



環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol.8 No.1 1986

環境変異原研究

第8巻 第1号 1986年

目次

昭和60年度学会奨励賞受賞者論文

食品中の新しい変異原前駆物質の研究 若林 敬二…………… 1

特集 日本環境変異原学会第14回大会

シンポジウム「環境化学物質の変異原性とそのとらえ方」

(司会 松島泰次郎、滝澤 行雄)…………… 7

試験方法の面から 黒田 行昭…………… 9

変異原性の強さとその評価 —生活関連物質の面から— 石館 基…………… 21

安全性評価と問題点 佐藤 茂秋…………… 31

疫学の立場から 滝澤 行雄…………… 33

特別講演

化学発がんの分子機構 角永 武夫…………… 41

公開講演

私たちが囲む変異原物質と健康 佐藤 茂秋…………… 49

一般演題より

各種加熱食品の heterocyclic amine の定量値

高橋 真、木苗 秀直、富田 勲…………… 51

オキシム化合物の変異原性 荒木 明宏、高橋 典代、松島泰次郎…………… 55

変異原の還元的失活の試み

玉井 功一、村上 和夫、賀田 恒夫、常盤 寛…………… 61

ニトロフルオレン類の変異原性と代謝活性代

渡辺 雅彦、能美 健彦、石館 基…………… 65

ショウジョウバエの除去修復能欠損系統 mei-9⁺ の体細胞における benzo (a) pyrene と

2-acetylaminofluorene の変異原性 藤川 和男…………… 69

培養細胞における Vitamin C の抗変異原作用 黒田 行昭…………… 75

哺乳動物組織中の DNA 損傷 —DNA 鎖切断とアルカリ感受性部位—

蜂谷 紀之、田中 尚子、滝澤 行雄…………… 79

分科会報告

哺乳動物試験分科会 (MMS 分科会) ニュース —昭和60年度活動状況—

祖父尼俊雄……………83

日本学術会議だより……………85

付 記

日本環境変異原学会会則……………90

日本環境変異原学会昭和61年度評議員名簿……………91

日本環境変異原学会入会申込書……………92

日本環境変異原学会奨励賞受賞者……………94

環境変異原研究 8: 1—5 (1986)

昭和60年度学会奨励賞受賞者論文

食品中の新しい変異原前駆物質の研究

国立がんセンター研究所・発がん研究部 若 林 敬 二

1 はじめに

日本人には胃癌が多い。日本人の硝酸塩の摂取量は欧米人のそれに比べて多く、胃癌発生との相関関係が指摘されている¹⁾。硝酸塩は口腔内の細菌により亜硝酸に変換される。又、最近、亜硝酸はマクロファージによっても生成されることが報告されている²⁾。亜硝酸は胃の酸性条件下で二級アミン及びアミド化合物と反応して、変異原・癌原物質であるニトロソ化合物を生成する。直接変異原・癌原物質である *N*—methyl—*N'*—nitro—*N*—nitrosoguanidine は実験動物に胃癌を誘発する。したがって、胃の酸性条件下で亜硝酸と反応して生成する直接変異原・癌原物質は、人の胃癌発生に関与している可能性がある。

我々は、人癌、特に胃癌発生に関与する化合物を検索する目的で、日本人の日常食品に、亜硝酸と反応して直接変異原性を示す物質すなわち変異原前駆物質が含まれているか否かについて調べた。その結果、6つの化合物を変異原前駆物質として単離した。これらの化合物は、これまでに報告されているジアルキルニトロソアミン及びアルキルニトロソアミド等の前駆物質とは異なる新しい変異原前駆物質であった。さらに、亜硝酸処理により生成する変異原の1つについては癌原性も証明した。これら研究の経過及び結果について以下に述べる。

2 各種食品の、亜硝酸処理により生ずる変異原性

各種食品を50mMのNaNO₂と、pH3.0、37℃で1時間反応させ、ammonium sulfamateで過剰の亜硝酸を取り除いた後、生じた変異原性をサルモ

ネラ菌TA100を用い、S9mix非存在下で調べた。各種食品を試験したところ、大豆発酵食品であるしょう油及び豆みそが強い変異原性を示すことがわかった³⁾。しかし、しょう油及び豆みその原料である大豆には変異原性は認められなかった。日本で製造された8種類のしょう油を、亜硝酸処理すると、1ml当たり2,700—25,200個の復帰コロニーを誘導した。豆みそは1g当たり、6,200個の復帰コロニーを誘導した。

各種野菜及び各種漬物も亜硝酸処理により直接変異原性を示すことがわかった^{4,5)}。白菜、キャベツ、大根及びほうれん草1g当たりに認められた復帰コロニー数は2,400—4,700であった。又、みそ漬、糠漬、粕漬、福神漬及び塩漬をした各種野菜の漬物の変異原性は、漬物1g当たり1,900—18,000であった。さらに、白菜塩漬の醸成期間中の変異原前駆体活性を調べたところ、活性は生の白菜に最も強く認められ、1日の醸成で35%の変異原前駆体活性が漬汁に溶出することがわかった。又、醸成期間1日目から10日目までの変異原前駆体活性はほぼ同じ値を示した。このことより、白菜塩漬の変異原前駆物質は生の白菜に存在する変異原前駆物質によるものであり、塩漬醸成期間中に新たに生成したものではないと考えられる。

身欠きにしん及ぶ丸干しいわしも亜硝酸処理により変異原性を示し、1g当たりに認められた変異原性は、各々5,500及び2,400であった⁵⁾。

3 食品中の変異原前駆物質の分離及び同定

亜硝酸処理により直接変異原性を示す食品の内、日本人が頻繁に摂取しているしょう油及び白

菜に含まれる変異原前駆物質の分離を各種クロマトグラフィーを用いて行った。その結果、しょう油より3つの変異原前駆物質を単離した。これら化合物は tyramine、(-)-(1*S*, 3*S*)-1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid [(-)-(1*S*, 3*S*)-MTCA] 及び (-)-(1*R*, 3*S*)-MTCA であった^{3,6)}。白菜からも3つの変異原前駆物質が単離され、それら化合物は indole-3-acetonitrile, 4-methoxyindole-3-acetonitrile 及び 4-methoxyindole-3-aldehyde であった^{4,7)}。これら6つの変異原前駆物質の構造を図1に示す。

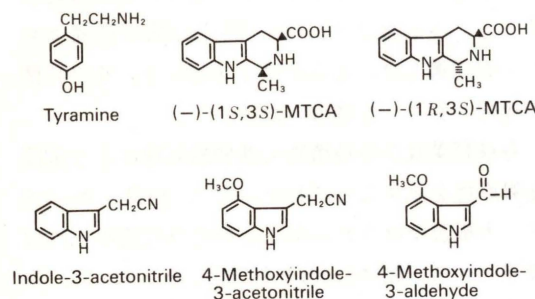


図1 しょう油及び白菜より分離された変異原前駆物質の構造

6つの変異原前駆物質をpH3.0で、37℃、1時間、50mMのNaNO₂と反応させ、生成する変異原性をサルモネラ菌TA100及びTA98を用いて調べた。変異原前駆物質1mg当たり、S9mixなしでTA100に対して認められた変異活性は、tyramineで、3,900、(-)-(1*S*, 3*S*)-MTCAで17,400、(-)-(1*R*, 3*S*)-MTCAで13,000、indole-3-acetonitrileで17,400、4-methoxyindole-3-acetonitrileで31,800、4-methoxyindole-3-aldehydeで156,900であった。これら化合物の亜硝酸処理により生ずる直接変異原性はTA98に対しても認められ、それらの活性はTA100に対するものに比べほぼ同様か又は低かった。Tyramineの亜硝酸処理により生ずる変異原性はS9mixを添加してもあまり減

少しなかった。しかし、MTCA及び3種のインドール化合物の場合は、S9mix添加により変異原性は著しく減少した。尚、6つの変異原前駆物質は亜硝酸処理しない場合には、いずれも変異活性を示さなかった。

4 変異原前駆物質と亜硝酸との反応により生成する変異原物質の構造

しょう油及び白菜より単離同定された6つの変異原前駆物質の内、tyramine及びindole-3-acetonitrileの亜硝酸処理により生成する変異原物質の構造が明らかにされている。

5 mMのtyramineと50 mMのNaNO₂をpH1.0で37、1時間反応させ、過剰の亜硝酸をammonium sulfamateで取り除いた後、反応溶液をODSカラムを用いたHPLCで分離した。その結果、2つの生成物のピークが認められ、変異原性はtyramineよりも前に溶出するピークに認められた。このピークフラクションに含まれる変異原物質の構造を各種スペクトルを用いて解析した。その結果、この化合物の構造は4-(2-aminoethyl)-6-diazo-2, 4-cyclohexadienoneと推定された。そこで、1-naphthylamine及び2-naphtholとのカップリング反応を行ったところ、アゾ化合物の生成が認められた。以上の結果より、tyramineと亜硝酸の反応により生成する変異原の構造は、図2に示すように4-(2-aminoethyl)-6-diazo-2, 4-cyclohexadienone (3-diazotyramine)と決定した。尚、変異原性を示さない生成物は3-nitrotyramineであった。

3.6mMのindole-3-acetonitrileと50mMのNaNO₂をpH3.0で、37℃、1時間反応させ、過剰の亜硝酸をammonium sulfamateで取り除いた。この反応溶液を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル分画をシリカゲルカラムを用いたHPLCで分離した。その結果、変異活性を示す1つの生成物のピークが認められた。この変異原物質の構造は、各種スペクトルデータより1-nitrosoindole-3-acetonitrileとわかった⁸⁾(図2)。

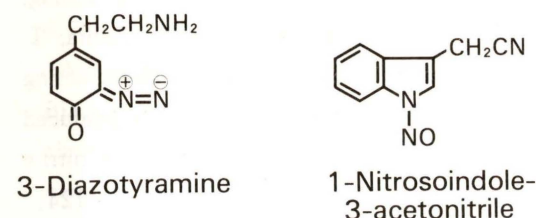


図2 Tyramine及びindole-3-acetonitrileの亜硝酸処理により生成する変異原の構造

5 3-Diazotyramine及び1-nitrosoindole-3-acetonitrileの変異原性及び癌原性

3-Diazotyramineのサルモネラ菌TA100及びTA98に対する変異原性は、1mg当たりS9mix非存在下で、各々112,000及び72,000であった。これらの変異原性はS9mixを添加することにより4/5~1/2に減少した。1-Nitrosoindole-3-acetonitrileの変異原性は、1mg当たりS9mix非存在下でTA100に対して45,000、TA98に対して30,000であった。これらの変異原性は、3-diazotyramineの場合の異なりS9mixの添加により1/10以下に減少した。

3-Diazotyramine及び1-nitrosoindole-3-acetonitrileの変異原性をチャイチーズハムスター肺細胞のジフテリア毒素耐性細胞出現を指標として調べた。その結果、これら2つの化合物はこの哺乳動物細胞に対しても直接変異原性を示すことがわかった。3-Diazotyramine及び1-nitrosoindole-3-acetonitrile各々1mgが10⁶生存細胞当たり誘発した変異細胞数は8,300及び15,000であった。これらの変異活性はN-nitrosomethylurea及びN-nitrosodimethylamineのそれらにはほぼ匹敵するものであった。

次に、tyramineと亜硝酸との反応により生成する3-diazotyramineの発癌実験をF344雄ラットを用いて行った。実験開始時のラットは5週令であった。化学合成した3-diazotyramineをイオン交換水に0.1%の濃度で溶かして動物に投与した。実験は116週で終了した。その結果、3-diazotyramineを投与したラット28頭中19頭に口

腔内の扁平上皮癌の発生が認められた⁹⁾。腫瘍発生部位は舌のつけ根近傍の口腔底と思われる。尚、この腫瘍は同系ラットに移植が可能であった。

6 変異原前駆物質の分布

日本で製造された8種類のしょう油のtyramine含量を測定した。その結果、6種類のしょう油には1ml当たり、660~2,250 μ gと多量のtyramineが含まれていることがわかった。残り2種類のしょう油には1ml当たり、17及び18 μ gのtyramineが存在していた^{6,10)}。Tyramineはしょう油以外にも各種チーズに1g当たり、29.8~953 μ gと多量に含まれていることが報告されている^{11,12)}。さらに、豆みそ、肉エキス及びビール等の食品にも存在することが知られている^{12,13)}。

日本で製造された8種類のしょう油中のMTCA含量も測定し、1ml当たり、82~678 μ g存在していることがわかった^{3,10)}。MTCAは日本酒にも含まれていることが報告されている¹⁴⁾。

白菜より分離されたindole-3-acetonitrile、4-methoxyindole-3-acetonitrile及び4-methoxyindole-3-aldehydeの収量は、白菜300gより各々80 μ g、60 μ g及び720 μ gであった⁷⁾。Indole-3-acetonitrileは植物生長ホルモンとして知られており、各種野菜に存在している^{15,16)}。これら3つのインドール化合物ばかりでなく、環境中に普遍的に存在しているtryptophan及びtryptamine等のインドール化合物も、亜硝酸処理により直接変異原性を示すことが知られている^{17,18)}。又、そら豆からは変異原前駆物質として4-chloro-6-methoxyindoleが単離されている¹⁹⁾。

7 おわりに

Tyramine、MTCA及びインドール化合物は各種食品に広く存在している。したがって、これら変異原前駆物質は人癌発生に関与している可能性が高い。しかし、tyramine以外の変異原前駆物質の亜硝酸処理により生成する変異原物質に癌原

性が有るか否かはまだわかっていない。又、tyramine、MTCA及びインドール化合物が、人の胃内で亜硝酸と反応して変異原物質を生成するか否かも明らかにされていない。今後、これらの点を解明し、人癌特に胃癌の原因との関連性を検討する必要がある。

この度の奨励賞の受賞にあたり、色々御配慮いただきました本学会の諸先生方に深く感謝いたします。又、本研究は多くの方々の協力があり初めてなしたものであり、共同研究者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Fine, D. H., B. C. Challis, P. Hartman, J. Van Ryzin : Endogenous synthesis of volatile nitrosamines : Model calculations and risk assessment. In : *N — Nitroso Compounds : Occurrence and Biological Effects*, (Bartsch, H., et al., eds.), IARC Sci. Publ. No. 41, IARC, Lyon, 379—396, 1982.
- 2) Stuehr, D. J., M. A. Marletta : Mammalian nitrate biosynthesis : Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 7738—7742, 1985.
- 3) Wakabayashi, K., M. Ochiai, H. Saitô, M. Tsuda, Y. Suwa, M. Nagao, T. Sugimura : Presence of 1 — methyl — 1, 2, 3, 4 — tetrahydro — β — carboline — 3 — carboxylic acid, a precursor of a mutagenic nitroso compound, in soy sauce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 2912—2916, 1983.
- 4) Wakabayashi, K., M. Nagao, M. Ochiai, T. Tahira, Z. Yamaizumi, T. Sugimura : A mutagen precursor in Chinese cabbage, indole — 3 — acetonitrile, which becomes mutagenic on nitrite treatment. *Mutat. Res.*, 143 : 17—21, 1985.

- 5) Wakabayashi, K., M. Nagao, T. H. Chung, M. Yin, I. Karai, M. Ochiai, T. Tahira, T. Sugimura : Appearance of direct-acting mutagenicity of various foodstuffs produced in Japan and Southeast Asia on nitrite treatment. *Mutat. Res.*, 158 : 119—124, 1985.
- 6) Ochiai, M., K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura : Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite. *Gann*, 75 : 1 — 3, 1984.
- 7) Wakabayashi, K. M. Nagao, T. Tahira, Z. Yamaizumi, M. Katayama, S. Marumo, T. Sugimura : 4 — Methoxyindole derivatives as nitrosable precursors of mutagens in Chinese cabbage. *Mutagenesis*, in press, 1986.
- 8) Wakabayashi, K., M. Nagao, T. Tahira, H. Saitô, M. Katayama, S. Marumo, T. Sugimura : 1 — Nitrosoindole — 3 — acetonitrile, a mutagen produced by nitrite treatment of indole — 3 — acetonitrile. *Proc. Jpn. Acad.*, 61 : 190—192, 1985.
- 9) Nagao, M., K. Wakabayashi, Y. Fujita, T. Tahira, M. Ochiai, S. Takayama, T. Sugimura : Nitrosatable precursors of mutagens in vegetables and soy sauce. *Proceedings of the 16th International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund*, 12—14 November 1985, Tokyo (Japan), in press, 1986.
- 10) Wakabayashi, K., M. Nagao, M. Ochiai, M. Tsuda, Z. Yamaizumi, H. Saitô, T. Sugimura : Presence of 1 — methyl — 1, 2, 3, 4 — tetrahydro — β — carboline — 3 — carboxylic acids and tyramine as precursors of mutagens in soy sauce after nitrite treatment. In : *N — Nitroso Compounds : Occurrence, Biological Effects and*

Relevance to Human Cancer, (O'Neill, I. K., et al., eds.), IARC Sci. Publ. No. 57, IARC Lyon, 17—24, 1984.

- 11) Blackwell, B., L. A. Mabbitt : Tyramine in cheese related to hypertensive crises after monoamine-oxidase inhibition. *Lancet*, 1 : 938—940, 1965.
- 12) Yamamoto, S., S. Wakabayashi, M. Makita : Gas — liquid chromatographic determination of tyramine in fermented food products. *J. Agric. Food Chem.*, 28 : 790—793, 1980.
- 13) Smith, T. A. : Amines in food. *Food Chemistry*, 6 : 169—200, 1981.
- 14) Sato, S., M. Tadenuma, K. Takahashi, N. Nakamura : Configuration of sake taste. VI. Rough taste components. 3. Tetrahydroharman — 3 — carboxylic acid. *Nippon Jojo Kyokai Zasshi*, 70 : 821—824, 1975.
- 15) Henbest, H. B., E. R. H. Jones, G. F. Smith : Isolation of a new plant-growth hormone, 3 — indolylacetonitrile. *J. Chem. Soc.*, 3796—3801, 1953.
- 16) Okamoto, T., Y. Isogai, T. Koizumi, H.

Fujishiro, Y. Sato : Studies on plant growth regulators. III. Isolation of indole — 3 — acetonitrile and methyl indole — 3 — acetate from the neutral fraction of the Moyashi extract. *Chem. Pharm. Bull.*, 15 : 163—168, 1967.

- 17) Ohta, T., M. Isa, Y. Suzuki, N. Yamahata, S. Suzuki, T. Kurechi : Formation of mutagens from tryptophan by the reaction with nitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 100 : 52—57, 1981.
- 18) Ochiai, M., K. Wakabayashi, T. Sugimura, M. Nagao : Mutagenicities of indole and 30 derivatives after nitrite treatment. *Mutat. Res.*, in press, 1986.
- 19) Yang, D., S. R. Tannenbaum, G. Büchi, G. C. M. Lee : 4 — Chloro — 6 — methoxyindole is the precursor of a potent mutagen (4 — chloro — 6 — methoxy — 2 — hydroxy — 1 — nitroso-indole — 3 — oxime) that forms during nitrosation of the fava bean (*Vicia faba*). *Carcinogenesis*, 5 : 1219—1224, 1984.

シンポジウム：環境化学物質の変異原性とそのとらえ方

司 会： 松 島 泰次郎（東京大学医科学研究所）

滝 澤 行 雄（秋田大学医学部）

緒 言

発癌物質は人間集団や実験動物での研究によって、化学物質と癌との関係が明らかにされている。Doll は癌の80%は環境を規制することにより予防できると述べており、環境因子を同定、定量できるならば、戦略としての意義は大きい。

人類が作り出した化学物質は、chemical abstracts に登録されたものだけで1983年現在600万種類を超え、このうち世界中で工業的に生産されている化合物の種類は約5万種程度といわれている。また、わが国で生産、使用されている化合物の種類は約2万種程度と推定されており、これらが環境中に放出されてくる。

さて、環境化学物質の定義は必ずしも明確でないが、「環境」および「化学物質」の定義については国際機関等の化学物質対策の動きのなかでそれぞれに触れられている。EC（ヨーロッパ共同体）では「環境」とは水、大気、土壌ならびにこれらの間のみならず、これらとあらゆる生物の間の関係を意味する、と定義づけており、また、米国連邦議会事務局の「環境由来の発ガンのリスクを判定する技術評価」の報告書には、大気、水、土壌のほか飲食、喫煙、放射線、職業曝露、薬物性行動の諸側面を含む人間と相互作用をもつすべてのものを含むとしている。

ところで、化学物質は一般的には化学元素、天然に存在する、あるいは工業的に製造されたそれらの化合物として理解されている。しかし、わが国の「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律（以下、化審法という）」では、「元素または化合物に化学反応を起こさせることにより得られる化合物」、つまり、人工的に合成あるいは誘導された物質と解される。したがって、天然物から抽出、精製された物質（天然添加物）や発酵工学的に製造される物質、ダイオキシンやベンゾフランなどのような副生する不純物質は対象外となる。

本シンポジウムでは環境化学物質を広義にとらえ、環境との相互作用により癌を誘起する主要な役割をもつ物質と考えることにした。最近の15年間、潜在性発癌物質の確認方法の一つとして Ames 試験や各種の短期試験が開発され、すでに多数の変異原性をもつ環境化学物質が生活環境から次々と検出されてきている。人間集団での十分な疫学的証拠が得られない現段階では、人間に対する発癌性は、変異原性の結果から類推しなければならない場合が多い。

ここでは環境由来の発癌、遺伝毒性のリスクを判定する技術の今日的な評価を求めて、四つの立場から首題のシンポジウムを企画した。

試 験 方 法 の 面 か ら

国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門 黒 田 行 昭

1 はじめに

環境中に存在する変異原物質は、最近10年ばかりの間に種々の検出系を用いて効率よく検出されるようになった。一般に化学物質の変異原性検出のための試験方法として必要な条件は、

- 1) できるだけ短期間に検出ができること。
- 2) 試験実施に要する経費が少なくすむこと。
- 3) 試験実施のための設備、備品などの費用が少なくすむこと。
- 4) 試験方法に高度の熟練を要しないこと。

などがある。

生物を用いた変異原性の短期検出法としては、現在までにバクテリアから、酵母、昆虫、培養細胞などを含めて100種以上の方法が開発されている。それらの中で最も簡便な方法としてはAmesら(1975)¹⁾によって開発されたサルモネラ菌を用いた短期検出法があり、1979年アメリカの環境変異原情報センターが集めたAmesテストによって変異原性がしらべられた化学物質の数はすでに2,600種にのぼっており、その後もその数は急速に増加している。

しかし、一方毎年工業的に生産される化学物質の数は、アメリカだけでも25兆円に達し、現在使用されている化学物質の数は70,000種にのぼるといふ。このようなAmesテストの結果得られた化学物質の変異原性が果して人間のがんや遺伝にどのような影響を与えるのであろうか。人間を含む高等動物の細胞には、その構造や生化学的性質がバクテリアと異った多くのしくみがあり、とくに変異原物質に対する代謝活性化や失活化、またDNA

傷害の性質、その修復機構、変異形質の発現のしくみなどが異なる。

このようなことから、環境化学物質の人間に対する影響を知るためには、どのような生物を使ってどのような試験方法を用いればよいのであろうか。サルモネラなど細菌を用いて得られた結果とカビや酵母、昆虫、培養細胞、さらには実験動物などを用いた変異原検出とはどのような点がどのように異なるのか。それぞれの試験方法の特性やそれらによって得られる結果を比較しながら、変異原検出法のあるべき方向性の一端について述べてみたい。

2 変異原の試験方法とその特性

化学物質の変異原性をしらべる試験方法としては、すでに述べたサルモネラや大腸菌などの細菌を用いる方法から、酵母、植物、昆虫など動植物の細胞や個体を使った試験方法があり、さらにヒトやマウス、ハムスターなどの培養細胞を使った試験方法、実験動物を使ったものなど多種多様である。これらの各試験方法は変異原によって、細胞内の遺伝子や染色体に生じた傷害を効率よく検出する方法が考案されており、そのあらましは表1に示した。

この表に示されているように検出系によって検出される遺伝的傷害の種類に相違があり、細菌では遺伝子突然変異しか検出できないが、菌類以上の真核生物の検出系では遺伝子突然変異のほか染色体異常も検出できる。また遺伝子突然変異には細胞の増殖に必要な栄養分の要求性や種々の薬

表一 1 種々の変異原性試験法によって検出される遺伝的傷害の種類 (The Council of the EMS, 1975より改写)

試 験 法		検 出 さ れ る 傷 害 の 種 類									
		染 色 体 異 常					遺 伝 子 突 然 変 異				誘発組 換え
分 類	生 物 種	優性 致死	転座	欠失およ び重複	不分離	姉妹染色 分体交換	小核 形成	前進およ び復帰	特定 座位	DNA 修復	DNA 切断
細菌	サルモネラ菌							+			
	大腸菌							+			
	枯草菌							+		+	
菌類	アカバシカビ			+	+			+	+		
	コウジカビ				+			+	+		+
	酵 母	+			+			+	+		
植 物	ソラマメ		+	+	+						
	ムラサカツユクサ		+	+	+			+			
昆 虫	キイロシヨウジョウバエ	+	+	+	+			+	+		
	ハブラブラコン	+	+					+	+		
	カイコ	+						+	+		
培養哺乳類 細胞	ヒ ト		+	+	+	+	+	+		+	+
	チャイニーズ・ハムスター		+	+	+	+	+	+		+	+
	マ ウ ス		+	+	+	+	+	+		+	+
実験動物	マ ウ ス	+	+	+	+	+	+		+		
	ラ ッ ト	+	+	+	+	+	+			+	
	ヒ ト		+	+	+	+	+				

剤に対する抵抗性、DNAに生じた傷害の修復能、DNA分子鎖の切断などがあり、また染色体異常には不分離現象による数の異常や欠失、重複、転座、切断などによる構造の異常、姉妹染色分体交換や小核形成など種々の異った機構によって生ずる異常があり、これらの検出も生物の種類と試

表一 2 種々の変異原性試験法の特徴 (The Council of the EMS, 1975より改写)

試 験 法	検索期間	通 常 経 費	設 備 経 費	検 索 の 容 易 さ	
				遺伝子突然変異	染 色 体 異 常
微生物 (代謝活性化)				きわめてやさしい	
サルモネラ菌	2〜3日	きわめて安価	安 価	きわめてやさしい	
大 腸 菌	2〜3日	きわめて安価	安 価	きわめてやさしい	
枯 草 菌	2〜3日	きわめて安価	安 価	きわめてやさしい	
酵 母	2〜5日	中 程 度	安 価	やさしい	
アカバシカビ	1〜3週	中 程 度	中 程 度	非常にやさしい	やさしい
哺乳類培養細胞 (代謝活性化)				きわめてやさしいかやさしい	やさしい
宿主経路法					
微 生 物	2〜7日	安価から中程度	安価から中程度	やさしい	
哺 乳 類 細 胞	2〜5週	中程度から高価	中 程 度	やさしい	やさしい
植 物					
ソ ラ マ メ	3〜8日	安 価	安 価	きわめてやさしい	
ムラサキツユクサ	2〜5週	安価から中程度	中 程 度	きわめてやさしい	
昆 虫					
キイロシヨウジバエ	2〜7週	中 程 度	中 程 度	やさしいかきわめてやさしい	やさしいかきわめてやさしい
カ イ コ	2〜10日	中 程 度	中 程 度	やさしいかきわめてやさしい	
実験動物					
優性致死突然変異	2〜4月	中程度からやや高価	中 程 度		
転 座	5〜7月	中程度からやや高価	中 程 度		
血液および骨髓細胞	1〜5週	中 程 度	中 程 度		非常にやさしい やさしい
特定座位突然変異	2〜3月	高価からきわめて高価	高価からきわめて高価		

験方法によって検出できるものとできないものがある。化学物質の種類によって、遺伝的傷害の与え方に相違があり、それらをかなり広い範囲にわたって補促、検出するには1つの検出系では不十分で、いくつかの異った検出系を組み合わせることが必要である。

このような種々の変異原の検出系には最初に述べた検出に必要な期間や設備、通常経費、検索の容易さなどの点でかなりの相違がある。種々の変異原検出系について、このような検出を行う際の難易度の比較を表2に示した。

一般に検出系に使用する生物の種類が簡単で下等な生物ほど検出が容易で、逆に複雑で高等な生物ほど検出に手間がかかる。たとえば細菌や酵母では、2~3日の短期間に検出できるが、培養細胞や植物、昆虫では2~7週間を必要とし、さらに実験動物では2~7ヶ月の期間を必要とする。また発がんの実験などでは、さらに長期の歳月を必要とする。

3 変異原性とはん原性との相関

このような種々の変異原検出系の中で、これまで多くの化学物質についてその変異原性を検出するのに最も多く使用されているのは、サルモネラ菌を用いたAmesの系である。これは上にも述べたようにわずか2~3日で変異原性の検出できること、それに検出に要する経費が少なくすむことや、さらに特別な技術を必要としないことなどである。これらの化学物質の変異原性検出の目的

の1つは、遺伝的傷害を与える物質の検索を通して、そのがん原性を検索することにある。1978年にNagaoとSugimura³⁾により発表されたアメリカ、イギリス、日本の各研究者による多くの化学物質の変異原性についての肝ミクロソーム代謝活性化を加えたAmesテスト法による結果とがん原性との相関関係は表3のようになり、変異原性とはん原性とは一致した化学物質の比率はMcCannら(1975)⁴⁾の283の化学物質について88.7%、Purchaseら(1976)⁵⁾の120の化学物質について92.5%、NagaoとSugimura(1978)³⁾の結果のはっきりした282の化学物質について81.0%でかなり高い一致率を示した。このようなAmesの系で高率にがん原性物質をその変異原性によって検出できるが、10%~20%の化学物質はがん原性があるにもかかわらず変異原性が検出されなかったり、またはがん原性のないものに變異原性が検出されたりするものがある。

Amesの系で変異原性が検出されないがん原物質としてはBHCやDDTのような塩化物、またDimethylhydrazineのように生体内の腸内細菌によって始めて活性化されるような特殊な代謝が必要な物質、さらにDiethylstilbestrolやEthioestroradiolのようなホルモン類は、発がんのイニシエーターというよりはプロモーター作用をもつと考えられThioureaやThioacetamideなどとともに変異原性は検出されない。また、Ethionineのように細菌によって生産されるものも、Amesの系で

表一 3 Amesテストによる化学物質の変異原性とはん原性との相関関係³⁾

変異原性	がん原性	McCannら ⁴⁾	Purchaseら ⁵⁾	NagaoとSugimura ³⁾
+	+	157	53	136
+	-	14	4	21
-	-	94	58	60
+	+	18	5	25
+	?			178
-	?			207
計		283	120	627
一致率 (%)		88.7	92.5	81.0

表—4 肝ミクロソームを加えた Ames の系で変異原性が検出されなかったがん原性物質 (McCann と Ames, 1976)

(1) 代謝活性化を必要とする物質	DDE, Dieldrin, Carbon tetrachloride, Dimethylnitrosamine, DMB, Natulan, Dimethylhydrazine
(2) 細菌相によって活性化される物質	Cycasin, Dimethylhydrazine
(3) がん原性が疑わしいがん原性物質	Auramine, para-Rosaniline
(4) 突然変異でない機構をもつがん原性物質	Aminotriazole, Thioacetamide, Thiourea
(5) その他の物質	Ethionine, Hydroxysafrole, Phenobarbital, Urethane

は変異原性が検出されない。そのほか Safrole や Urethane など、肝ミクロソームの代謝活性化以外の活性化が必要と思われるものも、Ames の系では変異原性が検出されていない。

一方、がん原性がないのに Ames の系では変異原性が検出されるものとしては、Captan や Folpet のようにがん原性についての試験に使用するマウスの系統を変えると、陽性に出るものや Nitrofurantoin のようにサルモネラなど細菌にのみ存在するニトロ還元酵素により活性化されるが、動物体内の酵素では活性化されないと考えられるもの、そのほか使用する化学物質の純度に問

題があって、変異原性のある物質の混入のため結果があやまって発表されたものなどもある。

McCann と Ames (1976)⁹⁾ が肝ミクロソームを添加した Ames の系で検索した 175 種のがん原物質の中で変異原性が検出されなかった 18 種の物質を表 4 に示した。また Simmon (1979) が同じく肝ミクロソームを添加した Ames の系で検索した 101 種の化学物質の中で変異原性の検出されなかったがん原物質が 35% あったが、その主なものを表 5 に示した。この中にはその後、検索法が改良され変異原性が検出されるようになった Cycasin のようなものもあるが、依然として変異

表—5 肝ミクロソームを加えた Ames の系で変異原性が検出されなかったがん原性物質 (Simon, 1976)

(1) 前がん原性物質	Auramine, Diphenylmethane, Rosaniline, Dimethyl hydrozine, Hyrazine sulfate, Natulan, Nitrosodiethylamine, Phenyl dimethyl triazine, Aminotriazole, Hydroxysafrole, Safrole, Acetamide, Thioacetamide, Thiourea, Urethan, Ethionine
(2) 最終がん原性物質	Benzyl chloride, Methyl iodide
(3) 金属 その他	Beryllium sulfate, Lead acetate, Titanocene dichloride, Phorbol, TPA, Trihydroxyanthracene.

原性の検出されないがん原物質が存在する。

このようなことから、1983 年 WHO の化学物質の遺伝毒性とがん原性の短期試験による安全性の国際プログラム (International Programme on Chemical Safety: 略して IPCS) では、微生物の系

で変異原性が疑わしいが、検出されない 8 種のがん原物質について、陰性対照の 2 種の非がん原物質を加えて、世界各国の 113 名の研究者に依頼して、酵母、ショウジョウバエ、培養細胞など真核生物を使った突然変異、染色体異常、形質転換、

表—6 WHO の化学物質の遺伝毒性とがん原性に関する短期試験による安全性の国際プログラム (IPCS) で使用された検索系

第 1 部 体外試験系

- 1 サルモネラ菌 (TA97, 98, 100, 102, 1535, 1537, 1538, TM677)
- 2 カビ
 - (1) 突然変異 (D7, Asper35, XU185, P1, D6, D61-M, Mito D5)
 - (2) 遺伝子交換 (D7, D7-144, PU-3, JD-1)
 - (3) 交さ (D7, Asper 35, D6, D61-M)
 - (4) 異数性 (D6, D61-M, Asper 35)
- 3 ショウジョウバエ 体細胞変異 (翅スポット、複眼スポット)
- 4 哺乳類培養細胞
 - (1) 代謝共同 (V79細胞)
 - (2) トランスフォーメーション (C3H細胞、SHE細胞、SHE/SA7細胞、RLU/FRE細胞、CHO細胞)
 - (3) DNA 単鎖切断 (ラット肝細胞、CHO細胞)
 - (4) 不定期 DNA 合成 (ラット肝細胞、HeLa細胞)
 - (5) 染色体異常 (CHO細胞、LYM細胞、CHI-L細胞、CHL細胞、RL4細胞)
 - (6) 姉妹染色分体交換 (CHO細胞、V79細胞、RL4細胞)
 - (7) 小核テスト (CHO-MN細胞)
 - (8) 倍数性 (CHL細胞、CHI-L細胞、RL4細胞)
 - (9) 異数性 (CHI-L細胞)
 - (10) 突然変異 (L5178細胞、V79細胞、CHO細胞、ヒトリンパ球)

第 2 部 体内試験系

- 1 非哺乳類真核細胞系
キイロショウジョウバエの伴性劣性致死
- 2 哺乳動物系
齧歯類優性致死、マウス皮膚スポット試験
- 3 哺乳類細胞遺伝学的試験—生体系
染色体異常 (分裂中期解折)、小核試験、姉妹染色分体交換 (SCE)
- 4 肝および皮膚試験
肝特異性試験、皮膚特異性試験
- 5 その他の生体試験
肺腺腫、マクロファージ型転換試験、生体内不定期 DNA 合成、DNA 傷害
- 6 齧歯類の精子形態
- 7 限定された発がん性の試験

表一 7 WHO の化学物質の遺伝毒性とがん原性に関する短期試験による安全性の国際プログラム (IPCS) の結果⁸⁾

化学物質	細菌	カビ	昆虫	培 養 細 胞			
				突然変異	染色体異常	DNA傷害	トランス フォーメーション
がん原性物質							
Hexamethyl phosphoramide	-	+	+	+	+	+	+
<u>o</u> -Toluidine	-	+	+	+	+	+	+
Benzene	-	+	+	±	+	+	+
Safrole	-	+	+	+	+	+	+
Acrylonitrile	-	+	+	+	+	+	+
Diethylhexyl phthalate	-	+	+	+	+	+	+
Diethylstibestrol	-	+	-	-	+	+	+
Phenobarbital	±	+	-	+	+	-	±
非がん原性物質							
Benzoin	-	+	-	+	+	-	-
Caprolactam	-	±	+	-	+	-	+

DNA 損傷など表 6 のような検出系を用いて、その変異原性がしらべられ、サルモネラを用いた Ames の系での結果と比較された。

8 種のがん原物質は、Acrylonitrile (ACN), o-Toluidine (TOL), Hexamethylphosphoramide (HMPA), Safrole (SAF), Diethylstilboestrol (DES), Benzene (BEN), Phenobarbitone (PB), Diethylhexylphthalate (DEHP) でいずれも DNA との相互作用が知られているか、推測されているもので、微生物の系では陰性と考えられているものである。陰性対照の非がん原物質としては、Benzoin (ZOIN) と Caprolactam (CAP) が選ばれた。各研究者によって得られた結果を集計したものを、表 7 に示した。(Ashby ら編, 1985)⁸⁾

Ames のサルモネラ菌を用いた試験系では、8 種のがん原性物質の陽性率はわずか 15% であるが、カビ、ショウジョウバエ、培養細胞を用いた染色体異常、突然変異、トランスフォーメーションなどの各種短期試験系によるこれらがん原性物質の陽性率は 43~64% であり、Ames の系での変異原性が検出されない多くのがん原性物質がこれらの真核細胞を用いた短期試験法ではかなり高い

率で変異原性が検出される。とくに Acrylonitrile は 81%、o-Toluidine は 67%、HMPA は 62% と高く、一方ではこのような試験系でも DEHP は 20%、Phenobarbitone は 34% と陽性率は低い。また非がん原性物質についてはカビの異数性試験や培養細胞の姉妹染色分体交換では変異原性が全く検出されないが、カビの突然変異やショウジョウバエの体細胞試験系では 40~50% の陽性率を示す。

この中の培養細胞での遺伝子突然変異を相当した著者を含む 7 人の研究者の試験結果を Ames のサルモネラ菌での結果と比較したものを図 1 に示した。

8 種のがん原性物質の中で HMPA, Safrole, DES, Benzene などほとんど研究者が陽性の試験結果を得ているのに対してサルモネラの系ではすべて陰性の結果が示されており、明らかな対照を示している。

WHO ではさらに第 2 段階として表 6 に示したようなショウジョウバエや哺乳動物の個体、肝や皮膚、精子の形態、限られた発がん試験など生体を使った試験系で、Benz (a) pyrene, と Pyrene, 2-Acetylaminofluorene (2 A A F) と 4

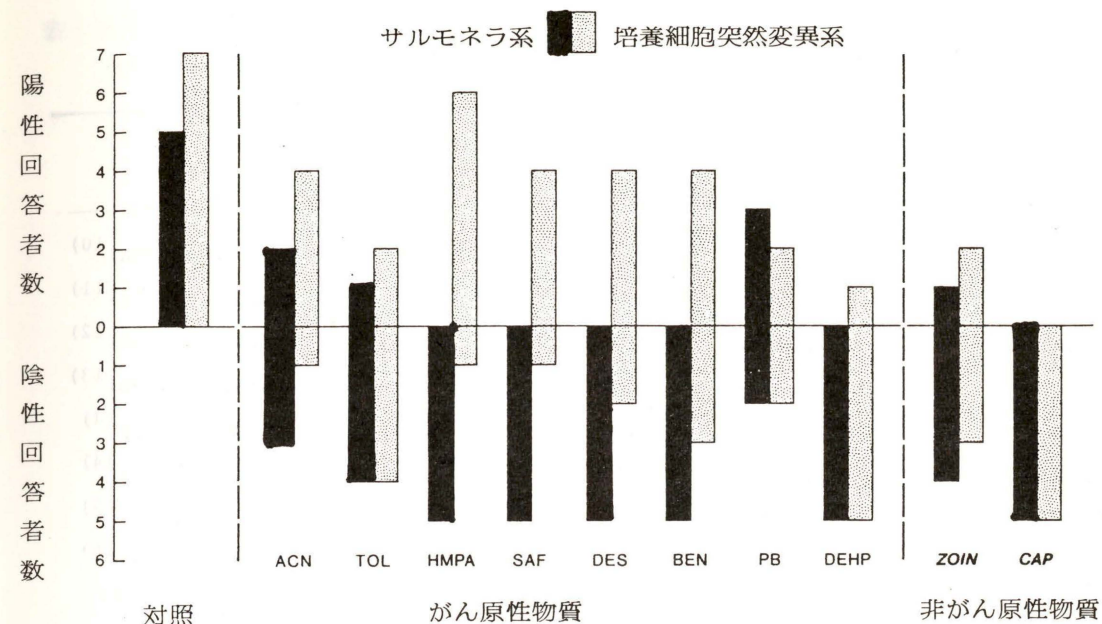


図 1 8 種のがん原性物質と 2 種の非がん原物質について、培養細胞の突然変異系とサルモネラ菌の系とでの変異原性陽性率の比較 (Ashby ら, 1985)⁸⁾

-Acetylaminofluorene (4AAF) のようにがん原性物質と非がん原性物質の 2 つをペアにした変異原性の検索が行われている。

4 哺乳類培養細胞を用いた試験法の特性

著者の研究室ではヒト胎児細胞を含む哺乳類の培養細胞を用いて 8-Azaguanine (8AG), 6-Thioguanine (6TG), Ouabain (OUA) などの抵抗性を指標として各種化学物質の変異原性について研究を行っている。ヒト胎児の肺細胞を用いた 8AG 抵抗性突然変異の検出系では表 8 に示したような各種化学物質の変異原性が検出され、その変異原性の強度は強いものと弱いものとは 5,000 倍以上の差がみられた。

哺乳類の培養細胞を用いた突然変異試験では、

上述 WHO の IPCS の結果でもみられたように Ames の系など細菌では変異原性の認められないかなりのがん原物質について変異原性が検出された。著者の研究室でも単独では変異原性が検出されない Aniline その他の多くの Ames 陰性の化学物質について 8AG または 6TG 抵抗性突然変異の誘発が認められた。

Aniline は NIH の報告では Fischer 系ラットの脾臓に肉腫、繊維腫、繊維肉腫、血管肉腫などを誘発することが知られている。Ames の系では Norharman などと共存すれば変異原性が認めれるが、単独では変異原性が検出されない。そのほか哺乳類培養細胞でもチャイニーズ・ハムスターの Don 細胞や CHL 細胞では染色体異常や姉妹染色分体交換に対しては陰性である。

表一 8 ヒト胎児細胞を用いた化学物質の 8 AG 抵抗性突然変異誘発作用 (黒田, 1983)

化学物質	LD50 ($\mu\text{mol-hr}/\text{ml}$)	誘発突然変異率 ($\times 10^{-5}$)		文 献
		LD50の濃度での	$\mu\text{mol-hr}/\text{ml}$ 当たり	
Sterigmatocystin	0.004	10.2	2,550	Kuroda (1979a) ¹⁰⁾
Furylfuramide (AF2)	0.08	58.7	734	Kuroda (1975a) ¹¹⁾
Phloxine	0.07	24.3	347	Kuroda (1975b) ¹²⁾
Trp-P-1	0.06	10.0	167	Kuroda (1979b) ¹³⁾
Trp-P-2	0.02	2.8	140	Kuroda (1981) ¹⁴⁾
Glu-P-1	2	2.7	1.35	Kuroda (1981) ¹⁴⁾
EMS	20	24.5	1.23	Kuroda (1974) ¹⁵⁾
Sodium bisulfite	20	11.7	0.59	Kuroda (1977) ¹⁶⁾
Quercetin	1.32	0.66	0.5	Kuroda (1982) ¹⁷⁾

著者らは Aniline のほかその誘導体である *o*-Chloroaniline, *m*-Chloroaniline, *p*-Chloroaniline, Nitrobenzene, Hexachlorobenzen などについてチャイニーズ・ハムスター V79細胞を用いて 8AG, OUA 抵抗性を指標としてこれらの変異原性をしらべた結果、いずれにも変異原性が検出された(黒田・浅倉, 1982¹⁸⁾; Kuroda と Asakura, 1983¹⁹⁾)。これらの Aniline およびその誘導体の変異原性の強さは表 9 に示したようになり、チャイニーズ・ハムスター V79細胞で検出される他の既知変異原に比べると変異原性の強度は弱い、S-9Mix などの代謝活性化なしで 8AG 抵抗性突然変異誘発作用が認められた。

これらの aniline 系化合物は、チャイニーズ・ハムスター V79細胞で 8 AG 抵抗性突然変異誘発作用が認められたが、OUA 抵抗性突然変異はほと

んど誘発されなかった(表 10)。8AG や 6TG 抵抗性突然変異は HGPRT の酵素活性の消失によって生ずるもので、HGPRT 酵素活性を失わせる遺伝子 DNA の種々の部分での塩基置換や塩基枠移動による点突然変異のほか種々の DNA 断片の欠失なども含み、とくに 8AG 抵抗性ではこのほか、細胞膜の透過性の変化なども含むと考えられている。一方 OUA 抵抗性突然変異は、主として塩基の変化による点突然変異によって起きると考えられる。Ames の系をはじめ細菌の系で検出されない多くのがん原性物質は、このような塩基の変化以外の変化を誘発するものと思われる、これらは 8AG や 6TG 抵抗性を指標した突然変異として検出されるが、OUA 抵抗性を指標とした突然変異としては検出されない。

表一 9 チャイニーズ・ハムスター V79細胞における各種化学物質による 8 AG、6 TG、OUA 抵抗性突然変異の誘発作用

化学物質	Ames テスト	遺伝的マーカー		
		8AG抵抗性	6TG抵抗性	OUA抵抗性
EMS	+	+	+	+
MMS	+	+	+	±
MNNG	+	+	+	+
Trp-P-1	+	+		±
Nitrobenzen	-	+		±
Aniline	-	+		-
<i>o</i> -Chloroaniline		+		-
<i>m</i> -Chloroaniline		+		-
<i>p</i> -Chloroaniline		+		-
Hexachlorobenzen		+		-
Chloroform		+		-

表一 10 チャイニーズ・ハムスター V79細胞におけるアニリンおよび各種芳香族化学物質の 8 AG 抵抗性突然変異誘発作用²⁰⁾

化学物質	S-9 Mix	LD50 ($\mu\text{mole-hr}/\text{ml}$)	突然変異誘発率 ($\times 10^{-5}$)	
			$\mu\text{mole-hr}/\text{ml}$ 当り	$\mu\text{g-hr}/\text{ml}$ 当り
Aniline	-	111	0.65	0.007
	+	66	0.19	0.002
<i>o</i> -Chloroaniline	-	20	0.12	0.001
<i>m</i> -Chloroaniline	-	16	0.26	0.002
<i>p</i> -Chloroaniline	-	16	0.26	0.002
Nitrobenzene	-	21	0.12	0.001
Hexachlorobenzene	-	1.7	0.14	0.004
EMS	-	80	0.25	0.002
MNNG	-	4×10^{-7}	80	0.54
Trp-P-1	-	0.05	46	0.22
	+	0.4	36	0.22
Trp-P-2	-	0.3	9.9	0.06
	+		373	2.27

5 諸外国における変異原性試験のガイドライン項目

以上述べたように多くの化学物質について変異原性をしらべる際に、とくにその物質のがん原性との関連で危険な物質であるかどうかを判定するためには、Amesの系などの細菌の系のみでは不十分なことは明らかである。したがって、Amesの系を補完するために各国ではいくつかの複数の変異原検出系をガイドラインとして採用している。

それらの主なものを表11に示した。各国とも微生物の系はすべて採用しているが、その他遺伝子突然変異検出系としては昆虫、培養細胞、哺乳動物の系がそれぞれ用いられている。また、染色体傷害検出系としては、カビ、昆虫はごくまれに、培養細胞、哺乳動物などでは多くの国で採用されている。その他の検出系としては、DNA傷害や修復、倍数性、精子形態異常なども使用されている。

わが国では国立衛生試験所で、サルモネラおよ

び大腸菌の突然変異と、ヒト細胞の染色体異常の検出系が最初とり上げられ、ヒト細胞やショウジョウバエの突然変異、マウスのスポット試験、哺乳動物の染色体異常、小核試験、転座、植物試験なども提案されている。

6 おわりに

環境化学物質の変異原性試験の主要な目標は、その物質の人間に対する発がん性や遺伝への影響の有無を検索することにある。これらの検索を効率よく正確に、また目標にできるだけ近づけるために、現在多くの試みが続けられている。WHOの国際プログラムもその1つであるが、今後、体内試験系の結果をふまえて、どのような検索系の組合わせが、人間に対する環境化学物質の影響を忠実に捕捉することができるかが明らかになることを期待する。

文 献

- Ames, B.N., J.McCann and E.Yamsaki : Method for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella* /mammalian microsome mutagenicity test. Mutation Res.,31 : 347—365, 1975.
- The Council of the Environmental Mutagen Society, Committee 17:Environmental mutagenic hazards. Science,187 : 503—514, 1975.
- Nagao, M. and T.Sugimura : Environmental mutagens and carcinogens. Annu. Rev. Genet.,12 : 117—159, 1978.
- McCann J., E. Choi., E.Yamasaki and B. N. Ames : Detection of carcinogens in the *Salmonella*/microsome test : Assay of 300 chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci.,72 : 5135—5139, 1975.
- Purchase, I. F. M., E.Longstaff, J. Astby, J. A. Styles, D. Anderson, P. A. Lefevre and F. R. Westwood : Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendation for their use. Nature,264 : 624—627, 1976.
- McCann and B.N.Ames : Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test : Assay of 300 chemicals : Discussion. Proc. Nat. Acad. Sci.,73 : 950—954, 1976.
- Simmon, V. F. : *In vitro* mutagenicity assay of chemical carcinogens and related compounds with *Salmonella typhimurium*. J. Nat. Cancer Inst.,62 : 893—899, 1979.
- Ashby, J., F. J. de Serres., M.Draper, M.Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. E. Matter and M. D. Shelby (Eds.) : Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Reports of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on In Vitro Assays. Prog. in Mutation Res. 5, pp752, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, Oxford, New York,1985.
- 黒田行昭 : 環境変異原物質の強度の比較とその評価. 環境情報科学, 12 : 39—49, 1983
- Kuroda, Y.: Induction of 8-azaguanine-resistant mutations by sterigmatocystin in cultured embryonic human diploid cells. Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Japan, 29 : 38—39, 1979 a .
- Kuroda, Y.: Mutagenesis in cultured human diploid cells. III. Induction of 8-azaguanine-resistant mutations by furylfuramide. Mutation Res.30 : 229—238, 1975 a .
- Kuroda, Y.: Mutagenesis in cultured human diploid cells. IV. Induction of 8-azaguanine-resistant mutations by phloxine, a mutagenic red dye. Mutation Res.,30 : 239—248, 1975 b .
- Kuroda, Y.: Mutagenic activity of tryptophan pyrolysis products on embryonic human diploid cells in culture. Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Japan,29 : 39, 1979 b .
- Kuroda, Y.: Mutagenic activity of Trp-P-2 and Glu-P-1 on embryonic human diploid cells in culture. Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Japan,31 : 41—46.
- Kuroda, Y.: Mutagenesis in cultured human diploid cells. II. Chemical induction of 8-azaguanine-resistant mutations. Japan. J. Genet.,49 : 389—398, 1974.
- Kuroda, Y.: Induction of 8-azaguanine-resistant mutation by sulfite in cultured embryonic human diploid cells. Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Japan.27 : 30—40, 1977.
- Kuroda, Y.: Mutagenic activity of quercetin on embryonic human diploid cells in culture. Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Japan,32 : 52, 1982.
- 黒田行昭・浅倉真澄 : 哺乳類培養細胞に対する化学物質の突然変異誘発作用—特にアニリ

表—11 各国における変異原性試験のガイドライン項目

国 名	機 関	遺伝子突然変異				染色体傷害				その他
		微生物	昆虫	培養細胞	哺乳動物	微生物	昆虫	培養細胞	哺乳動物	
アメリカ	Food and Drug Administration	+	+	+				+		+
	EPA-FIFRA	+		+	+	+		+		+
イギリス	Health and Safety Commission	+								+
	Dept.of Health and Social Security	+	+	+	+			+	+	+
オランダ	Pesticides Bureau of the Commission	+	+	+			+	+	+	+
	Proposed Amendment	+	+	+	+					+
ヨーロッパ	Commission of the European Communities	+	+	+	+			+	+	+
		+	+					+	+	+
日 本	国立衛生試験所	+	+		+			+	+	+
	労働安全法	+								
	農林水産省	+						+		

ン系化学物について一、組織培養研究, 1 : 30—31, 1982.

- 19) Kuroda, Y. and M. Asakura : Mutagenic activity of environmental aromatic compounds in cultured Chinese hamster cells. Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Japan, 33 : 32, 1983.

変異原性の強さとその評価

—生活関連物質の面から—

国立衛生試験所 石 館 基

1 はじめに

変異原性試験のうち、細菌復帰突然変異試験 (Ames テスト) はその代表的なものであり、労働省では職業がん予防のため、労働安全衛生法 (労働法) の中に本法を採用している。本法によって提出されたデータは労働基準局が召集した学識経験者の手で慎重に検討され、その結果、当該届出物質の製造または取扱いについて適切な措置を講ずるよう勧告される¹⁾。また、必要に応じて、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を追加するよう要請されている。

厚生省では新薬の申請 (薬事法)²⁾および、新規化学物質の登録 (化審法)³⁾に際し、Ames テストおよび染色体異常試験 (小核試験を含む) を行うよう指導している。農薬の申請には枯草菌を用いる DNA 修復試験 (Rec-assay) を含む 3 種の in vitro 系試験が要求されている⁴⁾。

いずれにせよ、被験物質の変異原性を評価するためには、ある特定の試験系に限定せず、できるだけ指標の異なる複数の試験系を組合せた上で、総合的に評価しようとするものである。この基本的な考え方は、英国環境変異原学会 (UKEMS) の小委員会でもまとめられた試験法基準⁵⁾ EC 委員会における指針⁶⁾並びに、OECD ガイドライン⁷⁾の考え方と一致している。

問題は、これらの試験で得られた結果をどのように評価すべきであるかということであろう。ある特定の試験で陽性となったとしても他の試験系で必ずしも陽性となるとは限らない。特に、in vitro 試験系 (代謝活性化を含む) で陽性となるもので、in vivo 試験系 (小核試験、優性致死試験あるいは長期発がん試験など) で陰性に終わる化合

物も少なくはない。ある特定の被験物質の変異原性に関する評価は、単に、ある試験系で陽性であるか陰性であるかという定性的な評価にとどまらず、その活性を定量的に評価し、ヒトへの安全性あるいは危険性を予測することがより重要と思われる。

2 定性的評価

現在まで蓄積されたデータでは、Ames テストが最も多く、恐らく 2,000—3,000 の化合物に関する報告があろう。哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では、約 1,000 種類、マウス小核試験では、さらに少なく 500 種類に満たないと思われる。これら 3 種類の試験で共に陽性となったものを拾って見ると、その多くは既知発がん性物質であることがわかる。その例を Table 1 に示す。

ある特定の試験系で、高い変異活性を示すような化合物は、他の試験系においても同時に陽性となり得る確率が高いが、特に、in vitro 系並びに in vivo 系試験が共に陽性となる物質については注目に価する。指標の異なる試験系で共通に陽性となる物質は、単独な試験系のみで陽性となる物質よりも、危険度はさらに高まると考えられる。なぜなら、デパートリーが広ければ、ヒトへの影響もあり得ると考えた方がよいからである。

現在本邦では、食品添加物として合成品が 347 種類、天然物由来のものが約 700 種類使用されている。これらのものの変異原性について現在、見直しが行われている⁸⁾⁹⁾。Ames テストを行うと、合成品では 16/220 (7%)、天然品では 26/93 (28%) が陽性となった。枯草菌の DNA 傷害を指標とする Rec-assay を行うと、合成品、天然品は、それぞ

Table 1 The Compounds which were positive in Ames Test, Chromosomal Aberration Tests in vitro and Micronucleus Tests in Mice.

2-AAF*	Kaempherol
Aflatoxin*	6-Mercaptopurine
Benzidine*	Methyl methanesulfonate*
Benzo(a)pyrene*	MNNG*
Bromodichloromethane	MNU*
Myleran*	2-Naphthylamine*
Cyclophosphamide*	Nitrofurantoin
4-Dimethylaminoazobenzene*	4-NQO*
7,12-DMBA*	Potassium bromate
Dimethylcarbamylnchloride*	Qunacrine mustard
DMN*	Sodium chlorite
Ethyl methansulfonate*	Thio-TEPA
Ethylene oxide	Treminon*
Hycanthone	Triethylenemelamine

* Carcinogenic

れ13/81 (16%) および31/95 (33%) であり、また、一方、チャイニーズ・ハムスターCHL細胞株を用いる染色体異常試験では、それぞれ47/219 (21%) および16/91 (18%) となった。しかしながら、これら3試験で共通に陽性となるものはそれほど多くはなく、合成品では、次亜塩素酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの2点、天然では、今のところ一種のカラメル1点に過ぎない。これらの物質についてマウス小核試験を行ってみると、いずれも陰性であり⁸⁾、長期動物実験によっても発がん性は認められなかった¹⁰⁾。in vitro系試験のいずれかで陽性となり、マウスを用いる小核試験でも陽性となったものは、合成品5/28 (18%)、天然1/12 (8%) に過ぎない。これらのうちには、臭素酸カリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、亜塩素酸ナトリウム、マルトール、二酸化塩素あるいはカカオ色素などが含まれる。このうち長期動物実験が終了し、その結果発がん性が疑われたものは、臭素酸カリウムのみである。

食品添加物のみならず、医薬品その他の生活関

連物質について行った in vitro 染色体異常試験 (合計674種類)、および、マウス小核試験 (合計65種類) の結果を定性的に Table 2 および Table 3 に示す。特に、染色体異常試験では、染色体の構造上の異常のみならず、数の異常あるいは倍数体 (polyploid) を誘発する物質も検出可能である (Table 4)¹⁰⁾。ただし、これらの作用が、生体内でどのような影響を及ぼすかについては、まだ不明である。米国 NTP で行われてきたスクリーニングの結果によれば、合計250種の化合物のうち、Ames テストで陽性と判定されたものは95種 (38%) であり¹⁰⁾、また、哺乳類培養細胞 (CHO) を用いて、染色体異常およびSCE試験を試みた合計107種の化合物のうち、陽性と判定されたものは、それぞれ35 (約33%) および66 (約62%) であったという¹⁰⁾。これらの数字は、試験に供した化合物の種類によって当然変わってくる。しかしながら、陽性となった物質に注目し、さらに定量的評価を加え、in vivo 試験で確認して行くという姿勢は、経費の節約という点でも合理的である。

Table 2 Specific Mutagenic Activities of the Compounds Isolated from Pyrolysates and Well Known Carcinogens.

Revertants/ μ g			
<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
MeIQ	661,000†	AF-2	42,000*
IQ	433,000†	MeIQ	30,000†
MeIQx	145,000†	Aflatoxin B ₁	28,000†
Trp-P-2	104,200†	MeIQx	14,000†
Glu-P-1	49,000‡	4NQO	9,900*
Trp-P-1	39,000†	IQ	7,000†
AF-2	6,500*	Glu-P-1	3,200‡
Aflatoxin B ₁	6,000†	Trp-P-2	1,800†
Glu-P-2	1,900‡	Trp-P-1	1,700†
4NQO	970*	Glu-P-2	1,200‡
B(a)P	320†	MNNG	870*
A α C	300§	B(a)P	660†
MeA α C	200§	MeA α C	120§
Lys-P-1	86§	Lys-P-1	99§
Phe-P-1	41§	Phe-P-1	23§
DEN	0.02§	A α C	20§
DMN	0.00§	DMN	0.23§
MNNG	0.00*	DEN	0.15§

* Without S9 mix; †10 μ l; ‡30 μ l; §150 μ l S9/plate.

TAKASHI SUGIMURA,

Reprinted from CANCER, Vol. 49, No. 10, May 15, 1982. Copyright, © 1982, by the American Cancer Society, Inc. J. B. Lippincott Company. Printed in U.S.A.

Table 3 Chromosomal Aberration Tests With Mammalian Cells in Culture.

Group	Negative (-)	Suspicious (\pm)	Positive (+)	Total
Food additives	169 (70%)	19 (8%)	54 (22%)	242
Medical drugs	57 (47%)	2 (2%)	62 (51%)	121
Pesticides	13 (50%)	1 (4%)	12 (46%)	26
Industrial chem.	47 (52%)	7 (8%)	37 (41%)	91
Laboratory prod.	55 (37%)	13 (9%)	82 (55%)	150
Natural products	29 (66%)	4 (9%)	11 (25%)	44
TOTAL	370 (55%)	46 (7%)	258 (38%)	674

(Ishidate, et al., 1983)

Table 4 Micronucleus Tests in Mice.

Group	Negative (-)	Positive (+)	Total
Food additives			
Synthetic	23 (82%)	5 (18%)	28
Natural	11 (92%)	1 (8%)	12
Medical drugs	4 (44%)	5 (56%)	9
Others	12 (75%)	4 (25%)	16

(Hayashi, et al., 1984)

3 定量的評価

Ames テストにおける活性の強さは、被験物質の単位濃度あたりの復帰変異コロニー数で比較することができる。杉村らのグループで行われた既知発がん性物質、あるいは、種々の熱分解産物 (pyrolysates) について比較したものを Table 5 に示す。活性が最も強いものと最も弱い物質の間には、 10^{10} 以上の開きのあることがわかる。

農薬について、白須らがまとめたところによれ

ば、228種のうち50種 (22%) が Ames テストで陽性となったが、その代表的なものの活性の強さを比較すると Fig.1 如くなるという¹⁰。この場合単位は n mol であるが、強いもの、例えばカプタンと弱いものアセフェイトとの間には、約 10^5 倍の開きがある。有機塩素系農薬には変異原性は認められないが、発がん性の知られているものも多く、この場合には、Ames テストのみならず、他の哺乳類細胞系を用いて検索する必要がある。

Table 5 Compounds Which Mainly Incuced Polyploid Cells in Mammalian Cells in Culture.

Compound	Dose (mg/ml)	Polyploid cells	Structural aberration	Ames test
Mustard oil	0.004	22 %	-	-
DES	0.02	81 %	-	-
Thiabendazole	0.05	74 %	-	-
1-Perillaldehyde	0.05	31 %	+	-
Noscapine-HCl	0.06	97 %	+	-
A α C	0.06	70 %	+	+
Me-A α C	0.13	71 %	+	+
Ethyl vanillin	0.25	43 %	-	-
Riboflavin	0.3	82 %	+	-
Metformin-HCl	1.0	27 %	±	-

(Ishidate, et al., 1983)

培養細胞を用いる染色体異常試験でも、既知発がん性物質の9割以上が陽性となる¹⁰。発がん性物質の多くは切断型 (break type) のみならず交換型 (exchange type) の異常を誘発することが知られている¹⁰。従って、染色体異常の活性の強さ (clastogenicity) を単位濃度 (mg/ml) あたりに出現する交換型異常を持つ細胞の出現率 (TR) におきかえて比較することも可能である。Fig. 2 は合計91種類の発がん性物質 (疑いのあるものも含む) を TR 値によって分類したものである。TR 値 10^4 以上を示す化合物の中には、代表的な発がん剤 4-NQO、MNNG のほか、Trp-P-1 あるいは、かなり作用の強い抗がん剤などが含まれている。最も強い活性のものと弱い活性のものとの間には、約 10^7 の開きのあることがわかる。

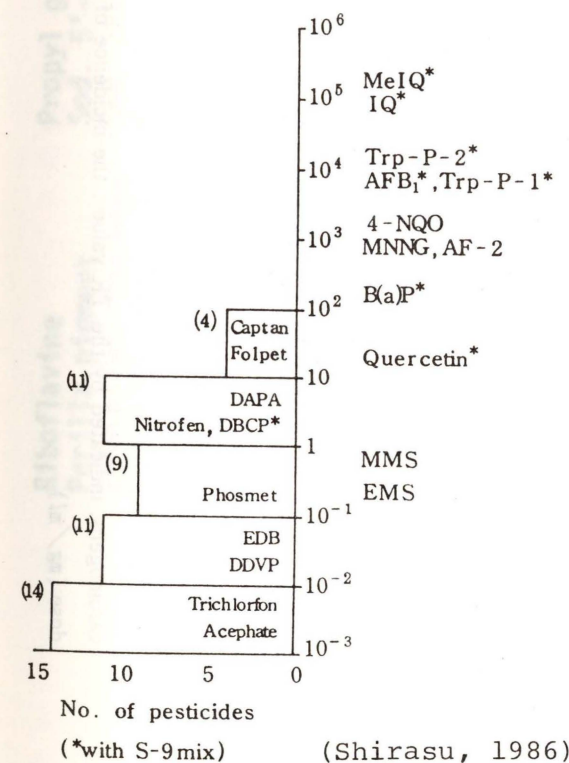
His⁺ revertants (TA98, TA100)/nmol

Fig.1. Mutagenic potential in Ames tests of well-known carcinogens and some kinds of pesticides (Shirasu, Y., 1986)

医薬品その他の生活関連諸物質のうち、染色体異常試験で陽性となった合計148種類について同様、TR値を比較すると Fig. 3 の如くなる。図の中で細かい点で囲んだ部分は、食品添加物に相当する。Fig. 2 の場合と比較して全体のピークが10-100倍、弱い方へ片寄っている。特に食品添加物は、他の物質に比べて活性が弱いことがわかる。活性の高いグループには、キャプタホルなどの農薬のほか、ニトロ化された農薬、その他の医薬品が含まれている。

前述した如く、染色体異常試験で陽性となったとしても、マウス小核試験が陽性となるとは限らない。Table 6 に示す如く、TR 値の高い物質 (多くは発がん性がある) は陽性となるが、TR 値の低い物質、特に高濃度で切断型を誘発する傾向にある物質では、陰性に終わることが多い。

4 リスクに対する評価

被験物質のリスクは、当然のことながら、その用途によって評価の仕方が異なってくる。労働法あるいは化審法で対象とするいわゆる一般化学物質については、ある限局された人々に対する有害性、あるいは、特定な区域における環境汚染を問題とする。しかしながら、医薬品、食品添加物、農薬その他の生活関連物質は、不特定多数の人々を対象としている。従って、前者よりも後者に対する規制はより厳しく、従って、より多くの毒性データが必要となる。

変異原性試験の場合もまた同様である。一般化学物質については、Ames テストおよび in vitro 染色体異常試験の両者を行えば、ある程度の有害性は予測し得るかもしれない。しかし、生活関連物質の安全性を評価するためには、そうは行かない。まず in vitro 系試験を行い、そこで疑わしい結果が得られた場合には、in vivo 系試験で確認し、必要があれば、長期動物実験を追加すべきである。

では、得られた結果をどのように総合的に評価すべきであろうか。生活関連物質を中心に考え方をまとめると次のようになる。

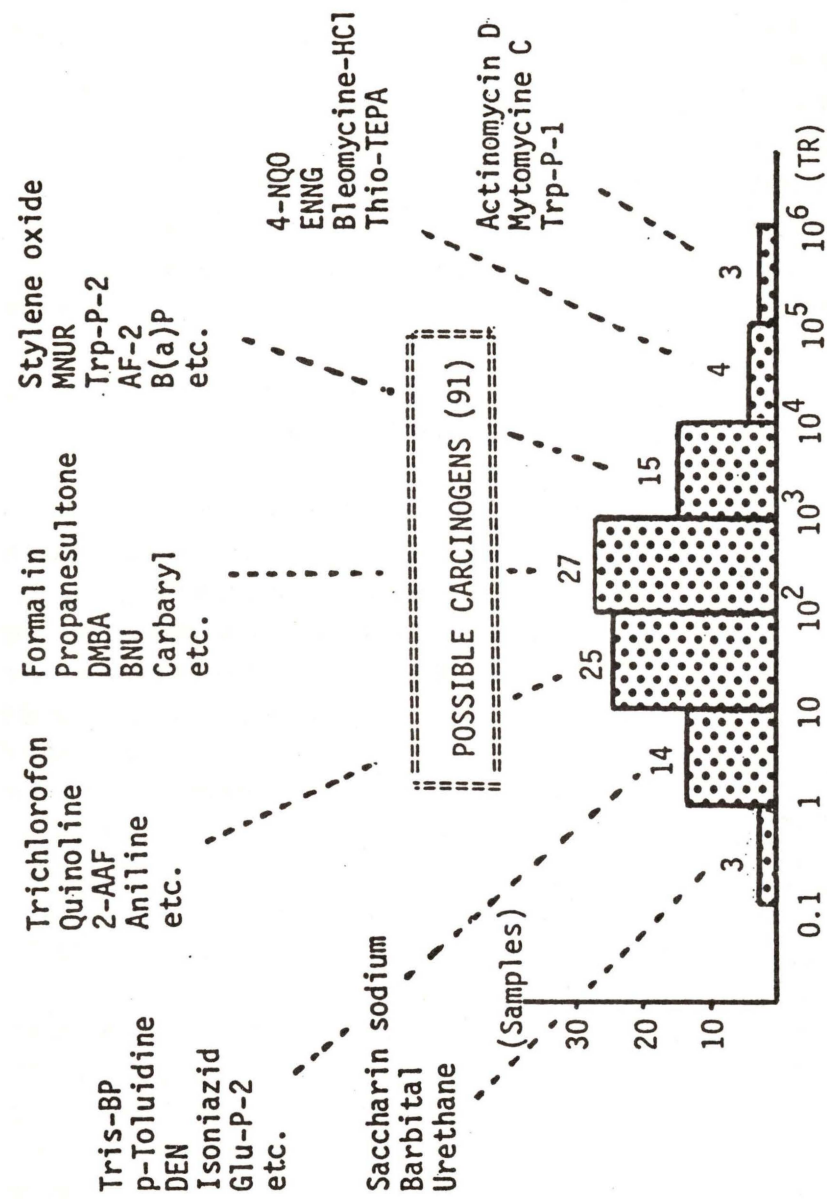


Fig. 2 Chromosomal aberration tests in vitro (CHL cells) — Clastogenic potential of possible carcinogens, indicated by the TR value : the incidence of exchange type aberrations per a unit dose (mg/mL)

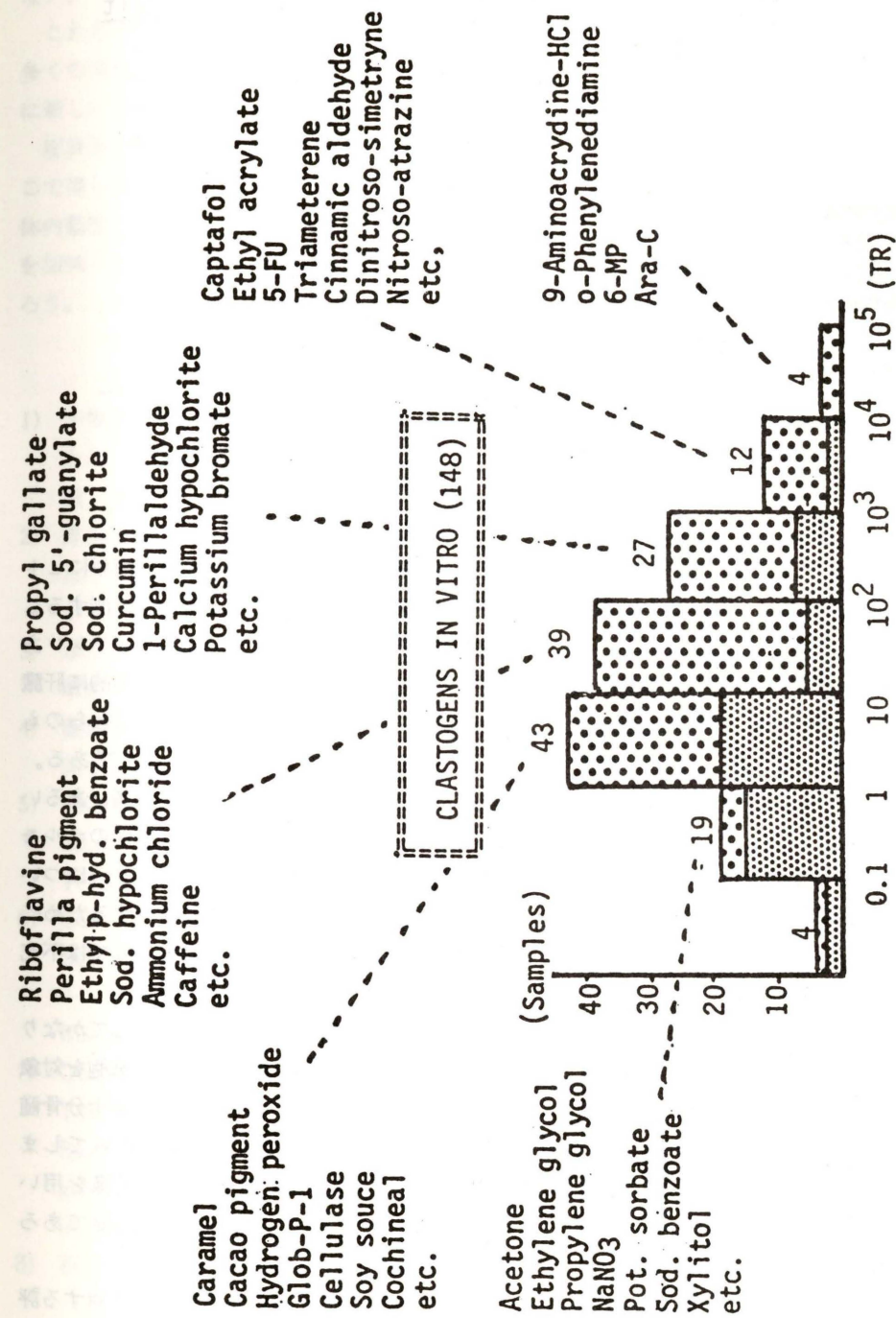


Fig. 3 Chromosomal aberration tests in vitro (CHL cells) — Clastogenic potential of food additives and others, indicated by the TR value.

Table 6 Chromosome test in vitro and micronucleus test in mice.

Compound	Chromosome test		Micronucleus test	
	Dose(mg/ml)	TR	Dose(mg/kg)	Result
Mitomycin C	0.0002	470000	3	+
4-NQO	0.0004	30000	80	+
5-FU	0.006	9280	100	+
MNNG	0.01	6200	50	+
ENU	0.13	56	50	+
Potassium bromate	0.25	116	100	+
Sodium nitrite	1.0	52	200	-
Fast Green FCF	4.0	5	2000	-
Potassium bromide	6.0	5	500	-
Acid Red	13.0	0.2	1600	-
Propylene glycol	32.0	0.2	15000	-

(Ishidate & Hayashi, 1984)

- 1 微生物および哺乳類細胞を含む複数の in vitro 系試験（代謝活性化を含む）で共に陰性である場合には、変異原性は殆どないものと判断する。
- 2 in vitro 系試験のいずれかで陽性となった場合は、その変異活性値を比較するとともに in vivo 系試験（小核試験、優性致死試験、ショウジョウバエを用いる試験、宿主経路試験など）を追加する。
- 3 in vitro 系試験で高い変異原性を示すのにかかわらず、in vivo 系試験で、陰性に終わった場合には、被験物質の生体内動態について検索する。生体内で急速に解毒される可能性もあるからである。
- 4 生体内における代謝産物（例えば尿中あるいは血漿中）に変異原性が認められた場合には、in vitro 系試験よりも優先的に考慮する。
- 5 in vivo 系試験で陽性であった場合には、in vitro 系試験の結果如何にかかわらず、変異原性は高いものと判断する。
- 6 変異原性が高いと判断された場合には、長期動物実験を追加することが望ましい。

5 おわりに

特定な試験系で得られた結果から、簡単にヒトに対する発がん性あるいは遺伝毒性を予測することは困難である。例えば、トリクロロエチレンあるいはディードリンはマウスでのみ特異的に肝臓がんを誘発することで知られている。これらのものは in vitro 系試験にかかりにくいものである。また、ニッケルやクロムなどの重金属、あるいは、ポリマーやアスベスト、DES その他のホルモン類、あるいは、BHA などのプロモーターについても同様である。これらを逃さず検出するためには、Ames テストと染色体異常試験のみでは不十分かも知れない。

小核試験は、in vivo 系の一次試験としてかなり有効と思われる。しかしながら、骨髓細胞を対象としている以上、被験物質の有効濃度が十分骨髓に達していなければ、陰性の結果に終わってしまう。この場合、第二次試験として、肝臓を用いる UDS 試験¹⁶⁾などを追加する工夫も必要であろう。

生殖細胞を介するいわゆる遺伝毒性に対する評価はさらに難しい。染色体異常を起こすことが知られている物質でも、生殖細胞に到達しない限り、優性致死試験は陰性となる。逆にショウジョウ

ウバエやカイコを用いて検出された遺伝毒性物質は必ずしも、in vitro 系試験で検出されるとは限らない。

これらの問題を解決するためには、これからも多くの実験データが必要である。また、そのために新しい実験法の開発が望まれている。

変異原性試験は毒性試験の一部に過ぎない。そこで得られた結果は他の多くの毒性試験、吸排、体内動態、その他の薬理学的試験で得られた結果を加味した上で、総合的に評価して行くべきであろう。

参 考 文 献

- 1) 労働省労働基準局化学物質調査課：「微生物を用いる変異原性試験ガイドライン」の解説、変異原と毒性，8，64—74 (1979)。
- 2) 厚生省薬務局審査課，生物製剤課：医薬品のための毒性試験法ガイドライン，トキシコロジー・フォーラム，7，187—198 (1984)。
- 3) 厚生省薬務局審査課，化学物質調査会（案）準備中 (1986)。
- 4) 農林水産省農産園芸局：農薬の安全性評価に関する基準 (1985)。
- 5) UKEMS: Report of the UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part 1., B.J. Dean (ed), UKEMS (1983)。
- 6) EC : Toxicology Guideline, Methods for the Determination of Toxicity, Other Effect — Mutagenicity, Official Journal of the European Communities, Vol. 27, Sept., 1984。
- 7) 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。
- 8) 石館 基ら，食品添加物の変異原性試験成績（その1—その6），トキシコロジー・フォーラム (1979—1985)。
- 9) Ishidate, M. Jr., et al., Primary Mutagenicity Screening of Food Additives Currently used in Japan., *Fd Chem. Toxic.* 22, 623—636 (1984)。
- 10) 厚生省がん研究報告書 (1973—1983)。
- 11) 石館 基（監修）：染色体異常試験データ集 リアライズ社，東京，1983。
- 12) Howorth, S., et al.: *Salmonella Mutagenicity Test Results for 250 Chemicals*, *Env. Mutag.*, Suppl. 1, 3—142 (1983)。
- 13) Galloway, S. M., et al.: *Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Chinese Hamster Ovary Cells : Evaluation of 107 Chemicals*, *Env. Mutag.* in press (1986)。
- 14) 白須泰彦：農薬の安全性 —— 変異原性および発癌性，トキシコロジー・フォーラム，9，2—11 (1986)。
- 15) Ishidate, M. Jr., et al.: Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and / or carcinogens. *GANN Monograph*, 27, 95—108 (1981)。
- 16) Mirsalis, J. C. and Butterworth, B. E.: Induction of unscheduled DNA synthesis in hepatocytes isolated from rats treated with genotoxic agents : An in vivo / in vitro assay for potential carcinogens and mutagens, *Carcinogenesis*, 1, 621—625 (1980)。

安全性評価と問題点

国立がんセンター研・生化学 佐藤 茂 秋

変異原の短期検索法の開発に伴い、我々の環境中に種々の変異原が検出されて来た。変異原性を有する環境物質は人間に対して何らかの危険性を示すであろうと予想される。しかし、その正確な危険性又は安全性に関しては、事故あるいは職業的な大量暴露、医薬品としての長期大量投与等の場合を除き、十分な評価がなされていない。従来の長期動物実験による環境変異原の発癌性等の証明は、その人間に対する危険性の存在の可能性を示すものであるが、実際の危険度評価法としては不十分である。

環境変異原、特に人に対する発癌性の危険度又は安全性の評価の為には以下の検討が必要である。第一にその物質の動物における発癌性の強度の定量的検討。この為には一用量のみの実験では不十分であり、低濃度領域での強度を推定出来る為の複数の用量設定が必要である。又、人間の状況を反映する様な複数の物質投与による反応を同様に調べる事も重要である。第二に、環境中の存在量、特に人間が摂取する量の推測が為されなければならない。多くの環境変異原の存在は極く微量であり、この為、感度が高く、回収率の良い測定法が必要である。更に、人体内に摂取された物質の組織又は細胞内の濃度、あるいは代謝的に活性化された量を推測する事が重要である。又、癌

という疾患の発生の為には、理論的には1箇の細胞の癌化で十分である。変異原の組織内濃度は人間の場合非常に低くても癌化の標的となる細胞数は実験動物に比べ非常に多い事も重要な事実である。第三に考慮されねばならないのは、変異原の生物活性(発癌性)を修飾する外的、内的因子の存在である。発癌プロモーターについての定量的及び複数投与の動物実験も必要である。又、in vitro での変異原性を修飾する物質については、動物実験におけるその効果の検討が期待される。第四に考慮すべき点は人間の種々の臓器の炎症の有無、内分泌及び免疫機能の変化、食物主成分の影響といった定量的に規定し難い因子の存在である。第五に変異原あるいは発癌修飾因子の作用に対する感受性を左右する、人間の遺伝的要因である。これ等の事項と並行して、変異原の生物学的作用、特に発癌遺伝子の活性化の有無、その機序等の分子生物学的検討と人癌における場合との比較も重要な情報となる。

現時点では種々の環境変異原について動物における半定量的発癌性の結果は得られているが、危険度評価の為のそれ以上のデータは皆無と言って良い。この点が今後の環境変異原研究上、重大な課題である事を認識すべきである。

疫学の立場から

秋田大学医学部 滝澤 行雄

化学物質と発癌の関係が一般に知られている特異な既往歴を有する集団を high risk group と呼んでいるが、ヒトの癌の大部分は、疫学または臨床学的研究によって明らかにされ、環境因子に直接関連があると推定されてきた¹⁻³⁾。

1 癌の疫学の効用

1) 癌疫学とは

癌の疫学は、人口集団に影響を与える発癌因子を系統的に研究する学問である。その目的は発生要因を解明し、癌から免れる方策を提示する。疫学的研究の重要な特徴は、発癌機構が未解決であっても、環境制御の最終的作用を示唆しうることである。

環境化学物質の作用を疫学的立場で検討する主な理由は、変異原性試験や動物実験で示された影響が、人間集団でも起こるかどうかを決定することにある。発癌作用が確認できれば、癌予防として曝露の軽減策を講じることができる。したがって、in vitro や in vivo の実験系で得られた知見と疫学的研究における仮説 hypothesis とのデータ交換は、この分野の研究の有用性を著しく向上させることになる。

2) 疫学的方法⁴⁾

疫学的研究は4つの段階を踏んで進められる。まず第1は、発癌の特徴を探し出し、これを後述する3主軸に関係づけて観察、記述するもので、記述疫学 descriptive epidemiology と呼ばれる。すなわち、時間分布を time chart, 地理的分布を epidemic map, また人体的要因を cancer incidence として表現する。

第2は、記述段階で得られた発癌の頻度および分布の特徴を説明できる hypothesis を打ち立てる。これは今後の研究を方向づけるうえに最も重要なものである。

第3は、形成された仮説の妥当性を証明するために特別に計画される分析疫学 analytical epidemiology で、特殊要因以外の条件を同一にして検討する。これには影響の有無に基づいて risk factor を後向き調査する retrospective study と、- risk factor の有無に基づいて影響を前向き調査する prospective study とがある。後者は前者に比べ因果関係の立証性において優れているが、実施上に困難性がある。

第4は、一定の様式に基づく実験疫学 experimental epidemiology で、最終的には人間集団において実証する。ここでは、人間集団で発癌因子に曝露させ、その病因を確認することはできないが、ヒトに癌を起こす化学物質の多くが動物にも発癌性を示すことから、動物実験や試験管内の実験結果は疫学における因果関係の証左となろう。

ヒトの疫学研究は、変異原性試験とちがいで、発癌に与える変量を制御できないため、検討しようとする変量に基づいて分類しなければならない。ここでは集団観察の絶対値よりも相対値が重視される。特に実社会から得られるデータは均一性であることが肝要であり、症例・対照両群のデータが同じ精度で調査され、しかも相互の比較ができるならば、相対値でも十分に意義がある。

以上、癌の疫学的方法は4段階に系統的に区分されているが、条件の複雑な長期、慢性影響の発癌研究では規則正しくこの順序に従うというわけではない。

3) 発癌の因果関係の追究⁴⁾

疫学の主効用に因果関係の解明があげられる。環境化学物質の曝露とヒトの癌との因果関係は、その解明に偶然性や偏傾がないように、関連の一致性(時間、場所、人を異にしても一致する)、強固性(相対危険度、オッズ比、重相関係数などが

高いほか、量・反応関係が認められる)、特異性および時間性(化学物質の作用が発癌の以前にみられる)が証明されなければならない。

さらに、化学物質の発癌に因果関係があるとした場合、そのヒト癌にみられる種々の現象が矛盾なく説明でき、また既存の知識とも合致するという関連の整合性がこれを支持する。

2 発癌の疫学的証拠

1) わが国の癌による死亡の現状

癌は、形質転換した細胞の増殖過程が近似した約200種類の病像の総称である。この癌に、わが国では4人のうち1人が罹患し、5人のうち1人が生命を奪われている。

わが国の癌死亡率は、この10年間に於いて年間平均4,000を超える増加を示し、昭和58年には約17万6,000に達し、56年からは死因順位で第1となった。全死亡中に占める割合も、昭和10年の4.3%

から30年に11.2%、40年には、15.2%、58年には23.8%と増加している。図1は、癌の部位別訂正死亡率の年次推移である。癌総数では男はここ数年、若干増加傾向にあるが、女は減少している。男女とも胃癌が最も多く、男では肺、肝、脾、食道などの順になっており、女では胃に次いで肺が多く、さらに子宮、肝、結腸(直腸を除く)、乳房などの順になっている。

2) 発癌化学物質の例証

発癌に関する知識の多くは、特定の化学物質に限定した職場従業員が曝露された事例とか、喫煙と肺癌との関連を明らかにした生活様式に基づく疫学研究から得られている。1775年、Percival Pott が記載した陰嚢癌は、煙突掃除で陰嚢に長い間油煙やすすが付着してできる職業性癌の一種である⁵⁾。塩化ビニルモノマーによる肝血管肉腫は1974年に発見されたのであるが、発癌性リスクは産業現場で始めて観察された⁶⁾。このように、

ヒトの発癌性を確認する唯一の方法は、疫学的研究による。

国際癌研究機関(IARC)⁷⁾ではヒトの疫学調査および動物発癌試験の結果から54の化学物質とその生産過程について、ヒトに対する発癌のリスクを3段階に分けて評価している。IARC—モノグラムの評価基準において発癌性の“sufficient evidence”および“limited evidence”とは、ヒトに対する有効な証拠の量だけを示すものであって、発癌性の強さや発癌機構について検討したものではない。しかし、実験動物に対して十分な発癌性の証拠が示される化学物質の場合、実際的な目的のためには、これらの化学物質がヒトへの発癌性リスクをもつものと判断し、勧告することが適当であると述べている。つまり、疫学の究極の目的である発癌の原因を決定し、一刻も早く健康を提示することにある。

この評価によると、表1のように、明らかにヒ

トの発癌原因として認められたものは18種で、そのうち職業癌の原因物質が14種、医薬品から3種、環境性(職業性)発癌物質は油煙・すすの一つだけである。また、ヒトの発癌原因として十分可能性のあるものは6種であるが、その中でも、環境性のものはアフラトキシンのみである。つまり、一般人の癌罹患について、その原因物質はほとんど特定できていない。

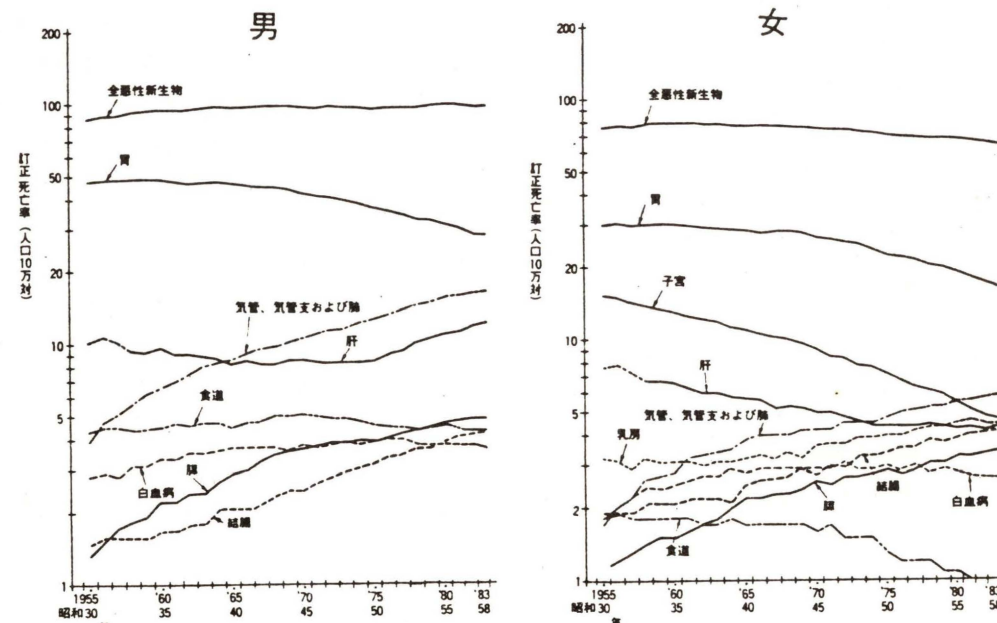
3 発癌が疑われる場合の対応と疫学的側面

1) 疫学と動物実験の役割

癌の原因の多くは化学発癌物質によるといわれる。毎年約700~1000の新しい化学物質が日常の用途に導入され、推定される総数はすでに63,000種に達している。発癌物質として問題になるのは、身近な生活環境に存在し、ヒトの癌の原因となる可能性のあることである。

表1: ヒトの発癌性またはその強く疑われる化学物質

化学物質名	曝露の型	作用する器官名	曝露の経路	推定された曝露量
アフラトキシン	食物より	肝臓	経口	5~15 μ g/kg体重/日
アスベスト	職業性	肺、胸腔、消化管	吸入、経口	不明
イベリットガス	職業性	肺、喉頭	吸入、経皮	0.05~0.07mg/l、空气中16ヵ月から13年にわたる
クロム (クロム酸塩製造工業)	職業性	肺、鼻腔	吸入	不明
赤鉄鉱(鉱山)	職業性	肺	吸入	不明
ビス(クロルメチル)エーテル	職業性	肺	吸入	不明
すす、タール、タール性油	職業性、環境より	肺、皮膚(陰嚢)	吸入、経皮	? 320 μ g/時間 B[a]P
ニッケル(ニッケル精錬)	職業性	鼻腔、肺	吸入	不明
塩化ビニル	職業性	肝臓、脳?、肺?	吸入、経皮	7.8mg/l(3,000ppm)以下、空气中
ベンゼン	職業性	造血器系	吸入、経皮	不明
酸化カドミウム	職業性	前立腺、肺?	吸入、経口	不明
4-アミノビフェニル	職業性	膀胱	吸入、経口、経皮	不明
オーラミン(製造工場)	職業性	膀胱	吸入、経口、経皮	不明
ベンジジン	職業性	膀胱	吸入、経口、経皮	不明
2-ナフチルアミン	職業性	膀胱	吸入、経口、経皮	不明
砒素化合物	職業性、医療より	皮膚、肺、肝臓?	吸入、経口、経皮	不明
オキシメトロン?	医療より	肝臓	経口	2~250mg/日、10~68ヵ月間9kg、平均総投与量
フェナセチン	医療より	腎臓	経口	不明
クロラムフェニコール?	医療より	造血器系	経口、注射	5~230g
メルファラン	医療より	造血器系	経口	2~6mg/日、15~114ヵ月間
フェニトイン	医療より	リンパ網状系	経口、注射	不明
シクロフォスファミド	医療より	膀胱	経口、注射	不明
ジエチルstilbestrol	医療より	陰、子宮	経口	1.5~150mg/日、母親がその娘を妊娠中の様々な時期に投与



- 注
- 1) 訂正死亡率の基準人口は、昭和10年の性別人口である。
 - 2) 片対数グラフを使用した。
 - 3) 肝の...線は、昭和32年まで胆のう及び肝外胆管を含んでいる。
 - 4) 結腸は、従来、小腸を含んでいたが、結腸のみの数値とした。

図1: わが国の部位別悪性新生物の訂正死亡率(人口10万対)の年次推移

(厚生統計協会, 1985)

(広畑, IARC モノグラフを整理, 1979)

ところで、ヒトに発癌性が認められたほとんどの化学物質は、また、動物にも癌をひき起こす。逆に動物に発癌性を示す化学物質はヒトにも癌を起こす可能性が大きい。例えば、IARC にリストされている369種の化学物質は、実験動物で発癌性のあることがわかり、ヒトとの関連性も確認されている。ただし、実験的な確認が明らかでない物質として金属元素とベンゼンがある⁷⁾。

環境化学物質の潜在的発癌性を推定する最良の方法は、試験動物に化学物質を長期投与して発癌の有無を調査することである。発癌性とその強さの判定は、統計の原理を用いるが、その適用にはきわめて慎重でなければならない。まず第1に、得られたデータを分割表にまとめて高濃度群、低濃度群、対照群の間に癌発生率の差があるかどうか χ^2 検定する。第2は、量・影響モデルを仮定し、投与量が増大すると、癌の発生も増加するとのデータから、最大法によってモデルの母数を推定するもので、プロビット法と呼ばれている。最近、化学物質のリスク・アセスメントとして多段階モデルが開発されている。第3は、発癌性の強さを推定するため、剖検日で補正した有効匹数の量・影響モデルを適用する。いわゆる癌発生時間モデルが脚光をあびている。

以上、動物による発癌実験は、試験条件を制御してはじめて結論が得られる。それだけに、自然条件下での妥当性に難点がある。しかし、ヒトへの微量曝露は一生続く可能性もあり、このような曝露量をヒトの成績から導き出すことは事実上不可能に近く、したがって、動物実験の成績を外挿して推定することになる。要するに、動物実験は、疫学的研究のより良い設計の手助けとして重要な意義をもっている。

2) 動物からヒトへの外挿

化学物質のヒトへの発癌性は、実験動物で得られた結果を基準にして定量的に推定する。この場合、問題になるのは動物の種類、系統などによる反応の差である。多くの動物では2-ナフチルアミンのように、誘発される膀胱癌の型は、ヒトの場合と同じであり、ハムスター、イヌ、サルでも

膀胱に発生する。しかし、他の例では種差がみられ、同じ化学物質でも違った部位に、違った型の腫瘍を発生させることがある。例えば、ベンチジンはラットで肝細胞癌を起こすが、ヒトやイヌでは膀胱癌を発生させる。

動物の選定は、一般には代謝パターンがヒトと等しいか、あるいはきわめて近似の動物であることが望ましい。しかし、実際にある物質の代謝過程を完全に解明することは至難であり、ヒトに最も近いとされるサルも、試験の目的やその供給、経済的な面から実用にならない。とくにサルの限界寿命は約30年と、哺乳動物の中では比較的長い。発癌試験は少なくとも二世代以上にわたる生涯飼育が必要とされるため、イヌやネコも不向きである。現在、発癌試験はラットとマウスというように二系統のげっ歯類を雌雄約50匹ずつ用いて経口、吸入、皮膚の接触あるいは飲料水の投与を行い、ヒトが取り込むのと出来るだけ近似した状況で化学物質を投与する。投与量は最大安全量とその $\frac{1}{2}$ 量などの2用量で約600匹を用いて生涯飼育約3年半の観察を行う。ちなみに、ある化学物質が1%に癌を引き起こすことを証明するには約4,700匹の動物が必要といわれる。米国NCIでは、試験群約400匹および対照群約200匹、計600匹で確認できる方法を開発している。最大無作用量を用いれば、発癌物質100種のうち、少なくとも95種は発見できると推定しているので、費用の点からも効用は大きい。

動物発癌が確認された場合、終局的にはヒトに対する評価となるが、前述したように、IARCではヒトに発癌性があると断定できる物質は、すべて疫学的研究で sufficient evidence と判断された物質に限っている。国際放射線防護委員会 (ICRP) の出版物8および14でも放射線発癌のリスクの推定に実験動物のデータは直接的にはいっさい用いていない。しかし、同報告は、実験動物において放射線発癌に関する普遍的な性質は、そのままヒトにも当てはまるであろう、と述べている。一方、WHOの技術報告をみると、細菌、酵母、ショウジョウバエなどで得られた化学物質の

変異原性試験の結果を、ヒトにおいて同様の障害を起こすかも知れないとするヒトへの外挿法に問題があると強調している。

要するに、疫学の対象は常に実社会を背景とした人間集団であり、そのことは疫学的方法の特徴であって、限界となっている。一方、ヒトに適した動物実験系のデザインは疫学仮説の証明とともに、公衆の健康障害を防止するための必要な科学的データとして重要であるが、取扱いには十分に慎重でなければならない。例えば、近年、各国において多用されたフェノキシ系除草剤2, 4, 5-Tは、2, 4-Dと類似したホルモン型移行性を選択的に示すという卓効がある反面、催腫瘍性

や催奇性などが不純物のダイオキシン (PCDD) に由来して存在することが指摘された。2, 4, 5-Tの経口50%致死量 (LD_{50}) はラットで約500mg/kg、純度99.6%の本物質を50mg/kgラットに経口投与した場合、7日以内に投与量の56~69%が尿中に排泄される⁸⁾。マウスに21.5~60mg/kg/日で78週投与した実験では投与群の腫瘍発生頻度も対照群と比べ有意に上昇していない⁹⁾。

ところが、不純物のダイオキシン、とりわけ2, 3, 7, 8-TCDD含有量が高くなると、各種の毒性が増強される。2, 4, 5-Tが最も敏感な動物はマウスとハムスターであって、ヒトとサルでは催奇形性が認められない。

表2: PCDDの急性毒性 (経口 LD_{50} , mg/kg-体重)

PCDD	Guinea pig	Rat	Mouse
Di2,7		>1,000,000	>2,000,000
2,8	>300,000		
Tri2,3,7	30,000		>3,000
Tetra1,3,6,8	} mixed	>100,000	
1,3,7,9			
2,3,7,8			
	0.6	22(M)	
	2.1	45(F)	
	2		280
Penta1,2,3,7,8	3		340
1,2,4,7,8	1,100		>5,000
Hexa1,2,3,4,7,8	73		825
1,2,3,6,7,8	70-100		1,250
1,2,3,7,8,9	60-100		>1,440
Mixed isomers		100,000	
Hepta1,2,3,4,6,7,8	>600		
Octa1,2,3,4,6,7,8,9		>1,000,000	>4,000,000

(註) 30日以内の50%致死量

(Kenneth,P.,1981)

表3：全国各地の一般ごみ焼却施設の関連試料中 PCDDおよびPCDF 含量
(灰、土壌：ng/g、排ガス：ng/m³N、排水：ng/l)

		T ₄ CDD		P ₅ CDD		H ₆ CDD		H ₇ CDD		O ₈ CDD		PCDDs	
N	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S
灰	35	34/35	N.D.-14.5	26/35	N.D.-12.8	32/35	N.D.-101	34/35	N.D.-985	35/35	4.6-9550	35/35	2.7-10700
焼却灰	30	30/30	0.3-7.3	30/30	0.8-34.5	13/30	N.D.-40.2	15/30	N.D.-184	30/30	2.8-2260	30/35	5.0-2470
排ガス	25	24/25	N.D.-109	25/25	22.4-793	1/25	N.D.-10.4	23/25	N.D.-2800	25/25	3.5-10400	25/25	133-13600
土	17	16/17	N.D.-1.7	17/17	0.3-79.5	0/17	N.D.	2/17	N.D.-0.5	17/17	1.3-39.4	17/17	3.2-84.6
排水	17	5/17	N.D.-9.7	7/17	N.D.-25.6	0/17	N.D.	2/17	N.D.-15.2	3/17	N.D.-40.9	9/17	N.D.-46.7
排水	16	3/16	N.D.-11.5	5/16	N.D.-43.8	1/16	N.D.-88.0	0/16	N.D.	0/16	N.D.	7/16	N.D.-143
排水	16	1/16	N.D.-13.7	5/16	N.D.-20.3	0/16	N.D.	0/16	N.D.	1/16	N.D.-0.8	4/16	N.D.-34.0
地下水	8	0/8	N.D.	3/8	N.D.-8.6	0/8	N.D.	0/8	N.D.	1/8	N.D.-8.4	4/8	N.D.-8.6

		T ₄ CDF		P ₅ CDF		H ₆ CDF		H ₇ CDF		O ₈ CDF		PCDFs	
N	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S	Min.-Max.	D/S
灰	35	35/35	0.3-445	25/35	N.D.-37.9	34/35	N.D.-400	33/35	N.D.-184	34/35	N.D.-443	35/35	1.0-1510
焼却灰	30	28/30	N.D.-76.7	25/30	N.D.-20.6	24/30	N.D.-430	18/30	N.D.-245	30/30	0.1-177	30/30	2.3-864
排ガス	25	24/25	N.D.-2070	25/25	168-3080	25/25	55.1-2220	20/25	N.D.-3890	25/25	7.1-1430	25/25	436-10000
土	17	16/17	N.D.-16.2	15/17	N.D.-434	9/17	N.D.-7.7	3/17	N.D.-5.8	17/17	0.6-5.4	17/17	1.1-447
排水	17	6/17	N.D.-170	5/17	N.D.-116	4/17	N.D.-96.0	0/17	N.D.	3/17	N.D.-21.8	9/17	N.D.-285
排水	16	5/16	N.D.-150	2/16	N.D.-234	2/16	N.D.-126	0/16	N.D.	2/16	N.D.-28.3	6/16	N.D.-242
排水	16	4/16	N.D.-106	2/16	N.D.-9.0	2/16	N.D.-73.0	0/16	N.D.	2/16	N.D.-22.5	4/16	N.D.-210
地下水	8	0/8	N.D.	1/8	N.D.-3.9	1/8	N.D.	0/8	N.D.	0/8	N.D.	1/8	N.D.-3.9

D : Detected samples S : Survey samples

※：最終処分場

(滝澤ら, 1985)

また、生活環境中のあらゆる燃焼によって生成される PCDDやPCDF (ジ・ベンゾフラン) の催奇形性や発癌性などが重視されているが、現在のところ、人体影響に関する疫学調査のうちで満足できるものはない。ちなみに、PCDDの異性体のうち、2, 3, 7, 8-TCDDは表2のように、最強の毒性もつ化学物質とされ、催奇性のほか、発癌性がマウスやラットで確認されている。肝や肺に腫瘍が発生するが、2, 3, 7, 8-TCDDはプロモータおよびイニシエーターの両役割を果たすと考えられている。わが国の一般ごみ焼却に伴う PCDD の分布量を表3に示したが、生活環境に広く存在する PCDDあるいはPCDFの安全性の評価については、動物実験の数多くの結果は異性体によってきわめて強毒性を示すものがある。しかし、これまでの疫学的研究では軟組織における肉腫の発生などの影響を支持する結果は得られていない¹⁰⁾。最近、消費者のための独立した非営利的教育団体 (ACSH) も、PCDDによる死亡例はこれまで見つかっておらず、大量曝露群においても慢性的影響を認めていない。

以上、動物実験はポジティブ、疫学的研究は必ずしもポジティブでない化学物質について、その生活利用が非意図的である場合の安全性をどう考えたらよいか、いわゆる action levelがある環境化学物質に適用できるか、残された本質な課題といえる。

3) 発癌リスクと規制の問題

発癌の疫学を体系化した Doll¹¹⁾は、癌の80%は環境を規制することにより予防できると述べている。この知見を受けて Ames¹²⁾は、いくつかの重要な癌の risk factor が生活環境、とりわけ、食生活の中に長い間存在しているとし、今後は、この課題は開拓すべき研究分野と指摘している。

食事と癌との関係は複雑であるが、胃癌や大腸癌を例示するまでもなく、消化器系癌が食生活のパターンに大きく影響されていることは周到な疫学的研究が教えている。とくに微生物の突然変異を利用する鋭敏な発癌性の検出法が開発されて以

来、食品中の変異原物質あるいは発癌物質の存在が次々と明らかにされてきた。食品成分の一つである蛋白質を加熱分解すると、変異原の強いヘテロサイクリックアミン物質を生成することが注目されている。すでに11種類の変異原物質が単離され、その構造も決定されている。そのほとんどは動物に発癌性示すが、現在、これらの化合物が単独でヒトに対して著しい影響を与えている証拠はない¹⁰⁾。

現今、化学物質の安全性に国際的な関心が向けられ、環境基準、怒限度、使用基準、品質規格など諸対策が講ぜられていることは周知のとおりである。安全性とはあくまで毒性の評価であり、有害物質の存在が人体にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、公衆衛生上、適切な使用量に変えたり、あるいは使用を制限したりすることにある。したがって、その評価は、化学物質の性状や使用量、ヒトの曝露経路とその程度、曝露人口のほか経済的効率などを総合して行わなければならない。

化学物質の開発、利用に伴い、保健衛生上の設定や勧告などがなされてきた。それらは次第に詳細化して、その適用範囲は限定され、用量、あるいは濃度レベルも以前のように単一化したものではなく、risk-benefitの観点からの考察や実施面からの行政的、社会的考慮も払われるようになっている。しかし、米国議会が食品、薬品、化粧品法に1958年採択したデラニー条項「いかなる添加物もヒトまたは動物が摂取した場合に癌を誘発することが証明され、あるいは添加物の安全性評価法による適切な試験法で、ヒトまたは動物に発癌性が証明された場合は、安全とは見なさない」は、化学物質の量と反応(影響)との関係が直線性にあるとすれば、これは全く議論の余地はないものと思われる。このことは発癌物質に閾値はなく、無条件にリスクの完全な除去を要求しているわけである。

しかし、化学物質の安全性を科学的に確認するに当たって、閾値のある物質に対しては使用基準を定め、閾値のないものは禁止する方法をとる。

この閾値の存在を認めるかどうかは別として、疫学的経験の影響量よりも微量の摂取においては、検知し得るような反応が現われにくいということは事実である。もとより、この反応を検知する方法が十分精密でないことや、発癌性が長い潜伏期をもつことなどに起因することも考えられる。また個人差が介在するため、ある摂取量の幅をもつことも推論される。しかし、発癌のリスクなどこれまで規制するかの問題に対して、閾値の存在を仮定することはそれなりの意義があるわけである。すなわち、発癌を検出し得る最小量に対しては、少なくとも、現時点の医学的知識の段階において、その値より以下であれば、実際に障害が生じて、その頻度はおそらくかなり低いものと期待されよう。最近の傾向として、ゼロ・リスクの考え方から技術準拠あるいはリスク・ベネフィットのバランス重視の考え方に移行している¹⁰⁾。化学物質がヒトの福祉に利用することが多大であればあるほど動物実験のみの発癌性や変異原性により規制の問題は慎重でなければならない。疫学的研究は、この政府決定にかけがいのない科学的根拠を与える。

文 献

- 1) Clayton, D.B.: Chemical carcinogenesis. Little, Brown and Co., Boston, 1962.
- 2) Higginson, J.: Present trends in cancer epidemiology. In: Proceedings of the 8th Canadian Cancer Research Conference, Honey Harbor, Ontario, 1968. Pergamon, Oxford, 1969.
- 3) Doll, R.: Strategy for detection of cancer hazards to man. Nature, 265:589-596, 1977.
- 4) 滝澤行雄: 発生要因の把握と因果関係の推定。疫学—臨床家のための方法論(重松逸造編), 講談社サイエンティフィク, 東京, 1978.
- 5) Pott, P.: The Chirurgical Works of Percival Pott (Ed. Howes et al.), London, 1775.
- 6) Creech, J.L., Johnson, M.N.: Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinyl

- chloride. J. Occup. Med., 16: 150-151, 1974.
- 7) IARC: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Supplement 4. Lyon, 1982.
- 8) Grunow, W., Böhme, C., Budezies, B.: Renale ausscheidung von 2,4,5-T bei Ratten. Food Cosmet. Toxicol., 9:667-670, 1971.
- 9) Muranyi-Kovacs, I., Rudali, G., Imbert, J.: Bioassay of 2,4,5-trichloro-phenoxyacetic acid for carcinogenicity. Brit. J. Cancer, 33: 626-635, 1976.
- 10) Kenneth, P.: Chemistry and toxicology of polychlorodibenzo-p-dioxins, Study on State of Art of Dioxin from Combustion Sources. Arthur D. Little Inc., 1981.
- 11) Kimbrough, R.D.: Health Implication of 2,3,7,8-TCDD Contamination of Residential Soil. C.D.C., U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 1981.
- 12) Doll, R.: Perspects for prevention, Brit. Med. J. (Clin. Res.), 28:1805-1806, 1983.
- 13) Ames, B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science, 221:1256-1264, 1983.
- 14) 若林敬二: 代謝(臨時増刊号 癌'82), 19:939-948, 1982.
- 15) ILSI-Japan: Safety Assessment. Proceedings of the ILSI International Symposium on Safety Assessment, Nov.19-20, 1984, Tokyo.

結 語

環境化学物質の潜在的発癌性を推定する最良の方法は、変異原性を中心とした短期テストと動物実験であり、これらの結果と疫学の仮説に関する知見の積極的な情報交換が焦眉の課題といえる。とりわけ、実験データを人間集団に外挿するための客観的指標の開発は、化学物質の規模と速度に対応するためにも、大いに期待される。

とまれ、人の成績が極めて欠如しており、Clearing-House for On-Going Research in Cancer Epidemiologyが要請されよう。

化学発がんの分子機構

大阪大学微生物病研究所 角 永 武 夫

I 序

化学発がんの研究は近年目ざましい発展をとげた。関連科学領域の進展に依るところが大であったのは言うまでもないが。一方では化学発がんの研究の進展は周辺の研究領域の進歩に大きな貢献をなした。1970年前後から展開した主な領域は薬物代謝経路の解明と高圧液体クロマトグラフィーなどの応用による究極発がん物質およびその核酸との共有結合体の同定、微生物を用いた迅速な環境変異原の検出、特に加熱食品中の発がん物質の同定、DNA 損傷修復欠損変異株を利用した修復機構の解明及び突然変異と発がんの関連性の追究、動物及び培養細胞を用いた発がん及びプロモーションの定性及び定量的測定法の開発と改良、環境中腫瘍プロモーター物質の検出と作用機作の解明など多面に亘る。これらの領域の研究結果は発がん過程に突然変異が関与していることはほぼ間違いないことを推定させた。

しかし、発がん過程は非変異的な機構すなわち遺伝情報そのものには変化なく情報発現の過程の変化であるという特に発生物学者によって支持されてきた可能性も残された。この長年論議されてきた命題に結着をつけ更に乗り越えてゆくには、具体的にどの遺伝子にどのような変異あるいは発現の変化が起こるのか、またその結果どのような代謝生理学的変化が起こるのかについて物質的に証明する必要がある。遺伝子工学技術の進展に伴ってその物質的証拠を得るいくつかのアプローチが可能となった。トランスフェクション技術を応用した人がん遺伝子の分離はその最も注目されているアプローチである。

私達は別のアプローチを試みた。細胞のがん化過程が変異を含むと含まざるとにかかわらず、また変異の発現の優性劣性を問わず、発現された遺

伝情報の変化は蛋白質レベルに反映される。そこで正常細胞とがん細胞との間で合成される蛋白質を比べ相違する蛋白質を追究することから始めた。

II 変異アクチンの検出と同定

4-ニトロキノリン-1-オキシド処理によって癌化したヒト線維芽細胞を³⁵S-メチオニンでラベルし、可溶性分画を二次元ゲル電気泳動のオートラジオグラフでしらべると、1,000個以上のポリペプチドが識別される。正常ヒト二倍体線維芽細胞の可溶性ポリペプチドと比較すると、合わせて約20個のポリペプチドが出現または消失した。もっとも顕著な変化として目をひいたものの一つが、一つの癌化細胞(HuT-14株)に出現したポリペプチドであった。これを仮にA^{*}-ポリペプチドと呼ぶ。

このA^{*}-ポリペプチドは二次元ゲル中の移動位置から分子量約43,000、等電点5.2と推定され、正常な細胞質アクチン、すなわちβ-およびγ-アクチン(分子量42,000、等電点5.3)のすぐ近くの位置に出現した。A^{*}-ポリペプチドはTriton X-100非可溶性分画すなわち、細胞骨格と核マトリックス分画にも多量存在したので、ゲル上の位置とも考え合わせると、アクチンの一種であろうと推定した。そこで、抗アクチン抗体とHuT-1細胞の可溶性蛋白とを反応させると、A^{*}-ポリペプチドが正常アクチンと共に沈降した¹⁾。また、抗アクチン抗体は二次元電気泳動ゲルから分離回収したA^{*}-ポリペプチドとも反応することがわかった。次に³⁵S-メチオニンで標識したA^{*}-ポリペプチド、正常アクチン(β-およびγ-アクチンの混合体をそれぞれSDS一次元電気泳動ゲルから分離抽出し、トリプシン分解ペプチド

のフィンガープリントパターンをしらべると、ほぼ同一であった。正常ヒト二倍体細胞から同様にして分離したアクチンのトリプシン分解ペプチドのフィンガープリントパターンとも同一であった¹⁾。以上の結果からA^{*}-ポリペプチドはアクチンの一種であると結論した。以下、A^{*}-アクチンと呼ぶ。

ヒトなど脊椎動物には6種類のアクチンがあり、筋細胞にのみ存在する筋肉アクチンには骨格筋アクチン、消化器系平滑筋アクチン、血管系平滑筋アクチン、それに心筋アクチンの四種がある²⁾。非筋細胞にはβ-とγ-アクチンの二種類が存在するがその機能の違いには不明である。α-, β-, γ-という区別は等電点によって三つに分かれることから命名されたものである。ヒト線維芽細胞ではβ-およびγ-アクチンのみしか合成されない。したがって、A^{*}-アクチンは本

来発現されるべきでないα-アクチンが癌化した線維芽細胞であるHuT-14細胞で合成されたのか、あるいはβ-またはγ-アクチンが修飾されたものなのか、あるいはいずれかのアクチンの変異体であろうか、など色々な可能性が考えられる。この点を明らかにする為に以下の実験を行った。

まず、mRNA レベルで変化が起っているかどうかをしらべるために、HuT-14細胞から抽出したmRNA 存在下に試験管内蛋白質合成系で合成された蛋白質を二次元電気泳動で分析してみると、A^{*}-アクチンが存在した。正常細胞や他の癌細胞から抽出したmRNA 存在下に合成された蛋白質にはA^{*}-アクチンは存在しない。すなわち、A^{*}-アクチンをコードするmRNAがHuT-14細胞にのみ存在することが確かめられた³⁾。

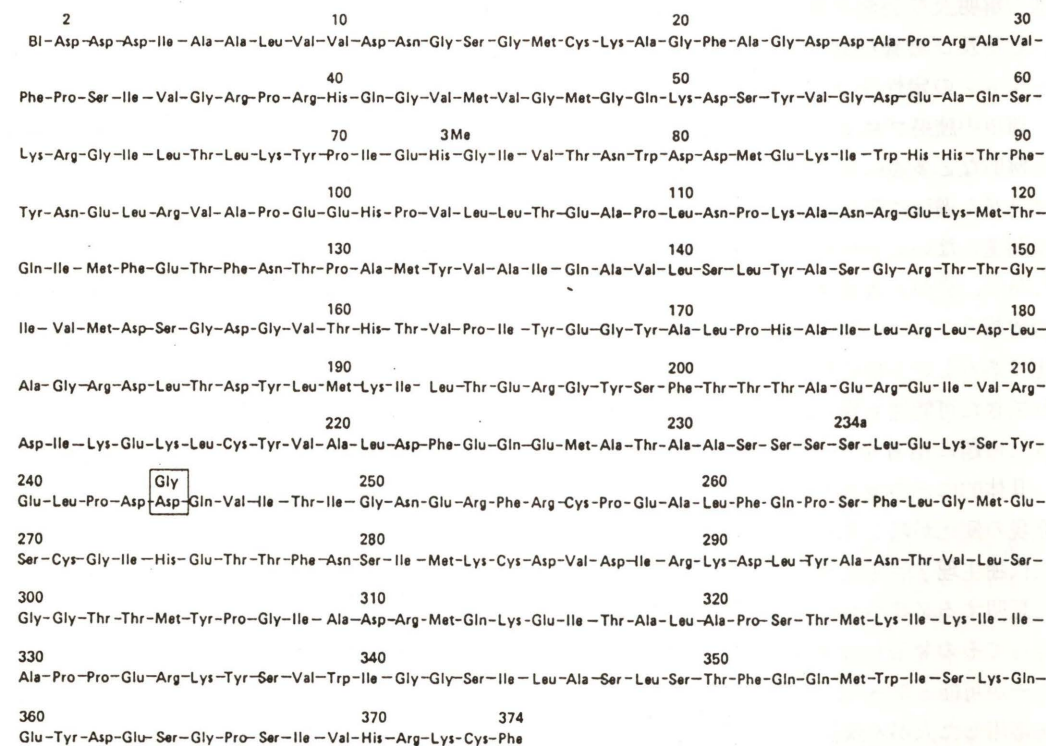


図1 第244番目のアミノ酸(線で囲まれている)が正常β-アクチンではグリシンであるのに対し、変異β-アクチンでは、アスパラギン酸に置換されているほかは、すべてのアミノ酸は同じである。

次にA^{*}-, β-およびγ-アクチンの構造遺伝子塩基配列の相互関係をしらべるために、粘菌アクチンのmRNAに相補的なDNA、すなわちcDNAとA^{*}-, β-およびγ-アクチンmRNAとの相補性をしらべた。HuT-14細胞からポリ(A)RNAを分離し粘菌アクチンcDNAとハイブリッドをつくらせ、ハイブリッドを形成したポリ(A)RNAを試験管内蛋白質合成系に加えて合成された蛋白質を二次元電気泳動でしらべると、β-アクチンの他にA^{*}-アクチンが存在した。しかし、γ-アクチンは見当らなかった。一方、HuT-14細胞から抽出したmRNAに相補的なcDNAを合成し、pBR 322にクローニングした。このヒトアクチンcDNAとハイブリダイズするHuT細胞のポリ(A)RNAは試験管内蛋白質合成系でA^{*}-, β-およびγ-アクチンの合成を誘導した。これらの実験結果は粘菌アクチンcDNA塩基配列はヒトγ-アクチンmRNA塩基配列よりもヒトβ-アクチンmRNA塩基配列により相補性が高いこと、およびA^{*}-アクチンmRNA塩基配列はγ-アクチンmRNAよりもβ-アクチンmRNAにより相同性が高いことを示す。したがってA^{*}-アクチンはβ-アクチンの一種であろうと推定された³⁾。

より正確な証拠を得るためにA^{*}-アクチンおよびヒトβ-アクチンの全アミノ酸配列が決定された⁴⁾。ヒトβ-アクチンのアミノ酸配列が決定されたのはこれが初めてであるが、結果的にすでに決定されているウシβ-アクチンのアミノ酸配列と同一であった。A^{*}-アクチンはβ-アクチンの244番目のアミノ酸であるグリシンがアスパラギン酸に置換した以外はβ-アクチンのアミノ酸配列と同じであった(図1)。

アミノ酸配列の結果はA^{*}-アクチンがβ-アクチンの突然変異体であることを推定させるが、正常細胞にもA^{*}-アクチン遺伝子が存在し、しかも発現されることの稀なアクチンイソマーである可能性が残されている。この可能性を検討し、更にはβ-アクチン遺伝子の構造決定およびその発現調節機構ならびに変異遺伝子の導入実験を行

うため、β-アクチン遺伝子およびA^{*}-アクチン遺伝子の分離を行なった。β-アクチン遺伝子のクローニングは、多数の偽似遺伝子の存在により困難であったが、合成ヌクレオチドとの相補性の度合いの相違を利用して、多数の偽似β-アクチン遺伝子を排除し、構造遺伝子の塩基配列が上記のβ-アクチンアミノ酸配列と完全に一致する機能的と考えられるβ-アクチン遺伝子が分離された⁵⁾。偽似β-アクチン遺伝子の殆んどはβ-アクチンmRNAより逆転写酵素によって作られたcDNAに由来すると思われ、介在配列を欠きポリ(A)シグナルを有する。また多数の突然変異が存在し、ストップコドンが点在する。分離されたβ-アクチン遺伝子は5個の介在配列を含み(1個は5'上流の非翻訳領域に在る)、その介在配列あるいは、3'-および5'側の非翻訳領域DNA断片をプローブとして全細胞DNAを用いてサザーン・ブロットすると、いずれも一本のバンドしか検出されなかった(図2)。すなわち、同じような構造を有するβ-アクチン遺伝子はヒト細胞には一対しか存在しないことを示す。HuT-14細胞から分離したβ-アクチン遺伝子にはこの正常β-アクチン遺伝子の他に、その構造が殆んどβ-アクチン遺伝子と同じでありながら、244番目のコドンがGAC(アスパラギン酸)である遺伝子が存在した⁶⁾。以上の結果を総合すると、A^{*}-アクチンはβ-アクチン遺伝子の突然変異により生じたもので、HuT-14細胞のβ-アクチン遺伝子の一方の対立遺伝子が正常で、他方の対立遺伝子に点突然変異があり、双方の対立遺伝子からアクチン蛋白質が作られていると考えられる⁷⁾。

Ⅲ 変異アクチンの発現と細胞のがん化

アクチンは進化を通じて極めて良く保存された重要な蛋白質であり、β-およびγ-アクチンは全ての非筋細胞で発現され、細胞の形態、運動、膜蛋白質の分布等の細胞の機能に主要な役割を果している。がん細胞の主要な表現形質が形態および運動性の変化であることを考えると、上記のアクチン変異が細胞のがん化の一因となっている可

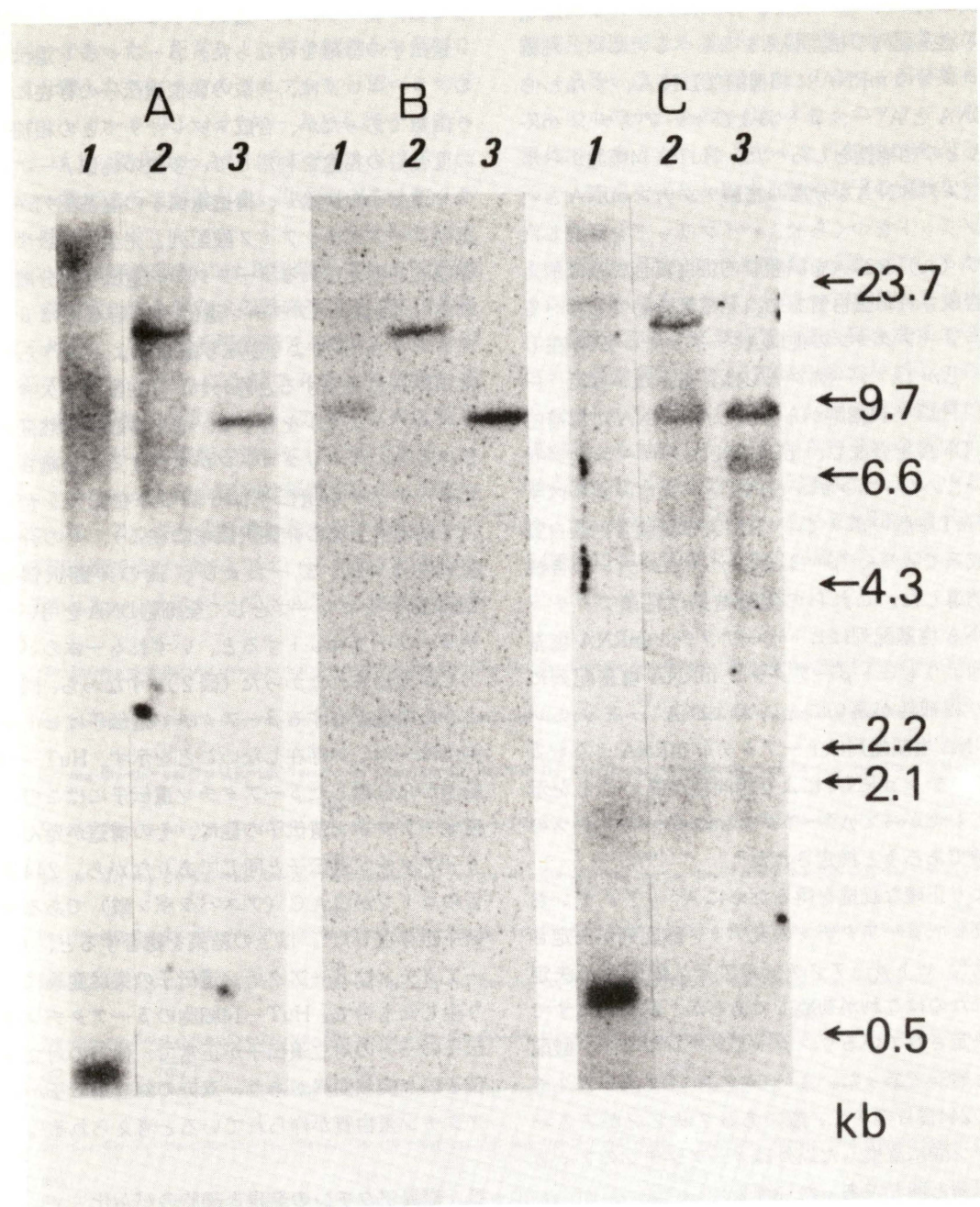


図2 ヒト β -アクチン遺伝子をプローブとしたサザン・ブロット。

HuT-14細胞DNAをSmaI (レーン1)、EcoRI (レーン2)、あるいはEcoRIとBamHIの双方 (レーン3) で消化切断し、アガロースゲル上電気泳動後フィルターにトランスファーし、 ^{32}P でラベルした0.3KbのイントロンI DNA断片 (A)、0.2KbのイントロンIII DNA断片 (B)、あるいは、0.6Kbの5'上流非翻訳領域DNA断片 (C) とハイブリダイズした。

能性が十分に考えられる。 β -アクチンの変異と細胞のがん化との関係をしらべるため、次の三つの実験を行なった。

第一の実験は、変異 β -アクチンを産生しているHuT-14細胞から腫瘍性の異なるサブクローンを分離し、変異 β -アクチンの発現および細胞内動態がどう変化したかをしらべた。HuT-14細胞のヌードマウス移植腫瘍形態および変異 β -アクチンの発現は安定で、培養継代中に自然転換した細胞あるいはヌードマウスにHuT-14細胞を移植して形成される腫瘍を移植継代してより増殖の早い細胞を分離する試みは成功しなかった。一方、HuT-14細胞を紫外線照射し、増殖速度が早くコロニー形態の変化したクローンを分離したところ、軟寒元ゲル内増殖能がHuT-14細胞より高く、ヌードマウス皮下移植による腫瘍形成能が上昇していることが判った⁸⁾。このクローン (HuT-14-3-1) の可溶性蛋白質を二次元ゲル電気泳動で分析した結果、意外にもHuT-14細胞にみられた変異 β -アクチンが消えており、その代りに変異 β -アクチンより等電点が0.1低下した個所にアクチン様ポリペプチドが検出された。このポリペプチドは抗原性、ペプチド・マッピング、および遺伝子塩基配列などの解析からHuT-14細胞で産生される変異 β -アクチンに更にもう一個の点突然変異が生じたものであることが明らかとなった。この二つの変異をもつ β -アクチンを二重変異 β -アクチンと呼ぶ。二重変異 β -アクチンの合成速度は正常 β -アクチンおよび変異 β -アクチンよりも速く、一方では細胞内半減期が短くなっていた⁸⁾。造腫瘍性の増大したHuT-14-3-1細胞の不溶性分画には二重変異 β -アクチンがほんの少量しか存在しなかった。不溶性分画には正常 β -アクチンに比べて変異 β -アクチンは80~90%、二重変異 β -アクチンは10%以下しか存在しなかった。可溶性分画には変異 β -アクチンは正常 β -アクチンとはほぼ等量、二重変異 β -アクチンは約1.5倍存在したのと対照的であった⁸⁾。以上の実験結果はHuT-14細胞の造腫瘍性の増大と変異 β -アクチンの更なる変化とが

同時に起ったことを示す。HuT-14細胞の造腫瘍性の安定性、アクチンの安定性、などを考慮すると、造腫瘍性の増大と変異 β -アクチンの追加変異とが偶然起ったというより、両者の間に原因結果の関係が存在すると考えた方が良いように思われる。

第二の実験アプローチとして、HuT-14細胞と正常ヒト二倍体線維芽細胞との間で雑種細胞を形成し、雑種細胞およびその雑種細胞から染色体が部分的に脱落した娘雑種細胞について、表現形質と変異アクチンの変動をしらべた。雑種細胞はHuT-14細胞に6-チオグアニン耐性 (6GT^r) とウアバイン耐性 (Oua^r) を挿入し正常細胞と融合させた後、HAT培地で増殖するOua^r細胞を選択分離して得た。こうして得られた雑種細胞を染色体分析すると大部分がHuT-14細胞染色体のみから構成される偽雑種細胞であったが、少数存在した真雑種細胞 (HuT-14細胞マーカー染色体を一揃えと一揃えの正常染色体とを持つ細胞を指す) のみについて検討した。増殖の良い雑種細胞の殆んどは形態的にHuT-14細胞の特徴を維持しており、軟寒元中増殖能を有した。現在、一つだけであるが、形態が正常線維芽細胞様で軟寒元中増殖能が非常に低い雑種細胞が得られている。これらの雑種細胞について変異アクチンをしらべると、形態変化および軟寒元中増殖能が亢進している雑種細胞では変異 β -アクチンの合成が認められるのに反し、正常細胞に似た性質を示す雑種細胞には変異 β -アクチンは検出されなかった⁷⁾。ここでも、変異 β -アクチンの発現と癌表現形質発現との間に相関関係が認められた。

第三の実験アプローチとして、クローニングされた変異 β -アクチン遺伝子を正常細胞に導入して発現させ、細胞の表現形質がどう変化するかを観察する実験を行っている。標的細胞の種類および導入された変異 β -アクチンの発現量によって細胞の表現形質発現が影響された。今後の詳細な研究が必要であるが、変異 β -アクチンの導入発現により細胞形態および運動性が変化する可能性があることは間違いない。

以上の三つの異なる実験アプローチから得られた知見は変異 β -アクチンの発現が細胞の癌表現形質発現と密接に関連していることを示すものと考えられる。

IV おわりに

4-ニトロキノリン-1-オキシドおよび紫外線によって β -アクチン遺伝子に点突然変異が誘起され、その結果、ヒト線維芽細胞のがん化あるいは造腫瘍性の増大が起ったらしいという例を、私達の研究を中心に述べた。化学物質によって多数の種々の突然変異が生成され、その中のほんの一部の変異が細胞のがん化に結びつくと思われるが、ほんの一部と言っても、その数は相当なものである。細胞の癌形質発現に参与する生化学反応および遺伝子は多数存在し、変異によって結果として細胞のがん表現形質の発現に導くような遺伝子は数多いと考えられる。更には同じ遺伝子の

同じような機能変化がその遺伝子の異なる部位の異なる種類の変異によって誘導されることが考えられる。従って、私達がみつけた β -アクチンの244番目のトランジション変異は細胞がん化を誘導し得る数ある変異の一つと考えるべきであろう。この β -アクチンの変異と同じような機能変化が多種類存在するアクチン調節蛋白質のいずれかに変異が起きても誘導されることが考えられる。最近、化学発がん物質によって一部の正常な遺伝子から活性がん遺伝子が生ずる機構に点突然変異が寄与している場合が次々と見つっている⁹⁾。これらががん遺伝子の殆んどは直接にアクチンあるいはアクチン調節蛋白質をコードするわけではない(例外として*v-fgr*のようにアクチン遺伝子の一部を含有するがん遺伝子も存在するが)。私達は活性がん遺伝子が直接あるいは間接にアクチン調節蛋白質のリン酸修飾を介してアクチン関連機能の変化、ひいてはがん表現形質の発現をう

ながすという仮説を立てている(図3)。今後、変異の生成機構とそれに及ぼす諸因子の解析、変異遺伝子の発現とその生物学的影響などについて具体的な知見が蓄積されるにつれて、変異の重要性が益々認識されると思われる。

ここに述べた研究はレビット、浜田、平川、谷口、飯島、相良の各博士らの協力によって達成されたものであり謝意を表したい。

文 献

- 1) Leavitt, J. & Kakunaga, T.: J. Biol. Chem., 255, 1650 (1980)
- 2) Vandekerckhove, J. & Weber, K.: J. Mol. Biol., 126, 783 (1978)
- 3) Hamada, H., Leavitt, J. & Kakunaga, T.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78, 3634 (1981)

- 4) Vandekerckhove, J., Leavitt, J., Kakunaga, T. & Weber, K.: Cell, 22, 893 (1980)
- 5) Iijima, S., Hamada, H., Reddy, P. & Kakunaga, T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1985)
- 6) Lin, C-S., Ng, S-Y., Gunning, P., Kedes, L. & Leavitt, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6995 (1985)
- 7) Kakunaga, T., Taniguchi, S., Leavitt, J. & Hamada, H.: Cancer Cell, vol. 1, Transformed Phenotype (ed. by Levine, A. et al.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 67 (1984)
- 8) Leavitt, J., Buscher, G., Kakunaga, T., Hamada, H., Hirakawa, T., Goldman, D. & Merrill, C.: Cell, 28, 259 (1982)

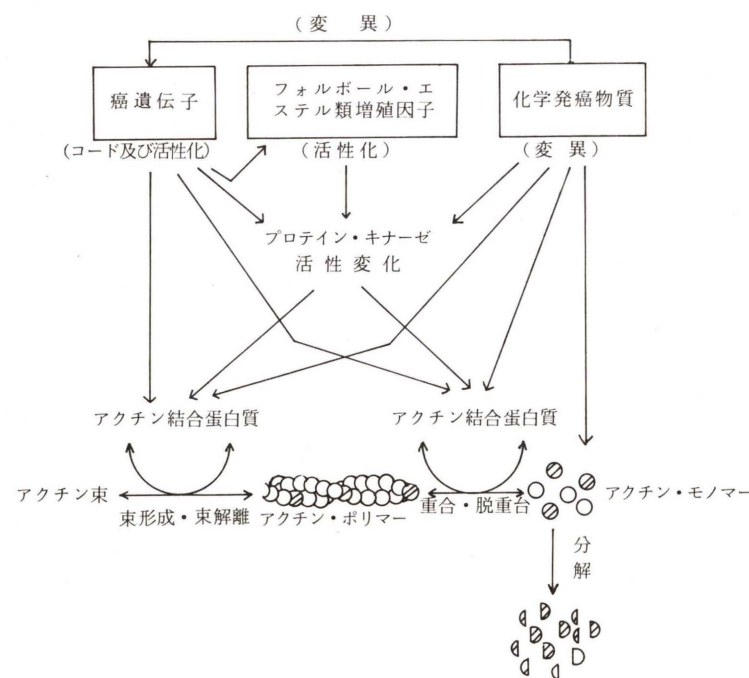


図3 細胞の癌化あるいは細胞の癌表現形質発現におけるアクチン関連蛋白質の役割に関する仮説

私たちを囲む変異原物質と健康

国立がんセンター 佐藤 茂 秋

我が国の平均寿命は、男74.54歳、女80.18歳であり、これらは世界で、一、二を争う数値である。戦後40年の間の健康、衛生状態の改善進歩によるものである。ワクチンの利用による伝染病の予防、抗生物質の投与による感染疾患の治療は著しい成果を挙げた。栄養条件の改善も著しく、国民の平均身長、体重の増加も見られている。今、我々が抱えている問題は、がんをはじめとする成人病と、老化に伴う諸現象である。

さて、変異原物質というのは、私たちの細胞の中にある遺伝子に変異を起こす物質である。遺伝子はDNA（デオキシリボ核酸）であり、DNAの塩基やリン酸に変異原物質が結合し、DNAの傷が出来る。DNAの傷は修復されて、元通りになることもあり、修復される途中で、ボタンのかけちがいのような誤りが起こることもある。又、修復される前に、細胞の増殖に伴うDNAの複製に際して、誤った複製が起こる。これらがすべてDNAの塩基配列の乱れを作る。DNAの塩基配列の乱れは、DNA上の遺伝情報の乱れであり、突然変異として性質の違った細胞が生まれることになる。

我々の体に突然変異が起こる場合を、二つに大別して考えとみる必要がある。一つは生殖細胞の変異である。これは、子孫に伝わる遺伝子の変化である。何億年という間に、宇宙線や自然界にある放射性同位元素、自然界にある変異原物質で、突然変異が蓄積し、そのあるものは進化に貢献したり、そのあるものは、遺伝病として現在に引き継がれている。しかしながら、精密な、詳細な研究によっても、原爆被曝者の次代に、変異原性を持つ放射線による遺伝形質の変化を証明することは出来なかった。

もう一つの変異原物質の作用は、我々の体の大部分を構成している生殖細胞以外の細胞、すなわ

ち体細胞に対する影響である。変異原物質によって、体細胞に起こされる変異の中、最も私たちの健康に関係のあるものは、細胞のがん化に関するものだろう。私たちの体は数十兆個の細胞から作られている。その数は地球の総人口の一万倍にもなる。私たちの体の中で、一個でもがん細胞が生まれると、長い年月をかけてそれはがんの塊へと成長する。

では、どんな変異原が私たちの回りにあるのだろうか？どうしたらそのような変異原物質の作用を避けられるのだろうか？どうしたらがんにかからないですむのだろうか？科学者の現在理解していることを平易に述べてみたい。

<参 考 資 料>

がんになしでもかからないための12カ条

- 1 偏食しないでバランスのとれた栄養をとる。
- 2 同じ食品を繰り返し食べない。
- 3 食べ過ぎをさけ、脂肪をとり過ぎない。
- 4 深酒をしない。
- 5 喫煙を少なくする。
- 6 適量のビタミンA、C、Eと繊維質のものを多くとる。
- 7 塩辛いものを多量に食べない。あまり熱いものはとらない。
- 8 ひどく焦げた部分は食べない。
- 9 かびの生えたものは食べない。
- 10 過度に日光に当たらない。
- 11 過労を避ける。適度の運動をする。
- 12 体を清潔に保つ。

公開講演は、日本環境変異原学会第14回大会に先立ち、1985年9月29日18時より秋田市文化会館小ホールにおいて、秋田市（健康と体力づくり市

民会議)との共催により、一般市民および学会員
合わせて約400名の参加のもとで開催された。演
者の佐藤茂秋氏は、当初予定していた杉村隆氏
(国立がんセンター総長)が急病で参加できなく
なったためそれにかわって講演していただいたも
のである。

各種加熱食品中の heterocyclic amine の定量値

静岡薬科大学衛生化学教室 高 橋 真
木 苗 直 秀
富 田 勲

はじめに

近年、アミノ酸、タンパク質および日常食品の
加熱分解物より変異原、がん原性を有する Trp-
P-1、Trp-P-2、Glu-P-1、Glu-P-
2、A α c、MeA α C、IQ、MeIQ、MeIQxな
どの heterocyclic amine が分離されている¹⁾⁶⁾。ま
た、最近、アミノ酸、糖およびクアチニンの混合
物の加熱分解物より、新たに2種の変異原性
heterocyclic amine 4,8-DiMeIQx および7,8-
DiMeIQx が単離された⁷⁾⁸⁾。加熱食品中でこれら
heterocyclic amine の含量についてはいくつかの
報告があるが、分析操作が煩雑であり、検出感度
が低いこと、回収率の検討が不十分であることな
どの問題が指摘されている。

著者らは加熱食品中の上記変異原、がん原性
heterocyclic amine を簡便、且つ精度良く定量す
る方法を検討している。食用および培地用牛肉ユ
キス中に含まれる非蛍光性の aminoimidazoquin-
oline および aminoimidazoquinoxaline 化合物につ
いてはブルーコットン⁹⁾を組み入れた部分精製と
電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラ
フィー (LCEC: liquid chromatography with
electrochemical detection) による微量定量法を
既に確立した¹⁰⁾。

今回、蛍光を有する aminopyridoindole および
aminodipyridoimidazole 化合物について蛍光検出
器を用いた高速液体クロマトグラフィー (LC-
fluorometry: liquid chromatography with
fluorometric detection) による定量法を検討
し、LCEC法と併用して数種の加熱食品中の各
種 heterocyclic amine の同時定量を試みた。

1 部分精製

ガスコンロ上で焼いた牛肉、鶏肉、羊肉および
ホットプレート上で焼いた牛肉各25gを0.1
NHClで処理し、HCl層を trichloroacetic acid
(1g/ml)で除タンパクしたのち、6 NNaOH
で中和し、水を加えて1,000mlとした。試料溶液
にブルーコットン2gを加え、heterocyclic
amineを吸着させた。吸着物をメタノール-アン
モニア水(50:1、%)で抽出し、減圧乾固し
た。残査を水250mlに溶かし、再びブルーコッ
トン2gで処理した。次いで、0.1NHCl-CH₂Cl₂分
配を行ない、HCl層を45℃で減圧乾固した。濃縮
物の一部を蛍光性 heterocyclic amine の分析試料
とした。残りは SEP-PAK silica cartridge 処理
を行い、0.25%アンモニア水を含むメタノール-
クロロホルム(3:7、%)で溶離する画分を非
蛍光性 heterocyclic amine の分析試料とした。

2 LCECによる非蛍光性 heterocyclic amine の 分析

既報¹⁰⁾に準じ、SEP-PAK silica cartridge 処理
により部分精製した試料を ODS カラム (YMC
A-303) を用いて LCEC 分析した。標品の
heterocyclic amine の保持時間に対応したフラン
クションを分取したのち、陽イオン交換カラム
(TSKgel SP-2 SW) を用いて LCEC 分析し
た。ODS および SP-2 SW カラムでの二重測定
の結果、両者の数値がほぼ一致した場合を分析値
とした。なお、ODS カラムの場合は移動相として
アセトニトリル-リン酸緩衝液 (pH2.0) を、陽イ
オン交換カラムの場合にはアセトニトリル-リン酸
緩衝液 (pH3.0) を用いた。また、EC 検出器 (Yana-

ko VMD 501) の印加電圧を+1,000 mV とした。

3 LC—fluorometry による蛍光性 heterocyclic amine の分析

部分精製において0.1 NHCl—CH₂Cl₂分配して得られた HCl 層を乾固したのち、少量のメタノールに溶解し、ODS カラム (YMC A—303, 46×250mm) を用いて LC—fluorometry 分析した。標品の heterocyclic amine の保持時間に対応するフラクションを分取したのち、さらに陽イオン交換カラム (TSKgel SP—2 SW, 4.6×250mm) を用いて LC—fluorometry 分析した。この場合、heterocyclic amine 以外の共雑ピークを認めたので、対応するフラクションについて、再び先と同一の ODS カラムを用いて LC—fluorometry 分析した。SP—2 SW および 2 回目の ODS カラムでの

二重測定において数値がほぼ一致した場合を分析値とした。移動相としては ODS カラムの場合、15—25% アセトニトリル—リン酸緩衝液 (pH 2.0)、陽イオン交換カラムの場合、40% アセトニトリル—リン酸緩衝液 (pH 3.0)、また、2 回目の ODS カラムには 18—25% アセトニトリル—リン酸緩衝液 (pH 2.0) を用いた。なお、蛍光強度は、Trp—P—1、Trp—P—2 が Ex 266 nm、Em 411 nm、AαC、MeαC は Ex 345 nm、Em 395 nm で測定した。

4 回収率

加熱調理した食品に一定量の¹⁴C 標識あるいは非標識の標品を添加し、その放射活性または非添加試料との分析値を比較して回収率を求めた (Table 1)。

Table 1 Recoveries of exogenously added authentic compounds on partial purification

Samples	Recovery (%)						
	IQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	AαC	MeAαC
Broiled beef	62	72		52	53	56	
Fried ground beef		65		52	51		
Broiled chicken		69	62	51	55	57	
Broiled mutton		52	67		54	56	58

The recoveries of IQ, MeIQx and 4, 8—DiMeIQx were determined at the step of the separation in a SEP—PAK silica cartridge. Other recoveries were determined at the step of 0.1N HCl—CH₂Cl₂ partition.

Table 2 Amounts of heterocyclic amines in cooked meat samples

Samples	Amount (ng / g of sample)						
	IQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	AαC	MeAαC
Broiled beef	0.19	2.11	—	0.21	0.25	1.20	—
Fried ground beef	—	0.64	0.12	0.19	0.21	—	—
Broiled chicken	—	2.33	0.81	0.12	0.18	0.21	—
Broiled mutton	—	1.01	0.67	—	0.15	2.50	0.19

— : not detected

5 加熱食品中の heterocyclic amine の定量値

数種の加熱食品について LCE (および LC—fluorometry で得られた分析値を回収率で補正して定量値を算出した (Table 2)。

おわりに

加熱食品中の変異、がん原性 heterocyclic amine の含有量を知ること、これら化合物の人ががん発生の危険性を評価する上で重要である。本実験で確立したブルーコットン処理、0.1 NHCl—CH₂Cl₂分配および SEP PAK silica cartridge 処理による部分精製と LCEC および LC—fluorometry を組み合わせた微量分析法は、加熱食品のみならず、生体試料や環境試料に含まれる heterocyclic amine の定量にも応用できるものと考えている。

謝 辞

本実験は国立がんセンターとの協同研究であり、御指導、御助言を賜りました国立がんセンター総長・杉村 隆博士、同研究所生化学部長・佐藤茂秋博士、発がん研究部長・長尾美奈子博士、同室長・若林敬二博士に深く謝意を表します。

文 献

- 1) Yamaguchi, K., K. Shudo, K. Okamoto, T. Sugimura and T. Kosuge : Presence of 2—aminodipyrido [1, 2—*a* : 3', 2'—*d*] imidazole in broiled cuttlefish.

Gann, 71 : 743—744, 1980.

- 2) Yamaguchi K., K. Shudo, T. Okamoto, T. Sugimura and T. Kosuge : Presence of 3—amino—1, 4—dimethyl—5 *H*—pyrido [4, 3—*b*] indole in broiled beef. Gann, 71 : 745—746, 1980.
- 3) Yamaizumi Z., T. Shiomi, H. Kasai, S. Nishimura, Y. Takahashi, M. Nagao and T. Sugimura : Detection of potent mutagens, Trp—P—1 and Trp—P—2, in broiled fish. Cancer Lett., 9 : 75—83, 1980.
- 4) Matsumoto, T., D. Yoshida and H. Tomita : Determination of mutagens, amino—α—carbolines in grilled foods and cigarette smoke condensate. Cancer Lett., 12 : 105—110, 1981.
- 5) Hargraves W. A. and M. W. Pariza : Purification and mass spectral characterization of bacterial mutagens from commercial beef extract. Cancer Res., 43 : 1467—1472, 1983.
- 6) Felton J. S., M. G. Knize, C. Wood, B. J. Wuebbles, S. K. Healy, D. H. Stuermer, J. F. Bjeldanes, B. J. Kimble and F. T. Hatch : Isolation and characterization of new mutagens from fried beef. Carcinogenesis, 5 : 95—102, 1984.
- 7) Negishi C., K. Wakabayashi, Z. Yamaizumi,

- H. Saito, S. Sato, T. Sugimura and M. Jägerstad : 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., 147: 267-268 (1985).
- 8) Negishi C., K.Wakabayashi, M.Tsuda, S.Sato, T.Sugimura, H.Saito, M.Maeda and M.Jägerstad : Formation of 2-amino-3, 7, 8-trimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline, a new mutagen, by heating a mixture of creatinine, glucose and glycine. Mutat. Res., 140: 55-59, 1984.
- 9) Hayatsu H., T.Oka, A.Wakata, Y.Ohara, T.Hayatsu, H.Kobayashi and S.Arimoto : Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfocopperphthalocyanine. Mutat. Res., 119: 233-238, 1983.
- 10) Takahashi M., K.Wakabayashi, M.Nagao, M.Yamamoto, T.Masui, T.Goto, N.Kinae, I.Tomita and T.Sugimura : Quantification of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (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, 1985.
- 11) Takahashi M., K.Wakabayashi, M.Nagao, Z.Yamaizumi, S.Sato, N.Kinae, I.Tomita and T.Sugimura : Identification and quantification of 2-amino-3, 4, 8-trimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (4, 8-DiMeIQx) in beef extract. Carcinogenesis, 6: 1537-1539, 1985.

環境変異研究 8: 55-59 (1986)

オキシム化合物の変異原性

日本バイオアッセイ研究センター 荒木 明 宏
高橋 典 代
東京大学医科学研究所 松島 泰次郎

1 はじめに

ニトロソ化合物のうちN-ニトロソ化合物の多くは癌原性があり変異原性のある事が知られている。しかし同じニトロソ化合物のうちC-ニトロソ化合物の癌原性、変異原性はあまり知られていない。C-ニトロソ化合物のうち第一または第二炭素原子にニトロソ基の結合しているものは互変異性体であるオキシムのほうが一般的に安定である。

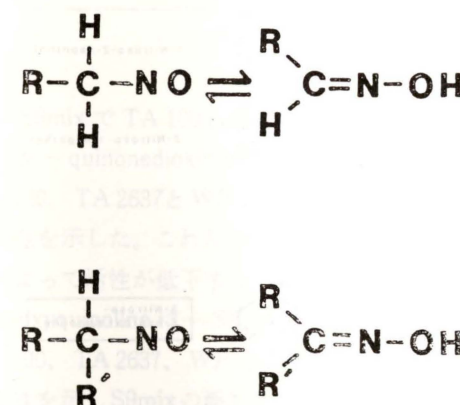


図 1

そこで構造に類似しているオキシム化合物について微生物を用いる変異原性試験を実施し、オキシム化合物の変異原性と構造相関について検討した。

2 方法および材料

試験に用いたオキシム化合物の名称および化学

構造を図1に示した(試験の結果陽性を与えた化合物の名称を枠でかこって示してある)。試験菌株はサルモネラ菌 TA 98, TA 100, TA 2637と大腸菌 WP 2 *uvrA* / pKM 101を用いプレインキュベーション法¹⁾ 37℃、20分で代謝活性化の有無で試験を実施した。試験物質の調整にはDMSOを用い、試験濃度は最高50~100 μg/プレートもしくは毒性の生ずる濃度まで実施した。

S9はphenobarbitalと5, 6-benzoflavoneを誘導剤として投与した雄ラットの肝S9を用いた²⁾。S9 mixの組成はNADPH 4 mM, NADH 4 mM, G-6-P 5 mM, MgCl₂ 8 mM, KCl 33 mM, ナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4) 100 mMと10% S9 (50 μl/プレート)を用いた。10% S9の濃度はWP2 *uvrA* / pKM 101におけるformaldoximeの変異原性発現の最適濃度である。

変異原性の有無の判定は濃度に依存して復帰変異コロニー数が増加し、かつ溶媒コントロールの2倍以上の復帰変異を生ずる場合を陽性と判断した。

3 結 果

29種類のオキシム化合物のうち8種類に変異原性を認めた。その結果は表1、図2に示した。formaldoxime, glyoxaldioxime, α-picolinealdoximeは+S9mixにおいてWP2 *uvrA* / pKM 101にのみ変異原性を示した。

2-methoxy-p-benzoquinone-4-oximeは、-S9mixでTA 100とTA 2637に、2-methyl-p-benzoquinone-4-oximeは-S9mixでTA 2637に、p-quinonemonoxime

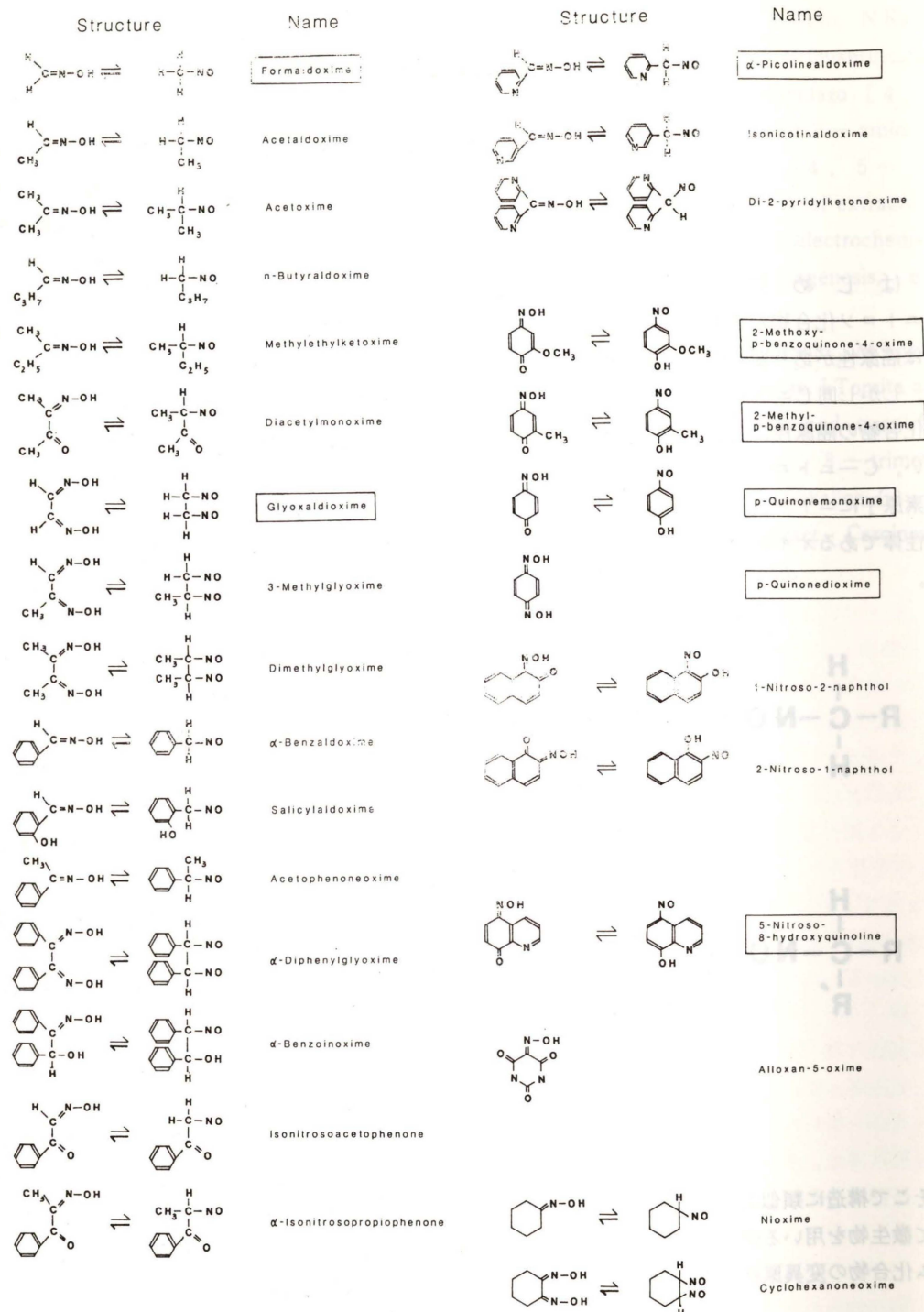


図2 オキシム化合物の名称と構造

試験の結果陽性を示した化合物の名称を枠でかこって示した。

表-1 オキシム化合物の変異原性

Chemical	Mutagenicity (Revertants / μmole)							
	-S9 mix				+S9 mix			
	TA98	TA100	TA2637	WP*	TA98	TA100	TA2637	WP*
Formaldoxime	-	-	-	-	-	-	-	23
Glyoxaldoxime	-	-	-	-	-	-	-	6
α-Picolinaldoxime	-	-	-	-	-	-	-	32
2-Methoxy-p-benzoquinone-4-oxime	-	1310	260	-	-	266	144	-
2-Methyl-p-benzoquinone-4-oxime	-	-	27	-	-	-	-	-
p-Quinonemonoxime	70	-	-	121	24	-	12	-
p-Quinonedioxime	2	10	3	14	-	-	4	7
5-Nitroso-8-hydroxyquinoline	610	6150	950	3060	3360	8960	2880	18300

* WP: WP2 uvrA/pKM101

は-S9mixでTA100とWP2 uvrA/pKM101に、p-quinonedioximeは-S9mixでTA98、TA100、TA2637とWP2 uvrA/pKM101に変異原性を示した。これらの変異原性はS9mixの添加によって活性が低下する。5-nitroso-8-hydroxyquinolineは-S9mixにおいてTA98、TA100、TA2637、WP2 uvrA/pKM101に変異原性を示しS9mixの添加によってその活性は増強する。

4 考察

脂肪族モノオキシム類のうち、オキシム基の結合する炭素原子にアルキル基等が結合すると変異原性は消失する。ラットでの発癌性が確認されている acetoxime³⁾は変異原性が認められなかった。脂肪族ジオキシム類においてもアルキル基が結合する事により変異原性は消失する。これは脂環式オキシム類の cyclohexanoneoxime, nioxime のいずれも変異原性を示さないことと一致する。オキ

シム基の結合する炭素原子に複素環である pyridyl 基の結合した α-picoline-aldoxime は +S9mixにおいて明らかな変異原性を示すのに対し isonicotinaldoxime は変異原性を示さない。また phenyl 基の結合した α-benzaldoxime, salicylaldoxime はTA100において濃度に依存した量、反応曲線を示すが、溶媒対照の2倍に達しないで毒性により死滅する。オキシム基の結合する炭素原子に phenyl 基もしくは pyridyl 基の結合した化合物は、毒性によって変異原性が隠れている事も考えられ、treat and plate法による変異原性の有無の確認が必要と思われる。

パラベンゾキノン型のオキシム類は代謝活性化を必要とせずに種々の菌株に対し変異原性を示すが、変異原性を示す濃度範囲は狭い。(p-quinonedioximeはアメリカのNTPプログラムによりラットでの癌原性が確認されている) また、1-nitroso-2-naphthol、2-nitroso-1-naphthol はTA100において濃度に依存した復

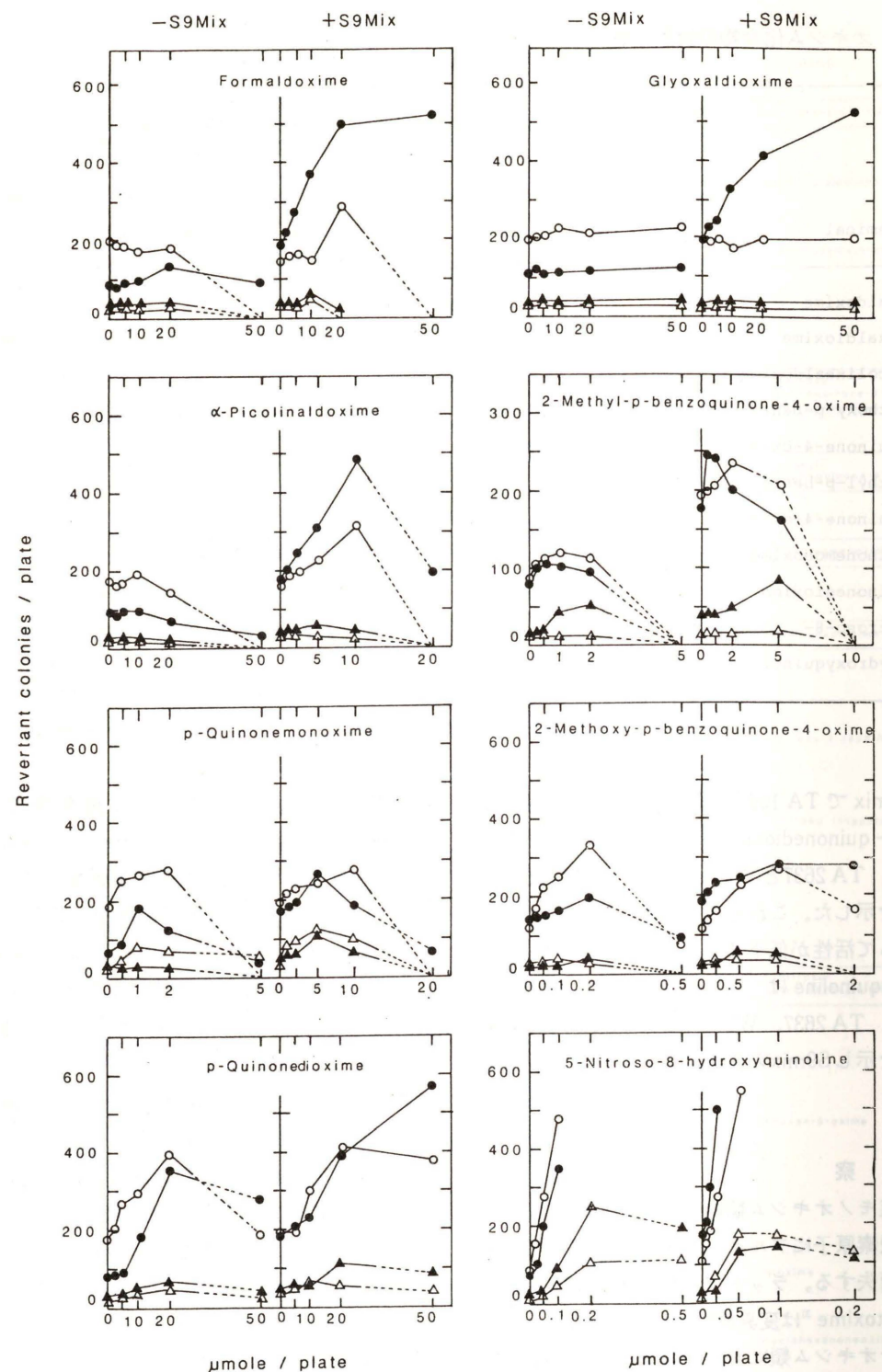


図3 オキシム化合物の変異原性結果図

(●) WP 2 *uvrA* / pKM 101 (○) TA 100 (▲) TA 2637 (△) TA 98

帰変異の増加を示すが溶媒対照の2倍に達しない
で死滅する。これらベンゾキノ型ナフトキノ
型のオキシムの毒性は、互変異性体であるニト
ロソフェノール、ニトロソナフトールの水酸基によ
るものと思われる。

5-nitroso-8-hydroxyquinolineの強い変異
原性は quinoline⁴⁾と同様に S9mix の添加によって
活性が増加する事より、quinoline 骨格によるもの
と思われる。

文 献

- 1) Matsushima, T., T.Sugimura, M.Nagao, T.Yahagi, A.Shirai, M.Sawamura : Factors modulating mutagenicity in microbial test. In : Short - Term Test Systems for Detecting Carcinogens (K. H. Norpoth R.C.Garner, eds.), Springer. Berlin, pp. 273-285, 1980.

- 2) Matsushima, T., M.Sawamura, K.Hara, T.Sugimura : A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In : In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing (F.J.de Serres, J.R.Fouts, J.R.Bend, R.M.Philpot, eds.), Elsevier, Amsterdam, pp.85-88, 1976.
- 3) Sidney, S.M., S.Salmasi, R.G.Runge : Carcinogenicity test of acetoxime in MRC-Wistar rats. J.N.C.I., 69 : 961-962, 1982.
- 4) Nagao, M., T. Yahagi, Y.Seino, T.Sugimura, N.Ito : Mutagenicities of quinoline and its derivatives. Mutation Res., 42 : 335-341, 1977.

変異原の還元的失活の試み

国立遺伝学研究所

玉井 功 一※
村上 和 夫
賀田 恒 夫
福岡県衛生公害センター 常盤 寛

1 緒 言

ベンズピレンやピレンなどが、大気中で、ニトロ化されて生じる、ニトロアレーン類は、強力な発ガン性及び変異原性を示し、環境毒性としても近年注目されている¹⁾²⁾³⁾。

ニトロ化合物は、一般に生体内で酵素的に還元されて終局的には、アミノ基を持つ化合物となるが、中間体であるハイドロキシアミン類などは、DNA と強い反応性を有するものと考えられている。一方、In vitro における化学的還元においては、化合物中のニトロ基の位置・存在状態で還元性が著しく異なっていると考えられる。

我々は、生体の有する化学的および酵素的な還元的能力と、変異原の失活あるいは、活性化の関心に興味を持ち、今回は、ニトロアレーン類の代表であるジニトロピレンに対する還元的 Desmutagen¹⁰⁾¹²⁾ の作用について検討を行なった。

2 材料及び方法

(a) ジニトロピレン (DNP) は、和光純薬より購入して使用した。このものは、1,3-、1,6-、1,8-、の異性体が、約 2:29:19 の割合に混合した標品である。

(b) 化学的不活化

種々な濃度の還元剤の 1 ml の中に化学変異原を

一定量加え、室温または、高温に保った後その一部分について、サルモネラ TA 98 株を用いたエームス法⁴⁾あるいは、枯草菌レックアッセイ法⁵⁾⁶⁾によって残存変異原活性を測定した。

(c) ニワトリ肝ホモジェネートによる不活化

市販のニワトリの肝臓組織を 0℃ にてホモジェネートし、9,000×g 遠心、上澄 1 ml に化学変異原を一定量混合し、37℃ にて 1 時間保持した後変異原活性を測定した。

(d) 緑膿菌による不活化

Oxoid Nutrient broth による *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853) の一夜培養液 0.1 ml と一定量の化学変異原を混合し培養した後加熱殺菌 (100℃ 30 分) して、その一部をエームスアッセイ法により変異原活性を測定した。

3 結 果

各種還元剤による DNP に対する不活化の試みを Table 1 に示す。一夜の室温作用あるいは加熱処理によって、アスコルビン酸 (ビタミン C)、システイン及びチオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) による DNP の不活化は示されなかった。

※ 現在の所属：三和化学研究所

TABLE 1

EFFECTS OF ASCORBIC ACID, CYSTEINE, SODIUM THIOSULFATE ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) AND SODIUM HYDROSULFITE ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ON THE MUTAGENICITY OF DINITROPYRENE. The mutagen was treated in an aqueous solution at a concentration of $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ with these reducing agents at room temperature, then $20 \mu\text{l}$ of each solution was used for the *Salmonella* assay with TA 98 without metabolic activation.

Treatment		Mean number of His ⁺ colonies found per plate (% activity)	
Agent	Concentration (mg/ml)		
Ascorbic acid	0	355	100
	10	455	134
	100	557	167
Cysteine	0	355	100
	1	315	85
	10	258	72
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0	355	100
	1	411	120
	10	378	109
	100	330	92
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	0	340	100
	1	87	4.7
	10	38	1.0
	100	51	5.7

The mean number 46 of spontaneous His⁺ revertant was subtracted and calculated.

チオ硫酸ナトリウムのように高濃度での作用や加熱などにより弱いながら変異原性の増加が認められた例もあった。しかしチオ硫酸ナトリウムより一つ酸素原子の多い Sodium hydrosulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) によっては、Table 1 に示す様に、DNP は、容易に不活化された。この不活化能は、反応中に加熱するか否かによらず $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 以上の濃度で示された。また、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ は、AF-2 および

4 NQO に対しても不活化を示した。TA98株を用いた試験は、フレイムシフト型の変異原性を観察しているが、不活化反応の結果他の特性の変異原に変化する可能性をチェックするため、塩基置換型の変異原検出に有効なサルモネラ TA1535 あるいは、大腸菌 *E. coli* WP2 を用いた実験を行なったが、この場合も不活化を確認した。またレックアッセイ試験による確認も行なった。

TABLE 2

INACTIVATION OF THE MUTAGENICITY OF DINITROPYRENE BY LIVER HOMOGENATE OF CHICKEN. The mutagen was added into the homogenate solution at 37°C , then $20 \mu\text{l}$ was sampled and used for the *Salmonella* assay with TA 98

Time of treatment (min)	Mean number of His ⁺ colonies per plate		
0	350	100	%
30	75	9.4	%
60	62	2.9	%

The mean number 40 of spontaneous His⁺ revertant was subtracted and calculated.

ニワトリの肝ホモジェネートによる DNP に対する作用は、反応時間30および60分で、90%以上の変異原が失われた (Table 2)。また緑膿菌による不活化では、コントロールと比較して90%ほどの変異原が失われた。この場合、DNP が菌体成分へ吸着されることによるものでないことも確認した。

4 考察および結論

以上、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ がジニトロピレン類を In vitro で能率よく不活化することを示した。ここで観察しているのは、もっぱら変異原活性であるので今後化学的に如何なる反応生成物が生れたのかを知ることが必要である。またこのような不活化は非可逆的であり、生体中で可逆的に再活性される可能性が全く無いのかという疑問も依然存在する。その後、行なった化学的研究によると、高速液体クロマトグラフィで示される (1,3-, 1,6-,

1,8-) 3種のジニトロピレンのピークは、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ の作用によって何れも全く消失した。

一方還元によって生成が考えられるアミノ体各化合物のピークは検出されなかった。

このことが分析技術的な問題であるのか、あるいは、反応の実態を反映しているのか否かまだ不明である。また大西⁷⁾らは、アミノ体化合物としての生体に対する危険性を示しており、ジニトロピレンが、ジアミノピレンなどに変化しても依然として変異原性を示すことの可能性も考えられ、この点も今後検討すべき課題である。

一方ニワトリ肝ホモジェネートや緑膿菌の生細胞によって、ジニトロピレンが失活されることは、Mason⁸⁾らや諸富⁹⁾らの観察と一致しており、酵素的還元によるものと考えられる。

In vitro によるニトロ基の還元的不活化に関しては、大沢¹⁰⁾がソルビン酸-亜硝酸の反応生成物がビタミンCやシステインで容易に不活される

ことに比しジニトロピレンは全く異なった特質を示していることになる。筆者の1人(TK)は、AF-2は、シスチンによって高温でわずかにしか不活化されぬに過ぎないことを経験している。

一方、酵素的不活化は、何れの場合にも非常に能率的であり、このことが果して一般的に云えるのか否かは、興味深いところである。

今回の報告では、ビタミンCやシスチンなどの生体成分によるジニトロピレンの不活化は示されなかったが、今後、ニトロ化合物をはじめ種々な変異原の構造と生体因子による還元的不活化能との関係を追求したいと考える。

文 献

- 1) 常盤他 : 燃焼生成物中ニトロアレンの変異原性と1,6-ジニトロピレンの発ガン性、環境変異原研究、6:49-56, 1984.
- 2) 大西他 : ニトロアレンの重要性、環境変異原研究、6:29-37, 1984.
- 3) Rosenkranz, H. S., R. Mermelstein : Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. Mutat. Res., 114:217-267, 1983.
- 4) Ames, B. N., J. McCann, E. Yamasaki : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* /mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31:347-363, 1975.
- 5) Kada, T., Y. Sadaie, Y. Sakamoto : *Bacillus subtilis* repair test. Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2:13-31,

1984.

- 6) Horikawa, K., H. Tokiwa, T. Kada : Results of the rec-assay of nitropyrenes in *Bacillus subtilis* test system. Mutat. Res., 174:89-92, 1986.
- 7) 大西他 : 環境におけるニトロピレンの存在およびその代謝、代謝、22:725-734, 1985.
- 8) Mason, R. P., P. D. Josephy : Free radical mechanism of nitroreductase. In : Toxicity of Nitroaromatic Compounds. (D. E. Rickert) Hemisphere Publishing Corp., 121-140, 1985.
- 9) 諸富他 : 腸内菌による化学物質の代謝、トキシコロジーフォーラム、7:395-408, 1984.
- 10) 賀田 : 自然因子における変異原の抑制、遺伝、34:49-54, 1980.
- 11) Osawa, T., H. Ishibashi M. Namiki, T. Kada : Desmutagenic actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrrole mutagen formed by the reaction between food additives; sorbic acid and sodium nitrite. Biochemical and Biophysical Research Communication. 95:835-841, 1980.
- 12) Kada, T. Desmutagenes and bio-antimutagens: Their action mechanisms and possible roles in the modulation of dose-mutation relationships. Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis. 73-82, 1984.

環境変異原研究 8:65-67 (1986)

ニトロフルオレン類の変異原性と代謝活性化

国立衛生試験所・変異原性部 渡 辺 雅 彦
能 美 健 彦
石 館 基

1 はじめに

ディーゼル排出ガス中などに含まれる nitroarene は、変異原性、発癌性を持つものが多く、環境汚染の一因となっている。

2-nitrofluorene (2 NF) は、ディーゼル排出ガス中から検出される nitroarene の一種であり、S9mixによる代謝活性化を受けずに変異原性を示す。しかし、2 NF は nitroreductase 欠損株である TA 98 NR、O-acetyltransferase 欠損株である TA 98/1,8-DNP₆ に対する変異原性が弱いことから、2 NF そのものは変異原性を持たず、菌体内で nitroreductase、O-acetyltransferase による代謝活性化を受け、究極活性体になるものと考えられている¹⁾²⁾。一方、他の nitroarene の中には、NR 株、1,8-DNP 株に対しても親株と同様の変異原性を示すものもあり、nitroarene の代謝活性化経路は一樣ではない³⁾。したがって、構造の違いにより変異原活性、代謝経路に大きな差が生じることが考えられる。今回、我々はニトロ基の結合部位の異なる4種の nitrofluorene (NF)、および4種の nitrofluorenone (NFone) について、親株および NR 株、1,8-DNP 株を用い変異原性試験を行ったので報告する。

2 実験材料と方法

菌株は *Salmonella typhimurium* TA 100 NR、TA 100/1,8-DNP、TA 98、TA 98 NR、TA 98/1,8-DNP₆、計6株(NR 株、1,8-DNP 株は Dr. H. S. Rosenkranz より供与された)を用い、PCB ラット肝 S9mix の不在下および存在下において、37℃、20分のプレインキュ

ベーション法で Ames テストを行った。本研究に用いた NP、NFone はすべて国立衛試、合成化学研究部より供与された。

3 結果と考察

TA 100、TA 98 株を用い、各化合物について変異原性に関する dose-response curve を描き、それぞれの最適濃度を決定した。6 菌株すべてについて、最適濃度で Ames テストを行った結果を図に示す。

S9mix 不在下において、各化合物の変異原性の強さを比較すると、NF、NFone とともに 2-ニトロ化合物が最も強く、3-ニトロ化合物がこれに次いでいた(図では化合物により濃度が異なることに注意)。4 NF、1 NFone、4 NFone は TA 100 > TA 98 であったが、他の5種は TA 98 > TA 100 であった。2 NF は、TA 98 により高い活性を有するフレームシフト型の変異原であるが⁴⁾、置換基の位置により、塩基置換型の突然変異が主体となる可能性が示唆された。親株と NR 株、1,8-DNP 株の感受性を比較すると、1 NF (親株 ≒ 1,8-DNP 株 > NR 株)、4 NF (親株 ≒ NR 株 ≒ 1,8-DNP 株)を除く6化合物では、親株 > NR 株 ≒ 1,8-DNP 株であった。したがって、これら6化合物は、nitroreductase、O-acetyltransferase を介して菌体内での代謝活性化が進むと考えられた。

S9mix 存在下では、1 NF、4 NF、1 NFone を除く5化合物が、NR 株に対してより強い変異原性を示し、親株 > NR 株 > 1,8-DNP 株となった。これは、S 9 中に nitroreductase が存

在することによると思われる¹⁾。1 NF、4 NF は、S9mixの添加によって全般に変異原性が強まり、1 NFone は、親株に対する変異原性がNR株、1,8-DNP株と同じ程度にまで弱まる結果となった。このことは、これら3化合物がS9mixの存在下で何らかの代謝変換を受けていることを示している。

4 おわりに

1 NF、4 NFを除き、今回試験に供したNF、NFoneは、nitroreductase、O-acetyltransferaseを介してバクテリア菌体内で代謝活性化が進行す

る可能性が示唆された。

nitroreductase、O-acetyltransferaseはnitroareneの変異原性発現の鍵を握る酵素である。現在4種のbacterial nitroreductaseの存在が報告されており⁴⁾、O-acetyltransferaseも部分精製されている⁵⁾。一方、哺乳動物ではN、O-acetyltransferaseが重要な役割を果たしていると考えられている⁵⁾。種々生物系におけるnitroreductaseおよびacetyltransferaseの活性と、変異原性あるいは発癌性発現との関連性を究明するためには、これら酵素の遺伝子をクローニングして、構造と機能を明らかにしていく必要があると思われる。そ

のため、我々は現在、サルモネラからnitroareneの代謝活性化に関与すると考えられるnitroreductase、O-acetyltransferase遺伝子クローニングを進行中である。

文 献

- 1) Rosenkranz, H. S., R. Mermelstein : Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutation Res.*, 114 : 217—267, 1983.
- 2) McCoy, E. C., M. Anders, H. S. Rosenkranz : The basis of the insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA 98/1,8-DNP₆ to the mutagenic action of nitroarenes. *Mutation Res.*, 121 : 17—23, 1983.
- 3) Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki, R. Kato : Metabolic activation of mutagenic N-hydroxyarylamines by O-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Arch. Biochem. Biophys.*, 239 : 286—295, 1985.
- 4) Kinouchi, T., Y. Ohnishi : Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 596—604, 1983.
- 5) King, C. M., W. T. Allaben : 薬物の解毒・活性化機構の生化学 II Chapter 10、アリルヒドロキサム酸アシル転移酵素 (W. B. Jakoby 編、加藤隆一他訳)、清至書院、211—223, 1983.

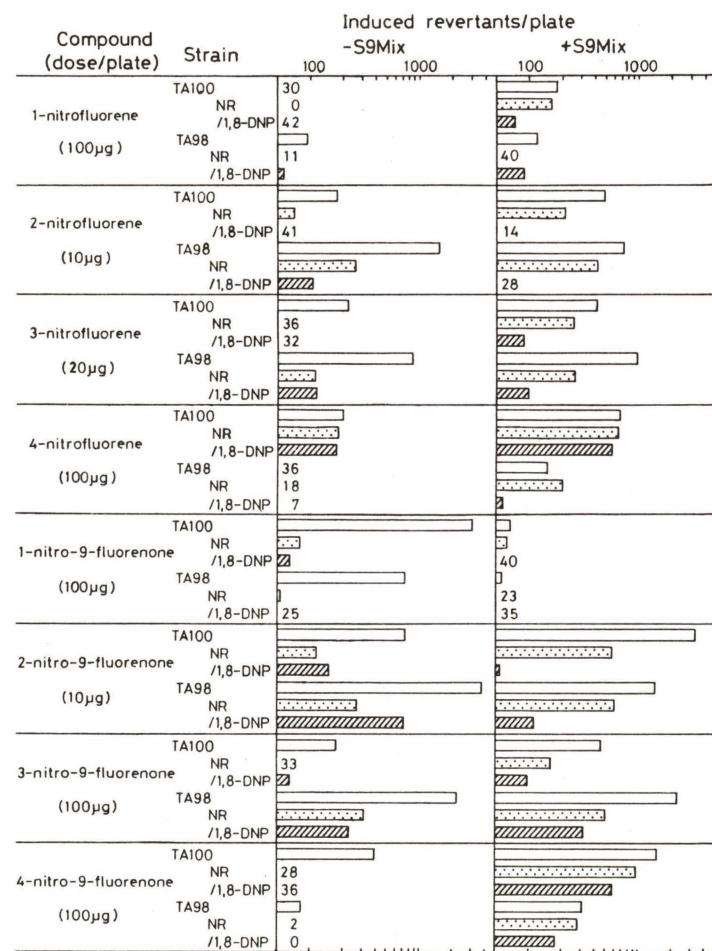


図 ニトロフルオレン、ニトロフルオレノンの各試験菌株に対する変異原性

ショウジョウバエの除去修復能欠損系統 *mei-9^a* の体細胞における benzo (a) pyrene と 2 - acetylaminofluorene の変異原性

武田薬品工業株式会社・中央研究所 藤 川 和 男

1 はじめに

前がん物質 benzo (a) pyrene (BP) や 2 - acetylaminofluorene (2 AAF) は、Ames のサルモネラ菌 / S 9 mix 系で顕著な遺伝子突然変異誘発効果を示すが、in vivo 系ではそうでないといわれている。ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ハエ) でも例外ではない。伴性劣性致死法と呼ばれている高感度な遺伝子突然変異検出系を用いて、いろいろな処理条件下で調べても、検出された突然変異の頻度は自然レベルのたかだか数倍にすぎなかったのである¹⁾²⁾。ただしこれは生殖細胞を対象にした実験の話であって、体細胞においては事情が異なるかもしれない。変異原性の発現に代謝活性化を必要とする物質の作用に対して、ハエの体細胞は生殖細胞よりも反応しやすいという証拠があるからである³⁾。視点を変えて、BP や 2 AAF も UV 型変異原であることを考慮すれば、これらが弱い変異原性しか示さないのは UV が弱変異原であること⁴⁾⁵⁾と一脈通じるところがあるかもしれない。すなわち、除去修復能が正常な細胞では、BP や 2 AAF による前突然変異損傷は、UV 損傷と同様に、DNA から効率良く取り除かれるのかもしれない。

上記 2 つの作業仮説の当否を明らかにすべく、正常な修復をもつ *Exc⁺* と、*mei-9^a* 突然変異のため除去修復能を欠損している *Exc⁻* 系統の体細胞を対象とした遺伝子突然変異誘発実験を行った。体細胞遺伝子突然変異は unstable *white-zeste* (UZ) 系を利用して、眼色復帰変異として検出した。

2 実験方法

遺伝子型 *scz'w^{+(TE)}/C (1) DX, yf* の UZ *Exc⁺* 株と *scz'w^{+(TE)} mei-9^a/C (1) DX, yf* の UZ *Exc⁻* 株を用いた (株の作成法は文献 6)。これらの記号はいずれも X 染色体に関するもので、バーの左側が雄、右側が雌の遺伝子型を示す。*z'* (zeste) と *w^{+(TE)}* (トランスポゾン TE のために不安定になっている *white* 遺伝子) の組み合わせが UZ 系で、その表現型は黄色眼で、*w^{+(TE)}* が変異して *w⁺* にもどると、眼色は野生型の赤になる (詳細は文献 3、6)。 *mei-9^a* は *Exc⁻* 変異⁷⁾ である。 *C (1) DX, yf* は *y* (yellow, 黄体色) と *f* (forked, フォーク状毛) で標識された付着 X 染色体 \overline{XX} の一種で修復能は正常である。図 1 に UZ *Exc⁻* 株を例にとり示したが、このような特別な X 染色体を利用すると、雄の X 染色体は常に雄の子孫のみに伝えられる。

UZ *Exc⁺* や UZ *Exc⁻* 株の親バエを処理用培地上で 24 時間産卵させ、そこでふ化した幼虫をそのまま親まで生育させた。処理用培地は、Tween 80 とエタノールの 1 : 2 混液に懸濁した BP や 2 AAF を、雌幼虫の生存率や生育速度に影響を与えない濃度で、通常培地に混入して作成した。Tween 80 とエタノールの培地中濃度はそれぞれ 0.1% と 0.2% とした。

雄幼虫の複眼原基の幹細胞で生じた *w^{+(TE)}* の *w⁺* への復帰変異を成虫の黄色眼中で赤斑として検出した。雄幼虫の成虫までの生存率は、羽化した雄バエの羽化数の雌バエの羽化数に対する比として求めた。

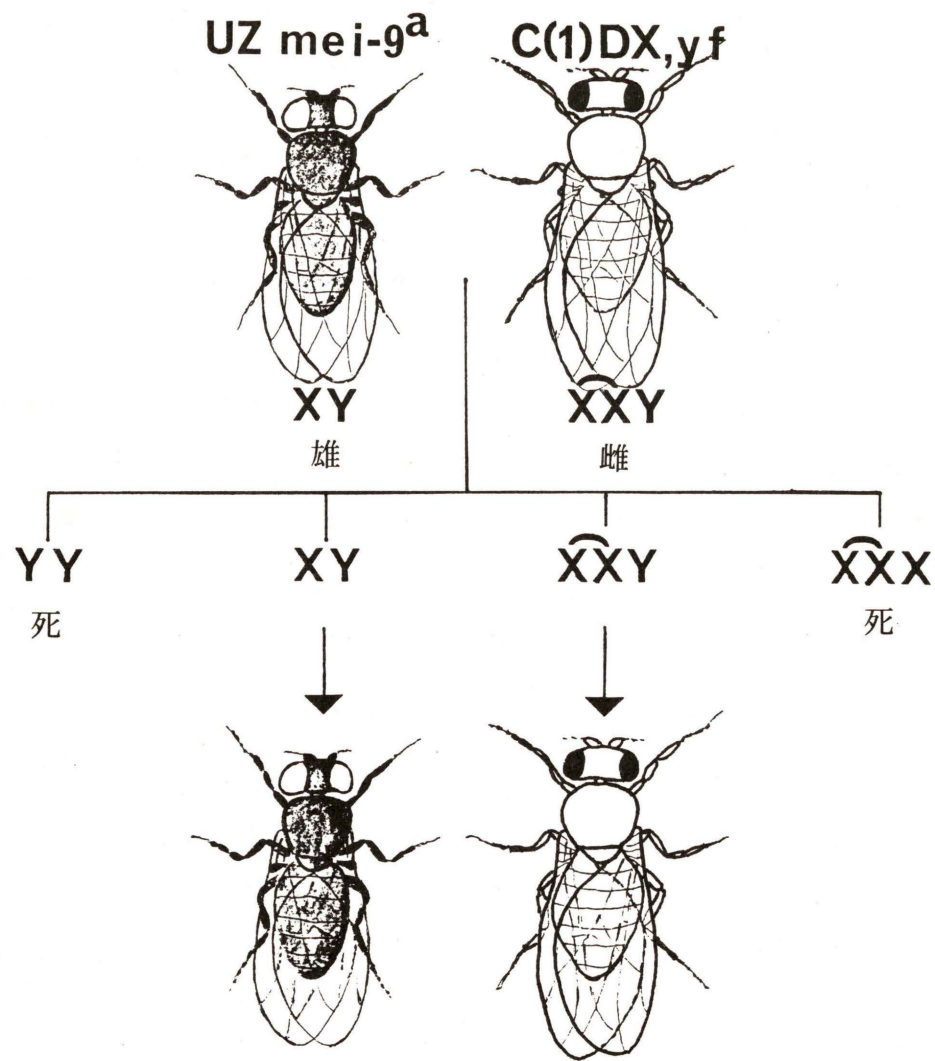


図1 付着X染色体C(1)DX,yfを利用する雄系統UZExc⁻(mei-9^a)の維持。肉眼ですぐわかる表現型は雄が黄色眼・野生型体色。雌が赤眼(野生型)・黄体色。

3 結果と考察

表1に示しているようにBPはExc⁺、Exc⁻株の両方で、2AAFはExc⁻株で変異原性効果を現した。しかし、有意であると判定された復帰変異頻度はいずれも対照レベルの2～3倍にすぎなかった。このような結果は、生殖細胞を対象とし

た過去の実験^{1),2)}で得られた「BPも2AAFも弱変異である」という結論を支持し、「体細胞ではいずれの前がん物質も顕著な遺伝子突然変異誘発効果を示すのではないか」という予測から大きくはずれものである。

BPのExc⁻幼虫に対する陽性効果はわずか

表1 幼虫期にBPや2AAFに被曝したハエにおける眼色体細胞復帰変異の出現頻度

処 理		雄バエの数 〔 A 〕	眼色復帰変異を よう雄バエの数 〔 B 〕	頻 度 〔 $\frac{B}{A} \times 100$ 〕
UZExc ⁺ 株				
溶媒対照		19,911	10	0.050
BP	4 mM	6,608	5	0.076
	8 mM	8,025	12	0.150*
2 AAF	0.5mM	8,412	5	0.059
	1.0mM	8,533	3	0.035
UZExc ⁻ 株				
溶媒対照		32,306	30	0.093
BP	0.031mM	13,538	31	0.229*
	0.063mM	7,976	14	0.176
	0.125mM	5,568	8	0.144
2 AAF	0.063mM	5,309	7	0.132
	0.125mM	5,305	13	0.245*
	0.25mM	3,573	6	0.168

UZ, unstable white - zeste sestem (眼色復帰変異検出系)。

Exc⁺、正常修復能。Exc⁻、除去修復能欠損。

*, P<0.05で有意 (Fisher's exact test)

0.03 mM で得られたが、Exc⁺ 幼虫処理ではほぼ同程度の効果を得るのに 8 mM の用量を要した。2 AAF の 0.125 mM は Exc⁻ 幼虫で復帰変異頻度を有意に上昇させたが、Exc⁺ 幼虫に対しては 1 mM でも陰性であった。これらの結果は、いずれの物質による前突然変異性損傷も細胞の除去修復機能によって効率良く取り除かれることを示唆し、「BP や 2 AAF の弱変異性は UV の弱変異原と共通の原因によるのではないか」という予測と一致するものである。

Exc⁻ 幼虫における復帰変異頻度上昇の主要な限定要因としては、BP や 2 AAF の致死作用に対する Exc⁻ 細胞の高感受性が考えられる。何故な

ら、図 2 に示しているように、いずれの物質に関しても、陽性結果は非致死用量で得られたもので、致死用量域では復帰変異頻度は生存率の低下に伴って減少したからである。

Exc⁻ 幼虫の生存率が用量に依存して顕著に減少した (LD₅₀ は BP で 0.13 mM、2 AAF で 0.31 mM) のに対し、比較的高用量域 (BP 4 ~ 8 mM、2 AAF 0.5 ~ 1 mM) でも Exc⁺ 幼虫の生存率の減少は認められなかった。BP や 2 AAF に被曝した Exc⁺ 細胞では、前突然変異損傷のみならず、致死性 DNA 損傷も効率良く修復されることがわかった。

以上のように、BP や 2 AAF のハエ体細胞にお

ける DNA 損傷作用は、Exc⁻ 幼虫の生存率の減少として明瞭に現われた。すでに指摘されていること^{2),3)}だが、ハエの Exc⁻ 株および他の修復欠損株をうまく利用すれば、環境変異原を簡便かつ迅速に検出できる in vivo repair test 系が開発できると思う。

文 献

- 1) Vogel, E., J. A. Zijlstra, W. G. H. Blijleven : Mutagenic activity of selected aromatic amines and polycyclic hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res., 107 : 53—77, 1983
- 2) Nguyen, T. D., J. B. Boyd, M. M. Green : Sensitivity of *Drosophila* mutants to chemical carcinogens. Mutation Res., 63 : 67—77, 1979
- 3) 梁治子、劉美愛、藤川和男、近藤宗平 : ショウジョウバエの体細胞突然変異、トキシコロジーフォーラム、8、587—596、1985
- 4) Ryo H., S. Kondo : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (in press)
- 5) 藤川和男、梁治子 : ショウジョウバエの体細胞突然変異と DNA 修復、細胞、7、459—463, 1985
- 6) Fujikawa, K., S. Kondo : DNA repair dependence of somatic mutagenesis of transposon—caused white alleles in *Drosophila melanogaster* after treatment with alkylating agents. Genetics 112 : 505—522, 1986
- 7) Boyd, J. B., M. D. Golino, R. B. Setlow : The *mei-9* mutant of *Drosophila melanogaster* increases mutagen sensitivity and decreases excision repair. Genetics 84 : 527—544, 1976

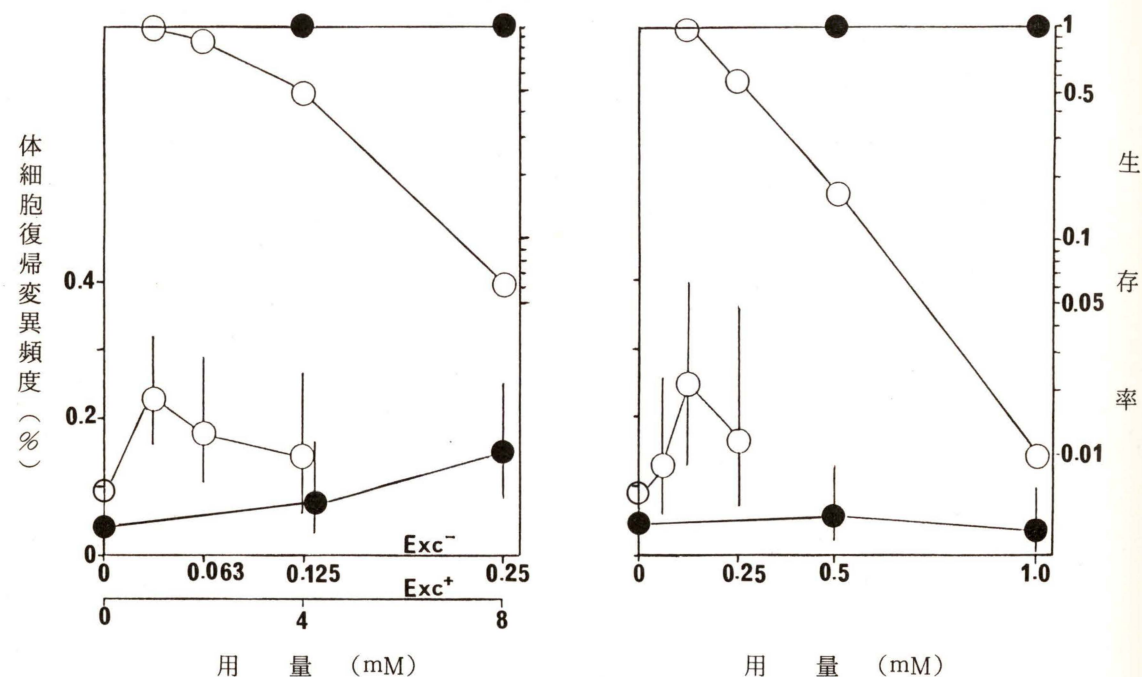


図 2 除去修復能欠損系統 UZExc⁻ (○) および正常系統 UZExc⁺ (●) 幼虫の生存率と体細胞突然変異におよぼす BP (左図) や 2 AAF (右図) の用量効果。突然変異は UZ 系を利用して眼色変異原として検出 (表 1 より)。生存率は対照区を 1 として補正した値。

培養細胞における Vitamin C の抗変異原作用

国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門 黒田 行 昭

1 はじめに

Vitamin C は緑茶やいちご、パイナップル、みかんなどの果物、キャベツ、ほうれん草、ピーマンなどの緑色野菜に多量に含まれ、壊血病に有効な Vitamin として知られている。その抗酸化作用により毒物に対する解毒剤や防臭剤としても使用されている。このようなことから Vitamin C は化学変異原に対して抗変異原作用をもつ可能性が考えられる。しかし、これまで微生物で *N*-nitroso 化合物や発がん物質に対して抗変異原性が報告され (Guttenplan, 1977¹⁾, 1978²⁾; Rosin と Stich, 1979³⁾), また実験動物で発がん剤により誘発された DNA 傷害を減少させ (Lo と Stich⁴⁾) たり、発がん剤による腫瘍の形成を阻害する (Mirvish ら, 1976⁵⁾; Schlegel, 1975⁶⁾; Slaga と Bracken, 1977⁷⁾) などが報告されている。しかしながら高等動物の培養細胞に対しては、マウスの C 3 H/10 T 1/2 細胞で 3-Methylcholanthrene⁸⁾ によって誘発される transformation が Vitamin C によって抑制されるという報告 (Benedict ら, 1980) があるのみで、をの変異原性について報告されていない。

本研究では、チャイニーズ・ハムスター肺由来の V79 細胞を用いて、典型的な変異原物質の 1 つである Ethyl methanesulfonate (EMS) によって誘発される突然変異が Vitamin C によってどのように影響を受けるかについてしらべた。

2 実験方法

チャイニーズ・ハムスター V79 細胞のクローン系を用いた。この細胞を 10% 牛胎児血清 (GIBCO) を含む Eagle の MEM 培養液 (日水製薬) を用いて大量に増殖させ、多数のアンプルに分注して凍

結し、各サンプルの細胞を融解後、HAT 培養液で培養し、細胞集団中に存在する HGPRT 欠損細胞を除去し、正常培養液中で増殖させ、4 週間以内の細胞を用いた。

細胞生存率に対する影響は、 10^2 個の細胞を 60 mm のプラスチック・シャーレ (Lux, Contur, 2 mm grid, No 5216) にまき、正常培養液中で 20 時間培養後、EMS (Aldrich) および Vitamin C (*L*-Ascorbic acid 和光純薬) で単独または同時に 3 時間処理し、正常培養液中で 7 日間培養し、形成されたコロニー数を算定した。

突然変異誘発作用の検定には、 2×10^5 個の細胞を 100 mm プラスチックシャーレ (Falcon, No 3003) にまき、正常培養液中で 20 時間培養した後、EMS および、Vitamin C で単独または同時処理し、正常培養液中で 6 日間の発現時間の間培養した。細胞を解離して、 2×10^5 個ずつの細胞を 100 mm の新しいシャーレにまき、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の 6-Thioguanine (6 TG) を含む培養液で 7 日間培養し、形成された 6 TG 抵抗性の細胞コロニー数を算定した。細胞再播種の際、別に正常培養液中でコロニー形成率を算定し、 10^5 生存細胞当りの突然変異率を算定した。

3 結果と考察

(1) EMS による細胞致死に対する Vitamin C の影響

細胞を種々の濃度の EMS 単独で 3 時間処理した場合の細胞生存率は図 1 に示したように、EMS の濃度が高くなるにしたがって細胞生存率は低下し、 $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ の EMS では対照の非処理の 9% の細胞生存率を示し、生存率曲線から求めた EMS の LD_{50} の値は $541 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。こ

れに対して Vitamin C 単独では $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで細胞生存率に与える影響はほとんどないが、それ以上の濃度では強い細胞致死作用を示し $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ では生存する細胞はみられなかった。Vitamin C の LD_{50} の値は $132 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

つぎに、種々の濃度の EMS と $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Vitamin C で同時処理した場合の細胞生存率は、図 1 に示したように、EMS 単独処理の場合に比較して細胞生存率が著しく上昇し、Vitamin C の添加によって EMS の細胞致死作用が抑制されることが分った。Vitamin C 共存下での EMS の LD_{50} の値は $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上となった。

(2) EMS による突然変異誘発に対する Vitamin C の影響細胞を種々の濃度の EMS 単独で 3 時間処理した場合に誘発された 6 TG 抵抗性突然変異の出現率は図 2 に示したように、EMS の濃度が高くなるにしたがって増大し、 $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ の EMS での突然変異誘発率は 87.5×10^{-5} に達した。これに対して、Vitamin C 単独では細胞致死作用のみられない $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度では、6 TG 抵抗性突然変異はほとんど誘発されなかった。

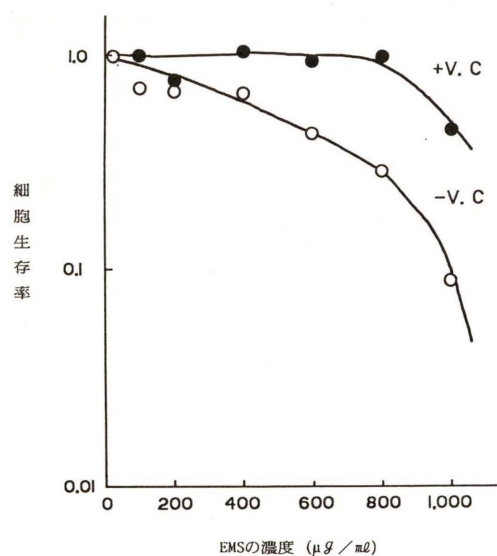


図 1 チャイニーズ・ハムスター V79 細胞における EMS の細胞致死作用に対する Vitamin C の影響

つぎに種々の濃度の EMS と $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Vitamin C で同時処理した場合に誘発される 6 TG 抵抗性突然変異の出現率は、図 2 に示すように、EMS 単独処理に比較して著しく低下し、 $1/3 \sim 1/4$ になった。Vitamin C は 10^{-3} M ($= 176.12 \mu\text{g}/\text{ml}$) 以上の高濃度では単独でもかえって変異原性が示され、染色体異常や不定期 DNA 合成を誘発することが報告されている (Stich ら、1976⁹)。また *Salmonella* を使った Ames のテストでも変異原性のあることが示されている (Stich ら、1976⁹, Guttenplan, 1977¹¹)。本研究においても、チャイニーズ・ハムスター V79 細胞に対して高濃度の Vitamin C は単独処理で強い細胞致死作用が認められ $132 \mu\text{g}/\text{ml}$ の LD_{50} 値を示した。われわれが通常食物から摂取している Vitamin C の量は $20 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重といわれ、これは約 $1 \sim 25 \times 10^{-4} \text{ M}$ に相当する。本研究に使用した $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($= 5.7 \times 10^{-4} \text{ M}$) までの低濃度の Vitamin C ではチャイニーズ・ハムスター V79 細胞で、EMS によって誘発される突然変異率を著しく低下させる作用が示された。

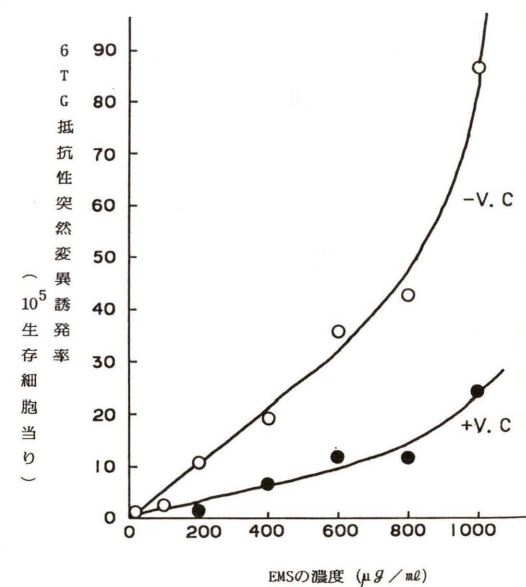


図 2 チャイニーズ・ハムスター V79 細胞における EMS の 6 TG 抵抗性突然変異誘発作用に対する Vitamin C の影響

4 おわりに

本研究ではチャイニーズ・ハムスター V79 細胞を用いて、EMS による細胞致死作用および 6 TG 抵抗性突然変異の誘発作用が Vitamin C の添加によってそれぞれ $1/2$ および $1/3 \sim 1/4$ に抑制されることが分った。ここでは変異原物質として EMS を用いたが、他の変異原物質についても Vitamin C の突然変異抑制効果をしらべ、Vitamin C による突然変異抑制効果の機構についてさらに研究を進めている。

文 献

- Guttenplan, J. B. : Inhibition by L-ascorbate of bacterial mutagenesis induced by two N-nitroso compounds. *Nature*, 286 : 368—370, 1977
- Guttenplan, J. B. : Mechanisms of inhibition by ascorbate of microbial mutagenesis by N-nitroso compounds. *Cancer Res.*, 38 : 2018—2020, 1978
- Rosin, M. P. and H. F. Stich : Assessment of the use of the *Salmonella* mutagenesis assay to determine the influence of antioxidants on carcinogen-induced mutagenesis. *Inter. J. Cancer*, 23 : 722—727, 1979
- Lo, L. W. and H. F. Stich : The use of short-term tests to measure the preventive

action of reducing agents on formation and activation of carcinogenic nitroso compounds. *Mutation Res.*, 57 : 57—67, 1978

- Mirvich, S. S., A. F. Pelfrene, H. Garcia and P. Shubik : Effect of sodium ascorbate on tumor induction in rats treated with morpholine and sodium nitrite, and with nitrosomorpholine. *Cancer Lett.*, 2 : 109—114, 1976
- Schlegel, J. R. : Proposed uses of ascorbic acid in prevention of bladder carcinoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258 : 432—437, 1975
- Slaga, T. J. and W. M. Bracken : The effects of antioxidants on skin tumor inhibition and aryl hydrocarbon hydroxylase. *Cancer Res.*, 37 : 1631—1635, 1977
- Benedict, W. F., W. F. Wheatley and P. A. Jones : Inhibition of chemically induced morphological transformation and reversion of the transformed phenotype by ascorbic acid in C 3 H/10 T 1/2 cells. *Cancer Res.*, 40 : 2796—2801, 1980
- Stich, H. F., J. Karim, J. Koropatnick and L. Lo : Mutagenic action of ascorbic acid. *Nature*, 26 : 722—724, 1976

哺乳動物組織中のDNA損傷

— DNA鎖切断とアルカリ感受性部位 —

秋田大学医学部 蜂谷紀之
田中尚子
滝澤行雄

1 はじめに

変異原・がん原物質を投与した動物組織におけるDNA損傷の形成とその修復の問題は、動物組織細胞の遺伝学的変化の機構だけでなくそれら物質の人体影響評価においても重要な問題である。ここでは前報¹⁾に引き続き、アルカリ溶出法によって検出されるDNA損傷のうち鎖切断とアルカリ感受性部位について比較し、DNA損傷の修復におけるその意義を考察するとともに、DNA損傷性スクリーニング法としてアルカリ溶出法を実施する際の問題点を考えた。

2 方法

方法は前報²⁾までと同様で、マウスあるいはラットに被験物質を腹腔内に投与したのち、適当な時間に肝の粗核分画を調整した。これはポアサイズ $2.0\mu\text{m}$ のニュークリポアフィルター（直径 25mm ）上でproteinase + SDS処理によりlysisさせ、DNA断片をEDTA + 水酸化テトラプロピルアンモニウム溶液で溶出した。溶出液は、DNA鎖切断の検出ではpH12.1に、アルカリ感受性部位の検出ではpH12.6にそれぞれ合わせ、このうちpH12.6での溶出試験は室温 $20\sim 25^\circ\text{C}$ の範囲で行なった。溶出速度は 2.0ml/hr とし、 3.0ml を1分画として分取し、各分画のDNA量はジアミノ安息香酸による蛍光分析法（励起光 410nm 、蛍光 510nm ）によって測定した。

3 結果

(1) ethylnitrosourea (ENU) 投与後の肝DNA損傷の経時変化

ENU ($12.5\sim 200\text{mg/kg}$) をマウスの腹腔内に投与したのちのDNA一本鎖切断の消長における組織間差については前報¹⁾で報告した。ここではそのうち肝についてその損傷の消長をさらに検討した。pH12.1の溶出試験によると、ENU誘発DNA鎖切断は投与後2~4時間にピークに達していた¹⁾。図1はENUを腹腔内に投与したのち2

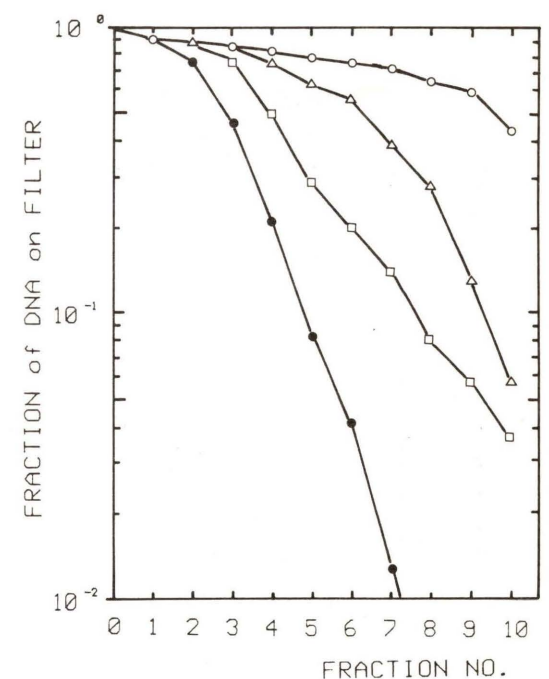


図1 ENU投与後2時間目のマウス肝DNAのpH12.6のアルカリ溶出曲線。

○: 0mg/kg , △: 12.5mg/kg , □: 25.0mg/kg , ●: 50mg/kg 。

時間目の肝 DNA についての pH12.6 のアルカリ溶出パターンであるが、溶出時間に対して残存 DNA 量を片対数でプロットした溶出曲線は下方に曲がったものとなった。これは pH12.6 の条件では、溶出開始時すでに DNA 鎖上に形成されていた切断部位のほか、塩基付加体や脱塩基 (AP) 部位などのアルカリ感受性部位がアルカリ切断によって時間とともに鎖切断に変換され、溶出性が増加していったためである²³⁾。

同様に ENU を投与後 9 日目の肝 DNA についてのアルカリ溶出曲線を図 2 に示す。このうち、pH 12.1 による DNA 鎖切断 (図 2 a) は投与後 24 時間目のそれ¹⁾と同程度で、これは投与 2 時間後の損傷程度¹⁾と比べてもこの間に修復されたのは一部のみで、かなりの部分は依然未修復のまま残されていた。一方、pH12.6 での溶出性 (図 2 b) は投与 2 時間目と比較してほとんど変化しておらず、このことは DNA 鎖上のアルカリ感受性部位の数

がこの期間ではほとんど変化していないことを示していた。

(2) acrylonitrile (ACN) および 2-acetylaminofluorene (2-AAF) による DNA 損傷
ACN を投与したラットの肝における DNA 損傷のアルカリ溶出法による検出では pH 依存性が特に顕著であった。図 3 は ACN を腹腔内に投与後 24 時間目の肝 DNA のアルカリ溶出曲線であるが、少なくとも投与後 2~48 時にわたり、DNA 鎖の溶出性の増加は pH12.1 では検出されず、pH12.6 の溶出液を用いたとき認められた。

図 4 では 2-AAF を投与したマウス肝について投与後の各時間に DNA のアルカリ溶出性を調べた。この結果、pH12.1 では DNA の溶出性の増加は投与後 24 時間まではほとんど検出されず、投与後 48 時間においてもごくわずかであった。これに対し pH12.6 では、投与後 3 時間をこえると明らかな溶出性の増加が認められた。

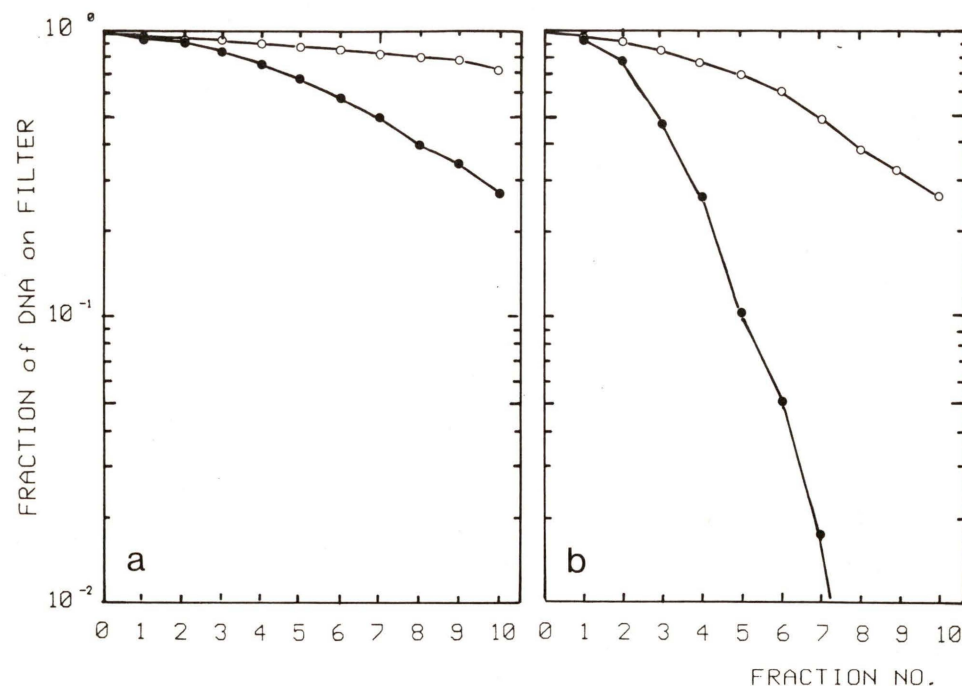


図 2 ENU 投与後 9 日目のマウス肝 DNA のアルカリ溶出曲線。
a : pH12.1 ; b : 12.6, ○ : 0 mg/kg ; ● : 50 mg/kg。

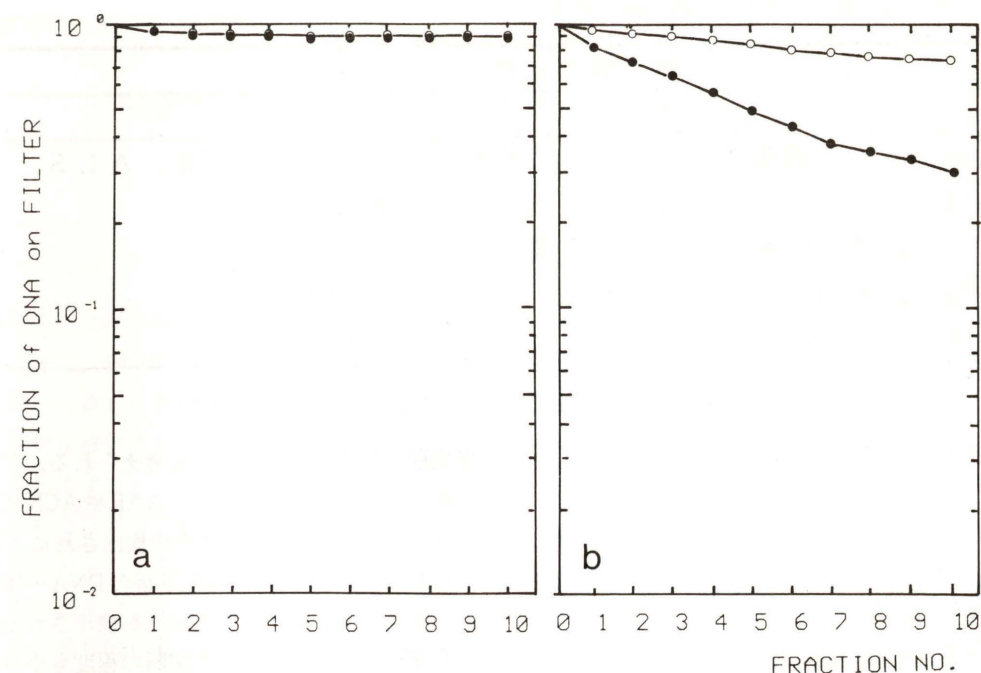


図 3 ACN 投与後 24 時間目のラット肝 DNA のアルカリ溶出曲線。
a : pH12.1 ; b : pH12.6, ○ : 0 mg/kg ; ● : 75 mg/kg。

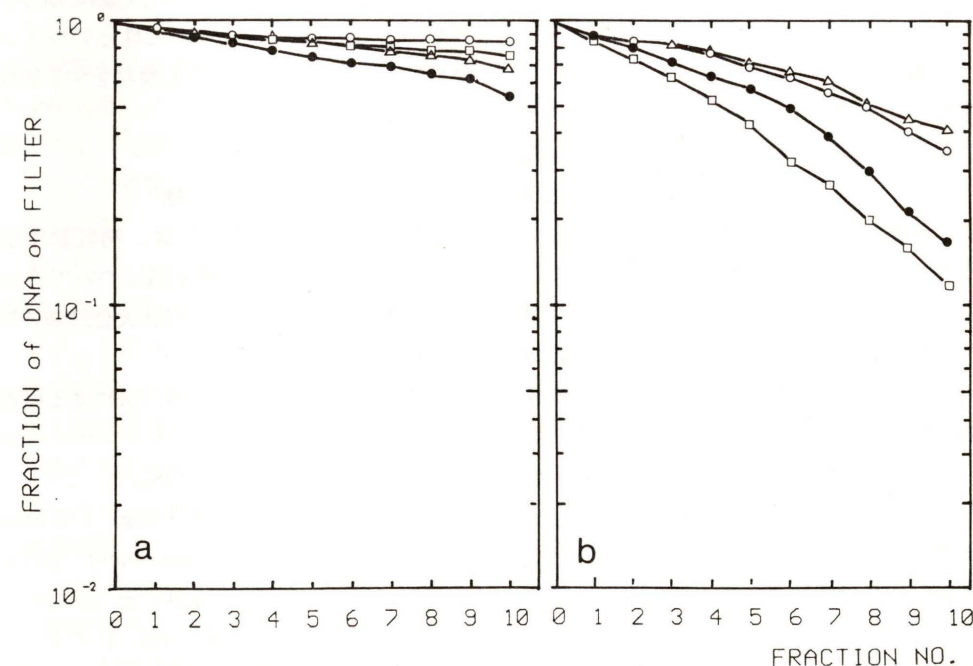


図 4 2-AAF (400 mg/kg) 投与後の各時間におけるマウス肝 DNA のアルカリ溶出曲線。
a : pH12.1 ; ○ : 0 時間 ; △ : 12 時間 ; □ : 24 時間 ; ● : 48 時間
b : pH12.6 ; ○ : 0 時間 ; △ : 3 時間 ; □ : 6 時間 ; ● : 14 時間

表1 アルカリ溶出法における溶出pHの効果

	溶出液のpH	
	12.1	12.6
検出される損傷	SSB, DSB	SSB, DSB, ALS
感 度	高 い	非常に高い
定 量 的 比 較	容 易	やや困難
温 度 依 存 性	無	有
再 現 性	良	やや良

SSB：一本鎖切断、DSB：二本鎖切断、ALS：アルカリ感受性部位

(3) 溶出液のpHとDNA損傷検出性

pH12.1とpH12.6それぞれの溶出液を使用したときの違いは表1にまとめた。一般に、損傷の検出効率もpH12.1のDNA鎖切断よりもpH12.6のアルカリ感受性部位の方が高い。しかし、この試験を実施する際に特に問題になるのは、pH12.6の溶出液を用いたときの温度依存性である。室温程度の範囲も含め一般に温度が高いほどアルカリ感受性部位のアルカリ切断も生じ易いため、定量的比較のためには十分な温度管理が必要であった。

4 考 察

前報にひきつづき動物個体の組織中におけるDNA損傷の検出法としてアルカリ溶出法が有効であることを示した。アルカリ密度勾配法と比較して本法の特色は、溶出液のpHを選択することにより検出されるDNA損傷のタイプを変えることができることにある²³⁾。すなわちpH12.1溶出におけるDNA断片の溶出性の増加はDNA鎖の切断(一本鎖および二本鎖切断)によるが、DNA損傷のうち鎖切断にいたらないアルカリ感受性部位もpH12.6の溶出により検出される。各種の変異原を投与したのち肝DNAに現れる損傷の消長は、検出される損傷のタイプにより異なっていた。

ENU誘発DNA損傷のうち一本鎖切断は投与後直ちに消失する部分と長期にわたって存在するものの二つに分かれたが、アルカリ感受性部位はこの期間大きく変化しなかった。治癒の遅い鎖切断は、残存するアルカリ感受性部位もしくはその修

復過程と関係しているものと考えられる。これら単純アルキル化剤に比べ、2AAFやACNによって誘発されたDNA損傷はやや検出されにくい傾向があった。2AFFでは投与後のDNA一本鎖切断の出現はアルカリ感受性部位が検出される時間より遅く、また検出される切断の程度も小さかった。したがって鎖切断の出現はアルカリ感受性部位などの損傷の修復過程などとも関連している可能性を示唆していた。またACN投与の場合にはアルカリ感受性部位のみ認められ鎖切断は検出されなかったが、ACNの発がん性とアルカリ感受性部位の修復効率との関係も検討をする問題の一つである。

文 献

- 1) 蜂谷 紀之、滝澤 行雄：哺乳動物組織中のDNA損傷Ⅱ 各種組織についての比較、日本環境変異原学会第13回大会講演要旨集、80、1984。
- 2) 蜂谷 紀之：アルカリ溶出法による動物組織中DNA損傷の測定、トキシコロジーフォーラム、8、349—357、1985。
- 2) Kohn, K. W., R.A.G.Ewig, L.C.Erickson, L.A.Zwelling, : Measurement of strand breaks and cross — links by alkaline elution. In : DNA Repair, vol. 1 (Friedberg, E.C. and P.C.Hanawalt, eds.), Marcel Dekker, New York, 379—401, 1981。

哺乳動物試験分科会 (MMS 分科会) ニュース

— 昭和60年度活動状況 —

国立衛生試験所・変異原性部 祖父尼 俊 雄

当分科会は昭和57年に発足し、早いもので5年目を迎えた。59年にはJENSの分科会として承認された。会員も当初の4倍の80名程にもなり、活発な活動を続けている。今回は昭和60年度の活動状況を報告する。

当分科会は年2回定例研究会(秋のJENS大会の開催時ともう1回は5～6月)を開いており、この春の研究会がその年度の活動の始まりとなっている。昭和60年度の春の研究会の概要は下記に示す通りで、特徴として小核研究グループやスポットテスト研究グループからの報告、特に小核試験の共同研究の報告と討論が主題になった。

第7回 研 究 会

日 時：昭和60年6月7日(金) 13:00～17:00
場 所：株式会社オリンパス 東京本店

1 報告および協議事項

- (1) 名称、幹事等について
- (2) 会計報告
- (3) その他

2 研究グループ報告

- (1) スポットテスト研究グループ
経過報告
第2回共同研究について
今後の方針について
- (2) ワークショップグループ
経過報告
今後の方針について
- (3) 小核研究グループ
第2回共同研究「小核試験における性差について」の結果報告および総合討論
今後の方針について

報告、協議事項としてはこれまで単に会の基本方針としていたものを会則として手直しをし、また会員の増加に伴い幹事を10名とした。渋谷、林、降旗の3会員がIPCSの会議に出席したので、その模様の報告をして頂いた。さらに、共同研究の発表の問題点や第8回研究会の開催予定について討議した。

研究グループの報告としては、まずスポットテスト研究グループの活動について報告があり、第2回の共同研究の基本方針が討議され、ENUを用いて雌の系統差を検討することになった。続いてワークショップグループより今後の方針について報告があり、できるだけ早い時期にワークショップを開催することで意見が一致した。

小核研究グループからは第2回共同研究の結果について報告があり、各研究機関毎の観察結果およびその統計解析について詳細な検討が行なわれ、秋のJEMS大会での発表についての方針も打ち出された。尚、研究会終了後、オリンパスよりイメージアナライザによる小核判別のデモンストラーションが行われた。

第8回 研 究 会

日 時：昭和60年度10月1日(火)～2日(水)
場 所：秋田厚生年金休暇センター

1 研究グループ報告

- (1) 小核研究グループ
- (2) スポットテスト研究グループ

2 研究発表

- (1) Trp—P—1、—P—2のマウススポットテストにおける変異原性
土 川 清(遺伝研)
- (2) MNUとENUの複合投与によるマウスス

ポットテスト

渋谷 徹 (食薬センター)

(3) マウススポットテストにおける雌マウス系統間の比較

小野 隆 明

(田辺製薬・安全研)

(4) マウスリンパ球の自然誘発および紫外線誘発 SCE に認められる系統間差について

西 義 介

(日本たばこ・生物実験センター)

(5) ベンゼンの小核誘発における性差の発現機構

祖父尼 俊 雄 (国立衛試)

(6) 小核誘発と DNA 鎖切断

島 田 弘 康 (第一製薬・中研)

第8回研究会はJEM第14回会の開催時に合わせて秋田厚生年金休暇センターで行った。10月1日(火)JEMS大会閉会后直ちにバスで休暇センターへ向かい、夕食後19:00より研究会を始めた。秋の研究会はJEMS大会での発表演題よりトピックスを選び、さらに詳しく説明してもらい、自由に討論を行うのが特徴になっている。今回は研究グループからの報告もあり、小核研究グループからは共同研究の総括および論文投稿について説明があった。目下、共同研究の成果はMutation Researchへ投稿中である。さらに、引き続き共同研究の基本方針が検討され、26機関もの参加を受けて「小核試験における系統差について」共同研究を行うことが決定され、目下それらの結果が続々集められている。尚、第4回ICEMに出席した菊池、大島、降旗の3会員よりin vivo試験の動向について紹介して頂いた。

第14回JEMS大会にはスポットテストに関する発表が4題もあり、このうち3題を研究会に取り上げた。このようにスポットテストに関する発表が増えたのも、スポットテスト研究グループがこれまで5回にわたる研究会を重ね、スポット判定の研修、プロトコルの検討、共同研究の実施など、絶えず活動を続けてきたことによるものであ

る。現在、スポットテストの共同研究に参加している機関は10ヶ所であるが、今後の活動を通じてさらに増えていくことが期待される。

研究発表は夜の10時までとしたが、その後もアルコールを補充しながら、今後の活動について、夜のふけるのも忘れて、熱心に意見交換が行われた。翌日9:30より11:30まで引き続き研究発表が行われ、SCEの系統差およびベンゼンに関して2題、計3題の発表が行われ、前夜の疲れもみせず、活発に討論が行われた。

小核およびスポットテスト研究グループの活動についてはすでに述べた通りであるが、ワークショップについては昭和61年2月1日にMMS分科会の拡大幹事会を開き、基本的な方針を決定した。その結果、「染色体異常の分類の判定」に関するワークショップを61年8月28、29日に開くこととし、目下、その準備が着々と進められている。募集要項などについてはJEMSニュースを通して会員の皆様にお知らせ致します。

尚、研究会開催の案内は分科会会員には直接連絡しているが、今後はJEMSニュースにも載せて頂き、広く皆様にお知らせすることに致します。

哺乳動物試験分科会 (MMS 分科会)

代表幹事 土 川 清

幹事 菊 地 康 基、祖父尼 俊 雄

島 田 弘 康、渋谷 徹

須 藤 鎮 世、一ツ町 晋 也

大 島 稔 彦、林 真

西 義 介

事務局 国立衛生試験所・変異原性部

(03-700-1141・Ext 435)

日本学術会議だより — No. 1 —

昭和61年 5月 日本学術会議広報委員会

—「日本学術会議だより」の創刊に当たって—

日本学術会議は、第13期の活動の重点の1つとして、学・協会との連携の強化に努めるため、従来以上に広報活動の充実をはかることとしております。

このたび、その一環として、当会議の活動状況を定期的にお知らせするため、今年5月から四半期ごとに「日本学術会議だより」を各学・協会の機関誌等に御掲載願うことにいたしました。

今後引き続き御一読いただければ幸いです。

100回を迎えた日本学術会議総会

日本学術会議は、去る4月23、24日の両日、記念すべき第100回総会(第13期の3回目の総会)を開催いたしました。

今回の「日本学術会議だより」では、この第100回総会の議事の一環として行われた「脳死をめぐる諸問題」に関する会員間の討論を中心として、同総会の議事内容をお知らせいたします。

当会議は、今後は、今回のような総会の報告のほかに、「第13期活動計画」に盛り込まれた課題について具体的に検討を進めていく各常置・特別委員会の活動状況をも逐次お知らせしていきたいと考えております。

総会報告

日本学術会議第100回総会は4月23、24日の両日に開かれ、「日本学術会議傍聴規則」及び「日本学術会議の運営の細則に関する内規」を決定し、また、「脳死をめぐる諸問題」について意見交換を行った。

第1日、午前。会長より第4部会員田中春夫氏が逝去され、新たに早川幸男氏(名古屋大学)が会員として発令されたとの報告があり、田丸第4部長が故田中会員への追悼の言葉を述べ、全員起立して黙禱をささげた。

会長より前回総会以後の経過報告を受けた後、諸委員会、部、研究連絡委員会の報告があった。広報委員会中川委員長より、「日本学術会議だより」を多数の学・協会(387団体、約90万部)の機関紙などに掲載される運びになったことに対して感謝の意が述べられた。高齢化社会特別委員会青井委員長より「高齢社会総合研究センター」(仮称)の設立についての中間報告があった。平和問題研連田田委員長より、SDI研究への参加をめぐる最近の動きに対して憂慮の念が述べられた。

諸報告の後、会長より「日本学術会議傍聴規則案」が提案され、従来の傍聴についての内規を規則にして公にすることが適切であると説明された。次いで「日本学術会議の運営の細則に関する内規案」が提案された。この大部分は、いままでの諸内規、慣行を整理したものであるが、いくつかの点で新しいものを含んでいる。主な点は①学術会議が勧告などを行う際の取り扱い及び講演会、シンポジウムなどを開催する手続を明確化したこと、②研連委員の在任期間を原則として通算3任期(1任期は3年)までとしたことなどである。

第1日、午後。各部の部会が開かれ、午前中に提案された事項について審議された。これらの提案は第1常置委員会が努力を重ねて作成したものであり、また連合部会及び部会において、各会員の意見を聴き調整したものであるが、この日の部会でさらに慎重な審議が行われた。

第2日、午前。前日提案された案件の審議、決定が行われた。傍聴規則は異議なく決定された(注1)。運営の細則に関する内規も、また無修正で決定された(注2)。新しい内規によれば、日本学術会議の名において行われる公開講演会は、運営審議会において決定し、広報委員会が実施する。この点に関して、その審議中、従来長年にわたって行われてきた学問・思想の自由に関する公開講演会は今後とも尊重されるべきであるとの発言があり、その趣旨が了承された。

第2日、午後。近藤会長司会の下に「脳死をめぐる諸問題」に関する会員間の意見交換が行われた。これは会員のための一種の勉強会で、第13期から始められた新しいスタイルの総会の持ち方の2回目当たる。問題の一般の関心の深さを反映して傍聴席は満席となった。勉強会は4会員による講演と、各講演に関連した4名の指定発言者によるコメントよりなり、予定より約30分超過し、3時間半にわたって、異なった分野からの意見開陳が行われ、人文・自然両系よりなる学術会議にふさわしい内容であった(詳細については別掲の「脳死をめぐる諸問題」について—総会の討論より—を参照)。

第100回総会は「脳死」に関する様々な印象を会員に残しつつ、4時半無事終了した。

なお、6時から、第100回総会を記念した会員懇親会が、ロビーでなごやかに開催された。

注1. 今回制定された「日本学術会議傍聴規則」の詳細については、「日本学術会議月報」5月号を参照

注2. 今回制定された「日本学術会議の運営の細則に関する内規」は、総会、部、常置(特別)委員会及び研究連絡委員会のそれぞれの運営に関する諸事項等について規定するとともに、外部から学術会議へ提出された要望等の処理に関する手続、外部に対する学術会議の意思の表出(勧告・声明等)に関する手続及び講演会、シンポジウム等の開催に関する手続等について規定している。

脳死をめぐる諸問題について

—総会の討論より—

日本学術会議第100回総会第2日(4月24日)の午後、総会議事の一環として、「脳死をめぐる諸問題」に関する会員間の討論が行われた。

行われた4件の講演と各講演に関連した指定発言のそれぞれの概要は、以下のとおりであった。

1. 基調報告—医学的見地からみた死の概念

瞳孔が散大し、呼吸と心臓の拍動が永久的に停止したと医師が判断したとき死亡したという。これに対して、最近、脳機能が永久的にまた不可逆的に消失したとき脳死といい、たとえ心臓が拍動していても、これをもって個体死としての治療行為を止めることがある。欧米の多くの国では様々な条件がつきなが

「日本高齢社会総合研究センター(仮称)の設立についての提言」を公表

昭和61年 8 月 日本学術会議広報委員会

本会議高齢化社会特別委員会は、このたび、「日本高齢社会総合研究センター(仮称)の設立についての提言」をとりまとめ、本会議運営審議会の承認を得て、公表いたしました。

今回の「日本学術会議だより」では、この「提言」の概要に加えて、本会議と学・協会とを結び付ける上で重要な役割を果たしている研究連絡委員会の概要等を紹介し、また、本年9月に開催を予定している本会議主催の公開講演会についてお知らせいたします。

「日本高齢社会総合研究センター(仮称)の設立についての提言」(概要)

昭和61年 5 月 26 日

日本学術会議高齢化社会特別委員会

今日、高齢社会への移行の問題が大きく取り上げられているにもかかわらず、我が国の研究体制は国際的にみても遅れており、とくに人文・社会科学の分野においてそれがいちじるしい。そこで、この遅れを取り戻して時代の要請にも応えるために、我々は「日本高齢社会総合研究センター」(仮称)の設立を提言したい。

1. 総合研究センターの目的

すでに日本学術会議は、昭和55年、「国立老化・老年病センター」設置についての勧告を内閣総理大臣あてに行っている。この医学・生物学を中心とする研究・診療型センターと緊密な連携を保ちつつ、本「日本高齢社会総合研究センター」は、人文・社会科学を中心として、(1)高齢社会の構造問題、(2)高齢層をめぐる総合政策、(3)高齢者の生活課題を総合的に研究するものである。また、本センターにおける研究は3つの原則、すなわち(1)高齢者主体の原則、(2)地域特性の原則、(3)国際交流の原則を重視する。

2. 当面の研究課題と活動

(1)地域福祉・在宅福祉との関連におけるソーシャルケアのあり方、(2)高齢社会における全年齢層の生涯学習体制の確立、(3)70歳まで働ける雇用体制づくり、(4)健康で自立な高齢者の社会的役割の重視。またこれら以外に、(5)高齢社会に関する研究者・実務専門家・政策担当者などキーパーソンの養成、(6)高齢者、わけても75歳以上の後期高齢者の生活実態と生活意識の全国的及び国際的調査、ならびにモデル調査地域における高齢社会化過程の追跡調査の実施も必要不可欠なものである。

3. 総合研究センターの性格

(1)法律にもとづく独立性の高い法人とする。
(2)国の出資による基金を基礎として設立されるが、そのほかにも一般寄付、研究受託費などを加えて弾力的に運営する。
(3)人文・社会科学を中心とする全国的なネットワーク型の中枢的研究センターであって、官庁や大学の付置型ではない。

4. 研究の運用

(1)研究・調査は総合研究センターの自主研究のほか、受託研

究・委託研究を行い、できうれば研究助成も行いたい。

(2)いずれの研究・調査も、必要な研究者で随時編成するプロジェクト・チーム方式によって組織する。

(3)大学、省庁、自治体、企業体、その他の研究機関から、外国人研究者も含めて、短期・長期の流動研究員を受け入れ、研究者と実務家との交流をはかると共に、研究者・政策担当者を養成する。

(4)また必須の活動として、情報セクター「調査室」において高齢者調査と高齢社会化過程の追跡調査を行う。

5. 研究の機構

次の諸セクターから構成される。

(1)研究セクター、(2)情報セクター(調査室・資料室)、(3)研修セクター、(4)公開活動セクター、(5)国際交流セクター

このような構想の下に、本「日本高齢社会総合研究センター」は、高齢社会に関する研究を、人生80段階の文明史的意味の究明を含めて行っていく。

「中性子回折・散乱研究の推進に関する意見—物理学、結晶学両研連の意見」を発表

本会議物理学、結晶学両研究連絡委員会は、このたび、「中性子回折・散乱研究の推進に関する意見」をとりまとめ、本会議運営審議会の承認を得て、両委員会委員長の連名で、関係機関へ送付した。

<「意見」の概要>

現在、日本原子力研究所において、改JRR-3研究用原子炉の建設が進められているが、この原子炉の利用は、物理学、結晶学はもとより、関連諸分野における中性子回折研究に重要な寄与を果たすものと思われる。

一方、この原子炉には、原研の外に、東京大学物性研究所、東北大学理学部等が多数の各種測定装置を設置する計画がなされている。

物理学および結晶学両研究連絡委員会は、これらの研究機関等によって改JRR-3を利用する中性子ビーム実験装置が設置されることが、我が国の基礎科学の進展に極めて大きな意義をもつことにかんがみ、この計画が遅滞なく達成されるよう、関係各方面の御配慮をお願いする次第である。

らもこれが認められているが、わが国では法的に認められていない。このような状況下では、医療の現場に好ましくあらざる問題が生じてきている。一方国際的にも医学・医療の立ち遅れと共にその進歩を停滞させているのではないか、対応が消極的でないかと指摘されている。死の概念についての不一致は国々の宗教、哲学、倫理等の相違に基づくものと考えられ、その善悪、優劣を軽々に論ずる訳には行かない。ただこの概念を多角的に分析する意味から、本総会では多方面の方々の意見を拝聴したい。ただ上述のようにわが国の対応が消極的であるとする、わが国の医学教育の倫理面における教育理念が欧米諸国とは異なっていることが推定されるのであって、このことによって、わが国の医学・医療の進歩に将来どのような影響が生じてくるか、これは強い関心を持たざるを得ない問題だと考えられる。

人間の機能、これは身体的機能と精神的機能に分けられるが、脳はこの両機能を合せて持っている。脳は身体の中の特殊な位置づけにおかれていると考えられる。心臓や肺などの器官で行う身体的機能は、それらが生きて機能するためには、脳との結びつきとその協調に依存せねばならないとされている。身体を構成する細胞はひたすらに生きる。その上に、脳のたくみに、わきまえかつよく生きる精神的機能が加わって、私たちは生きている。人が死に至る場合に、その死について上述による医学的根拠をもって死を定義するならば、脳死をもってその基準とすることにそれなりの理由があると考えられる。(本間三郎・第7部会員)

指定発言：脳死の問題がわが国において最近医師界はもとより関係各方面において活発に議論されているが、この背景についてまず医学・生物学的な解説、具体的には次の4つの問題にしばって私見を申し上げたい。①脳死と個体死の関係、②脳死判定基準、③脳死と判定されたあとの医療行為、④脳死と臓器移植。以上のことと関連して脳死のメカニズムの研究とその予防、臓器移植に代るべき新医療技術の開発の重要性などについて強調したい。脳死の問題①②に関しては医師界で十分に審議し合意に到達することが必要であり、それにつづいて③④については更に国民的合意と医師、家族間の理解が必要である。(寺山 宏・第4部会員)

2. 脳死に関する医療上の問題点

医学は医療に直結する。医学に科学の論理性が求められていることは当然であるが、医療の対象は人間の生命であるから、倫理的な重みが極めて強い。一般的にいうと、倫理観はすべての人に共通ではなく、個々人であり、また同じ人でも時を変えれば変動する。医療の行為の意思決定の方法は、医師個人の裁量権にゆだねられているが、新しい課題を抱えて医師が単独では行わない仕組みがつけられている。脳死に関する国民的合意が得られることを医療の現場より望みたいが、そのためには、東洋的な宗教・哲学上の問題の整理と、複数の医師と家族の合意があれば脳死をもって死と判断する法的な擁護が具体化されることを切望したい。(水越 治・第7部会員)

指定発言：最近臨床医学の進歩はまことに顕著なものがあがり、人類の健康、福祉の増進に大きく貢献していることは周知のことであるが、現実の問題としてわが国民総医療費の急上昇も決して看過できないものがある。脳死判定後の医療の行為についての医療経済面を取り上げて、脳死を社会的に考える資料として提供する。

また、脳死後、心臓停止に至るまでの期間をある手段により人為的に延長させる方法が発見された。こうなると、生命力をもった個体として蘇えることのない脳死状態を半永久的に、医療の対象とする危険性が生じてきたことになる。ここにもまた、脳死に関する根本的な議論の必要性がある。(曲直部壽夫・第7部会員)

3. 法律上の視点からみた問題の整理

「脳死の判定指針および判定基準」(厚生省脳死研究班・60年12月)には素朴な疑問がある。①角膜反射に関し閉眼不能の

者については同検査の除外例とし、検査対象から外すべきでないか。②前庭反射に関し投薬の影響によって反射がみられない者については、これをすべて同検査の除外例とするのであれば、反射がないのは薬物の影響によるものではないとする客観的資料・基準を示す必要があるのではないか。③脳幹反射がみられなくとも脳幹機能がすべて消失しているとは限らず、それを確認するために誘発反応をみるという提案が出されているのに、これを採用しないのは何故か。(中 義勝・第2部会員)

指定発言：①脳死判定基準の要素に一定の時間的経過が加えられていることは、判定基準の不確かさを示すものとして、社会的合意を得ることを困難にしている。この現状で、脳死説による臓器移植・レスピレーター取りはずしは、法律上正当化しえない。②法律上の死の概念は医師の合意に従うのではなく、社会的合意によるべきである。しかし、現在の判定基準では国民の常識となりえない。③脳死の客観的基準が確立して、国民の常識として受け入れられるようになるまで待つか、臓器移植・レスピレーター取りはずしについての医療現場の現実的処理に秩序をもたらすための社会的合意に基づく法律的条件の設定に努力するか、今後いずれの方向を選ぶかが、今の私たちに課された問題である。(澤登俊雄・第2部会員)

4. 倫理・宗教等からみた問題の整理

脳死の問題については、日本の宗教界や宗教学界にどのような意見があるか、宗教学会で取り上げたことがないので不明である。この問題については早急に取組みたいと思うが、ここでは私見を述べる。日本人の宗教心では、肉体をホトケとして拝むことや、遺骨をそのまま神仏と見る見方がある。また、先祖供養を重んじて、これを怠るとたたりがあるとの考えも強い。このように死体を宗教的に重視するために、これが臓器移植の障害になっていると考えられる。むしろ、人道主義や博愛慈悲の精神の方向から模索することによって、臓器移植と日本人の宗教心との接点を見出しうると考える。(平川 彰・第1部会員)

指定発言：旧・新約聖書においては、人間も宇宙万象も神によって創造されたとされる。人間が死ねば、もとのちに帰る。生命のいきの去ったからだはちりであり、そこには特に霊的・精神的な価値はない。宇宙の万象は神の被造物であって、占星術におけるような霊的存在ではない。このような人間観、世界観は一種の非魔術化のはたらきをなし、その結果人間の体も星々も科学的な観察・操作の対象となる。

この傾向はギリシャにはじまる科学的思考、特に“もの”と“心”の二元論によって強められた。近代科学がキリスト教の影響のもとに生れたとされる所以である。しかし、科学が教会の権力から独立し、自己完結的な歩みを始めるとき、その行きつく先はジャック・モノーの“客観的知識の倫理”に見られるようなニヒリズムではなからうか。

他面、欧米における脳死や臓器移植を考えると、他人のために奉仕するというキリスト教倫理の影響があることを忘れてはならない。(中川秀恭・第1部会員)

多数の学協会の御協力により、「日本学術会議だより」を掲載していただくことができ、ありがとうございます。
なお、御意見・お問い合わせ等がありましたら下記までお寄せください。

〒106 港区六本木7-22-34
日本学術会議広報委員会
(日本学術会議事務局庶務課)
電話 03(403)6291

研究連絡委員会（略称「研連」）とは？

日本学術会議法により、科学に関する研究の連絡を図り、その能率を向上させることが、本会議の職務の一つとして定められている。そして、そのために必要な事項を調査、審議する目的で、180の研究連絡委員会（以下、「研連」という。）が設置されている。

去る4月の第100回総会では「日本学術会議の運営の細則に関する内規」（以下「内規」という。）が制定されたが、この中で研連については、とくに一章を設け総括的な規定をした。研連については、多くの学・協会の方々にとって関心が深いと考えられるので、上述の規定を中心に関連する規定の大略を以下に紹介する。

1. 研連の職務など

日本学術会議法第15条により、「……科学に関する『研究の領域』及び『重要な課題』ごとに……」研連を設置することが規定されているため、今回の内規においては、研連を「領域別研連」と「課題別研連」の2つに分類し、それぞれの職務を区分している。

(1) 「領域別研連」の職務は、次のとおりである。

関係する学術研究領域についての、①学術の現状及び長期的動向の把握 ②将来計画の立案及び研究条件の整備の検討 ③国内における研究機関又は学術研究団体（学・協会）との連絡調整 ④国際学術団体の国内委員会又はこれに準ずるものとしての職務 ⑤その他

(2) 「課題別研連」の職務は、次のとおりである。

①重要課題についての将来計画の立案及び研究条件の整備の検討 ②複合又は学際分野の研究の促進のための研究の連絡の調整 ③国際的協力事業等に関する国内委員会又はこれに準ずるものとしての業務 ④その他

☆日本学術会議主催公開講演会—「21世紀の学術」—の開催のお知らせ☆

本会議は、このたび学術の成果を国民に還元するという日本学術会議法の趣旨に沿うための活動の一環として、本会議主催の公開講演会を開催することにした。

今回の公開講演会は、本会議の第13期活動計画の中でたてられている3つの重点課題に沿いつつ、21世紀を目指した学術の今後の展望を考えるという構想に基づき、次のように企画されている。

多数の方々の御来場をお願いしたい。

日 時：昭和61年9月27日（土）

13時30分～17時

会 場：日本学術会議講堂

（東京都港区六本木7-22-34）

（地下鉄千代田線、乃木坂駅下車1分）

演題と講演者

1. これからの科学の望ましい在り方

近藤 次郎（日本学術会議会長）

講演要旨：20世紀の科学の発展を回顧し、この趨勢で、これからの科学・技術がどのようなか予測する。1984年のオウエンスのようなSFを描く。そして人間の幸福とは何かをもう一度考え、環境・資源などから見た科学・技術の在り方を考える。

2. 創造的人間とその条件

本明 寛（日本学術会議会員・早稲田大学教授）

講演要旨：学術会議は、「創造的な基礎的研究の推進」に積極的に取り組むことを宣言している。そのため

2. 研連の構成と研連委員の任期

今回の内規では、研連は、関係する日本学術会議会員（以下「会員」という。）のほか、原則としてその研連と関係ある学・協会（正しくは、登録学術研究団体）や他の研連等の推薦により委嘱された者によって構成されることとしている。ちなみに、現在の委員定員総数は2,370人である。

また、研連委員の任期については、日本学術会議法により3年の定めがあるが、任期の通算制限については会員と異なり、法には規定がない。そこで今回の内規では、研連の活性化をはかるという観点から会員と同様の運用を行うことになり、「通算3任期まで」という規定をしている。ただし、会員在任期間や国際学術団体の役員等特別な事由がある場合の期間は除かれ、第12期以前の在任期間は算入しないこととしている。

3. 研連の審議成果の発表

研連での審議の結果、得られた成果については、委員会報告書としてとりまとめられて配布されたり、また、研連主催（関係学・協会との共催が多い）のシンポジウム・講演会等で報告されたりするが、それらの中で重要な事項については、春秋2回の総会の決定を経て、勧告、要望あるいは声明等として、日本学術会議名で外部へ出されることもある。

さらに、今回の内規により、前ページの物理学、結晶学両研連の「意見」のように、緊急を要する時には、おおよそ毎月開催されている運営審議会の承認を経て、研連名で外部へ発表することができるようになった。

なお、今回の内規では、会員の推薦には直接に関係のない研連本来の職務や構成等について定めたものである。第14期の会員の推薦に関係するいわゆる「関連研連」については、見直しを行って、来る10月の総会で必要な措置をとることとしている。

には個々の人間の創造活動を重視し、創造性の発揮のための条件を明確にする必要がある。そこで人間的立場からこの課題にアプローチしたい。

3. 学術研究における国際性

西川 哲治（日本学術会議会員・高エネルギー物理学研究所長）

講演要旨：加速器などにおける国際協力に関して講演者自身の体験に基づき、その在り方、問題点、今後の展望などについて考える。

◆申込方法：往復はがき（住所、氏名、郵便番号を明記）

◆定 員：300人（先着順）

◆申込締切日：昭和61年9月20日（土）

◆申 込 先：〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議事務局庶務課講演会係

多数の学協会の御協力により、「日本学術会議だより」を掲載していただくことができ、ありがとうございます。なお、御意見・お問い合わせ等がありましたら下記までお寄せください。

〒106 港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会

（日本学術会議事務局庶務課）

電話 03(403)6291

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3名の幹事をもって構成する。
会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

附 記

1. 本会則は昭和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年～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
佐 藤 茂 秋	国立がんセンター研究所
定 家 義 人	国立遺伝学研究所
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	京都大学放射線生物研究センター
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)

電話

内線

(英)

最終学校と卒業年次

研 究 歴 (現在行な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。)

- | | | | |
|-----------|--------------|------------|-----------|
| 1 変 異 原 | 2 検 出 系 | 3 毒 性 | 4 発 生 異 常 |
| 5 汚 染 | 6 疫 学 | 7 遺 伝 | 8 が ん |
| 9 微 生 物 | 10 高 等 動 物 | 11 高 等 植 物 | 12 食 品 |
| 13 気体・粉じん | 14 医 薬 品 | 15 農 薬 | 16 代 謝 |
| 17 分子機構 | 18 そ の 他 () | | |

ここに記入して下さい

推 薦 者 (日本環境変異原学会評議員)

勤務先および職名

氏 名 (署名)

印

入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

日本環境変異学会奨励賞受賞者

第1回 昭和54年度

長 尾 美奈子 「食品の変異原因子に関する研究」

第2回 昭和55年度

石 館 基 「環境変異原および癌原物質の染色体異常によるスクリーニング」

常 盤 寛 「大気中の変異原性汚染物質の実体と調査の研究」

第3回 昭和56年度

賀 田 恒 夫 「環境変異原検出に関する Rec — assay の開発とその応用」

第4回 昭和57年度

松 島 泰次郎 「変異原性検出による化学物質の発がん性評価についての研究」

早 津 彦 哉 「環境中の変異原物質の作用機作に関する化学的研究」

第5回 昭和58年度

葛 西 宏 「加熱食品中の強力な変異原イミダゾキノリンおよびイミダゾキノキサリンの発見」

第6回 昭和59年度

大 西 克 成 「環境中のニトロピレン類の検出及び代謝に関する研究」

第7回 昭和60年度

若 林 敬 二 「食品中の新しい変異原前駆物質の研究」

— 編集後記 —

ケミカルアブストラクトに登録されている化学物質は1986年3月23日現在、7,828,614種で毎週1万種もの化学物質が増加しているとのことであります。いきおい、われわれ人間はその環境において、計り知れない数の疑わしい、あるいは未知の変異原・癌原の危険にさらされていると思わなければなりません。人類遺伝質の保全をめざして発足した日本環境変異原学会（EMSJapan）も、これらの要請にこたえ、日進月歩の進展の進展する学問を支えてきております。

本誌第8巻第1号は、昭和60年9月30日、10月1日の2日間にわたって秋田で開催された日本環境変異原学会第14回大会の特集号として、特別講演「化学発がんの分子機構」、シンポジウム「環境化学物質の変異原性とそのとらえ方」、学会受賞講演「食品中の新しい変異原前駆物質の研究」のほか、一般口演および示説から7編を収録いたしました。選定に当たった第14回大会運営委員の先生（黒田行昭、石館 基、佐藤茂秋）には、紙面の都合がつけば全編を掲載したいほどの興味深い発表でありましたが、誠に残念ですが割愛させていただきました。ご執筆いただいた諸先生には厚くお礼申し上げます。

（滝 澤 行 雄）

環境変異原研究 第8巻 第1号 1986年

昭和61年9月1日 発行

発行者 日本環境変異原学会

編集責任者 滝 澤 行 雄

秋田大学医学部公衆衛生学教室

〒010秋田市本道一丁目1-1

TEL (0188) 33-1166 (内線) 3256

印刷所 秋田孔版印刷社

秋田市山王七丁目5-29

TEL (0188) 62-8766

