

# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

*Sakae  
Pimoto*

Vol.9 No.1 1987

# 環境変異原研究

第9巻 第1号 1987年

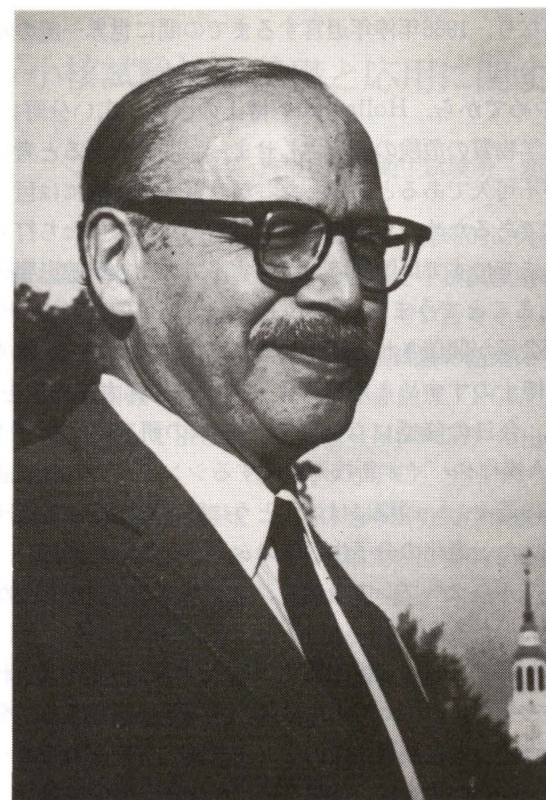
## 目次

Alexander Hollaender 逝く	近藤 宗平…………… 1
昭和61年度学会奨励賞受賞者論文	
In vivo 小核試験法の基礎と応用に関する研究	林 真…………… 3
ヒト末梢リンパ球における姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発に関する研究	森本 兼義……………15
日本環境変異原学会第15回大会特別講演	
Short-Term Mutagenicity Testing —Expectations and Frustrations	Claes Ramel……………37
日本環境変異原学会第15回大会シンポジウム	
「変異原の in vivo 短期検索法—有用性と問題点—」	
司会	近藤 宗平 松島泰次郎
はじめに……………	53
ショウジョウバエのスポットテスト	梁 治子……………55
マウススポットテスト	一ッ町晋也……………67
マウス小核試験—その特徴と評価—	林 真……………73
<sup>32</sup> P—ポストラベル法	山下 克美……………87
不定期 DNA 合成 (UDS) 法	降旗 千恵……………97
総合討論の印象記	近藤 宗平…………… 109
日本学術会議だより……………	111
付 記	
日本環境変異原学会会則……………	119
日本環境変異原学会入会申込書……………	120
日本環境変異原学会昭和61—62年評議員名簿……………	122
日本環境変異原学会奨励賞受賞者一覧……………	123

編集後記



## Alexander Hollaender 逝く



Alexander Hollaender

(1898-1986)

環境変異原学会 (Environmental Mutagen Society) の設立の指導者であり、国際環境変異原学会連合 (International Association of Environmental Mutagen Societies) を組織し、自らその初代会長を務め、東京で開催された第3回国際環境変異原会議の名誉会長でもあった Alexander Hollaender 博士は、1986年12月6日ワシントン、D.C. でなくなられた。あと13日で、満88才の誕生日を迎えられるところであった。

博士はドイツ生まれで、第一次大戦後、23才のとき渡米したが、移民のハンディキャップのため大学に入学するのがおくれ、ウィスコンシン大学の物理化学の博士課程を卒業したのは、33才になってからである。しかし、学生のときから研究論文を発表しており、卒業後間もなく、1935年には、紫外線障害に対する回復現象を発見している。Hollaender 博士の研究で有名なのは、1941年の Cold Spring Harbor Symposium での発表で、突然変異に対する紫外線の作用スペクトルから、遺伝物質は核酸である実験的証拠を初めて示した。Hollaender 博士は40数年も前に、DNA修復や変異原による人体影響という現在の研究課題の大部分を予測していた。1957年に博士は米国学士院会員に選出された。



Hollaender 博士の名を世界的に有名にしたのは、オークリッジの Biology Division のディレクターになってからである。オークリッジに原子力平和利用の国立研究所が設立されることになったとき、博士は放射線影響を研究する生物部門の新設の重要性を力説し、提案し、それが認められ、1946年にその初代ディレクターとなり、1966年停年退官するまでの間に世界一流の基礎生物研究所に発展させた。

オークリッジ研究所をやめてから、Hollaender 博士の眼は、広い分野にうつった。こうして、彼は、放射線よりも、環境化学物質の危険の方がさしせまった問題であると考えた。この危険を防ぐためには研究者の国際的協力が不可欠であると力説した。なぜなら、各国には巨大資本の化学会社、薬品会社があって、その力が強大であるため、1国内の研究者の力だけでは打ちできないからである。この国際的組織化には、それまでにすでに国際協力がすすんでいた放射線影響研究者の協力をえて、これに化学関係の研究者を加えることでうまくいった。こうして、1973年に、米国の Asilomar ではじめて第1回の国際環境変異原会議が開催され、同時に国際変異原学会連合が結成された。

1971年に、Hollaender 博士のすすめと応援によって、田島弥太郎先生を中心に日本環境変異原学会が組織されたときには、今日の隆盛になるとは、日本の研究者には予想できなかった。最近の Hollaender 博士は、DNA操作やバイオ新技術に関するシンポジウムの開催とその成果を出版するのに情熱をもやしていた。その若々しい頭脳にはほんとうに頭がさがる。最近年には、先進国の最大の課題“老化”に興味をもっていた。老化の分子生物学のシンポジウムを開催し、立派な本にして一昨年出版した。ひきつづき昨年もブルックヘブンで老化のシンポジウムが開かれたが Hollaender 博士は出席できなかった。さぞ残念であったろう。

癌の問題も、老化の問題が解けないと究極的解明はできないだろうとも言われている。放射線、環境変異原、老化と並べてみると Hollaender 博士は社会の大問題が何であるかをいち早く見抜いて、その研究のため基礎生物学を推進するのに抜群の能力をもった偉大な指導者であった。

オークリッジ時代の Hollaender 博士は、日曜日にはかかさず裏山に登り、化石を採集し、近代美術を愛し、彼の小さな家は絵であふれていた。ドイツなまりのつよい英語で、独特のユーモアをもって人生を語り、何よりも若い人を愛した。そうして、彼の頭脳は、死の直前まで若々しかった。偉大な国際的指導者をなくした。しかし、Hollaender 博士の精神は、彼に接した世界各国の研究者によって受け継がれて、人類の福祉のための研究は永遠につづけられるであろう。

近藤 宗平

## In vivo 小核試験法の基礎と応用に関する研究

国立衛生試験所 変異原性部 林 真

### はじめに

ここでは紙面の都合もあり上記タイトルのうち小核試験の基礎研究の部分、すなわち、マウス骨髄における小核の生成機構——染色体異常と小核の相関性<sup>1)</sup>に限定して述べる。応用面の研究に関しては文献<sup>8~10, 12, 13, 17)</sup>を参照して頂きたい。

小核試験は化学物質の染色体異常誘発性を推定する in vivo 試験系として一般的に用いられるようになってきたが、染色体異常と小核誘発の関係に関する基礎的な研究はほとんどなされていなかった。小核の出現が染色体異常を反映しているという根拠は、染色体異常誘発能を持つ化学物質で処理すると小核が誘発されてくる、といった現象の比較検討の結果が主なものである<sup>5, 20, 29)</sup>。小核と染色体異常との関係については Evans ら<sup>4)</sup>がソラマメの根端に放射線を照射し、染色体断片の約60%が小核を形成するとの報告と、Heddle と Carrano<sup>14)</sup>によるマウスにγ線照射して誘発した小核の DNA 量が、小核が染色体異常に起因すると仮定した時の値と一致するといった2, 3の報告があるのみである。

### 1 染色体異常と小核出現の経時変化

1群当り4匹の ddY マウス(静動協)にモデル化合物を投与し、経時的に動物をと殺して骨髄中における染色体異常と小核の出現頻度を求めた。モデル化合物としては、動物に投与後小核の出現頻度が最高になるまでの時間に差のあることが知られている化合物、mitomycin C (MMC), 6-mercaptopurine (6-MP), および 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C)

を用いた。経時的に大腿骨より骨髄細胞を取り出し、半量を小核試験用の塗抹に用い、残り半量を in vitro でコルセミド処理後染色体標本作製した。小核試験の結果は多染色赤血球(脱核直後の幼若な赤血球, PCE)中に出現する小核を持つ血球(MNPCE)の出現頻度および全赤血球に対する PCE の割合で示した。また染色体異常は固体当り50分裂中期像を観察して染色体異常を有する細胞の出現率で示した。なお今回は、切断端が本来の軸からずれていなければ非染色部分の長さにかかわらずギャップと分類した。

染色体異常および小核の出現頻度の経時変化を図1~3に示す。

MMC では投与4時間後に染色体異常が出現し始め、12時間後に最高値を示した。その後異常細胞は減少し、24時間後に小さなピークを示し36時間後にはほぼコントロール値に戻っている。一方、MNPCE は投与12時間後に増加し始め、24時間後に最高値を示した。さらに36時間まではほぼ同じ値を示した後減少し72時間後に正常値に戻った(図1)。

6-MP では(図2)、染色体異常を有する細胞は投与12時間後から増加し始め、36時間後に最高値を示し、その後急速に減少した。MNPCE は投与24時間後頃から増加し始め48時間後に最高値を示した。PCE の全赤血球に占める割合は投与後30時間から減少し始め60時間後に最低値を示した。

Ara-C は MMC および 6-MP と比較してかなり異なった経時変化を示した(図3)。投与2時間後に染色体異常を持つ細胞の出現頻度は最高値を示した。その後異常細胞は急速に減少し、



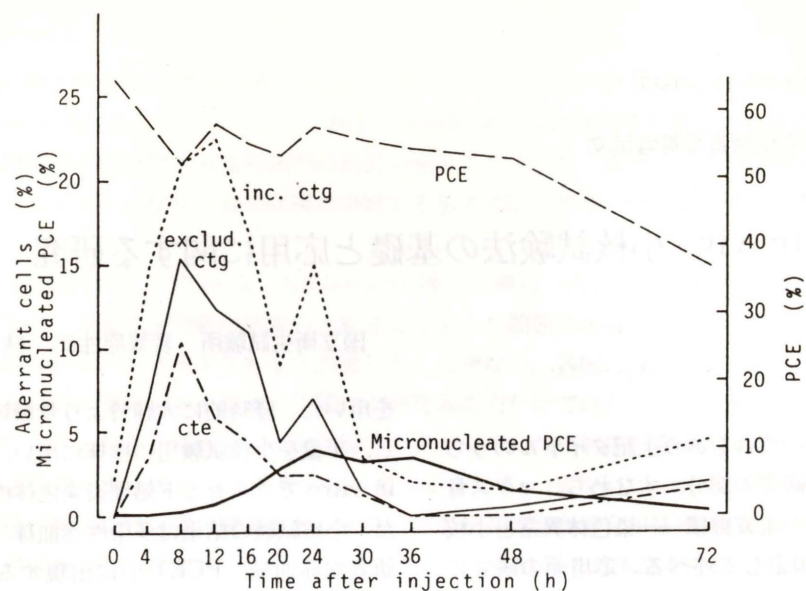


図1 MMC 1.0mg/kgを腹腔内投与後の染色体異常を有する細胞及び MNPCE 出現頻度の経時変化。  
inc. ctg: ギャップを異常に含めた場合。  
exclud. ctg: ギャップ以外の異常を有するもの。  
cte: 交換型異常を有するもの。  
Micronucleated PCE: 小核を有する多染性赤血球 (MNPCE)。  
PCE: 全赤血球に対する PCE の割合。  
各点はそれぞれマウス 4 匹の平均値で示してある。

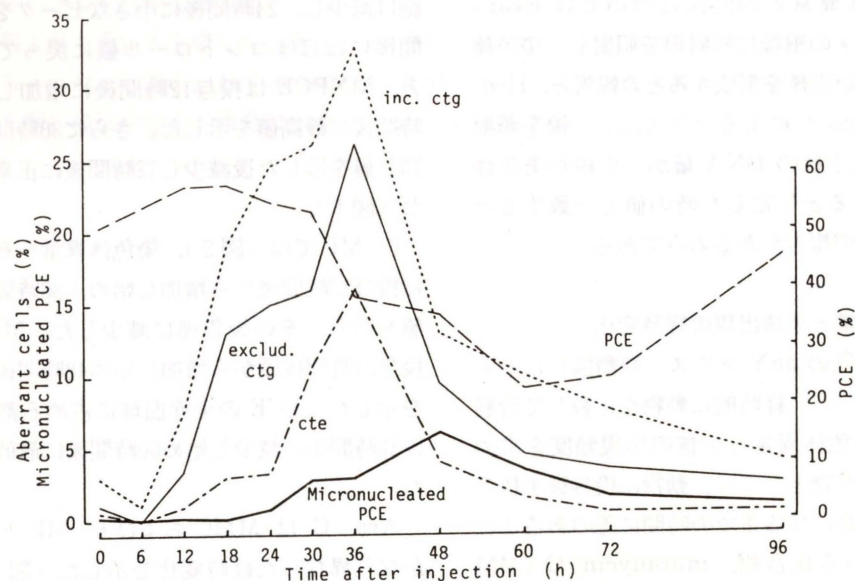


図2 6-MP 50mg/kgを腹腔内投与後の染色体異常を有する細胞および MNPCE 出現頻度の経時変化。  
図1の脚注参照。

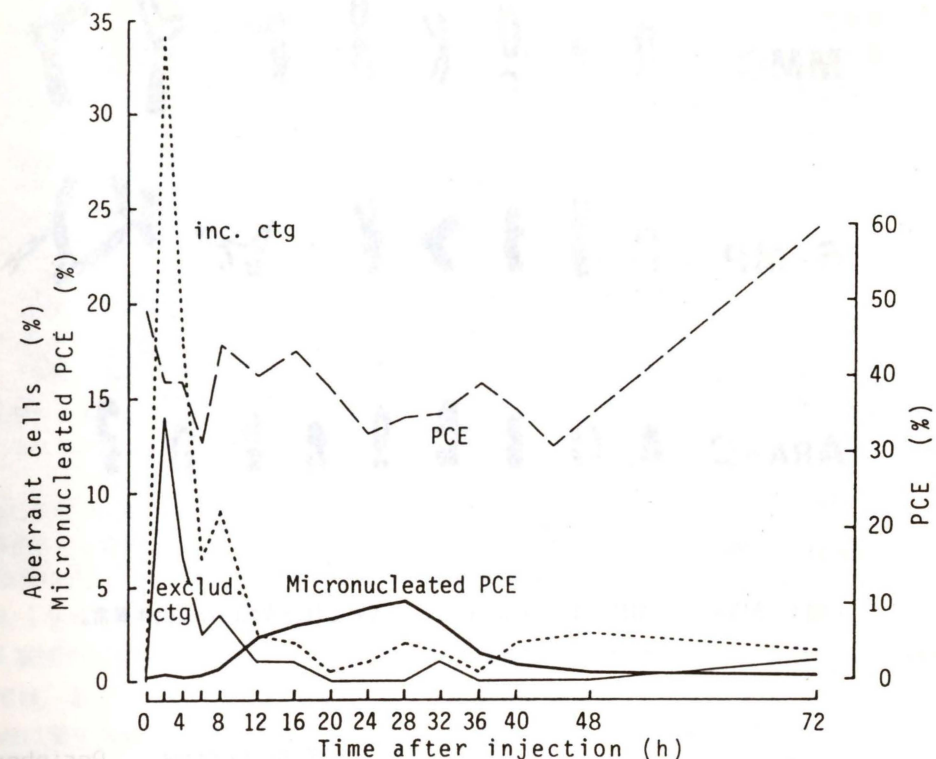


図3 Ara-C 25mg/kgを腹腔内投与後の染色体異常を有する細胞及び MNPCE 出現頻度の経時変化。  
図1の脚注参照。

4時間後に約半分に、さらに12時間後にほぼコントロール値にまで減少している。一方 MNPCE の出現頻度は投与12時間後から28時間にかけてゆるやかに増加し、28時間後に最高値を示した後急速に減少し48時間後には正常値に戻った。

各化学物質によって誘発された染色体異常の型を比較してみると、Ara-Cでは染色分体型(同位型を含む)のギャップおよび切断が主で、MMCや6-MPはギャップや切断の他に多くの交換型の異常を誘発した。それぞれの化合物によって誘発された代表的な染色体異常を図4に示す。なお染色分型の異常は全試験期間を通じ、派生型と思われるものをも含めて観察できなかった。

## 2 小核生成のモデルとシミュレーションによる解析

骨髓中の PCE に観察される小核は、赤血球成熟系の最終分裂において誘発された染色体断片、あるいは分裂装置に損傷を受けたために、分裂後期にいずれの極にも移動できず赤道板附近に残された染色体に、終期に主核と独立して核膜ができ小核が形成されると考えられている。さらにこの小核は、赤血球の成熟過程で主核が脱核する時に細胞質中に取り残され一機構は不明—MNPCE が生成する(図5)。



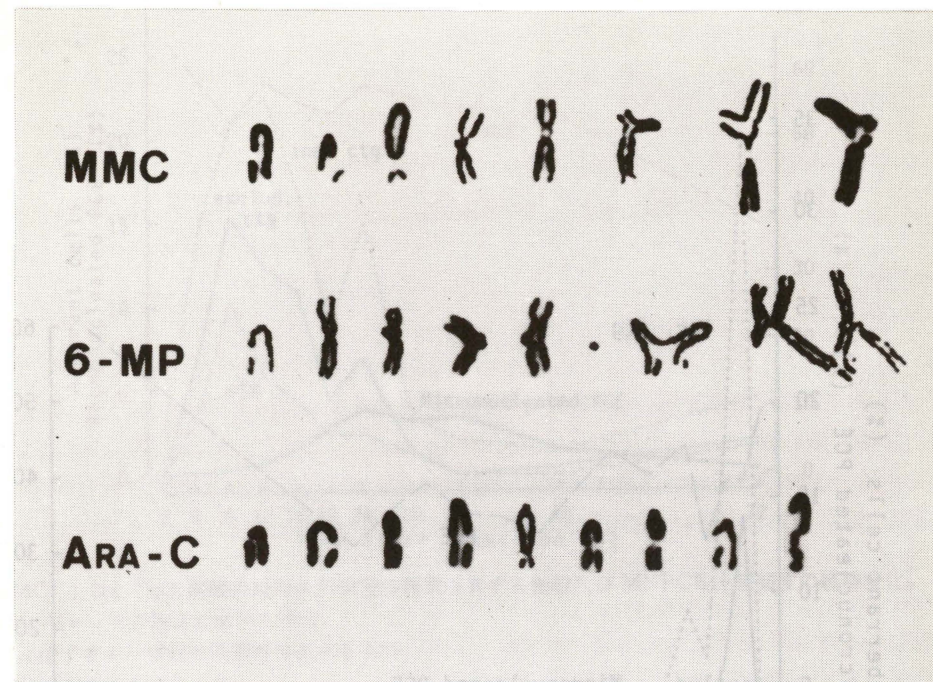


図4 MMC, 6-MP および Ara-C により誘発された代表的な染色体異常。

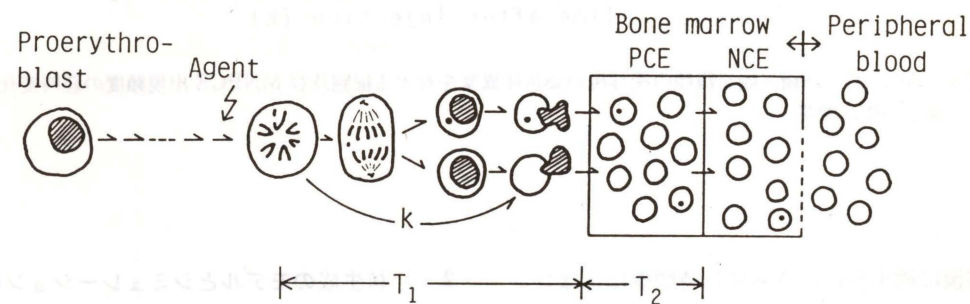


図5 骨髄中で染色体異常から小核を有する赤血球が生成してくるモデル。

ここで、MNPCE の出現頻度の経時変化を説明するために次の3つのパラメータを設定する(図5参照)。

$k$  : 染色体異常を持った中期の細胞が分裂した場合に出現する MNPCE の平均数。 $k$  は 0 (1つも MNPCE が形成されない) から 2 (娘細胞の両方にそれぞれ1つ以上の小核が形成され2つの MNPCE が生成し

た) の間の値を取る。

$T_1$  : 赤血球成熟系の最終分裂の中期から脱核が完了するまでの時間。

$T_2$  : 脱核後 PCE として骨髄中に存在する時間。すなわち、脱核後成熟して正染色赤血球 (NCE) になるか、または PCE のまま末梢血中に移行するまでの時間。

Stage	Meta.	PCE	NCE	Aberrant cells (%)	Micro-nucleated PCE (%)
1	○	○○○○	○○○○○○	0	0
2	●	○○○○	○○○○○○	40	0
3	●●	○○○○	○○○○○○	80	10
4	●●●	○○○○	○○○○○○	60	30
5	●●●●	○○○○	○○○○○○	20	45
6	○	●●●●	○○○○○○	0	50
7	○	●●●●	○○○○○○	0	40

図6 染色体異常を有する細胞から小核を有する PCE ができ、それらが蓄積されてゆく様子を示す模式図。

白丸印は正常な細胞を、黒丸印は染色体異常または小核を有する細胞を示す。

次に、新しく生成した小核が MNPCE として骨髄の PCE 集団中に蓄積するようすを図6に示す。この図では、あるステージから次のステージに移行するのに要する時間が  $T_1$  に相当し、4ステージの移行に要する時間が  $T_2$  に相当するものとして表現してある。Meta の欄の○印は1つの正常分裂細胞を示し、黒マル印は染色体異常を持つ分裂細胞を示している。PCE, NCE の欄の○印はそれぞれが正常な赤血球2細胞を示しており、黒マル印は小核を有する赤血球2細胞を表している。すなわちこの場合は  $k=2$  であり、染色体異常をもつ1つの細胞が分裂すれば必ず2つの小核赤血球を形成する場合を示している。またステージ (以後 S) - 1 は被験物質の影響が現れていない投与直後の状態を示す。S-2 で分裂像に染色体異常が出現してくるが PCE, NCE はそのままである。S-3 になると分裂像における染色体異常は増加する。また、S-2 で染色体異常を持った細胞は  $T_1$  時間経過したので脱核まで完了し、MNPCE となり PCE の集団に移行してくる。S-3 の異常分裂細胞は S-4 で、また S-4 の異常分裂細胞は S-5 でそれぞれ MNPCE となり、小核を持つ赤血球が PCE 集団中に蓄積

されていくことになる。S-3 から  $T_2$  時間後、すなわち S-7 で小核が NCE 中に観察されるようになる。この小核赤血球は S-3 ~ 6 で MNPCE として観察されるもの、すなわち S-2 での染色体異常を有する分裂細胞に由来している。

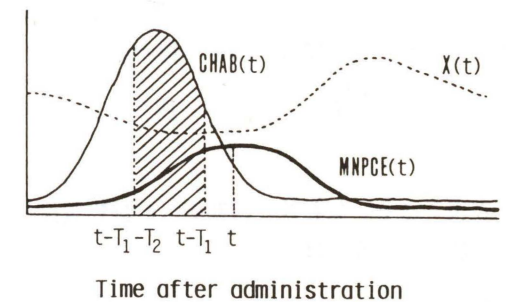


図7 染色体異常を有する細胞と小核を有する PCE の出現頻度の関係を示すモデル。

図6では、被験物質による骨髄細胞の増殖阻害の効果が考慮されていないので、その点を考えに入れ、さらに一般化したものを図7に示す。このグラフの横軸は時間を、縦軸は被験物質の効果量 (任意の単位) を示している。染色体異常出現頻度を時間の関数として  $CHAB(t)$ 、時刻  $t$  に脱核して PCE となる数 (骨髄中一定体積当り) を  $X(t)$  とすれば、被験物質投与  $t$  時間後の MNPCE は次式で示される。

$$MNPCE(t)\% = \frac{100}{PCE} \int_{t-T_1-T_2}^{t-T_1} \frac{1}{2} \cdot X(t) \cdot CHAB(t) \cdot k \cdot dt$$

ここで  $100/PCE$  は MNPCE の出現頻度を100分率表示するための係数で、PCE は単位容積当りの PCE の数を示す。また  $\frac{1}{2} \cdot X(t)$  は一定体積当りの赤血球生成系の最終分裂細胞数であり、本来分裂指数より求めるべきものであるが、分裂中期像を観察して、その細胞の種類 (赤芽球かどうか) を同定するのは不可能なので、次のように  $X(t)$  を推定した。骨髄一定体積中の全赤血球数を EBM (常に一定値を示すと仮定した) とし、被験物質投与後  $t$  時間の PCE の全赤血球



に対する割合を  $PCE(t)$ ,  $t$  より  $\Delta$  時間前のそれを  $PCE(t-\Delta)$ ,  $t-\Delta$  より  $t$  までの  $\Delta$  時間に新しくできた  $PCE$  の数を  $X(t)$ ,  $t-T_2-\Delta$  より  $t-T_2$  の間に新しくできた  $PCE$  の数を  $X(t-T_2)$  とすれば次式

$$EBM \cdot PCE(t) = EBM \cdot PCE(t-\Delta) + X(t) - X(t-T_2)$$

が成立する。よって  $X(t)$  は一種の漸化式として

$$X(t) = EBM [PCE(t) - PCE(t-\Delta)] + X(t-T_2)$$

と表現できる。なお  $X$  の初期値 (被験物質投与以前の値)  $X(0)$  は

$$X(0) = EBM \cdot PCE(0) \cdot \Delta / T_2$$

で示される。ここに  $PCE(0)$  は投与時における  $PCE$  の全赤血球に対する割合であり,  $\Delta$  はシミュレーションの間隔である。

次に実際に  $MNPCE$  出現頻度の経時変化を計算するに用いた漸化式を示す。

$$\begin{aligned} (a) \quad MNPCE(t) &= \left\{ [EBM \cdot PCE(t-\Delta)] \right. \\ &\quad \cdot \frac{1}{100} MNPCE(t-\Delta)] \\ (b) \quad &+ (\frac{1}{2} \cdot X(t-T_1)) \\ &\quad \cdot CHAB(t-T_1) \cdot k \\ (c) \quad &- (\frac{1}{2} \cdot X(t-T_1-T_2)) \\ &\quad \cdot CHAB(t-T_1-T_2) \cdot k \left. \right\} \\ &\quad \times \frac{1}{EBM \cdot PCE(t)} \times 100 (\%) \end{aligned}$$

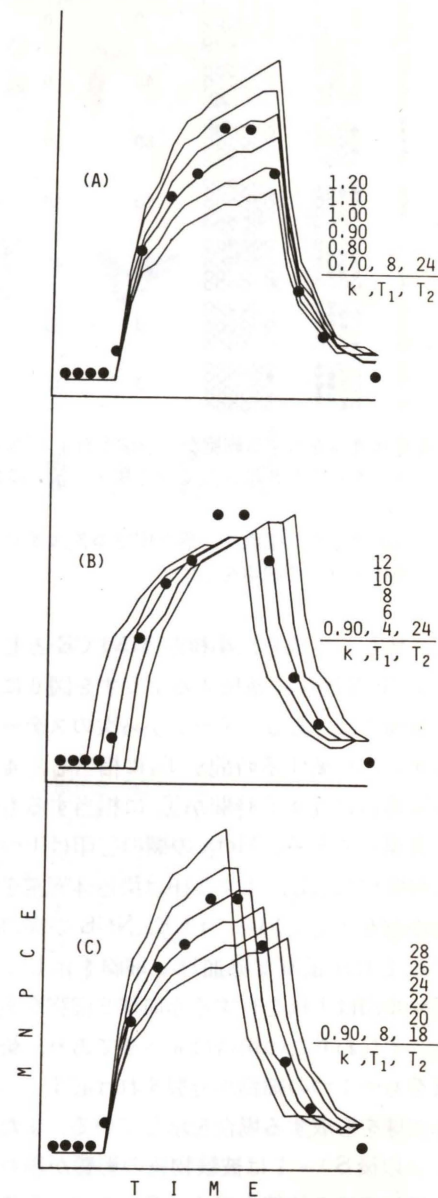


図8 A~C Ara-Cについて  $k$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  を変化した時のグラフの動き。A:  $T_1=8$  時間,  $T_2=24$  時間と固定し,  $k$  の値を0.7から0.1きざみで1.2まで変化した時。B:  $k$  を0.90,  $T_2=24$  時間とし,  $T_1$  を4時間から2時間間隔で12時間まで変化した時。C:  $k$  を0.90,  $T_1=8$  時間とし,  $T_2$  を18時間から2時間間隔で28時間まで変化した時のグラフの動きを示す。黒丸印: 観察値, 実線: 推定値。

ここで

$MNPCE(t)$ : 被験物質投与  $t$  時間後の  $MNPCE$  出現頻度 (%). 初期値は当研究室の背景データである0.2%<sup>7)</sup>とした。

$CHAB(t)$ : 時刻  $t$  における染色体異常を有する細胞の出現率 (観測値及び隣接2点間の補間値)。

$T_1$ ,  $T_2$ ,  $k$ ,  $EBM$ ,  $PCE(t)$ ,  $X(t)$  については既述。

上式の (a) は  $\Delta$  時間前の  $MNPCE$  の数, (b) は  $\Delta$  時間の間に新しくできた  $MNPCE$  の数であり (c) はその間になくなった  $MNPCE$  の数をそれぞれ示している。

それぞれの化合物について,  $k$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  を変化させて2時間毎の  $MNPCE$  の推定出現頻度を, 染色体異常と  $PCE$  の全赤血球に対する割合の観察値を基に計算し,  $MNPCE$  の観察値と最もよく一致する時の  $T_1$ ,  $T_2$  および  $k$  の値を求めた。各パラメタを変化させた時にグラフがどのように移動するかを Ara-C について1例を図8に示す。推定値と観察値の一致度は, 両者の差の2乗の合計値 (例として Ara-C について  $k=0.90$  とした時のものを図9に示す), グラフの立ち上がりの時間, 最高値を示す時間,  $MNPCE$  の最高値等を考慮して総合的に判断した。Ara-C では  $T_1=8$  時間,  $T_2=22$  時間,  $k=0.90$  の時に推定値と観察値が最もよく一致した (図10)。MMC では  $T_1=6$  時間,  $T_2=22$  時間,  $k=0.45$  であり, 6-MP に関しては  $T_1=8$  時間,  $T_2=18$  時間,  $k=0.35$  であった (図11)。

文献から推定される  $T_1$ ,  $T_2$  に相当する時間をまとめたものを図12に示す。今回のシミュレーションの結果はそれらと矛盾しないものであった。これらの値は小核生成の速度論を理解するのに重要な意味を持つばかりでなく, 赤血球の分化, 成熟を論ずる場合にも重要な要素となる。

小核出現の経時変化のパターンは用いた3化合物の間で異なっている。このばらつきは  $T_1$ ,  $T_2$  が異なっているためではなく, 先行する細胞分裂時における染色体異常出現の経時変化を反映して

いると考えられる。その染色体異常の出現は被験物質の吸収, 分布, 代謝, 排泄等の薬物動態学的な影響, また細胞に対する作用機構の違いによる影響を受ける。また今回用いたモデルからもわかるように, 小核出現のパターンは染色体異常出現のパターンを  $T_1$  時間だけ平行移動したものではなく, 蓄積効果があるためかなり異なった様相を示す。

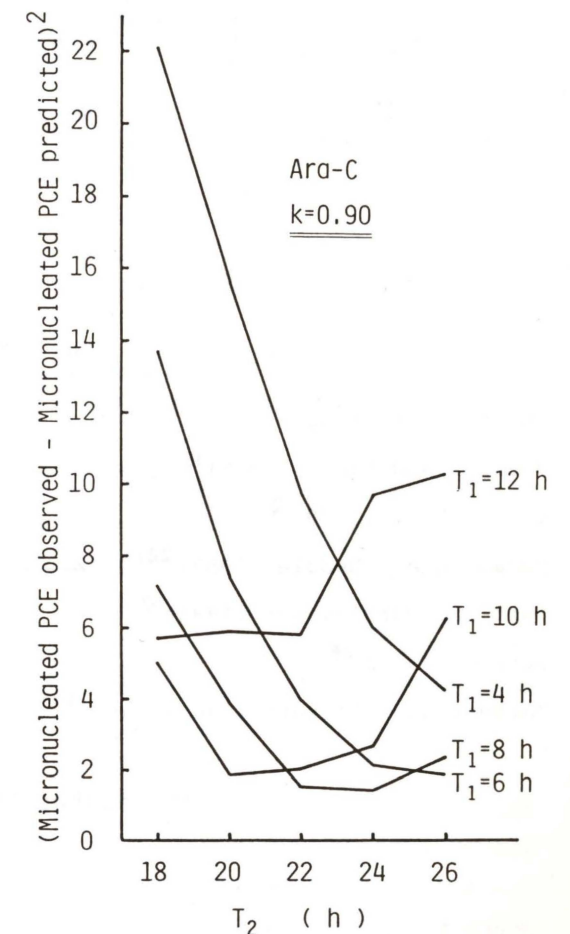


図9 Ara-C について  $k=0.90$  とし,  $T_1$  を6~12時間,  $T_2$  を18~26時間まで変化した時の小核を有する  $PCE$  の観察値と推定値の差の2乗。



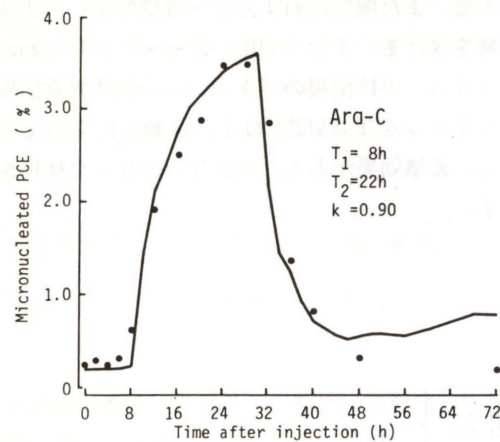


図10 Ara-Cについてのシミュレーション結果。  
黒丸：観察値 実線：推定値

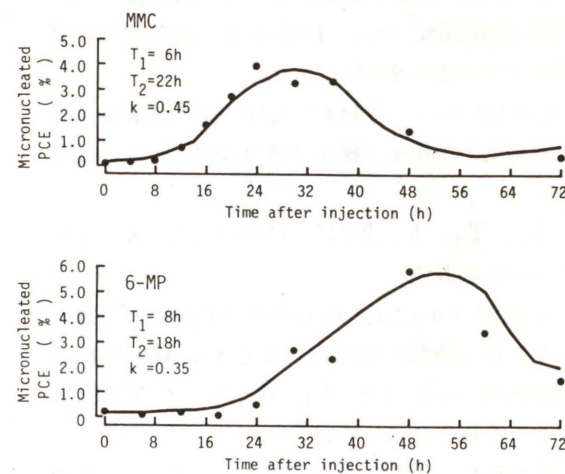


図11 MMC (上) と6-MP (下) についてのシミュレーション結果。  
黒丸：観察値 実線：推定値

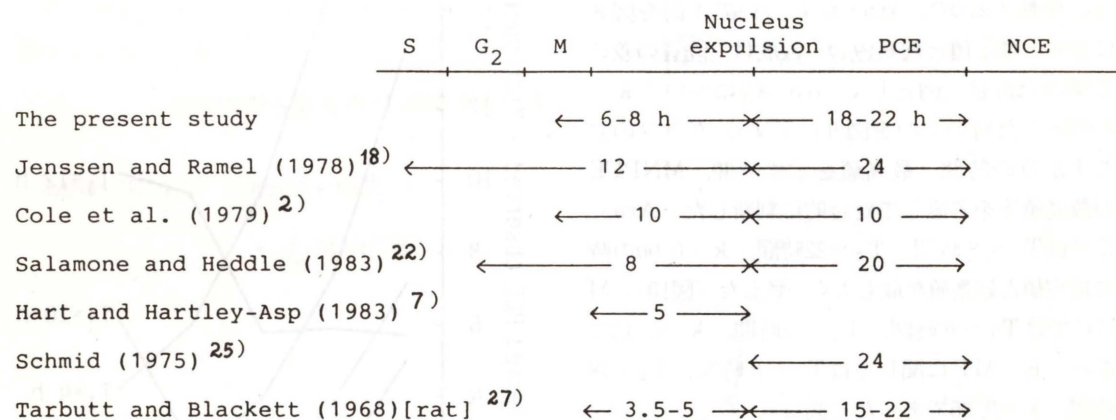


図12 赤血球分化の最終段階の移行時間。

次にもう1つのパラメータ  $k$  はこれまでに述べてきた  $T_1$  および  $T_2$  と異なり、今回用いた3化合物間で Ara-C は 0.90, MMC は 0.45 として 6-MP は 0.35 と大きなばらつきを示した。Ara-C の  $k = 0.90$  という値は、染色体異常を有する分

裂細胞の90%に由来する娘細胞に小核が観察されることを意味している。MMC と 6-MP についてはそれぞれ45%と35%の染色体異常細胞に由来する娘細胞に小核が認められることを示している。一方これらの化合物によって誘発される染色

体異常の型は Ara-C と他の2種で大きく異なっており(図4),  $k$  値との間に相関性のあることが示唆される。すなわち, Ara-C によって誘発される異常はギャップと切断であり, このような単純な切断が効率よく小核を形成する( $k$ の値が高くなる)ことを示している。一方, MMC と 6-MP はギャップ, 切断の他に交換型の異常を多く誘発している。交換型異常の場合, 対称形で完全型の場合には断片は形成されない点, また交換型を含み, 細胞当たり多くの異常を持つ場合には PCE にまで分化成熟できない<sup>15)</sup> 可能性がある点等を考慮すると  $k$  の値が小さくなることが充分予想でき, シミュレーションの結果とも一致している。

今回のシミュレーションの結果, 染色体異常のうちで議論の多いギャップにも小核を形成するような染色体断片を伴うものがあることが示された。ギャップについては染色体切断との関係において判別の基準も確定していないのが現状である<sup>19, 21, 23, 24, 26)</sup>。今回用いた分類基準は染色体分体の軸からずれているかどうかで, 非染色部分の長さは考慮に入れなかった。またシミュレーションに用いた染色体異常のデータはギャップも異常に含めたものを用いてある。そこでギャップの小核形成に対する関与度合を見るために, Ara-C についてギャップを異常から除いたデータ(図3の細い実線)を用いてシミュレートした結果( $k$ を変化させた1例を図13に示す),  $k = 2.60$ ,  $T_1 = 8$ 時間,  $T_2 = 22$ 時間を与えた時に推定値と観察値が最も良く一致した。この  $k = 2.60$  という値は平均して1つの異常細胞から2.6個の小核を持った細胞が形成されることを示しており, 理論的に考えられない値である。すなわち, ギャップのみを持つ細胞を異常細胞から除くと, 染色体異常を持つ1つの細胞が常に2つの小核をもつ赤血球を形成した( $k = 2.0$ )としても, 小核を有する赤血球のすべてを染色体異常で説明できなくなる。このことは, 今回ギャップと判定したものの中に, 小核の形成に関与する切断が含まれていたことを示すものである。

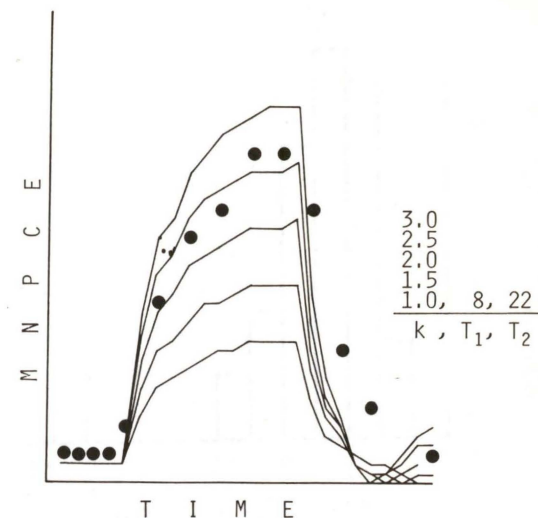


図13 Ara-C についてギャップを異常から除いたデータを用い,  $k$  を変化させた時のグラフの動き。  
 $T_1$  を8時間,  $T_2$  を22時間に固定し,  $k$  を1.0から0.5きざみで3.0まで変化させてある。  
黒丸：観察値 実線：推定値

### 3 小核の相対DNA量と染色体断片の相対長との比較

小核のDNA量を測定した報告は, Heddle and Carrano (1977)<sup>14)</sup> が  $\gamma$ -線を照射したマウス骨髓細胞について行ったものがある。彼らは, 小核のDNA量は顆粒球のそれに対して0.5~11.0%であったとし, その値は種々の型の染色体異常が確率的に起こり, その切断点を長腕の中央と仮定した時の断片の相対長の平均値と一致したと述べている。

今回は, ddY マウスに Ara-C を25mg/kg腹腔内投与し, 24時間後に大腿骨の骨髓細胞の塗抹標本を作製してDNA量測定のための標本とした。塗抹標本をDNAと特異的に結合する蛍光色素 Hoechst 33258 で染色し, オリンパス光学の顕微蛍光測光機 (BH2-QRFL) で測定した。基準となる2C(配偶子の有するDNA量の2倍)のDNA量を持つ細胞核としては小核を有する赤血球に近接するリンパ球を用いた。



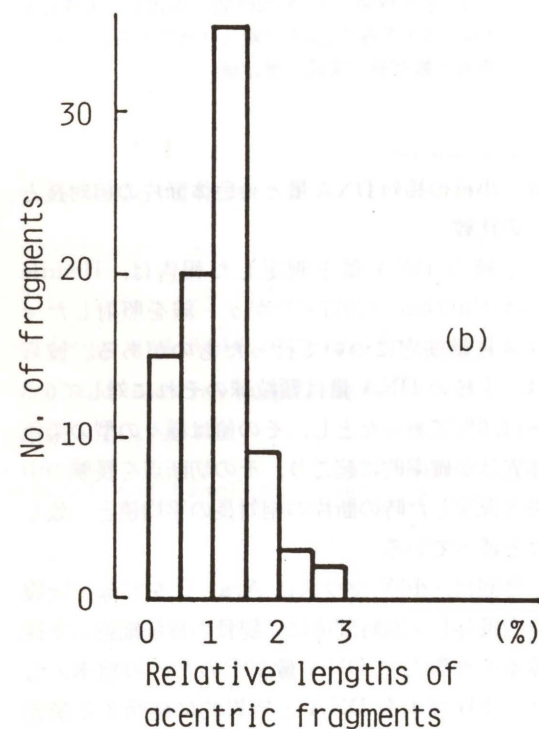
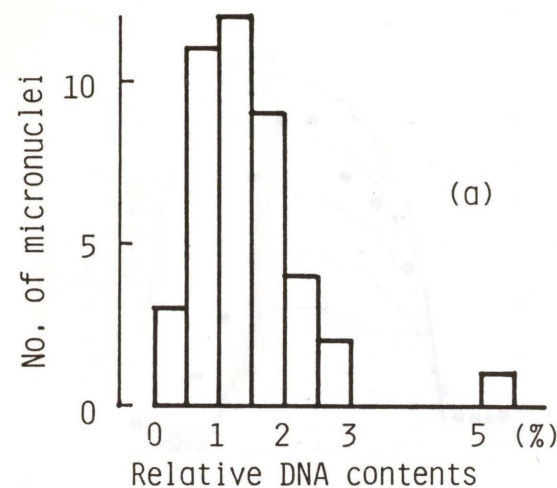


図14 Ara-C 25mg/kg, 腹腔内投与24時間後にみられた小核の2Cに対する相対DNA量の分布(a)と2時間後の分裂中期像にみられた染色体断片の全染色体長に対する相対長の分布(b)。

染色体断片長の計測には, Ara-C, 25mg/kgを投与したマウスを2時間後にと殺し, 大腿骨の骨髓細胞を用いて染色体標本作製した。よく拡がった分裂中期像を写真撮影し, 写真上で断片の長さと同染色体の長さを測定した。

小核のDNA量は2C量に対して0~3%の範囲に分布し, モードは1.0~1.5%であった。一方染色体断片の全染色体長に対する割合もまた0~3%の範囲に分布し, モードは1.0~1.5%と相対DNA量の場合と同じであった(図14)。このことは小核が染色体の断片に由来するものであることを強く示唆している。

今回の結果は Heddle と Carrano が得た値より低い値を示しているが, これは $\gamma$ -線と Ara-C の誘発する染色体異常の型の違いによるものと思われる。すなわち, 25mg/kg の Ara-C 処理で誘発される染色体異常のほとんどはギャップまたは切断であり, 断片の長さはかなり短いものであることが容易に予想できる。他方,  $\gamma$ -線の場合にはそれらに加え交換型の異常も多数誘発されていることが推定でき, 染色体断片も大きなものも形成されることが予想される。この差が小核の相対DNA量の差として現れているものと考えられる。

#### 4 おわりに

以上の結果を総合的に考えると, 染色体の構造異常を誘発する化学物質の投与によって出現する小核と, それに先行する染色体異常との間に密接な関連のあることが明らかになった。このように小核と染色体異常の関係が明らかになったことにより, 小核試験の持つ種々の利点を生かし, スクリーニングのみならず in vivo 細胞遺伝学の基礎研究にも利用できるものと考えられる。

小核を誘発する化学物質は, 染色体に構造異常を起こすものばかりでなく数値異常を起こす紡錘体阻害剤も含まれる<sup>1, 20, 21, 26, 28)</sup>。しかし, 紡錘体阻害剤による小核誘発の機構についての研究はほとんどなされていない。小核生成機構の全体像を把握するためにも今後この方面の研究が重要

であると思われる。

このたびの奨励賞授賞にあたり, 種々御配慮いただきました本学会の諸先生方に深く感謝の意を表します。また, 本研究を進める上でいろいろ御指導, 御協力くださいました研究室の先生方はじめ共同研究してくださった皆様に深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Bruce, W. R. and J. A. Heddle (1979) The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella*, and sperm abnormality assays, *Can. J. Genet. Cytol.*, 21 : 319-334.
- 2) Cole, R. J., N. A. Taylor, J. Cole and C. F. Arlett (1979) Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test, *Nature (London)*, 277 : 317-318.
- 3) Covelli, V., G. Briganti and G. Silini (1972) An analysis of bone marrow erythropoiesis in the mouse, *Cell Tissue Kinet.*, 5 : 41-51.
- 4) Evans, H. J., G. J. Neary and F. S. Williamson (1959) The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen: Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei, *Int. J. Rad. Biol.*, 3 : 216-229.
- 5) Frank, D. W., R. J. Trzos and P. I. Good (1978) A comparison of two methods for evaluating drug-induced chromosome alterations, *Mutat. Res.*, 56 : 311-317.
- 6) Frindel, E., M. Tubiana and F. Vassort (1967) Generation cycle of mouse bone marrow, *Nature (London)*, 214 : 1017-1018.

- 7) Hart, J. W. and B. Hartley - Asp (1983) Induction of micronuclei in the mouse: Revised timing of the final stage of erythropoiesis, *Mutat. Res.*, 120 : 127-132.
- 8) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1982) High-sensitivity in micronucleus induction of a mouse strain (MS), *Mutat. Res.*, 105 : 253-256.
- 9) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 120 : 241-247.
- 10) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An Acridine Orange staining method in the micronucleus test, *Toxicol. Forum*, 6 : 419-425.
- 11) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1984) Kinetics of micronucleus formation on relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, *Mutat. Res.*, 127 : 129-137.
- 12) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1984) A pilot experiment for the micronucleus test. The multi-sampling at multi-dose levels method, *Mutat. Res.*, 141 : 165-169.
- 13) Hayashi, M., M. Yamazaki, Y. Kikuchi and M. Ishidate, Jr. (1985) Use of historical control data for assessing micronucleus test data, *Toxicol. Forum*, 8 : 48-57.
- 14) Heddle, J. A. and A. V. Carrano (1977) The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: Evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments, *Mutat. Res.*, 44 : 63-69.



- 15) Heddle, J. A. and M. F. Salamone (1981) Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity, *Environ. Health Perspect.*, 39 : 23-27.
- 16) Hogstedt, B. and A. Karlsson (1985) The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used, *Mutat. Res.*, 156 : 229-232.
- 17) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, M. Hayashi, A. Matsuoka and M. Sawada (1986) Development of the method to detect in vivo cytogenetic effects of environmental pollutant chemicals at low dose level, *環境保全研究成果集*, 28-1-14.
- 18) Jenssen, D. and C. Ramel (1978) Factors effecting the induction of micronuclei at low doses of x-rays, MMS, and dimethylnitrosamine in mouse erythroblasts, *Mutat. Res.*, 58 : 51-65.
- 19) 加藤旌夫 (1983) 染色体異常の種類と生成機構, 染色体異常 (外村晶編), pp73-88, 朝倉書店
- 20) Maier, P. and W. Schmid (1976) Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 40 : 325-338.
- 21) Report of the standing committee on human cytogenetic nomenclature (1978) An international system for human cytogenetic nomenclature (1978), *ISCN (1978)*, *Cytogenet. Cell Genet.*, 21 : 309-404.
- 22) Salamone, M. F. and J. A. Heddle (1983) The bone marrow micronucleus assay : Rationale for a revised protocol, in : *Chemical Mutagens, Principles and method for their detection* (F.J. de Serres ed.), vol. 8, pp 111-149, Plenum, New York.
- 23) 佐々木正夫 (1983) 環境変異原性物質と染色体異常, 染色体異常 (外村晶編), pp273-301, 朝倉書店
- 24) Savage, J. R. K. (1976) Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.*, 13 : 103-122.
- 25) Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31 : 9-15.
- 26) Scott, D., N. Danford, B. Dean, D. Kirkland and C. Richardson (1983) In vitro chromosome aberration assays, In Report of the UKEMS subcommittee on guidelines for mutagenicity testing (B. J. Dean ed.), pp41-64, UKEMS.
- 27) Tarbutt, R. G. and N. M. Blackett (1968) Cell population kinetics of the recognizable erythroid cells in the rat, *Cell Tissue Kinet.*, 1 : 65-80.
- 28) Tsuchimoto, T. and B. E. Matter (1979) In vivo cytogenetic screening methods for mutagens, with special reference to the micronucleus test, *Arch. Toxicol.*, 42 : 239-248.
- 29) Yanamoto, K. I. and Y. Kikuchi (1979) Basic problems in the micronucleus test. I. Correlation between frequencies of chromosome aberrations and of micronuclei induced by triethylenemelamine (TEM), *J. Takeda Res.*, 38 : 57-61.
- 30) Yamamoto, K. I. and Y. Kikuchi (1980) A comparison of diameter of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, *Mutat. Res.*, 71 : 127-131.

環境変異原研究 9 : 15-35 (1987)

昭和61年度学会奨励賞受賞者論文

## ヒト末梢リンパ球に於ける姉妹染色分体交換

### (SCE) 誘発に関する研究

東京大学医学部 公衆衛生学教室 森 本 兼 曩

#### 1 はじめに

人間を主体として環境を眺めたとき、我々は環境に積極的に働きかけると同時に環境から種々の影響を受けている。これらの環境影響を評価する際、ヒト染色体は重要な情報を提供してくれる。種々の環境要因による染色体の変化が招来されることがよく知られているが、この染色体の変化はそれ自体が直接的に観察が可能であり、かつ定量的に評価する事が出来る遺伝物質そのものの変化であり、発癌、老化、或は次世代への遺伝的影響と密接な関連のあることが知られている。これら染色体の変化としては、染色体DNAの切断とそれに続く修復等により染色体の形態が変化する構造異常、細胞中の染色体数が変化する数的異常、及び染色体を構成する二本の姉妹染色分体間で交換が生じる姉妹染色分体交換 (Sister Chromatid Exchanges ; SCEs) がある。特にSCEは、近年染色体DNA傷害の鋭敏な指標として注目されているところである<sup>1)</sup>。

我々は、種々の環境変異原がいかにヒト染色体に影響を及ぼすかについて末梢リンパ球培養法を応用し、一連の研究を行ってきた。即ち、近年人類遺伝学並びに免疫学的研究に多用されているヒト末梢リンパ球培養法に注目し、その試験管内分裂動態<sup>3-6)</sup>と染色体傷害<sup>7-9)</sup>の関係を詳細に分析した。更にこのリンパ球培養法を用いて、in vitroで、ベンゼン<sup>10-12)</sup>、トリハロメタン<sup>13)</sup>、重金属<sup>14)</sup>等、環境変異原物質として重要な物質によるSCEの誘発を検討すると共に、水銀とセレンの複合影響の定量的解析<sup>15)</sup>や、好発癌性遺伝性疾患として著名なAtaxia telangiectasia

(AT), Xeroderma pigmentosum (XP), Fanconi anemia (FA), Bloom 症候群 (BS) 或は Down 症等のリンパ球について、その環境変異原物質への感受性の度合を、遺伝素因との関係から検討した<sup>16-20)</sup>。更に末梢リンパ球培養SCE法を用いて、種々の環境変異原に対する暴露に関する human monitoring のシステムを開発した。つまりここでは、現在健康阻害要因として注目されている喫煙の影響、産業現場で問題となる methyl bromide と beryllium 作業従業員のモニタリング、或は発癌や循環器疾患等の慢性症と強い関連性を持つ種々のライフスタイルの健康影響指標として、SCEを取り上げた<sup>17, 21)</sup>。

#### 2 培養ヒト末梢リンパ球における分裂動態と染色体の観察<sup>3, 4)</sup>

##### 2-1

in vitroの細胞遺伝学研究、中でもSCE研究に関して広く用いられている哺乳類・ヒト培養細胞株に比べ、リンパ球培養における細胞分裂動態はかなり特殊なものと考えてよい。例えば図1に見られるように、PHA添加培養開始後64時間目にある細胞集団をFPG染色をした後に観察してみると、培養開始後第1回目(X<sub>1</sub>)、第2回目(X<sub>2</sub>)、及び第3回目以降(X<sub>3+</sub>)の分裂期にある細胞が共存している。即ち、第2回目の分裂期にある細胞(X<sub>2</sub>細胞)の相対頻度は培養56時間目にピークに達するが(図2)、それより短い、或は長い培養時間においても常にX<sub>1</sub>細胞が混在するのが一つの特徴と言える。

これらの heterogeneity の説明としては、主



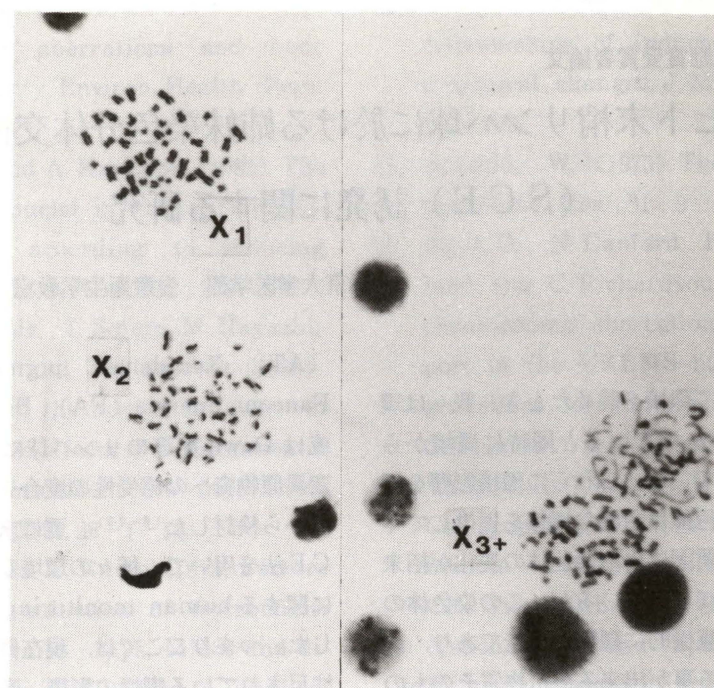


図1: brdUrd 処理後 FPG 分染による 1 回目 ( $X_1$ ), 2 回目 ( $X_2$ ) 並びに 3 回目以降 ( $X_{3+}$ ) のリンパ球分裂中期像

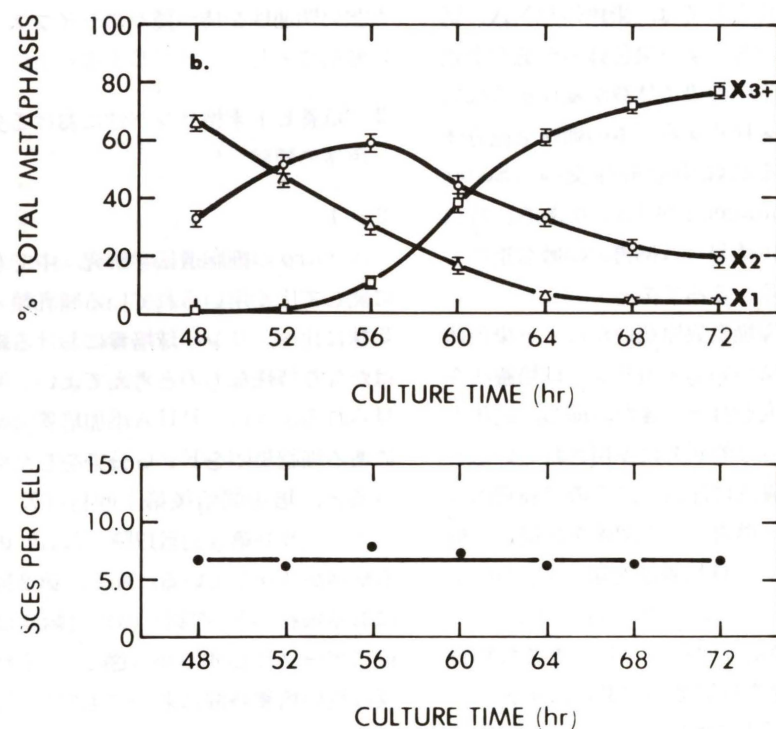


図2: 培養時間による  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_{3+}$  細胞の相対比の変化と  $X_2$  細胞における SCE baseline 頻度

として PHA に対する反応時間の相異説と世代時間相異説とがあった。現在までのところヒト末梢リンパ球の分裂動態に関する研究は数十を数えるが、それらの研究のほとんどはかなり高濃度のトリチウムサイミジン ( $^3\text{H}$ -TdR) を添加した autoradiography によるものであった<sup>4)</sup>。ところが、 $^3\text{H}$ -TdR によるラベリングにより細胞分裂の遅延が生ずることはよく知られている。そこで、FPG 分染と autoradiography の同時解析法により、まず細胞分裂動態の遅延が生じない程度に  $^3\text{H}$ -TdR でラベルするにはどのくらいの濃度が適当であるかを検討し、更にリンパ球分裂動態の解析を行った。

## 2-2 FPG 分染と autoradiography の同時解析法<sup>3)</sup>

Bromodeoxyuridine (BUdR) を含んだ培養

液中での分裂回数は、図1に示すような FPG 分染により容易に識別可能である。又、ごく低濃度の  $^3\text{H}$ -TdR でパルスラベルすることにより、個々の細胞がいつ DNA 合成を行ったかを推定することが可能である。この2つの方法を組み合わせることにより、上記のような複雑なリンパ球の分裂動態をも容易に識別可能となった(図3)。しかし、ギムザ染色をしたスライドガラス上に直接 autoradiography 用の乳剤をひいた場合、ギムザ色素と乳剤との化学的反応により多くの銀粒子が生ずる。従って従来の方法では、ギムザ染色の後一旦アルコール等でギムザ色素を脱色した後、autoradiography 用乳剤をひくことにより FPG 分染と autoradiography を行わざるを得なかった。しかし、我々はギムザ色素による FPG 分染の後、高分子物質 Formvar の薄膜を塗布し、その上に直接乳剤をひいて autoradio-

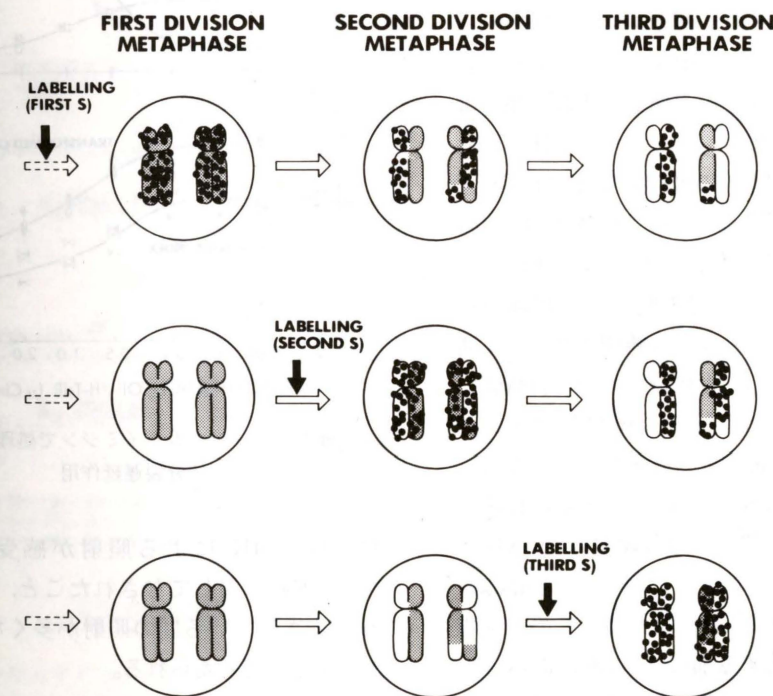


図3: 姉妹染色分体交換分染・autoradiography 同時解析法による細胞分裂動態の解析原理



graphy を行う方法を開発した。本 FPG・autoradiography 同時分染法の特徴は、1) autoradiography の銀粒子と分染された染色体像が同時に観察できること、及び 2) 十分な銀粒子数を得るために長い露出が必要な場合にも、autoradiography とは関係なく FPG 分染を行えることから、質の良い分染が可能であること、等である。

## 2-3 $^3\text{H}$ -TdR による細胞分裂動態の攪乱現象<sup>3)</sup>

既に述べたように、リンパ球分裂動態に関する従来の研究は、ほとんどが  $^3\text{H}$ -TdR による autoradiography を利用していた。そこで、これら  $^3\text{H}$ -TdR でラベルすることによる細胞分裂動態への影響を検討したところ (図4), 0.2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^3\text{H}$ -TdR 以上の濃度で8時間細胞をラベルした場合に、顕著な細胞分裂動態の遅延が観察された。又、図\*に見られるように  $^3\text{H}$ -TdR の取り込みの強い細胞ほどその遅延効果は大きかった。ちなみに  $^3\text{H}$  の1崩壊当りおよそ5 mGy の吸収線量を仮定して、autoradiography における銀粒子の誘発効率をも考慮して吸収線量を推定したところ、例えば0.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  の  $^3\text{H}$ -TdR 処理の場合、1時間当りの吸収線量は30 mGy とされた。一方、1回目、2回目、及び3回目以降の分裂期にある細胞の割合を対照群と比較して0.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^3\text{H}$ -TdR 処理時の細胞周期の遅延時間を推定したところ4~6時間であった。通常のリンパ球の場合、一世代時間は12~14時間であるが、0.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^3\text{H}$ -TdR のラベリングにより4~6時間の細胞分裂遅延が生じた場合、約18時間の世代時間を示すものと考えられる。従ってこの一世代時間内の吸収線量は30 mGy/h $\times$ 18h=540 mGy となり、1 Gy 当りの細胞分裂遅延時間は約10時間と推定された。この遅延時間は、PHAで賦活する前の ( $G_0$ 期にある) ヒト末梢リンパ球について我々が観察した値 (1 Gy 当り約1時間、或は1.3時間)<sup>6, 18)</sup> に比し、かなり強い遅延率を示している。この差の原因とし

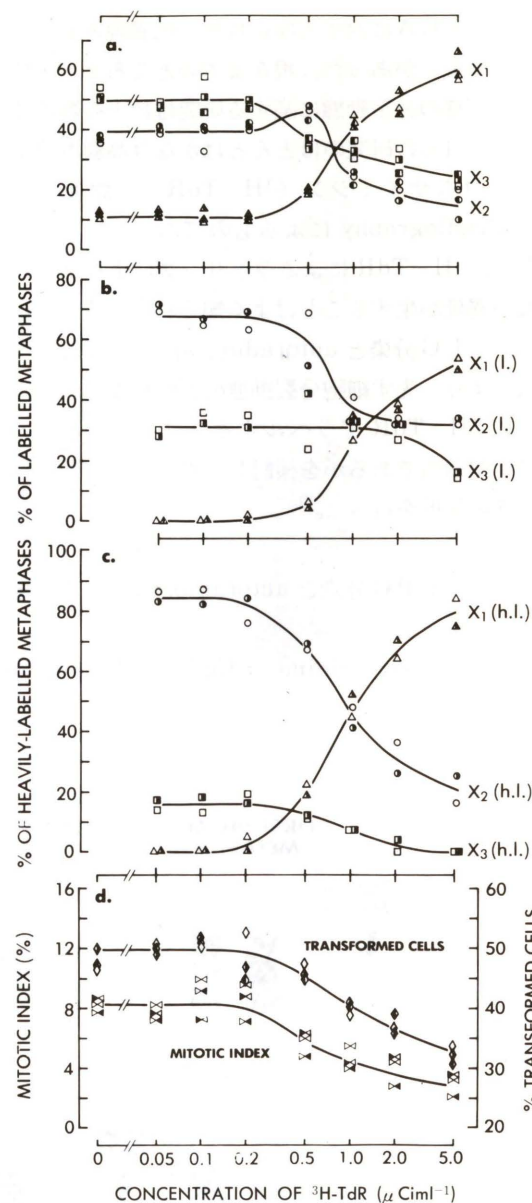


図4：種々のトリチウムサイミジンで処理した際に生ずるヒトリンパ球分裂遅延作用

ては  $^3\text{H}$ -TdR による照射が感受性の高い cycling 細胞に対してなされたこと、特に  $G_2$  期に block されている間の照射が多くなっていることが主として考えられる。

## 2-4 リンパ球分裂動態

0.1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  の  $^3\text{H}$ -TdR によるラベリング

表1：ヒトリンパ球のPHA添加培養後異なる時間にトリチウムサイミジンに pulse label した後、64時間培養した際に観察されるラベルされた細胞の割合。

Labelling period (0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ $^3\text{H}$ -TdR) (hr after initiation)	Donor	% labelled metaphases	% labelled (or heavily-labelled) metaphases among:					
			X1 I*	X2 I	X3			
24 - 32	A	53.0	0 (0)	2.9 (0)	96.3 (63.0)	0 (0)		
	B	43.0	0 (0)	10.6 (2.1)	97.4 (72.0)	0 (0)		
32 - 40	A	49.0	0 (0)	89.2 (37.8)	29.2 (6.3)	4.2 (0)		
	B	53.0	0 (0)	90.6 (52.6)	35.6 (5.1)	7.0 (1.8)		
40 - 48	A	85.0	25.0 (11.8)	85.3 (41.2)	0 (0)	98.1 (79.6)		
	B	65.0	31.6 (15.8)	59.2 (32.7)	0 (0)	93.8 (78.1)		

\* I or II represents the metaphases whose labelling pattern indicates the  $^3\text{H}$ -TdR incorporation in the first or second cell cycle respectively. (For details see Fig. 1.)

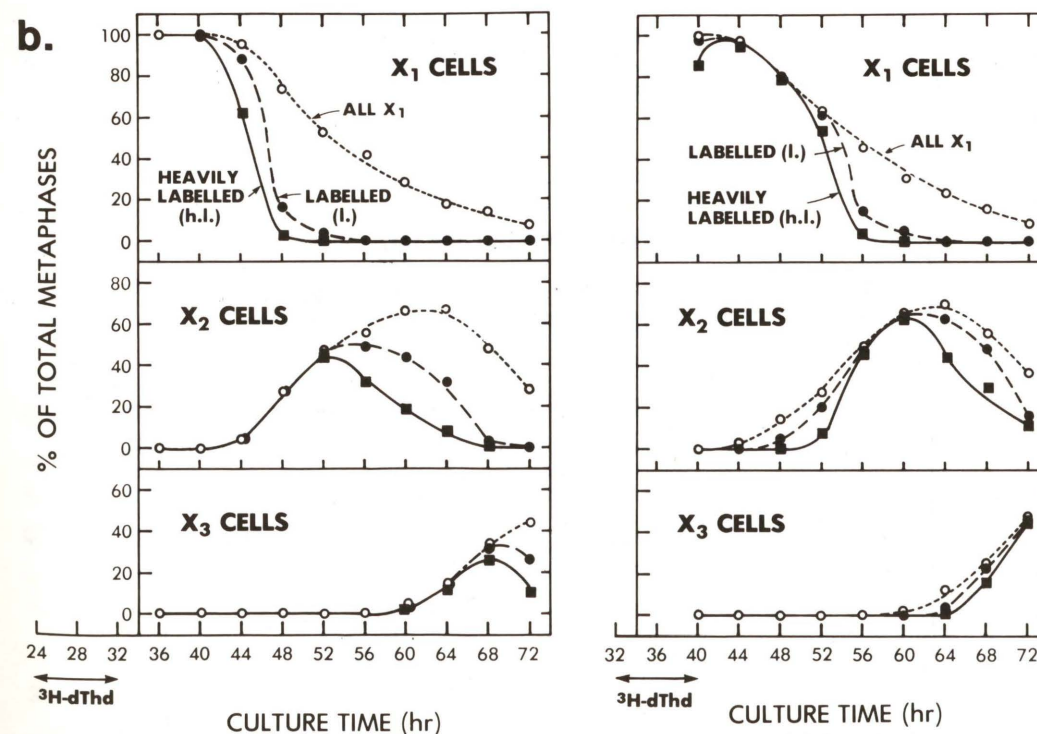


図5：トリチウムサイミジンパルスラベル後4時間毎の追跡によるヒトリンパ球分裂動態の解析 (実験方法等の詳細は文献3, 4を参照)



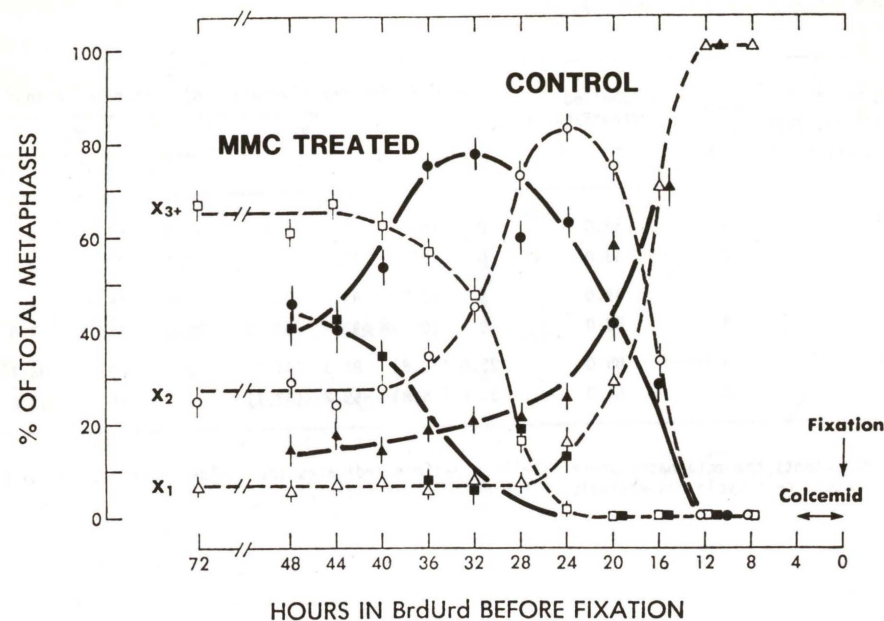


図6：ヒト抹消リンパ球にPHA添加培養開始後72時間培養を行い、培養終了前の異なる時間にBrdUrdを処理する方法で解析したヒトリンパ球世代時間の測定

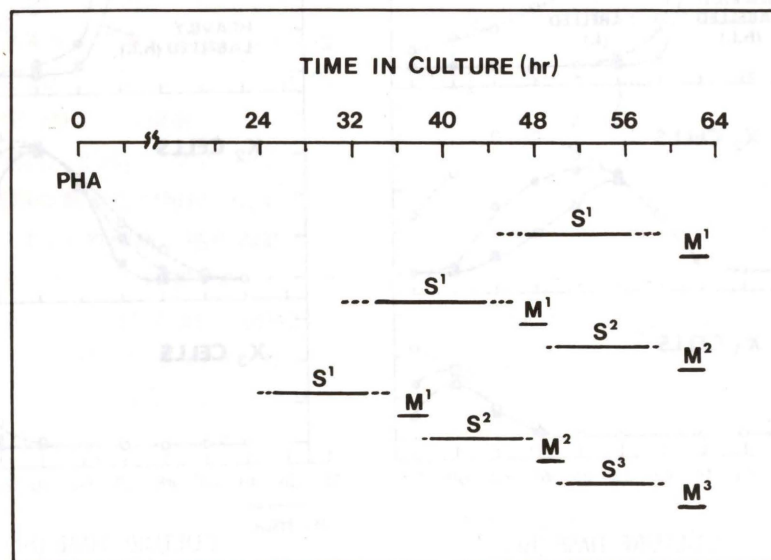


図7：ヒトリンパ球分裂動態

を用いたFPG染色—autoradiography 同時分析法により、例えば64時間培養後のリンパ球について、それを第1回目( $X_1$ )、第2回目( $X_2$ )、或は第3回目以降( $X_{3+}$ )の分裂期にある細胞がそれぞれいつ最初のDNA合成を開始したかを検討したところ、表1に示すように $X_{3+}$ 細胞はPHA添加後早期に、一方、 $X_1$ 細胞はPHA添加後比較的遅く最初のDNA合成を開始した細胞集団であることが明らかとなった。これらの事実は既に述べたごとく、リンパ球培養における heterogeneity が主としてPHA添加後DNA合成を開始するまでの時間の違いに由来することを強く示唆している。更に、PHA添加後24~32時間、或は32~40時間の間に最初のDNA合成を開始したリンパ球について $X_1 \sim X_{3+}$ の細胞毎にそのラベリング指数から一代時間を求めたところ、およそ12~14時間の世代時間が観察された(図5)。即ちリンパ球は、PHA添加後早期に細胞分裂周期にはいるものも、又、比較的遅く細胞周期にはいるものも同様に12~14時間の世代時間を持っているものと考えられる。更に、これを確認するために72時間培養の固定前、異なる時間にBUdRを添加した細胞について $X_1 \sim X_{3+}$ 細胞の割合を観察したところ、約12時間の世代時間により細胞が分裂を行っていることが明らかとなった(図6)。即ち、PHA添加培養によるヒトリンパ球の分裂動態は、図5に示すように、PHA添加後早期にDNA合成を開始するものは24時間ごろから、又、遅い集団では数日後に最初のDNA合成を開始するものとみられるが、何れも一旦細胞周期に入っ後は、12~14時間の一代時間で何回かの細胞分裂を繰り返すものと考えられる(図7)。

#### 2-5 PHA反応時間の heterogeneity<sup>18)</sup>

それでは、なぜこのようなPHAに対する反応の相違が生ずるのであろうか。この機作としては、大きく次のような2つの説明が可能である。1) リンパ球の平均寿命はおよそ3年と考えられている。即ち、あるリンパ球は流血中に放出され

たばかりであり、あるリンパ球は数年前より流血中に存在することになる。ところが流血中にあるリンパ球はいわゆる休止期( $G_0$ 期)にあり、この時間(流血中の年齢)が長くなればなるほど、細胞としての全体的な活性度が低下するものと考えられる。PHAを添加後のリンパ球については、様々な細胞活性の上昇が観察されるが、いわゆる血液中での年齢の高い細胞では細胞分裂に必要な細胞の活性を獲得するまでに、若い細胞に比べより長い時間が必要である。つまり、PHA添加培養後比較的早期にDNA合成を開始する細胞は血液中での年齢が比較的若い細胞群であり、比較的遅くDNA合成を開始する細胞群は年齢の高い細胞群であると考えられる<sup>18)</sup>。

2) PHAに反応するリンパ球は免疫学的にいくつかのサブグループに分類される。たとえば、直接的にPHAに対するレセプターを細胞膜に保有しているのはTリンパ球(厳密にはTリンパ球中にあるサブグループ)と考えられているが、これらのTリンパ球がPHAに反応して細胞周期に入っ後は、種々の lymphokine を合成し細胞外に放出することが知られている。これらの lymphokine 類のあるものは非Tリンパ球の分裂を補助する作用もあることから、培養開始後かなり時間がたって後にDNA合成を開始するリンパ球中には非Tリンパ球等が含まれてくるものと考えられる。このようにPHAに対し直接・間接に反応し、免疫学的にいくつかのサブグループに分かれるリンパ球について、その反応の機作を考慮した場合、細胞分裂に入る時期がそれぞれ異なることが十分考えられる。

#### 2-6 baseline SCEの変動要因

培養法によるSCE頻度の相違として決定的なものは、いわゆる“micro”法か“macro”法かの相違である。前者は、採決後赤血球等を含む全血そのものを培養する方法であるが、後者は、一旦リンパ球のみをFicol-Paque等で分離して培養する方法である。BUdRの濃度を一定にしたばあい、optimalな培養条件では“macro”



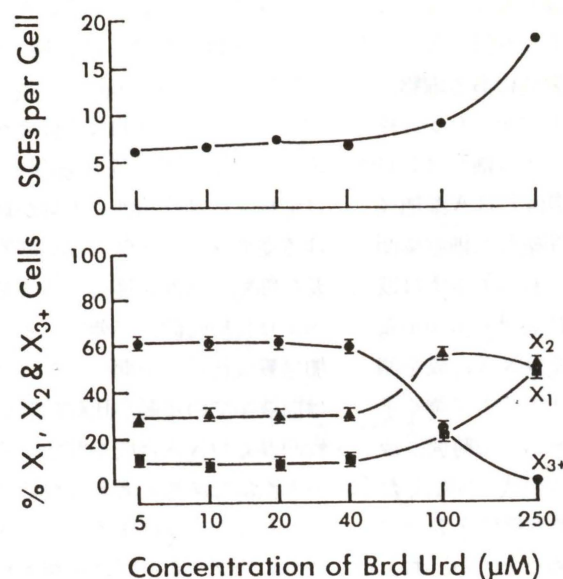


図8：異なる BrdUrd 処理をした際に生ずるリンパ球分裂の遅延と SCE baseline 頻度の上昇

法の SCE 頻度が“micro”法のそれと比し、20～30%高いことが知られており、cell-density の相違による BUdR の実行濃度の違いなどが原因として考えられているが、あまり詳細な検討は行われていない。

現在もっともよく用いられている培養液は、RPMI1640, MEM, Ham's F10, McCoy 5a, TC199 (109) などであるが、TC199 (109) 系を除いては増殖の程度は殆ど同じであり、他の培養条件を一定にした場合の SCE 頻度にはさほど大きな差は認められない（未発表資料）。しかし、細胞内部での実効 BUdR 濃度は個々の細胞内部での thymidine pool に大きく左右される。したがって、個々の培養液の持つ栄養条件が、リンパ球の pre-cursors pool に対し、どの程度の影響があるかを考慮する必要がある。また、予め thymidine を添加した培養液を用いる場合には、若干高めの BUdR 濃度を採用する必要がある。次に、リンパ球培養に最もよく用いられている RPMI1640 を用いて BUdR の濃度を変化させ、それによる baseline SCE 頻度と細胞分裂遅延への影響を観察したところ（図8）、BUdR 50

$\mu$ M 前後までは BUdR の濃度の上昇と共に SCE 頻度は徐々に上昇して行くが、BUdR 50  $\mu$ M 以上の濃度では、かなり急激な頻度の上昇が観察された。

リンパ球を賦活させる分裂促進剤としては、現在、PHA が多用されているが、PHA は直接的には T リンパ球を賦活するものの、数日後には T リンパ球により合成されるある種の lymphokine により、B リンパ球系も徐々に賦活され分裂サイクルに入ってくるものとの報告がある。

ところで、PHA 以外のレクチン類を用いた際に観察される baseline SCE 頻度はかなり変動する。この機作としては、例えば Santessen らによって最初に示されたように、B リンパ球系と T リンパ球系のみならず、T リンパ球系の中でも異なる T リンパ球賦活剤に反応するサブセットにおける baseline SCE 頻度の差異を反映していると考えられる。また、例えば、分裂促進剤を PHA と限った場合でも、その添加の濃度により SCE が変動する可能性、或いは、メーカーの異なる PHA を用いた場合に得られる baseline SCE 頻度の変動の可能性などが報告されている。

一般に、PHA 等の分裂促進剤を添加して培養開始後、リンパ球は24時間目以降順次最初の DNA 合成を開始するが、この間賦活化による細胞活性の上昇と共にいくつかの修復酵素の活性も上昇する。しかしながら、誘発された損傷が SCE として固定されるためには、その細胞が DNA 合成を行う必要があり、培養開始から最初の DNA 合成までの間に新たに合成された修復酵素による修復を受けた場合、SCE 誘発傷害が減少することも考えられる。培養開始後、ある細胞は24時間目ごろから、また、ある細胞は数日後から最初の DNA 合成を始めることが知られているが、これら比較的早期に DNA 合成を始める細胞は、末梢血中の「年齢」が若い“fresh”な細胞であり、比較的遅く DNA 合成を開始するものは年齢の高い細胞であると仮定すると、従来の知見がよく説明される場合が多い<sup>18)</sup>。従って、培養時間を変えることは、異なる細胞集団を sampling することになり、ほとんどの場合、培養時間を変えることにより baseline SCE 頻度が20～30%変動する。また、誘発傷害のある際には、この変動の幅はかなり大きなものになる可能性もある。

### 3 培養リンパ球における SCE の誘発

ヒト末梢リンパ球を化学物質で処理することにより SCE を誘発することが出来る。変異原物質により処理された細胞には様々なタイプの DNA 損傷が誘発されるが、それらのうちのあるものは SCE 誘発要因として作用する一方、また、有るものは細胞分裂の遅延作用を誘発する。一般に、SCE を誘発するような処理に対応して細胞分裂遅延も同時に生ずるものと考えてよい。ここではこれら細胞分裂の遅延が、観察される SCE 頻度に及ぼす影響を含め、ヒト末梢リンパ球培養法を用いた化学物質誘発 SCE の検出法について検討する。更に、in vitro で誘発された SCE 頻度を指標に、我々は種々の重要な環境変異原の影響評価をおこなってきた。ここでは数少ないヒトに対する発癌物質でありながらその染色体傷害並びに

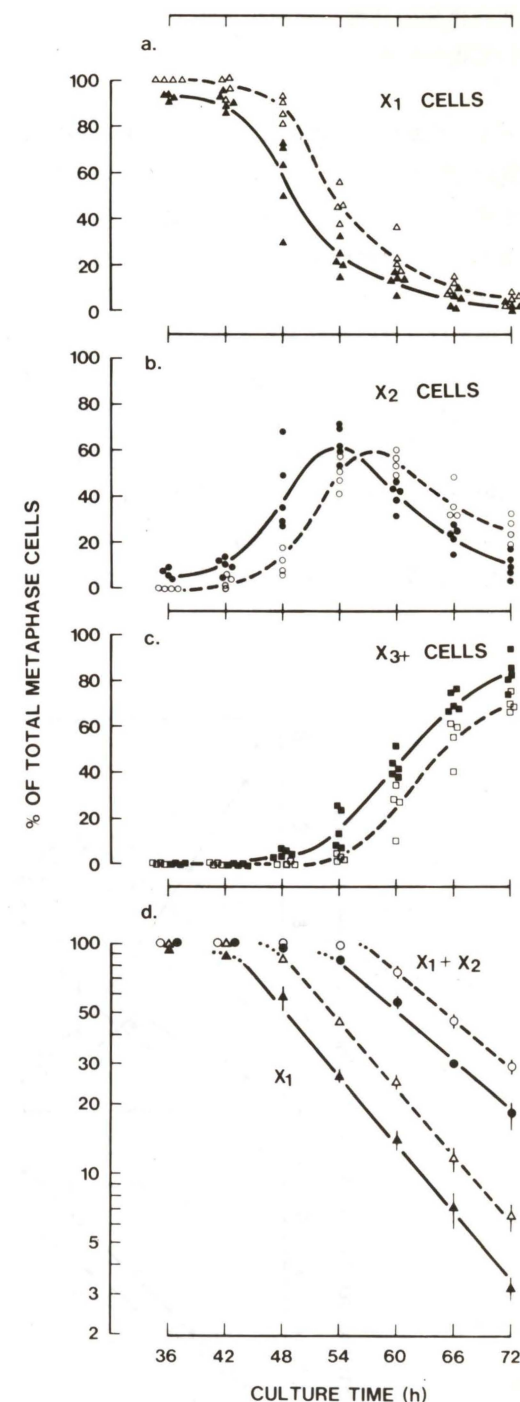


図9：Down 症患児由来リンパ球（実線）と対照正常児由来リンパ球（破線）のそれぞれにおける PHA 添加後の分裂動態。Down リンパ球が、正常児のそれに比して5～10時間速い分裂特性を示す。



白血病誘発の詳細な機構が不明である benzene について我々の研究成果を述べる。

### 3-1 化学物質処理とリンパ球分裂動態の遅延

既に述べたように、ヒト末梢リンパ球を PHA 等を添加して賦活化し培養した場合、培養24時間目頃より DNA 合成を開始する細胞が現れる。以後、経時的に DNA 合成を始める細胞が現れるため、例えば 72 時間培養した際には 1 回目、2 回目、或は 3 回目以降の分裂期にある細胞が混在することは既に述べた (図 1)。これら分裂回数の子となる細胞の相対的割合の変化から細胞分裂遅延の程度を定量的に測定することが出来る。そこでヒト末梢リンパ球を化学物質で処理した際生ずる細胞分裂遅延について、SCE 分染法を用い検討した。

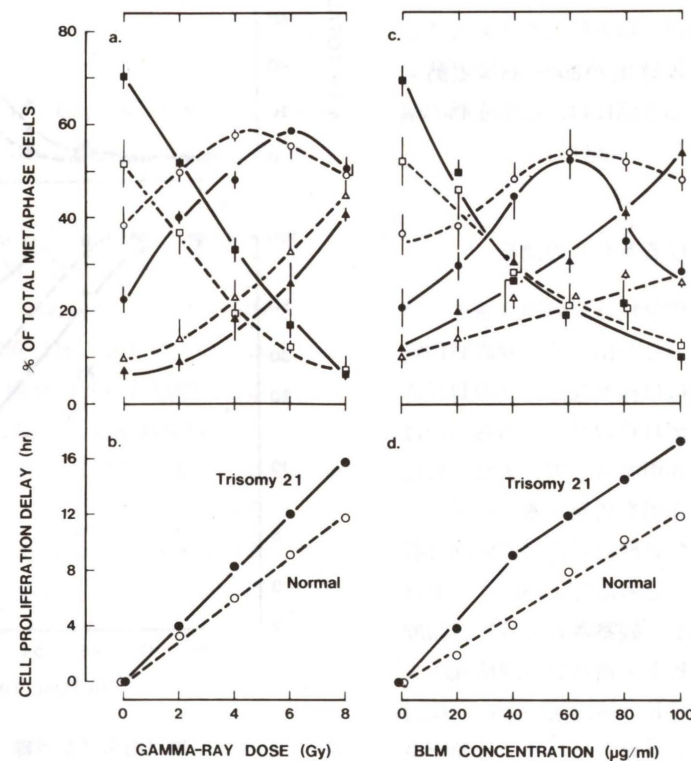


図10: Down リンパ球(実線)並びに対照正常リンパ球(破線)のそれぞれにおける  $\gamma$  線及び bleomycin 処理による分裂遅延時間の測定

ヒトリンパ球を72時間培養した際、Colcemid 添加・細胞固定前の異なる時間に BUdR を加え、視察される1回目 ( $X_1$ ), 2回目 ( $X_2$ ), 或は3回目以降 ( $X_{3+}$ ), の分裂期にある細胞の相対頻度を見た場合、図6の破線のごとくであるが、同様の培養に於いて PHA 添加前に MMC ( $3 \times 10^{-6}$  M, 1 時間処理) で処理した際に生ずる細胞分裂動態は、図6の実線のように観察される。即ち、無処理の場合には  $X_2$  の細胞のピークが24時間目の BUdR 添加時に見られるのに対し、MMC 処理群では  $X_2$  細胞のピークが36時間前後に観察される。即ち、1 回目の S 期の開始が、無処理群では培養開始後48時間目に、MMC 処理群では36時間目にある細胞が72時間培養の場合 sampling されている事を示している。更に、これら化学物質処理による細胞分裂の遅延を

定量的に扱うための手法についてのべる。正常児と、放射線に対し高感受性を示すことが知られている Down 症 (Trisomy 21) 患児とから採血したリンパ球を培養し、経時的に  $X_1 \sim X_{3+}$  細胞の相対頻度を観察すると図9のようになる。一方、これらの66時間培養時において、放射線に類似して DNA 鎖の切断を生ぜしめる化学物質であるブレオマイシン (BLM) を異なる濃度で添加し、66時間目にみられる  $X_1 \sim X_{3+}$  細胞の相対的な頻度を見てみると図10のようになる。図10には、線量に応じて細胞分裂遅延の生ずることがよく知られている  $\gamma$  線のデータも同様に示してある。たとえばこの  $\gamma$  線のデータで 6 Gy (600 rads) 照射時、Down 症患児細胞の場合、25%の  $X_1$ , 59%の  $X_2$ , 16%の  $X_{3+}$  細胞が観察されるが、この相対頻度は、非照射の Down 細胞に於いて54時間目にみられる頻度と合致する (図9)。また、同様の  $\gamma$  線照射は正常細胞に於いて33%の  $X_1$ , 55%の  $X_2$ , 12%の  $X_{3+}$  細胞を生ぜしめ、この頻度は非照射群において57時間目に観察されるものと同一である。従って、6 Gy の  $\gamma$  線照射は Down 症細胞においては12時間の、正常細胞においては9時間の delay を誘発するものと解釈される。同様の方法でこれらブレオマイシン及び  $\gamma$  線の各線量において遅延時間を測定したのが図10に示してある。これらの研究は、SCE 観察用に用いられる姉妹染色分体分染法を利用して細胞分裂動態を正確に測定することの出来る手法として新たに注目されている。

### 3-2 分裂遅延の SCE 頻度への影響

前述したように、通常、化学物質処理により SCE のみならず細胞分裂の遅延が生ずる。この事実は、もし、化学物質処理と培養時間を一定にしたばあい、処理量に応じ、細胞分裂の遅延が生じることから、異なる subpopulation を sampling していることを強く示唆している。そこでまず、培養開始後24時間目に MMC で pulse 処理し、その後、44~88時間の培養を行い第2回目の分裂期の細胞における SCE 頻度を検討したとこ

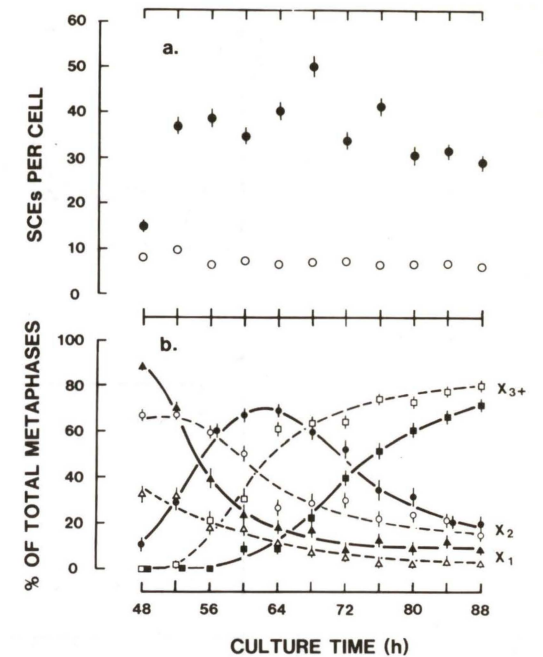


図11: Mitomycin 処理後異なる培養時間におけるリンパ球分裂動態と誘発 SCE 頻度の変化

ろ、図11に示すごとく、68時間培養でもっとも高い SCE 頻度が得られ、その前後の培養時間ではかなり低い平均 SCE 頻度を示す subpopulation を sampling している事が明かとなった。一般に同一の処理を行った場合でも個々の細胞における傷害量は均一ではなく、何らかの分布を示すものと考えられる。又、MMC で誘発される様々な傷害のうち、SCE に至る傷害と細胞分裂遅延に至る傷害とはかなり共通していると考えられるが、このことは、比較的に大きな傷害量を受け高い SCE 頻度を示す集団は、より長い細胞分裂遅延を示すことから理解される (図12)。従って、培養時間を長く取れば取るほど高い SCE 頻度を持つ細胞集団が sampling されることとなる。一方、培養時間を長くした際には MMC 処理後より長い時間  $G_0/G_1$  期にあり、傷害を修復する余裕を持つ細胞が第2回目の分裂期にある細胞として観察され始めるために、上で示した実験では70時間前後に SCE 頻度のピークが現れるものと考えられる。例えば、MMC や 4 N Q O を異な



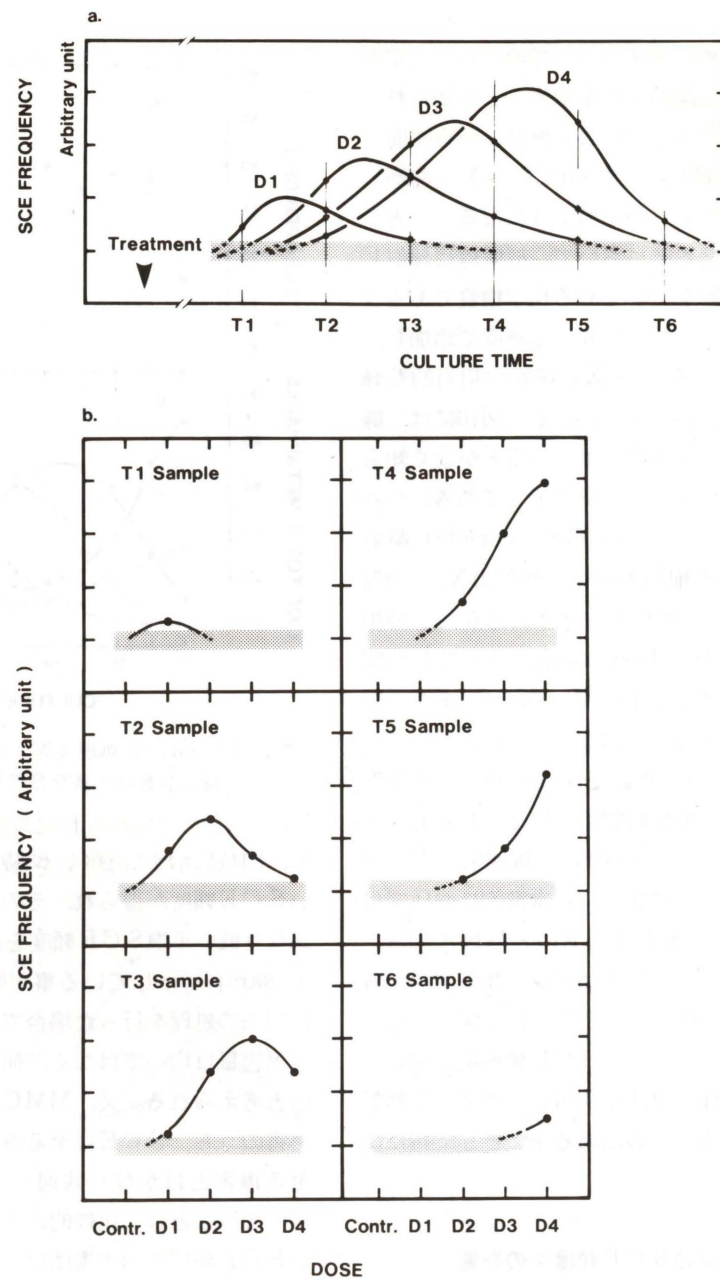


図12: muta-carcinogen 処理による培養時間 (sampling time) を変えた場合の dose-response curve の変化モデル図

る濃度で培養開始後24時間目に pulse 処理した際に得られる dose-response curve は図13のようであるが、この curve で特徴的なことは、かなり高い濃度（これらの濃度は同時に極めて長い細胞分裂の遅延を生ぜしめる濃度）で処理した際に誘発される頻度は正常な dose-response

curve よりもはずれ、むしろ、期待値よりも低くなる傾向を示す。これらは、細胞処理から sampling迄の時間を固定したために極めて高い濃度の化学物質処理によって生じる細胞分裂の遅延が長過ぎるため、高い SCE 頻度を持つ subpopulation がこれらの培養手法では sampling しきれないた

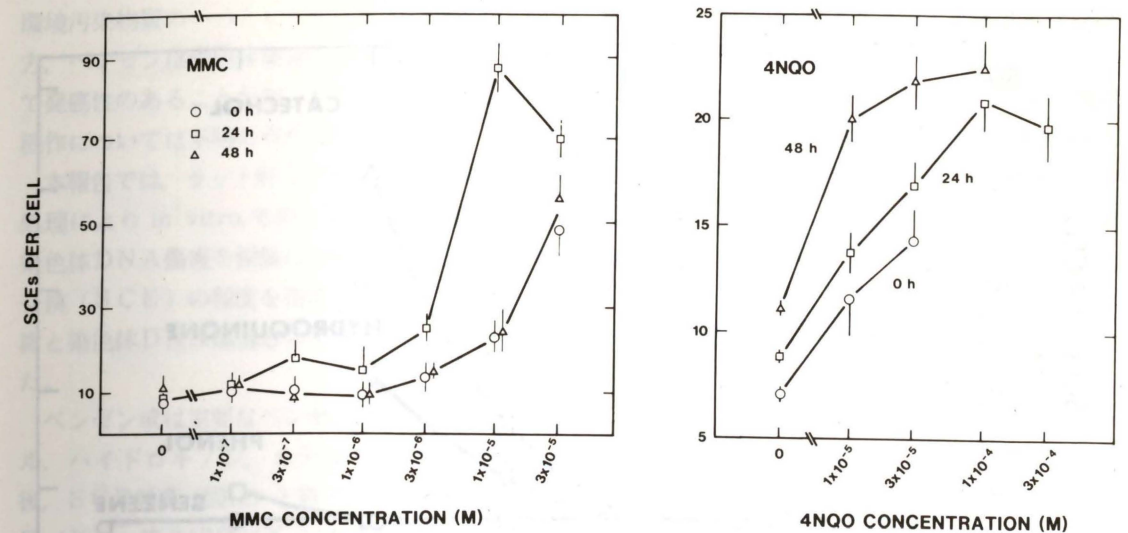


図13: Mitomycin-C 並びに 4NQO 処理（それぞれ1時間パルス処理）による dose-response curve

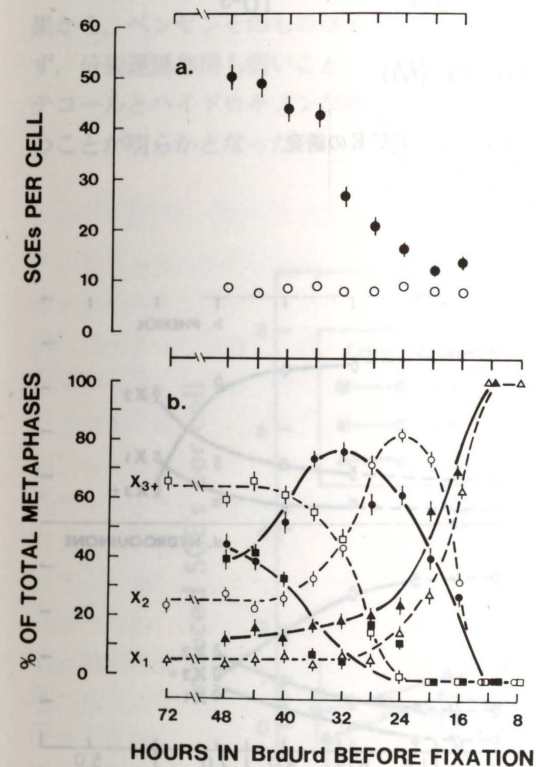


図14: ヒトリンパ球培養終了前、異なる時間BrdUrdを処理した際に観察される SCE 頻度の変化 (mitomycin-C 処理)

めと考えられる。ちなみに我々はより高い濃度（ $3 \times 10^{-5} M$ , 1時間処理）のMMCで処理した際、SCE頻度のピークは細胞分裂遅延がより強く生じるために84時間目に現れることを確認している。更にこれらの現象をより端的に観察するために、同様のMMC処理を行った後72時間培養した細胞について細胞固定（72時間）の前異なる時間BUDR処理を行ったところ図14の結果を得た。この図は、1) 1世代時間の短い細胞ほどSCE頻度が低い事を示すと共に、2) MMC処理後BUDRを添加するまでの時間、誘発傷害を修復するための時間、或いは、細胞分裂によって誘発傷害がdiluteする時間が長い細胞が混入してくるために、SCE頻度が低下する現象を現している。つまり、リンパ球培養のみならず、多く用いられている培養細胞において化学物質誘発SCE頻度を見る際、BUDRの処理時間も、観察されるSCE頻度に影響を及ぼす点に留意せねばならない。

### 3-3 ベンゼン代謝物によるヒト末梢リンパ球 SCEの誘発と細胞分裂阻害作用

ベンゼンは、工業的に多用される重要物質であり、又、ガソリン中に含まれていることなどから



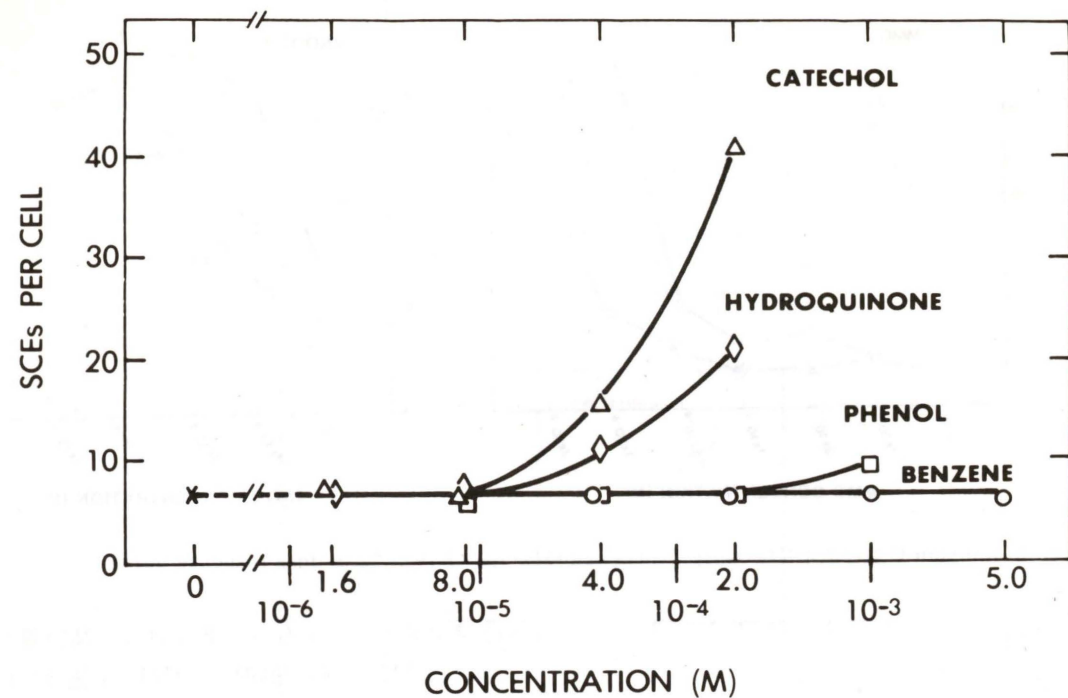


図15: Benzene 及びその代表的な代謝物による SCE の誘発

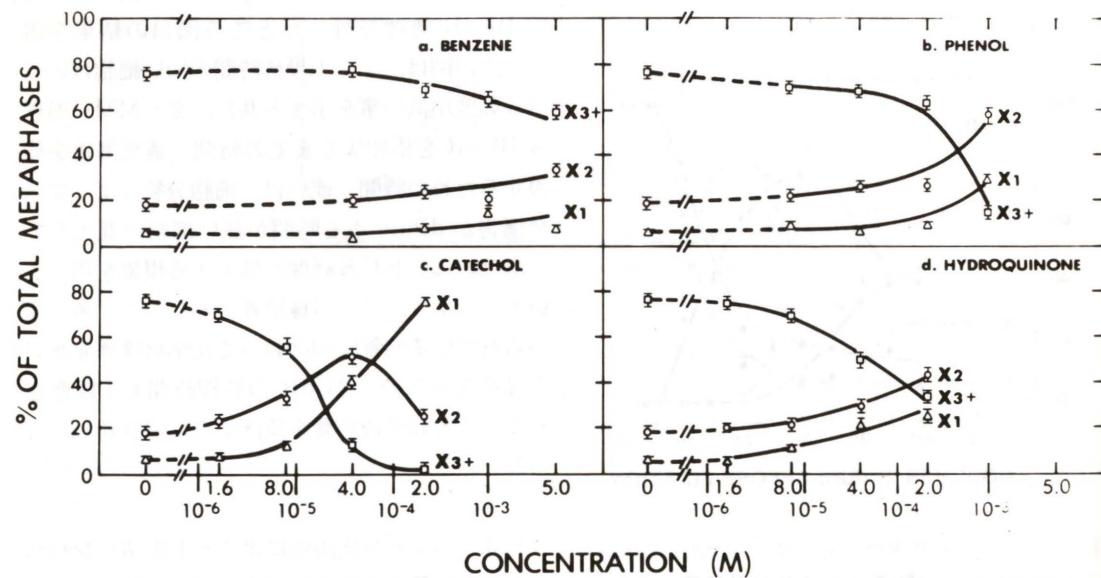


図16: Benzene とその代謝物によるヒトリンパ球分裂の遅延作用。

環境汚染物質の一つとしても注目されている。一方、ベンゼンは染色体傷害を誘発し、ヒトについて発癌性のあることが知られているが、その作用機作については不明の点が多い。

本報告では、ラット肝ミクロゾーム (S-9 Mix) 処理により in vitro でベンゼン代謝を実現し染色体DNA傷害を鋭敏に反映する姉妹染色分体交換 (SCE) の頻度を指標として、ベンゼン代謝と染色体DNA傷害との関連性について検討した。

ベンゼン或は主要なベンゼン代謝物 (フェノール、ハイドロキノン、カテコール) で処理した後、SCE頻度 (図15) と第1回目 ( $X_1$ )、第2回目 ( $X_2$ )、第3回目 ( $X_3$ ) の分裂期にある細胞の相対頻度を求めた (図16)。又、この図のデータから細胞分裂遅延時間を評価した。これらの結果から、ベンゼンそのものは全く SCE を誘発せず、分裂遅延作用も弱いこと、代謝物の中ではカテコールとハイドロキノンの極めて強い毒性を持つことが明らかとなった。

### 3-4 S-9 Mix によるベンゼン代謝と SCE, 分裂遅延の誘起

培養開始後40時間のリンパ球をベンゼン及び S-9 Mix で2時間処理し、全72時間培養後 SCE (図17) と分裂頻度 ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) (図18) を求めた。これらの結果から、S-9 Mix 10%添加時に、これらの作用が最も強いことが明らかとなった。また、ベンゼン+S-9 (10%) に GSH を加えた場合、3 mM GSH の添加で SCE はまったく誘発されなかった。

培養開始後異なる時間にベンゼン (5 mM) と S-9 Mix (10%) を2時間処理し、SCEを分析した。その結果、細胞がS期に入る直前に処理した場合 SCE はもっとも高く、培養開始直前の処理では全く上昇しなかった (図19)。この結果は、ベンゼン代謝物によって誘起されたDNA傷害は時間と共に修復される事を示唆している。

更に、ベンゼン代謝物と S-9 Mix による処理を行った場合 SCE をもっとも強く誘起する至適の S-9 Mix 濃度はカテコールがもっとも低く、

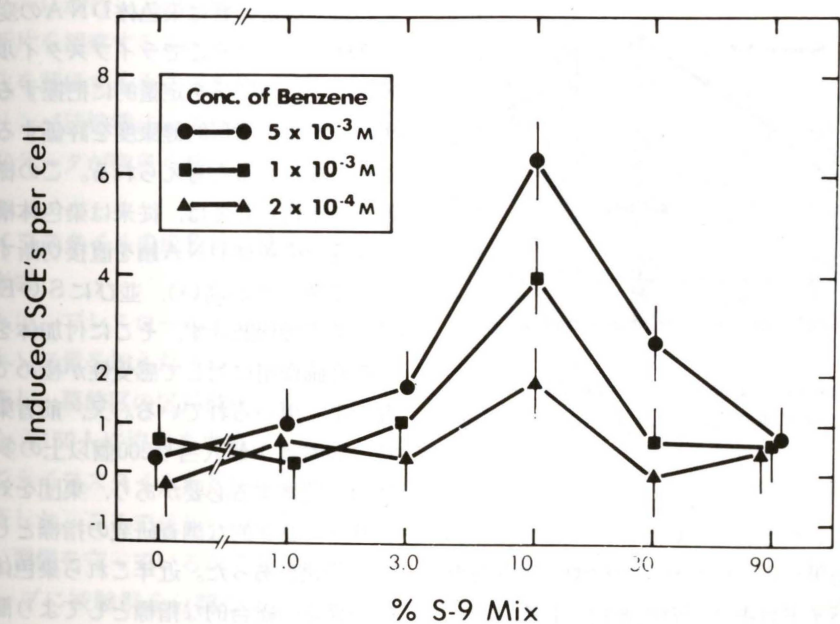


図17: Benzene と S-9 mix 処理による SCE の誘発



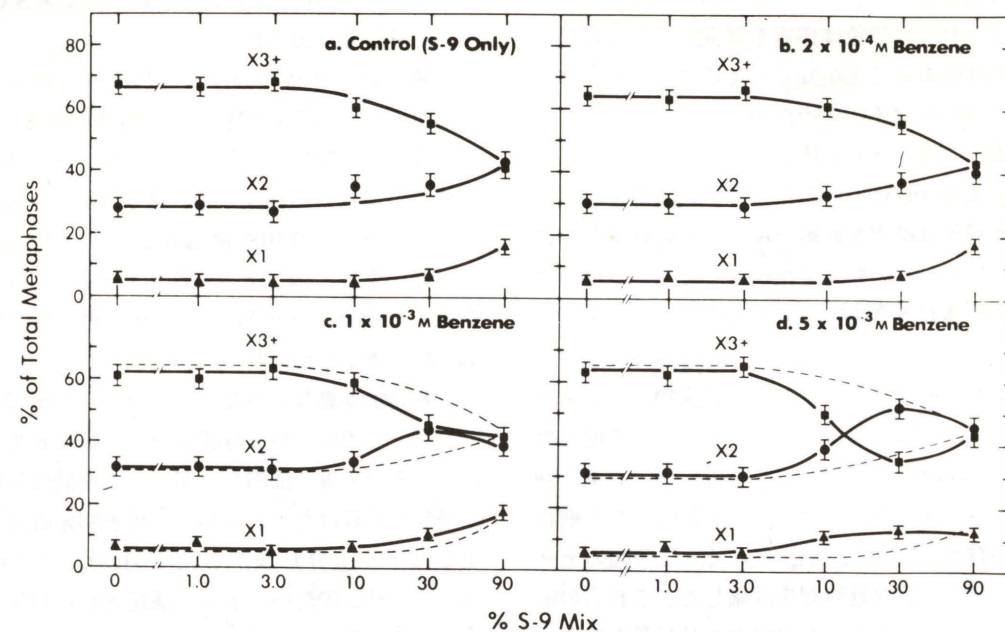


図18: Benzene と S-9 処理による細胞分裂遅延作用

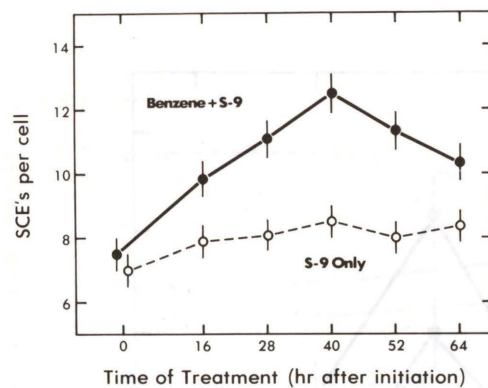


図19: Benzene+S-9 mix (10%, 2時間パルス処理)を異なる培養時間に行った際に生じるSCEの誘発

ハイドロキノンがそれについてだ。

これらの結果から、ベンゼンの代謝物のうちカテコールとハイドロキノンの代謝物(おそらくベンゾ(セミ)キノン類などのオキサイド)がDNA傷害を誘起する直接の物質と考えられる。

#### 4 リンパ球培養による human monitoring

発癌や遺伝影響は染色体DNAの変化と極めて関連性が深い。そこでライフスタイルと染色体DNAの変化の関係を定量的に把握することは、集団のレベルで遺伝的健康度を評価する良い科学的指標となりうると考えられる。このような染色体DNAの変化としては、従来は染色体構造異常(放射線等の染色体DNA鎖を直接切断するタイプに極めて感受性が高い)、並びにSCE(染色体DNAを直接切断せず、そこに付加体を結合、挿入する修飾作用に対して感受性が極めて高い)等が近年よく用いられている。又、前者染色体構造異常の観察は1個人当たり200個以上の多数の細胞を詳細に観察する必要がある、集団を対象としたスクリーニング的な調査研究の指標として経済性の点で問題があった。近年これら染色体構造異常と数値的異常の総合的な指標としてより簡便な小核法が提案されている<sup>13)</sup>。この小核法はなんらかの染色体変化を持った細胞が分裂する際に、切断や

表2 染色体の変異に関連する8つの生活習慣とライフスタイルの分類

8つの生活習慣を幾つ守っているかによりライフスタイルの良否を分類した。

#### 8つの健康習慣

- 1 喫煙
- 2 飲酒
- 3 朝食
- 4 睡眠時間
- 5 労働時間
- 6 身体運動、スポーツ
- 7 栄養摂取のバランス
- 8 自覚的ストレス量

8つの健康習慣のうち、幾つ守っているかによるライフスタイルの分類

守っている生活習慣数 ライフスタイル

1 - 4	不良
5, 6	中庸
7, 8	良好

不分離を起こした染色体を細胞質に残したまま次の分裂サイクルに進行して行くため、核外に染色性のDNA断片を観察することにより、間接的に染色体の変化を評価する手法である。又、点突然変異を末梢リンパ球培養法により評価する手法も近年実証的なデータが数多く発表されてきた。

#### 4-1 ライフスタイルの染色体のDNA (SCE) への影響

そこで我々は、ブレスローの7つの健康習慣に自覚的なストレス量を加えた8つの日常生活習慣について調査し、葛飾区の区民健康診査を受診した人々の中から150人に協力を求め、そのリンパ球を培養してライフスタイルとSCEの頻度との関連性を調査した。ここでは8つの生活習慣のうちいくつか良い習慣を守っているかで表2のごとく3つのグループに被験者を分類した。各々の分類、男女毎にbaseline SCE頻度と、発癌物質に対する感受性を検討する目的からDNA傷害性

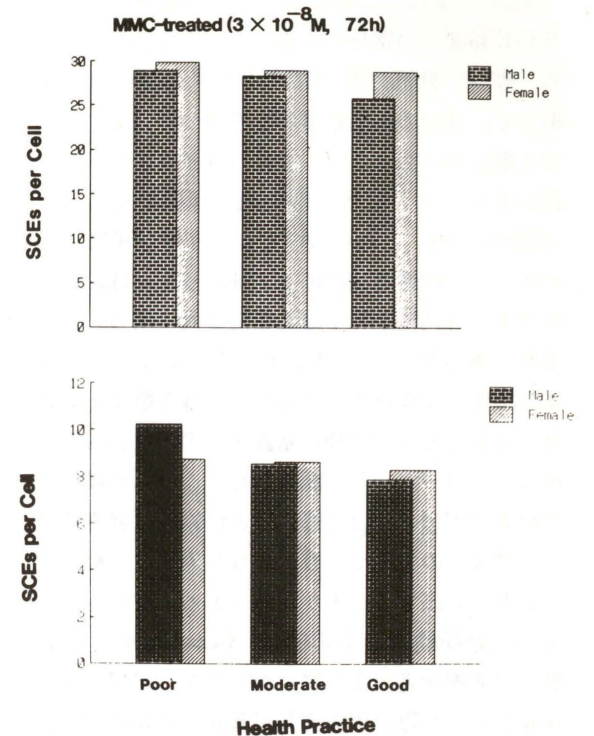


図20: 表2のライフスタイルの分類によるSCE baseline 頻度と mitomycin-C 誘発頻度との関連性

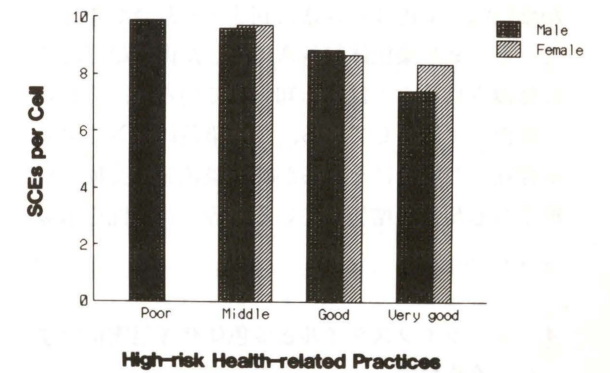


図21: 注目した3つの健康習慣を行っているか否かによるbaseline SCE頻度の有意な変化。

物質である mitomycin-C (MMC) の一定量 ( $3 \times 10^{-8} M$ , 72時間処理) による誘発SCE頻度を検討したところ、ライフスタイルの良好な群ほど有意にSCE頻度が低いことが明かとなった



(図20)。また、これら8つの生活習慣のうち、SCE頻度への寄与が大きい3つの生活習慣、即ち、喫煙、飲酒、並びにストレスの量の3つを取って、3つの生活習慣のうち幾つ守っているかで4群に分けたところ、やはりライフスタイルの良いものほどSCE頻度の低い傾向が見られた(図21)。尚、これらの中では、喫煙が単独でもその一日の喫煙本数に応じて抹消リンパ球のSCE頻度を有為上昇させる事実は既に報告したところであるが<sup>2, 14)</sup>、更に我々が、大学周辺の喫茶店で働く非喫煙者の抹消リンパ球を職業上も日常生活も殆どタバコ煙に暴露する事のない人達をコントロールとして調査した。これらの喫茶店では客の喫煙のたばこ煙に殆ど恒常的に暴露している環境での労働であり、かなり過酷な受動喫煙の影響を評価することが可能である。それらの結果、受動喫煙者の平均値は、baseline SCE頻度では非喫煙者のそれに近かったが、MMCを一定量負荷した際に生ずるSCE頻度は非喫煙者のそれよりも有意に高い事が明かとなった<sup>17)</sup>。これらの実験結果は、調査対象とした間接喫煙群の抹消リンパ球では非喫煙者のそれに比べて、1) 有害な発癌性物質が細胞外に存在した際、それらが細胞内の染色体DNAに到達する割合が増加している、2) 染色体DNAに生じた傷害は経時的に修復されることは良く知られているが、それらの修復能が低下している、3) 染色体DNA傷害が存在した場合にそれらが姉妹染色分体交換に転換される割合が増加している、等の可能性を示唆している。

#### 4-2 ライフスタイルと染色体修復阻害に対する感受性

次に染色体の構造異常を指標にしてライフスタイルの遺伝毒性的な影響を評価した。我々が取った方法は、放射線の一定線量(2Gy)により一定量の染色体DNAの切断を先ず生じさせる。これらの切断は各々のリンパ球中に存在する修復酵素により通常数十分以内に殆どが再結合して修復することが知られている。ところが、これらのうち

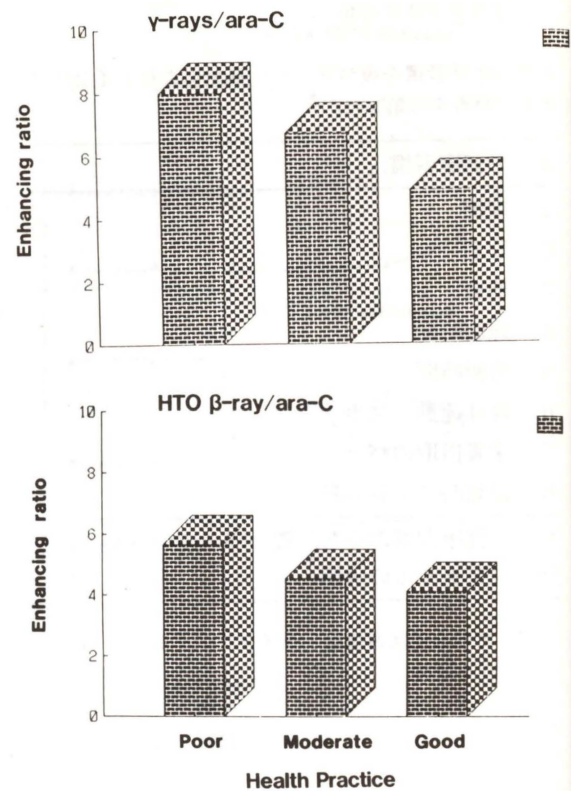


図22: ライフスタイルによる放射線誘発染色体傷害のara-Cによる修復阻害に対する感受性の影響

ある切断端は元の通りに再結合せず、誤って他の切断端と再結合した結果二動原体染色体や環状染色体が生ずることが良く知られている。一方、これらの染色体DNAの切断端の修復を阻害する物質としてcytosine arabinoside (ara-C) が良く知られている。そこで我々は一定線量でリンパ球を照射しながらara-Cで処理することにより、修復阻害に対する個々人のリンパ球の感受性を観察した。その結果、修復阻害剤であるara-C処理による染色体構造異常(二動原体染色体と環状染色体)の上昇比は驚くべき事にライフスタイルの悪い(表2に述べた健康習慣のうち、守っている数の少ないもの)ほどara-C処理による染色体構造異常頻度の上昇比が大きい傾向を示した(図22)。現在までのところ30名についての分析

結果であり、サンプルサイズが小さいことから統計的な有意性には至っていないが、目下対象者を増加して解析を継続しており、その結果が注目されるところである。

以上述べてきたように、我々の最近の知見は、胃癌や肺癌等と直接的な関わりの深い日常生活習慣が、発癌遺伝影響や加齢現象と極めて密接な関連にある染色体の変化とも定量的な関連性を持つことを示している。ただこれらは何れも集団の平均値であり、その集団の個々人のバラツキや変化はかなり大きく、その個人間のバラツキの多くは他のライフスタイル・環境要因と遺伝要因で説明可能と考えられるが、その実証的な研究はこれからの課題である。

#### 4-3 遺伝的な有害因子への適応現象

前節で述べたように染色体DNAに生じた変化は通常修復酵素によるほぼ完全に修復される。これら修復酵素の量(いわゆるpool size)は、通常一定であるが、ごく微量の遺伝的な有害因子に長期間暴露し続けた細胞では、そうでない場合に比べてこれら修復に関与する酵素群のpool sizeが増加しているのではないかと解釈できる研究が近年盛んである。例えばCalifornia大学のWolff教授はごく微量の放射線に長時間暴露した場合の細胞では、次に高線量のX線により誘発される染色体構造異常頻度が、低線量事前暴露のない場合に比べ有意に低い結果を報告して注目された。もし、この報告があまねく事実であるならば、ごく微量の有害因子に暴露し続けた人ほど有害因子に対して抵抗性が増すことを意味している。ライフスタイルの影響の特徴の一つに、ごく少量(少量)かつ長期間の暴露が挙げられる。この事実から、ライフスタイル(環境)と遺伝的健康度の関連性を探る際、これらの適応現象をどのように評価するかは重要な課題である。そこで我々は、ヒト抹消リンパ球を用いてごく少量の発癌性物質(Methyl-nitro nitrosoguanidine; MNNG)を長時間暴露させ、次に大量のMNNGにより多量のDNA傷害を人為的に誘発してそれらによる

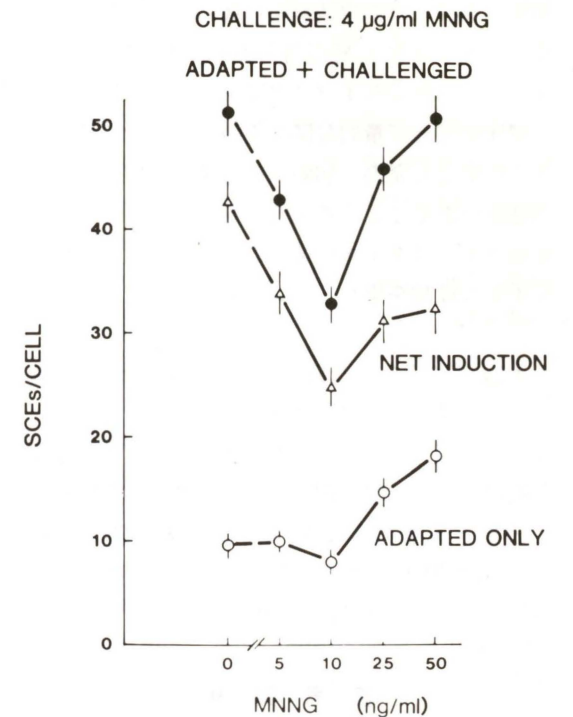


図23: ごく低濃度のMNNG 3日間連続処理による細胞性適応型修復能の誘導

SCEの誘発頻度を比較した。その結果、血液提供者として用いた5人を集団としてみた際には明らかにごく低濃度(10ng/ml)のMNNGの3日間連続投与によりMNNG誘発SCEに対する感受性の低下が観察されたが、これらの内の4人を個々にみても同様の場合(図23)、10ng/mlの低濃度長期暴露に対して適応を示す血液提供者と、殆ど適応を示さないものが存在する可能性が示唆された。これらは、適応能においても遺伝的なheterogeneityの存在を強く示唆しており、今後より多くの集団に対してこれら適応能の分布を観察する必要があるだろう。

次世代への影響を評価する際基礎的かつ包括的な指標と考えられる染色体DNAの変化とライフスタイルの関連性について我々の最近の知見を中心に解説した。とくに注目すべきは、いわゆる健康習慣としてライフスタイルを見た場合に、ライフスタイルの良い集団ほど染色体の変化(SCE



頻度、並びに放射線誘発染色体DNA切断の修復阻害作用に対する感受性)が低い傾向が明かとなった。これらライフスタイルが発癌を初めとした健康破綻と定量的な関係を持ち、かつ染色体DNAの変化も発癌、加齢、或は遺伝影響と密接な関連性のあることを考え合わせると、これらの知見はライフスタイルが遺伝的な健康に対して極めて重要な役割を果たしているものと解釈できる。

本論文に紹介した研究は、文部省科学研究費(一般研究B)「生活様態が染色体傷害並びにQuality of Lifeに及ぼす影響に関する公衆衛生学的研究」、日産財団奨励賞研究費「有害環境因子の複合影響の定量的解析と機構に関する研究」、及び厚生省癌研究費「がん一次予防に関する疫学的研究」、の援助を得て行った。

#### 参 考 文 献

- 1) R. Tice and A. Hollaender, B. Lambert and K. Morimoto (1984) Sister Chromatid Exchanges, Plenum Press, New York.
- 2) R. Tice and K. Morimoto (1984) A review of the international symposium on sister chromatid exchanges: Twenty-five years of experimental research, Environ. Mutagenesis 6 : 737-752.
- 3) Morimoto, K., and S. Wolff (1980) Cell cycle kinetics in human lymphocyte cultures, Nature 288 : 604-606.
- 4) Morimoto, K., et al. (1983) Proliferative kinetics of human lymphocytes in culture measured by autoradiography and sister chromatid differential staining, Exp. Cell Res. 145 : 349-356.
- 5) Morimoto, K. (1984) Proliferative kinetics and chemical-induced sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures, In : R. Tice and A. Hollaender (eds.), B. Lambert and K. Morimoto (assoc. eds.) Sister Chromatid Exchanges, Plenum Press, New York, pp. 801-811.
- 6) Morimoto, K., et al. (1984) Rapid estimation of the duration of  $\gamma$ -ray-induced proliferation delay in human lymphocytes, Radioisotopes 33 : 21-25.
- 7) Morimoto, K., et al. (1985) Sister-chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in human lymphocyte cultures exposed to alkylating mutagens: Apparent deformity in dose response relationships, Mutation Res. 152 : 187-196.
- 8) Iijima, K., and K. Morimoto (1986) Cell-stage dependence of mutagen-induced sister-chromatid exchanges in human lymphocyte cultures, Mutation Res. 164 : 121-129.
- 9) Miura, K., and K. Morimoto (1986) Effects of temperature on chemically induced sister-chromatid exchange in human lymphocytes, Mutation Res. 174 : 15-20.
- 10) Morimoto, K., and S. Wolff (1980) Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites, Cancer Res. 40 : 1189-1193.
- 11) Morimoto, K. (1983) Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes by microsomal activation of benzene, Cancer Res. 43 : 1330-1334.
- 12) Morimoto, K., et al. (1983) Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes by microsomal activation of benzene metabolites, Mutation Res. 119 : 355-360.
- 13) Morimoto, K., and A. Koizumi (1983) Trihalomethanes induce sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro and mouse bone marrow cells in vivo, Environ. Res. 32 : 72-79.
- 14) Morimoto, K., and A. Koizumi (1981) Inhibition of repair of radiation-induced chromosome breaks: Effects of chromium trioxide on cultured human lymphocytes, Ind. Health 19 : 259-262.
- 15) Morimoto, K., et al. (1982) Selenite prevents the induction of sister-chromatid exchanges by methyl mercury and mercuric chloride in human whole-blood cultures, Mutation Res. 102 : 183-192.
- 16) Miura, K., and K. Morimoto (1983) Proliferative kinetics and mitomycin C-induced chromosome damage in Fanconi's anemia lymphocytes, Human Genet. 63 : 19-23.
- 17) Morimoto, K., et al. (1984) Human health situation and chromosome alterations: Sister chromatid exchange frequency in lymphocytes from passive smokers and patients with hereditary diseases, In : R. Tice and A. Hollaender (eds.), B. Lambert and K. Morimoto (assoc. eds.) Sister Chromatid Exchanges, Plenum Press, New York, pp. 801-811.
- 18) Morimoto, K., et al. (1984) Proliferative kinetics and chromosome damage in trisomy 21 lymphocyte cultures exposed to  $\gamma$ -rays and bleomycin, Cancer Res. 44 : 1499-1504.
- 19) Iijima, K., and K. Morimoto (1984) Bleomycin-induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in Down lymphocyte cultures, Human Genet. 66 : 57-61.
- 20) Morimoto, K., et al. (1986) Genotoxicity of diesel exhaust emissions in a battery of in-vitro short-term and in-vivo bioassays, In : N. Ishinishi et al. (eds.) Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust, Elsevier, Amsterdam, pp. 85-101.
- 21) Morimoto, K., et al. (1986) Adaptation-like response to the chemical induction of sister chromatid exchange in human lymphocytes, Human Genet. 73 : 81-85.



## Short-Term Mutagenicity Testing

### —Expectations and Frustrations

Claes Ramel

Institute of Genetic and Cellular Toxicology

Wallenberg Laboratory, University of Stockholm

Stockholm, Sweden

#### Summary

The concept of evolution and species formation has largely been founded on rare mutational events in combination with selection forces causing a gradual shift in gene frequencies. The mutations usually considered in this and many other biological contexts include point mutations, chromosomal aberrations and numerical deviations of chromosomes that is, "conventional" mutations. However the development of molecular genetics during the last decade casts some doubts whether this picture of evolutionary processes is sufficient. The recognition of various non coding DNA sequences and "parasitic" DNA, as well as a high degree of instability of certain sequences of DNA point to more dynamic properties of the genetic material than previously visualized. These properties also apply to tissues and cells during the process of tumour formation. The genetic alterations encountered in carcinogenicity indicate a genetic instability and a cascade of effects. Changes at the DNA level do not only comprise "conventional" point mutations and chromosomal aberrations but also other alterations such as gene amplification, transposition, genetic recombination and DNA methylation. Standard short-term assays are

not adapted to pick up this kind of genetic changes. Other problems in short-term testing for carcinogenicity concern the joint action of different endpoints in multistage carcinogenicity and synergistic effects involving for instance free radical formation and effects on the protection mechanisms against radicals. It is emphasized that future testing strategies have to take these facts into consideration, but also that the accumulated experience from short-term testing has to be used more efficiently by means of computer systems.

#### Introduction

The use of short term mutagenicity assays to detect carcinogenic chemicals is based on the correlation between mutagenicity and carcinogenicity. That there is a connection between cancer and somatic mutations has been suspected since several decades ago and gradually stronger and stronger support for that notion has been acquired through the years. It is, however, not until the last few years that a causal correlation between carcinogenicity and mutagenicity has been demonstrated primarily through the analyses of viral and cellular oncogenes. Although the theoretical foundation for the use of short-term mutagenicity tests should have been



strengthened by these results, the actual situation is by no means that simple. It is somewhat of a paradox that the application and interpretation of short-term mutagenicity tests in fact seem to be more confused than ever in spite of the overwhelming demonstrations that definable mutations constitute critical events in tumour development. Ten years ago studies of carcinogenic chemicals with Ames test showed a remarkable correlation between mutagenicity and carcinogenicity and they fed the hope that carcinogenic chemicals in the environment could be identified and even quantitatively evaluated by simple *in vitro* bacterial tests. Extending the data base to various groups of chemicals evidently has changed the picture and we now know that both false negative and false positive results are produced in bacterial and other short-term tests by certain categories of chemicals. This has been shown by Shelby and Stasiewicz (1984) and Zeiger and Tennant (1986) using recent data sets from animal cancer tests, comprising more random selection of chemicals than in many previous investigations. Presumably the selection of test chemicals in the beginning of the use of short-term tests was directed towards agents with the most clear cut and obvious carcinogenic effects and with a pronounced ability to perform all the steps necessary to transfer normal cells to tumour cells, that is to function as complete carcinogens. However, considering the complex sequence of events leading to tumours it is hardly unexpected that carcinogenic chemicals may act at other levels than mutations and also the reverse that mutagenic effects in short-term tests do not always reflect what happens *in vivo* during carcinogenesis.

But also at the genetic level the question is to what extent the standard short-term assays can reflect what actually occurs during cancer induction and tumour development. I will briefly express some concern in that respect. But I will start by giving some very general background of the problem.

#### Current concept of speciation and evolution

Up to about 1970 the conception of the biological world centered around the stability of the genetic material. The stability of DNA was the consequence of the semiconservative replication. The necessary instability of the system was provided by mutations as rare stochastic events and by recombination, through which the existing genetic variability was reshuffled between the generations. This emphasis on the genetic stability has also become the foundation for our present concept of evolution as a slow and gradual process with a high stability of species and populations. The basis for the concept of evolution in population biology has been the Hardy-Weinberg's law, which describes the frequency of different genotypes in a population. A deviation from the expected frequencies indicates the selection against some phenotype. In the extension of the Hardy-Weinberg law is the concept of species formation. The process of speciation in animals and plants has been dealt with by a long series of outstanding biologists and geneticists. Fisher (1930), Haldane (1932) and Huxley (1943) provided the theoretical groundwork and their ideas lead to syntheses of speciation processes, from a genetic point of view by Dobzhansky (1937), in animals by Mayr (1942), in plants by Stebbins (1950) and in paleontology by Simpson (1944). They all came to the

conclusion that the formation of new species requires a first step, the formation of isolated populations. In these isolated populations the genetic selection and adaptation will cause a gradual genetic separation over subspecies to new species. The normal way for a separation of populations and speciation is through geographical barriers—a so called allopatric speciation. The opposite possibility of a speciation within the same geographic area, sympatric speciation, has been considered at most as rare exceptions for instance through the formation of polyploids in plants.

The fundament of evolution as the result of these kinds of conventional and rare mutations is reflected in all kinds of biological connections. In fact it is also evident in our interpretation of carcinogenicity and our use of short-term assays. We base the testing procedure on what we could call conventional mutations that is point mutations (base substitutions, shifts), chromosome aberrations (translocations, inversions, deletions) and numerical chromosome changes.

All these mutagenic changes have empirically well defined frequencies—apart from occasional hot and cold spots. Under normal circumstances they all are rare events both spontaneously and induced.

#### New trends in the concept of evolution

The general picture of evolution, which has emerged since the 1930ies and 1940ies is thus based on the occurrence of rare mutations and a gradual change in gene frequencies by means of appropriate selection forces. In the light of recent development in molecular genetics it is however quite doubtful whether this concept of evolution gives the entire

truth and to what extent it reflects what happens at the level of somatic tissues as well, which is of more immediate interest in the present context. I will elaborate somewhat on that theme.

I should emphasize that the present concept of speciation has been preceded by many controversial discussions. For instance Goldschmidt (1940) in United States maintained at an early stage that a new species can be formed in one step through drastic mutations, acting early in the development of the organism. One obvious problem with that idea was the fact that the chance for two such mutations to occur at the same time in order to be propagated was minimal and Goldschmidt's idea was more or less shelved as the hypothesis of "lonely monsters". At a more subtle level the concept of random establishment of mutations through genetic drift in small populations and the importance of this in evolution (the "Sewall Wright effect") was worked out by Sewall Wright (1931) in the United States. These ideas were vigorously opposed by R.A. Fisher and E.B. Ford in England, who maintained that genetic selection is far too strong to allow any genetic drift to have any real importance in evolution. These controversial issues have again received a considerable current interest as a consequence of new findings in genetics and molecular biology and in particular the instability of DNA.

#### Instability of DNA

As I mentioned, up to around 1970 the genetic research had largely focused on the stability of the genetic material. At that time the interest was rather dramatically shifted to



the *instability* of the genetic material instead. The reason for that was the fact that many new discoveries indicated that DNA in fact was far more instable than one had thought.

Crick's "central dogma" (Crick 1958) that DNA was the obligatory origin of the genetic information turned out to be wrong. Through reverse transcriptase RNA could be transcribed into DNA. To begin with that system was only found in prokaryotes, but today it seems clear that reverse transcriptase occurs throughout the organism world. Another crucial discovery was the restriction enzymes, which cut up DNA at specific sites. Finally the system of transpositions and insertions of DNA element within species and perhaps to some extent also between species has been found in all kinds of organisms.

The dynamic nature of DNA has been indicated by various observations, which have lead to interesting questions, for instance:

Why have amphibians such as salamanders 20 times more DNA than man?

Why are large pieces of mRNA spliced away without any use?

Why does Man have hundreds of thousands of copies of the Alu DNA sequences?

In the last few years the instability of DNA has been brought up by Crick and others from an evolutionary point of view. They have suggested that natural selection does not only operate between populations, species and individuals, but also within the microcosm of the cell. Some DNA sequences replicate out of step and they get a selective advantage until the cell suffers from an addition of use-

less DNA and then selection stops the development. It seems that more and more evidence suggest that middle repetitive DNA behaves like this. This kind of DNA sequences have been named "Junk-DNA" or "Parasite-DNA". Against this concept of junk or parasite DNA it has been argued that these processes cost energy without any immediate profit. But as Jain in England has put it "Energy consumption has never been a big problem in evolution".

Now after this long introduction—what has all this to do with mutagenicity testing? I think there are many indications that genetic changes involved in carcinogenicity do not always fit the ordinary and traditional mutations that we are dealing with in mutational testing.

#### Activation of oncogenes

During the last few years our knowledge of the sequence of events leading to cancer has gone through a dramatic development. Specific viral and cellular oncogenes, which are involved in the transformation of normal cells to malignant cells have been recognized. This has opened up an entirely new approach to the study of the mechanism of tumour formation. It has been possible to link the formation of tumours to specific mutagenic events in oncogenes. The study of the gene products of oncogenes have revealed connections with growth factors or their receptors and they have also indicated their mode of action through kinase activity and specific amino acid phosphorylations.

The activation of oncogenes therefore constitutes somewhat of a key issue in the

discussions of the relationships between cancer and mutations. I will not have any time to dig into the complicated and fascinating story of oncogene activation, but I would like to focus the attention to some points of special relevance.

The mutagenic changes of oncogenes, which are involved in cancer induction have been shown to occur spontaneously, by viral insertion mechanism and by chemical and physical mutagens. There are two mechanisms for oncogene activation through mutational changes. One mechanism implies an altered gene product as illustrated by point mutations in the *ras* oncogenes. The other mechanism implies a change of transcription and expression of oncogenes, as exemplifies by the *myc* oncogenes. The *ras* and the *myc* oncogenes evidently fulfil different functions in tumorigenesis. Activated *ras* can be characterized as a transforming oncogene providing an altered growth control and *myc* as an immortalizing oncogene causing a continuous propagation of the cells. Each of the *ras* and *myc* oncogenes are insufficient to transform normal diploid cells, but it has been shown by Weinbergs' group (Land *et al.* 1983) that the combination of activated *ras* and *myc* gives rise to transformation of primary cell cultures in transfection assays. Dealing with transformation of diploid cells the *ras* function could be substituted by chemical carcinogen treatment (Newbold and Overell 1983) and the *myc* function by large T antigen from DNA virus (Ruley 1983).

The activation of oncogenes involves puzzling specificities. This is particularly evident with the *ras* oncogenes. It has been estimated that

between 10 and 30 per cent of human tumours contain mutations in one of the *ras*-genes (Bos *et al.* 1985). They all imply a change in the protein p21 through base substitutions in one of three amino acids, no 12, 13, or 61. In *in vitro* experiments mutations in amino acids 59 and 63 also cause transformation (Fasano *et al.* 1984). These mutations have never been observed in normal tissues. Zarble *et al.* (1985) reported that in 36 of 48 mammary tumours induced by MNU (N-methyl-N-nitrosourea) the same base substitution of G to A in codon 12 of Ha-*ras* was found. Bos *et al.* (1985) have presented another interesting example of specificity of the *ras* oncogenes. Five out of six myeloid leukaemic tumours in humans had a N-*ras* oncogene, which had a base substitution in codon 13 resulting in a change from glycine to either valine or aspartic acid.

Another remarkable case of specificity in oncogene activation has been provided by Guerrero *et al.* (1984a and b). They showed that in mouse lymphomas induced by MNU and 600 rad of gamma radiation different *ras* oncogenes were activated by the two treatments. MNU caused activation of N-*ras* and the radiation activation of Ki-*ras*. In three independent tumours induced by gamma radiation all had a base substitution from G to A in codon 12. This observation brings up the problem of mutation frequency of genes involved in carcinogenesis. Transformation to neoplastic cells seems to require at least two mutagenic events. With a dose of 600 rad a specific base substitution is statistically possible among the  $10^7$ - $10^8$  lymphocytes available in a mouse, but there is hardly any reasonable statistical chance for a



simultaneous induction of another mutation in the same cell. It can of course not be ruled out that the base substitutions of codon 12, which were observed in fact were preexisting mutations and the treatment caused another genetic lesion providing the immortalization step. However, the spontaneous frequency of cells with such an activated *ras* oncogene seems at least to be very small and can not easily account for a second induced mutation in the same cell in order to induce tumours. It seems that either activation of one oncogene in fact is sufficient to induce lymphomas or else we are not dealing with ordinary mutation frequencies and processes. I think that the induction of tumours by two or even more mutagenic events will meet statistical difficulties in many other cases.

#### Genetic alterations at later stages of tumorigenicity

The development of tumours is a multistep process and the relationship between mutagenicity and carcinogenicity is complicated by the fact that alterations of the genetic material during tumour formation is probably not restricted to the initiation step of cancer. In most cases it can be assumed that activated oncogenes act at an early stage of tumour development corresponding to initiation and this is also supported by experimental evidence. The role of oncogene activation at the initiation step in combination with promotion has been studied in two step mouse skin carcinogenicity by Balmain's group. Activated *ras* was introduced into the skin cells either by treatment with chemical mutagen (DMBA) or by exposure to retrovirus containing *v-ras*. Both treatments in combination with the promoting agent TPA gave rise to papillomas

and carcinomas (Quintanilla *et al.* 1986, Brown *et al.* 1986). However, there are also indications that oncogene activation occurs at later stages. For instance Albino *et al.* (1984) have showed that only one of five melanoma cell lines from independent metastatic foci in one patient contained an activated *ras* oncogene.

In contrast to initiation, promotion usually is thought of as an epigenetic event. However the work by Cerutti (Cerutti 1985) suggests that promoters also can act at the chromosome and DNA level by inducing oxidative burst through lipid peroxidation. Oxygen radicals are generated and a clastogenic factor is formed, which causes chromosome aberrations. It has furthermore been shown by Hennings *et al.* (1983). That conversion of benign papillomas to malignant carcinomas, which is a late event, is increased by mutagens but not by promoters.

Also progression of tumours involves various chromosomal and ploidy changes, which probably are important for the development of malignancy.

It appears as if the development of tumours involves a series of mutational changes, which may point to some kind of a cascade effect, which is triggered by an initial mutation, which controls further genetic alterations. Concerning the actual mutations involved in carcinogenesis, oncogene activation has been connected with a wide spectrum of mutational changes—base substitutions, translocations, deletion, insertions of viral DNA and gene amplifications. We can add to that the mechanism of making recessive genes homo-

zygous, which is involved in certain types of tumours such as retinoblastoma, which can be brought about by chromosome loss, deletions, nondisjunction, mitotic recombination, gene conversion or inactivation through translocation to an inactive X-chromosome (Murphree and Benedict 1984). Yuasa *et al.* (1986) have presented some interesting observations on colon carcinoma which may be of relevance in this connection. They found that the tumour had an activated *ras* oncogene, but beside that a homozygous mutation in another oncogene, *myb*. The normal tissue was heterozygous for the *myb* mutation and presumably the induction of the tumour was caused by *ras* mutation and some process, probably a recombination event, which made *myb* homozygous. One of the interesting conclusions, which can be drawn from that experiment is the fact that mechanisms to make genes homozygous, particularly recombination and gene conversion may play a much more important role in carcinogenesis than we have thought. The findings by Kinsella and Radman (1978) and Fahrig (1984) of a correlation between somatic recombination and promotion points in the same direction. This is a parameter, which therefore has to be taken into consideration in short-term testing. In general, it can be concluded at this stage that no genetic alterations can be considered irrelevant in carcinogenesis, which of course has to be taken into account in short-term testing for carcinogenicity.

#### "Unconventional" genetic alterations

This large variation of mutations, which can be involved in carcinogenicity of course makes the mutagenicity testing procedure difficult as no one assay system can pick up

this whole spectrum of mutations. But the mutations that one usually considers in short-term testing are anyway of more or less conventional types with reasonably predictable frequencies. We therefore have some idea of how to deal with them experimentally and that is what we try to do in our mutagenicity assay systems. But every now and then you come across both carcinogenic and other biological processes, which deviate from the standard pattern of mutations, particularly resulting in peculiar mutation frequencies. I have already mentioned the suspiciously high specificity and rate of oncogene mutations that one can anticipate in some experiments, which points to some kind of instability of the genetic material.

**1. Immunoglobulin genes and poly ADP-ribosylation.** A well known example of a natural but remarkable instability of DNA are immunoglobulin genes, where the DNA goes through spontaneous rearrangements to provide the necessary variability of the immune system. The immunoglobulin system is involved in the activation of some oncogenes, particularly the *myc* oncogenes in cancers of the blood. The expression of *myc* is altered in these tumours through translocations to immunoglobulin genes. Tsujimoto *et al.* (1985) have indicated that a translocation in B-lymphocytes was brought about by a mistake in the rejoining of DNA in one immunoglobulin gene, so segments from different chromosomes were put together. The frequent involvement of immunoglobulin genes in translocations presumably is not by chance.

There is an interesting parallel between the formation of antibodies through immuno-



globulin genes and differentiation. Data indicate that both are dependent on poly ADP-ribosylation (Johnstone and Williams 1982), which may lead to the speculation that differentiation also involves rearrangements of DNA. Furthermore inhibitors of poly ADP-ribosylation has been reported to also inhibit neoplastic transformation—in contrast to mutations, which tend to be increased by the same inhibitors of poly ADP-ribosylation (Kun *et al.* 1983, Borek *et al.* 1984). This suggests that neoplastic transformation is a process separate from ordinary mutations. This would explain the extremely high transformation frequencies sometimes reported, which do not seem to fit any mutation frequency. It might also explain the fact that human and rodent cells have fairly similar mutation rates, but only rodent cells exhibit any spontaneous neoplastic transformation, never human cells.

**2. Methylation.** Much data indicate that methylation of cytosine residues in DNA is involved in expression of genes and in differentiation. Differentiated and non dividing cells thus have a lower methylation of cytosine than dividing cells. It has also been shown that transformed cells are hypomethylated. Holliday has presented a model of differentiation, which implies that cell divisions are "counted" by methylation of cytosine in repeated sequences of DNA (Holliday and Pugh 1975). He has extended this model to cancer induction (Holliday 1979), suggesting that cancer is induced through loss of methylation of cytosine in DNA. Holliday has also maintained that this methylation may be crucial in ageing and he has worked out a tentative model for that (Holliday 1985).

These changes of DNA are not comparable to ordinary mutations, and Holliday has suggested a special name for them—epimutations.

**3. Transpositions.** I think it is important to realize that the formation of cancer very often implies a series of different genetic alterations. It looks as if a sudden general genetic instability was introduced and caused a self generating sequence of mutational events.

Such cascades of genetic alterations may lead the thought to the work by McClintock on maize. She maintained already 40 years ago that a genetic instability could be created by what she called genomic stress (for a review see McClintock 1984). Similar stress reactions have been observed in other organisms. Cullin observed for instance a large genetic variation in the offspring through stress situations in the plant Flax (Marx 1984). McClintock's observation of genetic instability induced by stress was particularly manifested by her remarkable recognition of transpositions or jumping genes almost 40 years ago.

I remember that Hermann Muller, when he visited our laboratory 1956, said he really did not understand what McClintock's reports on jumping genes was all about, but he added that he would not have bothered about it, if it had been somebody else than McClintock who had reported it. If McClintock had observed these strange jumping genes it must be correct—and indeed it was correct. Transpositions are widespread phenomena probably occurring in all organisms, but the

full significance is still far from clear. Detailed analyses of some genes in *Drosophila* have suggested that half of spontaneous mutations are not conventional mutations but due to insertion of DNA pieces. Curiously enough the first mutation described eighty years ago by Morgan in *Drosophila*, white eyes, has turned out not to be a mutation but an insertion of such a sequence. Several virus like insertion sequences have been recognized—the best studied is copia. These insertion DNA pieces can be responsible for the transpositions of larger segments of DNA. This was the case for a transposing segment, which was found by Dr. Gunnar Ising in Lund and myself twenty years ago, the so called transposing element, TE (reviewed by Ising and Ramel 1976). It is a large segment comprising at least two genes in the X chromosome, white and the neighboring gene roughsh. Ising has collected about 200 sites all over the genome where this transposing element has landed. It can take another gene with it when it jumps and thus transfer it to another place in the genome. Walter Gehring and coworkers (Gehring and Paro 1980, Paro *et al.* 1983) has made a series of interesting analyses of this transposing element and they have found that it is coupled to copia. In the present connection it is of interest that we have not been able to increase the transpositions of this element with any mutagens or carcinogens. The only slight indication of an induction of transpositions we got recently was with 3-aminobenzamide, which is an inhibitor of poly ADP-ribosylation (Magnusson and Ramel unpublished).

A particularly dramatic finding concerning transpositions in higher organisms is the p-

factor in *Drosophila*, which was analyzed by Rubin and Spradling in United States (Spradling and Rubin 1982, Rubin and Spradling 1982). In short this factor occurs in certain strains of *Drosophila* and presumably codes for a transposing enzyme, transposase. It can cause extremely high frequencies of mutation. Around 50% mutations of the gene singed has been recorded. The p-factor can be used experimentally to insert any DNA sequence in the germ line of *Drosophila*. It seems to cause a fairly random insertion in the genome. Up to recently the p-factor only acted on germ line cells—never on somatic cells. Rubin has, however, recently found that the elimination of an intron in the p-factor makes it work also in somatic cells (Laski *et al.* 1986, Rio *et al.* 1986). To my knowledge nobody had reported any attempts to use this newly constructed p-factor for somatic cells in other organisms than *Drosophila*. The exposure of organisms to foreign nucleic acids can lead to extremely high mutation frequencies in specific genes. This was found by Gershenson (1986) in U.S.S.R. He injected various DNA and RNA viruses in *Drosophila* and recorded an extreme increase in recessive lethal mutations in some loci. Thus DNA from a virus in crane flies, *Tipula*, caused an increase of mutations 10,000 times over the spontaneous rate. What all this may imply from other viewpoints such as cancer induction is of course too early to say.

**4. Amplifications.** The significance of transpositions and insertion elements in carcinogenicity is so far not known. However, it is not too daring to speculate that they probably are of importance. There is a connection be-



tween transpositions and another genetic phenomenon very much involved in at least oncogene activation and that is amplification of DNA. Amplification is one widespread cause of increased expression of oncogenes and it particularly is connected with activation of the group of oncogenes to which the *myc* genes belongs. However, it is very possible that amplification is a manifestation of a dynamic equilibrium of DNA. Amplification would be a much more efficient way to meet the immediate need of a high expression of certain genes than through "ordinary" mutations. It has been known since a long time that certain drugs, such as the cytostatic drug methotrexate, cause amplifications of DNA, observed as homogeneously stained regions or as free DNA episome-like pieces, double minutes (for a review see Hamlin *et al.* 1984). The exposure to metals such as Hg or Cd likewise causes amplification of the gene for metallothionein (for a review see Hamer 1986). In *Drosophila* it is a well known fact that the heterochromatic genes for r-RNA go through spontaneous amplifications. Repeated gene sequences seem to be involved in the regulation of gene expression in many cases. Flavell has stated that: "The combination of repeated sequences and all of the enzymes capable of responding to them are biological dynamite" (Marx 1984). Wahl *et al.* (1984) have studied the course of amplifications in cell cultures. They used the resistance to the drug PALA, which requires the amplification of the gene CAD, which is involved in the uridine biosynthesis. They transfected CAD into CHO cells, which are deficient for CAD. The CAD was incorporated in different places of the genome. They then selected for resistance to PALA

and found that the CAD went through amplification but there was a large variation between different transfectants, apparently depending on the chromatin structure, where the CAD sequence had been incorporated. In some cases there was an amplification *in situ* but in other cases the gene was amplified by transpositions to other places.

**5. Polygenes.** It is tempting to speculate that amplifications may be involved in some genetic alterations, which are not in accordance with usual mutation frequencies such as activation of some oncogenes. Perhaps this may also be the case with mutations in polygenes. Polygenic inheritance is responsible for quantitative characters such as viability, life length, fecundity, developmental time and probably also traits like intelligence and reaction speed that is, properties, which are of central importance in our lives. Such polygene mutations may in fact be far more important than mutations in the major genes, which we devote all our short-term testing to (Ramel 1983). Few organisms are suitable to study mutations in quantitative characters. *Drosophila* is one such organism and it has been found both by Mukai in Japan (see Mukai 1979) and by Crow in United States (see Simmons and Crow 1977) that polygenes do exhibit rather specific properties, which separate them from ordinary genes. They have about 25 times higher spontaneous mutation frequency than major genes, they often exhibit an overdominance as heterozygotes and they seem to have other unusual relations between expressions in homozygous and heterozygous form.

There are some interesting observations on

cancer induction through mutations in the germ line, which may be related to polygenic mutations. I am thinking particularly of Dr. Nomura's work. He reported 1982 and 1986 from large scale experiments that treatment of male mice with X rays and urethane gave an increased cancer incidence in the F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> offspring of such a high frequency that it can only be explained by one of three possibilities: a very large number of genetic sites being involved, a remarkably high mutation frequency or a mechanism other than conventional major mutations. It is tempting to compare this data with polygene mutations in *Drosophila*. If such polygenic systems in fact are involved in carcinogenesis our present battery of short-term test systems are not suitable to detect them.

#### Radical generation and synergistic effects

The most fatal carcinogen in our environment may well be oxygen. All aerobic organisms are exposed to reactive oxygen radicals and nature has developed a number of protection mechanisms against this. There is, however, always the risk that a depletion of such mechanisms may occur and that the protection becomes insufficient. I may mention one example of this. Dr. Agneta Rannug at our laboratory was investigating the mutagenicity in *Salmonella* of chemicals used in the rubber industry. One of the more potent ones turned out to be tetramethylthiuram disulfide (TMTD). Two observations were of interest in that connection. TMTD does not bind to DNA and the mutagenicity turned out to be dependent on the oxygen pressure. Now TMTD and similar compounds have a chelating property and apparently inactivates particularly superoxide dismutase, which is

one of the most important protective agents against oxygen damage. Evidently TMTD acts in an indirect way by interfering with the protection against oxygen radicals. This hypothesis was supported by the fact that TMTD showed a strong synergistic effect in *Salmonella* with menadione, which is a radical generating compound (Rannug and Rannug 1984). Later on *in vivo* tests on *Drosophila* also indicated a similar synergistic effect of TMTD.

Another indirect mutagenic effect involving oxygen radicals may occur with chemicals, which cause a proliferation of peroxisomes (for a review see Reddy and Lalwai 1983). These chemicals are notoriously negative in short-term tests but some may cause up to 100% liver cancer in experimental animals. Peroxisomes are organelles involved in lipid metabolism and they are induced to proliferate by certain chemicals, such as di-(2-ethylhexyl)phthalate and compounds used as hypolipidemic drugs, for instance clofibrate. This proliferation causes lipid peroxidation and the generation of radicals in liver cells and it is possible that the carcinogenic effect is connected with that.

The occurrence of indirect effects and combined effects like the examples with radical generating systems, implies a crucial problem in testing for mutagenicity and carcinogenicity. An obvious illustration of these problems refers to the fact tumour formation implies several steps and in many cases a combination of initiating and promoting agents is required to elicit a carcinogenic response. But there are also other examples of combined effects not easily foreseen and detected in



routin screening for mutagenicity and carcinogenicity. This applies for instance to the combined effects of virus and chemicals as mentioned. Another area, which may be of importance in that respect is the consequence of an imbalance of the nucleotide pool. Dr. Dag Jenssen at our laboratory studied the effect of hydroxyurea on mutations in the HPRT locus in V79 hamster cells (Jenssen 1986). Hydroxyurea acts as an inhibitor of the ribonucleotide reductase and causes an imbalance of the nucleotide pool. There was a pronounced synergistic effect with mutagenic agents and posttreatment with hydroxyurea. The imbalance of the nucleotide pool evidently causes an error in the incorporation of bases at DNA repair. A similar increase of mutations as with hydroxyurea was also obtained by cotreatment with thymidine. This kind of induced imbalance of the nucleotide pool may in fact be used in order to increase the sensitivity of mutagenicity tests with cell cultures.

#### Concluding remarks

In conclusion I would like to stress the following points:

1. Mutational changes are critical events in carcinogenicity.
2. All chemicals increasing cancer incidence do not necessarily have to act by means of genetic mechanisms, which can explain some discrepancies between mutagenicity and carcinogenicity data.
3. Although oncogene activations occur by definable mutagenic events, the process of tumour formation seems to involve a series of mutational changes, the background of which is not clear. A cascade of effects may be triggered by

an induced instability of the genome, related to genomic stress as described by McClintock.

4. DNA changes involved in carcinogenicity may not only comprise point mutations, chromosomal aberrations and numerical chromosomal changes, but also other genetic alterations and interactions, not easily detected in short-term tests:
  - a) Recombinogenic events.
  - b) Secondary effects of spontaneous DNA rearrangements in immunoglobulin and possibly also other genes during differentiation.
  - c) DNA methylation.
  - d) Transpositions.
  - e) Amplifications.
  - f) Polygene mutations.
  - g) Radical generation and depletion of antioxidants.
  - h) Combined effects of initiating and promoting agents.
  - i) Combined effects of chemicals and virus.

The solution of the present tendency of frustration in prediction of carcinogenic properties of chemicals is in my opinion by no means to get away from short-term tests. Instead we have to use the tools of modern molecular biology and genetics to better understand the process of cancer induction and to use appropriate short-term tests in accordance with these findings. It is also necessary to make a better use of the enormous experience of testing by building up computerized systems for prediction of carcinogenesis on the basis of that sort of data. An excellent example of that is provided by the two com-

puter programs developed by Rosenkranz and Klopman in U.S.A., "Computer Automated Structure Evaluation" (CASE) and "Carcinogenicity Prediction and Battery Selection" (CPBS) (Rosenkranz *et al.* 1985). These programs have already demonstrated their efficiency in this connection.

#### References

- Albino, A.P., Lestrangle, R., Oliff, A.I., Furth, M. and Old, L.J. Transforming *ras* genes from human melanoma. A manifestation of tumor heterogeneity. *Nature* 308 (1984) 69-72.
- Borek, C., Morgan, W.F., Ong, A. and Cleaver, J.E. Inhibition of malignant transformation *in vitro* by inhibitors of poly (ADP-ribose) synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 243-247.
- Bos, J.L., Toksoz, D., Marshall, C.J., Verlaan-de Vries, M., Veeneman, G.H., van der Eb, A.J., van Boom, J.H., Janssen, J.W. G. and Steenvoorden, A.C.M. Amino-acid substitutions at codon 13 of the *N-ras* oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature* 315 (1985) 726-730.
- Brown, K., Quintanilla, M., Ramsden, M., Kerr, I.B., Young, S. and Balmain, A. *V-ras* genes from Harvey and BALB murine sarcoma virus can act as initiators of two stage mouse skin carcinogenesis. *Cell* 46 (1986) 447-456.
- Cerutti, P.A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227 (1985) 375-381.
- Crick, F.H.C. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12 (1958) 138-163.
- Dobzhansky, T. Genetics and the origin of species. New York 1937.
- Fahrig, R. Genetic mode of action of cocarcinogens and tumor promoters in yeast and mice. *Mol. Gen. Genet.* 194 (1984) 7-14.
- Fasano, O., Aldrich, T., Tamanoi, F., Taparowsky, E., Furth, M. and Wigler, M. Analysis of the transforming potential of the human *H-ras* gene by random mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 4008-4012.
- Fisher, R.A. The genetic theory of natural selection. Oxford 1930.
- Fisher, R.A. and Ford, E.B. The spread of a gene in natural conditions in a colony of the moth *Panaxia dominula* L. *Heredity* 1 (1947) 143-174.
- Ford, E.B. Ecological Genetics. London 1964.
- Gehring, W. and Paro, R. Isolation of a hybrid plasmid with homologous sequences to a transposing element of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 19 (1980) 897-904.
- Gershenson, S.M. Viruses as mutagenic factors. *Mutation Res.* 167 (1986) 203-213.
- Goldschmidt, R. The material basis of evolution. New Haven 1940.
- Guerrero, I.A., Calzada, P., Mayer, A. and Pellicer, A. A molecular approach to



leukemogenesis: Mouse lymphomas contain an activated *c-ras* oncogene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984b) 202-205.

Guerrero, I. A., Villasante, A., Corces, V. and Pellicer, A. Activation of a *c-K-ras* oncogene by somatic mutation in mouse lymphomas induced by gamma radiation. Science 225 (1984a) 1159-1162.

Haldane, J. B. S. The causes of evolution. London 1932.

Hamer, D. H. Metallothionein. Ann. Rev. Biochem. 55 (1986) 913-951.

Hamlin, J. L., Milbrandt, J. D., Heintz, N. H. and Azizkhan J. C. DNA sequence amplification in mammalian cells. Int. Rev. of Cytology 90 (1984) 31-82.

Hennings, H., Shores, R., Wenk, M. L., Spangler, E. F., Tarone, R. and Yuspa, S. H. Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by human initiators and unaffected by tumour promoters. Nature 304 (1983) 67-69.

Holliday, R. A new theory of carcinogenesis. Br. J. Cancer 40 (1979) 513-522.

Holliday, R. The significance of DNA methylation. In: Woodhead, A. D., Blackett, A. D. and Hollaender, A. (Eds.). Molecular Biology of Ageing. Plenum, New York (1985) 269-283.

Holliday, R. and Pugh, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during the development. Science 187 (1975) 226-232.

Huxley, J. Evolution. The modern synthesis. New York 1943.

Ising, G. and Ramel C. The behaviour of a transposing element in *Drosophila melanogaster*. In Ashburner, M. and Novotski, E. (Eds.): The Genetics and Biology of *Drosophila*, New York, Vol. 1b (1976) 947-954.

Jenssen, D. Enhanced mutagenicity of low doses of alkylating agents and UV-light by inhibition of ribonucleotide reductase. In: Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Genetic Toxicology of Environmental Chemicals. Part A. Basic Principles and Mechanisms of Action (1986) 541-549.

Johnstone, A. P. and Williams, G. T. Role of DNA breaks and ADP-ribosyl transferase activity in eukaryotic differentiation demonstrated in human lymphocytes. Nature 300 (1982) 368-370.

Kinsella, A. R. and Radman, M. Tumor promoter induces sister chromatid exchanges: Relevance to the mechanism of carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 (1978) 6149-6153.

Kun, E., Kirsten, E., Milo, G. E., Kurian, P. and Kumari, H. L. Cell cycle dependent intervention by benzamide of carcinogen-induced neoplastic transformation and in-vitro poly(ADP ribosylation) of nuclear proteins in human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 7219-7223.

Land, M., Parada, L. F. and Weinberg, R. A. Tumorigenic conversion of primary

embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature 304 (1983) 596-602.

Laski, F. A., Rio, D. C. and Rubin, G. M. Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. Cell 44 (1986) 7-19.

Marx, J. L. Instability in plants and the ghost of Lamarck. Science 224 (1984) 1415-1416.

Mayr, E. Systematics and the origin of species. New York 1942.

McClintock, T. The significance of response of the genome to challenge. Science 226 (1984) 792-801.

Mukai, T. Polygenic mutations. In: Thompson, J. N. and Thoday, J. M. (Eds.) Quantitative Genetic Variation. New York (1979) 177-196.

Murphree, A. L. and Benedict, W. F. Retinoblastoma: Clues to human oncogenesis. Science 223 (1984) 1028-1033.

Newbold, R. F. and Overell, R. W. Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ *c-Ha-Ras* oncogene. Nature 304 (1983) 648-651.

Nomura, T. Parental exposure to X rays and chemicals induces heritable tumours and anomalies in mice. Nature 296 (1982) 575-577.

Nomura, T. Further studies on X-ray and

chemically induced germ-line alterations causing tumors and malformations in mice. In: Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson J. (Eds.) Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B. Genetic Effects and Applied Mutagenesis, New York (1986) 13-20.

Paro, R., Goldberg, M. L. and Gehring, W. Molecular analysis of large transposable elements carrying the *white* locus of *Drosophila melanogaster*. EMBO Journal 2 (1983) 853-860.

Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. and Balmain, A. Carcinogen-specific mutation and amplification of *Ha-ras* during mouse skin carcinogenesis. Nature 322 (1986) 78-80.

Ramel, C. Polygenic effects and genetic changes affecting quantitative traits. Mutation Res. 114 (1983) 107-116.

Rannug, A. and Rannug U. Enzyme inhibition as a possible mechanism of mutagenicity of dithiocarbamic acid derivatives in *Salmonella typhimurium*. Chem. Biol. Interact. 49 (1984) 329-340.

Rio, D. C., Laski, F. A. and Rubin G. M. Identification and immunochemical analysis of biologically active *Drosophila* P element transposase. Cell (1986) 21-32.

Reddy, J. K. and Lalwai, N. D. Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: Evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. CRC Critical Rev. in Toxicol. 12 (1983) 1-58.



Rosenkranz, H. S., Mitchell, C. S. and Klopman, G. Artificial intelligence and Bayesian decision theory in the prediction of chemical carcinogens. *Mutation Res.* 150 (1985) 1-11.

Rubin, G. M. and Spradling, A. C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218 (1982) 348-353.

Ruley, H. E. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304 (1983) 602-606.

Shelby, M. D. and Stasiewicz, S. Chemicals showing no evidence of carcinogenicity in long-term, two-species rodent studies: The need for short-term data. *Environ. Mutagen* 6 (1984) 871-878.

Simmons, M. J. and Crow, J. F. Mutations affecting fitness in *Drosophila* populations. *Ann. Rev. Genet.* 11 (1977) 49-78.

Simpson, G. G. Tempo and mode in evolution. New York 1944.

Spradling, A. C. and Rubin, G. M. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218 (1982) 341-347.

Stebbins, G. L. Variation and evolution in plants. London 1950.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. and Coce, C. M. The t(14, 18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasm result

from mistakes in V D J joining. *Science* 229 (1985) 1390-1392.

Wahl, G. M., de Saint Vincent, B. R. and de Rose M. L. Effect of the chromosomal position on amplification of transfected genes in animal cells. *Nature* 307 (1984) 516-520.

Wright, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16 (1931) 97-159.

Yuasa, Y., Premkumar Reddy E., Rhim, J.-S., Tronick, S. R. and Aaronson, S. A. Activated N-ras in human rectal carcinoma cell line associated with clonal homozygosity in myb locus-restriction fragment polymorphism. *Japanese J. of Cancer Res. GANN* 77 (1986) 639-647.

Zarbl, H., Sukumar, S., Arther, A. V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methyl-urea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 315 (1985) 382-385.

Zeiger, E. and Tennant, R. W. Mutagenesis, clastogenesis, carcinogenesis: Expectations, correlations and relations. In: Ramel, C., Lambert, B and Magnusson, J. (Eds). Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Liss, New York (1986) 75-84.

## 変異原の in vivo 短期検索法 ——有用性と問題点——

司会 近 藤 宗 平 (近畿大学原子力研究所)

松 島 泰次郎 (東京大学医科学研究所)

### はじめに

環境化学物質の変異原性の検索や癌原性の予測には, in vitro 短期検索法が開発されて用いられてきている。なかでもサルモネラ菌を用いる微生物変異原性試験法は有効で世界中で広く利用されてきた。AF-2 や加熱食品中のヘテロサイクリックアミン類やニトロピレン類など数多くの環境変異原物質が見出された。癌原性があとから確認された例も増えている。一方そのなかには, 例えばフラボン類のケルセチンの様に種々の in vitro 短期検索法で陽性であるが, いくつかの in vivo 短期検索法で陰性の物質も見つかってきた。

この様に, in vitro 短期検索法で見出された変異原物質の生体への影響を評価するためには, 数多くの実験動物を用いる長期試験を実施する前に, in vivo 短期検索法で調べて評価する必要がある。種々の in vivo 短期検索法が開発されているが, いろいろな問題を含んでいる。生殖細胞を用いる in vivo 短期検索法は遺伝毒性を評価するうえで重要であるが, 今回は体細胞を用いる in vivo 短期検索法に限定して5種類の方法を選出して方法の紹介とともに, 方法の有用性と問題点を明らかにし, in vivo 短期検索法を利用する方の参考にすると同時にこれらの方法を改良開発するための基礎にしたいと考えて表題のシンポジウムを企画した。



## ショウジョウバエのスポットテスト

大阪大学医学部 放射線基礎医学教室 梁 治 子

はじめに

エームテストの開発でさまざまな変異原がスクリーニングされてきた。これらの変異原のヒトへの危険度がどのくらいなのかに関心が高まってきた。ポストエームス試験として、1つは哺乳動物細胞を用いた in vitro 試験がある。しかし、ヒトが個体として存在する限り、動物をまるごと変異原に暴露しての in vivo 試験は不可欠であろう。現存開発されているポストエームス試験としての、短期試験法で、ベストといえる系を知らない。それは微生物の試験にくらべると、複雑で、時間がかかる為にまだ資料不足であるからと思わ

れる。ハエのスポットテストは開発されて日が浅く、まだこの系がどんな意義をもつかわからない。ハエのグループからの結果をもとに、バクテリア系と、マウスの系の結果と比べてみた。このシンポジウムを企画された松島先生から、将来、短期試験法による結果をもとに、“多くの人のコンセンサス”を得る事が、1つの目標であると同った。

体細胞突然変異の検出

図1で示すように、ハエの受精卵は約10日で成虫になる。体の大きさが著増するのは幼虫期で、

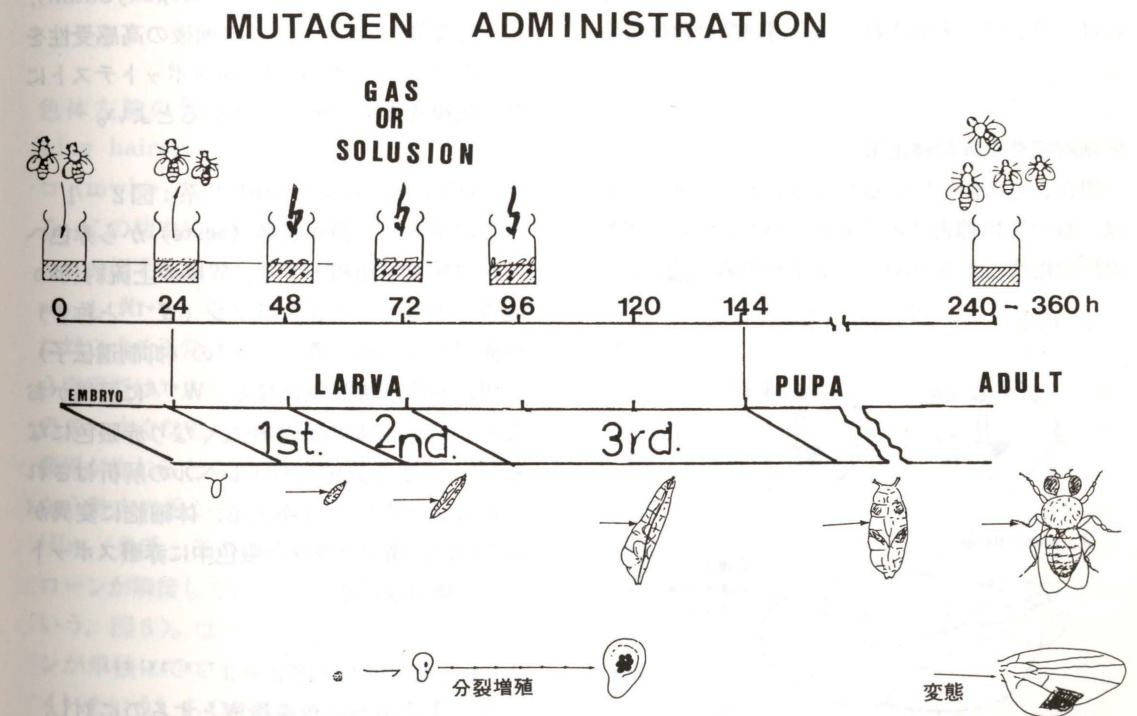


図1 ハエの発生と、翅原基の変化、及び変異原投与の方法



この間幼虫は絶えず摂食している。幼虫の体内では、未分化な“成虫原基”といわれる細胞集団がさかんに分裂している。成虫原基とは、将来成虫の体の組織になる細胞群で、翅になるのに“翅原基”，眼になるものは“眼原基”という。原基細胞は蛹期に入ると、変態ホルモンの影響で、いっせいに大変態をおこし、成虫器官にかわる。成虫器官を作っている細胞は、もはや分裂はしない。したがって体細胞突然変異を誘発させるのなら、幼虫期に変異原を投与しなければならない。図1に示す方法が一般的な方法である。エサ入り飼育びんにハエの成虫を1日入れておくと産卵する。この受精卵が幼虫になった時、変異原の水溶液を滴下すると、幼虫はエサと共にたべる。水溶液になりにくい物質は、予めエサに変異原をまぜておけばよい。ガスならガスを飼育びんに送りこめば、幼虫の呼吸と共に体内に入る。このように変異原を暴露し、そのまま成虫になるまで飼育する。原基細胞の1個に突然変異がおこっていれば、成虫の体表面上に変異コロニー（スポットという）として表われる。変異スポットを検出するには、遺伝的工夫がされた系を用いなければならない。

#### 体細胞突然変異の検出系

現在、主に使っているハエのスポットテスト系は、眼色を指標とするUZ系、 $W^i$ 系および翅毛の形の指標とするmwh/flr系がある（図2）。

##### 1. UZ系



##### 2. $w^i$ 系



##### 3. mwh/flr系

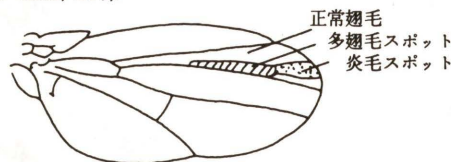


図2 ハエのスポットテスト系

#### 1. white ivory ( $W^i$ )系：（図2-2）<sup>4)</sup>

眼色復帰変異を検出する系で、象牙色 (ivory) から赤色（野性型）への変化を指標とする。ハエには、white座とよばれる、眼の色素量を調節する遺伝子座がある。ハエの野性型眼色は赤眼であるが、white座に突然変異がおこると、眼色に変化がおこる。 $W^i$ はそのうちのひとつで、象牙色を呈するのは、 $W$ 座の3 kbのイントロンの大部分と、第2エクソンをへて第3エクソンの一部まで含む2.9 kbのDNAがタンデム重複した為である。復帰変異 ( $W^i \rightarrow W^+$ ) は、重複した一単位 (2.9 kb) が正確に除去されることによっておこる<sup>11, 14)</sup>。以上のように、 $W^i$ 系は、変異の分子機構が解明されている特徴があるが、体細胞変異の感度はあまり高くない。検出感度を高めるために、 $W^i$ 遺伝子を4個もつ [( $W^i$ )<sub>4</sub>] ハエを作った。(  $W^i$  )<sub>4</sub> ハエは、予想したように、代表的変異原、X線、ENU (ethylnitrosourea), EMS (ethylmethanesulfonate), TEM (triethylenemelamine), DEB (diepoxybutan), に対して  $W^i$  ハエより、4倍前後の高感受性を示した<sup>10)</sup>。したがって  $W^i$  系スポットテストには4重複変異株 ( $W^i$ )<sub>4</sub>を用いるとよい。

#### 2. UZ (unstable zeste)<sup>20)</sup>系：図2-1

この系も、眼色が黄色 (zeste) から赤色への復帰変異を指標とする。 $W$ 座の上流約10 kb地点に小さなトランスポゾン ( $W^{+TE}$ と称す) が挿入したため（図2）， $z^1$ の（抑制遺伝子）と組合わすと黄眼色になる。 $W^{+TE}$ に変異がおこると、 $z^1$ の抑制がきかなくなり赤眼色になる<sup>20)</sup>。しかし詳細な分子レベルの解析はされていない。 $W^i$ 、UZ系とも、体細胞に変異がおこれば、黄又は象牙色眼色中に赤眼スポットとして検出される。

#### 3. mwh/flr系：図2-3<sup>7, 8, 24, 28)</sup>

$W^i$ 、UZ系が眼色を指標とするのに対し、mwh/flr系は翅毛の形を指標とする。第3染

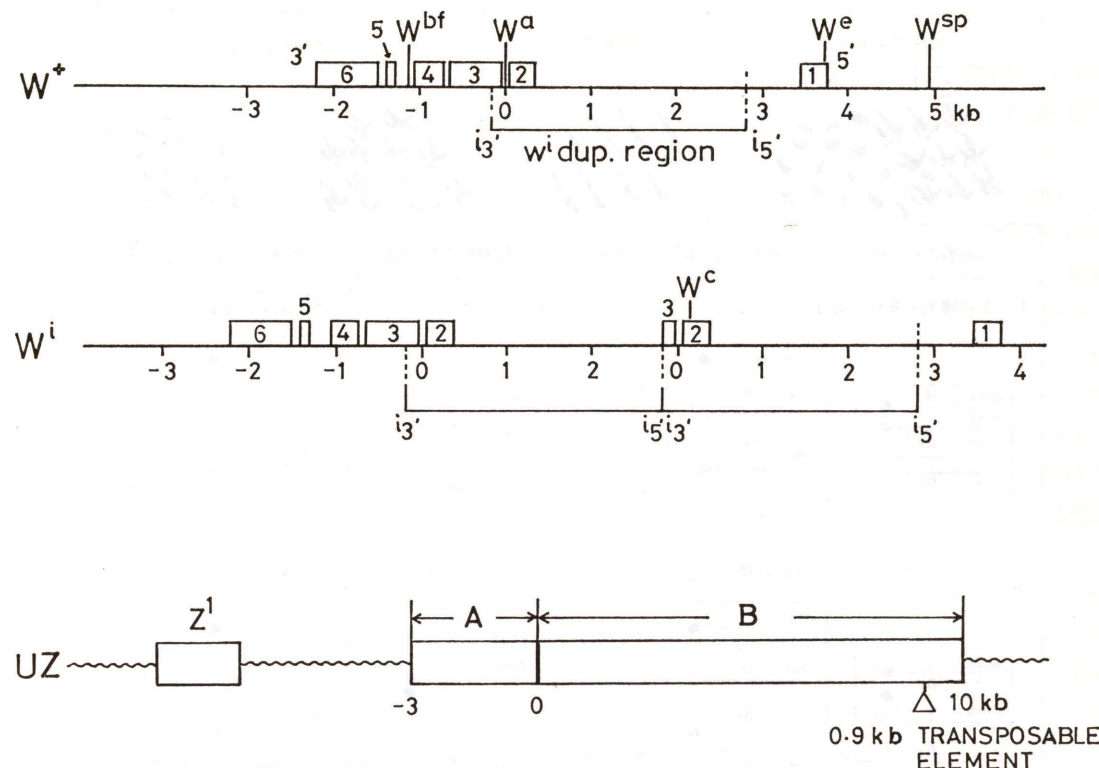


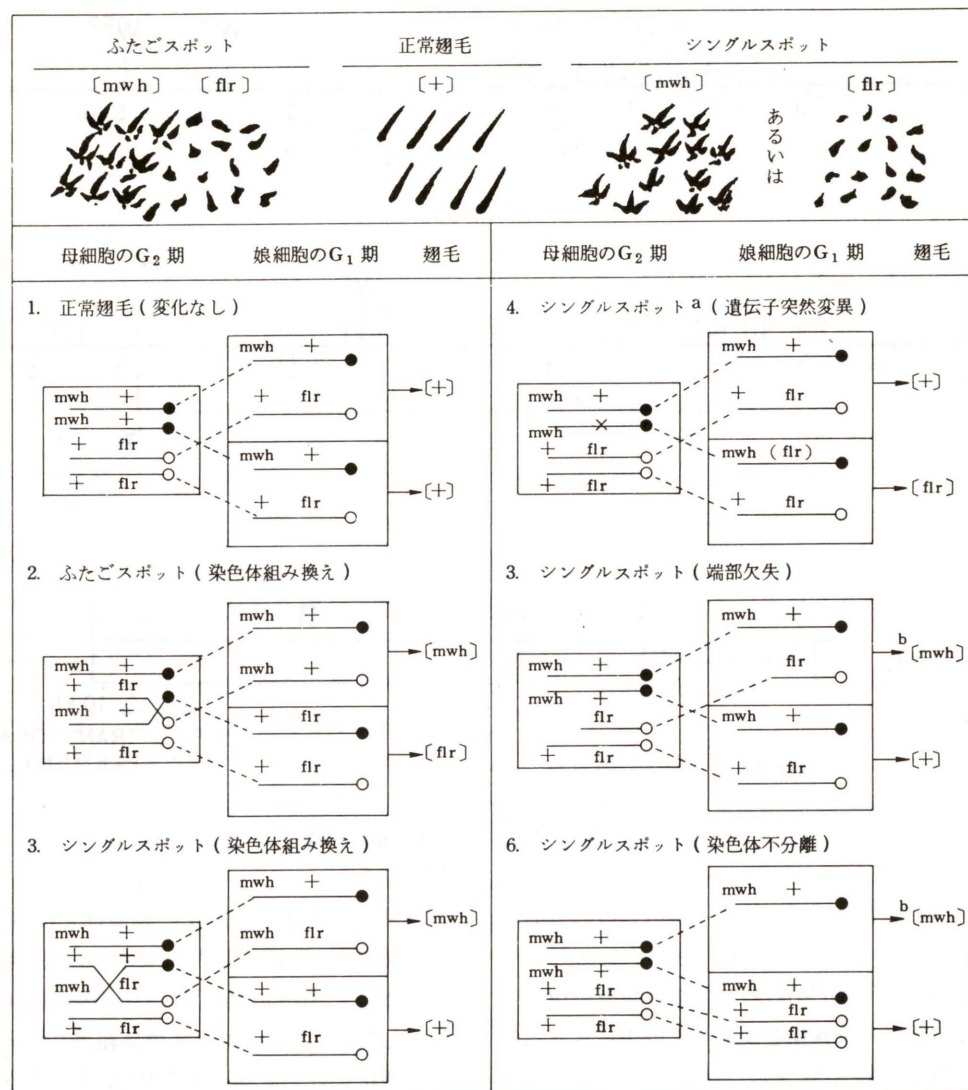
図3 野性型 ( $W^+$ )、 $W^i$ 、UZの遺伝子構造

色体左腕の劣性突然変異 mwh (multiple wing hairs) と flr (flare) をトランスヘテロ ( $mwh^+/+flr$ ) (図4) にもつ幼虫を用いる。この幼虫に変異原を暴露して成虫になったハエの翅毛を調べる。何もおきなかったら、mwh も flr も、相同染色体のそれぞれの遺伝子に対立する正常 (+) な遺伝子をもっているから表現型は、正常な形（1細胞がそのまま1本のまっすぐな毛に分化（図4））になる。突然変異が生じると ①「mwh」（多翅毛：1細胞から数本の毛が分化，図4）型クローンと，「flr」（炎毛：炎のような形の毛，図4）型クローンが隣接しているもの（ふたごスポットという，図5）。② mwh 型又は flr 型のクローンが単独にでてくる（シングルスポット（図4）という）ものが観察される。このうち「ふたごスポット」は、母細胞のG2期に、相同染

色体間で、染色分体同士が動原体と flr 座の間で、組換えをおこしたためである（図4-2）。一方、mwh 型は又は flr 型細胞からなる「シングルスポットは、染色体組換えのみならず、遺伝子突然変異、端部欠失、部分欠失、染色体不分離からも生じる（図4-3~6）。これらのうち、端部欠失や、染色体不分離は、異数体細胞になるので生存力が弱く、せいぜい変異細胞数が1~2個からなる「小シングルスポット」しかかなり得ない。

他方、染色体組換えや、突然変異は、細胞の分裂能をそこなわないので、変異スポットが多数の細胞からなる「大シングルスポット」として現われる。体細胞の染色体組換えは、ハエで大変よくおこる。「大シングルスポット」の大部分は、染色体組換え（図4-2）によるものとみなされる<sup>9)</sup>。UZや $W^i$ 系が遺伝子突然変異





a. mwh の正常な対立遺伝子が突然変異をおこすと多翅毛シングルスポットになる。  
b. 比較的小さなスポットとして出現

図4 翅毛スポットの分類と成因

を検出する系であるのに対し、mwh/flr 系は、染色体突然変異を検出する系といえる。mwh/flr 系は翅毛の形を指標にするので、観察させるべき翅を永久プレパラートとして保存できる利点がある。眼色の変化は標本にすることができない。さらに、mwh/flr 系は、原理的に、遺伝子や染色体の変化をスポットとして検出することができるので、検出される変異原

の種類も多い。例えば、紡垂体毒、vinblastine や vincristine のようなものは、染色体不分離をおこすので mwh/flr 系でのみ検出される<sup>9, 25)</sup>。mwh/flr 系は、真核生物特有の原理（体細胞の染色体組換え）を利用しているので、バクテリアの系で検出できないものも検出できる。

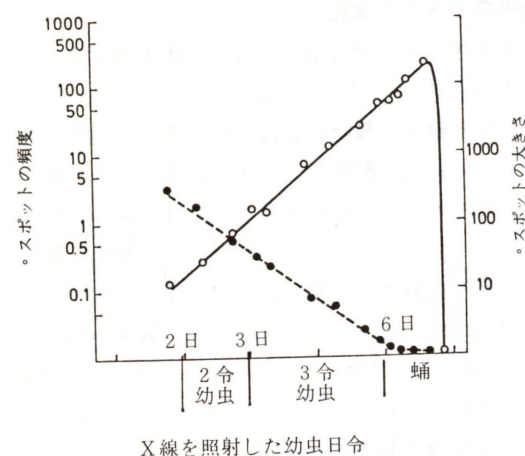


図5 X線を発生段階の異なる幼虫に照射した時の翅毛スポットの頻度と大きさ

表1 ハエスポットテストの実験規模

	自然突然変異率	ハエの数
翅毛スポット系 (mwh/flr系)	10% (小シングル) 0.15% (大シングル)	<50匹
眼色スポット系 (W <sup>i</sup> ) <sub>4</sub>	0.4%	<500匹
UZ	0.1%	<2,000匹

3種スポットテストの変異感度： 翅毛スポットの検出単位は翅一枚あたり30000個（翅毛数）であるのに対し、眼色スポットの単位は約800個（個眼数）である。すなわち mwh/flr 系の方が、眼色系より検出感度が30倍以上高い。突然変異の実験規模は、ふつうは自然突然変異頻度による。表1では、経験的に得た3種スポットテストの1線量当りに要するハエの数を実験規模とした。mwh/flr 系が、少ないハエの数で行なえる。

#### 変異スポットの大きさ

翅や眼に生じた変異スポットは、その大きさを測ることができる。翅毛スポットは、異常形質をもつ翅毛の数を、眼色スポットなら赤色の個眼数を大きさの“ものさし”とする。ハエの翅の毛の総数は、翅あたり約30000本、眼の総個眼数は800個と決まっているので、変異原で誘発された変異スポットの大きさを測れば、翅毛なら、30000/変異クローンの翅毛数で、突然変異がおこった時の標的細胞の数を知ることでもできる。図5はX線を、発生段階の異なる幼虫に照射した時の翅毛スポットの出現頻度と、スポットの大きさの関係を表わしている。標的理論どおり、スポット出現頻度は、発生後期の幼虫ほど高くなり、スポットの大きさは逆比例している<sup>1)</sup>。W<sup>i</sup>系でも翅毛系同様の結果が得られた<sup>22)</sup>。しかし、UZ系は、幼虫が若いほど、変異の感受性は高くなる（図6）<sup>22)</sup>。この理由は、UZ変異はトランスポゾンが関係しているためと解釈している。

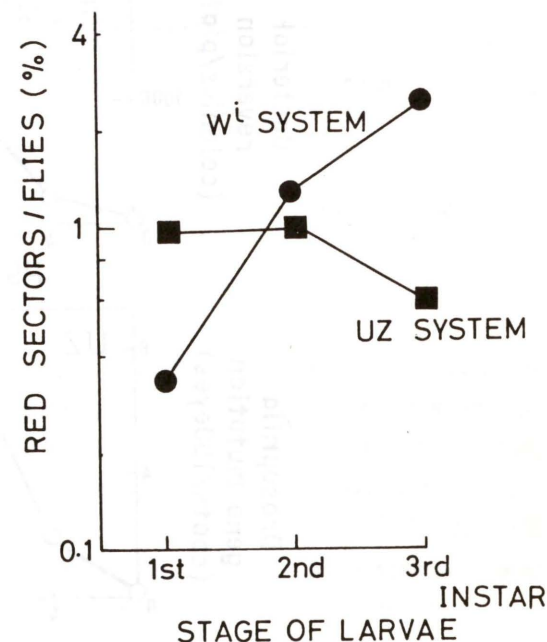


図6 UZとW<sup>i</sup>系の幼虫のいろんな時期にX線1KRを照射した時の赤色スポットの出現頻度と照射時期の関係



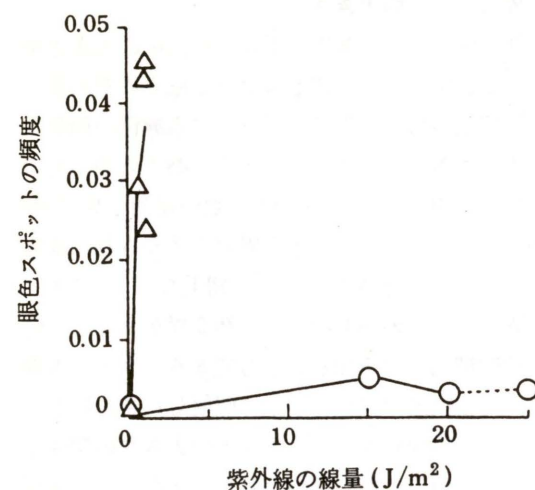


図7 除去修復欠損株 *mus201/mus201* ( $\Delta$ ) と正常株 ( $\circ$ ) における紫外線による眼色スポット感受性。UZ 系を使用。紫外線は1令幼虫に照射。

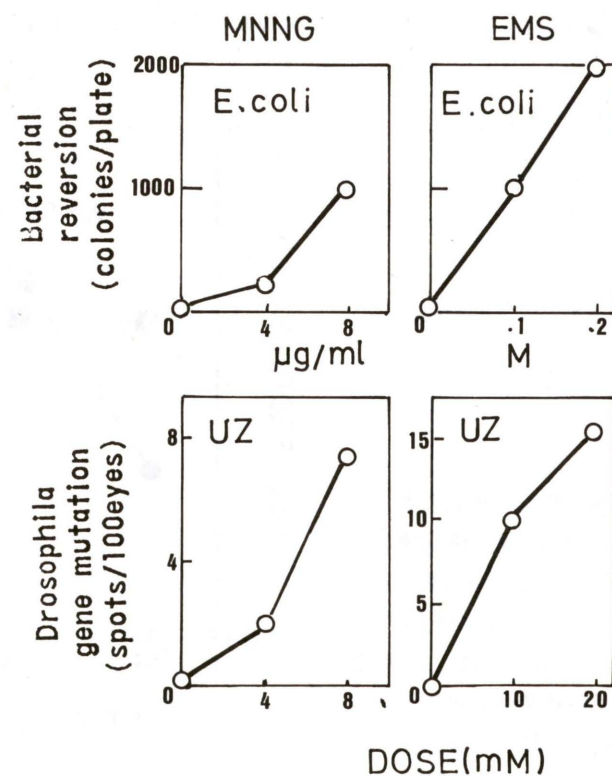


図8 MNNG と EMS の大腸菌での変異感受性とハエ UZ 系での変異感受性, *E. coli* のは文献11より, UZ 系は, 文献5より。

#### 幼虫の DNA 修復能:

常染色体の突然変異 *mus201/mus201* 株は, 除去修復が全くない<sup>3)</sup> *mus201/mus201* 幼虫は, 紫外線を微量照射されただけで, 眼色突体変異 (UZ 系) が著増した。野性型 (+/+ ) 幼虫は, 紫外線による眼色スポットにはほとんど誘発されない (図7)<sup>2,3)</sup>。つまり, ハエの幼虫初期には, 紫外線損傷を完璧に近いまで修復する能力をそなえている。紫外線以外の変異原 Benzo (a) pyrene (BP) 2-acetylaminofluorene (2-AAF) の UZ 系における変異原性も、もうひとつの修復欠損株 *mei9<sup>a2</sup>* では, 陽性であったが, 野性型株では陰性 (2-AAF) と偽陽性 (BP) であった<sup>6, 8)</sup>。野性型株で変異原性がなくても, 高修復のためかもしれないので, 除去修復欠損株で確かめてみる必要がある。

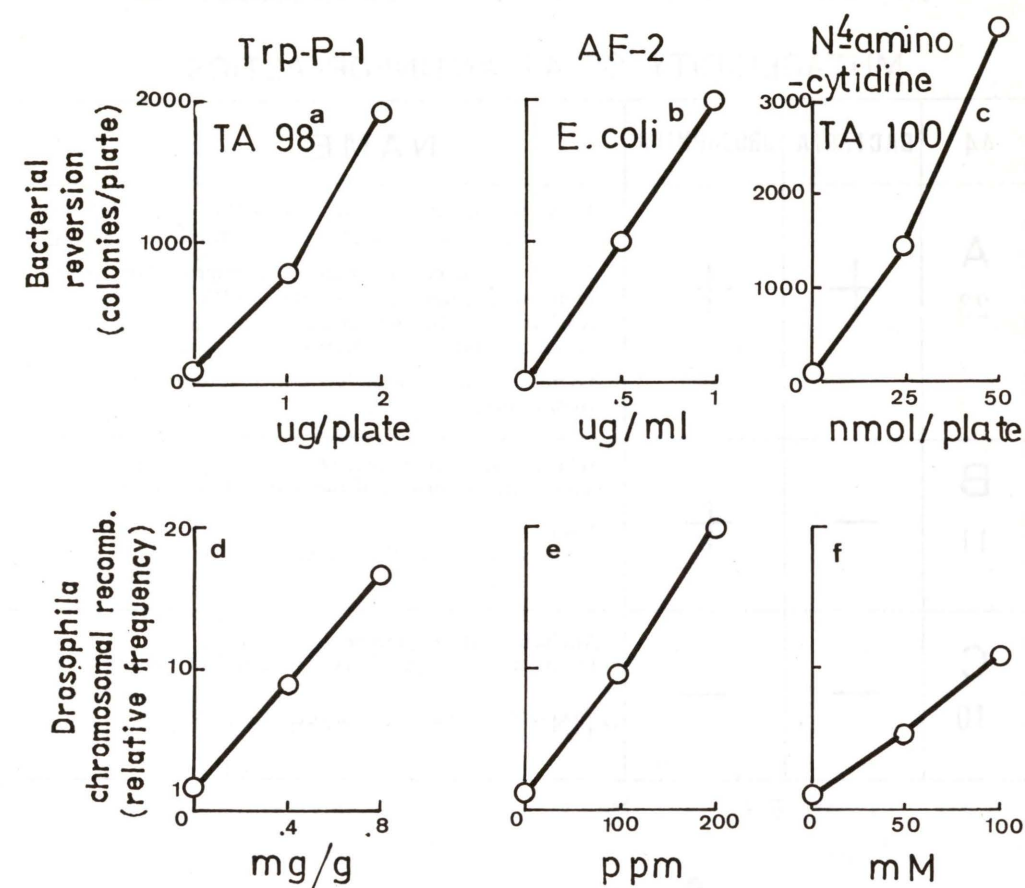


図9 Trp-P-1, AF-2, N<sup>4</sup>-Aminocytidine によるバクテリアとハエ (*mwh/flr* 系) での変異感受性

a) 25, b) 13, c) 16, d) 27, e) 7, f) 根岸未発表

#### バクテリアとハエにおける変異原性の強さの比較

変異原性の強さを, 自然突然変異頻度を最高何倍まで上昇させるかで表わすと, MNNG と EMS はバクテリアで 50~100倍, ハエ UZ 系で 100~200倍, 自然変異コロニー数 (スポット数) を上昇させる (図8)。他方 Trp-P-1, AF-2, N<sup>4</sup>-aminocytidine はバクテリアの自然復帰コロニー数を 50~100倍上昇させるが, ハエの翅毛スポットは, 10~20倍しか上昇させない (図9)。つまり Trp-P-1, AF-2, ACR は, バクテリアでは強い変異原性を示すが, ハエでは, さ

ほど強い変異原ではない。坂本<sup>25)</sup> は, 44種の抗腫瘍性薬剤について微生物に対する変異原性と, ハエに対する変異原性をしらべた (表2)。23種は, 両者に陽性, 11種はハエのみで陽性, のこり10種は, 両者とも陰性であった。少なくとも, 44種抗腫瘍性薬剤に関しては, 変異原性検定の守備範囲はバクテリアよりハエの方が広がった。

#### 体細胞レベルにおけるマウスとハエの比較

1. マウスとハエのスポットテストにおける変異原性の相関



表2 44種抗腫瘍性薬剤のバクテリアとハエでの変異原性を指標にした分類

# MUTAGENICITY OF 44 ANTINEOPLASTICS

44	BACTERIA	DROSOPHILA	NAME
A 23	+	+	Carbazilquinone, cisplatin, nimustin, nitrogen mustard, nitrogen mustard- <i>N</i> -oxide, triethylenemelamine Busulfan, cyclophosphamide, improsulfan tosylate melphalan, mitobronitol, thio-TEPA Adriamycin, bleomycin, daunomycin, Streptozotocin neocarzinostatin, peplomycin Mitomycin C Cytosine arabinoside, 6-mercaptopurine, thioinosine, Pipobroman
B 11	—	+	Aclarubicin, actinomycin D, chromomycin A <sub>3</sub> Carmofur, 5-fluorouracil, methotrexate, procarbazine Tegafur Demecolcin, vinblastine, vincristine
C 10	—	—	Ancitabine, 8-azaguanine, hydroxyurea Dromostanolone propionate, fosfestrol, Mepitiostane Aceglatone, 5-bromodeoxyuridine, Krestin, Picibanil

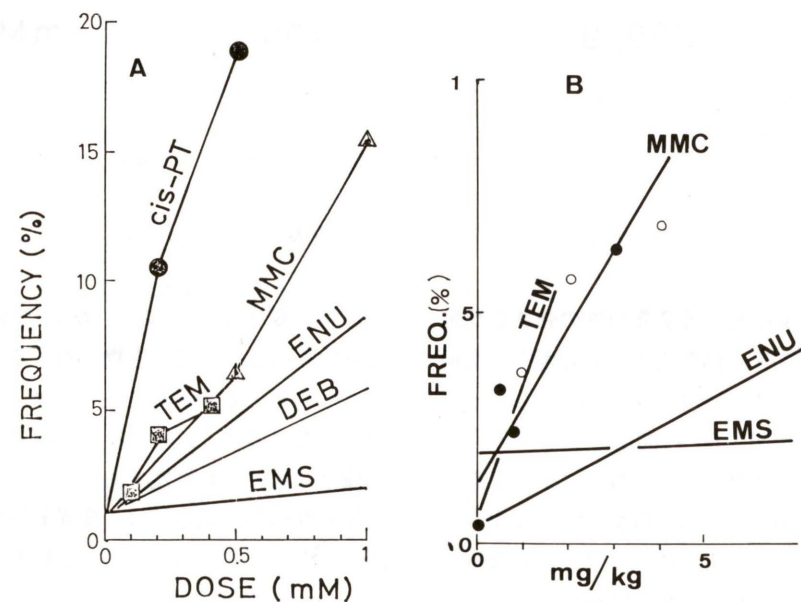


図10 ハエ (W<sup>1</sup>)<sub>1</sub> 系及び (A) およびマウススポットテスト (B) における変異原の強さの順序。  
Bは文献より ENU は1ツ町 (未発表) より回帰直線を引いた。変異原はハエへは経口投与, マウスへは注射で投与。

表3 ヘテロサイクリックアミンの変異原誘発力 (ハエスポットテストとサルモネラテスト) と発癌力 (マウス) の比較。

検体	MD <sub>10</sub> (mg/g) (ハエのスポットテスト)	TD <sub>50</sub> (mg/g) (マウスの肝臓)	RD <sub>1000</sub> (μg/ml) (サルモネラのテスト)
Trp-P-1	0.20	0.25	0.036
Trp-P-2	0.18	0.19	0.014
IQ	0.11	0.30	0.0032
MeIQ	0.06	未定	0.0097
MeIQx	0.11	未定	0.029
Glu-P-1	0.26	0.45	0.7
Glu-P-2	0.29	0.39	0.75
AaC	0.31	0.59	4.7
MeAaC	0.31	0.56	7.1

図10は (W<sup>1</sup>)<sub>1</sub> 系スポットテストによる, EM S, ENU, DEB, TEM, MMC, (mitomycine C), cis-platinum<sup>10)</sup> の変異原性の強さを示している。これを Russel ら<sup>21)</sup> の ENU, EMS, TEM, MMC によるマウススポットテストにおける変異原性の強さ (図10-B) と比較すると, 驚くほど似ている。4種の化合物は, S-9による代謝活性が不必要なものばかりであるためかもしれない。S-9代謝活性化を必要とする化合物によるマウスとハエの比較をしてみた。

2. ヘテロサイクリックアミンのハエでの変異原の強さとマウスでの発がん性の強さ<sup>24, 27)</sup>

ハエ mwh/flr 系による9種ヘテロサイクリックアミンの変異原性の強さを, 小シングルスポットを指標に, 自然突然変異率を10%上昇させる時の, エサ中の濃度 (MD<sub>10</sub>) で表わした (表3)。マウスにおける発癌力の強さは, 肝癌を50%誘発させるエサ中の濃度 (TD<sub>50</sub>) とし, サルモネラ菌における変異原の強さは, 1000個復帰コロニーを誘発する時のプレインキュベーション中の濃度 (RD<sub>1000</sub>) として概報より算出した (マウス発癌力は文献15, 17, 18 後者は26より)。マウスでの発癌力の強さ (1/TD<sub>50</sub>) とハエでの変異原性の強さ (1/MD<sub>10</sub>) 10倍の中におさまっているのに対し, サルモネラ菌での変異原性の強さ (1/RD<sub>1000</sub>) は10000倍のものの広い範囲

に分散している。マウスでの発癌性の強さは, サルモネラ菌での変異原性の強さを指標とするより, ハエでの変異原性の強さを指標とする方が, よりよい相関がえられた。この理由は, これらヘテロサイクリックアミンはすべて経口投与した為, 標的細胞へ達する代謝経路が似ているからであろう。

おわりに

ハエのスポットテストは, 容易に, 変異原による突然変異の線量効果曲線を得る。つまり, 変異原の強さを定量することができる。定量化されたハエ体細胞レベルでの変異原の強さを概報のバクテリアとマウスの系で調べられた変異原の強さ (発癌力) と比較してみた。ハエはマウスと姿, 形こそちがっているが, 以外にもマウス系とのよい相関を示した。他方, ハエの DNA 修復欠損株において変異原がどのように作用するのかを知ることが, 正常なハエでの変異原に対する修復能がどれだけ効いたかも知る事ができる。上述のことは, ハエのまるとレベルでの突然変異の研究は, 動物体内で変異原処理により, 何がおこっているかを教えてくれることを期待してよさそうだ。

## 参考文献

- 1) Becker, H., J. Mitotic recombination, in: The Genetics and Biology of Drosophila (M. Ashburner and E. Novitski eds.) Academic Press, New York, Vol. 1c, pp. 1020-1084 (1976).
- 2) Boyd, J. B., Golino, M. D., Setlow, R. B.: The mei-9<sup>a</sup> mutant of Drosophila melanogaster increases mutagen sensitivity and decreases excision repair, Genetics, 84: 527-544, 1976.
- 3) Boyd, J. B., Snyder, R. D., Harris, P. V., Presley, J. M., Boyd, S. F., Smith, P. D.: Identification of a second locus in Drosophila melanogaster



- ter required for excision repair, *Genetics*, 100 : 239-257 (1982).
4. Bowman, J. T. : Parameters of spontaneous and X-ray-induced reversion of the white-ivory mutant of *Drosophila*, *Mutat. Res.* 7 : 409-415 (1969).
  5. Fujikawa, K., Kondo, S. : DNA-repair dependence of somatic mutagenesis of transposon-caused white alleles in *Drosophila melanogaster* after treatment with alkylating agents, *Genetics*, 112 : 505-522 (1986).
  6. Fujikawa, K., Ryo, H., Kondo, S. : Somatic eye-color reversion assay in *Drosophila melanogaster* using the unstable white-zeste system incorporated with repair-deficient mutation, submitted to WHO/IPCS/CSSTT.
  7. 藤川和男、梁 治子、近藤宗平 : ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目されている短期試験法、環境変異原研究 6 : 107-113 (1984)
  8. 藤川和男 : ショウジョウバエの除去修復能欠損系統 mei-9<sup>a</sup> の体細胞における benzo (a) pyrene と 2-acetylaminofluorene の変異原性、環境変異原研究 8 : 69-73 (1986).
  9. Graf, U., Wurgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P. G. : Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environmental Mutagenesis*, 6 : 153-188 (1984).
  10. Green, M. M., Todo, T., Ryo, H., and Fujikawa, K. : Genetic-molecular basis for a simple *Drosophila melanogaster* somatic system that detects environmental mutagens, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 83 : 6667-6671 (1986).
  11. Karess, R. E., Rubin, G. M. : A small tandem duplication is responsible for the unstable white-ivory mutation in *Drosophila*, *Cell*, 30 : 63-69, 1982.
  12. Kondo, S., Ichikawa, H., Iwo, K., Kato, T. : Base-changes mutagenesis and prophage induction in strains of *Escherichia coli* with different DNA repair capacities, *Genetics*, 66 : 187-217 (1970).
  13. Kondo, S., and Ichikawa-Ryo, H. : Testing and classification of mutagenicity of furylfuramide in *Escherichia coli*, *Japan J. Genet.*, 48 : 295-300 (1973).
  14. Levis, R., O'Hare, K., and Rubin, G. M. : Effect of transposable element insertions on RNA encoded by the white gene of *Drosophila*, *Cell* 38 : 471-481 (1984).
  15. Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., Sugimura, T. : Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolyzate, *Science*, 213 : 346-347 (1981).
  16. Negishi, K., Harada, C., Ohara, Y., Ohara, K., Nitta, N., and Hayatsu, H. : N<sup>4</sup>-aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity, *Nuc. Aci. Res.*, 11 : 5223-5233 (1983).
  17. Ohgaki H., Matsukura, N., Morino, K., Kawachi, T., Sugimura, T. Takayama, S. : Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from glutamic acid and soybean globulin pyrolysates, *Carcinogenesis*, 5 : 815-819 (1984).
  18. Ohgaki, H., Kusama, K., Matsukura, N., Morino, K., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S., Sugimura, T. : Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f)guanine, from broiled sardine, cooked beef and beef extract. *Carcinogenesis*, 5 : 921-924 (1984).
  19. Rasumson, B., Svahlin, H., Rasumson, Å., Montell, I., Olofsson, H. : The use of a mutationally unstable X-chromosome in *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing, *Mutation Res.*, 54 : 33-38, 1978.
  20. Rasmuson, B., Rasmuson, Å. and J. Nygen : Eye pigmentation changes in *Drosophila melanogaster* as a sensitive test for mutagenicity, : In *Handbook of Mutagenicity Test Procedures* (B. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel, eds.) Elsevier Sci Publishers, Amsterdam, pp. 603-613 (1984).
  21. Russel, L.B., Selby, P.B., Von Halle, E., Sheridan, W., and Valcovic, L. : Use of the mouse spot test in chemical mutagenesis: Interpretation of past data and recommendations for future work. *Mut. Res.*, 86 : 355-379 (1981).
  22. Ryo, H., Yoo, M.A., Fujikawa, K., Kondo, S. : Comparison of somatic reversions between the ivory allele and transposon-caused mutant alleles at the white locus of *Drosophila melanogaster* after larval treatment with X rays and ethyl methanesulfonate, *Genetics*, 110 : 441-445 (1985).
  23. Ryo, H., and Kondo, S. : Photoreactivation rescue and hypermutability of ultraviolet-irradiated excisionless *Drosophila melanogaster* larvae, *Proc. Nat. Aca. Sci., USA* 83 : 3366-3370 (1986).
  24. 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).
  25. 坂本豊 : 抗腫瘍性薬物の変異原性複合試験系の検討、大阪大学医学雑誌 36 : 407-414 (1986).
  26. Sugimura, T. : Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food, *Cancer*, 49 : 1970-1984 (1982).
  27. Yoo, M. A., Ryo, H., Todo, T., Kondo, S. : Mutagenic potency of heterocyclic amines in the *Drosophila* wing spot test and its correlation to carcinogenic potency, *Gann, Japan. J. Cancer Res.*, 76 : 468-473 (1985).
  28. Würgler, F.E., Vogel, E. W. : In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*, in : *Chemical Mutagens* (F. de Serres ed.), Plenum Press, New York, Vol. 10, in press.



## マウススポットテスト

武田薬品工業株式会社 中央研究所 一ツ町 晋 也

## 1 はじめに

毛色を指標とするマウスのスポットテストは、L. B. Russell と M. H. Major<sup>1)</sup> によって既に1957年に発表された体細胞突然変異の検出系で、放射線研究の手法として確立されたものである。近年、化学物質の遺伝毒性が問題視されると、このテストが、体細胞ながら in vivo でマウスの遺伝子突然変異を検出できるため注目されはじめた。化学物質の遺伝的影響（即ち生殖細胞における突然変異）を検出する哺乳動物の in vivo 系としてはマウス特定座位法があるのみだが、実験規模が大きく screening test としては現実的ではない。その点、スポットテストは規模が比較的小

さく、短時間で実施可能なため特定座位法の pre-screening として着目されたわけである。しかし、世界的にみても、いまだ普及していると言いはれ難い。我が国では、日本環境変異原学会の MMS (Mammalian Mutagenicity Study Group) 分科会において共同研究が行われている以外、独自で研究している機関は1, 2を数えるのみである。共同研究は、土川 清 (遺伝研) を総括責任者とし、著者の研究室を含め11の研究機関が参加して1984年より実施されている。

## 2 原理

スポットテストは、通常、毛色を指標とするた

Table 1. Recessive genes in mouse strains used in the spot test

Locus	Strain							
	C57BL	KYG	PW	T (PT)	HT	DBA	NMRI	PDB
Non-agouti	a	a	a	a	a	a	a	a
Brown			b	b		b		b
Albino			c <sup>ch</sup>	c <sup>ch</sup>			c	
Dilute			d	d		d		d
Pink eye			p	p				p
Piebald		(s)		(s)				
Short ear			(se)	(se)				
Pallid					pa			
Leaden					ln			
Pearl					pe			
Fuzzy					(fz)			
Brachypody					(bp)			

( ) ; not detectable as the spot

Crosses used in the spot test; C57BLxPW, KYGxPW, C57BLxT, TxHT  
NMRIxDBA, NMRIxPDB

This table was modified one in reference No. 2.



め、毛色に関して数個の劣性遺伝子をホモにもつテスターを使う。Table 1 に現在スポットテスト用として各国で使われているマウスの系統とそれらの標識遺伝子を示した。ここでは、我が国の共同研究で使われている PW と C57BL マウスの交配を例にとって説明したい。PW マウスは土川<sup>3)</sup>によって確立された近交系のテスターである。PW の毛色に関しては non-agouti (a, 黒色), brown (b, 褐色), pink-eyed dilution (p, 淡紅眼, 淡色), chinchilla (c<sup>ch</sup>, チンチラ) および dilute (d, 淡色) の 5 つの遺伝子座が劣性ホモで、さらに short ear (se, 短耳) を合せもつ。このため PW の表現型は毛色が白、眼がピンクで短耳となる。通常、PW の雄と C57BL の雌マウスを交配させる。C57BL は、毛色に関して non-agouti のみがホモで、PW に

対応する残りの 4 遺伝子座は野生型の黒いマウスであるため、この交配から得られる F<sub>1</sub> では、Fig 1 に示したように標識遺伝子に関して non-agouti だけがホモで、他の 4 つは野生型とのヘテロとなる。従って、毛色の表現型は母親と同じ黒となる。胎仔期に変異原の作用を受けた F<sub>1</sub> の色素細胞において、母親由来の遺伝子のうち標識遺伝子に関して野生型から劣性への突然変異が誘起されると、変異細胞由来の細胞集団が周囲の黒い毛色の中に変色斑即ち recessive spot (RS) として観察されることになる。RS は変異した遺伝子により、褐色、灰色および白色などいろいろの色相を呈するが、その色相からいずれの遺伝子における変異であるかを肉眼的に判定することは不可能である。

色素細胞は神経節、間充織とともに神経冠から

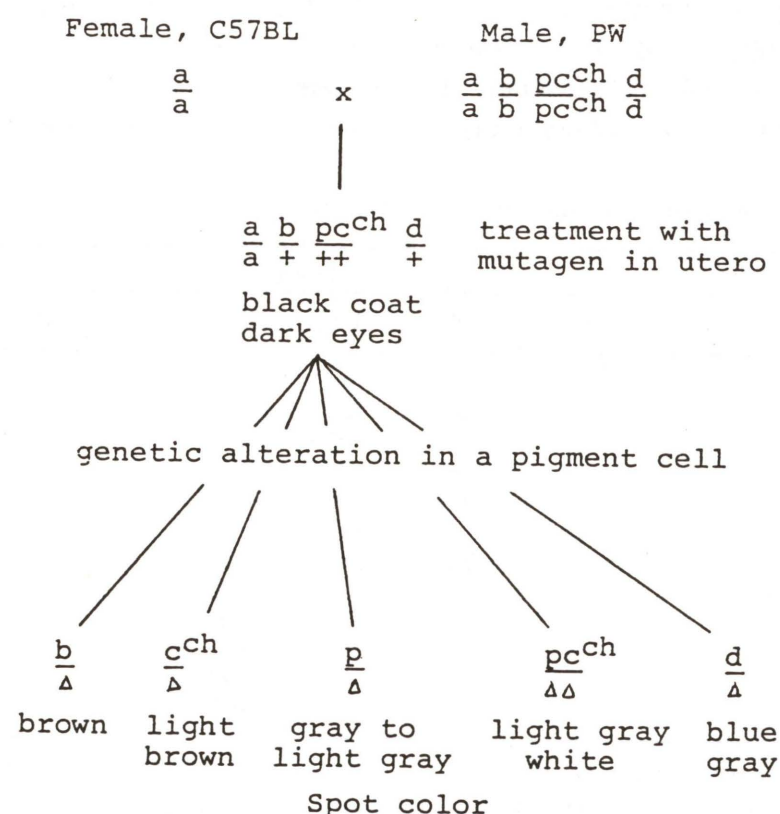


Fig. 1. The principle of the spot test  
(modified the figure in reference No.4)

分化する。14個<sup>5)</sup>とも、34個<sup>6)</sup>存在するともいわれている始原色素細胞が妊娠 8~12 日の胎仔期に細胞分裂を繰り返しながら腹側に向って migrate する。最終的には、毛根において成熟した色素細胞が色素顆粒を分泌して毛色を支配する。L. B. Russell<sup>1)</sup> は、妊娠 6~12 日の胎仔を放射線で処理した実験において、RS の出現頻度と大きさから幼若色素細胞が migrate している時期にあたる妊娠 10 日位に照射するのが最適だという結論を出した。また、RS の体表に占める割合から計算して、妊娠 10 日の胎仔ではスポットテストにおいて標的となる色素細胞が 150~200 個あると推測している。

スポットテストにおいて検出されるスポットの種類と成因を Table 2 に示した。RS の成因としては、前述したように、標識遺伝子に関する母親由来の遺伝子の野生型から劣性への変異がまずあげられる。この場合、劣性遺伝子そのものでなく、劣性と野生型の中間型であっても検出され得る。また、質的なものでなくその部位の微小な染色体欠失も考えられる。これら 3 つの変異を検出できるというのが、特定座位法とともに本テストの特徴である。その他、大きな染色体欠失とか染色体 1 本の消失という場合、特定座位法では個体死に到るが、体細胞では細胞死に到らず生存可能で RS を形成すると考えられている。また、体細

胞組換えが起ったとしても、検出するはずである。さらに、標識以外の毛色に関する遺伝子に優性変異が誘起されても RS として判定されるであろう。しかし、検出された RS がこれらの成因のうちいずれに起因するかを確認することはできない。

スポットテストでは RS のほかに、腹側の正中線部位に白斑が観察され white midventral spot (WMVS) といわれている。これは体細胞の変異ではなく、処理した化学物質の毒性のために細胞死が起こり色素細胞が不足して出現すると考えられている。また、正常でも乳首や外陰部周辺の体毛は黄褐色を呈しているが、これらの近辺に同じ色の斑紋が現われることがある。これも体細胞変異ではなく、分化異常で misdifferentiation spot (MDS) と呼ばれている。

### 3 実験方法

まずテスターの PW の雄と C57BL の雌を交配させ、翌朝以降に産腔の確認された日を妊娠 0 日とする。妊娠の 8~11 日、通常 9~10 日に検体を母体に投与する。Screening としては胎仔が流産したり、重篤な外形異常などのため F<sub>1</sub> が離乳までに死んだりしない範囲で、できるだけ大量を投与する。投与経路は、検体が最も効率よく胎仔に到達すると思われる腹腔内とするのが一般的

Table 2. Appearance of spots having various causes

Cause	Spot location	Color
Uncovering of recessive at marked loci (RS)	Random	Brown Shades of tan or gray White
mutation of wild-type allele deficiency involving wild-type allele chromosomal loss (breakage or nondisjunction) homozygosity through somatic recombination		
Dominant mutation at other locus (RS)	Random	Various
Pigment cell insufficiency (cytotoxicity, WMVS)	Midventral	White
Misdifferentiation	Associated with non-black areas or mid-forehead	Agouti-like or yellowish

This table was cited from reference No. 7.



である。

処理した雌を個別に飼育してF<sub>1</sub>を出産させる。出産後できるだけ早く、生死別産仔数、性比および外形異常（特に後肢の趾と尾）について観察する。その後、毛が均一に生え揃う生後11~14日に仔の数、性比およびスポットをRS, WMVS, MDS 別に観察する。また、外形異常（特に水頭症）についても観察する。さらに、離乳時にこれらの観察を繰り返して最終判定とし、それぞれの出現頻度を求める。最終判定時に観察したF<sub>1</sub>が1群当り200個体位になるように妊娠雌を揃える。検体投与時の色素細胞が200個とすると4万の標的細胞で screening したことになる。しかし、色素細胞の数はあくまでも概算なので、この系では正確な変異率を求めることはできない。

#### 4 研究の成果

Table 1 に示したように、スポットテストでは交配に用いる系統によって、スポット形成に関与する遺伝子が3~7と異なる。しかし、特定座位法の結果から判るように遺伝子にも変異を受け易いものと受けにくいものがあり<sup>8)</sup>、一概に標識遺伝子が多いほど感受性が高いとは言えないようである。感受性に関して、土川<sup>9)</sup>は、C57BL×PWと KYG×PW との交配を比較して、ENU に対しては後者の方がはるかに感受性が高いことからスポット形成に関与する遺伝子が同じであっても、用いる雌マウスの系統により感受性に差のあることを報告している。MMS 分科会の共同研究において、C57BL/6 および C57BL/10 とその congenic line 3 系統の雌と PW 雄マウスとの交配で ENU に対する感受性を調べたが系統差はみられなかった。この時得られたデータに研究室間で大きなばらつきはなく、スポットテストは再現性のよいことが実証された。

Fig. 2 に共同研究の一環として著者の研究室で行った ENU のスポットテストの結果を Fig. 3 に W. L. Russell<sup>10)</sup> による ENU のマウス精原細胞に対する特定座位法の結果を示した。スポットテストにおいて外形異常および WMVS には見

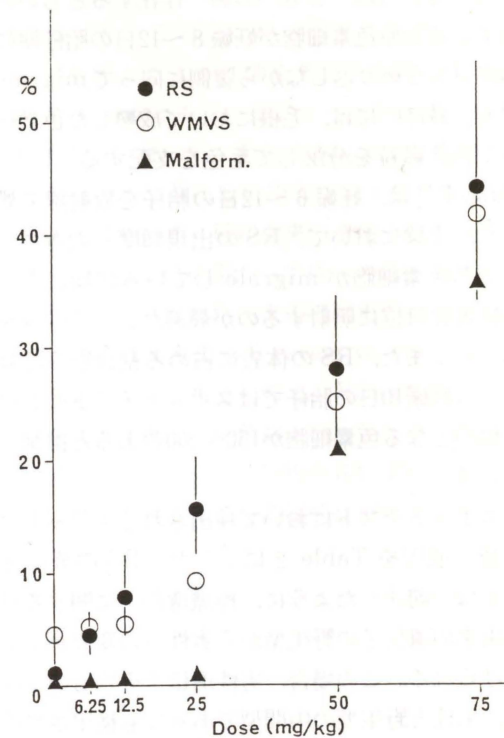


Fig. 2. Frequencies of ENU-induced recessive spots, white midventral spots and malformations

かけ上の閾値があるが、RS の頻度は投与量の増加とともに直線的に増加している。一方、特定座位法の低用量域では無処理対照群と100mg/kg群の値を結ぶ直線より低い値を示す。これらのことから、精原幹細胞では体細胞と違って効率よく修復機構が働いていると考えられる。さらに、スポットテストでは特定座位法では検出できないような変異でも検出可能だと考えられている。従って、スポットテストは特定座位法より感度がよいことになる。事実、成熟分裂以後の生殖細胞も含め、特定座位法で陽性となった化合物はもちろんのこと、その他多くの化合物でスポットテスト陽性の結果が得られている。このことから、スポットテストが単に特定座位法の pre-screening としての価値だけでなく、癌原性との相関性を判断する資料の一つとして有用という考えがでてくる。

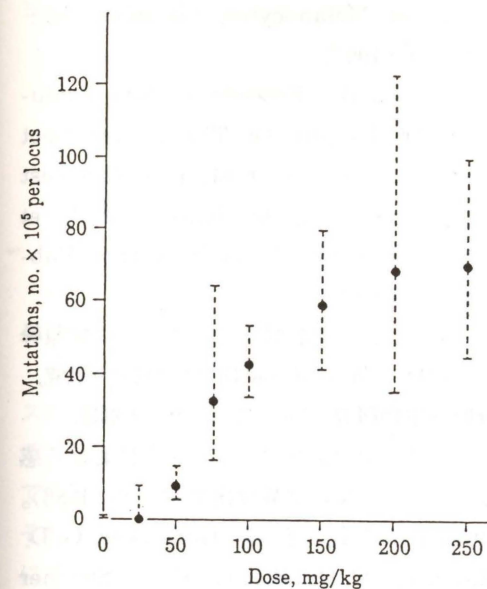


Fig. 3. Frequencies of ENU-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia (cited from reference No.10)

Styles と Penman<sup>11)</sup> の報告を参考にして、Table 3 にスポットテストと発癌性試験の相関性を示した。彼らは約60の化合物を review しているが、そのうち abstract paper だけの報告とマウスあるいはラットでの in vivo の発癌性試験が実施されていない物質を除いた約50種について

まとめた。スポットテストと発癌性試験の結果が一致しない10種のうち、スポットテストが陽性で発癌性は陰性の化合物は2-aminopurineのみである。このことから、スポットテストで陽性となれば高い確率で発癌性も陽性といえるのではないかと考えられる。逆に、スポットが陰性で発癌性は陽性という化合物に関しては、代謝を含めた生体内動態を考慮する必要がある。この範疇に入れられる9化合物のうちには、ラットでの発癌性試験では陽性であるが、スポットテストと同じ種であるマウスでは陰性結果となっているものや、スポットテストでも発癌性試験でも陽性を示す化合物の基本骨格に置換基が付くとスポットテストのみで陰性となるものが含まれている。これらはそれぞれ代謝に種特異性があったり、活性代謝産物が胎児に到達しなかったと考えることができる。スポットテストで陰性となり、しかも外形異常や WMVS が観察されなかった場合には、検体あるいはその代謝産物が胎盤を通過できなかったことも考えられる。

#### 5 終りに

スポットテストと発癌性試験における結果の一致率は現在約80%となっている。しかし、このような比較をするには、まだまだスポットテストのデータが不足しているので、この試験系を1つでも多くの研究機関で開始されることを願って稿を

Table 3. Comparison of results from the spot test with those from cancer and bacterial mutation assays

Spot test	Cancer	Bacteria	No. of chemicals	
+	+	+	31	(36)
+	+	-	4	
+	-	+	1	
<hr/>				
-	+	+	6	(12)
-	+	-	3	
-	-	+	2	
-	-	-	1	



終りたい。

#### 参考文献

- 1) Russell, L.B. and M.H. Major, Radiation-Induced Presumed Somatic Mutations In The House Mouse, Genetics, 42: 161-175 (1957).
- 2) Hart, J., The mouse spot test: Results with a new cross, Arch. Toxicol., 58: 1-4 (1985).
- 3) Tutikawa, K., Y. Harada and K. Moriwaki, Origin and Genetic Background of Three Substrains in Inbred PW Mouse Strain, Annual Report of Natl. Inst. of Genetics, Japan 36: 68 (1986).
- 4) Fahrig, R., The Mammalian Spot Test (Fellflecken test) with Mice, Arch. Toxicol., 38: 87-98 (1977).
- 5) Schaible, R.H. and J.W. Gowen, Delimitation of coat pigment areas in mosaic and piebald mice, Genetics, 45: 1010 (1960).
- 6) Mintz, B., Gene Control of Mammalian Pigmentary Differentiation, I. Clonal

Origin of Melanocytes, Genetics, 58: 344-351 (1967).

- 7) Russell, L.B., Procedures And Evaluation Of Results Of The Mouse Spot Test, in Handbook Of Mutagenicity Test Procedures, eds. by Kilbey, B.J. et al., pp 393-403, Elsevier Science Publishers, (1984).
- 8) 一ツ町晋也, 化学物質に対するマウス精原幹細胞の反応 W.L. Russell らの最近の研究, 放射線生物研究, 19: 241-248 (1984).
- 9) 土川 清, マウススポットテストにおける感度の系統差, 環境変異原研究, 8: 43 (1986).
- 10) Russell, W.L., P.R. Hunsicker, G.D. Raymer, M.H. Steele, K.F. Stelzner and H.M. Thompson, Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 3589-3591 (1982).
- 11) Styles, J.A. and M.G. Penman, The mouse spot test: Evaluation of its performance in identifying chemical mutagens and carcinogens, Mutat. Res., 154: 183-204 (1985).

## マウス小核試験

—その特徴と評価—

国立衛生試験所 変異原性部 林 真

### はじめに——小核試験の歴史——

変異原の in vivo 短期検索法の 1 つとしてマウスの骨髓を用いる小核試験が広く用いられている。哺乳類を用いる小核試験の発展を歴史的にみると、1890年と1905年に Howell と Jolly がそれぞれネコとラットの血液に見出した小体に始まる<sup>1)</sup>。これは Howell-Jolly 小体と呼ばれ、悪性貧血の患者の末梢の赤血球中等で観察され、今日小核試験において観察されるものと同一物である。

1959年に Evansら<sup>2)</sup> がソラマメの根端細胞に電離放射線を照射して小核が誘発されてくるのを観察し、これによって染色体異常の誘発を推定しようとした。これが小核の出現頻度により染色体異常の出現を推定しようとした最初の報告のようで、さらに彼らは染色体切断の約60%が小核の形成に関与していると報告している。

1970年に Boller と Schmid が trenimon をチャイニーズハムスターに投与し、骨髓と末梢の血液細胞中に出現する小核を観察し、本来無核の赤血球中に残存する小核の出現頻度を計測する試験法を提唱した<sup>3)</sup>。Mikrokern-Test (micronucleus test) と言う名称もこの論文で提唱されている。その後1973年頃までに Schmid のグループおよび Heddle によって今日の小核試験の基礎がつけられた<sup>4-7)</sup>。

1976年には Countryman と Heddle によりヒトの末梢リンパ球培養を実験材料とする小核試験法が報告<sup>8)</sup> され、その後方法に改良も加えられ、現在でもヒトの細胞を材料とする最も一般的な方法として用いられている<sup>9)</sup>。

1979年に Coleら<sup>10)</sup> および King と Wild<sup>11)</sup>

により被験物質を妊娠雌動物に投与し、胎盤を経由して胎仔に作用させ、出産直前の胎仔の肝臓（この時期には造血能がある）または末梢血中出现する小核が観察されている。この方法によって被験物質の胎盤通過性が調べられる他に MNG<sup>12)</sup> や DEN<sup>13)</sup> のように代謝活性化体の寿命の非常に短いものも効率良く検出できるとされている。

1980年に MacGregor らによりマウスの末梢血中出现する小核を観察する方法が報告された<sup>14)</sup>。ヒトやラットでは小核を有する赤血球は脾臓で破壊されるので実験材料として適切ではないが、マウスでは小核を有する赤血球の末梢血中への蓄積がみられる<sup>15-17)</sup>。これによって小核試験による化学物質の慢性的な作用を検討することが可能になりつつある。

1981-1983年には Lähdetie ら<sup>18, 19)</sup> および Tates ら<sup>20)</sup> により精巢を用いる小核試験が報告され、体細胞ばかりでなく生殖細胞における染色体異常誘発性も小核試験で検討できることが報告された。

1983年には米国 EPA の Gene Tox Program の小核委員会のレビューが完成し Mutation Research 誌に掲載された<sup>21)</sup>。このレビューは当時までの小核試験全般について非常によくまとめられており、小核試験に関係する人の必読書であろう。

1984年からは JEMS・MMS 分科会の小核試験研究グループによる共同研究が始まっている。これまでに「小核試験における性差について」（20機関参加）および「小核試験における系統差について」（25機関参加）の共同研究が終了して



おり、性差に関しては Mutation Research 誌に発表済みである<sup>22)</sup>。現在は第3回の共同研究が約40機関の参加者を得て「小核試験における投与経路の差について」のテーマで進められている。

以上のように小核試験を歴史的にみても、Boller と Schmid による論文<sup>3)</sup>が発表されて以来15年以上の年月が経過し、基礎的な研究はほぼ終了し今はたゞデータを出すのみとの感もある。しかし Gene Tox Program のレビューを見てもわかるように多くの相矛盾するデータの報告もあり、正当な評価を受け得るデータ（特に陰性データ）を出すには慎重でなければならないと同時にまだまだ工夫をこらす必要があることが痛感させられる。小核試験の結果を化学物質の変異原性の検索やがん原性の予測に用いるには、そのデータ自身が評価に耐え得るものでなければならない。そのためには小核試験の特徴を充分理解した上で最適な条件下での試験が必要である。

以下に小核試験の特徴（有用性と問題点）を骨髄を用いる染色体異常試験や姉妹染色分体交換（SCE）試験と対比しながら述べ、今後この試験を改良、発展させていくための基礎としたい。

また小核試験自体の評価を in vivo 染色体異常試験の結果、およびがん原性のデータと比較することにより考えてみたい。

#### 小核試験の特徴

表1に小核試験の特徴をまとめて示す。

表1 小核試験の特徴

1. 実験材料は核型による制約をうけない
2. 正確な判定（ギャップの問題がない）
3. 検出可能時間が長い（蓄積効果）
4. 紡錘体阻害剤の検出が可能
5. 安定したバックグラウンド
6. Colcemid や BUdR 処理は不用
7. 染色体異常の種類は判定不可
8. アーティファクトの影響の可能性

#### 1. 実験材料は核型による制約をうけない。

染色体異常試験や SCE 試験においては、分裂中期の染色体を直接観察するので染色体の大きさや本数により試験の精度や効率が大きく異なり、実験材料を選択する時にはその核型を充分考慮する必要がある。しかし、小核試験においては染色体を直接観察するのではなく、分裂間期の細胞における小核の有無を観察するので、実験材料の核型にとらわれることなく研究、実験の目的に合ったものを選択することができる。

これまでに報告された種として植物ではソラマメやタマネギの根端細胞を用いたもの<sup>23, 24, 25)</sup>、ムラサキツユクサやソラマメの花粉母細胞の減数分裂の時に生ずる小核を観察したもの<sup>26-29)</sup>などがある。動物ではげっ歯類を用いた報告がほとんどであるが、他に魚類を用いたもの<sup>30)</sup>、両性類<sup>31, 32)</sup>、さらに霊長類のサル<sup>4, 33)</sup>からヒト<sup>34-42)</sup>に至るまで多くの種を用いた小核試験の報告がある。

#### 2. 正確な判定ができる。

小核試験における異常の表現形は小さな核が存在するか否かであり、特にげっ歯類の骨髄細胞を用いる小核試験では本来核の無い赤血球の中に小さな核があるか無いかといった単純なものである。よって染色体異常試験でよく問題となるギャップとブレイクの問題もなく<sup>21)</sup>、個々の異常の判定は正確かつ客観的に行うことができる。また観察の対象となるのが赤血球であり、染色体異常試験や SCE 試験での分裂中期像に比べて観察細胞数を多くすることが可能であり、全体としてデータのばらつきも小さくなり観察結果の精度を高めることができる。

異常の表現形が単純であるという利点を生かし、標本観察の機械化がイメージアナライザやフローサイトメータを用いて試みられている<sup>43-46)</sup>。

#### 3. 検出可能時間が長い。

増殖している細胞を染色体異常を誘発するような化学物質で処理すると、分裂のサイクルが遅延

することは一般的に知られている。遅延の度合いは用いた化学物質の種類や処理量によって異なるので、細胞遺伝学的な試験においては被験物質で処理してから動物をと殺し、標本作製するまでの時間が結果に大きく影響する。小核試験においても化学物質の種類によって投与してから小核赤血球の出現頻度が最高になるまでの時間が異なることが報告されている<sup>21, 47, 48)</sup>。

小核試験の方が染色体異常試験に比べて検出可能時間が長いことを示す例を図1に示す<sup>49)</sup>。これは  $1-\beta-D$ -arabinofuranosylcytosine を腹腔内に25mg/kg投与し、投与後経時的にマウスをと殺し、骨髄細胞を大腿骨より回収し半量で小核試験用の塗抹標本を、残りの細胞を in vitro で20分間コルセミド処理を施した後染色体観察用のエアードライ標本作製した。図の各点は1群4匹の平均値で示してある。この図からも明らかに異常の検出可能時間は小核の方が染色体異常よりも長いことがわかる。一般に小核試験では骨髄中の多染性赤血球（脱核直後の幼若な赤血球）中の小核を観察するが、脱核後多染性赤血球として骨髄中に存在する時間は約20時間<sup>49)</sup>であり、その間小核を有する多染性赤血球は蓄積されている。一方マウス骨髄細胞のM期は約10分

間<sup>50)</sup>であり、コルセミド等分裂阻害剤で2時間分裂細胞を蓄積したとしても多染性赤血球の存在時間の約1/10にしかならない。このように小核赤血球の蓄積効果（詳細は本誌別稿参照）によって異常の検出可能時間が長くなる。

#### 4. 紡錘体阻害剤の検出が可能。

小核試験によって、染色体の構造異常を誘発する化学物質のみならず紡錘体阻害剤をも検出できることはよく知られている<sup>51-57)</sup>。また紡錘体阻害剤によって誘発された小核は、構造異常を起すものによって誘発されたものより大きいことがマウスの骨髄細胞（表2）<sup>55)</sup>およびヒトの培養リンパ球<sup>57)</sup>において示されている。紡錘体阻害剤による小核の生成機構は未だに明確に示されていないが、染色体の断片ではなく、1本または数本の染色体によって1つの小核が形成されている可能性があり、そのために大きな小核が作られるようである。しかしながら、マウスで polyploid や aneuploid を誘発する diethylstilbaestrol-dipropionate<sup>58)</sup>や酵母で aneuploid を誘発する有機溶媒<sup>59)</sup> (acetone, methyl ethyl ketone, ethyl acetate, 2-methoxy ethyl acetate) はマウスとチャイニーズハムスターを用いた小核試

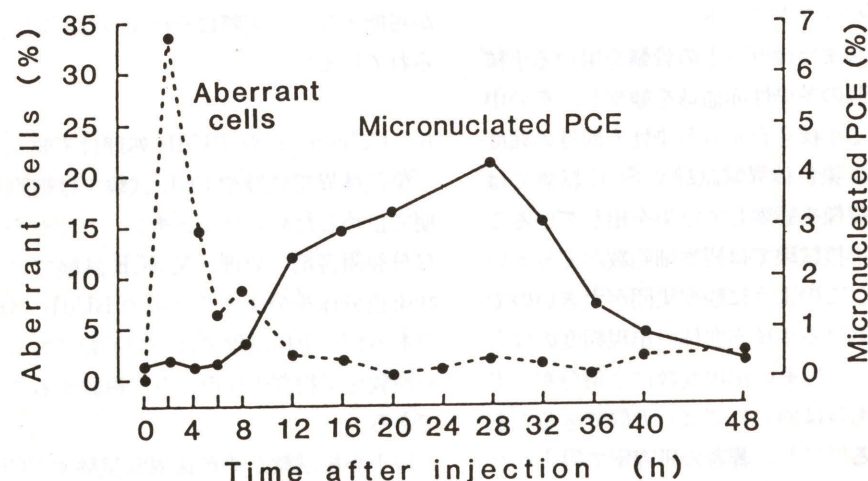


図1 Ara-C 25mg/kg投与後の経時変化  
各点はマウス4匹の平均値



表2 化学物質による小核の大きさの違い

Chemical	Dose (mg/kg)	MNE(%)	Type of MNE		
			d < D/4	d ≥ D/4	(%)
TEM	0.3	1.81	98	2	(2.0)
MMC	3	1.89	195	5	(2.5)
Ara-C	50	2.67	99	1	(1.0)
6-MP	100	3.00	98	2	(2.0)
VCR	0.125	3.07	26	74	(74.0)
COL	0.625	0.47	46	54	(64.0)
COLC	10	0.57	56	44	(44.0)
ANSA	0.33	0.74	47	53	(53.0)
Untreated		0.14	98	2	(2.0)

分献(55)のTable 1よりその一部を引用

d:小核の直径, D:赤血球の直径

TEM: triethylenemelamine, MMC: mitomycin C,

Ara-C: 1-β-D-arabinofuranosylcytosine,

6-MP: 6-mercaptopurine, VCR: vincristine,

COL: colchicine, COLC: colcemid, ANSA: ansamitosin

験で共に陰性の結果を示しており、紡錘体阻害剤による小核生成機構ならびに小核形成と aneuploid 形成の関係等の解明が今後に残された大きな課題である。

##### 5. 安定したバックグラウンド

一般にマウスまたはラットの骨髓を用いる小核試験では1000個の多染性赤血球を観察し、その中に出現してくる小核を有する多染性赤血球の頻度を求めている。染色体異常試験や SCE 試験では50核前後の分裂像を観察して結果を出していることからすれば小核試験では観察細胞数が充分多いことがわかる。このように観察集団が大きいので陰性対照群における小核赤血球の出現頻度のばらつきも小さく、またその出現度数は2項分布(ポアソン分布でもほぼ同じ)でよく近似できることが示されている<sup>60-63)</sup>。著者の研究室で得られた陰性対照群における小核を有する多染性赤血球(MNPCE)の背景データのヒストグラム<sup>63)</sup>を

図2に示す。破線は $p=0.002$ ,  $n=1000$ の2項分布を示しており、実際の観察値が理論値とよく一致していることがわかる。このことは小核試験の結果を統計学的に評価する上で非常に有利であり、既知母集団からの資料と考えて処理することが可能となり、実際にそのような判定方法も考えられている<sup>63)</sup>。

##### 6. Colcemid や BUdR 処理は不要

染色体異常試験や SCE 試験では細胞分裂を中期で止めるためのコルヒチン、コルセミドのような分裂阻害剤の処理、又 SCE 試験ではさらに姉妹染色分体を分染するための BUdR 処理が必要であるが、小核試験では一切不要である。そのため被験化学物質の作用のみを検討することが可能である。

以上小核試験が染色体異常試験や SCE 試験と比較して勝っている点について述べてきた。次に小核試験において問題となる点にもふれてみた

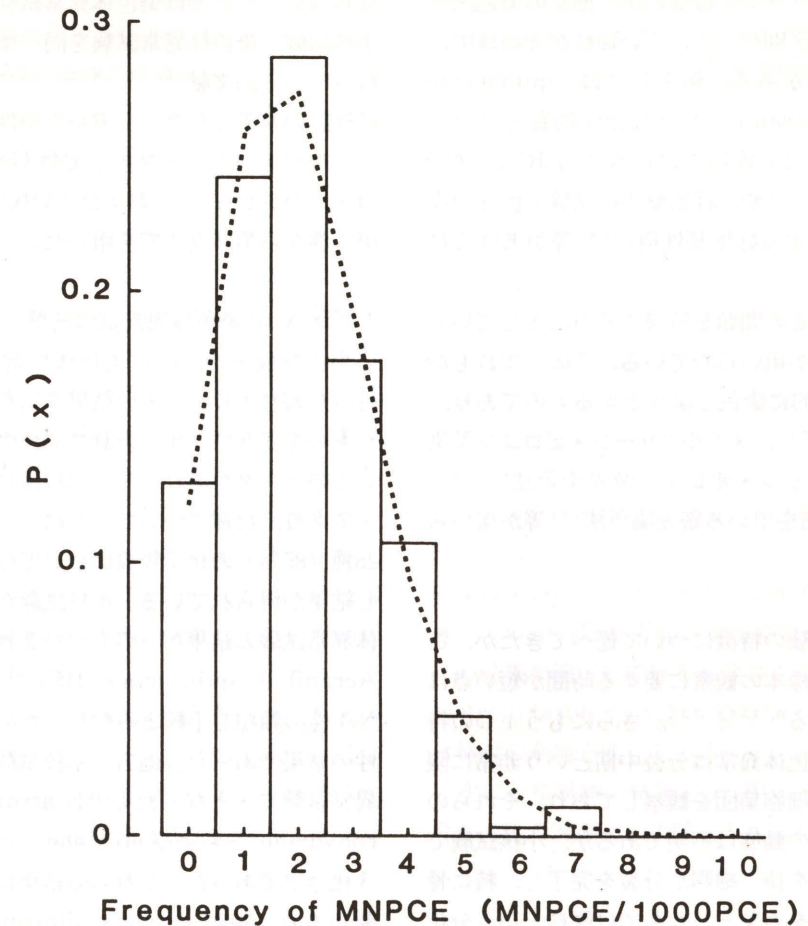


図2 陰性対象群における MNPCE の出現頻度

破線: 二項分布 ( $p=0.002$ ,  $n=1000$ )

い。

##### 7. 染色体異常の判定は不可

染色体の構造異常の内、交換型の異常をよく誘発する化学物質の方が単純なギャップや切断を主に誘発するものより癌原性物質である可能性が高いとする考えもある<sup>64, 65)</sup>。この考えに基づけば、染色体異常試験では誘発された構造異常の種類を結果の判定に含めることにより被験化学物質の癌原性予測に重要な情報をもたらすことが期待できるが、小核試験においてはこの種の情報を得ることは不可能である。小核の形態より得ることのできる情報としては、その大きさより紡錘体阻

害剤であるかどうかの予測ができる程度である<sup>55, 57)</sup>。

##### 8. アーティファクトの影響の可能性

小核試験の結果に影響をおよぼすアーティファクトとしては、ラットの骨髓標本でよくみられる肥満細胞の顆粒をギムザ液で染色したものが最も一般的なものである<sup>66-69)</sup>。マウスではほとんど観察されないが、ラット、特に Fisher 344 では骨髓中に肥満細胞が多く<sup>69)</sup> 通常の染色法では本来の小核との識別が困難であり、観察に支障をきたす。アーティファクトとしてはこれの他に球菌、染色色素のかたまり等が考えられる。



アーティファクトではないが、通常の染色法で本来の小核と区別が付きにくい顆粒が赤血球中に出現する場合がある。例としては、quinacrine・2HCl や acranil のような化学物質をマウスに投与した時に赤血球中に出現する RNA 性の顆粒<sup>67, 68, 70, 71)</sup>や、経胎盤小核試験で胎仔の赤血球中に出現する好塩基性斑点<sup>68)</sup>等があげられる。

この小核同定の問題を解決する方法としていくつかの染色法が用いられている。そのいずれもが DNA を特異的に染色しようとするものであり、Feulgen反応<sup>70)</sup>、メチルグリーン・ピロニン Y 染色<sup>71)</sup>、アクリジン・オレンジ蛍光染色法<sup>67, 68)</sup>、ヘキスト33258を用いる蛍光染色法<sup>72)</sup>等が用いられている。

以上小核試験の特徴について述べてきたが、これらの他にも標本の観察に要する時間が短い点によく指摘される<sup>6, 7, 53, 73)</sup>。さらにもう1つの特徴として、染色体異常は分裂中期という非常に限られた時期の細胞集団を観察しており、それらの細胞のその後の動態は不明であるが、小核試験では染色体異常を持つ細胞が分裂を完了し、特に骨髓中の赤血球を対象とした系では脱核という分化の過程を経た細胞集団を観察対象としている点を掲げることができる。このことは生体内に生き残る可能性のある異常細胞を検出していることであり、細胞遺伝毒性を考える上で興味深い点である。

小核試験はあくまで染色体異常試験の簡便法である<sup>74)</sup>との考えが強いようであるが、ここまでみてきた小核試験の特徴を総合すると、単なる簡便法ではなく十分な特性を持った細胞遺伝学的試験法であると言える。

#### 小核試験結果の評価

小核試験の結果を評価するために in vivo 染色体異常試験の結果およびがん原性のデータとの比較について述べる。+/-の結果を比較検討する時に重要なことは、どのデータベースの情報を用いるかで、データの出典が明らかでなければ

ならない。ここでは染色体異常試験との比較は、小核試験と染色体異常試験を同一条件下で同時に行っている23文献<sup>35, 37, 38, 71, 75-93)</sup>の結果を比較検討の対象とした。一方がん原性との比較検討のためのデータベースとしては Gene-Tox Program のレビュー<sup>21)</sup>および IARC のモノグラフ第1巻から第36巻までを用いた。

#### 1. In vivo 染色体異常試験結果との相関

小核試験と in vivo 染色体異常試験を同時に行った報文より+/-の結果を切り出し、まとめたものを表3に示す。合計で33種の化学物質についてのデータがあり、その内17種については共に+であり、11種については共に-の結果を示し計28種(85%)の化学物質については両試験系で同じ結果が得られている。小核試験が+であり染色体異常試験の結果が-のものが2物質、すなわち Acranil と quinacrine・2HCl<sup>70)</sup>であり共に RNA 性の顆粒を小核とみなしたために生じた偽陽性の結果であった。他方、小核試験が-で染色体異常試験で+となったものは atrazine, epichlorohydrine<sup>86)</sup>および ethylene dibromide<sup>92)</sup>の3化合物であった。これらの結果には再検討の必要があり、特に ethylene dibromide については1点のみで統計的に有意であるが用量依存性も認められず、もし染色体異常誘発性があったとしても非常に弱いものであると思われる。

表3 小核試験と in vivo 染色体異常試験結果の比較

小核	染色体異常	化合物数
+	+	17
-	-	11
+	-	2 (acranil, quinacrine)
-	+	3 (atrazine) (epichlorohydrine) (ethylene dibromide)

小核試験と染色体異常試験を同時に行ったデータに限定

以上を総合的にみると、小核試験と染色体異常試験の定性的な結果は予想通りほぼ同じと考えられる。しかし同一条件下で両実験を行っているデータは少なく、最終的な評価を下すには更にデータの蓄積が必要である。

#### 2. がん原性データとの相関

データベースを Gene-Tox Program と IARC モノグラフに限ったため、小核試験と実験動物に対するがん原性のデータがそろっている化学物質の数は74であった。実験動物に対するがん原性を、がん原性ありとするのに十分なデータがある(sufficient)、そのデータが量、質共に限られている(limited)、データはあるが評価するのに充分でない(inadequate)および評価に耐えるデータが複数あり、その範囲内ではがん原性なし(no evidence)の4種に分類し小核試験結果との比較を表4に示した。この表からもわかるように sufficient の化学物質の内小核+のものは19種あり、一方小核-のものも20種もある。この数だけから判断すると小核試験でがん原性物質を検出する効率は悪い印象を受ける。Gene-Tox

表4 動物への発がん性と小核誘発性との比較

IARC animal data	Micronucleus	
	Positive	Negative
Sufficient*	19	20
Limited	8	6
Inadequate	5	11
No evidence	0	5

IARC Monographs vol. 1~36 Gene Tox Program, Mutat. Res. (1983)

\*: 本文参照.

Program の集計でもがん原性物質の検出感度は50%となっている<sup>21)</sup>。しかしながらこのような結果は用いたデータベースに依存するところが大きく、Gene-Tox Program の評価で小核試験-の結果が確定しているものはこの20化合物の内 Metronidazole たゞ1つであり、他の陰性結果は検討の余地を残している。

次に小核試験の結果と IARC によるヒトへの発がん性の評価との相関をみたのが表5である。

表5 ヒトへの発がん性と小核誘発性との比較

IARC GROUP	Micronucleus test	
	Positive	Negative
1	5	1 (4-aminobiphenyl)
2 A	4	1 (o-toluidine)
2 B	4	9
3	4 (1-naphthylamine) (5-FU)(6-MP)(MTX)	6

IARC Monograph Supplement 4 (1982)

Gene Tox Program, Mutat. Res. (1983)

Group-1 : ヒトに発がん性があると断定できるもの

Group-2A : 多分発がん性があると思われる(疑いの強いもの)

Group-2B : 多分発がん性があると思われる(疑いが比較的弱い)

Group-3 : ヒトへの発がん性に対する評価が下せないもの



両者のデータがそろっている化学物質は全体で34しかなく、これだけのデータからは詳しい相関は求められないが、4-aminobiphenyl, とo-toluidineのような例外はあるものの、おおむね期待通りと考えることもできよう。

以上のように小核試験のデータをがん原性の予測に用いようとする、その検出感度は決して高くない。その原因の主なものとして実験条件が不備のために偽陰性の結果を出していることが考えられる。これは実際に小核試験を行っている者の責任であり、実験条件を充分検討して充分評価に耐え得るデータを出すことが最も重要なことであると思われる。小核試験に対する正当な評価を下すためにも信頼性の高いデータを集めたデータベースの構築が急がなければならない。

#### 参 考 文 献

- 1) Koyama, S. (1960) Studies on Howell-Jolly Body, Acta Haem. Jap., 23: 20-41.
- 2) Evans, H. J., G. J. Neary and F. S. Williamson (1959) The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen: Part II, Chromosome damage: the production of micronuclei, Int. J. Rad. Biol., 3: 216-229.
- 3) Boller, K. und W. Schmid (1970) Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo-Testsystem. Haematologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon, Humangenetik, 11: 35-54.
- 4) Matter, B. and W. Schmid (1971) Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species evaluated by the micronucleus test, Mutat. Res., 12: 417-425.
- 5) von Ledebur, M. and W. Schmid (1973) The micronucleus test. Methodological aspects, Mutat. Res., 19: 109-117.
- 6) Schmid, W. (1973) chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells, Agents and Actions, 3/2: 77-85.
- 7) Heddle, J. A. (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage, Mutat. Res., 18: 187-190.
- 8) Countryman, P. I. and J. A. Heddle (1976) The production of micronuclei form chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, Mutat. Res., 41: 321-332.
- 9) Shinkawa, K. and K. Morimoto (1986) Micronucleus assay in human lymphocytes. Application as an index for genetic epidemiology, Toxycol. Forum, 9: 619-627.
- 10) Cole, R. J., N. A. Taylor, J. Cole and C. F. Arlett (1979) Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test, Nature (London), 227: 317-318.
- 11) King, M. -T. and D. Wild (1979) Transplacental mutagenesis: The micronucleus test on fetal mouse blood, Hum. Genet., 51: 183-194.
- 12) Yamamoto, K. I. and Y. Kikuchi (1984) Induction of micronuclei in mouse fetal liver after exposure in utero to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Mutat. Res., 128: 173-179.
- 13) Cole, R. J., J. Cole, L. Henderson, N. A. Taylor, C. F. Arlett and T. Regan (1983) Short-term tests for transplacentally active carcinogens. A comparison of sister-chromatid exchange and the micronucleus test in mouse foetal liver erythrocytes, Mutat. Res., 113: 61-75.
- 14) MacGregor, J. T., C. M. Wehr and D. H. Gould (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of a improved micronucleus test, Environ. Mutagen., 2: 509-514.
- 15) Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1982) The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: Detection of chronic chromosome breakage in mice, Mutat. Res., 104: 367-369.
- 16) Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1983) A rapid screen for cumulative chromosomal damage in mice. Accumulation of circulating micronucleated erythrocytes, Mutat. Res., 113: 481-487.
- 17) Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1984) The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: Implications for cytogenetic screening, Mutat. Res., 127: 169-174.
- 18) Lahdetie, J. and M. Parvinen (1981) Meiotic micronuclei induced by x-rays in early spermatids of the rat, Mutat. Res., 81: 103-115.
- 19) Lahdetie, J. (1983) Meiotic micronuclei induced by adriamycin in male rats, Mutat. Res., 119: 79-82.
- 20) Tate, A. D., A. J. J. Dietrich, N. de Vogel, I. Neuteboom and A. Bos (1983) A micronucleus method for detection of meiotic micronuclei in male germ cells of mammals, Mutat. Res., 121: 131-138.
- 21) Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salamone (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutat. Res., 123: 61-118.
- 22) The Collaborative Study Group for the Micronucleus test (1986) Sex difference in the micronucleus test, Mutat. Res., 172: 151-163.
- 23) Degraffi, F. and M. Rizzoni (1982) Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in freshwater pollution, Mutat. Res., 97: 19-33.
- 24) Diehl-Marshall, I. and M. Bianchi (1981) Induction of micronuclei in bean roots by 250 GeV hadrons, Radiat. Environ. Biophys., 19: 117-124.
- 25) Cortes, F., P. Escalza, J. Moreno and J. L. Lopez-Campos (1982) Effects of the fungicide Tridemorph on mitosis in *Allium cepa*, Cytobios, 34: 181-190.
- 26) Ma, T. -H. (1979) Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. A promising mutagen test system, Mutat. Res., 64: 307-313.
- 27) Ma, T. -H. (1981) *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening, Environ. Health Perspect., 37: 85-90.
- 28) Ma, T. -H., T. Fang, J. Ho, D. Chen, R. Zhou, G. Lin, J. Dai and J. Li (1982) Extraordinary high micronucleus frequency induced by X-ray in a special clone of *Tradescantia reflexa*,



- Mutat. Res., 194 : 101-103.
- 29) Janakiraman, R. and P. M. Harney (1976) Effects of ozone on meiotic chromosomes of *Vicia faba*, Can. J. Genet. Cytol., 18 : 727-730.
  - 30) Hoofman, R. N. and W. K. de Raat (1982) Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate, Mutat. Res., 104 : 147-152.
  - 31) Siboulet, R., S. Grinfeld, P. Deparis and A. Jaylet (1984) Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* Michah : Induction with X-rays and chemicals, Mutat. Res., 125 : 275-281.
  - 32) Grinfeld, S., A. Jaylet, R. Siboulet, P. Deparis and I. Chouroulinkov (1986) Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* after treatment with benzo(a)pyrene : Dependence on dose, length of exposure, posttreatment time, and uptake of the drug, Environ. Mutagen., 8 : 45-51.
  - 33) Michelmann, H. W., P. Maier, G. Fiscor and D. B. Feldman (1978) Bone marrow and lymphocyte cytogenetics of Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) treated with the clastogen mitomycin C, Mutat. Res., 57 : 77-84.
  - 34) Goetz, P., R. J. Sram and J. Dohnalova (1975) Relationship between experimental results in mammals and man. I. Cytogenetic analysis of bone marrow injury induced by a single dose of cyclophosphamide, Mutat. Res., 31 : 247-254.
  - 35) Goetz, P., R. J. Sram, I. Kodytkova, J. Dohnalova, O. Dostalova and J. Bartova (1976) Relationship between experimental results in mammals and man. 2. Cytogenetic analysis of bone marrow cells after treatment of cytembena and cyclophosphamide-cytembena combination, Mutat. Res., 41 : 143-152.
  - 36) Jensen, M. K., G. G. Rasmussen and S. Ingerberg (1979) Cytogenetic studies in patients treated with penicillamine, Mutat. Res., 67 : 357-359.
  - 37) Jensen, M. K. and A. Nyfors (1979) Cytogenetic effect of methotrexate on human cells in vivo : Comparison between results obtained by chromosome studies on bone-marrow cells and blood lymphocytes and by the micronucleus test, Mutat. Res., 64 : 339-343.
  - 38) Abe, T., T. Isemura and Y. Kikuchi (1984) Micronuclei in human bone-marrow cells : Evaluation of the micronucleus test using human leukemia patients treated with antileukemic agents, Mutat. Res., 130 : 113-120.
  - 39) Stich, H. F., J. Curtis and B. B. Parida (1982) Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk group : Tobacco chewer, Int. J. Cancer, 30 : 553-559.
  - 40) Stich, H. F., W. Stich and B. B. Parida (1982) Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer : Betel quid chewers, Cancer Lett., 17 : 125-134.
  - 41) Stich, H. F. and M. P. Rosin (1983) Quantitating the synergistic effects of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells, Int. J. Cancer, 31 : 305-308.
  - 42) Stich, H. F. and M. P. Rosin (1984) Micronuclei in exfoliated human cells at a tool for studies in cancer risk and cancer intervention, Cancer Letter, 22 : 241-253.
  - 43) MacGregor, J. T., R. Schlegel, W. N. Choy and C. M. Wehr (1983) Micronuclei in circulating erythrocytes : A rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice. In : Developments in the Science and Practice of Toxicology (A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya eds.) pp. 555-558, Elsevier.
  - 44) Hutter, K. J. and M. Stohr (1982) Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry, Histochemistry, 75 : 353-362.
  - 45) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Sawada and M. Ishidate, Jr. (1986) An application of flow cytometry to the micronucleus test, I. Technical aspects, Mutat. Res., 164 : 266-267.
  - 46) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, M. Hayashi, A. Matsuoka and M. Sawada (1986) Development of the method to detect in vivo cytogenetic effects of environmental pollutant chemicals at low dose level, 環境保全研究成果集, 28-1-14.
  - 47) Salamone, M., J. A. Heddle, E. Stuart and M. Katz (1980) Towards an improved micronucleus test : Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene, Mutat. Res., 74 : 347-356.
  - 48) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1984) A pilot experiment for the micronucleus test. The multi-sampling at multi-dose levels method, Mutat. Res., 141 : 165-169.
  - 49) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1984) Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, Mutat. Res., 127 : 129-137.
  - 50) Frindel, E., Tubiana, M. and F. Vassort (1967) Generation cycle of mouse bone marrow, Nature (London), 214 : 1017-1018.
  - 51) Maier, P. and W. Schmid (1976) Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test, Mutat. Res., 40 : 325-338.
  - 52) Bruce, W. R. and J. A. Heddle (1979) The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, Salmonella, and sperm abnormality assays, Can. J. Genet. Cytol., 21 : 319-334.
  - 53) Tsuchimoto, T. and B. E. Matter (1979) In vivo cytogenetic screening methods for mutagens, with special reference to the micronucleus test, Arch. Toxicol., 42 : 239-248.
  - 54) Jenssen, D. and C. Ramel (1980) The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested, Mutat. Res., 75 : 191-202.
  - 55) Yamamoto, K. I. and Y. Kikuchi (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, Mutat. Res., 71 : 127-131.
  - 56) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1982) High-sensitivity in micronucleus induction of a mouse strain (MS), Mutat. Res., 105 : 253-256.
  - 57) Hogstedt, B. and A. Karlsson (1985)



- The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used, *Mutat. Res.*, 156 : 229-232.
- 58) Henderson, L. and T. Regan (1985) Effects of diethylstilboesterol-dipropionate on SCEs, micronuclei, cytotoxicity, aneuploidy and cell proliferation in maternal and foetal mouse cells treated in vivo, *Mutat. Res.*, 144 : 27-31.
  - 59) Basler, A. (1986) Aneuploidy-inducing chemicals in yeast evaluated by the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 174 : 11-13.
  - 60) Hart, J. W. and H. Engberg-Pedersen (1983) Statistics of the mouse bone-marrow micronucleus test : Counting, distribution and evaluation of results, *Mutat. Res.*, 111 : 195-207.
  - 61) Salamone, M. F. and J. A. Heddle (1983) The bone marrow micronucleus assay : Rationale for a revised protocol. In *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, vol. 8 (de Serres, F. J. ed.), pp 111-149, Plenum Press.
  - 62) Amphlett, G. E. and G. G. Delow (1984) Statistical analysis of the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 128 : 161-166.
  - 63) Hayashi, M., M. Yamazaki, Y. Kikuchi and M. Ishidate, Jr. (1985) Use of historical control data for assessing micronucleus test data, *Toxicol. Forum*, 8 : 48-57.
  - 64) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni and K. Yoshikawa (1981) Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. In *Mutation, Promotion and Transformation In Vitro*, Gann Monograph vol. 27 (N. Inui, T. Kuroki, M. A. Yamada and C. Heiderlberger ed.), pp 95, Japanese Scientific Society Press.
  - 65) 佐々木正夫 (1982) 染色体異常, 環境と人体 ; I, 生体影響の検出 (中馬一郎・近藤宗平・武部 啓 編) pp 241-256, 東京大学出版会.
  - 66) Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31 : 9-15.
  - 67) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 120 : 241-247.
  - 68) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An Acridine Orange staining method in the micronucleus test, *Toxicol. Forum*, 6 : 419-425.
  - 69) Gollapudi, B. B., V. A. Linscombe and A. K. Sinha (1983) A note on the utility of Fischer-344 rat in the micronucleus test, *Toxicol. Lett.*, 17 : 201-204.
  - 70) Jenssen, D., C. Ramel and R. Goethe (1974) The induction of micronuclei by frameshift mutagens at the time of nucleus expulsion in mouse erythroblasts, *Mutat. Res.*, 26 : 553-555.
  - 71) Maier, P. and W. Schmid (1975) The non-induction of micronuclei by quinine, *Mutat. Res.*, 30 : 299-302.
  - 72) MacGregor, J. T., C. M. Wehr and R. G. Langlois (1983) A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutat. Res.*, 120 : 269-275.
  - 73) Matter, B. E. and J. Grauwiler (1974) Micronuclei in mouse bone-marrow cells. A simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberration, *Mutat. Res.*, 23 : 239-249.
  - 74) Ashby, J. (1983) The unique role of rodents in the detection of possible human carcinogens and mutagens, *Mutat. Res.*, 115 : 177-213.
  - 75) Basler, A. and G. Roehrborn (1981) Lack of mutagenic effects of halothane in mammals in vivo, *Anesthesiology*, 55 : 143-147.
  - 76) Bempong, M. A. and R. M. Butts (1976) Further studies on the histological, cytological and cytogenetic effects on Nogalamycin in mammals, *Mutat. Res.*, 40 : 251-260.
  - 77) Charles, D. and A. Leonard (1978) Mutagenicity tests with phenylbutazone in mammals, *Toxicol. Lett.*, 2 : 225-230.
  - 78) Connor, T. H., J. Meyne, L. Molina and M. S. Legator (1979) A combined testing protocol approach for mutagenicity testing, *Mutat. Res.*, 64 : 19-26.
  - 79) Hite, M., H. Skeggs, J. Noveroske and H. Peck (1976) Mutagenic evaluation of ronidazole, *Mutat. Res.*, 40 : 289-304.
  - 80) Jellema, M. M. and J. L. Schardein (1975) Comparison of two methods for determining the cytogenetic effects induced by triethylenemelamine, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31 : 107-113.
  - 81) Kliesch, U., N. Danford and I. D. Adler (1981) Micronucleus test and bone-marrow chromosome analysis. A comparison of 2 methods in vivo for evaluating chemically induced chromosomal alterations, *Mutat. Res.*, 80 : 321-332.
  - 82) Kliesch, U. and I. D. Adler (1983) Chromosome analysis and micronucleus test in mouse bone marrow are not equally sensitive as shown by results with 5 chemical mutagens, *Mutat. Res.*, 113 : 340-341.
  - 83) Krishna, G., J. Xu, J. Nath, M. Petersen and T. Ong (1985) In vivo cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide, *Mutat. Res.*, 158 : 81-87.
  - 84) Luca, D., C. Barbarasa and F. Postica (1981) Cytosar-induced micronuclei and chromosomal aberrations in mouse bone-marrow cells, *Mutat. Res.*, 91 : 67-69.
  - 85) Luca, D., L. Raileanu, V. Luca and R. Duda (1985) Chromosomal aberrations and micronuclei induced in rat and mouse bone marrow cells by sodium nitrate, *Mutat. Res.*, 155 : 121-125.
  - 86) Matter, B. E. (1976) Failure to detect chromosome damage in bone-marrow cells of mice and Chinese hamsters exposed in vivo to some ergot derivatives, *J. Int. Med. Res.*, 4 : 382-392.
  - 87) Peter, S., G. E. Palme and G. Roehrborn (1979) Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons III. Monitoring genetic hazards of benz(a)anthracene, *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, 27 : 199-204.
  - 88) Renner, H. W. and R. Muenzner (1978) Mutagenic evaluation of single cell protein with various mammalian test systems, *Toxicol.*, 10 : 141-150.
  - 89) Renner, H. W. and J. Wever (1983) Attempts to induce cytogenetic effects



with sulphite in sulphite oxidase-deficient Chinese hamsters and mice, Food Chem. Toxicol., 21: 123-127.

- 90) Roehrborn, G. and A. Basler (1977) Cytogenetic investigations on mammals, comparison of the genetic activity of cytostatics in mammals, Arch. Toxicol., 38: 35-43.
- 91) Rohrborn, G., H. G. Miltenburger, A. Basler and R. Strobel (1980) Testing propafenone hydrochloride in the Ames salmonella microsome system and in mammalian cytogenetic system (bone marrow, spermatogonia), Arz-

neimittelforsch., 30: 2084-2087.

- 92) Siou, G., L. Conan and M. EL Haitem (1981) Evaluation of the clastogenic action of benzene by oral administration with 2 cytogenetic techniques in mouse and Chinese hamster, Mutat. Res., 90: 273-278.
- 93) Tate, A. D., A. T. Natarajan, N. de Vogel and M. Meijers (1977) A correlative study on the genetic damage induced by chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia of mice, Mutat. Res., 44: 87-95.

環境変異原研究 9: 87-96 (1987)

シンポジウム「変異原の in vivo 短期検索法——有用性と問題点——」

## $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法

国立がんセンター研究所 生化学部 山下 克 美

### 1. はじめに

環境中の種々の化学物質が生体に取り込まれ突然変異原性を示す際には、DNA 塩基の修飾や鎖切断などの DNA の傷害を伴う。その後、修復がおこり、修復されなかった傷害や誤って修復されたものが、突然変異として固定され、がんをはじめとした種々の疾患の原因となる。これら一連の過程における最初の事象である DNA の修飾に着目して、付加体形成の強さから発がん性を推定したり、ヒトの化学物質への暴露量を測定することが行なわれている<sup>1, 2)</sup>。テスト化合物を $^3\text{H}$ や $^{14}\text{C}$ でラベルし、その放射活性を測定する方法や、紫外吸収やマススペクトルを測定する方法が代表的なものである。また最近では、化学物質-DNA 付加体に対し、特異的なモノクローナル抗体を用いて検出する事も行なわれている。

我々は、近年 Randerath らによって開発された $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法を利用して、化学物質による DNA 修飾を検出する事を試みている<sup>3, 4)</sup>。この方法は、ラベルした化学物質を用いる事なく、比較的短時間で、極めて高感度に化学物質による DNA 修飾を検出する方法である。これまでの実験で我々が得た結果をもとに、この方法について述べてみたい。

### 2. $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の原理

この方法は、原理的には以下の4つの連続した過程から成る(図1)。

- 1) 修飾を受けた DNA を2つの核酸分解酵素によって、3'-mononucleotides に分解する。
- 2) 3'-mononucleotides へ T4 polynucleo-

tide kinase の酵素反応により、 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP から $^{32}\text{P}$ を5'-OHの位置へ転移し、5'- $^{32}\text{P}$ -deoxyribonucleoside 3', 5'-diphosphates を得る。

- 3) 正常ヌクレオチドを除去する。

- 4) 薄層クロマトグラフィー (TLC) により付加体を二次元展開し、オートラジオグラフィーにより検出する。

図2に示されている様に、3)と4)のステップは、実際には1枚のシート上で行う。ここでは、弱塩基性イオン交換体であるポリエチレンジアミン (PEI) セルロースの薄層シートを用いる。試料をスポットした後、1.1M LiCl で図2のD<sub>1</sub>方向へ展開すると正常 nucleotides のみを移動させ、付加体を origin (OR) にとどめる事が可能である。展開後、破線の部分で切り放し、2.5M ギ酸アンモニウム (pH3.5) で展開し、同様に破線の位置で切り放し、OR を含むシートの小片を得る。このシートを、尿素を含むギ酸リチウム (pH3.5) で展開し (D3) その後、尿素を含む Tris-HCl-LiCl (pH8.0) で前回に対して直角の方向に展開し (D4)、二次元展開を行う。現在は、D1の展開を1M sodium phosphate (pH 6.8) で行うことで正常ヌクレオチドを除去し、D2は行なわない<sup>5)</sup>。また、D4展開後、1M sodium phosphate で同一方向に展開し、シート上のバックグラウンドのカウントを除く操作を行う。

付加体形成レベルの定量は、検出された各スポットに相当するシートを切りとり、シンチレーションカウンターで測定することにより行う。この実験で用いた全 nucleotides の数は、次のようにして求める。ラベルのときの反応液に ATPase



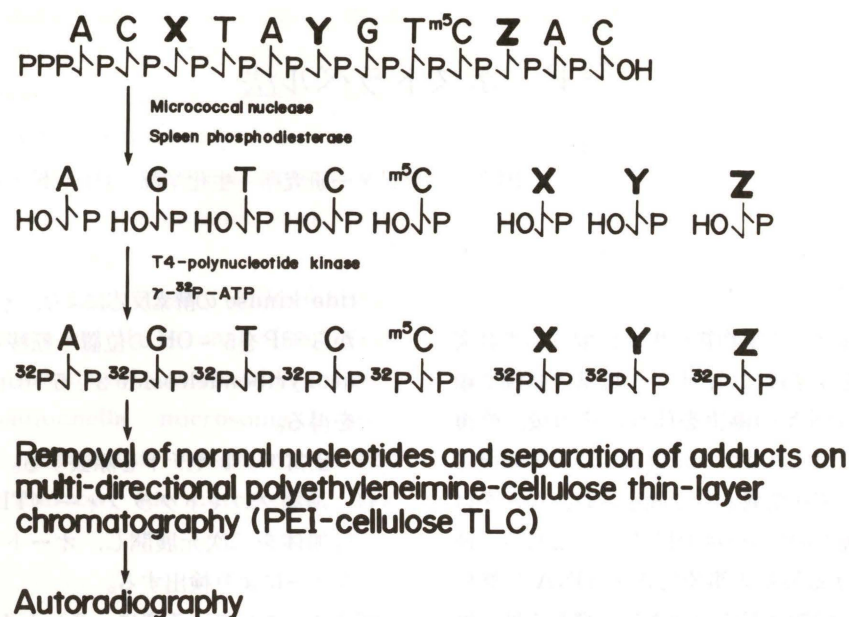
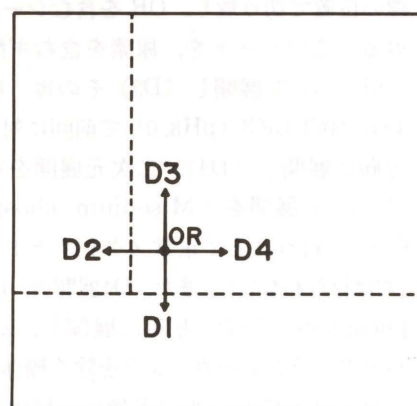


図1. <sup>32</sup>P-ポストラベル法の原理 (文献3より改写)

## 4-Directional PEI-cellulose TLC



D1, D2: Removal of normal nucleotides

D3, D4: Resolution of adducted nucleotides

----- Cut after development

図2. PEIセルロースTLCを用いた、正常ヌクレオチドの除去及び、付加体の展開 (文献3より改写)

を加え、未反応の  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP を分解後 PEIセルロース TLC により、ラベルされた nucleotides と <sup>32</sup>Pi を分離し、nucleotides にのみとりこまれたカウントを測定する。このようにして得られた値から、ラベルされた付加体の相対比 (relative adduct labeling) を以下の式により求める。

Relative adduct labeling (RAL)

$$= \frac{\text{付加体のカウント}}{\text{全 nucleotides のカウント}}$$

付加体形成の強さは、一般的には  $10^7$  nucleotides 当りの付加体の数で表わされる場合が多いので、RAL の値を  $10^7$  倍して求める。また、 $10^7$  nucleotides 当りの付加体数を 0.3 倍すると、mg DNA 当りの付加体の fmol 数が簡単に求まる。また、付加体の検出限界は、 $10^7 \sim 10^8$  nucleotides 当り 1 個程度である。

この一連の操作により検出できる付加体は、芳香性かつ多環性の化合物に限られる。メチル化やエチル化などを受けた nucleotides は、正常の nucleotides とほとんど変わらない挙動をするために、D1 展開でシートから除かれてしまう。また、一環性や二環性の化合物による付加体も、シートとの親和力が弱いため、同様に D1 展開で移動して解析できない。

### 3. <sup>32</sup>P-ポストラベル法の改良

今まで述べてきたのは、開発された当初の方法であるが、その後いくつかの改良がなされた。主な改良点は、1) 検出感度の上昇、2) 低分子量の化学物質による付加体の検出という二点である。

#### 1) 検出感度の上昇

従来の方法を用いた場合、 $10^7 \sim 10^8$  nucleotides 当り 1 個の付加体を検出でき、Randerath らは、20 以上の化学物質について、これまで発がん性が証明されているもの全てに付加体を認め<sup>9)</sup>。しかし、それ以下のレベルの付加体の検出、特に、ヒトの化学物質への暴露量の測定という応用面を考えた場合、一般には、上記の検出限界以下の付加体を検出する必要がある。従って、

この点に関する改良は大きな意味をもつ。さてその改良は、原理的には付加体を選択的に濃縮し、正常 nucleotides がほとんど存在しない条件で、付加体のみを <sup>32</sup>P でラベルする事により可能となる。これには、1-butanol で付加体を抽出する方法<sup>7)</sup>と、nuclease P1 の酵素作用を利用する方法<sup>8)</sup>がある。いずれの場合とも、これらの処理は、DNA を核酸分解酵素処理により、3'-mononucleotides に分解した後で行なう。この改良により  $10^{10} \sim 10^{11}$  の nucleotides 当り 1 個の付加体を検出する事が可能となった。また、ラベルの際に、3'-mononucleotides の濃度より、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP の濃度が低いと、T4 polynucleotide kinase の酵素反応の特異性により、付加体が選択的にラベルされる (ATP deficient condition)。Randerath らは、この性質を利用して検出感度の上昇を計った変法も開発している<sup>9)</sup>。

図3に、1-butanol 法で解析した例を示した。用いた化合物は heterocyclic amine の一種である、2-amino-3-methyl- $\alpha$ -carboline (MeA $\alpha$ C) である。これは、吉田らによってダイズグロブリンの加熱産物中より変異原物質として同定されたもので、各種の加熱食品中や、タバコのタール中にも含まれている<sup>10, 11, 12, 13)</sup>。マウスにおいては、肝及び、血管内皮細胞の腫瘍を誘発するが、ラットでは、長期間投与により、唾液腺及び、脾に萎縮を引き起こす<sup>14, 15)</sup>。我々は、ラットにおいて、これらの臓器の DNA に MeA $\alpha$ C による付加体が形成されることを証明した<sup>16)</sup>。F344 ラットに 100mg/kg b. w. の MeA $\alpha$ C を 1 回、経口的に投与し、24 時間後に肝において形成された付加体は、少なくとも 8 種類認められた。それぞれの付加体のレベルを表1に表わした。この実験の場合、全 nucleotides にとりこまれたカウントが約  $6 \times 10^{10}$  cpm、付加体 1 へは約  $4 \times 10^5$  cpm とりこまれた。さらに、非常に弱いスポットとして認められる付加体 2 と 5 へは、それぞれ 200 cpm, 100 cpm とりこまれた。従って、 $10^9$  nucleotides に数個という非常に低いレベルの付加体も有意に検出できた。このように、レベルの高い



## DNA Modification in the Liver by MeA $\alpha$ C

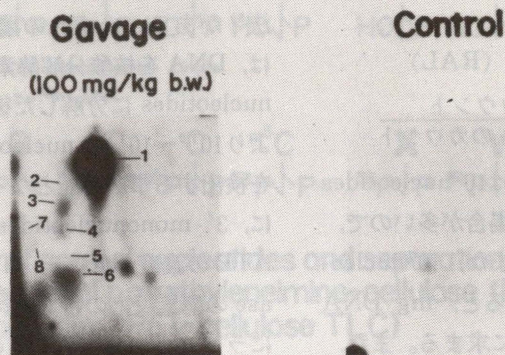


図3. MeA $\alpha$ Cにより形成された付加体。10 $\mu$ gのDNAを解析に用いた。D<sub>1</sub>: 1M sodium phosphate (pH 6.8), D<sub>3</sub>: 4.2Mギ酸-リチウム, 7.5M尿素 (pH 3.5), D<sub>4</sub>: 0.8M塩化リチウム, 0.5M Tris-HCl, 7.5M尿素 (pH 8.0)

表1. MeA $\alpha$ Cにより形成された付加体のレベル

Adduct No.	Adducts/10 <sup>7</sup> nucleotides
1	67.44
2	0.04
3	0.34
4	0.24
5	0.02
6	0.84
7	0.10
8	0.16
Total	69.18

付加体が1つと、その他いくつかのレベルの低い付加体が認められるというパターンは、その他のheterocyclic amineによる付加体に一般的にみられる傾向である(未発表)。

Nuclease P1法は、最近開発された方法である<sup>8)</sup>。本酵素は、3'-phosphorylase活性をもつため、3'-mononucleotidesは、nucleosidesに分解され、次のステップで用いるT4 polynucleo-

tide kinaseの基質にならなくなってしまう。付加体は、本酵素の基質になりにくいので、正常nucleotidesのみが選択的に分解され、付加体が濃縮されるというのが原理である。しかし、化合物によっては、基質になる付加体もあり、heterocyclic amineについて調べたところ、いくつかのものでは検出されない付加体があった(未発表)。

2) 低分子化合物による付加体の検出

PEI-セルロースシートを用いたTLCでは、D<sub>1</sub>展開により正常nucleotidesを除くが、低分子化合物による付加体も同様にORから移動してしまう。この問題は、低分子化合物に対してより親和力の強いODSシートを用いたTLCをD<sub>1</sub>展開で行うことにより解決された<sup>17)</sup>。我々は、この方法を用い、1-nitrosoindole-3-acetonitrileによるDNA付加体の検出を試みた。この化合物は、若林らによって同定されたもので、白菜中の変異原前駆物質、indole-3-acetonitrileを亜硝酸処理する事によって生じる直接変異原物質で

ある<sup>18, 19)</sup>。F344ラットに100mg/kg b.w.の1-nitrosoindole-3-acetonitrileを経口的に与え、2時間後に、前胃・腺胃のDNAに形成された付加体を解析した。図4に示される様に、前胃・腺胃の場合とも明らかに、1-nitrosoindole-3-acetonitrileによる付加体が認められた。この実験では、検出感度を上げるために、ATP deficient conditionを用いているので正確な付加体レベルの定量はできないが、全体として10<sup>7</sup> nucleotidesに1個程度の付加体が形成されていた。Randerathらは、このODS-TLC法により一環性の化合物であるsafrole及びその誘導体による付加体を検出している<sup>17)</sup>。従って、この方法を用いれば、環境中に数多く存在する一環性及び、二環性化合物による付加体も検出が可能である。

## 4. <sup>32</sup>P-ポストラベル法を用いた化学物質複合体による付加体の検出

これまでの、方法を中心に単一化合物による付

## DNA Modification in Rat Stomach by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile

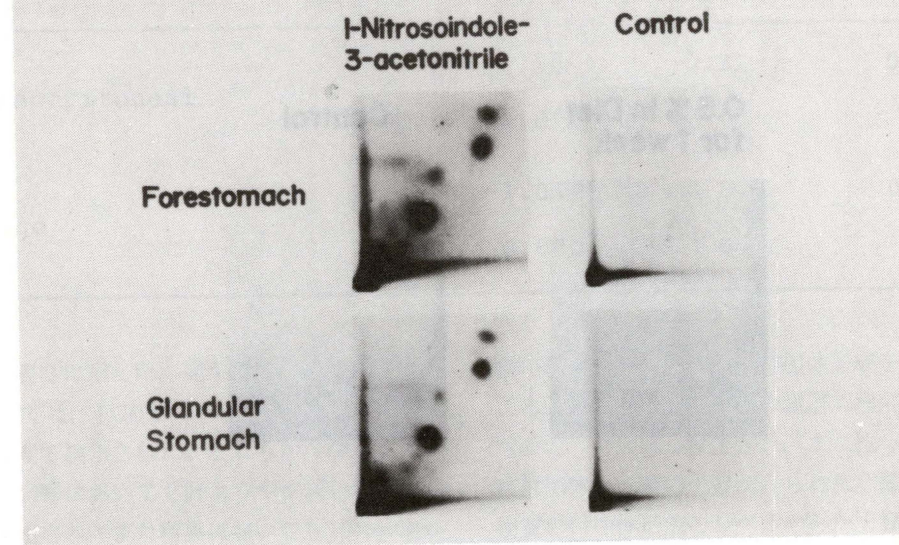


図4. 1-Nitrosoindole-3-acetonitrileによるDNA付加体。D<sub>1</sub>: 0.4Mギ酸-アンモニウム (pH 6.0) (ODSシートを使用) D<sub>3</sub>: 2.5Mギ酸-リチウム, 4.5M尿素 (pH 3.5), D<sub>4</sub>: 0.4M塩化リチウム, 0.4M Tris-HCl, 5M尿素 (pH 8.0)



加体の検出について述べてきた。しかし、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法によれば、単一化合物のみならず、食品や大気等からの粗抽出物についても敏感に同様の解析ができる。Randerath らは、タバコのタールからの粗抽出物による付加体を検出している<sup>20)</sup>。また、Jeffrey らは、ディーゼル排ガスを長期間暴露させたラットの肺から付加体を検出している<sup>21)</sup>。さらに、この方法を用いて、ヒトの試料から付加体を検出することも行なわれており、Randerath らは喫煙者の胎盤や気管・肺の DNA から喫煙に関連した付加体を検出している<sup>20, 22)</sup>。

#### 5. ハルマンによる付加体の検出

我々は、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法を用いてハルマンによる DNA 付加体の検出を行った。ハルマンは、サルモネラ菌の系では、それ自身は突然変異原性を示さないが、アニリン等との共存により co-mutagen として作用する<sup>23)</sup>。一方、哺乳動物の培養細胞系においては、単独で変異原性を示す<sup>24)</sup>。そこで我々は、in vivo でハルマンがD

NA修飾をおこなうかを検討した。0.5%のハルマンを含む飼料を CDF<sub>1</sub> マウスに一週間与えたところ、図5に示される様に、肝の DNA に明らかな付加体が、 $10^8$  nucleotides に3個の頻度で形成された。このように、変異原性の疑わしい化合物について、in vivo での DNA 修飾を明らかにすることも、この方法により可能である。

#### 6. 発がんの臓器特異性の予測

化学物質の発がん性及び、その臓器特異性を短期で予測するために、我々は、化学物質の種々の臓器での DNA 付加体形成のレベルという面からのアプローチを試みた。用いた化合物は MeIQx<sup>25)</sup> で、マウスにおいては、肝、肺及び、血液系に腫瘍を引きおこし<sup>26)</sup>、ラットに対しては、肝、Zymbal腺、陰核腺及び、皮膚に腫瘍を誘発する<sup>27)</sup>。F344ラットに 50mg/kg b.w. の MeIQxを一回、経口または腹腔内投与すると、24時間後の肝の DNA に図6の様に、少なくとも2種類の付加体を形成する。このときの付加体形成のレベルを、肝、腎及び、精巣について測定し

### DNA Modification in Mouse Liver by Harman

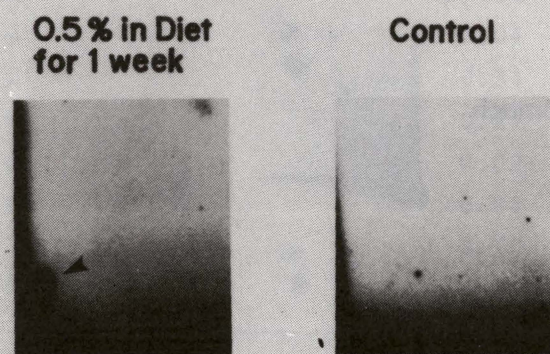


図5. ハルマンによる DNA 付加体の検出。10 $\mu\text{g}$ の DNA を解析した。D<sub>1</sub>: 1M sodium phosphate (pH 6.8), D<sub>3</sub>: 4.2Mギ酸-リチウム, 7.5M尿素 (pH 3.5), D<sub>4</sub>: 1M塩化リチウム, 0.5M Tris-HCl, 7.5M尿素 (pH 8.0)

### MeIQx-DNA Adducts in the Liver by Single Administration

24 hours after administration of 50 mg/kg b.w. MeIQx

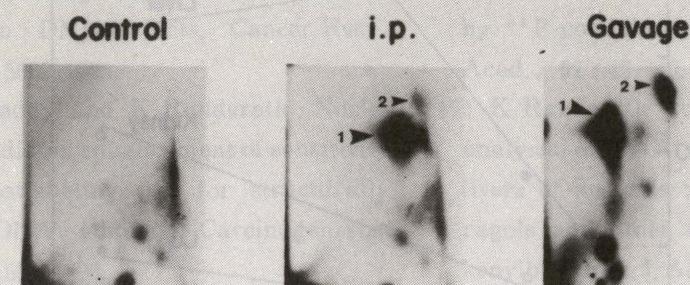


図6. MeIQx による DNA 付加体。10 $\mu\text{g}$ の DNA を解析した。D<sub>1</sub>: 1M sodium phosphate (pH 6.8), D<sub>3</sub>: 4.2 Mギ酸-リチウム, 7 M尿素 (pH 3.5), D<sub>4</sub>: 0.8M塩化リチウム, 0.5M Tris-HCl, 7.5M尿素 (pH 8.0)

表2. MeIQx の1回投与によるラットの各臓器での付加体のレベル

Route	Adduct No.	Adducts/ $10^7$ nucleotides		
		Liver	Kidney	Testis
Intraperitoneal	1	0.86	0.31	0.041
	2	0.071	-	-
Gavage	1	1.03	0.87	0.054
	2	0.080	0.073	-

たものを表2に示した。発がんの標的臓器である肝においては、付加体は、 $10^7$  nucleotides に約1個の程度で検出された。ところが、腫瘍発生のみられない腎においても肝よりやや弱い程度で付加体が検出され、また精巣においても $10^9$  nucleotides に数個というレベルで付加体が形成されることがわかった。さらに、発がん実験と同一条件、即ち、0.04%のMeIQxを含む飼料を与え、

経時的に種々の臓器での付加体形成を測定したところ、図7の様に、全ての臓器で程度の差はあるものの、付加体が検出され、また投与期間とともに付加体レベルの上昇がみられた。従って、化学物質の付加体形成のレベルのみから発がんの臓器特異性を予測する事は困難と思われる。しかしながら、化学発がん過程における initiation 活性の強さはこの方法により測定できる。



## DNA Adduct Levels in Various Organs of Rats Fed 0.04% MeIQx

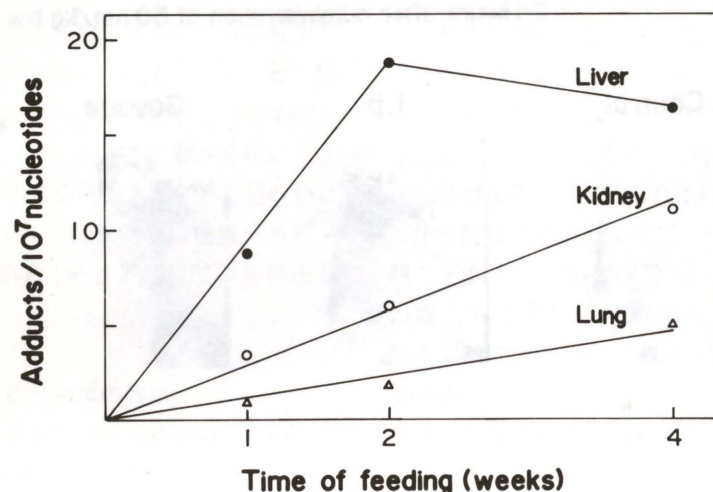


図7. MeIQxの連続投与によるラットの各臓器での付加体のレベルの経時的変化

### 7. おわりに

<sup>32</sup>P-ポストラベル法は、化学物質によるDNA付加体を比較的短期間で、極めて高感度に検出できる有用な方法である。この方法を用いることにより、環境化学物質が生体にとりこまれ、活性化や不活性化等の代謝を受けた後、どれくらいの割合が変異原性等の生物活性を示す可能性のある形に変化しているのかを定量的に求める事が可能である。また、付加体の検出感度が高いことから、ヒトの化学物質への暴露量の測定に応用する事も可能と思われる。しかしながら、これまでの方法では、メチル化やエチル化などのアルキル化を受けた付加体は検出できない。また、ヒトの化学物質への暴露量の測定へ応用する場合、付加体の検出感度をさらに上昇させる必要があるばかりでなく、少量の試料から効率よく付加体を検出できるようにしなければならない。今後は、種々の化学物質について、*in vivo*での潜在的変異原性を測定するばかりでなく、上記の様な点について改良をしていかなければならない。

### 参考文献

- 1) R. C. Garner : Assessment of carcinogen exposure in man. *Carcinogenesis*, 6 : 1071-1078, 1985.
- 2) G. N. Wogan et al. : Chemical and biochemical dosimetry of exposure to genotoxic chemicals. *Environ. Health Perspect.*, 62 : 5-18, 1985.
- 3) R. C. Gupta et al. : <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, 3 : 1081-1092, 1982.
- 4) K. Randerath et al. : Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environ. Health Perspect.*, 62 : 57-65, 1985.
- 5) M. E. Shurdak and K. Randerath : Tissue-specific DNA adduct formation in mice treated with the environmental carcinogen, 7H-dibenzo [c, g] carbazole. *Carcinogenesis*, 6 : 1271-1274, 1985.
- 6) M. V. Reddy et al. : <sup>32</sup>P-Postlabeling

test for covalent DNA binding of chemicals *in vivo* : application to a variety of aromatic carcinogens and methylating agents. *Carcinogenesis*, 5 : 231-243, 1984.

- 7) R. C. Gupta : Enhanced sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen : DNA adducts. *Cancer Res.*, 45 : 5656-5662, 1985.
- 8) M. V. Reddy and K. Randerath : Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, 7 : 1543-1551, 1986.
- 9) E. Randerath et al. : <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of DNA adducts persisting for up to 42 weeks in the skin, epidermis and dermis of mice treated topically with 7, 12-dimethylbenz [a]anthracene. *Carcinogenesis*, 6 : 1117-1126, 1985.
- 10) D. Yoshida et al. : Mutagenicity of amino- $\alpha$ -carbolines in pyrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83 : 915-920, 1978.
- 11) D. Yoshida et al. : Amino- $\alpha$ -carbolines as mutagenic agents in cigarette smoke condensate. *Cancer Lett.*, 10 : 141-149, 1980.
- 12) T. Matsumoto et al. : Determination of mutagens amino- $\alpha$ -carbolines in grilled foods and cigarette smoke condensate. *Cancer Lett.*, 12 : 105-110, 1981.
- 13) T. Sugimura et al. : Mutagens and carcinogens in cooked food. In : *Genetic Toxicology of the Diet*, Alan R. Liss, Inc., pp. 85-107, 1986.
- 14) H. Ohgaki et al. : Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from glutamic acid and soybean globulin pyrolysates. *Carcinogenesis*, 5 : 815-819, 1984.
- 15) S. Takayama et al. : Atrophy of salivary

glands and pancreas of rats fed on diet with amino-methyl- $\alpha$ -carboline. *Proc. Jpn. Acad.*, 61 : 277-280, 1985.

- 16) K. Yamashita et al. : Amino-methyl- $\alpha$ -carboline-induced DNA modification in rat salivary glands and pancreas detected by <sup>32</sup>P-postlabeling method. *Proc. Jpn. Acad.*, 62 : 45-48, 1986.
- 17) K. Randerath et al. : <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with sufrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. I. Adult female CD-1 mice. *Carcinogenesis*, 5 : 1613-1622, 1984.
- 18) K. Wakabayashi et al. : A mutagen precursor in Chinese cabbage, indole-3-acetonitrile, which becomes mutagenic on nitrite treatment. *Mutation Res.*, 143 : 17-21, 1985.
- 19) K. Wakabayashi et al. : 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile, a mutagen produced by nitrite treatment of indole-3-acetonitrile. *Proc. Jpn. Acad.*, 61 : 190-192, 1985.
- 20) E. Randerath et al. : Comparative <sup>32</sup>P-analysis of cigarette smoke-induced DNA damage in human tissue and mouse skin. *Cancer Res.*, 46 : 5869-5877, 1986.
- 21) D. Wong et al. : Identification of DNA damage as a results of exposure of rats to diesel exhaust. *Carcinogenesis*, 7 : 1595-1597, 1986.
- 22) R. B. Everson et al. : Detection of smoking related covalent DNA adducts in human placenta. *Science*, 231 : 54-57, 1986.
- 23) M. Nagao et al. : Comutagenic action of norharman and harman. *Proc. Jpn. Acad.*, 53 : 95-98, 1977.
- 24) M. Nakayasu et al. : Mutagenic activity of norharman and harman in Chinese



- hamster lung cells in assay with diphteria toxin resistance as a marker, *Cancer Lett.*, 17 : 249-255, 1983.
- 25) H. Kasai et al. : Structure of a potent mutagen isolated from fried beef, *Chem. Lett.*, 485-488, 1981.

- 26) H. Ohgaki et al. : Carcinogenicity in mice of mutagenic compound, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-*f*]quinoxaline (MeIQx) from cooked foods, in press.
- 27) T. Kato et al., in preparation.

## 不定期DNA合成 (UDS) 法

東京大学医科学研究所 癌生物学研究部 降旗千恵

### 1. はじめに

この方法で指標にしている不定期DNA合成 (unscheduled DNA synthesis, UDS) とは, DNA 損傷の切除修復 (excision repair) による修復DNA合成をさす。すなわち, 突然変異原性物質, 化学癌原性物質あるいはその代謝活性化物, 放射線がDNAを修飾して, それが切除修復で修復される場合には, トリチウムで標識したチミジン ( $^3\text{HTdR}$ ) を共存させると, 1ヶ所の傷に対して, 多数の  $^3\text{HTdR}$  が取込まれて, 高感度でDNA損傷を検出することが出来る。

動物の発癌は, 動物の体細胞の突然変異に起因すると考えられている。微生物に対する変異原性物質が必ずしも動物で, 変異原性物質あるいは癌原性物質とならないが, それは, 1) 化学物質の摂取経路と体内への分布, 2) 標的臓器あるいは細胞での吸収, 3) 代謝活性化, 解毒, 排泄, 4) 標的臓器での細胞の増殖性などの要素が絡んでくためと考えられる。このように動物で, 標的臓器と呼ばれる特定の臓器に癌を誘発する現象を発癌の臓器特異性と呼ぶ。標的臓器の細胞のDNAには損傷が起っているはずなので, それをUDSを指標として検出できるのではないかという考えで, この in vivo 検索法が考えられた。

修復DNA合成の発見は古く, 1964年に Rasmussen と Painter によって, UV 照射された細胞にS期以外のDNA合成が誘起されることが見出された<sup>1)</sup>。“unscheduled synthesis”という言葉は, Djordjevic と Tolmach によって最初に用いられ<sup>2)</sup>, 現在も, “repair DNA synthesis”と“unscheduled DNA synthesis”の両方の言葉が使われている。このUDSを in vivo 短期検

索法として使うという考えは, Stich と Kieser によって提案された<sup>3)</sup>。彼らはマウスに癌原性物質を投与して in vivo で作用させた後, 標的臓器を取り出して, in vitro で  $^3\text{HTdR}$  存在下にDNA合成を行わせて, UDSを測定する方法を示唆した。彼らは組織切片または組織を押し潰した標本のオートラジオグラフィーの測定を行った<sup>4)</sup>。しかしこの方法は, 短期検索法のルーチン・ワークとしては煩雑すぎたようで, その後の発展はなかった。実用的な方法を開発して, in vivo 検索法として使いだしたのは, 1980年代に入ってからで, Mirsalis と Butterworth は, 癌原性物質を投与したラットから肝細胞の primary culture を調整して, UDSをオートラジオグラフィーで観察する方法を開発した<sup>5)</sup>。この方法は検索に2週間あまりかかる。彼らのグループは同様の方法を, 腎臓<sup>6)</sup>, 脾臓<sup>7)</sup>, 上部呼吸器系<sup>8)</sup>について開発した。現在この方法はアメリカを中心に20人ほどの研究者が用いている。私達は, ラットに癌原性物質を投与して in vivo で作用させた後,  $^3\text{HTdR}$  およびヒドロキシウレア (複製DNA合成の阻害剤: HU) 存在下で腺胃粘膜の器官培養を行ってUDSを測定する迅速な方法を開発した<sup>9, 10)</sup>。私達は  $^3\text{HTdR}$  のDNAへの取り組みを液体シンチレーションカウンターで測定している。この方法だとわずか2日間で測定できる。私達は同様な方法を前胃<sup>11)</sup>と大腸<sup>12)</sup>について開発した。この方法は私達の他では, 外国で数人始めるところである。

また発癌のイニシエーション作用を検索するのみでなく, 癌原性物質のプロモーション作用も, 培養液からHUを除いて同様の方法で細胞の複



製に伴う総 DNA 合成 (TDS) または S 期細胞の増加を観察することによって検索できそうである。

## 2. 実験法

化学物質をラット (マウス) に、胃チューブ、腹腔内注射、注腸などで投与して in vivo で作用させた後、目的とする臓器を取り出して、in vitro で  $^3\text{H}$ TdR 存在下に器官培養または細胞培養を行って、UDS を測定する。

DNA への  $^3\text{H}$ TdR の取り込みを測定するのに、液体シンチレーションカウンターを使う方法<sup>9, 10)</sup>とオートラジオグラフィーを使う方法<sup>9)</sup>とがある。オートラジオグラフィーの方が、時間がかかるが、複製 DNA 合成と UDS を正確に区別することができる。液体シンチレーションカウンター法でも、TDS と UDS を同時に測定すれば概略は推定できる。

私達は液体シンチレーションカウンターを使っ

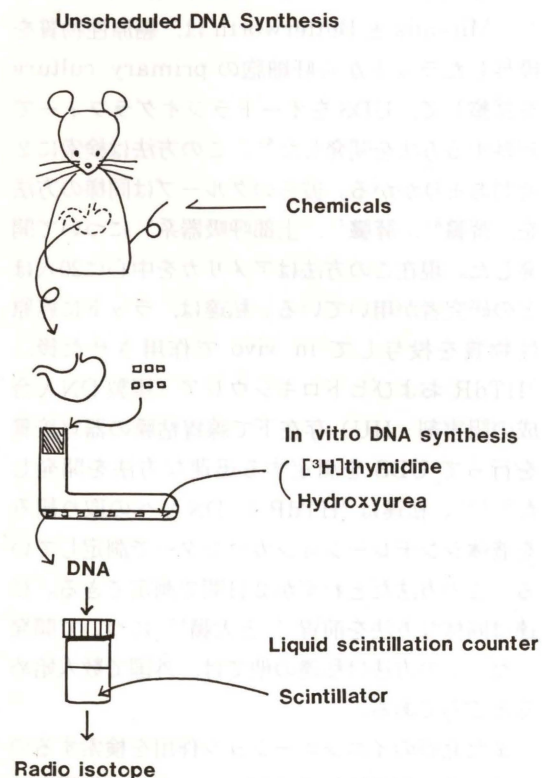


図1 UDS 法

ているので、主としてその方法 (図1) について述べる<sup>9, 10)</sup>。検索はまず LD 50 の約 1/2 の用量で試料を投与後 0, 2, ~16 時間の間に数点を取って時間経過を観察し、陽性の出た物質について最適な時間で用量反応性を測定する。

### 1) 腺胃

1 群 5 頭の Fischer (F344, チャールス・リバー) 7~8 週令雄ラットを個別ケージに入れて、ラットの体重 200 g 当り 4 g の固型飼料を夕方投与し、翌朝胃袋がほぼ空になったところへ試料を注入する。投与 16 時間後の測定をする時には、朝から絶食させて夕方試料を投与し、翌朝屠殺して測定する。投与は注射筒で、注射針の先にポリエチレンチューブを付けるか、胃ゾンデ用針を付けて行う。試料は蒸留水かジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0.3~1.0 ml 投与する。

in vivo で試料を作用させた後、屠殺して胃袋を取り出し、大彎側で切り開き、0.9% 食塩水および L-15 medium (Gibco) で洗った後、幽門腺部粘膜 (図2) を 1 mm の幅で、粘膜筋板や漿膜を含まないように薄く細長く、眼科用ハサミで切り取り、コルク板にアルミ箔を被せた台の上に、粘膜が干からびないように一滴垂らした L-15 medium 上に置いて、メスの刃で約 1 mm 幅に切り刻む。L 字管 (図3) に 50  $\mu\text{l}$  の L-15 medium をあらかじめ入れたところへ、細切した粘膜 20 mg を入れ、1 群 5 頭分たまったところで、HU を添加 (UDS 用) または HU を無添加 (TDS 用) の  $^3\text{H}$ TdR を含む L-15 medium 3 ml を入れ、37°C で 2 時間おだやかに振盪してインキュベートする。2 時間後に L-15 medium で一度洗った後、放射能で標識していない 1 mM TdR を含む L-15 medium を 3 ml 加えて 37°C 30 分さらにインキュベートする。PBS で洗った後ドライアイス上で凍結する。組織から DNA 分画を以下の方法で抽出し、放射能と DNA 濃度を測定する。なおラットを解剖する時から、放射能で標識していない 1 mM TdR を含む L-15 medium でインキュベートする時まで、使用する器具と溶液は滅菌しておく。

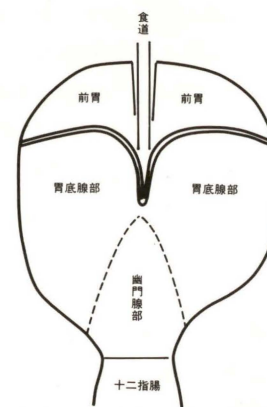


図2 ラットの胃を大彎側で切開した図  
前胃 (forestomach), 胃底腺部 (fundus), 幽門腺部 (pylorus) で構成される。

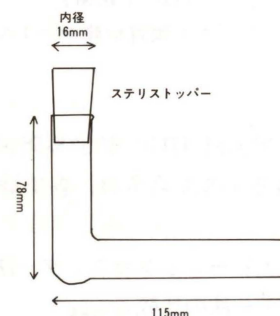


図3 L字管

スピッツ遠心管型ホモジナイザー外筒管 (図4) に氷冷した 10% トリクロロ酢酸 (TCA) 1 ml を取り、この中に凍結した組織をミクロスパーテルで移し、ただちに 2 分間ホモジナイズする。同じ容器のまま 4°C で 3000rpm 15 分間遠心して沈澱 (タンパク質と DNA と RNA とを含む) を取り、もう一度 10% TCA 1 ml でホモジナイズして遠心して沈澱を取る。IN の KOH 1.1 ml を加えてホモジナイズし、37°C 一夜インキュベートして RNA を加水分解する。翌朝、不溶物が遠心管の底に沈澱しているので 3000rpm 15 分間遠心して、上清 1.0 ml を他のスピッツ遠心管型ホモジナイザー外筒管に移し、5 N の HCl 200  $\mu\text{l}$  で中和し、70% TCA 63  $\mu\text{l}$  加えて最終 5% TCA とする。10 分間氷冷後、遠心して沈澱を取る。この時管壁に残る水滴は、細く切ったろ紙で拭き取る。

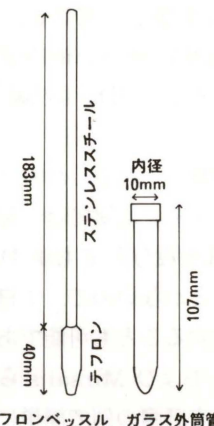


図4 スピッツ遠心管型ホモジナイザー

沈澱に 5% TCA 650  $\mu\text{l}$  を加えてホモジナイズした後、80°C 30 分間加温して DNA を加水分解する。この時タンパク質は変性して沈澱するので、水冷後遠心して上清を DNA 分画として使う。500  $\mu\text{l}$  をシンチレーター ACSII (Amersham Corp.) に溶かし込んで、液体シンチレーションカウンターで DNA に取り込まれた  $^3\text{H}$ TdR の量を測定する。

DNA 濃度の定量は、DNA 分画 20  $\mu\text{l}$  に 2 M 3,5-ジアミノ安息香酸・2 塩酸塩 (DABA) (東京化成) 40  $\mu\text{l}$  を加え、37°C で 30 分間インキュベートした後、0.6 N 過塩素酸 (PCA) 300  $\mu\text{l}$  を加え、マイクロセルを用いて励起光 436 nm, 蛍光 520 nm で蛍光を測定する。標準試料として、仔牛胸腺 DNA 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を 5% TCA で加水分解して用いる。DABA は空試験値の低いロットを選んで使う。溶かしてすぐ使うと空試験値が低い。

### 2) 前胃

腺胃での方法と異なる点は、以下の通りである。前胃は漿膜ごと切り取り、まるごと L 字管に入れてインキュベートする。インキュベートを終わって凍結した前胃を 24 mM EDTA・75 mM NaCl (pH 7.5) で洗い、前胃上皮を片刃のカミソリで削り取り、スピッツ遠心管型ホモジナイザー外筒管に入れ、300 mM NaCl・30 mM EDTA・0.5% SDS (pH 10.2) 溶液 1 ml を加え、37°C 5 分間インキュベートした後、軽くホモジナイズし、



70% TCA 150  $\mu$ lを加えて混合し、室温で10分間静置した後、室温で3000rpm 15分間遠心して沈澱を取る（氷冷するとSDSも沈澱してしまう）。

### 3) 大腸

試料は経口投与か、滅菌した0.9% NaCl 0.5mlに溶かして注腸する。大腸では、腺胃や前胃と異なり癌原性物質を投与しても総DNA合成が著しく増加することがないので、1日1回3日連続して投与後測定することも可能である。

Butterworth および Mirsalis らのオートラジオグラフィ法を肝臓の例で簡単に説明すると、経口投与あるいは腹腔内注射で化学物質をラットに投与したあと、肝臓をコラゲナーゼ液で環流して、初代培養肝細胞を調製し、 $^3\text{H}$ TdR 存在下にDNA合成を行わせ、オートラジオグラフィで、核での $^3\text{H}$ TdRの取り込みからくる銀粒子数を数える<sup>5, 13)</sup>。

## 3. 結果の解析

### ① HUによる複製DNA合成の阻害

消化管上皮では、常に細胞の交代があり、増殖帯では複製のDNA合成が観察される。それゆえ、DNAへの $^3\text{H}$ TdRの取り込みでUDSを測定するためには、この複製のDNA合成を阻害する必要がある。図5に正常未処置ラットから取り出した胃の幽門腺部粘膜をin vitro 器官培養した時のHUによるDNA合成の阻害を示す<sup>10)</sup>。HUによって複製DNA合成を100%阻害するこ

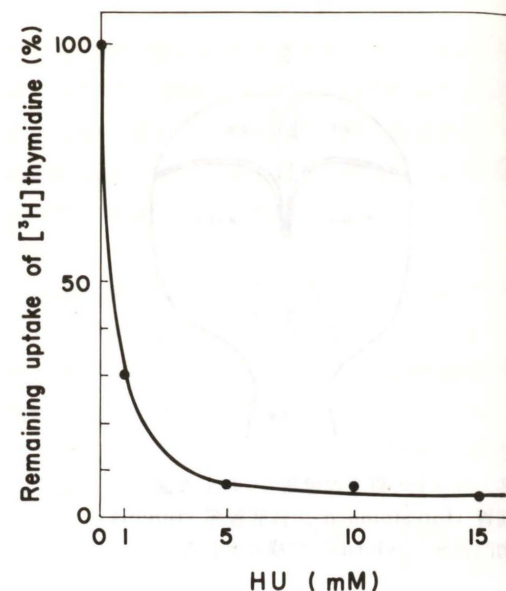


図5 HUによるラット腺胃粘膜中のDNA合成阻害<sup>10)</sup>

とは出来ず、10mM HUで約93%阻害する。阻害されずに残るDNA合成は、各実験での対照値となる。

### ② 液体シンチレーションカウンター法とオートラジオグラフィ法の比較

表1はN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) によるラット胃の幽門腺部粘膜中のUDS誘起を液体シンチレーションカウンター法とオートラジオグラフィ法とで同時に測定した結果である。ここではオートラジオグラフィは組織切片で行った。上記の二つの方

表1 液体シンチレーションカウンター法とオートラジオグラフィ法の比較

グループ No.	MNNG mg/kg 体重	HU mM	液体シンチレーション カウンター法 $^3\text{H}$ TdR dpm/ $\mu\text{g}$ DNA*	オートラジオグラフィ法 銀粒子/核**
1	0	0	4450 $\pm$ 2370	0.68 $\pm$ 1.06
2	0	10	271 $\pm$ 96	0.54 $\pm$ 0.50
3	200	0	2640 $\pm$ 644	8.50 $\pm$ 6.84
4	200	10	1930 $\pm$ 459	8.47 $\pm$ 6.79

\* 平均値 $\pm$ 標準偏差。1群5頭。グループ4は2に対して統計学的に有意に異なる。

\*\* 平均値 $\pm$ 標準偏差。S期以外の細胞の核の銀粒子数を数えた。グループ3は1に対して、グループ4は2に対して各々統計学的に有意に異なる。

法による結果はよく合っている。またオートラジオグラフィの結果から、HUそれ自身がUDSを阻害も促進しないことも明らかになった<sup>10)</sup>。

### ③ UDS測定

図6に胃の幽門腺部粘膜での典型的な実験結果を示す。既知の腺胃癌原物質MNNGをラットに体重1kg当り100mg投与すると、2~4時間後のHU存在下でのDNA合成の上昇としてUDSが検出された。また16時間後には細胞の増殖に伴う複製DNA合成も約10倍上昇した。他方、肝臓、腎臓に腫瘍を誘発するが、腺胃粘膜には癌を誘発しないジメチルニトロソアミン (DMN) では、HU存在下でDNA合成の増加がまったくなく、HU非存在下では複製DNA合成が多少阻害された。すなわちUDSも複製のDNA合成も誘導されなかった。

このように+HUと同時に-HUでのDNA合成を測定しておく、細胞増殖の促進を示す場合には総DNA合成の増加が、毒性を示す場合には総DNA合成の減少が観察されるので、同時

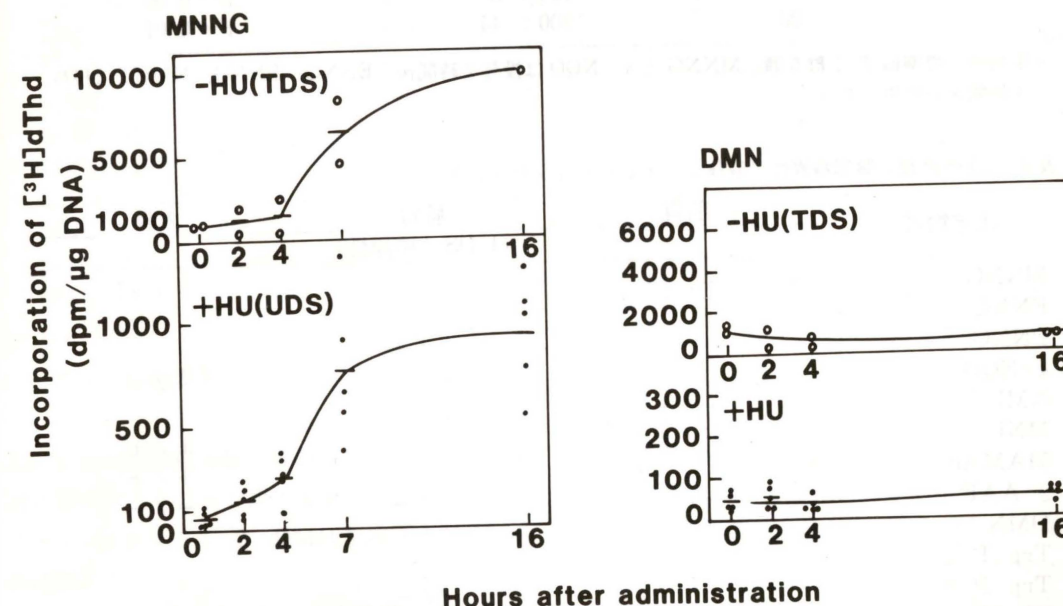


図6 ラット腺胃粘膜におけるUDSと総DNA合成の誘導

MNNG (100mg/kg体重), +HUの2, 4, 7, 16時間とも平均値は0時間と統計学的に有意に異なる<sup>10)</sup>。

DMN (16mg/kg体重), +HUの2, 4, 16時間とも平均値は0時間と有意の差がない。

に測定しておくといよい。

表2に5種類の腺胃癌原物質の胃の幽門腺部粘膜でのUDS誘起の用量反応性を示す。腺胃以外に標的臓器を持つ癌原物質では、腺胃では用量を上げてもUDSを誘起しなかった<sup>10)</sup>。

### ④ UDS誘起の臓器特異性

表3に私達の方法で14種類の既知癌原物質および変異原物質について、前胃、腺胃、大腸で調べた結果を示す。各臓器別にUDS誘起の有無とその臓器での癌原性の有無を示してある。癌原性既知の化学物質では、UDSの誘起と標的臓器での発癌性とはかなりよく一致した<sup>12)</sup>。

表4にButterworth および Mirsalis らのオートラジオグラフィ法によって33種類の既知癌原物質およびその類似体によるUDS誘起を肝臓、腎臓、脾臓および上部呼吸器系（鼻~気管）で調べた結果を示す<sup>5-8), 14-20)</sup>。UDSの誘起と標的臓器での癌原性はかなりよく一致している。ここでは化学物質の投与経路によるUDSの誘起および癌原性の違いを厳密に調べて示してあ



表2 ラット胃粘膜における腺胃癌原物質によるUDS誘導の用量反応性

癌原物質	投与量 mg / kg 体重	UDS <sup>3</sup> HTdR dpm / $\mu$ g DNA*	Student's t 検定
MNNG	0	72 $\pm$ 16	
	50	260 $\pm$ 70	P < 0.001
	100	337 $\pm$ 140	P < 0.01
	200	317 $\pm$ 132	P < 0.01
ENNG	0	108 $\pm$ 35	
	100	269 $\pm$ 83	P < 0.01
	500	329 $\pm$ 57	P < 0.001
	800	309 $\pm$ 102	P < 0.01
PNNG	0	37 $\pm$ 13	
	400	148 $\pm$ 40	P < 0.01
	800	166 $\pm$ 87	P < 0.05
	1200	187 $\pm$ 104	P < 0.05
4-NQO	0	93 $\pm$ 35	
	10	289 $\pm$ 101	P < 0.01
	20	352 $\pm$ 91	P < 0.01
	30	499 $\pm$ 114	P < 0.01
NMUT	0	66 $\pm$ 15	
	23	158 $\pm$ 28	P < 0.001
	45	164 $\pm$ 59	P < 0.05
	90	200 $\pm$ 44	P < 0.01

\* 平均値  $\pm$  標準偏差, 1群5頭。MNNGと4-NQOは投与2時間後, ENNG, PNNG, NMUTは投与4時間後の結果である。

表3 UDS誘起の臓器特異性(液体シンチレーションカウンター法)

化学物質	前胃	腺胃 (UDS / 癌原性)	大腸
MNNG	+/+	+/+	+/+*
ENNG		+/+	
PNNG		+/+	
4-NQO		+/+	-/-
NMUT	+/+	+/+	
MNU	+/+	±/+	+/+*
MAMAc			+/+
2-AAF	-/-	-/-	-/-
DMN		-/-	
Trp-P-1		-/-	
Trp-P-2		-/-	
B[a]P	±/+		
4-AAF	-/-		
ピレン	-/-		

文末の略語表を参照。\* 注腸法による投与, 他は経口投与。

表4 UDS誘起の臓器特異性(オートラジオグラフィ法)

化学物質	肝臓	腎臓 (UDS / 癌原性)	脾臓	上部呼吸器系
2-AAF	+/+			
AFB <sub>1</sub>	+/+			
ベンジジン	+/+			
6-BT	+/+			
2,4-DAT	+/+			
DEN	+/+			
DMN	+/+	+/+		+/+
2,6-DNT	+/+			
サフロール	-/+			
CCl <sub>4</sub>	-/+ (非遺伝毒性)			
DEHP	-/+ (非遺伝毒性)			
B[a]P	-/-			
CH <sub>3</sub> Cl	-/-			
シクロフォスファミド	-/-			
DMBA	-/-			
MNNG	-/-			
1,6-DNP	-/?			
2,6-DNP	-/-			
ニトロベンゼン	-/-			
アザセリン	+/?	+/+	+/+	
MMS	+/?	-/-		
アゾキシメタン	+/+			
1,2-DMH	+/+	-/?		
2-NT	+/?			
3-NT	-/?			
4-NT	-/?			
MA6-BT	+/?			
CNEt6-BT	+/?			
6-PT	-/?			
MNU	-/?	+/+		
ストレプトゾトシン		+/+		
MAMAc		+/+		
1,1-DMH		-/?		

文末の略語表を参照

る。長期動物発癌実験で他の投与経路ではその臓器に発癌するものまで含めると, 肝臓ではさらにアゾキシメタンと1,2-DMHが皮下注射では癌原性がある。

このように癌原性既知の化学物質では, UDS誘起と標的臓器での癌原性がかかなりよく一致していることが明らかになったので, 実際にこの方法を用いて環境中の変異原および癌原物質の in

vivo 検索が始められた。

#### ⑤ UDS法による癌原物質の予知

糖質を含む加熱食品および発酵食品中に存在する direct-acting な変異原, グリオキザール, メチルグリオキザール, ジアセチルは, 図7に示すように, 各々投与2~4時間後に胃の幽門腺部粘膜で, HU存在下でのDNA合成が2.3~4.8倍有意に上昇し, UDS誘起を示唆した。HU非存



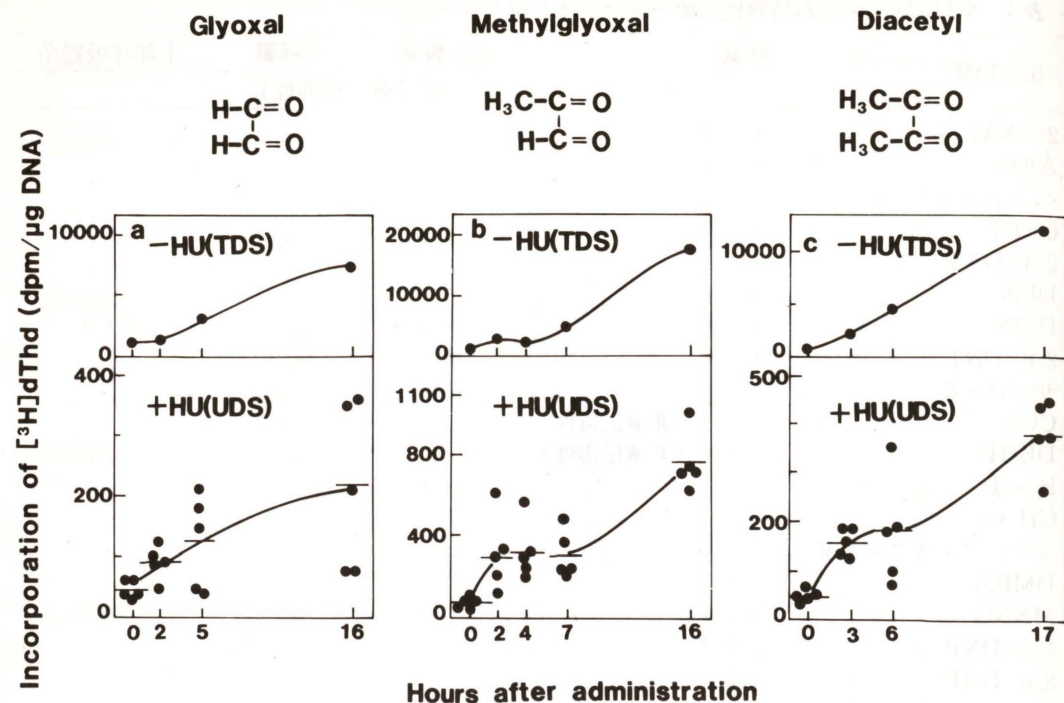


図7 ジカルボニル化合物によるラット腺胃粘膜におけるUDSと総DNA合成の誘導  
 G (300mg/kg体重), +HUの2時間の平均値は0時間と統計学的に有意に異なる。

MG (300mg/kg体重), +HUの2, 4, 7, 17時間の平均値は0時間と統計学的に有意に異なる。

DA (1500mg/kg体重), +HUの3, 17時間の平均値は0時間と統計学的に有意に異なる。

在下でのDNA合成(主として複製DNA合成)も同時に1.4~2.5倍と上昇するが, HU存在下での増加より低く, UDS誘起が示唆された。16時間後には, HU非存在下での総DNA合成が21~26倍上昇した<sup>21, 22)</sup>。この時のDNA合成は, 組織切片のオートラジオグラフィーで観察して, 粘膜増殖帯のS期細胞数の増加によることが確かめられた。これは発癌プロモーション作用の指標となる可能性がある。実際にMNNGをイニシエーターとするラットの二段階胃発癌系で, グリオキサールは腺胃発癌を促進することが高橋らによって明らかにされた<sup>23)</sup>。

若林らによって白菜に前駆体が見出されたdirect-actingなニトロソ化合物, 1-ニトロソインドール-3-アセトニトリルも1kg体重当り300~1000mg投与で4時間後に, HU存在下でのDNA合成が4~6倍上昇し, 見かけのUDS

を誘起した。しかしながら, この時HU非存在下でのDNA合成も実験により2~3倍上昇し, UDS誘起がはっきり示唆される場合と, HU存在下でのDNA合成の上昇の倍率とあまり変わらずに, UDS誘起がはっきりしない場合とがあって, UDS誘起の可能性は示唆されたが, はっきりと結論がつけられなかった。このように化学物質の投与後, HU非存在下のDNA合成も同時に上昇する場合には, さらに他の方法, 例えば組織切片のオートラジオグラフィー, アルカリ溶出法, DNA adductの解析でイニシエーション作用を確認する必要がある。

他にUDS誘起が腺胃粘膜で陰性だった物質に, 丸干しいわしの焼けこげから抽出された2-アミノ-3-メチルイミダゾ [4,5-f] キノリン(IQ)<sup>9)</sup>, 胃腸薬シメチジンをニトロソ化したdirect-actingな変異原ニトロシメチジン<sup>9)</sup>,

醤油に含まれるチラミンを亜硝酸処理した生成物でdirect-actingな変異原4-(2-アミノエチル)-6-ジアゾ-2,4-シクロヘキサジエノンがある。これらの物質では長期動物発癌実験の結果でラット腺胃には癌は誘発されず, 予知は当たっていた。その他にUDS誘起が腺胃で陰性で, まだ長期動物発癌実験が行われていない物質に, 大豆グロブリンの熱分解物2-アミノ- $\alpha$ -カルボリン(A $\alpha$ C)を亜硝酸処理した生成物でdirect-actingな変異原2-ヒドロキシ-3-ニトロソ- $\alpha$ -カルボリン<sup>9)</sup>と, フランスのBartch博士から依頼されたアミノ糖のニトロソ化物N-ニトロソ-N-p-メチル-1-デオキシ-D-フラクトシルアミンおよびN-ニトロソ-N-p-ニトロフェニル-L-アラビノシルアミンがある。

またある臓器を標的とする癌原性物質が発見された時に, その類似化合物の潜在性癌原性の検索に本法は適していると考えられる。例えばBeijeらの研究によれば<sup>17)</sup>, 6-ジメチルアミノフェニルアゾベンツチアゾール(6-BT)の類似化合物6-モノメチルアミノフェニルアゾベンツチアゾール(MA 6-BT), 6-[p-(N- $\beta$ -シアノエチル-N-メチルアミノ)フェニルアゾ]ベンツチアゾール(CNEt 6-BT)および6-[4-N-ピペリジニルフェニル]-アゾベンゼン(6-PT)によるラット肝臓でのUDS誘起の強さは, MA 6-BT > 6-BT > CNEt 6-BTで6-PTでは陰性であった。Salmonella typhimurium TA98でS9 mix存在下での変異原性の強さはCNEt 6-BT > MA 6-BT = 6-BT > 6-PTで全部陽性であった。ここでも微生物に対する変異原性と動物固体に対する変異原性の違いが示されている。

#### おわりに

UDS誘起と癌原性物質の臓器特異性とがかなりよく一致することが明らかになり, この方法で潜在性癌原物質の検索が始まったところというのが現状である。

この方法が最も有効なのは, 肝臓なり胃なり, ある特定の臓器を標的とする潜在性癌原性物質の検索であろう。またある臓器を標的とする癌原性物質が発見された時に, その類似化合物の潜在性癌原性の検索には威力を発揮するであろう。

今後の問題としては, 今まで前胃, 腺胃, 大腸, 肝臓, 腎臓, 脾臓について方法が揃ったので, さらに肺, 食道, 膀胱, 子宮, 乳腺などについても方法を開発していく必要がある。そうすればある化学物質についてすべての臓器でin vivoで短期検索を行うことができる。

他のDNA損傷測定法, たとえばアルカリ溶出法やアルカリ性蔗糖勾配遠心法などと比較すると, 一度に多数の動物(20-30頭)について個別に試験できる点が強みである。

今後この方法を用いてどれだけ多くの潜在性癌原性物質の発見ができるかということが, この方法に携っている研究者の課題である。

この方法は誰にでもできる方法を組み合わせただけなので, 多くの方に是非試みていただきたい。

#### 参考文献

- 1) Rasmussen, R. E., and Painter, R. B. : Evidence for repair of ultraviolet damaged deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells. *Nature*, 203 : 1360-1362 (1964).
- 2) Djordjevic, B., and Tolmach, L. J. : Responses of synchronous populations of HeLa cells to ultraviolet irradiations at selected stages of the generation cycle. *Rad. Res.*, 32 : 327-346 (1967).
- 3) Stich, H. F., and Kieser, D. : Use of DNA repair synthesis in detecting organotropic actions of chemical carcinogens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 145 : 1339-1342 (1974).
- 4) Stich, H. F., and Koropatnick, D. J. : The adaptation of short-term assays for carcinogens to the gastrointestinal



- system. In: Pathophysiology of Carcinogenesis to the Gastrointestinal System (edited by Farber, E. et al.), University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 121-134 (1977).
- 5) Mirsalis, J. C., and Butterworth, B. E.: Detection 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).
  - 6) Tyson, C. K., and Mirsalis, J. C.: Measurement of unscheduled DNA synthesis in rat kidney cells following in vivo treatment with genotoxic agents. *Environ. Mutagen.*, 7: 889-899 (1985).
  - 7) Steinmetz, K. L., and Mirsalis, J. C.: Induction of unscheduled DNA Synthesis in primary cultures of rat pancreas cells following in vivo and in vitro treatment with genotoxic agents. *Environ. Mutagen.*, 6: 321-330 (1984).
  - 8) Doolittle, D. J., Bermudez, E., Working, P. K., and Butterworth, B. E.: Measurement of genotoxic activity in multiple tissues following inhalation exposure to dimethylnitrosamine. *Mut. Res.*, 141: 123-127 (1984).
  - 9) Furihata, C., and Matsushima, T.: Unscheduled DNA synthesis in rat stomach-short-term assay of potential stomach carcinogens. In: Indicators of Genotoxic Exposure, Banbury Report 13 (edited by B. A. Bridges et al.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 123-135 (1982).
  - 10) Furihata, C., Yamawaki, Y., Jin, S., Mori, H., Kodama, K., Matsushima, T., Ishikawa, T., Takayama, S., and Nakadate, M.: Induction of unscheduled DNA synthesis in rat stomach mucosa by glandular stomach carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.*, 72: 1327-1334 (1984).
  - 11) Furihata, C., Takezawa, R., and Matsushima, T.: Unscheduled DNA synthesis and total DNA synthesis in rat forestomach stratified squamous epithelium. In: Evaluation of Short-Term Test for Carcinogens, Report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on In Vivo Assays (edited by J. Ashby et al.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, in press (1987).
  - 12) Furihata, C., and Matsushima, T.: Use of in vivo/in vitro unscheduled DNA synthesis for identification of organ-specific carcinogens. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 17: 245-277 (1987).
  - 13) Mitchel, A. D., and Mirsalis, J. C.: Unscheduled DNA synthesis as an indicator of genotoxic exposure. In: Single Cell Mutation Monitoring Systems (edited by A. A. Aansari and F. J. de Serres), Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 165-216 (1984).
  - 14) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K., and Butterworth, B. E.: Detection of genotoxic carcinogens in the in vivo-in vitro hepatocyte DNA repair assay. *Environ. Mutagen.*, 4: 553-562 (1982).
  - 15) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., and Penman, M. G.: An assessment of the in vivo rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mut. Res.*, 156: 1-18 (1985).
  - 16) Ashby, J., and Beije, B.: Concomitant observations of UDS in the liver and micronuclei in the bone marrow of rats exposed to cyclophosphamide or 2-acetylaminofluorene. *Mut. Res.*, 150: 383-392 (1985).
  - 17) Beije, B., and Ashby, J.: Use of in vivo/in vitro rat liver DNA repair assay to predict the relative rodent hepatocarcinogenic potency of new azo mutagens. *Carcinogenesis*, 6: 611-615 (1985).
  - 18) Butterworth, B. E., Earle, L. L., Strom, S., Jirtle, R., and Michalopoulos, G.: Induction of DNA repair in human and rat hepatocytes by 1,6-dinitropyrene. *Mut. Res.*, 122: 73-80 (1983).
  - 19) Doolittle, D. J., Sherrille, J. M., and Butterworth, B. E.: Influence of intestinal bacteria, sex of the animal, and position of the nitro group on the hepatic genotoxicity of nitrotoluene isomers in vivo. *Cancer Res.*, 43: 2836-2842 (1983).
  - 20) Butterworth, B. E., Bermudez, E., Smith-Oliver, T., Earle, L., Cattley, R., Martin, J., Popp, J. A., Strom, S., Jirtle, R., and Michalopoulos, G.: Lack of genotoxic activity of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes. *Carcinogenesis*, 5: 1329-1335 (1984).
  - 21) Furihata, C., Sato, Y., Matsushima, T., and Tatematsu, M.: Induction of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by methylglyoxal. *Carcinogenesis*, 6: 91-94 (1985).
  - 22) Furihata, C., Yoshida, S., and Matsushima, T.: Potential initiating and promoting activities of diacetyl and glyoxal in rat stomach mucosa. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 76: 809-814 (1985).
  - 23) Takahashi, M., Furukawa, F., Hasegawa, R., Sato, H., Jang, J. J., and Hayashi, Y.: Promoting effect of glyoxal in the two-stage gastric carcinogenesis of the rat. *Proc. Jpn. Cancer Assoc.*, 45: 43 (1986).

# 略語表

2-AAF, 2-アセチルアミノフルオレン;  
 4-AAF, 4-アセチルアミノフルオレン;  
 AFB<sub>1</sub>, アフラトキシンB<sub>1</sub>;  
 B[a]P, ベンツ[a]ピレン;  
 6-BT, 6-ジメチルアミノフェニルアゾベンツチアゾール;  
 CNEt 6-BT, 6-[p-(N-β-シアノエチル-N-メチルアミノ)フェニルアゾ]ベンツチアゾール;  
 DA, ジアセチル;  
 2,4-DAT, 2,4-ジアミノトルエン;  
 2,6-DAT, 2,6-ジアミノトルエン;  
 DEHP, ジ(2-エチルヘキシル)フタレート;  
 DEN, ジエチルニトロソアミン;  
 DABA, ジアミノ安息香酸;  
 DMBA, ジメチルベンツアントラセン;  
 1,1-DMH, 1,1-ジメチルヒドラジン;  
 1,2-DMH, 1,2-ジメチルヒドラジン;  
 DMN, ジメチルニトロソアミン;  
 DMSO, ジメチルスルフォキシド;  
 1,6-DNP, 1,6-ジニトロピレン;  
 2,6-DNT, 2,6-ジニトロトルエン;  
 EDTA, エチレンジアミン四酢酸ナトリウム;  
 ENNG, N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン;  
 G, グリオキザール;  
<sup>3</sup>HTdR, [<sup>3</sup>H]チミジン;  
 HNαC, 2-ヒドロキシ-3-ニトロソ-α-カルボリン;  
 HU, ヒドロキシウレア;  
 IQ, 2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]キノリン;



MA 6-BT, 6-モノメチルアミノフェニルアゾ  
ベンツチアゾール;  
MAMAc, メチルアゾキシメタノールアセテ  
ー  
ト;  
MG, メチルグリオキサール;  
MMS, メチルメタンスルホネート;  
MNNG, N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロ  
ソグアニジン;  
MNU, 1-メチル-1-ニトロソウレア;  
NCM, ニトロソシメチジン;  
NMUT, N-ニトロソ-N-メチルウレタン;  
4-NQO, 4-ニトロキノリン 1-オキシド;  
2-NT, 2-ニトロトルエン;  
3-NT, 3-ニトロトルエン;  
4-NT, 4-ニトロトルエン;  
PCA, 過塩素酸;  
PNNG, N-プロピル-N'-ニトロ-N-ニトロ  
ソグアニジン;  
6-PT, 6-[4-N-ピペリジニルフェニル]  
アゾベンゼン;  
SDS, ドデシル硫酸ナトリウム;  
TCA, トリクロロ酢酸;  
TdR, チミジン;  
TDS, 総DNA合成;  
Trp-P-1, 3-アミノ-1, 4-ジメチル-  
5H-ピリド [4,3-b] インドール;  
Trp-P-2, 3-アミノ-1-メチル-5H-  
ピリド [4,3-b] インドール;  
UDS, 不定期DNA合成;

## 総合討論の印象記

最近になって、Ames テスト系などの in vitro 変異原短期テスト法による変異原性の陽性とマウスやラットによる発癌性の陽性の相関は、かろうじて正の関係をたもつものの、初期のころに発表されたような80%以上も相関があるというようなことはないといわれた。これは Ramel 博士の特別講演でものべられた通りである。このことは、環境変異原研究者にとって、大問題である。これは、単純な in vitro テストの結果を、マウスやラットの発癌性という複雑な in vivo 現象に短絡してはいけないという警告であると思われる。本シンポジウムでは、両者の中間に位置する in vivo 短期検索法の長所をとり上げて、in vitro 短期検索法の欠点を補完する可能性をさぐってみた。

日ごろ in vitro 短期系を専門にしている方が、本日のべられた5種類の in vivo 短期系のどれか1つに興味をもってもらえれば、このシンポジウムを企画した目的の半分は達せられたことになる。この目的にそうため、演者には、自分の仕事を中心にしながらも、なるべく広い視野から、話をしてもらうようお願いしておいた。総合討論のようすから、多くの参加者の興味をひくのに成功したと、自賛している。以下少し内容に立ちいって、検索法それぞれの印象をのべる。

「不定期DNA合成(UDS)法」(降旗千恵): この方法では、1日に20匹のラットをこなすことができ、成績は2~3日後に得られるので、文字通り短期検索法である。欠点として、検体の中には、定期DNA合成の上昇をおこすものがしばしば

みつかる。ところが、定期DNA合成を起こした物質をよく調べてみると、その多くは癌化プロモーター活性をもつことが報告されているものだ、というのである。これは大変面白い。今後の検討をのぞみたい。

「<sup>32</sup>P ポストラベル法」(山下克美): 2個以上の環状構造をもつ化合物がDNAと付加体をつくると、その数が、10<sup>10</sup>ヌクレオチド当り1個という微量でも、この方法で検出できる。この新しい方法は、感度がいままでの方法よりけた違いによいだけに、技術的に難しいという定評がある。それを克服して、マウスに経口投与した検体について、DNA付加体が経時的に変化する様子が手にとるように示され、多くの聴衆を魅了した。この方法は、ヒトの環境汚染の暴露量の直接測定に適用できる大きな可能性をもっている。

「小核試験」(林 真): 広い視野に立って、小核試験の長所、短所の位置づけを披露してもらって、感銘をうけた。演者が強調したように、小核試験は、in vivo の短期試験法の1つとして、従来の染色体試験やSCEとは独立して発展するだろう、という印象をうけた。これから、この方法による陽性と発がん陽性の相関がどうなるか、楽しい問題である。

「マウスのスポット試験」(一ツ町晋也): マウスの体毛の色に関する劣性変異遺伝子をヘテロにもつ接合体を用いた体細胞突然変異検出法の解説がていねいになされた。胎盤通過性物質について



は、この系で陽性なものと発がん性の相関はひじょうに高い。しかし、胎盤を通過しないため、発癌原性をもちながらこの系で陰性なものがあ。これさえ克服されれば、発癌性に関して最良の短期検索法になる可能性がある。

「ハエのスポット試験」(梁 治子): ハエの個体細胞において、染色体組換え突然変異または遺伝子突然変異を検出する方法について紹介があった。ハエを用いる利点は、いままでのべられた方法に比べると、格段に安価で、簡便なことである。このことは、10名を越す会員がハエを用いてテストした初体験のデータが紹介されたことでもわかる。この系のもう1つの強みは、ショウジョウバエの分子生物学が急速に進歩しているため、DNA分子の変化まで下りて、変異の仕組みを論

じることができるようになりつつある点である。実際、その一部が紹介された。

討論は大へん活発で、本学会に新しい波がもり上ってきたことを感じさせた。この熱気が今後大きな流れになるかどうかは、若手の会員の熱意にかかっていると思う。最後に、佐藤茂秋氏より、in vivo 短期突然変異検索法は、欧米では、もうヒトについて行われているという発言があった。日本でも異、秋山両氏によって試みられているが、まだ少数派である。ヒトについて、体細胞変異の in vivo 検索とDNA付加体の検索が平行しておこなわれる日が近づいているようである。本日のシンポジウムが、日本環境変異原学会の新しい発展に役立つことを願ってやまない。

(近藤 宗平)

## 日本学術会議だより №.3

### 第13期初めての勧告・要望出る

昭和61年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る10月22日から24日まで第101回総会(第13期の4回目の総会)を開催しました。今回の「日本学術会議だより」では、今総会で採択され、政府に勧告した「国立代用臓器開発研究センター(仮称)の設立について」及び要望した「我が国における学術研究の推進について—大学院の充実等を中心として—」を中心として、同総会の議事内容をお知らせします。

また、来年1月に開催を予定している本会議主催の公開講演会等についてお知らせします。

#### 総会報告

総会はその初日に、会長からの経過報告、各委員会報告に続き、規則などの改正、勧告・要望の提案がなされ、午後の各部会での審議の上、2日目午前中にこれらの採決が行われた。なお、前日、21日午前に全員が出席する連合部会が開催され、これらの案件の予備的な説明・質疑が行われた。3日目は午前中、常置委員会、午後は特別委員会が開催された。

総会の冒頭に先に逝去された、第3部会員高宮 晋氏(部長)を追悼した後、新たに任命された野口 祐会員が紹介された。また、チェルノブイリの原子力発電所事故について、原子力工学研究連絡委員会委員長から8回の会合における検討に基づく、この研連の見解「原子力の平和利用と安全性」が委員長の下国際原子力機関での事故調査検討状況と共に報告された。

総会で決定された事項は、すべて「日本学術会議月報」11月号に詳しく掲載されるので、主要な項目の説明にとどめる。まず、第1常置委員会が鋭意検討されてきた、会則の改正、規則及び内規等が次のように採択された。会則の改正は、「衛生学研連」から「環境保健学研連」への名称変更である。規則の改正は、昭和63年度の第14期会員推薦手続きの手直しであって、その第1は、学術研究団体(学・協会)の登録に際し、従来の方式に加えて会員名簿などの添付を要請すること、会員推薦の場となる「推薦研連」に登録する学・協会を確保する方策などである。第2は、この登録された学・協会が会員候補者を届け出る際の記載事項を追加して、推薦人の判断資料を充実させることである。最後に推薦研連が熱工学研連から機械工学研連へ、衛生学研連から環境保健学研連へと変更された。

内規の改正は、日本学術会議の活動の周知と学・協会との連絡・協力を維持・強化するために、「連絡学・協会」の名の下に多くの学・協会との緊密な連絡を保ってきたが、今回、これを「広報協力学術団体」と改称し、別項のようにさらに広い範囲の学・協会と連携を図るようにしたものである。

特別委員会のうち、国際協力事業特委は任務を終了したので、それに代わり、人材養成などを含めて総合的・学際的・広域的な地域の研究機関のあり方を検討するために、「地域の研究推進特委」が設置され、直ちに委員を選出して活動を開始した。

本総会では、第7部提案の「国立代用臓器開発研究センター(仮称)の設立について(勧告)」、第4常置提案の「我が国における学術研究の推進について—大学院の充実等を中心として—(要望)」が採択され、直ちに内閣総理大臣始め関係諸機関等に送付した。これらの詳細は別項及び月報所載のとおりである。

第2日目午後、「高度情報社会の展望と課題」について自由討議を行った。

#### 国立代用臓器開発研究センター(仮称)の設立について(勧告)

人体のある臓器が障害を受け、従来の治療によっては、もはやその機能の回復が不可能になった場合には、当然、死に至るわけであるが、近代医学は、その臓器の機能を他のもので代替することによって、未だ完全の状態と言えないまでも生命の維持を可能にしている。その一つの手段が人工臓器であり、もう一つが臓器移植である。両者は代替という同じ目標を持ちながら、全く異なった研究アプローチで、それぞれ独立したテーマとして発足し、今日の進歩をみている。例えば腎臓移植と人工臓器との関係では、両者の技術は全く異なっている。しかし、慢性腎不全の治療における両者の相補的効果は極めて高いものである。人工臓器と臓器移植とはあたかも車の両輪のような関係にあるので、医療の場において両者を一体化した医療システムが強く要求されている。

このような関係にある両者を合わせ、代用臓器と呼んでいるが、この研究が今後飛躍的に進めば、臓器疾患に悩む患者の治療に貢献することは間違いない。一方これら研究の我が国の現状をみると、個別的に極めて優れた成果を挙げているものもあるが、全体的にはまだ十分の研究体制が整っているとはいえない。その理由を考えてみると、臓器移植の面では、臓器取得に関連して、我が国の脳死問題を含む死の判定等人の考え方の相違に基づくと思われる問題が大きいことである。人工臓器の面では、基礎材料の研究に始まり、エネルギー、エネルギー変換機構、駆動機構や臓器機能の制御システムの開発などは、各分野の専門家による有機的な組織のもとでの研究が必要であるにもかかわらず、そのような研究体制が我が国にはなかったのである。

医学、薬学、生物学、理学、工学、農学にわたる分野の研究が緊密な協力研究を行い、臓器置換を安全に、有効に行うため生体生理機構を解明しつつ、システムとテクノロジーを確立することが緊急に必要と考えられる。ただ本研究は臓器置換という生命の尊厳に係わる医の倫理問題が関係しているため、本研究センターの運営には、人文社会科学系の方々の参加を求め、また、本研究センター内の活動に係わっては、研究者の倫理的思考の行き過ぎを抑制し、社会の理解を深めるなど医の倫理を検討する組織の設置を計画し、運営機構が一方では開発研究にあたって独創的研究を積極的に推進し、臓器置換という医療がここに飛躍的に進展するよう期待したい。

詳細は日本学術会議月報11月号を参照されたい。



## 我が国における学術研究の推進について —大学院の充実等を中心として—(要望)

次の代を担う若い人達をどうしたら立派に育成することができるとい問題は、その国の将来を決める上で重要である。日本学術会議においても第13期活動計画の中にこの種の問題の重要性をうたっているが、これからは経済的のみならず学術的にも大きく世界に貢献する立場に置かれているだけに、独創的な若い人達を育成する必要が一段と強まっている。

学術研究推進のための一つの大きな柱として若い研究者の育成、特に大学院の充実等を中心としてまとめる際、むずかしい基本的な問題は、学問分野によって事情が著しく異なるが、今回の「要望」はおおむね各分野に共通する問題であり緊急性の高いものにしようとした。その中では学問の急速な進歩に対応し得るよう、長期的展望にたつて大学院(必要な人員、設備、建物面積や経常費等)を抜本的に強化充実を図る必要性を強調し、さらに大学院における人材養成について基本的問題を踏まえて、大学が大学院の内容を自主的に検討し、改善すべき点は積極的かつ的確に実現していくことが必要である。

一方研究者の層をもっと厚くし、研究基盤を強化し、特に基礎科学の分野の充実を図ることが急務である。研究者の交流その他、種々の問題があるが、一つの新しい建設的提言として地域研究機構の設立がある。研究機器が年々性能が向上すると共にその価格が高くなる情勢下において、効率よく使う仕組みが要求されている今日、日帰りで使える地理的範囲に先端機器を配置すると共に、その場を、その地域に特徴的なしかも世界的レベルの独創的研究を育成する場とし、研究者の日常的交流、協力を、国内、国外、産官学の広い範囲にわたって図ろうとするものである。その他年々加速度的に盛んになる国際交流についても、特に若い研究者達が日常的に国際競争の場の中で育成される条件を整えることが重要である。

この要望は大学院の充実という、考えようによっては当然の事柄が、現在あまりにも不十分である現実を前にして、国に対して、また大学自身に対して出されたものである。

詳細は、日本学術会議月報11月号を参照されたい。

## 広報協力学術団体の申込について

本会議では、第101回総会で内規の一部改正が行われ、従来の「連絡学・協会」は、名称を「広報協力学術団体」と改め、資格要件も大幅に緩和されました。「広報協力学術団体」とは本会議活動の周知を図るとともに、各分野の学術研究団体との緊密な連絡・協力関係を維持し、強化するため広報活動に協力してもらうために指定する団体です。詳細は事務局にお問い合わせください。

なお、登録学術研究団体、従来からの連絡学・協会は自動的に指定されたものとみなします。

## 公開講演会開催のお知らせ

本会議は、9月27日「21世紀の学術」をテーマとした公開講演会を開催したが、第2回目の公開講演会を次のように企画しているので、多数の方々の御来場をお願いしたい。

☆ テーマ 学問の自由と科学者の責任

☆ 日 時 昭和62年1月24日(土)13時30分～17時

☆ 会 場 日本学術会議講堂

☆ 演題及び演者

- 科学研究の環境と科学者の責任(大木道則 第4部会員、東京大学理学部教授)
- 学問の自由と教育の自由(大田 堯 第1部会員、東京大学名誉教授)
- 生命科学の進歩と科学者の責任(渡辺 格第4部会員、北里大学衛生学部教授)

## 自由討議—高度情報社会の展望と課題—

この自由討議は今期に設置された、高度情報社会特別委員会のメンバーが、個人の立場で、来るべき高度情報社会の展望と課題についての意見を発表したものである。第3部竹内 啓(可能性と展望)、第5部平山 博(技術的展望と問題点)、第2部正田 彬(人権)、第4部坂井利之(人間)、第1部東 洋(教育)の各会員がそれぞれ付記したサブテーマについて問題を提起した。これに続いて、第7部梅垣洋一郎(医学・医療)、第6部飯田 格(情報と図書館)の各会員からコメントが提出された。

すべての部にまたがる広汎な分野からの発表であるから、その対象・論旨は多様であったが、あえて要約すると以下のようである。

これまでの「人」と「物」の社会に、これらと独立して「情報」が生まれた。情報の処理、通信(伝送)、記憶の超高速、巨大化と認識・識別の高度の発展により、労働形態・教育・医療も含めて社会を大きく変化させることが予想される一面、人権、人間疎外を始めとする影の部分にも十分に配慮する必要があると強調された。

なお、この自由討議は別途刊行される予定である。

## 財団法人日本学術協力財団設立

日本学術会議と密接に連携しつつ、本会議の成果を国民に還元するため出版事業や国際会議の計画策定などを行う財団法人日本学術協力財団(〒106 東京都港区西麻布3-24-20 TEL 03(403)2860)が10月17日、内閣総理大臣所管の公益法人として設立されました。

この財団は事業の一つとして、日本学術会議総会時における自由討議等を「日学双書」としてシリーズで発行・販売することにしており、当面、脳死をめぐる諸問題(11月初旬発行)、21世紀の学術(12月中旬発行予定)及び高度情報社会の展望と課題(2月中旬発行予定)が予定されています。

## 学術研究団体調査についてお願い

日本学術会議事務局では、昭和61年7月1日現在で全国の学術研究団体(いわゆる学・協会)の調査を実施しています。

この調査は、全国の学術研究団体の最近の活動状況を把握することを目的としており、主要な項目については、「総覧」として刊行することを計画しております。

当事務局で承知している各学術研究団体には、既に調査依頼を行っておりますが、最近発足した学術研究団体などで調査依頼が未着のところがありましたら、当事務局推薦管理事務局あてに御連絡くださるようお願いいたします。

☆ 申込方法:往復はがき(住所、氏名を明記)

☆ 定 員:300人(先着順)

☆ 申込締切日:昭和62年1月17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」に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

# 日本学術会議だより

No.4

## 21世紀の学術とその動向調査

昭和62年2月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、昨年9月27日(土)、初めて日本学術会議主催公開講演会を開催しました。

今回の「日本学術会議だより」では、公開講演会「21世紀の学術」の講演内容と日本学術会議の国際交流事業の一つである二国間学術交流及び来年度に開催される共同主催国際会議についてお知らせします。

また、昨年10月、第101回総会で設置された「地域の研究推進特別委員会」等について内容を紹介いたします。

## 公開講演会「21世紀の学術」

本会議は、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、9月27日、本会議講堂において、公開講演会「21世紀の学術」を開催した。

これは、第13期日本学術会議主催の初めての公開講演会であったが、各界各層及び一般市民から350人以上が聴講し、成功裡のうちに終了した。

講演は、3人の演者の講演とそれに関連する質疑応答が行われた。

まず最初に、近藤次郎日本学術会議会長が「これからの科学の望ましいあり方」について、1855年王立研究所のファラデーの講演を示しながら、学術会議の講演会の意義を述べるとともに、21世紀の中期に焦点をあてて明暗の予測として、人口増加、CO<sub>2</sub>の増加、森林喪失、砂漠化、核戦争の影響、核の冬の問題等について、スライドを交えながら意見を述べられた。そして、最後に科学技術の進歩が新たな職業を労働者に提供するとともに、多くの失敗も相次いで起こっており、そこで科学を望ましい方向に力説した。

次に、本明寛日本学術会議第1部長(早稲田大学教授)が「創造性豊かな人材の育成」について、若者の創造性をいかにして養成するかは、指導する側の態度・助言及び自己主張を表現できるムード・環境作りが重要であるとともに、若者の個性を伸ばすためには「見る・聴く」の教育から「聴く・話させる」の教育へ移行させる必要性が述べられ、21世紀に向けて、今、若者をいかにして「教える」かではなく、「育てる」かが重大であると力説した。

最後に、西川哲治日本学術会議第4部会員(高エネルギー物理学研究所長)が「学術研究における国際性」について、演者の専門分野である物理学特に原子核物理学の分野を中心に演者の体験を踏まえて、高エネルギー物理学のみならず基礎科学の研究には国際協力が不可欠であり、国と国とが独自の個体となって対等なぶつかり合うことが重要であると述べられた。そして、現在、日本では言葉の力がかが問題であるが、来訪者に対して特別扱いせず、発展途上国からの研究者に対しても温かく見守るだけでなく、自分でやれるように仕向けることが必要であると力説した。

(なお、この講演会の講演内容は、日学双書第2刊として、財団法人日本学術協力財団から出版されます。1月末日発行予定)

このような日本学術会議主催の公開講演会は、今後各年度2～3回を目標に開催していくこととしております。

## 二国間学術交流

本会議は、我が国が科学や技術面において諸外国と交流を深め、それにより我が国の科学技術の総合的な発展に寄与することを目的として、昭和58年度から毎年2か国を選んで代表団を派遣している。58年度にはアメリカ合衆国、マレーシア、59年度にはドイツ連邦共和国、インドネシア共和国、60年度にはスウェーデン王国、タイ王国、そして今年度は11月15日から24日までフランス共和国へ、また、12月8日から14日まで大韓民国へ会長、副会長以下7名ずつの会員を派遣した。

日本学術会議の第13期は、その活動計画にあるとおり、「学術研究の国際性重視と国際的視野の確立」をその活動の重要な柱の一つとしている。今回もその観点に立つて訪問諸機関との間で熱心な協議が行われた。

今回の代表団は、派遣国において科学技術政策や教育を担当する行政機関、研究所、大学等を訪問し、情報交換を行い、さらに訪問先の関係者と両国の学術研究とその問題点について討論を行った。

フランスでは、特に教育の問題について関心が高く、この問題について各地で関係者から種々の意見を聞くとともに情報の交換を行った。さらに近藤会長がコレージュ・ド・フランス及び国立科学研究センターで「日本の最近の科学・技術政策について」講演を行ったが、これに対し、最近のフランスの我が国科学技術政策への関心の高まりを反映し、熱心な意見交換が行われた。

韓国では、最近の産業の発展と科学技術の役割の観点から日本学術会議の役割と活動を含め、我が国の学術体制への質問が多く出されるとともに学術研究の面における協力要請が各訪問先で出され、我が国に対する期待が高いことを深く痛感した。

今回の成果は、代表団の訪問時だけのものだけでなく、今後の相手国との継続的な科学者の交流、情報、資料の緊密な交換、日本学術会議と相手国機関と相互理解の促進、関係緊密化等の形で永続的に表れるものであり、加えて、これらの成果は、我が国の学術研究の国際交流・協力の基本姿勢及びその抜本的充実方策を検討する場合の大きな資料として役立つものと期待される。



## 昭和62年度共同主催国際会議

我が国の多数の科学者が世界各国を代表する関係科学者と接し、最近の研究情報を交換し、我が国の科学の向上発達を図り、行政、産業及び国民生活に科学を反映浸透させることを目的として、昭和28年以降毎年おおむね4件の学術関係国際会議を学・協会と共同主催している。近年、国内外において日本開催の要請が強く、また、日本開催国際会議は高い評価を得ている。昭和62年度は次の4国際会議を開催する。

### 第6回ケムローン世界会議

開催期日 昭和62年5月17日～22日  
開催場所 東京都（都市センターホール）  
参加者数 国外 300人、国内 600人、計 900人  
[36か国]  
共催団体 ①日本化学会

※ この会議は、産業、経済の発展と密接な関係を持つ材料問題と材料、宇宙開発の将来計画と材料、未来のコンピュータと材料等について研究発表と討論を行い、材料工学の発展を図ることを目的としている。

### 第18回低温物理学国際会議

開催期日 昭和62年8月19日～26日  
開催場所 京都市（国立京都国際会館）  
参加者数 国外 600人、国内 750人、計 1350人  
[38か国]  
共催団体 ①日本物理学会、②応用物理学会

※ この会議は、量子液体、量子固体、超伝導、固体の低温物性、低温技術及び応用等を主要題目とし、研究発表と討論を行い、低温物理学の発展を図ることを目的としている。

### 法哲学・社会哲学国際学会連合第13回世界会議

開催期日 昭和62年8月20日～26日  
開催場所 神戸市（神戸国際会議場）  
参加者数 国外 150人、国内 300人、計 450人  
[22か国]  
共催団体 日本法哲学会

※ この会議は、法、文化、科学技術—異文化間の相互理解を主要題目とし、科学技術の時代における法と倫理、現代法哲学・現代法社会哲学の基本問題、東西法文化の比較について研究発表と討論を行い、法哲学・社会哲学の発展を図ることを目的としている。

### 第6回国際会計教育会議

開催期日 昭和62年10月7日～10日  
開催場所 京都市（国立京都国際会館）  
参加者数 国外 250人、国内 400人、計 650人  
[56か国]  
共催団体 日本会計研究学会、日本経済学会連合

※ この会議は、国際理解のための会計教育、会計研究を主要題目とし、研究発表と討論を行い、会計研究の発展を図ることを目的としている。

## 地域の研究推進特別委員会

日本学術会議は、昨年10月の第101回総会において、「臨時（特別）委員会の設置について（申し合せ）」の一部を改正し、新たに「地域の研究推進特別委員会」を設置することとした。

[目的]

基礎的研究を十分に発展させるためには、研究基盤が広く整備され、各地で特色をもった研究が行われて、研究者

の交流、人事の流動なども活発に行われることが必要である。

地域における学術の振興のための学術体制については、その必要性に応じていろいろな方策が考えられているが、当面、地域に個々の大学、研究機関及び産業界の研究者等に広く開かれた共同利用の総合的、学際的研究機関を設置するのが最も实际的で、かつ有効な方策であろうと思われる。このような研究機関は、地域の研究に関する中枢的機能も果たすべきである。

## 学術研究動向に関するアンケート調査 についてお願い

日本学術会議第3常置委員会では、第13期における活動の一環として学術研究動向の現状分析とその展望を行い、今後の学術研究の発展に寄与するために「学術研究動向に関する白書（仮称）」の作成を主要目標としています。

この白書作成については、第99回総会（昭和60年10月）で決定した第13期活動計画において「学術研究の動向について総合的分析を加え、その長期的な研究計画を総合的レビューのためのいわゆる『学術白書』の作成の可能性を検討する」と述べられており、次の第100回総会（昭和61年4月）において、この白書を作成することが了解されました。これらの総会の決定に基づき、白書の具体的内容、作成手続等について検討を重ねてきた第3常置委員会では、白書作成のための資料を得る目的で、本会議の全会員・研究連絡委員会委員および学術研究団体等に対する学術研究動向に関するアンケート調査を実施することにしました。

今回作成予定の白書は、人文・社会及び自然科学の全学問分野の現状分析と動向の的確な把握、問題点の解明等を行うことを目指していますが、これらのことを適切に行うためには、全会員の英知の結集等が不可欠なことは言うまでもありませんが、更にそれに加えて、現に日本学術会議の存在の基盤を成している全学問領域にわたる約830の学術研究団体及び各専門の学問領域や研究課題ごとに設置された180の研究連絡委員会（委員数2370人）の御協力、御支援が是非とも必要であると考えております。

以上のことを踏まえて、アンケート調査の具体的な手順としては、現在、全会員・研究連絡委員会委員にアンケート調査票を発送済みであり、昭和62年2月28日を締切期日として回答願うこととしております。

また、学術研究団体等に対するアンケート調査は、3月上旬に依頼することにし、回答締切は4月末を予定しております。

白書の内容は、各団体等の研究計画等を考える上で種々活用していただけないかと思っておりますので、アンケート調査票がお手許に届きました学術研究団体等におかれましては、年度末の御多用の折、御面倒をおかけしますが、御協力のほどよろしくお願いいたします。

多数の学・協会の御協力により、「日本学術会議だより」に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

## 日本学術会議だより

№.5

## 地域型研究機関設立（勧告）・学術予算の増額（要望）出される

昭和62年5月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る4月22日から24日まで第102回総会（第13期の5回目の総会）を開催しました。今回の「日本学術会議だより」では、今総会で採択された勧告、要望等を中心として、同総会の議事内容をお知らせします。

## 総会報告

総会ではその第1日目に、会長からの経過報告、各委員会報告に続き、規則などの改正、勧告・要望等の6つの提案がなされ、同日の午前中に提案1件が、午後に各分会で審議した上、第2日目の午前中に3件が、第3日目の午前中に1件の採決が行われた。なお、総会前日の21日午前に連合部会が開催され、これらの案件の予備的な説明、質疑が行われ、第2日目の午後には、「21世紀へ向けてのエネルギー問題」についての自由討議が、第3日目の午後にはそれぞれの常置委員会、特別委員会が開催された。

また総会の冒頭に、先に逝去された北川晴雄会員（第7部副部長）を追悼して黙禱を捧げた後、新たに任命された鶴藤丞会員が紹介された。

第1日目の午前中にまず現代の「高度技術化社会」における人間の役割と対応及び「こころ」の健康の回復、増進の問題について総合的に検討するために「マン・システム・インターフェース（人間と高度技術化社会）特別委員会」を設置することが決定された。今期は余すところ約1年間であり、この特別委員会は各部から委員を選出して直ちに活動を開始した。第2日目の午前には、まず、第1常置委員会等で検討されてきた「日本学術会議の運営の細則に関する内規」の一部改正が採択された。改正の第一は、従来の地方区会議の名称を地区会議とし、広報委員会がこれを組織することとしたことであり、第二は日本学術会議が勧告等を出すに当たって整合性を考慮すべき過去に行った勧告等を3期前から後のものに限ることとしたことである。次に第6常置委員会が検討してきた日本学術会議の行う国際学術交流事業の実施に関する内規の改正が採択された。これは、今まで国際学術交流事業については、「団体加入」、「代表派遣」、「国際会議主催・後援」、及び「二国間学術交流」の基準があったが、これらを一つの内規にまとめたものであり、本会議の行う国際学術交流事業の見直しを今後行い、必要な自己改革を図る原則を定め、予算、組織等の基盤の拡充・強化に努めて、国際社会への学術的貢献を一層拡大してゆこうとする方針を確立したものである。

さらに本総会では、「地域型研究機関（仮称）の設立について」（勧告）と、「大学等における学術予算の増額について」（要望）の提案が、いずれも活発な質疑応答の後、賛成多数で採択され、直ちに内閣総理大臣始め関係諸機関

等に送付された。（これらの詳細は別項所載のとおりである。）

また本総会では「医療技術と人間の生命特別委員会」の中間報告—いわゆる脳死に関する見解—を対外発表することに関する提案が行われた。これは同特別委員会が60年10月から審議を重ねてきたものであって、基本的には脳死を個体死とすべきであるとの主旨であった。日本学術会議の内規によれば、各委員会等の報告を外部に発表するには総会または運営審議会の承認を必要とすることになっており、この件は対外発表の可否を問うものとして総会に提案されたのであった。しかし、この重要性にかんがみ慎重論、時期尚早論の空気が強く、対外発表の可否を問う提案としては取り下げられ、総会でこの問題を討論することとなり、第2・3日目の両日にわたり活発な討論が行われた。

## 「地域型研究機関の設立について（勧告）」

我が国の基礎的学術研究の水準を一層高めるためには、各地域の研究を高度化し、地域の特色に基づく活発な国際対応を可能にする条件を整備しなければならない。

そのためには、地域の大学や研究機関を活性化するとともに、地域の研究者並びに社会の要請に即した課題について総合的なプロジェクトを実施し得る基盤を整備する必要がある。

これを達成するためには、要所に地域型研究機関（「地域センター」という。）を置く必要がある。この地域センターは、地域の特性を活かした研究やその地域に深く関連する研究の拠点としての機能とともに、既存の研究機関及び研究領域の枠を越えて研究者の交流を促進する機能をもったものである。従って地域センターには、相互に利用し得る研究機器や研究資料を備える必要がある。

地域センターの規模・内容は、各地域の研究者の自主的・具体的要請によって異なるが、次のいずれかまたはこれ等を組み合わせた形態をもつ。

- A 地域研究（area studies）を主とするもの
- B 大型共同利用機器を備えるもの
- C 中小型の研究機器及びその他の研究設備を備えるもの

なお、設置形態は、国公立大学等の研究者が、平等に利用し得る国立の共同利用機関とし、官公庁、産業界にも自由に開かれたものを目指す。



## 大学等における学術予算の増額について(要望)

「国が栄える時、そこには立派な大学がある」といわれる。大学において優れた人材が養成され、独創的かつ自主的な研究活動を通して学術が振興し、高い文化が形作られ新しい技術が生まれる。大学は、国際的にも学術交流の場として、広く世界の協調と平和のために基本的に重要な役割を果たしている。

しかし、現在、我が国における大学を中心とする学術研究の財政的基盤は極めて憂慮すべき事態におかれている。これは一つには国の財政事情によって、現行の概算要求の枠組みが強い制約になっているからであり、時代の進歩に即応した学術予算を組むことが非常に困難な情勢になっている、しかも、このひずみは年毎に増幅されつつある。

文化国家としての実を挙げ、学術の振興を図るためには、まず、大学等における学術予算をこの際思いきって増強することが絶対に必要である。そのためには学術予算を組む上において、一般の予算要求のシーリングの別枠として、当面5年間の増額計画を策定する措置をとるよう強く要望する。なお、科学研究費補助金及び日本学術振興会の事業予算について、毎年少なくとも15%増加させ、5年間で倍増し、国公立の大学への国費の支出についても、格段の増額を図るよう考慮されたい。

## 自由討議—21世紀へ向けてのエネルギー問題—

この自由討議は、今期設置された「資源・エネルギーと文化・経済・環境特別委員会(エネ特)」のメンバーが主となり、個人の立場で、来るべき21世紀へ向けてのエネルギー問題の展望と課題について意見を発表したものである。会長近藤次郎(エネルギー問題の基調講演)、第5部、エネ特委員長上之園親佐(エネルギー問題の研究動向と将来)、第5部垣花秀武(原子力の安全性、廃棄物処理並びに核拡散問題についての研究動向)、第3部、エネ特委員則武保夫(経済の立場からみた資源<特に石油>問題)の各委員がそれぞれ付記したサブテーマについて問題を提起した。これに続いて、第4部、エネ特委員澤田龍吉(環境問題に関連して)、第5部、エネ特委員山口梅太郎(資源問題に関連して)、第7部、エネ特委員梅垣洋一郎(健康問題に関連して)、第2部、エネ特委員小山 昇(社会問題に関連して)、第4部大島康行(グローバル・チェンジ・プログラム(ICSU))の各委員からコメントが提出された。さらに、出席会員のうち第2部及川 伸会員、第7部曲直部壽夫会員、第5部山口梅太郎会員、第4部西川 治会員、第2部関 寛治会員からコメントが提出された。

エネルギー問題は広い分野に関連しているが、文化とエネルギーについてのコメントが得られなかったのは惜しいことであった。この度の提起・提出された対象・論旨は多様であったが、あえて要約すると以下のようである。

人間は有史以来、指数関数的に人口が増加し、消費エネルギーも増大した。その結果放射能や大気汚染からの障害が問題となってきた。これら障害を絶無とすることは極めて重要である。熱エネルギーから電気エネルギーへの有効変換効率を高めて省エネルギー化をはかること、核燃料サイクルによって核燃料を有効に使用し、かつ廃棄物処理に関する研究は重要であること、石油資源は、現在すぐになくなることはないが、地下探査法と掘削技術を開発して資源評価を高めることが強調された。

## 社会福祉におけるケアワーカー(介護職員)の専門性と資格制度について(意見)

社会福祉・社会保障研究連絡委員会では、従来、我が国では全く問題とされていなかったケアワーカーの問題について、2月25日厚生大臣に表記の意見書を提出した。

意見書の中身の主要な点は、後期高齢者の増加に伴い、“重介護”を要するものが増えてきていることに對し、その介護を受けるものの人間としての尊厳に立った介護を担うケアワーカー(寮母職、家庭奉仕員及び家事援助者などのホーム・ヘルパーに類する職種の担い手)の専門性を明らかにし、その専門性に基づく資格制度を造ることによって質を高め、さらに量的拡大を図る必要がある。資格は、高校卒業後、最低6か月の実習を含んだ2年間の採用前訓練を条件とし、またその職務にふさわしい待遇を確立することなどである。

いずれも既に高齢化の進んでいる国々、例えばイギリス、西ドイツ、スウェーデンなどでは実現していることであり、今後、日本の高齢化社会の急速な進展を考えると、当然のことといえよう。

ことに、高齢時におけるケアワーカーの問題はその需要の広がりへのたんなる対応以上に大切である。それは、いわゆる“重介護”を要する高齢時において、その介護の在り方が、誰でもできるというものではないということである。その人の心身にあう介護を、直接身体に触れながら、多面的な要求にみあって、最後まで人間らしさを損なわずに行うことが、肝要である。そのためには、何よりもケアワーカーの倫理性、科学性、技能そしてそれらの統合された専門性が、欠くことのできないものである。

なお、以上の結論は、社会福祉・社会保障研連の委員会(月1回を原則)で、現場の実践を参考にし、約2年間の検討及び昨年12月9日に行った公開シンポジウム「高齢者問題と福祉サービス」(参加者約200名)の討論を基にまとめたものである。

## 日本学術会議第14期会員の選出に係る学術研究団体の登録について

日本学術会議会員の選出に係わって、「会員の候補者」を選定し、その推薦に当たる「推薦人」を指名し、届け出ることを希望する学術研究団体は、期ごとに日本学術会議に「登録」をする必要があります。

(従って、第13期における登録学術研究団体も、第14期会員の推薦のための登録学術研究団体となるためには、改めて第14期の「登録」が必要です。)

第14期会員の推薦のための登録学術研究団体となるためには、所定の様式による「学術研究団体登録申請書」を、昭和62年6月30日までに日本学術会議会員推薦管理会に到達するように提出しなければなりません。

「学術研究団体登録申請書」は、所定の様式と用紙がありますので、日本学術会議会員推薦管理会に請求してください。無料で送付します。

多数の学術研究団体の御協力により、「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

## 日本学術会議だより №.6

## マン・システム・インターフェース(人間と高度技術化社会)特別委員会設置さる

昭和62年8月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議では、特別委員会が追加設置され、活動を開始しました。また、現在第14期(昭和63年7月22日より3年間)会員の選出手続きが進められています。今回の「日本学術会議だより」では、これらの概要に加えて、来年度に開催される共同主催国際会議及び研究連絡委員会報告等についてお知らせします。

## マン・システム・インターフェース(人間と高度技術化社会)特別委員会

日本学術会議は、昭和62年4月の第102回総会において新たに「マン・システム・インターフェース(人間と高度技術化社会)特別委員会」を設置した。

高度な技術革新とその急速な浸透により、現代の社会はいわゆる「高度技術化社会」ということができる。すなわち、今日社会の各分野で、化学プラントや原子力発電所等に見られるごとく「システムの巨大化」が進むとともに、OA機器などのように「高度技術の大衆化」等も起こっている。

「高度技術化社会」においては、機械システム又はソフトシステムに対する人間の役割が、従来のものと大幅に変化しており、人間は新たに重要な役割を担うようになってきている。これらの人間の役割を軽減したり代替するために各種のインターフェースが設計され、装備されている。

これらのインターフェースは、人間—システム系の信頼性・安全性を高める上で極めて重要である。従って「高度技術化社会」を維持・発展させるためには、この方面の研究、開発が今後ますます重点的に行われなければならない。

しかし、現実には「高度技術化社会」における「システムの巨大化」や「高度技術の大衆化」に対して、人間は個人としても、社会としても、必ずしも十分な対応・受容ができていとは言えない。人間の能力を超えるシステムが技術的に実現したことによって、かえって人間としての生甲斐を喪失する人も一部に生じている。その結果、いわゆるテクノストレスの状態に陥ったり、人間味の喪失による不適応状況に悩む者が増加している。これはまた、人間—システム系のヒューマン・エラーによる大事故の一因ともなっている。また「高度技術化社会」から取り残されたと感じる人々の中には、種々の回避的なないし攻撃的な不適応行動を呈する者もみられ、今後、大きな社会問題となることが予想される。

「高度技術化社会」では、以上のような諸問題に対する対処策ないしは予防策のみでなく、人間性の回復・維持の問題を含めて、十分な対応が講ぜられる必要がある。

以上の観点に立て、このような問題を学際的かつ総合的に検討するために特別委員会を設置することとした。

日本学術会議第13期は、その活動期間を1年余残すのみになっているが、この問題の重要性に鑑み、期の途中であるが着手することとした。

## 日本学術会議会員選出制度

日本学術会議は、210人の会員をもって組織されているが、その会員は次の手続きにより選出(推薦)される。現在第14期会員(任期:昭和63年7月22日から3年間)を選出(推薦)するための手続きが進められているところである。【手続概略】

- 1 会員の候補者を選定し、及び推薦人(会員の推薦に当たる者)を指名することを希望する学術研究団体は、日本学術会議に登録を申請する(昭和62年6月30日締切り)。申請する場合には、その学術研究団体の目的とする学術研究の領域と関連する研究連絡委員会を届け出なければならない。届け出られた研究連絡委員会が「関連研究連絡委員会」(3参照)である。
- 2 関連研究連絡委員会により区分された学術研究の領域(以下「学術研究領域」という。)ごとに、会員の候補者及び推薦人を届け出ることになる。
- 3 日本学術会議会員推薦管理会は、この申請を審査し、その学術研究団体が所定の要件を満たすものであるときは、関連研究連絡委員会その他の事項を登録する。登録された学術研究団体が「登録学術研究団体」である。
- 4 登録学術研究団体が届け出た関連研究連絡委員会が複数あるときは、日本学術会議会長は、登録学術研究団体の意見を聴いて関連研究連絡委員会を限定(指定)する(11月30日までに指定)。
- 5 登録学術研究団体は、その構成員である科学者のうちから、会員の候補者を「学術研究領域」ごとに選定し、日本学術会議に届け出る(昭和63年2月1日締切り)。
- 6 日本学術会議会員推薦管理会は、届け出られた会員の候補者が会員の資格を有する者であるかどうか認定する。
- 7 登録学術研究団体は、その構成員である科学者のうちから、推薦人を「学術研究領域」ごとに指名し、日本学術会議に届け出る(2月20日締切り)。
- 8 推薦人は、「学術研究領域」ごとに、日本学術会議会員推薦管理会が会員となる資格を有すると認定した会員の候補者のうちから、会員として推薦すべき者及び補欠の会員として推薦すべき者を選考・決定する(5月中旬～6月上旬)。
- 9 推薦人は、会員として推薦すべき者及び補欠の会員として推薦すべき者を、日本学術会議を経由して、内閣総理大臣に推薦する(6月中旬)。
- 10 内閣総理大臣は、その推薦に基づいて、会員を任命する(7月22日)。



## 昭和63年度共同主催国際会議

本会議は、昭和28年以降毎年おおむね4件の学術関係国際会議を関係学術研究団体と共同主催しているが、昭和63年度は次の4国際会議を我が国において開催することとした。(昭和62年6月16日(火)閣議了解)

### 国際家族法学会第6回世界会議

開催期間：昭和63年4月6日～12日  
開催場所：日本大学会館（東京都）  
共催団体：日本家族〈社会と法〉学会

### 第9回世界地震工学会議

開催期間：昭和63年8月2日～9日  
開催場所：ホテルニューオオタニ（東京都）、国立京都国際会館（京都市）  
共催団体：土木学会、日本建築学会、土質工学会、日本機械学会、地震学会、震災予防協会

### 第8回国際内分泌学会議

開催期間：昭和63年7月17日～23日  
開催場所：国立京都国際会館（京都市）  
共催団体：日本内分泌学会

### 第5回国際植物病理学会議

開催期間：昭和63年8月20日～27日  
開催場所：国立京都国際会館（京都市）  
共催団体：日本植物病理学会、日本植物防疫協会

## 我が国の理科教育について（意見）

### —日本学術会議科学教育研究連絡委員会報告—

本研究連絡委員会は、かねて我が国と世界各国との学校における理科教育の実態について関心を持ち比較を行ってきたが、昨年教育課程審議会の発表した教育課程改定の大綱に関する中間報告と各教科の時間数に関する試案は、我が国の理科教育の世界の動向からの逸脱をはっきりさせたものとして、深い憂慮の念を示すものである。

#### 意見（要旨）

第2次大戦後、科学技術立国は我が国の国是であった。この方向に資するため、我が国は学校における理科教育の振興に努め、大学における科学・技術の教育・研究にも多大の力を注いできた。しかるに、現今の国の施策を見ると、上述の方向とは逆行するものが増えていと言わねばならない。今回の中間報告に見られる小学校低学年理科の廃止、小学校から中学校まで9年間の理科の時間数は昭和43年に比べて6～7時間の減、高等学校においては、昭和35年に6単位（4科目必修）か昭和53年に4単位（理科Ⅰのみ必修）となり今回もそれが引き継がれようとしている。

学校教育における時間数の削減は必ずしも他の教科になかった現象ではないが、理科においてその減少が特に顕著であった。我々はこの点について強い危機感を抱くものであるが、その理由は理科に関する教育は児童・生徒の心身の発達に見合って、その内容を設定していく必要があるからで、時間数の削減がその適期を逸する恐れが強くなったからである。我々は、今後の理科教育において次の手当がなされるべきであると考えている。

- 1 小学校においては、健全な自然観の育成を目標とし、低学年の理科も存続させる。
- 2 中学校・高等学校においては、科学技術に生きる人間としての能力を育成するため充分の時間を確保する。

## 地区会議活動について

日本学術会議は、全国を、北海道、東北、関東、中部、近畿、中国・四国、九州・沖縄の7ブロックに分け、「地区会議」を組織している。

これらの地区会議は、運営審議会附置広報委員会の下に置かれ、学術会議の各部・委員会等の活動状況を各地区内の科学者等に周知し、また、学術会議に対する意見、要望を汲み上げて、学術会議と科学者との意志疎通を図るとともに、地域社会の学術の振興に寄与することを目的としている。

各地区会議は、原則として、当該地区に居住、あるいは勤務している学術会議会員の中から各部（第1部～第7部）1人ずつ計7人をもって構成することとされているが、該当する会員全員を構成員としている地区も多い。また、部によっては、該当する会員のいない地区があり、その場合には研究連絡委員会委員を構成員としている。

各地区会議は、構成員である会員の中から代表幹事1人（関東地区のみ2人）を選び、その主宰者としている。

さらに、各地区会議には、その活動に関する事務処理するために、「地方連絡委員」を置いている。この地方連絡委員には、北海道地区会議は北海道大学、東北地区会議は東北大学、中部地区会議は名古屋大学、近畿地区会議は京都大学、中国・四国地区会議は広島大学、九州・沖縄地区会議は九州大学の事務局長以下6～10人の職員が委嘱されている。各地区会議は、これらの各大学事務局職員の多大な協力の下に運営されているのである。

各地区会議は、前述の目的を果たすために、科学者との懇談会・学術講演会等の開催、地区会議ニュースの発行等の事業を運営に行っている。先般、運営審議会で決定された今年度の各地区会議事業計画によると、全国各地で、科学者との懇談会は12回、学術講演会は14回それぞれ開催される予定である。

## 日本学術会議主催公開講演会

本会議は、学術の成果を広く国民生活に反映浸透させるという日本学術会議法の主旨に沿うため、公開講演会を主催していますが、昭和62年度には、本会議会員（演者）による公開講演会を次のとおり3回企画しています。

開催日・演者等詳細は決定次第新聞広告等でお知らせする予定ですが、多数の方々のご来場をお願いします。

テーマ1：「高度情報化社会」に関するもの

開催地 東京

テーマ2：「科学の進歩と人間社会」に関するもの

開催地 京都

テーマ3：「マン・システム・インターフェース」に関するもの

開催地 東京

多数の学術研究団体の御協力により、「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

## 日本環境変異原学会会則

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

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

第3条 本会の会員は、正会員および賛助会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者、賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。

第4条 本会に入会を希望するものは、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込むものとする。

第5条 会員は年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は評議員会において審議し総会において定める。

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
2. 奨励賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行い、将来の成果が期待される研究者（原則として会員）に授与する。
3. Mutation Research 誌の特別巻を特価で購入配布する。
4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
5. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

会長 1名 庶務幹事 1名  
会計幹事 1名、国際交流幹事 1名、  
編集幹事 1名、会計監査 2名、および評議員若干名。

評議員は正会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。

庶務幹事、会計幹事、国際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。

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

役員および評議員の任期は2年とする。

役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

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

第9条 本会は年1回総会を開く。  
総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。  
会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

#### 附記

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



# 日本環境変異原学会入会申込書

昭和 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議会の推薦を添えて申し込みます。

フリガナ			
氏 名	㊟		
ローマ字つづり			
生年月日, 性別	年 月 日	男 女	

所属機関 部局 職名	(和)
	(英)
所属機関 所在地	〒 電話 内線
	(和)
	(英)
自宅 住所	〒 電話
	(和)
	(英)
会誌送付先 ① 所属機関 ② 自宅	

学 部	学部学校名	卒業年次	年
歴 大学院	課程学校名	修了年次	年
学 位	取得年 年		
研究領域 (下記にあてはまる項の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 (    )			
研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)			
加入学会名 (本学会以外の)			
推薦者 (日本環境変異原学会評議員)			
氏 名 (署名) ㊟			
入会申込者との関係 (数行ご記入ください)			



日本環境変異原学会昭和61～62年度評議員名簿

(五十音順)

氏 名	所 属
石 館 基	国立衛生試験所
乾 直 道	日本たばこ産業(株)生物実験センター
大 西 克 成	徳島大学医学部
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	近畿大学原子力研究所
定 家 義 人	国立遺伝学研究所
佐 藤 茂 秋	国立がんセンター研究所
白 須 泰 彦	残留農薬研究所
杉 村 隆	国立がんセンター
祖 父 尼 俊 雄	国立衛生試験所
高 山 昭 三	国立がんセンター研究所
武 部 啓	京都大学医学部
土 川 清	国立遺伝学研究所
長 尾 美 奈 子	国立がんセンター研究所
西 岡 一	同志社大学工学部
早 津 彦 哉	岡山大学薬学部
松 島 泰 次 郎	東京大学医科学研究所
吉 川 邦 衛	三菱化成(株)総合研究所安全性センター

日本環境変異原学会奨励賞受賞者

- 第1回 昭和54年度  
長尾美奈子 「食品の変異原因子に関する研究」
- 第2回 昭和55年度  
石館 基 「環境変異原及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態の調査と研究」
- 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癌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気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」
- 第8回 昭和61年度  
林 真 「in vivo 小核試験法の基礎と応用に関する研究」  
森本 兼曩 「ヒト末梢リンパ球における姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発に関する研究」



— 編集後記 —

昭和61年10月1～3日にわたって東京で開催された日本環境変異原学会15回大会の特集号として、学会奨励賞受賞講演、特別講演、シンポジウム講演を収録させて頂きました。

特別講演にストックホルム大学の C. Ramel 博士をお招きすることが出来たのは、財団法人がん研究振興財団が日本小型自動車振興会の補助により行っている「対がん10カ年総合戦略」の1事業であるレクチャーシップ事業の講師として招へいされた機会に、財団の御好意により実現できたもので、改めてここにごがん研究振興財団および中澤幸一専務理事に対し感謝、御礼申し上げます。

名誉会員 Alexander Hollaender 博士がなくなられたので、博士にもっとも身近かに接してこられた近藤先生に追悼文をお願いしました。博士の写真も近藤先生の御好意でかかげることが出来ましたので厚く御礼申し上げます。Hollaender 博士の御冥福をお祈りします。

ご執筆をいただいた諸先生には、御多用中のところを本号のために貴重な時間をさいて原稿をお寄せいただいたことを厚くお礼申し上げます。

(松 島 泰次郎)

環境変異原研究 第9巻 第1号 1987年

昭和62年10月14日 印刷

昭和62年10月20日 発行

発行者 日本環境変異原学会

編集責任者 松 島 泰次郎

東京大学医科学研究所

癌生物学研究部

〒108 東京都港区白金台4-6-1

TEL 03-443-8111 内506

印刷所 三造写真工業株式会社

〒105 東京都港区新橋5-23-7

TEL 03-433-1869



ISSN 0910-0865