。

4. ガイドラインに対する意見

製薬企業、受託研究機関を問わず、多くの意見が寄せられたので、全体の傾向を把握するため、下記の項目に従って大まかに整理した。ここでは製薬企業の意見を中心に紹介する。

(1) 医薬品の安全性評価の見地から

意見を寄せた 43 社中 35 社は、変異原性試験の重要性を認め、ガイドラインについても妥当としている。ただし、試験の組合せや評価などに関する付帯意見が 23 社からだされた。一方、残り 8 社は否定的意見であり、スクリーニングとしての重要性和安全性評価資料としての重要性とは本質的に異なること、生殖試験が実施されるのであれば変異原性試験は不用であること、がその理由としてあげられている。

(2) 試験実施上の問題点

45 社より 95 の意見が寄せられた。表 3 にまとめたように、総論的問題としては、試験の組合せ (22 社)、評価 (17 社)、研究者の育成と技術的対応 (5 社) などであり、個々の試験に関しては、復帰変異試験 (13 社) と in vitro 染色体試験 (13 社)、に集中している。主な項目について解説する。

表 3 変異原性試験（医薬品の毒性試験法ガイドラインに基づく）の実施上の問題点

	製薬企業	受託研究機関
回答数	45	7
意見総数	95	14
1. 試験の組合せについて 組合せの選択と基準を明確に 復帰変異試験と小核試験との組合せがよい 他の試験による代行等、柔軟な対応を望む 追加試験を必要とする判断基準は？ -3 試験を同時に	22 (49%) 7 8 4 3 0	3 (43%) 0 1 0 1 1
2. 評価について 評価基準を明確に 試験結果の判定基準を明確に 癌原性、遺伝毒性との関係	17 (38%) 8 5 4	2 (29%) 2 0 0
3. 解説書による試験の具体的解説	5 (11%)	0
4. 検体（含陽性対照）の取扱い	5 (11%)	2 (29%)
5. 研究者の育成と技術的対応	5 (11%)	0
6. 新しい検出系について	4 (9%)	1 (14%)
7. 復帰変異試験について 抗菌性薬剤の試験法 菌株の選択と維持 その他	13 (29%) 6 4 3	2 (29%) 0 2 0
8. in vitro 染色体試験について 細胞株の選択と維持 染色体異常の判定基準 対応策に考慮 その他	13 (29%) 5 2 3 3	2 (29%) 2 0 0 0
9. 小核試験について 方法の改良	1 (2%)	0
10. その他 Rec-assay の評価 外部への依頼 その他	4 (9%) 1 1 2	2 (29%) 0 0 2
11. 問題点なし	6 (13%)	0

a 試験の組合せ

最も多い意見は①試験の選択と組合せに対する疑問である。基準が明確でないこと、試験が画一的で医薬品の個々の特性に配慮がない、とする意見が代表的である。安全性評価の観点から、②復帰変異試験と in vivo cytogenetic test として小核試験または骨髓染色体試験の組合せがより有用、との意見も多く、in vitro 系試験のみでは十分な評価は下せない、とする考えも表明された。また、③ 3 種の試験にこだわらず、他の試験も実施して総合的に評価すべきとの考えも寄せられている。

b 試験結果の評価

この問題については、①評価基準の明確化、②試験結果の判定基準の明確化、についての要望が多い。また、③癌原性や遺伝毒性との

関係をどのように考えたらよいか、との質問も寄せられた。例えば陽性（または陰性）結果を基に癌原性試験を必要（または不必要）とする考え方は妥当か、培養細胞系試験の評価限界についての疑問、などが代表的な意見である。

c 個々の試験について

講習会の希望として、より具体的な多くの意見が寄せられているので、次章にまとめて解説する。

5. 変異原性試験の講習会について

変異原性試験の講習会について、製薬企業59社および受託研究機関10社から、さまざまな具体的内容の希望が寄せられた。試験ごとに整理すると表4のごとくとなる。

表4 変異原性試験の講習会について。希望する試験法と講習内容

		製薬企業			受託研究機関
		計	試験技術保有	試験中又は試験後	
復帰変異試験	回答数	36	30	6	6
	意見総数	58	50	8	6
1. 具体的手法		9	7	2	1
2. 菌株(選択, 保存)		7	5	2	0
3. 検体(陽性対照含む)		10	10	0	2
4. 結果の判定と評価		18	15	3	2
5. 抗菌性薬剤の試験法		11	11	0	1
6. その他		3	2	1	0
In vitro 染色体試験	回答数	48	23	25	6
	意見総数	76	35	41	7
1. 具体的手法		16	3	13	2
2. 細胞株(選択, 取扱い, 保存)		12	4	8	0
3. 検体		12	8	4	0
4. 代謝活性化		6	5	1	0
5. 染色体異常の分類と定義		20	11	9	4
6. 結果の判定と評価		9	3	6	1
7. 試験法の意義		1	1	0	0
小核試験	回答数	32	22	10	3
	意見総数	42	29	13	3
1. 具体的手法		13	4	9	0
2. 動物(系統, 性差など)		5	5	0	0
3. 検体と投与量など		10	10	0	0
4. 標本作成と観察		7	7	0	0
5. 結果の判定と評価		7	3	4	3

(1) 復帰変異試験(36社)

試験を実施している企業からの希望が大半を占めている。このことはルーチン試験の担当者からの切実な要求と考えられる。要望の多い順に並べると、①結果の判定と評価、②抗菌性薬剤の試験法、③検体の取扱い、④具体的手法、⑤菌株の選択と維持、などである。

①については前章でも紹介したが、その他にも、用量効果相関について、ヒトに対する毒性評価の問題など、安全性評価の考え方についての解説を希望する声が多い。②に関しては、手法の講習と共に、ガイドラインでいう抗菌性薬剤の定義、突然変異誘発頻度を求めることの必要性和妥当性についての解説希望がある。また、試験方法が未だ確立されていないことから、検討会による手法の確立をすべきとの意見も寄せられた(製薬協内でアドホックなグループによる検討をすでに開始した)。③については変異原性試験の全てに共通する問題であり、ここで一括して述べる。検討自体の毒性が未知であり、また、陽性対照に変異原、癌原物質を用いることから、bio-, chemical hazard の対策について、溶液の廃棄(処理)法、陽性対照の選択基準と用量設定などについての解説希望が多い。④と⑤については、GLPに則した具体的な手法の解説や実技の指導を求めている。

(2) In vitro 染色体試験(48社)

他の2試験に比べ、未経験の企業が多く、基礎的な事項についての希望も多く寄せられた。

講習テーマとして最も多い希望は①染色体異常の分類と定義、についてである。化学物質により誘発される染色体異常については、早急に標準化を図る必要がある。②具体的手法については、細胞培養の技法も含め、技術を持たない企業からの希望が多い。③細胞株の選択、取扱い、保存法など、④代謝活性化に関する解説希望も寄せられている。⑤検体および⑥結果の判定と評価については、復帰変異試験の項で紹介した内容とほぼ同じである。

紹介した内容とほぼ同じである。

(3) 小核試験(32社)

上記2種の試験に比べると問題の少ない方法といえよう。①具体的手法についての希望は技術を持たない企業から多く出されている。②検体に関すること、③標本の作製法、④使用動物の3項目は全て技術を保有する企業からであり、具体的な内容を含んでいた。

6. 総括

今回の調査対象とした製薬企業は、製薬協加盟会社であり、変異原性試験の普及度は比較的高い集団と予測していた。試験の実施経験や技術の保有状況などの調査結果は、この予測を裏付けるものといえよう。

安全性評価の見地から、医薬品について変異原性試験を実施することに異存はないにしても、いかなる試験を適用すべきかについては、さまざまな意見がある。例えば、復帰変異試験、in vitro 染色体試験をヒトでの安全性評価の観点からどのように位置づけるのか? in vivo 系と in vitro 系とでは評価のウエイトが同じか異なるのか? 変異原性そのものを重視するのか、それとも癌原性や遺伝毒性のスクリーニングとみなすのか? スクリーニングであるとした場合、癌原性と遺伝毒性のいずれに比重をかけるのか? 生殖細胞に対する影響を調べる必要は? などについて質問すれば、研究の専門分野あるいは置かれた立場によって、おそらく十人十色の答えが返ってくると思われる。ガイドライン検討の過程でも、これらの点についてつっ込んだ討議が行われた。今回のアンケートでも、ガイドラインに対する意見として、試験の組合せと評価の2項目に多くのコメントが寄せられたことは、その現れといえよう。

ガイドラインに試験方法が記載された3種の試験については、講習会の希望が極めて多かった。

講習の希望項目も多岐にわたっているが、これは同時に、これらの試験における問題の提起としてもとらえることができる。企業研究所における試験従事者は、必ずしも専門研究者とはかぎらず、また経験の度合いもさまざまである。各分野の専門家からみれば、初歩的で幼稚な内容と思われることでも、切実な問題として悩んでいるものも多いことを理解していただきたい。また、これらの疑問に答え、指導・教育を施してレベルアップをはかることも重要なことと考える。その意味からも、講習会の開催については、学会にもご協力をお願いしたいと考えている。

今回の変異原性試験に関するアンケート調査は、日本製薬工業協会・医薬品評価委員会に設けられた毒性試験法検討特別小委員会・変異原性試験分科会(分科会長、菊池)によって実施された。ここに分科会委員の氏名を記し、感謝の意を表します。

有沢幹雄(日本ロシュ)、土居卓治(ミドリ十字)、藤井登志之(藤沢薬品)、服部幸男(興和)、近藤専治(エーザイ)、小野隆昭(田辺製薬)、大島稔彦(山之内製薬)、佐藤忠夫(中外製薬)、島田弘康(第一製薬)、白取治(塩野義製薬)。

文 献

- 1) 日本製薬工業協会・安全性委員会・基礎研究部会・第5チーム：医薬品の遺伝毒性試験—現状分析と暫定的試験法—, 月刊薬事, 19: 773-783, 931-940 (1977)。
- 2) 厚生省・薬審118号：医薬品のための毒性試験法ガイドライン (1984)。
- 3) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・毒性試験法検討特別小委員会・変異原性試験分科会：医療薬品の変異原性試験に関する調査報告, トキシコロジーフォーラム, 8, 印刷中 (1985)。

微生物試験について

国立遺伝学研究所 賀 田 恒 夫

微生物を用いた変異原性試験もかなり定着して、その評価も正常なところに着きはじめているように思える。ヒトにおける化学物質の発がん性や遺伝毒性についての予知に関してより高い完全性を求める一方、その基本的側面である DNA に対する作用性、反応性を高い感度で知ることが可能となった。これに並行して、哺乳動物系の *in vitro*, *in vivo* 試験の結果が集積し、それらとの対比によって個々の化学物質の活性が発現したり修復されたりする様相が少しずつ明らかになっている。このような知識の蓄積は、化学変異原の毒性評価をより正しいものに導きつつある。

さて、微生物試験——とくにエームス試験その周辺——においては、依然として未解決の問題がいくつか存在する。したがって、それらの点を考慮しつつ試験の実施を進める必要がある。また、本質的な解決にはまだかなりの時間がかかる面もあり、このような限界点の“認識”も必要でもある。

一方、既に知られた知識・方法でも理解が不充分であったり、何らかの理由で活用されていないものもいくつかある。これらの点をこの機会にできるだけ指摘してみたい。本稿でつくせない点もあろうが現時点における“メモ”として残したい。

1) 菌株

エームス試験においては菌株の遺伝的性質として菌膜の透過性を高め、損傷の DNA 修復を防止し感度を高めている。一方、誘発性の修復エラー系をプラスミドと共に導入している。この結果、復帰変異試験の運命である変異遺伝子座位の特異性の限界をかなり広めた。しかしながら、まだ、特異性の枠にはいらない変異原も存在しているように思われる。Ames 博士は、TA97 とか TA102

のような新しい特異性を有する菌株も新たに調整してその利用をすすめている。

事実、これらの株の利用によって国立衛生試験所における食品添加物の試験では、乳酸鉄やリボフラビンリン酸エステルナトリウムのようなものの変異原性が検出され、この性質は哺乳動物細胞における染色体異常誘発との関連性を示した例もある⁽¹⁾。

従来、TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100 などに加えて WP2 系統も利用されている。そこで日常いかなる株を利用したらよいかよくたずねられるが、これは悩みの種である。理論的に云えば、何種類の株で陰性であっても他の株で陽性を得る可能性は常に存在する。ただ実際には、多くの機関がすすめているように TA1535, TA98, TA100, WP2 *hcr* 位で検出される変異原が圧倒的に多く、これに他の株を用いて変異原性が検出されるチャンスは少ない。法的な形式をととのえることとは別に、実験的にはエームス株数株による試験以外に枯草菌による *rec*-assay とか、哺乳動物培養細胞による染色体異常試験のような全く“原理”の異なった検出系を併用することが見逃しを少なくするために必要である。

一般に陰性であることを 100% 結論することは理論的にはありえない。安全性チェックのため限られた労力と時間をどのように配分するかが常に困難な点である。

2) よい菌株の選択と保存

エームス試験のように広く実施されている微生物遺伝的手法において、その結果における変動の主な要因の一つは菌株そのものにある。異常な結果が出た場合は、他所から菌株の再配布を受けて行うのも一方法である。しかし、移し替えや研究

室間における諸条件の相違によって、果して菌の本来の性質が再現されるか否かの問題は常に存在する。そこで、筆者の行っている古典的微生物遺伝学における選択・保存法をここに記す(図1)。

譲渡されたスラントや保存中の菌体の一部を滅菌した磷酸緩衝液(以下PBと略す)にやや濃めに浮遊する。これをPBで10倍、100倍に薄めたものをつくる。そのごく一部(0.01~0.05mlほど)を、表面の乾燥したブロス寒天の一部にのせ、水分がほぼ吸収された頃を見はからってガラスのスプレッダーで寒天表面の全体に拡げる。要するに、最初にのせた部分は菌が密集して生える可能性が高いが後で拡げた部分に多数の単一コロニーが生じるようにする。

このようなプレートを37℃で一定時間培養する。生じたコロニーはようやく目に見える程度の小さい方がよい。なぜなら、その方が spontaneous な His⁺細胞の率の低いものが分離される可能性

が高いからである。コロニーが十分に大きくなると、それぞれのコロニーの中の His⁺の細胞の存在率は平均化されてしまう。朝まで培養したプレートを夕方を使用するときは4℃に保存する。

液体ブロス3mlを3mlあて培養用試験管(たとえば10本)に分注する。各コロニーの一つ一つから白金線で各試験管に菌のごく少量を植えつける。この際、大きい見え易いコロニーばかりから取るということは正当でない。隣接しているコロニーからもランダムに分離することが必要である。つまり人為的な選択をさなければならぬ。

各試験管に37℃で一夜好氣的に培養したものをつくり、翌朝、氷水中に漬ける。各試験管に50%グリセリンの1mlを加える。全体の4mlのうち、3mlをねじふた付きのストック管に分注して-80℃で保存する。

残りの1mlから0.1mlを採り、規定濃度のピオチン、ヒスチジンを含んだ Soft agar (2~3ml)

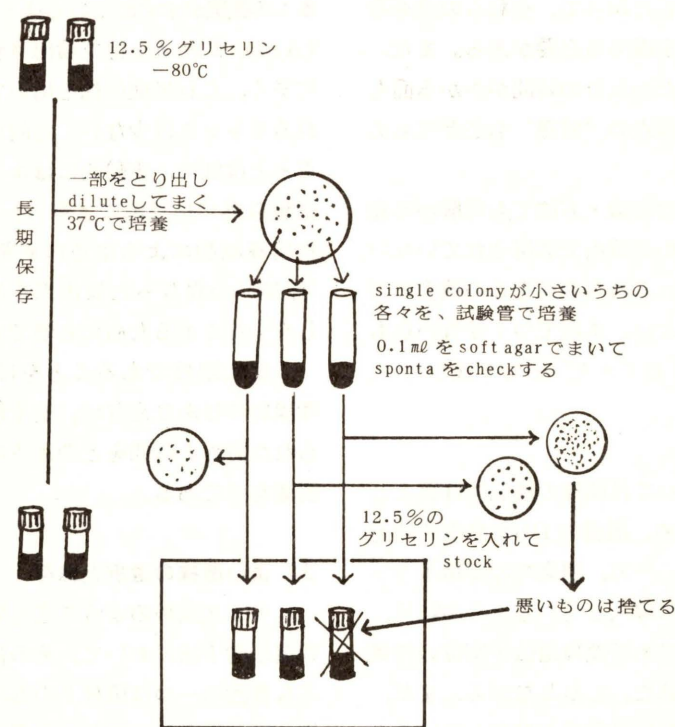


図1 試験菌の保存と選択

と混ぜエームス最少寒天培地の表面に播き拡げる。37℃で2日培養して spontaneous な His⁺コロニー数を計数する。

この結果により、他の微生物で汚染しているストック試験管や、spontaneous His⁺コロニー数が著しく高いと思われるものは廃棄し、適当と思われるストック試験管のみをそのまま-80℃につづけて保存して、後の実験に使用する。

このようにして調整した各ストックは、“検定ずみ”であってエームス実験に当って各試験管の3mlを使用すれば失敗することはない。普通-80℃から取り出して融解した後、遠心して上澄のグリセリンを含むブロスを除き、菌を3mlのPBで再浮遊したものを0℃に保ちつつ実験に用いる。あるいは、各ストックからごく一部を30mlの液体ブロスに植えて、一夜培養して常法によって使用する。

TA100は種々な変異原に敏感であり、エームスはその培養に Difco ブロスの替りに Oxoid ブロスの使用をすすめている。また、プラスミド(pKM101)を保有する株に関しては、上記の spontaneous His⁺数のチェックとともにアンピシリン耐性の試験をしてから各試験管を-80℃に保存する。また、アンピシリン(30 μg/ml)を含む液体ブロス中で静置培養することにより、プラスミド保有菌のみを集めることができる。

3) 試料の形態

多くの場合、検体は水あるいはDMSOに溶解しうる液体あるいは固体である。不溶性のもの、とくにポリマーのようなものはどうしたらよいかと、よくたずねられる。変異原性はもともと細胞のDNAに接近してこれに作用する性質であるので、検定系に溶けないことはこの性質がないわけである。従って、当然陰性の筈である。しかし、これから溶出される因子や菌の表層に可溶化されるものもある場合がある。そこで目で見て溶けるか否かはお構いなしに常法通りの操作を機械的に

行えばよいのではないか?

一方、気体の変異原の定量的方法は確立されていない。もちろん、特定の試料に関しては作用量に比例した突然変異誘発が見られるが、その強度を量的に比較することはまだ出来ない。この点(2)は以前試案を記したことがある。ここでは、一定の時間・ガス濃度でのプレートの曝露によって誘発された His⁺コロニー数を指標とした。その後いろいろ考えた結果、一種のプレインキューション法を今後検討すべきと考える。つまり薬物処理と培養とを別に行ない、S9は処理に際して短時間加えればよい。ただし純粋なガスが得られている場合はよいが、空气中に少量汚染したガス状物質の変異原性の測定のような場合はいろいろ困難な問題がある。とくにS9が活性化するために、長時間をかけるとS9そのものが失活してしまい定量性が失われるからである。

4) エームス試験結果の判定

通常、ソルベントのみによる対照区の His⁺コロニー数の2倍以上のコロニーが試料によって誘発され、これがしかも試料の量に比例して増大する場合にのみ陽性と判定される。TA1535やTA1537の場合のように数が比較的少ない場合にはそのバラツキが多いので、プレート数を増やして平均を確認する必要がある。また、2倍を越す部分が最初の試験で一点に過ぎぬ場合には、その前後の試料の量において試験を繰り返し行い、誘発 His⁺コロニー数が量依存的であるか否かを確認せねばならない。また試料の毒性のため菌の致死が示されるまで量をふやして試みるのが普通である。試料1mg当りによって誘発される His⁺コロニー数をもって比活性を示す。種々な株のうち、この比活性のもっとも高いものを求める。

5) rec-assay

枯草菌を用いた rec-assay 法⁽³⁾に関してはその見直しを最近記したのでご覧いただきたい。最近の

遺伝子工学的手法によって、従来使用している M45 Rec⁻に欠失している DNA 修復活性は、大腸菌の recA 遺伝子の導入によって完全に回復することが示されている。⁽⁴⁾そこで従来行っていた枯草菌 rec-assay 試験では、recA 蛋白質の関与する DNA 組換え機能による修復の対象となる DNA 損傷の有無を観察していたことになる。もう一つの面として、recA の関与している SOS DNA 修復を誘発させる DNA 損傷の有無の検出も含まれる。この型の損傷は次に述べるクロモテストによって直接検出されるが、枯草菌と大腸菌における薬物透過性などの相違によって、検出スペクトルが幾分異なることも予想される。

枯草菌 rec-assay 法は、4℃に安定に保存する孢子の利用によって前培養を行う必要がなく便利であるとともに、再現性のよい試験を行うことができる点、S9 による活性化がプレート上で可能な点、寒天中を拡散しない化学試料の検定法が確立している点、また電氣的に増殖阻害を測定できるセンサー系が確立している点などの特徴がある。⁽⁵⁾

rec-assay をエームス法と組み合わせることにより、発がん性を見逃す確率は0.5%以下という、種々な試験法の組み合わせのうち最も効率的であることが示された。⁽⁶⁾

6) クロモテスト

フランスの Hofnung⁽⁷⁾は SOS DNA 修復を誘発する化学物質——この多くは変異原であり発がん物質でもある——の簡易検出系を案出した。同様な系は品川⁽⁸⁾によっても作製された。その原理とするところは以下の通りである。

紫外線による大腸菌における突然変異の誘発機構に関して詳細に解析された結果によって次のことが知られている。紫外線あるいは多くの変異原が DNA を損傷すると、ある種のシグナル分子が生成し、これが recA 蛋白を活性化し、その作用によりレプレッサー蛋白質 (lexA product) が不

活化される。その結果としてレプレッサーが抑制していた DNA 修復機構を発現させる。ここで新たに発現して働く DNA 修復はその途次エラーを越え頻度が比較的高い (Error-prone と称する)。Hofnung らは、このようにして誘発される SOS 機能をもつ遺伝子の一つに人工的に lacZ 遺伝子をつないだ (図2)。その結果として、SOS 誘発性の DNA 損傷が生じると、lac Z の product である galactosidase が誘発合成されることになる。この酵素活性を比色法で定量する。実験方法としては、このように design された菌を化学検体で一定時間処理した後、洗って化学検体を除き、培養を行い培養液中に出現する β -galactosidase 活性を測定すればよい。一方同時に、SOS 誘発とは関係のない alkaliphosphatase 活性を測定して、 β -galactosidase 活性の誘発が化学検体での処理に特有であることを確認する。

品川らの系も、原理的に全く同じである。但し lacZ とつないだ Inducible な SOS 遺伝子があること、それがプラスミド上に存在することが異なっている。

多くの変異原、発がん原に関してクロモテストを行った結果を表1にまとめた。ここで次の点が明らかに示されている。

(a) エームス試験を与える試料のすべてが、クロモテストで陽性を与えない。すなわち、エームス陽性でクロモテスト陰性のものがある。9-アミノアクリジン、エチジウムブロマイドなどがその例である。

その理由は明白である。SOS シグナルを介することなく DNA レベルで生じた損傷が直接に遺伝子の sequence の改変の直接的原因となっている場合である。

(b) また既知発がん物質のすべてがクロモテストに陽性を与えるわけではない。これはエームス試験の場合と同様である。さて発がんが何らかの遺伝子の DNA レベルにおける改変あるいは非特異的不活化を含むならば、SOS

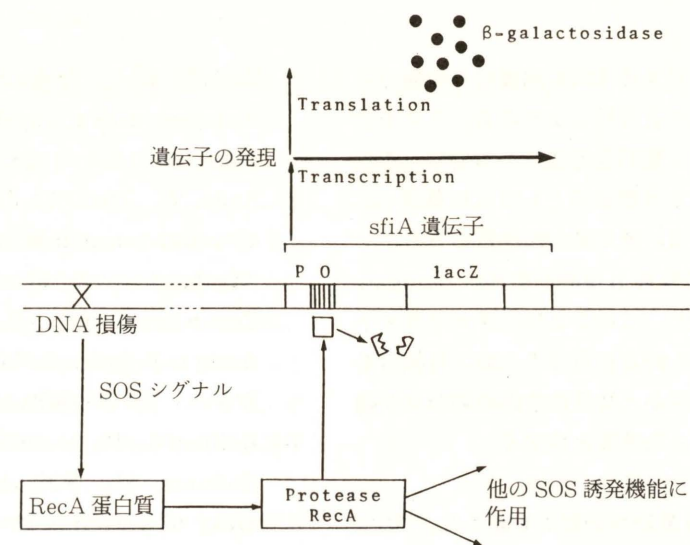


図2 SOS クロモテストの原理の概念図

表1 発がん性化合物の DNA 傷害テスト

(a) HOFNUNG法 (太田ら, 1984)

(b) umn法 (品川ら, 1983; 小田ら, 1984)

※試験が行われていないもの

化学試料	発がん性	エームス試験法	SOSクロモテスト		枯草菌 rec-assay
			a	b	
Actinomycin D	+	-	-	-	*
Bleomycin	+	+	+	+	*
Beryllium (BeSO ₄)	+	-	*	*	+
Chloroform	+	-	*	*	+
Chromium (K ₂ Cr ₂ O ₇)	+	-	*	*	+
Cortison acetate	+	-	*	*	+
Cyclophosphamide	+	?	+	*	+
DDT	+	-	-	-	-
Eiethylstil bestrol	+	-	*	*	+
1,2-DMH	+	-	-	-	+
5FU	?	-	-	+	*
Formaldehyde	+	-	*	+	+
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	+	-	*	+	+
(-)-Luteoskyrin	+	-	*	*	+
Mitomycin C	+	-	+	+	+
MOCA	+	?	*	*	+
PCB	+	-	*	-	*
PQ	?	-	*	+	*
Patulin	+	-	*	*	+
Penicillic acid	+	-	*	*	+
Safole	+	-	*	+	+
Thioacetamide	+	-	*	+	+
Thiourea	+	-	*	*	+
Urethane	+	-	*	*	+
Vanadium (VOCl ₂)	+	-	*	*	+

哺乳動物変異原性試験研究会ニュース

国立衛生試験所・変異原性部 祖父尼 俊 雄

哺乳動物変異原性試験研究会(MMS研究会)が昭和59年10月の日本環境変異原学会総会において、本学会の分科会として承認されましたので、本紙上をお借りして、MMS研究会の生い立ちとこれまでの活動状況を簡単に紹介し、本研究会について御理解頂くと共に、多数の方々の御参加をお願いする次第です。

MMS研究会は哺乳動物個体を用いる各種変異原性試験について検討を行い、この分野の研究の発展に努めると共に、ヒトへの安全性評価に寄与することを目的とする自主研究グループで、それまですでに活動していた優性致死セミナーおよび小核研究会を発展的に統合した形で昭和57年に発会した。

優性致死セミナーは昭和52年2月に土川 清(国立遺伝学研究所)、菊池康基(武田薬品工業㈱)、渋谷 徹(食品薬品安全センター)を世話人として、7研究機関からの参加により発足した。このセミナーの名称は最初に取り上げたテーマが優性致死試験であったことから名付けられたもので、当時より、優性致死試験は有力な in vivo 試験として提唱されており、基礎データの集積が望まれていた。但し、発会の主旨は優性致死試験に限定せず、哺乳動物を用いる in vivo 試験について研究者間の相互理解と情報交換を行いつつ、この分野の発展に資することを目的とした。本セミナーは昭和52年に環境変異原学会の分科会として承認され、次に示すような活動を行った。

- 第1回 昭和52年2月10日 運営方針、テーマの選択など
 第2回 昭和52年6月10日 優性致死試験の各自データの検討；カイコの優性致死試験；小核試験について
 第3回 昭和52年9月16日(JEMS第6回大

会小集会として) 優性致死試験について(内容は環境変異原研究 1, 1978)

- 第4回 昭和53年5月30日 優性致死の生データの検討
 第5回 昭和54年6月29日 優性致死試験に関する討議；哺乳動物による小核試験

一方、小核研究会は昭和55年9月に石館 基(国立衛生試験所)、菊池康基を世話人として発足し、他の in vivo 変異原性試験に比べてルーチン試験として有用性が高いと考えられている小核試験法の確立を目的とした。第1回研究会は昭和55年9月19日に国立衛生試験所で16名の参加者を集めて開かれ、小核試験の現状と問題点(林真, 国立衛生試験所)、小核試験における系統・性差(田中憲穂, 食品薬品安全センター)について話題提供がなされた。第2回の研究会は昭和56年2月24日に国立衛生試験所で開かれ、15名の参加者の下に小核試験のプロトコールについて検討がなされた。また、ヒトの骨髄での小核試験の適用の可能性についても検討された(話題提供者: 阿部達生, 京都府立医大)。

両研究会において実際に精力的に研究を行っている研究者(機関)は重複し、かつ限られていることが問題となり、我が国に哺乳動物個体を用いる試験をもっと普及させるべきであるという意見が関係者の間から出された。そのためには両研究会を統合したより幅の広い研究会を作り、試験方法の基礎的問題について共同研究が行えるような場にすべきであるという機運が高まってきた。このような状況下で第10回環境変異原学会(昭和56年12月)の際に有志による会合で上記の主旨に対し賛同が得られ、昭和57年2月13日に修善寺において「動物個体を用いる変異原性試験に関する研

シグナルを生成するDNA損傷はその極く一部に過ぎないことは明らかである。クロモテストはきわめて簡易な方法であるので、これを補うに匹敵する簡易法としては枯草菌 rec-assay 法がある。既知発がん物質のうち、クロモテスト陰性のものの約85%が rec-assay に陽性を与えた。このことは、クロモテストと rec-assay の両方を行うことにより検討を行えば、既知発がん物質の全部の約93%が陽性として検出されることになる。

以上、現時点で思いついた点を記した。「微生物による変異原試験」という大きな地図の中の数ヶ所のみを拡大して説明を加えたような結果になった。むしろ地図全体を正しく把握され、目的に間違いなく到着することを望んで止まない。

文 献

- 1) 石館基, 祖父尼俊雄, 吉川邦衛
食品添加物の変異原性試験成績(その5)
トキシコロジーフォーラム 7(6) 634-643, 1984
- 2) 賀田恒夫
ガス状物質の変異原性一とくに微生物試験の定量化について
トキシコロジーフォーラム 6(2) 149-157, 1983
- 3) 賀田恒夫
微生物による変異原試験における枯草菌“Rec-assay”の見直し(その1)
トキシコロジーフォーラム 8(4) 462-467, 1985
- 4) de Vos W.M., de Vries S.C., Venema G.:
Cloning and expression of the *Escherichia coli* recA gene in *Bacillus subtilis*, Gene 25 301-303, 1983.
- 5) Karube, I., Matsunaga, T., Nakahara, T.,
Suzuki, S.: Preliminary screening of mutagens with a microbial sensor, Anal. Chem. 53: 1024-1026, 1981.
- 6) Kada, T: The DNA-damaging activity of 42 coded compounds in the rec-assay, In “Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens” (eds, F.J. de Serres and J. Ashby), Progress in Mutation Res. Vol 1, Elsevier North-Holland, Inc. pp 175-182.
- 7) Quillordet, P., Huisman, O., D'Ari, R., 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.
- 8) 小田美光, 中村清一, 沖岩四郎, 中田篤男, 品川日出夫
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
環境変異原研究 6; 87-92, 1984

研究会」の準備会が開かれた。参加者は土川 清、菊池康基、渋谷 徹、祖父尼俊雄（国立衛試）、島田弘康（第一製薬）、林 真、山本好一（武田薬品）の7名で長時間にわたる討論の末に次のような基本的な方針が打ち出された。

1. 会の名称

哺乳動物変異原性試験研究会
Mammalian Mutagenicity Study Group
MMS研究会（略称）

2. 会の目的

哺乳動物個体を用いる各種変異原性試験について検討し、この分野の研究の発展に努めると共に、ヒトへの安全性評価に寄与する。

3. 会の活動

1) 定例研究会を一年に最低2回行う。1回はJEMS開催の時とし、会の形式は学会世話人と協議する。他の1回は5-6月に行う。

2) 定例研究会

- a) Original dataの発表および討議
- b) 各種の情報交換
- c) その他の協議事項

3) その他の活動

- a) 特定テーマについての共同研究
- b) 会員相互の研鑽のための研究会
- c) 会員外対象の講習会
- d) Standard Protocolの検討

4. 会員の対象

この研究会の目的に賛同する有志で現に研究にたずさわっている人に限定し、時期をみてそれ以外の対象に拡大する（注1）。

5. 会の運営

幹事数名（うち代表幹事1名）および事務局をおく（注2）。

6. 会 費

年会費2,000円とし、定例研究会にて徴収する。

注1) 会の活動が軌道にのった時点においてJEMSの分科会としての承認を求め、承認された後に会員の対象をJEMS会員に拡大する。その際「JEMSニュース」に当研究会の記事を載せてもらう。

注2) 57年度は、代表幹事、土川清、幹事菊池康基、祖父尼俊雄、渋谷徹、島田弘康とする。事務局は国立衛生試験所・変異原性部内におく。

上記の基本方針を基に、早速第1回の研究会が昭和57年5月8日国立衛生試験所において開かれた。表1にこれまで行われた研究会の内容を示す。

表1の活動状況にも記されているように、MMS研究会の中に共同研究分科会、プロトコール分科会、ワークショップ分科会が設けられ、共同研究の具体化、プロトコールの検討がなされた。共同研究の成果については第13回環境変異原学会において「小核試験における性差について」として発表され、現在同テーマについて2回目の確認実験が行われている。プロトコール分科会では小核試験について慎重な検討がなされ、トキシコロジーフォーラム、7:564-568, 684-654に「小核試験—ガイドラインの比較検討と標準プロトコールの提案—」として報告された。目下、講習会、ワークショップの開催についても具体案を検討中である。

尚、共同研究分科会とプロトコール分科会はその後研究分科会及びスポットテスト分科会に再編されている。スポットテスト分科会もこれまでに4回の会合がもたれ、マウス毛色のスポット判定基準など共同研究のための基礎的検討がなされている。今後、優性致死試験、SCE試験などについての分科会の設置が検討課題となっている。

哺乳動物個体を用いる変異原性試験はin vitroの試験に比べてかなりの日数がかかるため、基本的に重要なことでも一人（一つ）の研究者（所）で十分に検討を加えることが困難なことが多い。そのため、出来るだけ多くの研究者が集まり特定

テーマについて共同研究を行い、基本的な問題点を解決していくことがMMS研究会の大きな使命と考えている。現在の会員数は38機関よりの56名（昭和60年3月現在）で発足当時に比べて3倍近くにも増えており、当研究会の活動がさらに一段

表1 MMS研究会活動状況

第1回 研究会 日時：57年6月4日（金） 13:00 - 17:00
場所：国立衛生試験所

【研究発表】

- i) PW系を用いるマウススポットテストについて 土川 清 （遺伝研）
- ii) 小核出現頻度の経時的変動と連続投与の効果について 山本好一 （武田薬品・中研）
- iii) 小核試験の最適条件設定のための予備試験法 林 真 （国立衛試）

第2回 研究会 日時：57年10月28日（木） 16:00 - 21:00
場所：修善寺町総合会館

【研究発表】

- i) チャイニーズ・ハムスター細胞におけるSCEの自然発生頻度について 須藤 鎮世 （野村総研・生科）
- ii) マウス小核試験と系統差について 佐藤 精一 （専売公社・中研）
- iii) WHO/IPCSのCSSTの活動について 石館 基 （国立衛試）
- iv) 6-Mercaptopurineの染色体異常の発現機構 菊池 康基 （武田薬品・中研）

第3回 研究会 日時：58年6月4日（土） 13:00 - 17:00
場所：オリンパス大阪センター

【研究発表】

- i) 特定座位試験におけるENU分割投与の効果 一ツ町 晋也 （武田薬品・中研）
- ii) ショウジョウバエによる突然変異検出系について（デモンストレーションを含む） 藤川 和男 （武田薬品・中研）
- iii) これからの変異原性試験について 近藤 宗平 （阪大・医）

【分科会経過報告】

- i) プロトコール分科会
- ii) 共同研究分科会

第4回 研究会 日時：58年10月27日（木） 18:00 - 21:00
場所：徳島厚生年金会館

【報告および協議事項】

- i) 分科会等よりの報告
- ii) スポットテスト研修会について
- iii) 環境変異原遺伝毒性研究会（58年12月、大阪）の開催について

と活発になることが期待されるが、さらに、共同研究に積極的に参加出来る若い研究者の入会を希望する。

哺乳動物変異原性試験研究会 (MMS 研究会)

代表幹事 土川 清

幹事 菊池 康基, 祖父尼俊雄
渋谷徹, 島田 弘康

(文責: 事務局 国立衛生試験所・変異原性部
祖父尼俊雄)

【研究発表】

- | | |
|--|------------------|
| i) マウス受精卵におけるDNA修復 | 井上 雅雄 (金沢医大) |
| ii) 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 | 加藤 基恵 (食薬センター) |
| iii) 変異原物質によるマウス小核誘発におよぼすH-2遺伝子複合体 (H-2 complex) の影響について | 仁藤 新治 (田辺製薬・安全研) |
| iv) マウス骨髄における小核の生成機構 | 林 真 (国立衛試) |

第5回 研究会 日時: 59年6月8日(金) 13:00 - 17:00
場所: 食品薬品安全センター・秦野研究所

【報告および協議事項】

- i) 会計報告
- ii) 会則および幹事等について
- iii) スポットテスト分科会よりの報告

【共同研究 (I) —小核試験における性差— 小核分科会】

- i) 経過報告
- ii) データ収集および分析結果
- iii) 総合討論

—第6回 研究会 日時: 59年10月11日(木) 13:00 - 17:00
場所: 経団連会館

【報告および協議事項】

- i) 小核研究分科会より報告
- ii) スポットテスト分科会より報告
- iii) 変異原性試験講習会について (製薬協アンケート結果より)
菊池 康基 (武田薬品・中研)

【研究発表】

- i) 小核試験検出率に及ぼす加齢および性差の影響 小泉 直子 (兵庫医大)
- ii) 哺乳動物組織中のDNA損傷 — 各種組織についての比較
蜂谷 紀之 (秋田大・医)
- iii) BDF 1 マウス骨髄におけるcyclophosphamide誘発SCEの持続性の検討
竹下 達也 (山梨医大)

付 記

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、
編集幹事 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、国際交流幹事、編集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4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61年1月1日より施行する。
2. 本会は事務所を静岡県三島市谷田1,111番地に置く。
3. 正会員および賛助会員の会費はそれぞれ年額3,000円および1口20,000円とする。ただし、Mutation Research 誌の特別巻の配布を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

日本環境変異原学会昭和61～62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	日本たばこ産業(株)生物実験センター
大 西 克 成	徳島大学医学部
賀 田 恒 夫	国立遺伝学研究所
加 藤 隆 一	慶応義塾大学医学部
菊 池 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
定 家 義 人	国立遺伝学研究所
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
杉 村 隆	国立がんセンター
祖父尼 俊 雄	国立衛生試験所
高 山 昭 三	国立がんセンター研究所
武 部 啓	京都大学医学部
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
吉 川 邦 衛	三菱化成総合研究所安全性センター

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	印
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点について数行記入のこと)

加 入 学 会 名 (本学会以外の)

研 究 領 域 (下記のあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)

- 変異原
- 検出系
- 毒 性
- 発生異常
- 汚 染
- 疫 学
- 遺 伝
- が ん
- 微生物
- 高等動物
- 高等植物
- 食 品
- 気体・粉じん
- 医 薬 品
- 農 薬
- 代 謝
- 分子機構
- 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)

印

入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

—編集後記—

昭和59年10月12日、13日の2日間にわたって東京で開催されました日本環境変異原学会第13回大会の特集号として、本号ではシンポジウム「食品、蛋白質、アミノ酸の加熱により生ずるヘテロサイクリックアミン」、特別講演「New Views in Chemical Carcinogenesis」および学会奨励賞受賞講演「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」を収録させていただきました。また大会に先立って10月11日に開催されました公開シンポジウム「変異原性試験に関連する規制と諸問題」からも3編を収録いたしました。

ご執筆をいただいた諸先生には、いずれもご多用中のところを本号のために貴重な原稿をお寄せいただきましたことを厚くお礼申し上げます。
(白須 泰彦)

環境変異原研究 第7巻 第1号 1985年

昭和60年12月2日 印刷

昭和60年12月10日 発行

発行者 日本環境変異原学会

編集責任者 白 須 泰 彦

残留農薬研究所

〒187 東京都小平市鈴木町2-772

TEL 0423-83-7641

印刷所 藤原印刷株式会社

〒186 東京都国立市富士見台3-6-4

TEL 0425-73-3090

