

環境変異原研究

**Environmental
Mutagen
Research**

環境変異原研究

Environmental Mutagen Research

目 次

第 30 回大会基調講演

日本環境変異原学会創生の頃と今考えるべき改革

杉村 隆 63

環境変異原研究がめざす道

木苗直秀 69

第 30 回大会特別講演

変異原性試験で何がわかるか：21 世紀の展望

能美健彦 75

第 30 回大会受賞講演

学術賞

変異・癌原性物質の産生・代謝とその活性抑制に関する研究

大西克成 81

研究奨励賞

フリーラジカルを経由する環境変異・発がん物質の生成と発現に関する研究

平本一幸 91

げっ歯類の培養細胞と個体を用いる小核試験法の検討

若田明裕 99

付 記

日本環境変異原学会 入会申込書
学生会員申込書

環境変異原研究 投稿規定
執筆規定

複写される方に

本誌（書）に掲載された著作物を複写したい方は、著作権者から複写権の委託を受けている下記の協会から許諾を受けて下さい。著作物の転載・翻訳のような複写以外の許諾は、直接日本環境変異原学会へご連絡下さい。

学術著作権協会

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル, Tel : 03-3475-5618, Fax : 03-3475-5619

Notice about photocopying

In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copyright owner of this publication.

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan

Phone : 81-3-3475-5618, FAX : 81-3-3475-5619, E-mail : naka-atsu@muji.biglobe.ne.jp

In the USA

Copyright Clearance Center, Inc. (CCC)

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, Phone : (978) 750-8400, FAX : (978) 750-4744, www.copyright.com

日本環境変異原学会創生の頃と今考えるべき改革

杉村 隆

国立がんセンター名誉総長 〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1

Recollections on the early stages of the Japanese Environmental Mutagen Society and thoughts on how to revolutionize its Society

Takashi Sugimura

President Emeritus, National Cancer Center
1-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0045

辻：おはようございます。この第30回記念大会を記念いたしまして、座長を承りました静岡県立大学薬学部のご挨拶でございます。杉村先生の座長を務めさせていただくわけでございますが、私は今から約25年前、杉村先生の研究室と東大の薬化学教室、それから私たちの研究の三者共同でアミノ酸の熱分解の研究をしたことがございます。それから約25年が過ぎました。今にして考えますと、まさにその25年前はこの環境変異原学会の創設期にあたったのではないかと考えております。

今回、杉村先生の座長をするにあたりまして杉村先生のいろいろなご紹介をしようと考えていたんですが、本日お集まりの皆様方には杉村先生をご紹介するまでもないことであります。それよりも杉村先生のお話を長くお聴きしたほうがいいと思い、杉村先生のご経歴のご紹介は失礼させていただきます。ご存じのように杉村先生は文化勲章、日本国際賞、いろいろな賞を受賞なさっております。この環境変異原学会の始めからいろいろ面倒を見ていただいております。

先ほど控室でお話ししておまして、先生は若い頃からいろいろな役職をなさっていらっしゃいますが、もう今では「仙人みたいになってきた」というお話をなさっていましたが、先生目の輝きは25年前とまったく変わらなく鋭い目というのをつくづく感じました。では先生、よろしく願いいたします。

杉村：辻先生、どうもありがとうございました。今回は第30回の大会であります。30回を迎えるということ

は大変なことでありまして、これまで学会の運営にあたられた方々ならびに会員の皆様に、まずお祝いを申し上げたいと思います。

この日本環境変異原学会が30年前にできた頃のことをお話ししろというようなことだろうと思うんですが、そこに「日本環境変異原学会の創世の頃」、創「世」となっているので、これは間違えて本当は創「生」であったという正誤表が付いているのですが、考えてみると「創世」のほうがよかったと思っています。本当に何もなかったところから、もやもやと生まれてきたんです。環境変異原学会が混沌の中から生まれてきた。まさに「創世」されたのだと考えております。今日はどうぞ気楽にお聞きください。

考えてみると、この創生の頃に関わった方々は遺伝研の田島弥太郎先生、それから大阪大学の近藤宗平先生、非常に残念ながら早くお亡くなりになった遺伝研の賀田恒夫先生、同志社大学の西岡一先生、京大の武部啓先生等です。それから私どものグループでは松島泰次郎、河内卓、長尾美奈子、佐藤茂秋の諸君が参画いたしました。慶應大学からは加藤隆一先生が馳せ参じられました。いろいろな背景のある人が自然体で集まってきたのです。

それで、まさに創世でありました。戦国時代みたいなものです。何となく田島先生の旗の下に集まって、この会ができたのが1972年です。第1回の会を東京の教育会館で開いたのであります。その辺のことは本会を記念して発刊された日本環境変異原学会第30回大会プログラム・要旨集の12頁に書いてございますので、お読みいただけるとありがたい。ちょうどその頃、世界がやは

受付：2002年3月11日 受理：2002年3月11日
日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第30回大会において発表された基調講演である。
This paper is the keynote lecture presented at the 30th JEMS annual meeting, 2001.

りこの environmental mutagen science に関して創生期であったと思います。

ただ、今とはいろいろと違っていただことがあるのではないかと思います。初期には、この environmental mutagen は子孫に遺伝病を起こすのに大きな因子であろうと感じていました。われわれの周辺にはどんどん新しい化学物質が生まれてくるから、それは人類の将来にとって非常に重要な問題である。子孫にいろいろな遺伝が蓄積するということが、主な1つの領域だったんだと思うのです。ところが、それがなかなか証明困難です。なぜかという、いま地球の人口が50億~60億ですが、その中でどういう遺伝病が新しく発生したかというのを広い範囲にわたって研究し、それと原因とを関係づけるという科学が難しいことが判ってきたのです。

一方では我々の体というのは数十兆個の細胞でできている。その中で、幹細胞だけを考えてみても数兆個はあるでしょうから、それから体細胞変異でがん細胞が出るというチャンスは非常に高い。現に3人に1人はがんになるわけですから。勿論、実験も可能でありました。ある条件で動物実験をすれば、100匹のうち100匹ががんになるのです。そういうわけだから、どうしても重点はだんだん変異原からがん原のほうにシフトしていったのであります。

これはやむをえないことではありますが、やむをえないだけで済むのか。本当はもう少し environmental mutagen science というものは、どういうものを目的とするべきであるかを考える必要もあるのではないかと考えております。しかし、当面のところはそういう体細胞の変異…我々の1人1人の体が数十兆個の細胞から成立している。その数十兆個の細胞の中に起こる、1個1個の細胞の中、数万個ある遺伝子の中に起こる変異の蓄積の結果としての発がんを研究する、また変異原によるDNAの修飾と修復を研究することが優先的になっているのはやむをえないのです。だから、創生期の頃の考えからシフトしてしまって、Environmental Mutagen Society から Environmental Carcinogen Society になったのは、時の流れと研究の発展の経過であると思います。しかし、それで本当にいいのか、これからのいいのか、というのはここで考えてみる必要があると思います。

ところで、体細胞の mutation が正常細胞をがん細胞に変え、しかも、いくつも溜まってがんになるというのは正しい。変異そのものは多分、非特異的に起こる。体細胞変異の蓄積の中で発がんに関係している特定の遺伝子が何個か変化するとがん細胞になるのです。At random に起こる非特定のな変異の蓄積は、老化細胞の生成にも関係すると思われます。あるいは自己免疫疾患になります。新しく変異した蛋白ができるから、それに対する抗体ができて自己免疫疾患ができるのだと思います。

第3回国際環境変異原学会は1981年に東京と三島と

京都で行われましたが、この学会は、日本にとりひとつのエポックだったと思います。1988年に黒田行昭先生が伊豆の大仁で mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis の、第2回国際会議を開催されたことがあります。Environmental mutagen の作用に対して拮抗する物質、その作用機構の科学も非常に盛んになってきました。もともと賀田先生が antimutagen とか desmutagen とか、かなり先駆的に言っておられました。だんだん現実のものとなってきたと思っております。わが学会のこれまでの研究の課題を考えると、新しい mutagen を探す、新しい carcinogen を探すことが1つとしてありました。我が国から一連のヘテロサイクリックアミンが見つかったり、8-ヒドロキシグアニンシンを葛西宏君が見つけました。そのDNAの修復を関口睦夫博士と西村暹博士が見つけました。本学会は世界的にいろいろな貢献をしました。

これからの事を考えると、だいたい5つぐらいのことを考えたほうがいいと思っています。

第1番目は、がんというのは決して1つの遺伝子変異が起こってできるのではなく、multiple な、階段を上がっていくように、たくさんの変異が溜まってできるので。しかし、その階段も、ある場合には遺伝子の変化であります。他の場合は epigenetic、遺伝子自身には変化がないけれど、その遺伝子が silence になったり、expressed state になるということによって起こります。down-regulation あるいは upregulation されることで起こっています。もっと研究を深化させねばなりません。1つの遺伝子変異が起こることによって、その後は変異原なしに自然に突然変異がどんどん溜まっていく genomic instability もあります。細胞増殖に伴うDNAのreplicationは、変異の機会を増します。細胞分裂に密接に関与する蛋白の変異による chromosome instability も、この環境変異原学会にとっては避けて通れない重要な問題とっております。

第2番目に非常に重要だと思うことは、変異原があるとかないとか、変異発生が予防されたとか何とか、いろいろ言われています。しかし、問題はそのリスクや効果を定量化することが非常に重要な、そして難しい21世紀の課題です。ヒトのがん化は階段を上がって進むわけですから、1つの原因で1つのがんがすぐ起こるような簡単な事ではありません。

さまざまな原因が微量ですがたくさんあります。それに加えて拮抗するものもあります。定量的なリスクを決めなければいけないのですが、これは大変複合的なものだから、新しく難しい科学の誕生が必要だと思います。どうしてもそれを解かなければいけない。数学者とか、バイオインフォマティクスとか、そういう領域の関与が必要になってくると思います。

第3番目には、閾値の問題が非常に重要だろうと思

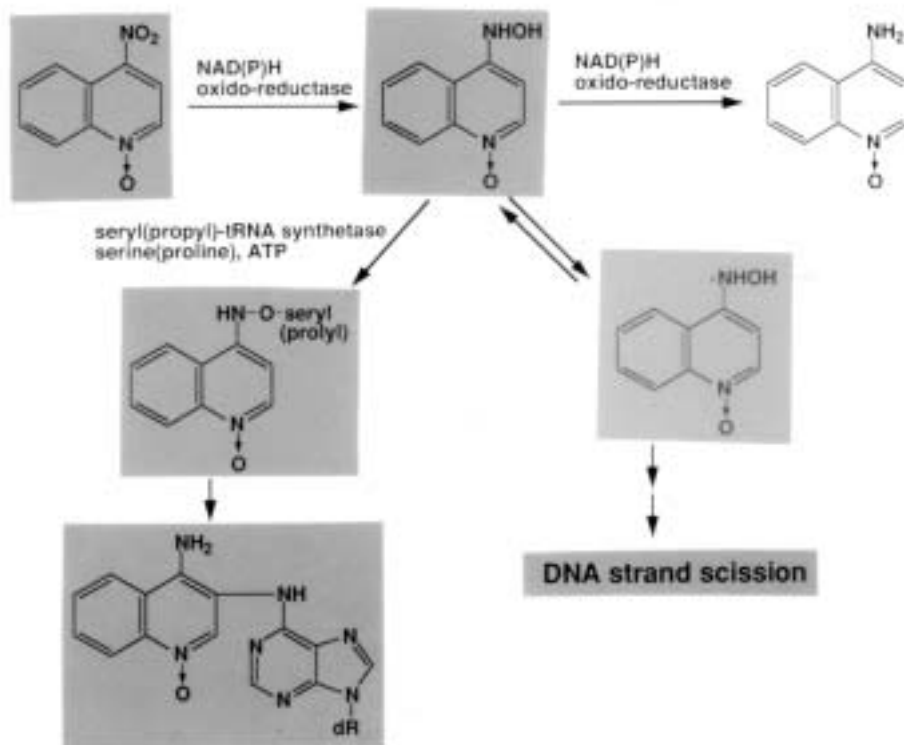


Fig. 1

ます。1つ1つの物質について閾値を決めていくということが、リスクを考えるため非常に大切です。環境変異原学会ができた頃から、メガマウスの実験とか、閾値のことを考えてきました。最近ホルミシスと言われる、ごく少量だと作用がバックグラウンドよりもかえって減ってしまう現象があります。ラドンのexposureが少ないある地域では、ラドンが全くないところよりも肺がんの発生が低いことがあります。しかしそれも1つの要因について考えればそうだけど、たくさんの物質が同時に関連していたときには、どうなるのかまだわかりません。複合露出の閾値を解く科学も、これから大切になると思っています。

第4番目には、1人1人の人相が違いうように、ゲノムから考えても変異原やがん原物質に対する感受性が1人1人違ってきます。本学会発足後、30年経ってここに集まってみると、だいたいお若い方々になってしまったが、まだずいぶん創生の頃に関わった人があるんです。見ると、かなりagingが進んだ人と、進み方の遅い人がおられるようです。これはやはり、お1人お1人のゲノムの問題です。そういうことが、SNPs分析を含むゲノム科学で明らかにされます。1人1人が環境変異原に対する感受性がいろいろ違うのだと思っております。本日はいろいろとこれから後、リスクのestimationに関しては木苗直秀先生、能美健彦先生、福島昭治先生から、また閾値の問題についても、多くの方のお話を聞くことになるわけです。

最後に第5番目として、環境科学の中でこの環境変異原学会がどういう立場にあるのか、ということを考える必要があると思います。地球全体の環境との関連はあるべきなのでしょう。日本にも環境科学学会があります。私も環境科学学会には入っています。雑誌は来るのだけど1回も会場には出たことがないんです。『環境科学学会』という雑誌に環境変異原のことが出たことは一度もないに近い。それから、環境科学学会の会で環境変異原学会の人が何か大きな意味を持つ発言をしたとか、講演をしたとかいうこともあまりないようです。

月の環境なんていうものもある。月の環境なんていうのは、あまりわれわれに関係ない。だけど、「環境科学」の人はそういうものにもやたらと熱心なんです。私たちは、仲間が、友人が、そして子孫の健康がどうなるかを先見的に考える必要があります。積極的に環境科学全体に大きく寄与していく必要があると思っています。

それでは、これからちょっとスライドを見ていただきます。懐かしき良き時代の思い出、あまり今みたいにイライラ心配しないで済んだ頃のことです。

思えば、第1回の日本環境変異原学会は、田島先生が1972年に開かれました。外村晶先生、菅原努先生、近藤先生、賀田先生、岩原繁夫先生、早津彦哉先生、石館基先生と続き、やがて松島先生、長尾先生も登場されて、今年30回にきております。いろいろな地方で年会が行われました。

一方、日本の環境変異原学会ができた翌年の1973年



Fig. 2



Fig. 3

に、第1回目の国際環境変異原学会がアシロモアで行われました。2回目が4年後にエジンバラで行われ、3回目に東京と三島、京都で行われたのであります。ついで1985年はストックホルムでした。1989年にクリーブランドで行われた時は、ものすごく暑かったのを覚えておられると思います。そして、今回の8回目が静岡で開催されるのです。

日本が非常にこの環境変異原研究で有利だったことがたくさんあるのですが、その1つは、4-ニトロキノリン1-オキシド (4NQO) という化合物がありました。4NQOはチトクロムP450の関与なしにヒドロキシアミ

ノ体に活性化され、ついで、あるアミノ酸活性化酵素でアシル化されるものですから、原核細胞 (procaryote) と多くの真核細胞 (eucaryote) と共通の機構でDNAを修飾します。XP細胞もUV同様4NQOに対しても sensitiveです。それから、細菌のDNAの除去修復欠損株は4NQOに対して感受性が高いのです。P450を含む代謝活性化の関与なしに、微生物でも培養哺乳動物細胞でも研究が同じように進歩したのです。これは日本での特徴だったと思っております (Fig. 1)。有名な変異原であった*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンに発がん性があることを知ったのも、この学会のすべり出しには好都合でした。

第3回の国際環境変異原学会の時に、皆さん思い出されると思いますが、フレデリック・デセレス、アレキサンダー・ホレンダー、フリッツ・ソーベルス、シャーロット・アウエルバッハ、ブルース・エイムス、それから私の写真があります。この年までにアメリカの環境変異原学会賞を受賞した人々の6人が並んでいます (Fig. 2)。

これはCancer Researchの表紙ですけれども、静岡県立大学の小菅卓夫先生が中心におられます (Fig. 3)。小菅先生はヘテロサイクリックアミンの構造を明らかにするのに、最初に貢献されたのです。いま辻先生がおっしゃった通りであります。この頃、橋本嘉幸先生が東京の生化研から東北大学の教授になられ、出川雅邦先生が張り切ってチトクロムP450のレスポンスの性差による違い等をご研究になりました。

先ほど申しましたように、mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesisのミーティングの時、まだソーベルス先生もお元気だった。それでデルバーアト・シェンケル博士と黒田先生が素晴らしい会を組織されま



Fig. 4

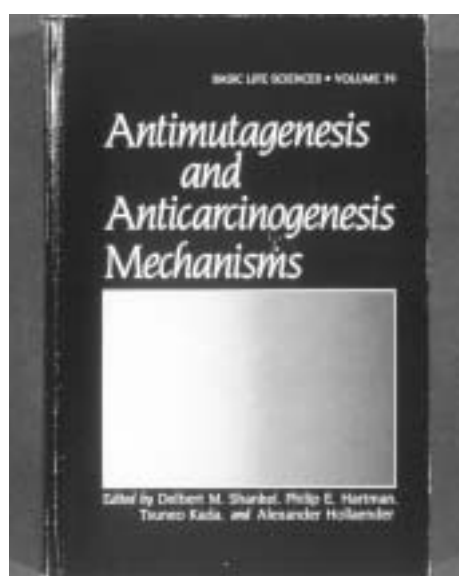


Fig. 5

した (Fig. 4)。時代も非常によい雰囲気でありました。この黒田先生の会の proceedings の表紙、何の意味もない表紙だろうと思っておられるかもしれませんが、これは実は物事を、とくに環境変異原のことを議論するときに、絶対白、絶対黒というのは正しくなく、その間がもやもやとしているんです。白からだんだん灰色、ついに黒になるということが、この表紙に出ているのでありまして、この概念は今でも本当に大切です (Fig. 5)。

フレデリック・デセレス博士は、長く日米医学研究協力プログラムの環境変異原のパネルでずいぶん日本を助けてくれた人だと思います。その後いろいろな会がずっと行われましたが、当時の日米関係というのは、今に比

べてもっと穏やかでした。世界中も穏やかだった。たとえば、会を行うにしてもチャールストン、ウィリアムズバーグ、下田とか、歴史的な場所を選んでやるというような余裕のある時代でありました。日米協力は今もずっと続いていますが、米国のチェアマンはデセレスの後にバーニー・ワインシュタイン、最近カール・バレットがチェアマンになりました。さらに今年からチェリル・ウォーカー博士になりました。日本側は山本正先生から鈴木武夫先生、松島先生、寺田雅昭先生を経て、今年から若林敬二博士になったわけです。

私は沖縄で会をやることを若林部会長におすすめしました。科学のうえでも沖縄を日米協力のテリトリーとして、沖縄の科学をおおいに盛んにする必要があると、そう考えたからです。事実、バレット博士と若林博士が、G8サミットが行われた沖縄の万国津梁館で2001年2月に日米合同会議を開催しました。

最後になると思いますが、この日米医学の environmental mutagenesis and carcinogenesis というパネルは、今度新しく environmental genomics and carcinogenesis というふうになりました。

考えてみると創生の頃から30年間、いろいろなことがありました。皆様の熱意によって大きな進歩がなされました。ただし、これからは、またちょっと違った熱意、あるいは違った厳しさ、あるいは違った方向。何となくこのままいけばいいというわけでは決してない。どうもそういう感じがいたしますので、31年からの発展を祈ってやみません。どうもありがとうございました。

辻：この環境変異原学会、あるいはこの環境変異原研究に対しまして、非常に示唆に富んだお話、本当にあり

がとうございました。先ほど先生が、agingのお話をなさいましたが、本当に先生の目の輝きといいすのは、私が先生にお会いして25年間いまだにまったく変わっ

ておりません。これからもひとつよろしくご指導をお願いしたいと思います。どうもありがとうございました。(録音終了)

環境変異原研究がめざす道

木苗 直秀*

静岡県立大学食品栄養科学部 〒422-8526 静岡市谷田52-1

Our research on environmental mutagens, now and future

Naohide Kinae

School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka
52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan

Summary

There are many kinds of mutagens and/or carcinogens in our environment. To isolate and to identify these compounds is very important in assisting the protection of human and ecological health. The toxicity and the degradation efficiency of 3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2 (5H) furanone (MX), a potent mutagen in tap water, were examined. It showed strong promoting effects on rat glandular stomach cancer initiated by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. It decomposed with an increase of pH and temperature. The mutagenic activity also decreased by treatment with serum, but not with saliva.

In other work undertaken, several heterocyclic amines containing 2-amino-3, 4-dimethylaminoimidazo [4,5-*f*] quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) were formed during cooking of hamburger. But the addition of green tea extracts to the patty decreased the contents of both mutagens. Therefore, tea catechins may play an important role to inhibit the formation of heterocyclic amines. To elucidate the adverse biological effects of environmental mutagens, several mutagenicity tests using bacteria, yeast, cultured cells and animals are applied. To convey the implications of these results to society, skills in risk communication and risk management will be required.

Keywords : mutagen, tumor induction, chlorofuranone (MX) , heterocyclic amine, risk assessment

ただ今、御紹介頂きました日本環境変異原学会長の木苗と申します。月日が経つのは早いもので日本環境変異原学会が発足して30年という節目の年を迎えることができました。特に今回は、日本環境変異原学会第30回大会と第8回国際環境変異原学会の両大会を時期を同じくして静岡で開催することになりました。皆様には格別の御協力をよろしくお願い致します。

さて、前演者の杉村隆先生が日本環境変異原学会の設立時およびその後の発展状況の多くを語られました。そこで、私は私なりに20数年間環境変異原研究に関して泥くさい仕事をやってきましたので、それらを含めてお

話させていただきます。最後にまとめとして皆様に今後の研究課題を投げかけてみたいと考えております。

我々の生活環境中には多種多様な変異原、発がん物質が存在しています。実際にはFig.1に示すように陸上で使われた化学物質や汚染物質（例：ダイオキシン）は直接、あるいは2次的に代謝・分解を受けながら生態系を循環しています。河川や海洋に到達した化学物質は食物連鎖を通して水生生物に取込まれ、生体濃縮することが知られています。

ヒトは呼吸を通して、あるいは経口的に多くの化学物質いわゆる異物を生体内に取込んでいます。また、紫外線、放射線、電磁波などにも常に暴露されています。それらは、いずれも量的に少ないながら日常的に我々の体

* E-mail : kinae@smail.u-shizuoka-ken.jp.ac

受付：2002年8月9日 受理：2002年8月9日

日本環境変異原学会

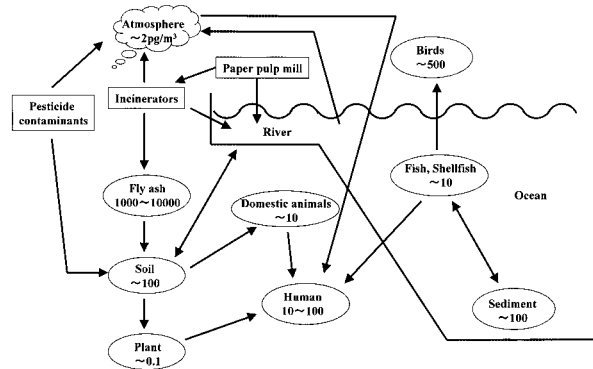


Fig. 1 Circulation of dioxins in ecological system

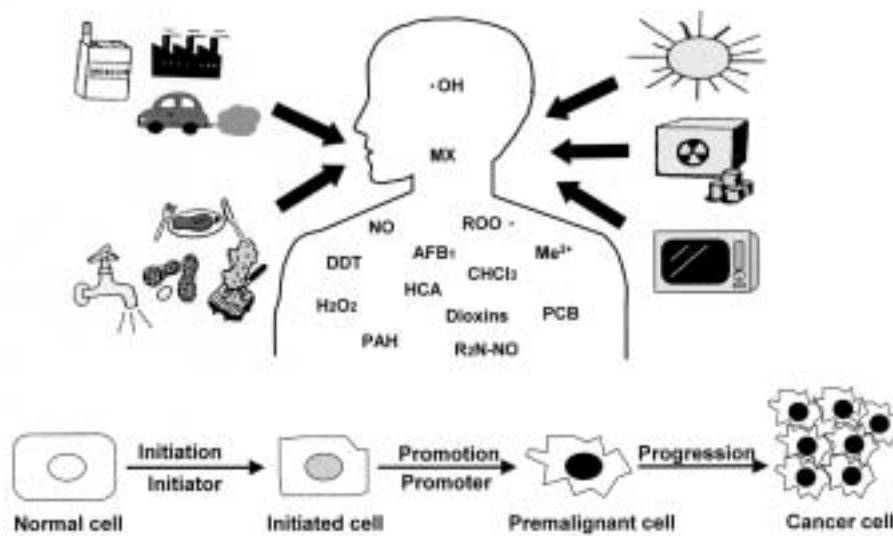


Fig. 2 Intake of mutagens and/or carcinogens and multi-steps in tumor induction

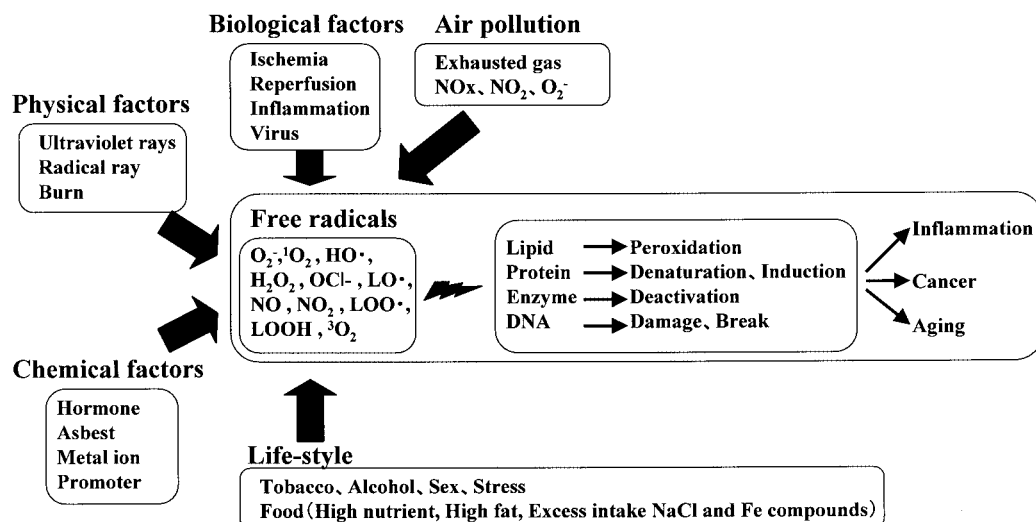


Fig. 3 Biological effect of free radicals

Table 1 Contents of MX in tap and pool water samples

Tap water (1987～1997)			Pool water (Japan, 1994)		
Country	Contents (ng/L)	Contribution (%)	Type of pool	Contents (ng/L)	Contribution (%)
U.S.A (1987)	ND ～ 33	～ 33	A private/indoor	0.6	1.0
Russia (1987)	ND ～ 15	～ 36	B “	1.4	2.2
Finland (1988)	15 ～ 67	19～ 46	C “	0.6	0.5
Japan (1990)	ND ～ 9	～ 23	D “	13.9	17.0
Japan (1990)	0.1 ～ 33	0.2～ 36	E “	1.1	3.4
U. K. (1990)	ND ～ 3	～ 60	F public/indoor	2.0	8.1
Japan (1991)	0.18 ～ 1.05	0.5～ 2.2	G “	1.0	5.6
China (1995)	3.8 ～ 58.4	15～ 57	H public/outdoor	0.9	1.8
Spain (1997)	5.6 ～ 10	8.3～ 20	I “	1.6	3.2

Table 2 Risk evaluation of environmental mutagens

Mutagens	Revertants colonies/mg (A)	Production (Consumption) volume (B)	A × B
Tabacco (20mg/cigarette)	1.0×10^3	290×10^9 cigarettes	5.8×10^{15}
Captan	5.1×10^5	422 tons	2.2×10^{17}
Caramel	1.9×10^1	15,000 tons	2.9×10^{14}
Roasted Fish (3.9g burning/60g fish)	8.0×10^0	(as fresh fish) 9,860,000 tons	5.1×10^{15}
Coffee	1.1×10^1	134,000 tons	1.5×10^{15}
Green tea	3.9×10^1	222,000 tons	8.7×10^{15}
Tap water	770/L	2L × 365days × 1.2 billion people	6.7×10^{13}
MX	13/ng	12ng/L × 2L × 365days × 1.2 billion people	1.4×10^{13}

(Kawachi, Food Sanitation Research, 35,679, (1985) modified)

に少なからぬ影響を与えているものと考えています (Fig.2).

すなわち、それら化学因子、物理因子とともにウイルスなどの生物因子がヒトのがん発生に深くかかわっていることが明らかになってきました。

さらに、近年注目されているフリーラジカルは虚血、再灌流、炎症など、あるいは飲酒や喫煙を含む生活習慣によって容易に生成し、DNAに作用して損傷・切断を起し、がんを含む疾病や老化を惹起しているものと思われます (Fig.3)。

私は、1970年代後半より水環境中の変異・発がん物質と魚の腫瘍発生とのかわりについて検討してきました (Kinae et al., 1981; Kimura et al., 1984; Kinae et al., 1990)。また多くの化学物質が最終的にヒトにどのような影響を与えるのかというリスク評価を行ってきました (木苗, 1993)。

それではまず、我々の研究の1つを紹介しましょう。水道水や製紙工場排水中には塩素処理工程で生成する多くの有機塩素系化合物が含まれております。その中の難揮発性塩素化合物である 3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2 (5H) -furanone (MX) に注目しました。MX は1980年代初頭に製紙工場排水より見出され、サルモネラ TA100で強い直接変異原性を示しており、この物

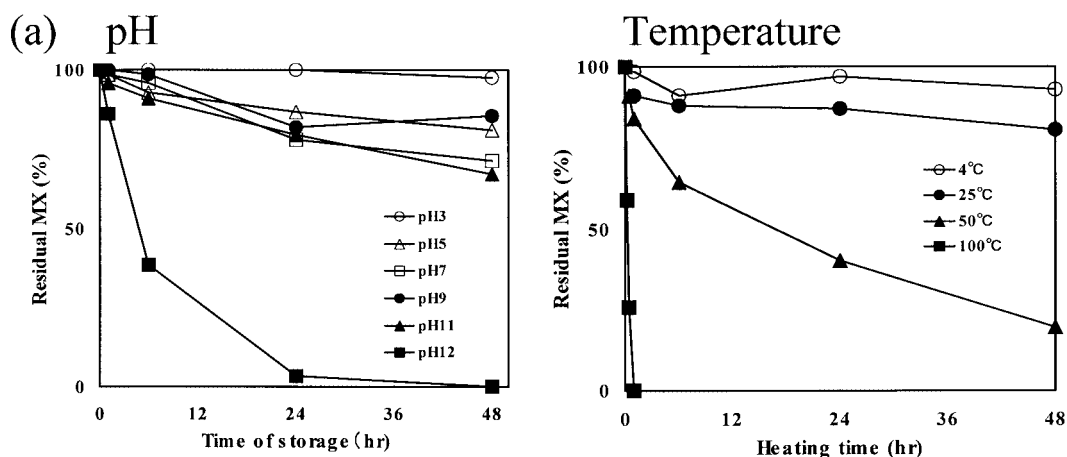
質が我が国の水道水やプール水からも検出されました (Table1) (Kinae et al., 1992; 木苗ら, 2001)。

水道水中のMXの含量は女性の胆管腫や男性膀胱腫の発生と関連することが指摘されています。そこでMXを別途合成し、発がん性を含む毒性を検討しました。さらに温度、pH、生体成分である唾液、血清に対する安定性を調べることにしました。

MXの前駆体としては従来からフルボ酸やフミン酸などの腐食物質が知られておりましたが、我々は、緑茶中のカテキン類や柑橘類中のジオスミンも前駆体になることを明らかにしました (Kinae et al., 2000)。ついで変異原性を指標として安定性を調べた結果を Fig.4 に示しました。

MXは温度の上昇により分解が進むこと、しかし、100℃では10分間加熱しても安定であることから、MXがトリハロメタンとは異なりきわめて揮発しにくい性質を有する物質であることがわかりました。唾液中ではMXの変異原性が若干上昇する傾向を示したのに対して、血清中では変異原性が消失、または低下しました。さらに、pHが9以上になると変異原性は著しく低下しました (木苗, 1994)。

MXについては西川らとの共同研究でMNNGを用いた二段階発がん実験によりラット胃粘膜に腺がんを誘発することを明らかにし (Nishikawa et al., 1999)、広瀬ら



(b) Saliva and serum

Treated with	Mutagenic activity (TA100, -S9mix)	
	(rev/100 ng 4NQO)	(rev/100 ng MX)
PBS (control)	780	780
Saliva A (48y, m)	0	1200
" B (22y, m)	37	1400
Serum A (48y, m)	26	0
" B (22y, m)	250	8

Each sample (MX or 4NQO) was treated with saliva or serum at 37°C for 5 min and then subjected to the Ames test

Fig. 4 Effect of pH, temperature, saliva and serum on the mutagenic activity of MX

Table 3 Change of HCA content in cooked hamburger with and without green tea samples

Tea samples added	Content (ng/g raw beef)	
	MeIQx	PhIP
None	1.130 (100)	3.931 (100)
Crude extracts	1.382 (122)	0.926 (24)
Catechin fractions	0.611 (54)	0.845 (21)
Powder	0.289 (26)	0.368 (9)

Ground beef patty (65g), green tea samples (0.975g) were used.

The figures in parentheses show the ratio (%) to the control.

とともにヒトへのリスク評価を行いました (Hirose et al., 1999).

Table2には、生活環境中の各種変異原物質の活性値、存在量と人への暴露量 (コロニー数換算) を示しました。1人あたり1日に2Lの水道水を消費すると、コロニー数が 6.7×10^{13} リバートントとなり、MXについては1ngが13リバートントですので1.2億人では、 1.4×10^{13} リバートントとなり、国民が消費するカラメルに近似した総変異原活性を示しました。しかし、すでに水道原水の塩素処理とヒトの発がん率との関連が指摘されていることを考えるとMXを含めた副生成物の除去が今後の重要な課

題となってくるものと思われます。

次に、ハンバーグ中のヘテロサイクリックアミン(HCA)の抑制方法を検討した結果をTable3に示しました。

カテキン混合物とカテキンをほぼ同量含む緑茶の粗抽出物をそれぞれ添加すると前者でMeIQxの生成量が54%に低下しました。一方、PhIPの場合、いずれも9-24%と有意に生成が抑制されることを観察しました (Kinae et al., 1997)。このことから緑茶およびその有効成分であるカテキンがHCAの生成を抑制していることが明らかになりました。杉村先生には実際に緑茶入りハンバーグを試食して頂きましたところ、おいしいと頂戴したことを数年近く経った今でも記憶しています。

ところで従来、焼け焦げ由来の変異原・発がん物質は食品を加熱することにより生成します。私はメイラード反応に関する研究をライフワークの1つとしておりましたので、それらが生理的条件すなわちpH7.4, 37°Cで生成していないかという疑問が生じました。というのは、メイラード反応は反応系内の鉄イオンや水分含量の影響を大きく受けること、また、活性酸素などのラジカルもこの反応を促進することなどを考えると生体内でHCAが生成する可能性が十分に推測できました。そこで、グルコースとフェニルアラニン、クレアチンを1:1:2に混合し、pH 7.2のリン酸緩衝液に溶解して37°Cで

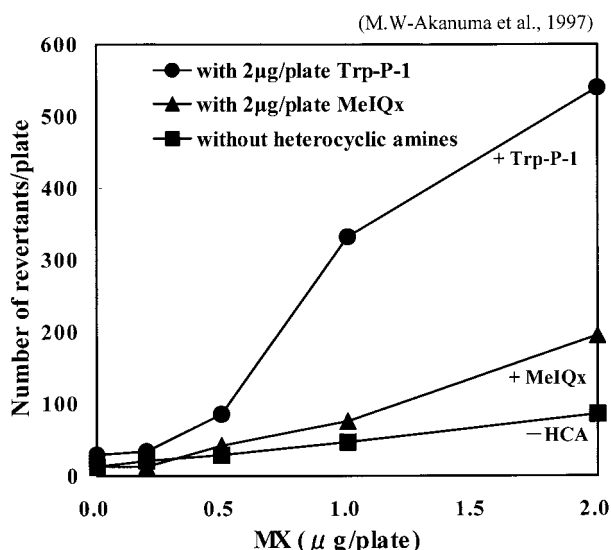


Fig. 5 Mutagenicity of MX in the presence and absence of heterocyclic amines

50 - 80 日間静置したところ、原液のブルーコットン吸着物がサルモネラ TA98, +S9mix で変異原性を示しました。分画した PhIP 画分のトータルイオンクロマトとマスキングクロマトのデータは標品と完全に一致しました。しかし、これは定性的なものですので現在、定量実験を進めております。また、グルコースとグリシン、クレアチニンを 1 : 2 : 2 の割合で 37℃ でインキュベーションした場合にも同様に、経時的に変異原性が上昇し、活性画分を精製したのちマス分析したところ、MeIQx とスペクトルデータが完全に一致しました。それゆえ、37℃ でこれら HCA が生成することを確認しました (Kinae et al., in press)。

すでに同様のモデル系において 128℃ で 2 時間反応した場合の HCA の生成メカニズムについて報告されております (Nagao and Sugimura, 2000) が、本実験から実際に生体内でも HCA が生成する可能性が強く示唆されたのでマウスを用いて in vivo での HCA 生成実験を試みています。

ところで化学物質については、従来単独での変異原性が数多く報告されております。しかし、先に述べたように微量ながら多くの変異原・がん原物質が共存していることを考えると複合毒性を明らかにする必要があります。そこで、演者らは赤沼らと共同で大腸菌 WP2 を用いて、MX 単独では変異原性を示さない濃度のものに MeIQx や Trp-P-1 を添加したところ、コロニー数が有意に上昇することを確認しました (Fig. 5) (Watanabe-Akanuma et al., 1997)。また、佐々木らとの共同研究で MX を鉛化合物や DDT を含む各種有機塩素化合物と共存させた場合にも同様の複合毒性が観察されました (佐々木と木苗, 1995)。このように MX に対する他の化学物質の変異原性増強作用を確認することができました。

水道水中に存在するきわめて微量の MX が他の化合物と共存した場合に変異原性が上昇することから今後、各種化学物質間の相互作用、特に複合作用について十分に検討していく必要があると考えています。

我々は現在、環境試料や魚類について Ames 法、小核試験法、コメットアッセイ等を用いて変異原性を検定しております。生体に取り込まれた化学物質は主として肝臓で第 1 相、第 2 相の反応を受け、代謝され抱合体を形成します。しかし、PCB を含む塩素化合物では解毒よりもむしろ抱合体が活性化体となり、DNA adduct を作り、また芳香族アミンの場合、トランスフェラーゼにより硫酸誘導体となり、DNA に作用するものと考えられます。これらのことは異物を環境における存在形態だけで捉えるのではなく、生体に取り込まれて生ずる二次あるいは三次生成体についても変異原性を検定する必要があります。

我々は実際に河川水や沿岸海域に棲息する魚類の血液や鰓を用いて小核試験やコメットアッセイを適用し、さらにそれら環境水に和金を暴露して両試験を行い、変異原、発がん物質のモニタリングをしてきました (谷所ら, 1998; Hayashi et al., 1998)。それらデータをもとにして変異原性の定量化、数値化を行い、COD や BOD 値、個別の化学物質の定量値などを考え合わせてリスクアセスメントを行うことになります。ついでリスクコミュニケーションを通して情報交換を行い、最終的にはリスクマネジメントで法的規制を行うことになるでしょう。このようにしてリスクアナリシスを完了することになり、このプロセスはきわめて重要になってきました。なお、疫学的調査研究を含めたフィールドワークも是非実施され、総合的に評価することを推奨したいと思います (Fig. 6)。

ここ数年の間に、細菌、培養細胞、動物個体などを用いて DNA 損傷性や発がん性のスクリーニングを行い、定量化するためチップを用いたマイクロアレイ法などが取り入れられてきました。実際に、ヒトの発がんとその治療、予防を考える時、遺伝情報を解析するためそれらの活用が大きな戦力になってきました。

10 数年前から、日本や欧米での詳細な研究から各種がん発生に関与する危険因子と予防因子の作用機構が次々に明らかにされています。しかし、時には 1 つの食品の中に変異原と抗変異原が共存していることも多く、それゆえ、当該食品が実際に変異原として作用するのか抗変異原として作用するのかを検討していくことが大切であると考えています。これからの変異原研究は変異原や抗変異原を探索するだけでなく、それらが DNA にどのように作用し、どのような発がん遺伝子やがん抑制遺伝子の発現に関与するのか、さらにがんの防御法についても遺伝子レベルで十分な知見の蓄積が望まれています。また、変異原ががんのみならず、内分泌攪乱作用や

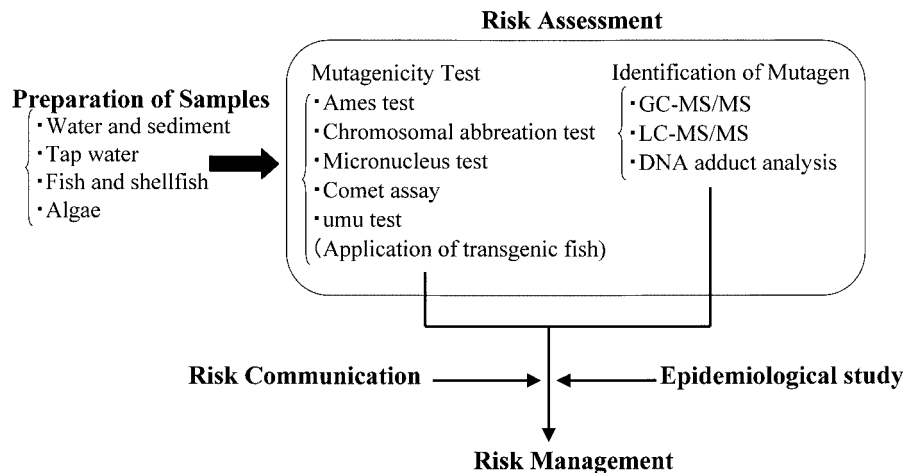


Fig. 6 Monitoring of mutagens in aquatic environment and their risk analysis

加齢，その他炎症に対して単独または複合的にどのようなにかかわりあいをもつのかを明らかにしていく必要があると考えています。それゆえ，今後genotoxigenomicsやtoxicogenomicsなどの考えを取り入れた毒性評価システムの構築が必須のものとなってきたものと思われます（Sasaki et al., 2001）。

結びに会員の皆様の御研究が益々発展することを祈願し，私の講演を終了させていただきます。今日は御静聴ありがとうございました。

参考文献

- Hayashi, H., T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, N. Kinae, K. Saotome, N. Tanaka, A. Takai, Y. F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni and Y. Ojima (1998) Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms, *Mutat. Res.*, 399, 125-133.
- Hirose, M., A. Nishikawa, N. Kinae and R. Hasegawa (1999) 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) : Toxicological properties and risk assessment in drinking water, *Rev. Environ. Health.*, 14, 103-120.
- Kimura, I., Y. Taniguchi, H. Kumai, I. Tomita, N. Kinae, K. Yoshizaki, M. Ito and T. Ishikawa (1984) Correlation of epizootiological observation with experimental data : Chemical induction of chromatophoromas in the croaker *Nibea mitsukurii*, National Cancer Institute Monograph, 65 Use of small fish species in carcinogenicity testing, 139-154.
- Kinae, N., T. Hashizume and T. Makita (1981) Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents (I) . Mutagenicity of sediment samples derived from kraft pulp mills, *Water Res.*, 15, 17-24.
- Kinae, N., M. Yamashita, I. Tomita, I. Kimura, H. Ishida, H. Kumai and G. Nakamura (1990) A possible correlation between environmental chemical and pigment cell neoplasia in fish, *Sci. Total Environ.*, 94, 143-153.
- Kinae, N., C. Sugiyama, M. Nasuda, K. Goto, K. Tokumoto, M. Furugori and K. Shimoi (1992) Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water. *Water Sci. Technol.*, 24, 333-340.
- 木苗直秀 (1993) 魚の腫瘍発生に基づいた水質評価，用水と廃水，35, 51-66.
- 木苗直秀 (1994) 水道水中の強力な変異原物質 “MX”，和光純薬時報，62, 5-7.
- Kinae, N., M. Furugori, H. Takemura, M. Iwazaki, K. Shimoi and K. Wakabayashi (1997) Inhibitory effects of tea extracts on the formation of heterocyclic amines during cooking of hamburger, In: H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, T. Yoshikawa. (Eds.) , *Food Factors for Cancer Prevention*, Springer-Verlag, Tokyo, pp.142-146.
- Kinae, N., J. Tanaka, N. Kamio, C. Sugiyama, M. Furugori, K. Shimoi and K. Tanji (2000) Detection and origin of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H) furanone (MX) in river Water, *Water Sci. Technol.*, 42, 117-123.
- 木苗直秀，杉山千歳，下位香代子 (2001) 水中の直接変異原MXの生成と毒性発現の機構，環境変異原研究，22, 141-148.
- Kinae, N., K. Kujirai, C. Kajimoto, M. Furugori, S. Masuda and K. Shimoi (in press) Formation of mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines in the model systems without heating, Elsevier Science, International Congress Series.
- Nagao, M. and T. Sugimura (2000) Food borne carcinogens, Heterocyclic amines, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Nishikawa, A., F. Furukawa, I. S. Lee, K. Kasahara, Z. Tanakamaru, H. Nakamura, M. Miyauchi, N. Kinae and M. Hirose (1999) Promoting effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone on rat glandular stomach carcinogenesis initiated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *Cancer Res.*, 59, 2045-2049.
- 佐々木有，木苗直秀 (1995) 水質汚濁性物質の変異原性増強作用，環境変異原研究，17, 65-74.
- Sasaki, Y.F. and T. Sofuni (2001) My consideration on environmental mutagen research : Perspectives for the 21st century. *Environ. Mutagen Res.*, 23, 39-44.
- 谷所達幸，八木利仁，岩崎浩一，下位香代子，木苗直秀，祖父尼俊雄 (1998) 魚類の小核試験を用いる沿岸水域の汚染モニタリング，環境変異原研究，20, 1-9.
- Watanabe-Akanuma, M., K. Shimoi, N. Kinae and T. Ohta (1997) Food-derived heterocyclic amines potentiate the mutagenicity of a drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) , *Mutat. Res.*, 377, 225-229.

変異原性試験で何がわかるか：21世紀の展望

能美 健彦*

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

The past, present and future of genotoxicity assays

Takehiko Nohmi

Division of Genetics & Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501

Summary

The year 2001 was the 30th anniversary of the Japanese Environmental Mutagen Society. This is a good opportunity to look back over the development of genotoxicity assays during that period and envision the future perspective. At the beginning of the Society, the most important issue appeared to be the establishment of efficient screening systems to identify potential mutagens in the environment where millions of chemicals were present. Microbial gene mutation assays, such as the Ames test, and chromosome aberration tests using cultured mammalian cells were developed in the era. The mutagenicity and carcinogenicity of AF2, a food additive, and the heterocyclic amines in burnt food were discovered and these findings caused heated debate in the Society. In the 1980s and 90s, the genotoxicity assays seemed to have evolved mainly in two directions. The first one is the development of assays whose sensitivities were enhanced by genetic engineering. Examples include sensitive bacterial strains, such as *Salmonella typhimurium* YG1024 and YG1021, which are highly sensitive to mutagenic aromatic amines and nitroarenes, and *Salmonella typhimurium* YG7108 which is sensitive to the mutagenicity of alkylating agents. The second direction was the development of assays using experimental animals. Examples include transgenic assays, in vivo micronucleus assay and comet assay. The rodent assays are less sensitive than the microbial assays but may be more appropriate to evaluate the potential risks of chemicals to humans. At present, we still face a number of unsolved problems, such as how to evaluate the risk of exposure to multiple chemicals. Establishment of the molecular bases for the risk assessment of chemicals is a major challenge in the 21st century. Current topics for the development of genotoxicity assays are presented and future directions are discussed.

Keywords : genotoxicity, transgenic assays, Y family DNA polymerases

緒 言

日本環境変異原学会の大会も2001年10月で30回目を迎えた。これを機会にこれまでの環境変異原研究の流れを「試験法」という観点から振り返り、今後のありようを展望してみたい。

環境変異原研究は、環境中の因子、特に化学物質がヒトの遺伝子に与える影響を調べることを目的にしてい

る。化学物質がヒトの体細胞に突然変異や染色体異常を起こせば、発がんリスクを高め、生殖細胞に変異を起こせば、世代をへて有害な変異がヒトの集団中に蓄積する可能性が高まる。しかし環境中に存在する化学物質の数は膨大であり、この中からヒトの遺伝子に影響を与える恐れのある物質をどのようにしてふるい分けるかということが、学会発足当時の大きな問題であったと思う。

変異原が遺伝子DNAに作用すると、DNAに付加体を形成し、またDNA鎖の切断を起こす。DNA付加体は、後で述べるトランスリージョンDNA合成を経て遺伝子

* E-mail : nohmi@nihs.go.jp

受付：2002年6月27日 受理：2002年6月27日

日本環境変異原学会

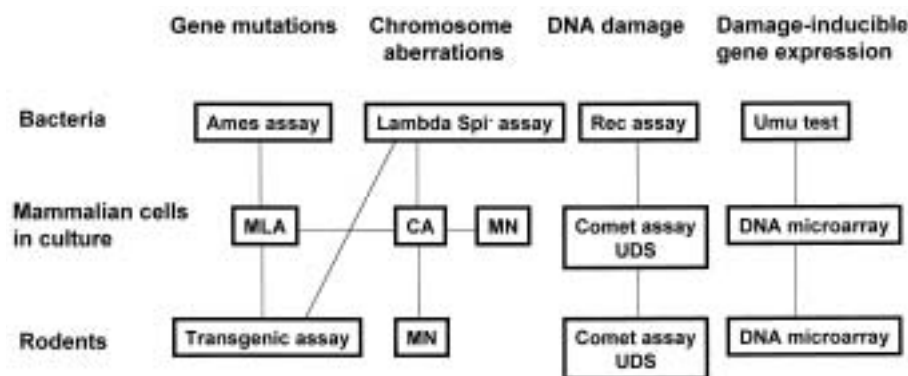


Fig. 1 Typical genotoxicity assays. MLA, mouse lymphoma assay; CA, chromosome aberration assay; MN, micronucleus assay; UDS, unscheduled DNA synthesis assay.

突然変異を誘発する。一方、DNA鎖切断は染色体の欠失や転座といった染色体異常を誘発する。そしてDNA損傷は、多くの場合、修復酵素などの特異的な遺伝子発現を促進する。したがって環境変異原の検出はFig. 1に示すいくつかの方法を組み合わせで行われてきた。すなわちend pointとしては①遺伝子突然変異、②染色体異常、③DNA損傷、④損傷により誘導される遺伝子発現が用いられ、テスター生物としては①微生物、②ほ乳類培養細胞、③齧歯類（ラット、マウス）が用いられてきた。このうちいくつかの試験法は行政が定めたガイドラインや法律で実施が求められている。たとえば厚生労働省の「遺伝毒性試験ガイドライン」では、細菌を用いる遺伝子突然変異試験、ほ乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験（MLA＝マウス・リンフォーマ試験）あるいは染色体異常試験、そして齧歯類を用いる小核試験という3種類の試験の実施が求められている。さまざまな目的で作られた新規化学物質を遺伝毒性試験にかけてその遺伝的影響を調べ、その後に市場に放出するという社会のしくみ（行政や法律）が整えられたことは、これまでの環境変異原研究の成果の一つであるといえる。特に1980年代のなかばからは、GLP（Good Laboratory Practice）制度が導入され、法的な規制に結びつく遺伝毒性試験の実施を手堅いものになっている。しかし、GLP試験だけで環境変異原のすべてを検出できるわけではない。食品や天然物、大気や生体成分などに含まれる化学物質の遺伝的な影響を調べる場合には、GLP試験とは別の取り組みが必要となる。また創薬研究部門では、これまでとは比較にならない多数の候補化合物の中から、より迅速に毒性の少ない物質を検索する手法の確立が求められている。さらに遺伝毒性試験によって検出された「変異原」が、はたしてどれほどヒトの遺伝子に対して有害かという根本的な問題も解決されていない。したがってGLP試験を超えた新しい遺伝毒性試験をどのように作って行くかということが、これからの大きな課題である。

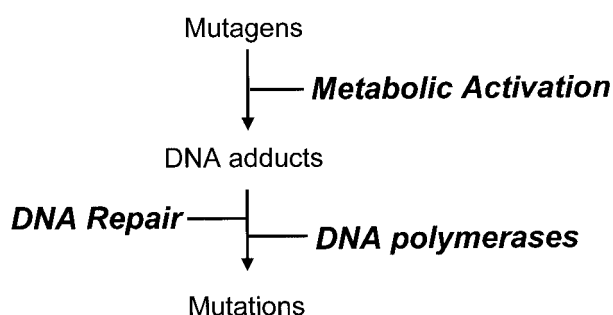
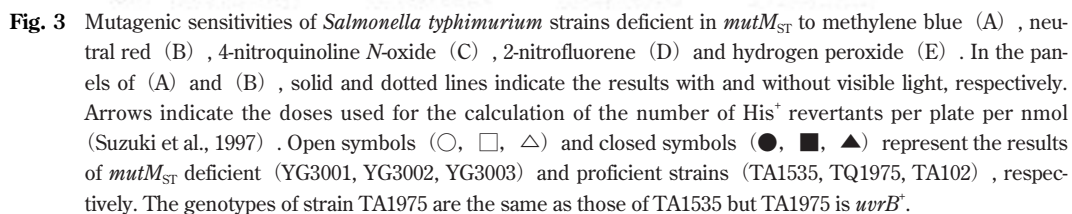


Fig. 2 Factors affecting the sensitivity of genotoxicity assays

1. 遺伝毒性試験のハイ・スループット化

現在、製薬企業等では「創薬プロセスの変化」「創薬パラダイムのシフト」ということがいわれている。これは「ゲノム創薬」という言葉に代表されるゲノム情報を基にした新しい薬作りというものを意味している。また、薬の候補化合物も「コンビ・ケム（combinatorial chemistry）」と呼ばれる手法を用いて、きわめて少量かつ多数生み出されるようになってきた。したがって従来以上に微量の試料を短期間に処理しうる新しい毒性試験が求められている。また、大気、水、食品などのcomplex mixtureに含まれる微量の変異原を、迅速に検出・同定することは、従来にもまして重要性を増している。こうした状況に鑑み、我々は微生物を用いたより高感度で迅速な遺伝毒性試験の開発を目指して研究開発を進めている。

Fig. 2は、遺伝毒性試験のテスターに使われるバクテリアの感受性を支配する因子を示している。変異原物質の多くはチトクロームP-450をはじめとする薬物代謝酵素により活性化されDNA付加体を生ずる。DNA付加体の多くはDNA修復酵素により除かれるが、修復されずに残った付加体はDNAポリメラーゼによる複製の際に誤りを起こす原因となり突然変異を生ずる。したがってFig. 2に示す3つの因子は、テスター株の感受性を支配する重要な因子である。



77

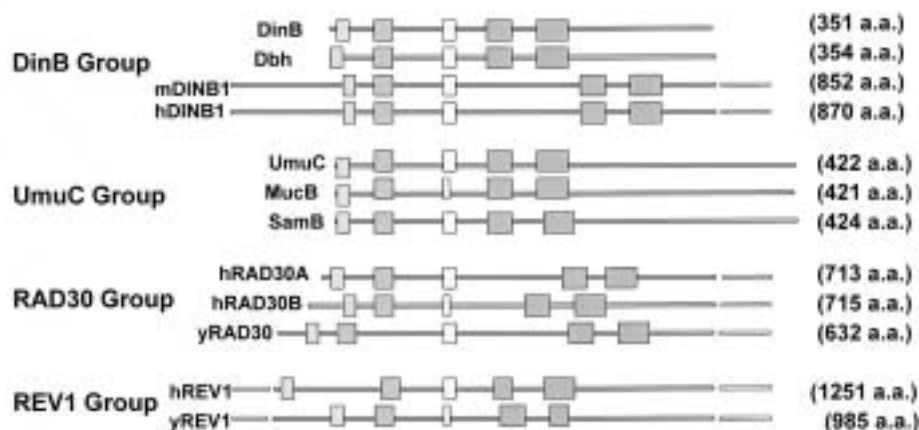


Fig. 5 The Y-family DNA polymerases. This family consists of at least four sub-families, *i.e.*, DinB, UmuC, RAD30 and REV1. Boxes represent highly conserved amino acid sequences of the proteins.

を形成するとともに、付加体を形成するためと考えられる。uvr機能を持ったテスター株ではDNA付加体が効率よく除去されるため、酸化損傷の量が変異原性の発現の律速になると考えられる。uvr機能を欠損した場合には酸化損傷の多少に関わらずDNA付加体の変異原性発現の律速となるため、mutM_{ST}を欠損させても感受性の増大はみられないものと考えられる。

3) DNAポリメラーゼを高発現するテスター株

感受性を支配する第3の因子はDNAポリメラーゼである。Benzo[a]pyreneの付加したDNAを鋳型にDNAポリメラーゼが複製を行うと、付加体のある塩基を飛ばして合成したり、その向かい側に誤った塩基の挿入を行う (Fig. 4)。こうしてできたDNA鎖をもとにもう一度DNA合成が起こると、塩基配列の変化が固定されて突然変異、すなわちフレームシフトや塩基置換が生ずる。損傷部位を乗り越えて進むDNA合成を「トランスリージョンDNA合成 (translesion DNA synthesis)」と呼び、環境変異原に由来する突然変異の多くは、トランスリージョンDNA合成により生じていると考えられる。

この3年あまりの間にトランスリージョンDNA合成に関わると考えられる新しいDNAポリメラーゼが同定され、YファミリーDNAポリメラーゼと名付けられた (Friedberg and Gerlach, 1999; Johnson et al., 1999; Friedberg, 2001; Ohmori et al., 2001; Friedberg et al., 2002)。このファミリーには少なくともDinB/UmuC/RAD30/REV1の4つのサブファミリーが存在する (Fig. 5)。異なるDNAポリメラーゼは一部重複しつつも異なるタイプのDNA損傷のトランスリージョンDNA合成に関与しているようである。環境変異原→DNA付加体→DNA修復→トランスリージョンDNA合成→突然変異という流れをさまざまな角度から探求することが、これからの環境変異原研究において重要である。

YファミリーDNAポリメラーゼの遺伝的多型やその阻害剤を探索することは、リスク評価、リスク低減化に大きな役割を果たすと予想される。

4) 機械化によるハイ・スループット遺伝毒性試験

エームス試験やumuテストの試験規模を小さくし、機械化を図ることで、遺伝毒性試験をハイ・スループット化する試みがなされている (Reifferscheid et al., 1991; Brooks, 1995; Burke et al., 1996; Wilson and Cariello, 1997; Gee et al., 1998)。フラクチュエーション法を用いたエームス試験や高感受性株を用いたumuテストでは、従来のエームス法に比べ必要な化合物の量が20～100倍少なくなる (富田と森田, 2000)。この値は機械による自動分注を行わない時の値であるので、分注機械を使用することにより、さらに試験化合物の量をダウンサイジングすることができると予想される。生物学的手法によるハイ・スループット化と機械化によるハイ・スループット化を結合することにより、遺伝毒性試験の高性能化を図ることが、今後考慮すべき重要な一つの方向ではないかと考える。

2. 評価を目指す遺伝毒性試験

近年、発生工学技術の進歩により、さまざまな特性を持つトランスジェニックマウス、ノックアウトマウス、トランスジェニックラットが開発されている。遺伝毒性研究の分野においても大腸菌のgpt, lacI, lacZ遺伝子などを導入した変異検出用のマウス、ラットが開発されている (Nohmi et al., 2000; Heddle et al., 2000; 能美と増村, 2000)。

1) 標的臓器の予測

発がん物質についてはその発がん性に臓器特異性のあることが知られており、変異検出用のトランスジェニック

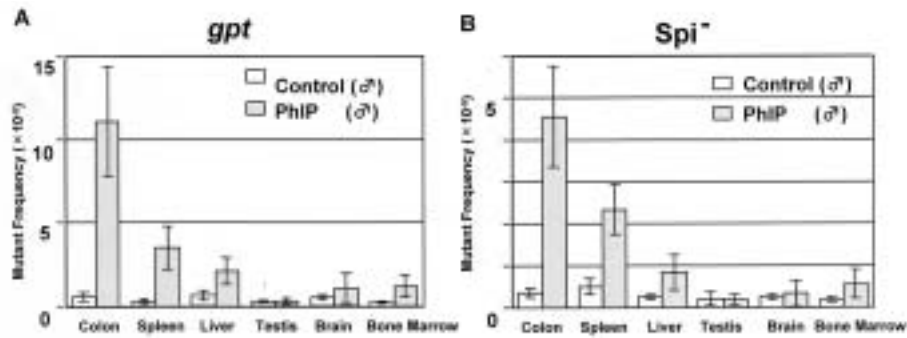


Fig. 6 Mutant frequencies in various organs of PhIP-treated and untreated male *gpt* delta mice. (A) *gpt* mutant frequencies and (B) *Spi*⁻ mutant frequencies. Bars represent mean values and standard deviations.

クマウスが開発された当初から、in vivoにおける遺伝毒性を指標に、発がんの標的臓器を予測できないかという期待があった。これに関連して、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]-pyridine (PhIP) を雄の *gpt* delta mouse に投与し、各臓器で起こる *gpt* 突然変異体頻度ならびに *Spi*⁻ 突然変異体頻度を測定した (Masumura et al., 1999)。臓器別でみると *gpt*, *Spi*⁻ いずれの場合も、大腸で最も突然変異体頻度が高くなり、ついで脾臓、肝臓の順であった (Fig. 6)。PhIP については雄のラットに投与すると大腸と前立腺に腫瘍を発生することが報告されており、この結果は発がんとの相関を示しているように見える。しかし、雌の *gpt* delta マウスに PhIP を投与した場合にも変異体頻度は大腸が肝臓よりも高くなる。ラットでは PhIP を雌に投与すると乳がんを誘発することが知られており、ラットの発がんで見られた性差をマウスの変異では必ずしも反映していない。一般的に、変異体頻度の上昇が観察された臓器の中に発がんの標的臓器が含まれていることが多いと思うが、変異体頻度のもっとも高い臓器が必ずしも発がんの標的臓器になるとは限らない。変異体頻度は上昇しながら発がんには至らない原因を考えることは、発がんの抑制を考えるうえで重要な示唆を与えてくれるのかもしれない。最近、C57BL/6N マウスに PhIP を投与すると、雄、雌ともに小腸に腫瘍を発生することが報告され、PhIP の発がん性は遺伝的背景によって影響されることが示唆されている (Ochiai et al., 2002)。

2) トランスジェニックラット

遺伝毒性試験の分野では小核試験をはじめ *in vivo* の実験にマウスを用いることが多いが、発がん試験をはじめ他の毒性試験や薬物代謝の分野ではラットが多く使われており、変異検出用のトランスジェニックラットの開発が求められてきた。明治製菓安全性研究所の林、近藤、進藤らのグループは、我々と共同してトランスジェニックマウスの開発に用いたラムダー EG10DNA を Sprague Dawley ラットの受精卵に導入し、変異検出用のトラン

スジェニックラットを開発した。このトランスジェニックラットの4番染色体の片方には、ラムダー EG10 が数コピー挿入されている。

このトランスジェニックラットに ethyl nitrosourea (ENU) 100mg/kg を腹腔内投与し、7日目に屠殺して肝臓を摘出し *gpt*, *Spi*⁻ assay を行うと、*gpt* 突然変異体頻度は無処理群に比べ約7倍上昇していた。一方、欠失変異を検出する *Spi*⁻ assay では陰性の結果となった。この結果は、ENU が主に塩基置換を誘発するというこれまでの知見とよい一致を示す。またトランスジェニックラットに benzo [*a*] pyrene を 62.5 mg/kg, 125 mg/kg 投与し、7日目に肝臓における *gpt*, *Spi*⁻ 変異体頻度を測定すると、*gpt*, *Spi*⁻ ともドーズに応じて変異体頻度が上昇し、トランスジェニックラットにおいても欠失変異を検出する *Spi*⁻ アッセイが使えることを示した。

結 語

今から約20年前の日本環境変異原学会第11回大会において、当時国立遺伝学研究所の変異遺伝部長であった賀田恒夫博士は抄録に次のような文を書かれた (賀田, 1983)。

「環境変異原研究とは何であるか？環境中に存在する変異原がわれわれに与える影響毒性を正しく知ることを起点としている。まさしく、ヒトの健康の向上を目的とした実学である。従って、このような目的にかなうことが必要である。ただ、毒物を検出して人命を救う場合のような直接の場合よりも、むしろ、毒性を予見する方法を開発するといった間接的な場合が多い。とくに、環境変異原の場合では、がんとか遺伝的影響のような慢性の毒性を対象としているがゆえに、種々な仮説の上に立った予測が必要になってくる。実験生物におけるデータから、ヒトへの影響の評価を行う所以である。ここに難しさがある。」

我々はサルモネラからトランスジェニックラットまで様々なモデル生物を使って化学物質の遺伝毒性を調べている。大切なことはその結果 (陽性、陰性) を直接ヒト

に当てはめるのではなく、その結果からより普遍的なルール（原則、教訓、原理）をみつけ、これをヒトに適用するという姿勢ではないだろうか。遺伝毒性を含む毒性研究の目指すところは、ヒトへの影響を評価（予測）することである。しかし私たちの前には「ヒトを含む動物の種差」や「複合状態での影響評価」「低用量域におけるドーズレスポンス」と数々の難問が立ちだかっている。「毒性の予測」は、天候や地震など自然現象の予測と同様に社会的に大きな意味を持つ問題である。我々の「毒性に関する予測能力」は、いまだ稚拙な段階にあるのかもしれないが、その頂をきわめることは社会が求めており、「（遺伝）毒性の予測」は、この分野に携わる専門家が他の分野の研究者と共同して解決してゆかねばならない21世紀における大きな挑戦であると考える。

謝 辞

本論文で紹介したハイ・スループット遺伝毒性試験ならびにトランスジェニックラットを用いる遺伝毒性試験の開発は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団の援助で進めている創薬等ヒューマンサイエンス総合研究の一環として行われているものである。原稿にコメントを寄せてくれたグラクソ・スミスクライン株式会社、森田健博士、明治製菓薬品総合研究所、林宏行修士、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部、山田雅巳博士、増村健一修士に感謝いたします。

参考文献

- Brooks, T.M. (1995) The use of a streamlined bacterial mutagenicity assay, the MINISCREEN, *Mutagenesis*, 10, 447-448.
- Burke, D.A., D.J. Wedd and B. Burlinson (1996) Use of the Miniscreen assay to screen novel compounds for bacterial mutagenicity in the pharmaceutical industry, *Mutagenesis*, 11, 201-205.
- Friedberg, E.C. (2001) Why do cells have multiple error-prone DNA polymerases?, *Environ. Mol. Mutagen.*, 38, 105-110.
- Friedberg, E.C. and V.L. Gerlach (1999) Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis, *Cell*, 98, 413-416.
- Friedberg, E.C., R. Wagner and M. Radman (2002) Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations, *Science*, 296, 1627-1630.
- Gee, P., C.H. Sommers, A.S. Melick, X.M. Gidrol, M.D. Todd, R.B. Burris, M.E. Nelson, R.C. Klemm and E. Zeiger (1998) Comparison of responses of base-specific *Salmonella* tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study, *Mutat. Res.*, 412, 115-130.
- Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R. Tindall and N. Yajima (2000) in vivo transgenic mutation assays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 253-259.
- Johnson, R.E., M.T. Washington, S. Prakash and L. Prakash (1999) Bridging the gap: A family of novel DNA polymerases that replicate faulty DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 12224-12226.
- Josephy, P.D., P. Gruz and T. Nohmi (1997) Recent advance in the construction of bacterial genotoxicity assays, *Mutat. Res.*, 386, 1-23.
- 賀田恒夫 (1983) 環境変異原研究10年の反省と今後の展望, 日本環境変異原学会第11回大会要旨集.
- Masumura, K., K. Matsui, M. Yamada, M. Horiguchi, K. Ishida, M. Watanabe, O. Ueda, H. Suzuki, Y. Kanke, K.R. Tindall, K. Wakabayashi, T. Sofuni and T. Nohmi (1999) Mutagenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) in the new gpt delta transgenic mouse, *Cancer Lett.*, 143, 241-244.
- 能美健彦 (2000) 遺伝子工学的手法を用いた新しい遺伝毒性試験法の開発, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 118, 1-20.
- 能美健彦, 増村健一 (2000) トランスジェニックマウス *gpt* delta を用いた点突然変異と欠失突然変異の検出, 環境変異原研究, 22, 85-90.
- Nohmi, T., K. Masumura and T. Suzuki (2000) Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays, *Mutat. Res.*, 455, 191-215.
- Ochiai, M., H. Imai, T. Sugimura, M. Nagao and H. Nakagama (2002) Induction of intestinal tumors and lymphomas in C57BL/6N mice by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine, *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 478-483.
- Ohmori, H., E.C. Friedberg, R.P.P. Fuchs, M.F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T.A. Kunkel, C.W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G.C. Walker, Z. Wang and R. Woodgate (2001) The Y-family of DNA polymerases, *Mol. Cell*, 8, 7-8.
- Reifferscheid, G., J. Heil, Y. Oda and R.K. Zahn (1991) A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples, *Mutat. Res.*, 253, 215-222.
- Sinclair, J.C., J. Sandy, R. Delgoda, E. Sim, M.E. Noble (2000) Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad, *Nature Struct. Biol.*, 7, 560-564.
- Suzuki, A., H. Kushida, H. Iwata, M. Watanabe, T. Nohmi, K. Fujita, F.J. Gonzalez and T. Kamataki (1998) Establishment of a *Salmonella* tester strain highly sensitive to mutagenic heterocyclic amines, *Cancer Res.*, 58, 1833-1838.
- Suzuki, M., K. Matsui, M. Yamada, H. Kasai, T. Sofuni and T. Nohmi (1997) Construction of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in 8-hydroxyguanine DNA glycosylase and their sensitivities to oxidative mutagens and nitro compounds, *Mutat. Res.*, 393, 233-246.
- 富田晃代, 森田 健 (2000) ハイスループット遺伝毒性スクリーニング試験法の開発, 日本環境変異原学会第29回大会プログラム・要旨集, PP. 139-139.
- Wilson, J.D.Jr., N.F. Cariello (1997) The Ames miniscreen assay: volatility of sodium azide can cause an increase in the reversion frequencies of adjacent, untreated wells, *Environ. Mol. Mutagen.*, 29, 217-219.

変異・癌原性物質の産生・代謝とその活性抑制に関する研究

大西 克成*

徳島大学大学院医学研究科プロテオミクス医科学専攻生体制御医学講座分子細菌学分野
〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

Studies on production and metabolism of mutagenic and carcinogenic substances and inhibition of their activities

Yoshinari Ohnishi

Department of Molecular Bacteriology, Graduate School of Medicine,
The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan

Summary

Dr Bruce Ames developed a simple procedure for assaying bacterial mutation, i.e. the Ames test, using *Salmonella Typhimurium his*⁻ mutant strains. We have used this procedure to measure mutagenicity of complex mixtures such as those in airborne particulates, automobile exhaust, small engine exhaust, wastewater, kerosene-heater exhaust and yakitori as well as nitroarenes in the mixtures, especially 1-nitropyrene (1-NP) and dinitropyrenes (diNPs). We measured the amounts of 1-NP and diNPs by a new procedure in which specific nitroreductases are used to convert NP to aminopyrene (AP) and the fluorescent AP is assayed efficiently and sensitively by high-pressure liquid chromatography. Metabolism of 1-NP in germ-free and conventional rats was elucidated: it appears that the liver is primarily responsible for ring hydroxylation and *N*-acetylation of 1-NP and for *O*-glucuronide conjugation, while intestinal bacteria play a dominant role in nitroreduction of 1-NP and its metabolites and in glucuronide cleavage. In addition, we showed that glutathione conjugates of 1-NP oxides produced in the liver were excreted into the bile and those in the upper intestine were metabolized to the corresponding cysteinylglycine and cysteine conjugates by γ -glutamyl-transferase and aminopeptidase of pancreatic juice. The cysteine conjugates were then metabolized by β -lyase of the normal bacterial flora in the lower intestine to the reactivated metabolites and reabsorbed, partly producing DNA adducts in the intestinal mucosa. We observed in vivo formation of mutagens induced by intraperitoneal administration of pyrene in animals during exposure to nitrogen dioxide, and we concluded that 1-hydroxypyrene is nitrated in the body when the animal is exposed to NO₂ gas after hydroxylation of pyrene in the liver. We studied the carcinogenicity of 1,6-diNP, which is stronger than that of benzo[*a*]pyrene, the augmenting effect of a nonmutagenic fraction in soy sauce on mutagenicity of 3-diazotyramine produced in nitrite-treated soy sauce, the antimutagenicity and anticarcinogenicity of spices and medicinal plants, lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf), roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) and *Murdannia loriformis*, and the interaction among drugs, antibiotics and intestinal bacteria. We developed new bacteria that produce lycopene or human lactoferrin, which are chemopreventive substances.

Keywords : mutagens, 1-nitropyrene, intestinal bacteria, chemoprevention, antimutagenicity and anticarcinogenicity

* E-mail : ohnishi@basic.med.tokushima-u.ac.jp

受付 : 2002年6月10日 受理 : 2002年6月10日

日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第30回大会において発表された2001年度学術賞受賞講演である。
This paper is the lecture of the JEMS Award (2001) presented at the 30th JEMS annual meeting, 2001.

緒 言

Ames ら (1973 a,b) が *Salmonella Typhimurium his*⁻ 株による高感度で代謝活性化を加えた変異原性試験の改良法を発表して以来、殺菌性物質が入っていなければ混合物でもその変異原性を細菌の His⁺ 復帰変異集落数で測定することが容易になった。しかも変異原性が強ければ化学的測定限界を超えて、変異原性物質の存在を証明できるようになった。我々はこの Ames 法を利用することによって環境中の混合物の変異原性を測定し、その中のニトロ化合物の変異原性を測定し、新しい化学的測定法を開発して含有量を明らかにした。1-nitropyrene (1-NP, CAS : 5522-43-0) をモデル化合物としてその生体内代謝経路を明らかにした。特に、1-NP oxides の glutathione 抱合体は脾液中の γ -glutamyltransferase と aminopeptidase によってラット小腸内で分解され、生じた cysteine 抱合体は大腸内の腸内菌によって分解されてチオール化合物になることを明らかにした。自動車排ガスや石油ストーブ中の NO₂ によって多環芳香族炭化水素 (PAH) がニトロ化されることを追試し、さらに生体内でも NO₂ 暴露によって pyrene (CAS: 198-55-0) がニトロ化を受ける機序を明らかにした。また、1,6-dinitropyrene (1,6-diNP, CAS: 42397-64-8) の発癌性は benzo[a]pyrene (CAS: 50-32-8) より強いことを示した。食品に関しては醤油の亜硝酸処理後の変異原性について、ethanol やいろいろな食品との相互作用について、さらに香辛料や医薬用植物の抗変異・抗発癌作用について調べた。また、癌治療薬の副作用と腸内菌の関係についての研究も行った。腸内菌の大腸発癌促進と抑制作用を調べ、最近では抗発癌作用をもつ生理活性物質を産生する腸内菌を作製して、癌の化学予防を試みている。過去 27 年間に多くの共同研究者とともに以上のようなことを研究してきたのでその要点について述べる。

1. ニトロアレーンの検出と定量

大気中の浮遊粒子状物質をハイボリュームサンプラーでガラス繊維濾紙上に集め、methanol でソックスレー抽出を行い、S9 画分を加えてネズミチフス菌 TA98 株を使った Ames 法で変異原性を測定すると、大気 1m³ 当たり工場地帯 (1974-75 年の大牟田市) で 22-445 His⁺ revertants/m³、都市・住宅地帯 (福岡市) で 7-78 His⁺ revertant/m³ の変異原性を示した (Tokiwa et al., 1977)。中に含まれる化学物質として benzo[e]pyrene (CAS: 192-97-2), chrysene (CAS: 218-01-9), fluoranthene (CAS: 206-44-0), benzo[ghi]perylene (CAS: 191-24-2), benz[a]anthracene (CAS: 56-55-3), benzo[a]pyrene, pyrene (CAS: 129-00-0), coronene (CAS: 191-07-1), perylene (CAS: 198-55-0) などの polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) 以外に S9(-) で測定される直接変

異原物質もあることを明らかにした (Tokiwa et al., 1980)。また、自動車排ガス中の粒子状物質の変異原性を Ames 法で測定し、ガソリンエンジンの乗用車の排ガス 1m³ 当たり TA98 株 S9(+) で 500 revertants, TA100 株 S9(+) で 960 revertants を示したが、ディーゼルエンジンバスの排ガスではそれぞれ 19,600, 5,780 revertants/m³ を、ディーゼルエンジントラックでは 9,140, 3,780 revertants/m³ を示した (Ohnishi et al., 1980; Ohnishi, 1988)。さらに、発電気用の小型ガソリンエンジンで 1000W 発電させると排出粒子状物質の変異原性は TA98 株 S9(+) で 20,500 His⁺ revertants/plate/m³ を示した (Ohnishi et al., 1982)。これらの大気やエンジン排出粒子状物質を抽出分画すると中性画分に S9 画分による代謝活性化を必要としない直接変異原性を認め、ニトロ化合物の存在が推定された。その中の高変異原性物質である 1-NP と 1,6-diNP (Tokiwa et al., 1981b) の定量法を確立するために、まず、腸管内に常在する嫌気性細菌である *Bacteroides fragilis* の 4 種のニトロ還元酵素 nitroreductase (NRase) を精製した (Kinouchi et al., 1982; Kinouchi and Ohnishi, 1983)。それぞれ基質特異性が異なっており、NRase I は 1-NP を還元して蛍光性の 1-aminopyrene (1-AP, CAS: 1606-67-3) に、NRase III は 1,6-diNP を 1,6-diAP に変換した。高速液体クロマトグラフィーでこれらのアミノ体を高感度に定量する方法を確立した (Kinouchi and Ohnishi, 1983; Manabe et al., 1984; Manabe et al., 1985)。1-NP と 1,6-diNP の検出感度は、それぞれ 1.1×10^{-2} と 1.3×10^{-2} pmol であった (Manabe et al., 1984; 大西, 1985)。

Ames 法とアミノ体で高感度に定量する方法によって、ディーゼルトラック排ガス (Manabe et al., 1985)、ディーゼル小型エンジン排ガス (Ohnishi et al., 1982; 大西と木内, 1983)、ディーゼルエンジン内燃焼ガス (大西と木内, 1983; Hayano et al., 1985)、石油ストーブ燃焼中の室内空気 (Ohnishi et al., 1985; Kinouchi et al., 1988)、給油所排水 (Ohnishi et al., 1983; Manabe et al., 1984)、使用済みエンジンオイル (Manabe et al., 1984)、さらに食品である焼き魚、焼肉、焼き鳥の変異原性を測定し、NP 類の定量を行った (Ohnishi et al., 1985; Kinouchi et al., 1986a; Ohnishi et al., 1986a)。そして 1-NP が多い試料には diNP 類が含まれており、変異原性に占める割合も大きいことを明らかにした (大西, 1985)。

2. 1-NP の生体内代謝

Bacteroides fragilis から精製した NRase I と NRase III は in vitro でそれぞれ 1-NP と 1,6-diNP を代謝活性化して DNA, RNA, poly(G), poly(dG) に結合させ付加体を形成した。1-NP の DNA 付加体の酵素的分解産物の主要産物は *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene であり、哺乳動物の NRase である xanthine oxidase によって形成される

付加体と同じであった。SD ラットの各臓器と腸管内容物の NRase 活性を測定すると、肝臓、小腸、および腸管内容物で高かった。腸管内容物ではその菌数に比例し、特に嫌気性菌数に依存していた (Kinouchi and Ohnishi, 1986)。

次に、1-NP の生体内代謝を明らかにするために、無菌ラットと通常ラットを使用して、 $[^3\text{H}]$ 1-NP を経口投与後、各臓器の放射能と尿や糞便中の代謝産物を分析した。無菌ラット糞便中の主たる代謝産物は、3-nitropyrenol > 1-NP > 4,5-dihydroxy-4,5-dihydro-1-NP > 6-nitropyrenol > 8-nitropyrenol の順に少なかった。無菌ラット尿中には 1-NP を除いた同様の化合物の glucuronide 抱合体が証明された。通常ラットではニトロ還元反応とアセチル化反応が起こっており、糞便中の代謝産物は 1-NP > 1-aminopyrene > 8-acetylaminopyrenol > 6-acetylaminopyrenol > 3-acetylaminopyrenol であった。尿中の主たる代謝産物は 6-と 8-acetylaminopyrenol の glucuronide 抱合体であった。通常ラットの胆汁中の抱合体を分析すると、4,5-dihydroxy-4,5-dihydro-1-NP, 3-, 6-, および 8-nitropyrenol の glucuronide 抱合体であったが、時間がたつと 6-と 8-aminopyrenol, および 6-と 8-acetylaminopyrenol の glucuronide 抱合体が増加した。また、 β -glucuronidase に反応しない硫酸抱合体や glutathione 抱合体の存在も推定された。以上の結果から、NRase はあるにも関わらずニトロ還元反応は肝臓では行われず、腸管内細菌によることが明らかになった。また、通常ラットの胆汁中の代謝産物の解析から、肝臓ではピレン環の水酸化反応、N-アセチル化反応、および抱合反応が起こり、腸管内常在細菌ではニトロ還元反応と脱抱合反応とが起こることを明らかにし、1-NP、主として glucuronide 抱合体のラット生体内代謝経路を推定した (Kinouchi et al., 1986b; Ohnishi et al., 1986b)。

3. 腸内菌による 1-NP の代謝と第 3 相反応

肝臓での第 1, 2 相反応に対して、胆汁中に排出された変異原代謝産物の腸管内での主として腸内菌による反応を第 3 相反応と呼んでいる。この腸内菌の役割を明らかにするために通常の SPF (specific pathogen-free) マウスに比べて腸内生菌数を 0 に近づけるための抗生物質処理法を確立した。bacitracin, neomycin sulfate, streptomycin sulfate の 3 剤を 1 日 2 回 5 日間胃内強制投与すると生菌数が減少するだけでなく、腸内容物中の腸内菌由来の cysteine conjugate β -lyase, β -glucuronidase, nitroreductase 活性が減少した。それに対して、膵液由来の γ -glutamyltransferase や aminopeptidase 活性は減少しなかった。さらに、glucose の腸管からの吸収や肝臓の酵素活性には影響が無かった (Kinouchi et al., 1993)。 $[^3\text{H}]$ 1-NP をラットに経口投与後 48 時間の胆汁中の代謝産物の 21.4 % は 4,5-epoxy-4,5-dihydro-1-nitropyrene (1-

NP 4,5-oxide) と 1-NP 9,10-oxide の glutathione, cysteinylglycine, および cysteine 抱合体であり、1-NP 4,5-oxide と 1-NP 9,10-oxide との glutathione 抱合体はそれぞれ 2.6 % と 10.4 % であった。胆汁中に排出された 1-NP 4,5-oxide と 1-NP 9,10-oxide の glutathione 抱合体が小腸内において膵液中の γ -glutamyltransferase と aminopeptidase (Ohnishi et al., 1990) によって分解されて cysteine 抱合体となり、さらに大腸内で腸内菌、特に *Peptostreptococcus magnus* と *Eubacterium limosum* の cysteine conjugate β -lyase によって分解されて、再吸収されたり、活性化されて腸管粘膜内で DNA 付加体を形成することを明らかにした (Kinouchi et al., 1990; Kinouchi et al., 1992; Kinouchi et al., 1993; Kataoka et al., 1995)。また、1-NP の代謝産物としてアセチル化体が出現するが、アセチル化には腸内菌はほとんど関与せず肝臓で起こることを示した (Kinouchi et al., 1987)。

1-NP のリスクを動物実験の結果からヒトに外挿するために、肝臓での 1-NP の酸化的活性化と不活性化のヒトと 5 種の動物における差を in vitro で調べた。ヒトの 1-NP oxides 生成活性は ICR マウスに似て低く、1-NP 4,5-oxide の epoxide hydrolase による加水分解はヒトで最大であった。1-NP 4,5-oxide からのグルタチオン抱合体生成活性は 9,10-oxide からより高かったが、ヒトとイスでは極端に低かった。このようにヒトの 1-NP の代謝経路の酵素活性と同じ動物はおらず、種差があることを明らかにした (Kataoka et al., 1991; Ohnishi et al., 1991)。

さらに、腹腔内に 1-NP を投与した膵管胆道合流異常のモデル犬では、解毒抱合体に膵液中の γ -glutamyltransferase や aminopeptidase と感染細菌の sulfatase が作用して、抱合体の再活性化が胆道内で起こっていることを示し、膵管胆道合流異常症のヒトでの胆道癌の発生率が高い原因の一つを示唆した (Dong et al., 1993)。

4. diNP の発癌性

1-NP と 1,6-diNP を精製して各 0.1 mg を週 1 回 20 週間雄 BALB/c マウスの皮下に投与し、45 週後に観察したところ、1-NP 投与群では腫瘍は発生しなかったが、1,6-diNP 投与群では 20 匹中 10 匹に投与部位に悪性線維性組織球腫が生じた (Tokiwa et al., 1984; Tokiwa and Ohnishi, 1986)。雄 F344/DuCrj ラットの左肺に 1.5 mg 1-NP, 0.15 mg 1,6-diNP, または 0.5 mg 3-methylcholanthrene (MCA, CAS: 56-49-5) を含む beeswax-tricaprylin を注入し、72 週後に観察すると、1,6-diNP 投与群では 28 匹中 21 匹 (75 %) に扁平上皮癌、2 匹 (7 %) に未分化癌、2 匹 (7 %) に扁平上皮化生が生じていたが、1-NP 投与群では 32 匹すべて癌も扁平上皮化生も誘発されていなかった。MCA 投与群 19 匹では、1,6-diNP 投与群より早く 100 % 扁平上皮癌が誘発された (Maeda et al., 1986)。さらに、用量依存性を調べるために 0.003, 0.01,

0.03, 0.1, 0.15 mg の1,6-diNPを肺内に投与したところそれぞれ0/39 (0%), 4/30 (13%), 13/31 (42%), 22/26 (85%), 6/9 (67%)に未分化癌が, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 mg のbenzo[*a*]pyrene投与で1/29 (3%), 7/30 (23%), 22/29 (76%), 9/13 (69%)に扁平上皮癌が用量依存的に誘発されており, 同じ用量ではbenzo[*a*]pyreneより1,6-diNPの方が発生頻度が有意に高かった (Iwagawa et al., 1989).

5. NO₂ 暴露によるニトロ化反応

大気中でPAHをNO₂ガスに暴露すると直接変異原性のニトロ体が生じることを明らかにしていた (Pitts et al., 1978; Tokiwa et al., 1981a) が, 20 ppm のNO₂ガスに暴露している雄ICRマウスの腹腔内に800 mg/kg体重のpyreneを投与し, さらに24時間NO₂ガスに暴露したところ, 生体内でニトロ化反応が起こり, β -glucuronidase処理した尿中に変異原性の1-NPの水酸化体である3-hydroxy-1-NP, 6-hydroxy-1-NP, 8-hydroxy-1-NP, および1-hydroxypyreneを検出した (Kanoh et al., 1987). また, 1-hydroxypyrene投与の場合にもNO₂暴露と同様のニトロ化合物を証明した (Kanoh et al., 1990). 400 mg/kg体重の5種類のPAH (pyrene, fluoranthene, fluorene, anthracene, chrysene) をそれぞれ腹腔内に投与したICRマウス, pyrene, またはfluorantheneを投与したWistarラット, Syrian goldenハムスター, Hartleyモルモットをそれぞれ20 ppmのNO₂ガスに暴露し, 尿中のグルクロン酸および硫酸抱合体を分析した. 脱抱合体のpyrene, またはfluorantheneを投与したNO₂暴露のマウスとハムスターの尿の変異原性はネズミチフス菌TA98株とTA100株に対して非常に高かったが, ラットとモルモットではそれほど高くなかった. 5種類のPAHを混合して与えるとNO₂暴露マウス尿の変異原性は1.5倍に増加した. NRase欠損変異株TA98NRやacetyltransferase欠損変異株TA98/1,8-DNP₆に対しては変異原性が減少した (Ohnishi et al., 1990; Miyanishi et al., 1996).

生体内でのニトロ化の機序を明らかにするために, 10 μ g/ml のpyrene, または1-hydroxypyreneを含む50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), またはdichloro-methane溶液にNO₂ガスを吹き込んだところ, pyreneは両溶液でNO₂によってニトロ化されず, 1-hydroxypyreneはTris-HCl緩衝液中でNO₂によってニトロ化されたが, 有機溶媒中ではニトロ化されなかった. ascorbic acidや α -tocopherolを加えると1-hydroxypyreneの水溶液中でのNO₂によるニトロ化反応が阻害された. さらに, ascorbic acidや α -tocopherolを経口投与したマウスではpyreneとNO₂によるニトロ化反応が阻害された. これらの結果から, 1-NPは肝臓で水酸化を受けてから, イオン反応で1-hydroxypyreneがニトロ化されるという機序を明らかにした (Kinouchi et al., 1994; Miyanishi et al., 1996).

6. 亜硝酸処理醤油の変異原性

Nitrate摂取量と胃癌死亡率は正の相関を示す (Hartman, 1983). nitrateは口腔内や腸管内でnitriteに還元され, 食品中のaminesやamidesと容易に反応して発癌性のN-nitroso化合物を生成する (Magee et al., 1967). Wakabayashi et al. (1983) は亜硝酸処理した日本の食品中で醤油が最も高い変異原性を示すこと, および1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCCA) が亜硝酸処理醤油中に生じる変異原の前駆体であることを報告した. また, 醤油中のtyramineは亜硝酸処理で強力な変異原になり (Ochiai et al., 1984), その産物3-diazotyramineはラット口腔内に扁平上皮癌を誘発することが報告された (Fujita et al., 1987). そこで共同研究者のHigashimoto et al. (1988) は25種類の日本の醤油について5%の濃度で50 mM sodium nitrite (pH 2) と37℃, 1時間保温したところ, その反応液はTA100株S9(-)で368 $\pm$ 228 (34-834) revertants/ μ l 醤油の変異原性を示すことを報告した. 生じた変異原は光に対して不安定であり, 黄色灯ないし暗所で安定であった. 醤油中の変異原前駆体としては既知のtyramineやMTCCAの他に変異原性が弱い1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (MTC) が証明された. とこが, これら3種類の成分の亜硝酸処理後の変異原性の合計は亜硝酸処理醤油の変異原性の一部しか証明できなかった. さらに分析を進めて, 醤油中には亜硝酸処理tyramineすなわち3-diazotyramineの変異原性を9倍に増強する因子が含まれていることを示した. したがって, tyramineが亜硝酸処理醤油中に産生される変異原の主たる前駆体であり, 上記3前駆体と3-diazotyramineの変異原性の増強因子とで亜硝酸処理醤油の全変異原性を説明することができることを明らかにした. この変異原性増強因子は非変異原性であり, 亜硝酸処理前後で熱にも光にも安定であった (Higashimoto et al., 1988).

醤油を1.25-10% ethanol存在下で亜硝酸処理した場合にはethanolの濃度に比例して, 生じる変異原性が減少した. ethanolの代わりに市販のアルコール飲料である日本酒, ワイン, 焼酎, ウイスキー, ブランディーが有効であったが, ビールは効かなかった. 醤油成分のtyramineをethanol, *n*-propanol, またはisopropanol存在下で亜硝酸処理すると変異原性が減少したが, methanol存在下が最も強く減少した. しかし, glucoseやsucroseなどの糖存在下では変異原性が2倍増強した. この亜硝酸処理tyramineの変異原性の減少には, tyramineを亜硝酸とethanolとで同時処理することが必要であった. この減少はtyramineからの変異原性3-diazotyramineの生成が減少した結果であることを明らかにした (Higashimoto et al., 1995).

一方, 醤油成分のMTCCAを7.5% ethanol存在下で

37℃, 60分間, pH 3で50 mM 亜硝酸処理すると, 変異原性がethanol非存在下より強く増加した. この変異原性増強効果はMTCCAを亜硝酸とethanolとで同時処理することが必要であり, methanol, *n*-propanol, iso-propanolも増強効果があったが, glucoseやsucroseは無効であった. また, 日本酒と焼酎は強い増強効果があり, ワイン, ウイスキー, ブランディ, ビールにも増強効果があった (Higashimoto et al., 1996). MTCCAのethanol存在下で亜硝酸処理のときにさらにスダチ (*Citrus sudachi* Shirai), レモン (*C. limon* Burm.), ユズ (*C. junos* Tanaka)などの柑橘類を反応液に入れると生じる変異原性が減少した. 特に, 果汁の部分より外皮の部分の方が変異原性減少効果が強かった. このときの柑橘類中の抗変異原性物質としてはlignin, pectin, D-limonene, naringin, hesperidin, ascorbic acid, citric acidが示唆された (Higashimoto et al., 1998). 柑橘類の代わりに緑茶, 紅茶, ウーロン茶の熱湯抽出液, さらにハーブ茶 (バナバ, テンチャ, カキノハ, カキドオシ, ヨモギ, トチュウ, センナ) やハーブ抽出液 (ジオウ, トウキ, オウバク) を加えても変異原性は減少した. その抗変異原性の有効成分としてカテキン類が考えられた. これらのお茶やカテキン類の抗変異原性はこれらの物質の還元力と正の相関を示した (Higashimoto et al., 2000; Higashimoto et al., 2001).

7. 抗癌剤や発癌予防薬使用時の副作用

1-β-D-arabinofuranosyl-5-(*E*)-(2-bromovinyl) uracil (sorivudine) は抗ヘルペスウイルス剤として開発され, varicella-zoster virus と herpes simplex virus type 1 に対して非常に有効であった (Machida et al., 1981; Machida and Sakata, 1984; Machida, 1986). sorivudineは1993年に日本で抗ウイルス経口薬として認可されたが, fluorouracil系抗癌剤である5-fluorouracil (5-FU) やTegafurで治療していた癌患者に上記のウイルス感染が発症し, sorivudineを併用して副作用として血液疾患がおこり, 5-FUによる骨髄抑制がひどい15人の患者が死に至ったために使用禁止となった (Swinbanks, 1994). sorivudineが(*E*)-5-(2-bromovinyl)uracil (BVU) に分解され, BVUが肝臓において5-FUの分解酵素であるdihydropyrimidine dehydrogenaseを非可逆的に阻害して, 5-FUの血中濃度を異常に上昇させて副作用を引き起こすと考えられていた (Desgranges et al., 1986). そこで我々はsorivudineがどこでBVUに分解されるのかを知るために, その分解酵素pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase) 活性の分布をSprague-Dawley雄ラットで調べた. 肝臓, 腎臓, 胃, 盲腸, 大腸, および胃内容物と小腸内容物の酵素活性は低いか検出されなかったが, 盲腸内容物と大腸内容物の酵素活性が非常に高いことがわかった. このことは腸内菌叢が重要な役割をしているこ

とを示唆しているので, 15菌種23株の好気性細菌, 16菌種16株の嫌気性細菌, 1真菌, 合計32菌種40株の粗抽出液のPyNPase活性を測定したところ, 腸内最優勢菌である*Bacteroides*属の*B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*がsorivudineをBVUに分解する高い活性を保有していることがわかった. ラットに100 μmol/kgのsorivudineを投与すると血清中のBVU濃度は8時間後に最高になり, 血清中濃度AUC (area under the curve) は101μM×hで, 半減期は約4.2時間であった. in vivoでの腸内菌叢によるBVU産生を調べるために, 3日間抗生物質を投与したラットにsorivudineを投与して血清中のBVUを測定した. 好気性菌と嫌気性菌に有効なampicillin, またはbacitracin, neomycin, streptomycinの3剤混合液を前投与したラットにsorivudineを投与すると, 少量のBVUしか血清中に検出されなかった. また, 嫌気性菌の数を減少させるmetronidazoleで前処理すると血清中のBVU濃度は同様に低かった. このことはin vivoにおいても, 腸内菌叢の優勢菌である嫌気性菌がBVUを産生していることを示唆している. ところが, 好気性菌に作用するkanamycinで前処理すると血清中のBVU濃度は約3倍に増加し, BVUの半減期も3倍以上に増加した (Nakayama et al., 1997). このことは5-FUとsorivudine, さらに抗生物質が加わった薬物相互作用によって5-FUの副作用が出現した可能性を示唆している (大西, 1997).

非ステロイド系抗炎症剤 nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAID) は抗炎症・鎮痛剤として使われるだけでなく, 家族性大腸腺腫症の患者に対して化学予防薬・治療薬として使用される (Marnett, 1992; Weiss and Forman, 1996). しかし, ヒトに対しては使用者の15%に胃潰瘍, 8.4%に小腸潰瘍を誘発し (Allison et al., 1992), ラットには回腸潰瘍を形成する. NSAIDの一種5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(4-methylsulfonylphenyl) thiophene (BFMeT) を使ってラット回腸潰瘍形成と抑制の機序を明らかにした (Uejima et al., 1996; Kinouchi et al., 1998; Shan et al., 1998). SPFのWistarラットに500-1500 mg/kgのBFMeTを1回胃内投与すると72時間後に28匹中20匹 (71%) に回腸潰瘍が形成されたが, 腸内生菌数を抑えるためにbacitracin, neomycin sulfate, streptomycin sulfateの3剤を毎日投与したときには, 26匹中1匹しか潰瘍は形成されなかった. 無菌ラット (10匹) や*Bifidobacterium adolescentis* ATCC15703株のノトバイオートラット (5匹), *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356株のノトバイオートラット (5匹) にBFMeTを投与しても回腸潰瘍は形成されなかった. ところが, *Eubacterium limosum* ATCC8480株や*Escherichia coli* K12株 (その中のW3110株) のノトバイオートラットにBFMeTを投与すると潰瘍が形成された. もちろん,

これらのノトバイオトラットを抗生物質3剤で処理しておくで潰瘍は形成されなかった。これらのことは、BFMeTによる回腸潰瘍形成に関与している腸内菌と関与しない腸内菌があることを示している。SPFラットで回腸潰瘍が形成されているときには、回腸の優勢菌である *Lactobacillus* が相対的に減少し、グラム陽性菌は97.4%から56.4%に減少し、*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacteroides* が増加して、これらのグラム陰性桿菌は回腸内容物の総菌数の1.2%から37.3%まで増加した。BFMeTによる回腸潰瘍形成は上記の *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* の一夜培養液、または *Bifidobacterium breve* と *Streptococcus thermophilus* を含むヨーグルトを投与すると減少した (Uejima et al., 1996)。 *L. acidophilus* や *B. adolescentis* の培養上清を飲料水として与えても潰瘍形成を抑制し、回腸粘膜の過酸化脂質形成を抑制した (Kinouchi et al., 1998)。 ascorbic acid, dimethyl sulfoxide, glutathione, β -carotene が潰瘍形成を抑えたので、脂質過酸化の重要性を指摘し、粘膜障害の機序を明らかにした (Shan et al., 1998)。

8. 香辛料や薬用植物の抗変異・抗発癌作用

caraway, coriander, black pepper などの香辛料の熱水抽出液は、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, dimethylnitrosamine, ICR-170 の変異原性を減少した。しかし、black pepper の熱水抽出液や methanol 抽出液を亜硝酸処理するとネズミチフス菌 TA100 株に対して強い変異原性が出現した (Higashimoto et al., 1993)。タイ王国の薬用植物で食品でもある lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) の80%エタノール抽出液は抗変異原性であるが、ラット大腸における azoxymethane (AOM) 誘発 DNA 付加体 *O*⁶-methylguanine 形成と前癌病変である aberrant crypt foci (ACF) 形成を発癌初期過程と post-initiation 過程において抑制した。特に、post-initiation 過程において、腫瘍形成と相関している focus 当たり4個以上の aberrant crypt をもつ大きな ACF 形成を抑制した (Suaeyun et al., 1997)。さらに、 β -glucuronidase を阻害し、抗酸化活性をもっていることを明らかにした。これらのことは lemon grass 抽出液がラット大腸において glucuronide 抱合体から活性化した aglycon である methylazoxymethanol の放出を阻害し、DNA 付加体形成と ACF 形成を減少させることを示唆している (Suaeyun et al., 1997)。同じくタイ王国の薬用植物である roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) および *Murdannia loriformis* の80%エタノール抽出液は、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) などのヘテロサイクリックアミンの変異原性を減少させ、AOM 誘発 ACF 形成を発癌初期過程で抑制した (Chewonarin et al., 1999; Chiampanichayakul et al., 2001; Intiyot et al.,

2002)。roselle は PhIP の ACF 形成も抑制した (Chewonarin et al., 1999)。これらの薬用植物の抽出物、および含有成分である citral, geraniol, β -myrcene が大腸発癌の化学予防に使用可能であることを示唆した (Ohnishi et al., 1998)。

9. 新機能獲得腸内菌による大腸発癌初期過程の抑制

腸内菌は (1) 発癌物質の生成, (2) 脱抱合による再活性化, (3) 発癌物質の吸着, (4) 二次胆汁酸の生成, (5) 細胞増殖の調節, (6) 免疫系の賦活などで大腸発癌に影響を与えているといわれている。たとえば, bacitracin, neomycin sulfate, streptomycin sulfate の3剤混合液を前投与したラットの生きた腸内菌数は0.01%以下に減少しているが、このラットに大腸発癌物質である 1,2-dimethylhydrazine を投与すると、生じる ACF 数は、抗生物質を投与していない通常ラットに生じる ACF 数の22.6%であった (木内ら, 1995)。このことから腸内菌が大腸発癌の初期過程に影響を与えていることがわかる。

数種の腸内菌の培養液または培養上清が AOM 投与 Sprague-Dawley ラットの大腸粘膜 ACF 形成に与える影響を調べ、*Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 株と *Clostridium perfringens* GAI0668 株が ACF 形成を抑制し、前者の培養上清による ACF 形成抑制は、発癌に関係がある DNA 付加体 *O*⁶-methylguanine の半減期が短くなるのが原因であることを明らかにした (Arimochi et al., 1997)。

大腸癌を促進する腸内菌の遺伝子を潰し、その菌株を野生株と入れ替えて定着させれば、ある程度発癌を押さえることができるものと考えられる。その遺伝子の一つとして、発癌物質の代謝産物のグルクロン酸抱合体を脱抱合する β -glucuronidase の遺伝子が考えられる。AOM 誘発 ACF 数は、 β -glucuronidase 欠損大腸菌培養液投与では減少しなかったが、ACF 数は糞便の β -glucuronidase 活性と正の相関を示した (Arimochi et al., 1999)。大腸内の大腸菌数は少ないが、 β -glucuronidase 活性は強いので、大腸内の大腸菌をすべて β -glucuronidase 欠損大腸菌と交換できればある程度大腸発癌を予防できるかも知れない。

大腸発癌の予防として発癌の化学予防物質を産生する腸内菌を定着させる方法がある。大腸菌が属する腸内細菌科の菌種 *Erwinia uredovora* の lycopene 生合成遺伝子 *crtE*, *crtB*, および *crtI* を組み込んだプラスミド (Misawa et al., 1990; Misawa and Shimada, 1998) 保有の lycopene 産生大腸菌細胞浮遊液 (lycopene 濃度 97.7 ng/ml) を投与すると、AOM 誘発 ACF 数が減少した。lycopene はトマトの赤い色素であるので、トマトが沢山入った野菜ジュース (lycopene 濃度 51,300 ng/ml 大腸菌細胞浮遊液の

525倍)を経口投与しても同じ程度にAOM誘発ACF数を抑制した。糞便中のlycopene濃度はlycopene産生大腸菌細胞浮遊液投与群では177 ng/g fecesであり、野菜ジュース投与群では10,300 ng/g fecesで前者の58倍で、このことを勘案すると、lycopene産生腸内菌投与は効果的に大腸発癌を予防できる可能性を示唆した(Arimochi et al., 1999)。

さらに、新機能獲得腸内菌を作るために、ヒト lactoferrin の cDNA を大腸菌と *Bacteroides uniformis* のシャトルベクタープラスミド pVAL-1 (Valentine et al., 1988) にクローン化してプラスミド pVLFK を作成し、接合伝達で腸内常在菌の最優勢菌種の一つである *Bacteroides uniformis* の BU1001 株 (Shoemaker et al., 1986) に入れて TCTK101 株とした。ベクタープラスミド pVAL-1 保有 *B. uniformis* である TCTK11 株の培養液をラットに投与すると、水投与群よりも AOM 誘発 ACF 数と 4 個以上の aberrant crypt をもつ大きな ACF 数を増加させた。しかし、ヒト lactoferrin 産生菌である TCTK101 株の培養液投与群では発癌初期過程における ACF 数が TCTK11 株の培養液投与群よりも有意に減少した。このことは腸内菌が産生するヒト lactoferrin がラット大腸の ACF 形成を抑制することを示唆している (Chewonarin et al., 2001)。

結 語

以上、主として nitroarene の研究と癌予防のための研究を行い、腸内常在菌との関係やその利用を考えてきた。我々が lycopene 産生腸内菌の大腸癌予防の可能性の論文 (Arimochi et al., 1999) を発表した翌年の 2000 年 1 月の Science に同じ catotenoid であり vitamin A の前駆体である β -carotene の産生米“golden rice”の論文 (Ye et al., 2000) が発表された。これは vitamin A 不足のために約 25 万人の東南アジアの子供達が毎年失明しているために開発されたものであり、関連する多くの特許が他の企業から放棄されることによって実用化されようとしているものである。したがって、新機能獲得腸内菌としての栄養素産生腸内菌も今後は利用されるようになるものと考えられる。また、interleukin-10 分泌性の *Lactococcus lactis* をヒトの炎症性腸疾患であるクローン病や潰瘍性大腸炎の治療に使える可能性が示された (Steidler et al., 2000)。さらに、2001 年になると、Vogelstein らが lethal toxin を持たない偏性嫌気性菌 *Clostridium novyi* と通常の抗癌剤を併用することによって combination bacteriolytic therapy (COBALT) を開発して治験に行こうとしている (Dang et al., 2001)。また、*Klebsiella pneumoniae* が産生する microcin E492 が一部の human cell line で apoptosis を誘発することが示されている (Hetz et al., 2002)。このように新機能獲得腸内菌やある種の細菌が癌予防・治療に応用されようとしており、この分野の研究にこれからも貢献して行きたいと考えている。

謝 辞

参考文献に引用しました論文の共同研究者、特に筆頭研究者には御協力を感謝申し上げます。なかでも、環境変異原の研究を開始した当初からの共同研究者であり、今回の学術賞の受賞候補者に推薦して下さいました常盤寛博士、長年に渡っての共同研究者でありました故木内武美助教授、片岡佳子博士はじめ現教室員の方々に深謝いたします。また、本学会の初代会長の田島弥太郎先生、第二代会長の杉村隆先生、その後の歴代の会長であられた賀田恒夫先生、松島泰次郎先生、早津彦哉先生、祖父尼俊雄先生、木苗直秀先生、林真先生、さらに、本学会会員の皆様には、いろいろな形で御援助をいただきました。心から感謝申し上げる次第です。多くのタイからの留学生を引き受けるきっかけを作して下さいました松島泰次郎先生とその後共同研究を続けていますタイのチェンマイ大学医学部の Usanee Vinitketkumnun 準教授、文部 (科学) 省・厚生 (労働) 省の研究班の班長、班員の先生方には大変お世話になりました。また、国からはもちろん、各種財団からの研究費の御援助、およびいろいろな分野の方々からの研究材料の御提供なくしては今回の受賞に至ることはなかったものと思っています。心から御礼申し上げます。次第です。

参考文献

- Allison, M. C., A. G. Howatson, C. J. Torrance, F. D. Lee and R. I. Russell (1992) Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs, *N. Engl. J. Med.*, 327, 749-754.
- Ames, B. N., F. D. Lee and W. E. Durston (1973a) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 782-786.
- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki and F. D. Lee (1973b) Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2281-2285.
- Arimochi, H., T. Kinouchi, K. Kataoka, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (1997) Effect of intestinal bacteria on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238, 753-757.
- Arimochi, H., K. Kataoka, T. Kuwahara, H. Nakayama, N. Misawa and Y. Ohnishi (1999) Effects of β -glucuronidase-deficient and lycopene-producing *Escherichia coli* strains on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 262, 322-327.
- Chewonarin, T., T. Kinouchi, K. Kataoka, H. Arimochi, T. Kuwahara, U. Vinitketkumnun and Y. Ohnishi (1999) Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai medicinal plant, on mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in F344 rats, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 591-601.
- Chewonarin, T., T. Kuwahara, H. Arimochi, K. Kataoka, H. Nakayama, D.Y. Yu, H. Tsuda, U. Vinitketkumnun and Y. Ohnishi (2001) Expression of human lactoferrin in *Bacteroides uniformis* and its effect on azoxymethane-induced aberrant crypt

- focus formation in the rat colon, *Anaerobe*, 7, 247-253.
- Chiampanichayakul, S., K. Kataoka, H. Arimochi, S. Thumvijit, T. Kuwahara, H. Nakayama, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (2001) Inhibitory effects of bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) on bacterial mutagenesis and aberrant crypt focus formation in the rat colon, *J. Med. Invest.*, 48, 88-96.
- Dang, L. H., C. Bettgowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (2001) Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 15155-15160.
- Desgranges, C., G. Razaka, E. De Clercq, P. Herdewijn, J. Balzarini, F. Drouillet and H. Bricaud (1986) Effect of (*E*)-5-(2-bromovinyl) uracil on the catabolism and antitumor activity of 5-fluorouracil in rats and leukemic mice, *Cancer Res.*, 46, 1094-1101.
- Dong, Q., T. Kinouchi, K. Kunitomo, K. Kataoka, M. A. Matin, S. Akimoto, N. Komi and Y. Ohnishi (1993) Mutagenicity of the bile of dogs with an experimental model of an anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct, *Carcinogenesis*, 14, 743-747.
- Fujita, Y., K. Wakabayashi, S. Takayama, M. Nagao and T. Sugimura (1987) Induction of oral cavity cancer by 3-diazotyramine, a nitrosated product of tyramine present in foods, *Carcinogenesis*, 8, 527-529.
- Hartman, P. E. (1983) Putative mutagens and carcinogens in foods. I. Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality, *Environ. Mutag.*, 5, 111-121.
- Hayano, S., L. Jang-Ho, K. Furuya, T. Kikuchi, T. Someya, C. Oikawa, Y. Iida, H. Matsushita, T. Kinouchi, Y. Manabe and Y. Ohnishi (1985) Formation of hazardous substances and mutagenicity of PAH produced during the combustion process in a diesel engine, *Atmospheric Environment*, 19, 1009-1015.
- Hetz, C., M. R. Bono, L. F. Barros and R. Lagos (2002) Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2696-2701.
- Higashimoto, M., K. Matano and Y. Ohnishi (1988) Augmenting effect of a nonmutagenic fraction in soy sauce on mutagenicity of 3-diazotyramine produced in the nitrite-treated sauce, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 79, 1284-1292.
- Higashimoto, M., J. Purintrapiban, K. Kataoka, T. Kinouchi, U. Vinitketkumnuen, S. Akimoto, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1993) Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal plant in Thailand, *Mutat. Res.*, 303, 135-142.
- Higashimoto, M., T. Yamamoto, T. Kinouchi, Y. Handa, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1995) Mutagenicity of soy sauce treated with nitrite in the presence of ethanol or alcoholic beverages, *Mutat. Res.*, 345, 155-166.
- Higashimoto, M., T. Yamamoto, T. Kinouchi, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1996) Mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of alcohols, *Mutat. Res.*, 367, 43-49.
- Higashimoto, M., H. Yamato, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1998) Inhibitory effects of citrus fruits on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of ethanol, *Mutat. Res.*, 415, 219-226.
- Higashimoto, M., Y. Akada, M. Sato, T. Kinouchi, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (2000) Inhibitory effects of tea extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid on treatment with nitrite in the presence of ethanol, *Food Chem. Toxicol.*, 38, 7-13.
- Higashimoto, M., Y. Akada, M. Sato, Y. Yamada, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (2001) Inhibitory effects of herbal teas and herb extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid upon treatment with nitrite in the presence of ethanol, *Environ. Mutagen Res.*, 23, 1-7.
- Intiyot, Y., T. Kinouchi, K. Kataoka, H. Arimochi, T. Kuwahara, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (2002) Antimutagenicity of *Murdannia loriformis* in the *Salmonella* mutation assay and its inhibitory effects on azoxymethane-induced DNA methylation and aberrant crypt focus formation in male F344 rats, *J. Med. Invest.*, 49, 25-34.
- Iwagawa, M., T. Maeda, K. Izumi, H. Otsuka, K. Nishifuji, Y. Ohnishi and S. Aoki (1989) Comparative dose-response study on the pulmonary carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene and benzo[*a*]pyrene in F344 rats, *Carcinogenesis*, 10, 1285-1290.
- Kanoh, T., M. Fukuda, I. Mizoguchi, T. Kinouchi, K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1987) Detection of mutagenic compounds in the urine of mice administered pyrene during exposure to NO₂, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 1057-1062.
- Kanoh, T., M. Fukuda, E. Hayami, T. Kinouchi, K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Nitro reaction in mice injected with pyrene during exposure to nitrogen dioxide, *Mutat. Res.*, 245, 1-4.
- Kataoka, K., T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1991) Species differences in metabolic activation and inactivation of 1-nitropyrene in the liver, *Cancer Res.*, 51, 3919-3924.
- Kataoka, K., T. Kinouchi, S. Akimoto and Y. Ohnishi (1995) Bioactivation of cysteine conjugates of 1-nitropyrene oxides by cysteine conjugate β -lyase purified from *Peptostreptococcus magnus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3781-3787.
- 木内武美, 片岡佳子, 東元 稔, J. Purintrapiban, 有持秀喜, S. M. Shaheduzzaman, 秋本 茂, 松本久男, U. Vinitketkumnuen, 大西克成 (1995) 香辛料 caraway のアルキル化剤に対する抑制効果, 環境変異原研究, 17, 99-105.
- Kinouchi, T., Y. Manabe, K. Wakisaka and Y. Ohnishi (1982) Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria, *Microbiol. Immunol.*, 26, 993-1005.
- Kinouchi, T. and Y. Ohnishi (1983) Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 596-604.
- Kinouchi, T., H. Tsutsui and Y. Ohnishi (1986a) Detection of 1-nitropyrene in yakitori (grilled chicken), *Mutat. Res.*, 171, 105-113.
- Kinouchi, T., M. Morotomi, M. Mutai, E. K. Fifer, F. A. Beland and Y. Ohnishi (1986b) Metabolism of 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 77, 356-369.
- Kinouchi, T. and Y. Ohnishi (1986) Metabolic activation of 1-nitropyrene and 1,6-dinitropyrene by nitroreductases from *Bacteroides fragilis* and distribution of nitroreductase activity in rats, *Microbiol. Immunol.*, 30, 979-992.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1987) *In vitro* intestinal microflora-mediated metabolism of biliary metabolites from 1-nitropyrene-treated rats, *Microbiol. Immunol.*, 31, 1145-1159.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji, H. Tsutsui, S. L. Hoare and Y. Ohnishi (1988) Mutagenicity and nitropyrene concentration of indoor air particulates exhausted from a kerosene heater, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 79, 32-41.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Biliary excretion of glutathione conjugates of 4,5-epoxy-4,5-dihydro-1-nitropyrene and 9,10-epoxy-9,10-dihydro-1-nitropyrene in rats administered 1-nitropyrene orally and their further metabolism in the intestinal tract, *Carcinogenesis*, 11, 1381-1387.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyamishi, S. Akimoto and Y. Ohnishi (1992) Role of intestinal microflora in metabolism of glutathione

- conjugates of 1-nitropyrene 4,5-oxide and 1-nitropyrene 9,10-oxide, *Tohoku J. Exp. Med.*, 168, 119-122.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyanishi, S. Akimoto and Y. Ohnishi (1993) Biological activities of the intestinal microflora in mice treated with antibiotics or untreated and the effects of the microflora on absorption and metabolic activation of orally administered glutathione conjugates of K-region epoxides of 1-nitropyrene, *Carcinogenesis*, 14, 869-874.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyanishi, P. C. Howard, T. Kanoh and Y. Ohnishi (1994) Effect of nitrogen-dioxide exposure on formation of nitrated metabolites in animals treated with polycyclic aromatic hydrocarbons, In: S. Sumino, S. Sato, H. P. Lee, C. N. Ong and K. Saijoh (Eds), *Environmental and Occupational Chemical Hazards* (2), International Center for Medical Research, Kobe University School of Medicine, Kobe, pp. 285-290.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, R. B. Shan, H. Nakayama, M. Uejima, K. Shimono, T. Kuwahara, S. Akimoto, I. Hiraoka and Y. Ohnishi (1998) Culture supernatants of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* repress ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug by suppressing unbalanced growth of aerobic bacteria and lipid peroxidation, *Microbiol. Immunol.*, 42, 347-355.
- Machida, H., S. Sakata, A. Kuninaka and H. Yoshino (1981) Antiherpesviral and anticellular effects of 1- β -D-arabinofuranosyl-E-5-(2-halogenovinyl) uracils, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 20, 47-52.
- Machida, H. and S. Sakata (1984) In vitro and in vivo antiviral activity of 1- β -D-arabinofuranosyl-E-(2-bromovinyl) uracil (BV-araU) and related compounds, *Antiviral Res.*, 4, 135-141.
- Machida, H. (1986) Comparison of susceptibilities of varicella-zoster virus and herpes simplex viruses to nucleoside analogs, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29, 524-526.
- Maeda, T., K. Izumi, H. Otsuka, Y. Manabe, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1986) Induction of squamous cell carcinoma in the rat lung by 1,6-dinitropyrene, *J. Natl. Cancer Inst.*, 76, 693-701.
- Magee, P. N. and J. M. Barnes (1967) Carcinogenic nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.*, 10, 163-246.
- Manabe, Y., T. Kinouchi, K. Wakisaka, I. Tahara and Y. Ohnishi (1984) Mutagenic 1-nitropyrene in wastewater from oil-water separating tanks of gasoline stations and in used crankcase oil, *Environ. Mutagen.*, 6, 669-681.
- Manabe, Y., T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1985) Identification and quantification of highly mutagenic nitroacetoxypyrenes and nitrohydroxypyrenes in diesel-exhaust particles, *Mutat. Res.*, 158, 3-18.
- Marnett, L. J. (1992) Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer, *Cancer Res.*, 52, 5575-5589.
- Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura and K. Harashima (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 172, 6704-6712.
- Misawa, N. and H. Shimada (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts, *J. Biotechnol.*, 59, 169-181.
- Miyanishi, K., T. Kinouchi, K. Kataoka, T. Kanoh and Y. Ohnishi (1996) *In vivo* formation of mutagens by intraperitoneal administration of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals during exposure to nitrogen dioxide, *Carcinogenesis*, 17, 1483-1490.
- Nakayama, H., T. Kinouchi, K. Kataoka, S. Akimoto, Y. Matsuda and Y. Ohnishi (1997) Intestinal anaerobic bacteria hydrolyse sorivudine, producing the high blood concentration of 5-(E)-(2-bromovinyl) uracil that increases the level and toxicity of 5-fluorouracil, *Pharmacogenetics*, 7, 35-43.
- Ochiai, M., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1984) Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite, *Gann*, 75, 1-3.
- 大西克成, 木内武美 (1983) ディーゼル排出ガスの変異原性, トシキコロジフォーラム, 6, 335-355.
- 大西克成 (1985) 環境中のニトロピレン類の検出および代謝に関する研究, 環境変異原研究, 7, 1-10.
- 大西克成 (1997) 宿主・細菌・薬物の相互関係, 総合臨牀, 46, 2459-2462.
- Ohnishi, Y., K. Kachi, K. Sato, I. Tahara, H. Takeyoshi and H. Tokiwa (1980) Detection of mutagenic activity in automobile exhaust, *Mutat. Res.*, 77, 229-240.
- Ohnishi, Y., H. Okazaki, K. Wakisaka, T. Kinouchi, T. Kikuchi and K. Furuya (1982) Mutagenicity of particulates in small engine exhaust, *Mutat. Res.*, 103, 251-256.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, Y. Manabe and K. Wakisaka (1983) Environmental aromatic nitro compounds and their bacterial detoxification, In: M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff and S. Nesnow (Eds), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*, Plenum Publishing Corporation, New York and London, pp. 527-539.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, Y. Manabe, H. Tsutsui, H. Otsuka, H. Tokiwa and T. Otofujii (1985) Nitro compounds in environmental mixtures and foods, In: M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss and S. Nesnow (Eds), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV*, Plenum Publishing Corporation, New York and London, pp. 195-204.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, H. Tsutsui, M. Uejima and K. Nishifuji (1986a) Mutagenic nitropyrenes in foods, In: Y. Hayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Takayama, L. Tomatis, L. W. Wattenberg and G. N. Wogan (Eds), *Diet, Nutrition and Cancer, Proceedings of the 16th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo/VNU Science Press BV, Utrecht, The Netherlands, pp. 107-118.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, E. K. Fifer and F. A. Beland (1986b) Metabolism of mutagenic 1-nitropyrene in rats, In: N. Ishinishi, A. Koizumi, R. O. McClellan and W. Stober (Eds), *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust, Proceedings of the Satellite Symposium of the IV International Congress of Toxicology*, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 171-183.
- Ohnishi, Y. (1988) Mutagens and their biological effects, In: O. Hirao and R. K. Peefley (Eds), *Present and Future Automotive Fuels: Performance and Exhaust Clarification*, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 477-485.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, K. Miyanishi, T. Kanoh and M. Fukuda (1990) Metabolism of 1-nitropyrene oxides and effect of nitrogen dioxide on arene activation, In: P. C. Howard, S. S. Hecht and F. A. Beland (Eds), *Nitroarenes: Occurrence, Metabolism, and Biological Impact*, Plenum Press, New York, pp. 85-93.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, E. K. Fifer, F. A. Beland, T. Kanoh, M. Fukuda and I. Mizoguchi (1991) Metabolic formation and inactivation of 1-nitropyrene oxides and the effect of pyrene administration during nitrogen dioxide exposure on the formation of 1-nitropyrene metabolites, In: M. Cooke, K. Loening and J. Merritt (Eds), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Measurements, Means, and Metabolism*, Battelle Press, Columbus, Ohio,

- pp. 641-655.
- Ohnishi, Y., K. Kataoka, T. Kinouchi, H. Arimochi, R. Yoshida, T. Kuwahara, R. Suaeyun, T. Chewonarin, Y. Intiyot and U. Vinitketkumnuen (1998) Inhibitory effects of medicinal plants and their components on bacterial mutagenesis and the initiation stage of colon carcinogenesis, In: M. Moraes, R. Brentani and R. Bevilacqua (Eds), 17th International Cancer Congress, Monduzzi Editore, Bologna, pp. 275-279.
- Pitts Jr., J. N., K. A. van Cauwenverghe, D. Grosjean, J. P. Schmid, D. R. Fitz, W. L. Belser Jr., G. P. Knudson and P. M. Hynds (1978) Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives, *Science*, 202, 515-519.
- Shan, R. B., T. Kinouchi, K. Kataoka, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (1998) Protective effects of a culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* and antioxidants on ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug, *Microbiol. Immunol.*, 42, 745-753.
- Shoemaker, N. B., C. Getty, E. P. Guthrie and A. A. Salyers (1986) Regions in *Bacteroides* plasmids pBFTM10 and pB8-51 that allow *Escherichia coli*-*Bacteroides* shuttle vectors to be mobilized by *IncP* plasmids and by a conjugative *Bacteroides* tetracycline resistance element, *J. Bacteriol.*, 166, 959-965.
- Steidler, L., W. Hans, L. Schotte, S. Neirynck, F. Obermeier, W. Falk, W. Fiers and E. Remaut (2000) *Science*, 289, 1352-1355.
- Suaeyun, R., T. Kinouchi, H. Arimochi, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (1997) Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon, *Carcinogenesis*, 18, 949-955.
- Swinbanks, D. (1994) Deaths bring clinical trials under scrutiny in Japan, *Nature* (London), 369, 697.
- Tokiwa, H., K. Morita, H. Takeyoshi, K. Takahashi and Y. Ohnishi (1977) Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants, *Mutat. Res.*, 48, 237-248.
- Tokiwa, H., S. Kitamori, K. Takahashi and Y. Ohnishi (1980) Mutagenic and chemical assay of extracts of airborne particulates, *Mutat. Res.*, 77, 99-108.
- Tokiwa, H., R. Nakagawa, K. Morita and Y. Ohnishi (1981a) Mutagenicity of nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide, *Mutat. Res.*, 85, 195-205.
- Tokiwa, H., R. Nakagawa and Y. Ohnishi (1981b) Mutagenic assay of aromatic nitro compounds with *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 91, 321-325.
- Tokiwa, H., T. Otofujii, K. Horikawa, S. Kitamori, H. Otsuka, Y. Manabe, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1984) 1,6-Dinitropyrene: Mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in BALB/c mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, 73, 1359-1363.
- Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Critical Rev. Toxicol.*, 17, 23-60.
- Uejima, M., T. Kinouchi, K. Kataoka, I. Hiraoka and Y. Ohnishi (1996) Role of intestinal bacteria in ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug, *Microbiol. Immunol.*, 40, 553-560.
- Valentine, P. J., N. B. Shoemaker and A. A. Salyers (1988) Mobilization of *Bacteroides* plasmid by *Bacteroides* conjugal elements, *J. Bacteriol.*, 170, 1319-1324.
- Wakabayashi, K., M. Ochiai, H. Saito, M. Tsuda, Y. Suwa, M. Nagao and T. Sugimura (1983) Presence of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, a precursor of a mutagenic nitroso compound, in soy sauce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2912-2916.
- Weiss, H. A. and D. Forman (1996) Aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs and protection from colorectal cancer: a review of the epidemiological evidence, *Scand. J. Gastroenterol.*, 31 (Suppl. 220), 137-141.
- Ye, X., S. Al-Babili, A. Kloeti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer and I. Potrykus (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm, *Science*, 287, 303-305.

フリーラジカルを経由する環境変異・発がん物質の生成と発現に関する研究

平本 一幸*

東京薬科大学薬学部 〒192-0392 八王子市堀之内 1432-1

Formation and development of mutagenic and/or carcinogenic compounds through free radical mechanisms

Kazuyuki Hiramoto

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

Summary

Free radicals including carbon-centered radicals, oxygen-centered radicals and pyrazine cation radicals were found to be involved in the DNA damage and the formation of mutagens in foods. Carbon-centered radicals generated from aryldiazonium salts directly modified DNA bases and induced DNA strand breaks.

The DNA damages by the carbon-centered radicals were prevented by ethanol and phenolic antioxidants. Reactive oxygen species generated from furanone and pyranone reductones produced by Maillard reaction in many foods or from hydroxyhydroquinone in roasted coffee beans induced DNA strand cleavage under the atmospheric conditions. However, dietary supplementation with these reductones did not cause DNA damage in animals. Pyrazine cation radicals produced in the Maillard reaction participated in the formation of heterocyclic amine mutagens. Decreasing pyrazine cation radicals by controlling sugar content or scavenging pyrazine cation radicals with ascorbate or erythorbate were effective in preventing the mutagenicity of cooked hamburger.

Keywords : carbon-centered radical, reactive oxygen species, pyrazine cation radical, Maillard reaction, DNA damage, heterocyclic amine mutagen

緒 言

本研究では電子スピン共鳴 (ESR) 法を駆使することによって、フリーラジカルが環境変異・発がん物質の生成と発現に深く関与していることを明らかにした。環境変異・発がん物質がDNAに損傷を与える過程で、炭素中心ラジカル、酸素中心ラジカル (活性酸素種) を発生し、これらフリーラジカルがDNAに損傷をきたすメカニズムが明らかになった。また、ピラチンカチオンラジ

カルの生成が食物中の加熱変異・発がん物質の生成に関与していることが明らかになった。さらにこれらフリーラジカルを消去することにより、変異・発がん物質のDNA損傷を阻止できること、および変異・発がん物質の生成を低減できることが明らかになった。以下に具体的な研究結果を紹介するが、多くの部分はすでに本誌に紹介されている (菊川ら, 1996; 菊川ら, 2000)。

1. 炭素中心ラジカルを経由する DNA 修飾とその阻止

環境、食物、医薬品に由来するアリルジアゾニウム塩などのアゾ化合物が炭素中心ラジカルを発生することを

* E-mail : Hiramoto@ps.toyaku.ac.jp

受付: 2002年6月11日 受理: 2002年6月11日

日本環境変異原学会

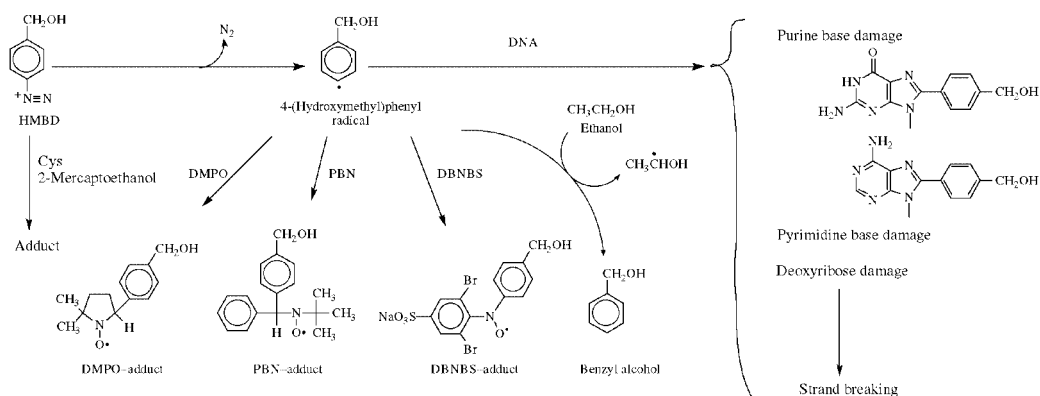


Fig. 1 Reaction of DNA with HMBD through generation of carbon-centered radical

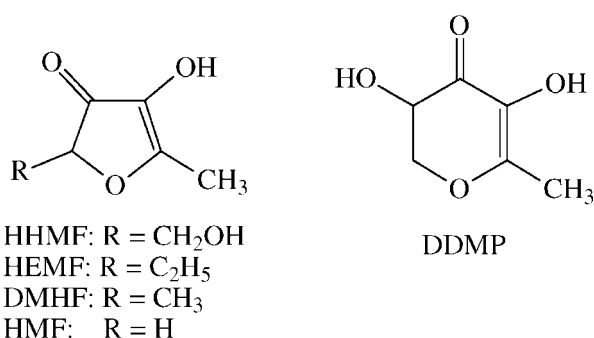


Fig. 2 Structures of fragrant furanone and pyranone derivatives

ESR法によりつきとめ、これらが酸素中心ラジカルを介することなく直接DNAのグアニン、アデニン塩基に反応し、さらにDNA鎖切断をひき起すことをつきとめた。くん製品に含まれるフェノールは胃内の酸性条件で亜硝酸と反応して変異原性をもつ

-およびo-ジアゾキノン(p-, o-DQ)を生成する(Kikugawa and Kato, 1988)ことがわかっていたが、p-, o-DQはスクレオシドレベルでアデニン、グアニン塩基の8位の炭素-炭素結合して付加体を与え、DNAレベルで鎖切断を引き起こした(Kikugawa et al., 1992; Kato et al., 1992)。この反応は活性酸素の消去酵素では阻害されず、水素供与体のエタノールやブチルヒドロキシアニソール(BHA)などのフェノール性抗酸化剤で阻害され、ESRスピントラップ剤のDMPO添加によっても阻害され、DMPO-炭素ラジカルの特徴的なESRシグナルを与えた。

西洋きのこ *Agaricus bisporus* には発がん性をもつヒドロキシメチルベンゼンジアゾニウム塩(HMBD)が存在することがわかっていた(Toth et al., 1981)が、この化合物は化学的に不安定で、スピントラップ剤としてDMPO, PBNおよびDBNBSを用いて調べると、炭素中心ラジカルが生成していることが明らかになった。水素供与体のエタノールを添加すると、ベンジルアルコールを与え、炭素中心ラジカルのはドロキシメチルフェニル

ラジカルを生成していることがわかった。これらはスクレオシドレベルおよびDNAレベルでの反応でアデニンおよびグアニンの8位の炭素に炭素-炭素結合で付加することがわかった。さらにこれらジアゾニウム塩はDNA鎖切断を誘発し、この切断は活性酸素の消去酵素では阻害されなかった。この反応はエタノールやフェノール性抗酸化剤の添加で効率的に阻害された(Hiramoto et al., 1995a, 1995b) (Fig. 1)。HMBDはマウスに投与すると小核誘発能を示し、ビタミンEの欠乏によって増強されたことから、in vivoでも抗酸化剤がこの反応を阻止しうることが示された(加藤ら, 1995)。またマウスへの投与により肝臓DNAに付加体が生じていることがわかった(Hiramoto et al., 1998b)。

ラジカルイニシエーターのアゾ化合物AAPHも炭素ラジカルを生成し(Hiramoto et al., 1993a)、変異原性を示した(加藤ら, 1994)。抗ウイルス作用をもつジアゾウラシル(Hiramoto et al., 1994b)、2-アミノフルオレンの亜硝酸処理により生成するフルオレンジアゾニウム塩(Hiramoto et al., 1994a)も炭素中心ラジカル経由のDNA鎖切断作用を示した。醤油のチラミンと亜硝酸の反応によって生成するジアゾチラミン、医薬品のバメタンやエチレフィリンと亜硝酸の反応によって生じるジアゾバメタン、ジアゾエチレフィリンなども変異原性を有するが、炭素中心ラジカル経由の反応によるものと考えられる。炭素中心ラジカルはエタノールやフェノール性抗酸化剤で消去されることも明らかになった。

2. 酸素中心ラジカル(活性酸素種)を経由するDNA鎖切断

糖/アミノ酸の固相(Hiramoto et al., 1993b)および水相(Hiramoto et al., 1994c)の加熱メイラード反応物、醤油(Hiramoto et al. 1996c)およびコーヒー(Kato et al., 1994)に大気下の反応条件でDNA鎖切断作用があることがわかり、その活性成分はレダクトンによる活性酸素種の発生が原因であることをつきとめ、その意義につ

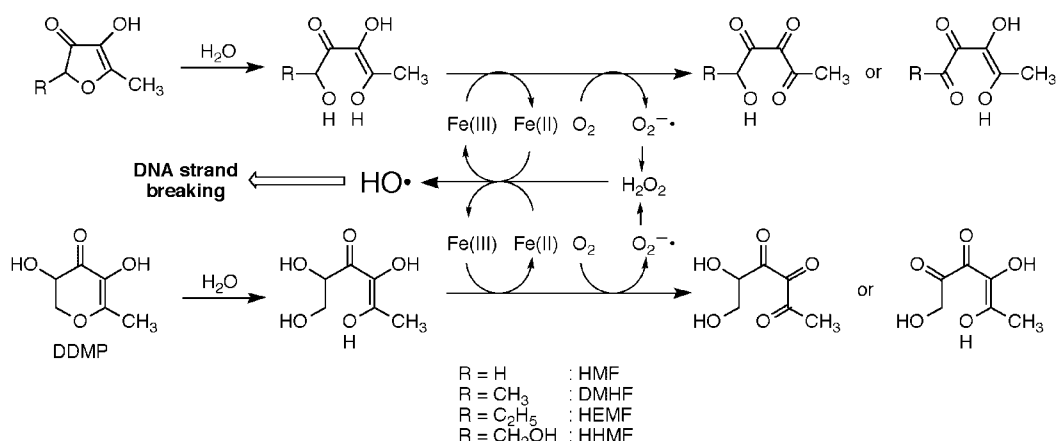


Fig. 3 Possible mechanisms for DNA strand breaking of furanone and pyranone derivatives through reactive oxygen species

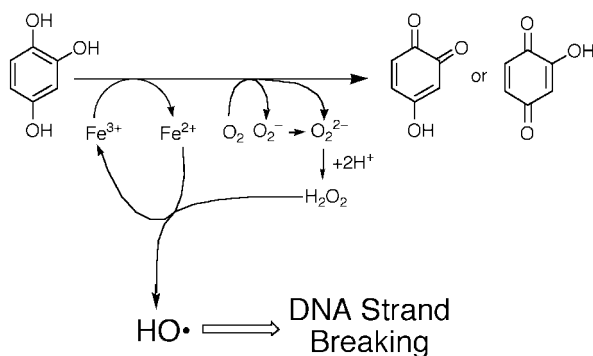


Fig. 4 Generation of reactive oxygen species from HHQ

いて考察を加えた。

1) メイラード 反応生成物の DNA 鎖切断作用

ブドウ糖を始めとする六単糖とグリシンの混合水溶液の加熱により生成した DNA 鎖切断作用物質を HPLC により単離した結果、Fig. 2 に示す HHMF (Hiramoto et al., 1995c) および DDMP (Hiramoto et al., 1997) であることがわかった。醤油にも類似の DNA 鎖切断作用をもつ成分 HMF (Hiramoto et al., 1996c), DMHF (Hiramoto et al., 1996a) および HEMF (Li et al., 1998) が見い出された。これら成分は食品の香成分として知られており、これら成分の量によって醤油などの品質管理がなされている (Kikugawa et al., 1999a) これらの成分はいずれも Fe(III) イオンを還元するレダクトンで、弱酸性のメイラード反応液や醤油の中では安定であるが、中性水溶液中で加水分解を受けることがわかり、その際ヒドロキシルラジカルを生成することが DMPO をスピントラップ剤として用いた ESR で確認された。DNA 鎖切断作用はスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種によることが、それらの消去酵素の添加で阻害されることからわかった。これら成

分による DNA 鎖切断反応は Fig. 3 のように推定された。これら成分は、生理条件下のメイラード反応でも生成し (Hiramoto et al., 1998a), マウスの経口投与実験でも速やかに吸収され、小核を誘発した (Hiramoto et al., 1998c)。これらの成分による DNA 鎖切断反応はエタノールや BHA などのフェノール性抗酸化剤、金属キレート剤により阻害された。

2) コーヒー成分の DNA 鎖切断作用

コーヒーに含まれる DNA 鎖切断作用物質を溶媒抽出および弱酸性条件下での HPLC によって単離した結果、強い還元性をもつヒドロキシヒドロキノン (1,2,4-ベンゼントリオール) (HHQ) であることがわかった (Hiramoto et al., 1998d)。HHQ はベンゼンの代謝物として知られており、すでに活性酸素種を生成して DNA 鎖を切断することが報告されていた (Kawanishi et al., 1989)。コーヒーには他の食品に比較して過酸化水素が多いことがわかっており、その発生原はコーヒー酸などが考えられていたが、HHQ であることがつきとめられた。HHQ は他のポリフェノール類に比較して多量の活性酸素種を生成し、大気下の酸性条件では安定であるが、中性条件ではスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルを発生する。HHQ は中性条件下で 0.5-0.6 モルの過酸化水素を発生し、スピントラップ剤 DMPO を用いた ESR によってヒドロキシルラジカルの生成が確認された。HHQ の自動酸化はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) によって抑えられたことから、発生したスーパーオキシドが触媒的に自動酸化を促進していることがわかった (Hiramoto et al., 2000) (Fig. 4)。HHQ による DNA 鎖切断反応もエタノール、金属キレート剤によって抑えられる。

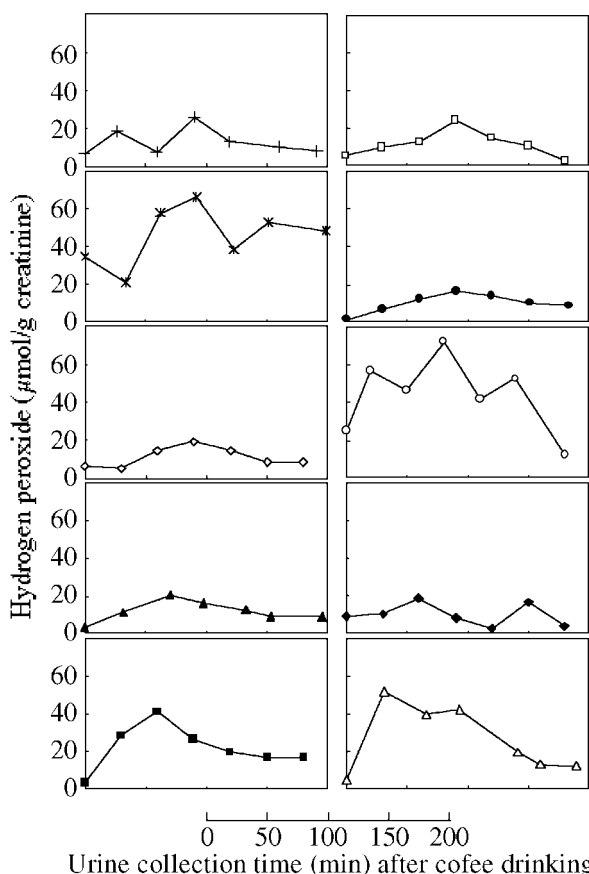


Fig. 5 Urinary hydrogen peroxide levels after drinking of a cup of canned coffee

3) レダクトンが示すプロオキシダント作用の生理的意義

メイラード反応生成物フラノンおよびピラノン類およびコーヒー成分のHHQは還元性をもつレダクトンであり、相手により還元性を示すとともに、前述のように大気下では活性酸素種を発生してDNA切断のような酸化ストレスを与えるプロオキシダントとして働く。フェントン反応によって発生したヒドロキシルラジカルによるDNA鎖切断作用に対する各種ポリフェノール類の作用を検討した結果、多くのものに阻害作用が認められたが、茶葉に含まれるエピガロカテキンガレート (EGCG) には切断促進作用が認められた (Hiramoto et al., 1996b)。HHQと同様に種々のポリフェノール類は活性酸素種を産生するプロオキシダント作用が報告された (Long et al., 2000 ; Yang et al., 2000)。また、多くのポリフェノール類に活性酸素種を経由するDNA傷害作用が報告されている。

しかし、一方で、醤油の成分HEMFはin vitroでFe (III) イオンによる赤血球膜やリポタンパク質の酸化を阻害する抗酸化作用を示す (Ando et al., 2000)。この局面では、DNA鎖切断にみられる酸化性とは逆の作用を示していることになる。同じ大気下の試験管内の反応で

も、作用する場の違いによって全く逆の抗酸化作用とプロオキシダント作用を示すことがわかった。

これらのレダクトンは生体内ではどのような作用を示すのかを検討した。高濃度のHHQをラットに経口的に投与すると、酸素分圧の比較的高い肺、心臓に脂質過酸化が誘導されたが、肝の脂質過酸化は誘導されなかった。また、いずれの臓器の8-ヒドロキシデオキシグアノシンも昂進することなく、これらレダクトン由来の酸素ストレスによるDNA傷害は認められなかった (Yasuhara et al., 2002)。また、高濃度のDMHFとHHQをマウスに投与した場合、肺の脂質過酸化は昂進したが、他の臓器の脂質過酸化は昂進しなかった。しかし、DMHF、HHQともに化学物質で誘導されるI型およびIV型アレルギー反応の増悪が認められた (Mi et al., 2001)。これらレダクトンの摂取は生体内では、酸素分圧の比較的高い肺などでは脂質過酸化を引き起こし、アレルギー反応の増悪を引き起こす可能性があることを示しているが、DNAの酸化的損傷にはつながらないことを示している。酸素分圧の高い組織でも生じる酸化ストレスは脂質過酸化を誘導することによってDNA傷害が阻止され、酸素分圧が低い組織では酸化ストレスの程度が低いと考えられる。

HHQを含むコーヒーの飲用によって尿中の過酸化水素の排せつが上昇するというシンガポールの実験が報告された (Long and Halliwell, 2000)。筆者らもコーヒーの飲用による尿中過酸化水素の上昇を日本人の健常者について調べた (Hiramoto et al., 2002)。その結果、10人の被験者ともに一杯のコーヒー飲用直後の尿に過酸化水素が排せつされ (Fig. 5)、尿中に排せつされたHHQが過酸化水素を発生しているらしいことがわかった。尿中に排せつされた過酸化水素量は飲用したコーヒーが発生する過酸化水素量の1/10以下であり、大部分のHHQは代謝されたか、体内に留まり酸素分圧の高い組織で酸素ストレスを与えているか、またはSOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼにより消去されていると考えられる。コーヒーの飲用が体内でDNAの傷害に寄与している可能性は少ないが、脂質の過酸化、アレルギー反応へ寄与している可能性はある。レダクトンが与える生体への影響はさらなる検討が必要と考えられる。

3. ピラチンカチオンラジカルを経由するヘテロサイクリックアミン変異原の生成とその低減

加熱調理や食品の加工によって生成するMeIQxなどのイミダゾキノキサリン型の変異・発がん性ヘテロサイクリックアミンの生成メカニズムにピラチンカチオンラジカルが関与していること、およびこのラジカルを消去することにより変異・発がん性ヘテロサイクリックアミン生成が低減できることが明らかになった。

変異・発がん性ヘテロサイクリックアミンは食肉やモ

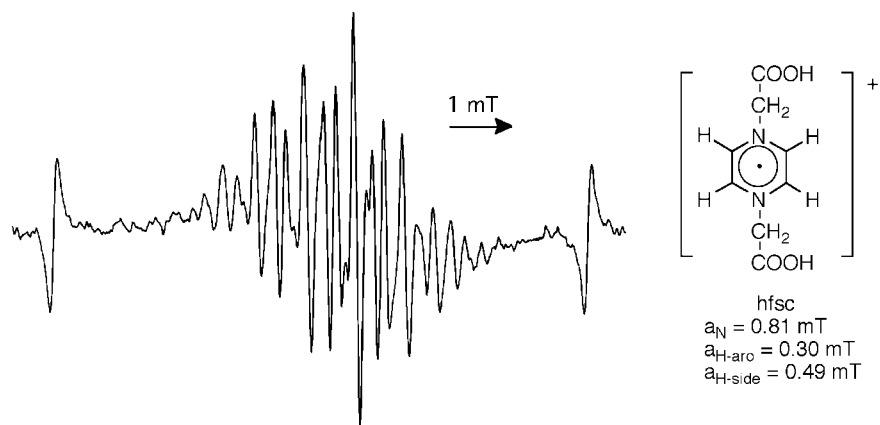


Fig. 6 ESR signal and structure of pyrazine cation radical

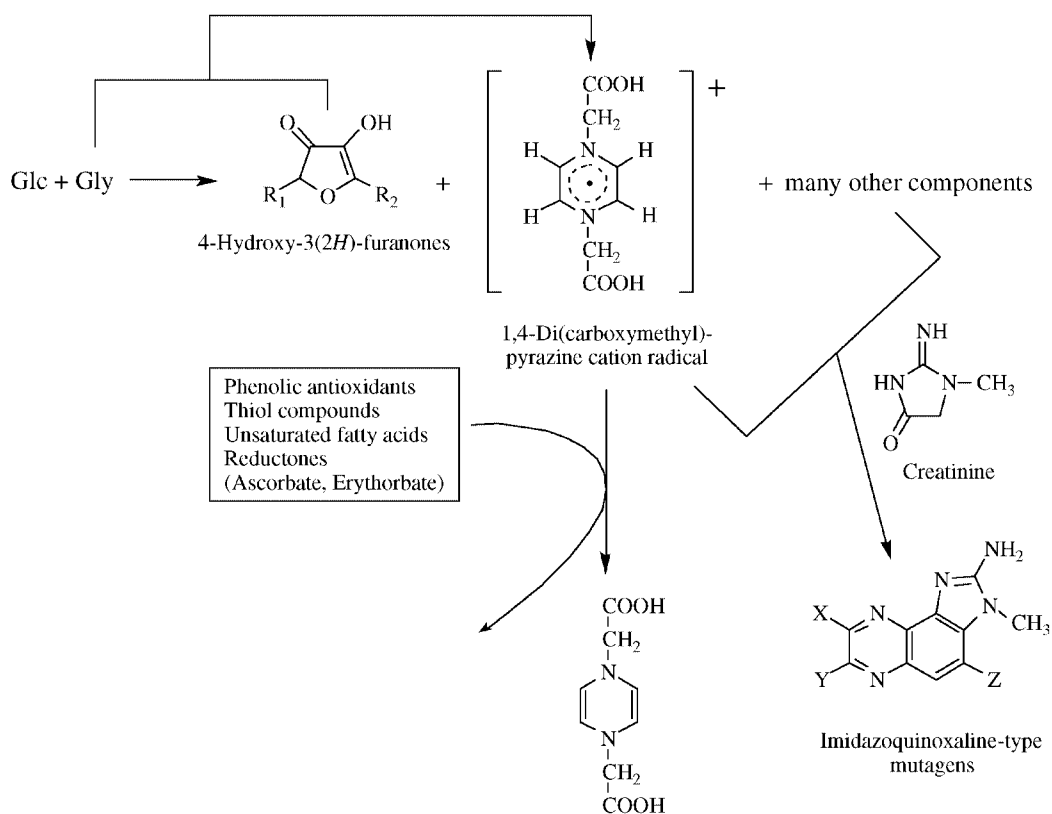


Fig. 7 Possible pathway for the generation of pyrazine cation radical and the mutagen formation in the reaction of glucose/glycine/creatinine

デル系のブドウ糖／グリシン／クレアチニン混合物の加熱によって生成し、ブドウ糖／グリシンから生成するメイラード反応物にクレアチニンが反応することによって生成するメカニズムが提唱されていた。これら変異原は、いわゆる“こげ目”にできるのではなく、加熱加工した肉質に生成する。加熱の条件によってその生成量が異なり、水分量が最も大きく関与している。同一の加熱条件でも水分のロスに伴う“焼く”方法が変異原が生成しやすく、“煮る”方法ではできない (Kikugawa and Kato,

1987) ことがわかっている。

ブドウ糖／グリシンのメイラード反応によってピラチンカチオンラジカル (Fig. 6) が生成することがわかっていた (Namiki and Hayashi, 1975) が、筆者らはこのラジカルに目を付け、ESR法を用いてブドウ糖／アミノ酸／クレアチニンのモデル系における加熱変異・発がん物質ヘテロサイクリックアミンの生成にピラチンカチオンラジカルが関与していることを明らかにした。ブドウ糖／アミノ酸の溶液の加熱反応で生成するピラチンカチ

オンラジカルの ESR シグナル強度とブドウ糖／アミノ酸／クレアチニン溶液から生成する変異原性の強さはブドウ糖とアミノ酸のモル比が 1 : 2 のとき最大になり、ピラチンカチオンラジカルの生成と変異原性物質の生成ともにブドウ糖の量依存性が認められ、ピラチンカチオンラジカルが変異原物質の生成に関与することが示唆された (Kikugawa et al., 1999b)。

ピラチンカチオンラジカルの生成と変異原物質の生成との関連は反応系に両者の生成に共通して影響を与える物質の添加によって確認された。ポリフェノール類をブドウ糖／アミノ酸／クレアチニン溶液へ添加することによって変異原物質の生成が抑えられることがわかっていった (Weisburger et al., 1994) が、筆者らは、ポリフェノール類はピラチンカチオンラジカルを消去するとともに変異原物質の生成を抑えることを見出し、ピラチンカチオンラジカルの生成と変異原物質の生成に関連していることを確かめた (Kato et al., 1996 ; Kikugawa, 1999)。反応系にエタノールを添加してもピラチンカチオンラジカルも変異原物質の生成も抑制されず、システインなどのチオール化合物、アスコルビン酸、エリソルビン酸などのレダクトンの添加によってピラチンカチオンラジカルの生成も変異原物質の生成も抑えられた。メイラード反応で生成するレダクトンの芳香性フラノン類の添加はピラチンカチオンラジカルの生成を増大させ、変異原物質の生成は抑制しなかった。このことは、メイラード反応においてフラノン類はピラチンカチオンラジカルの前駆体になっていることを示唆している (Kikugawa et al., 2000a,b) (Fig. 7)。

モデル系においてブドウ糖の添加量によってピラチンカチオンラジカルと変異原の生成量が左右されたので、調理したハンバーグの変異原生成に適用を試みた。もともと 0.07% の還元糖を含んでいる牛ひき肉を用いてハンバーグを調理する際に異なる量の還元糖を添加してハンバーグの変異原性を調べた。その結果、終濃度 0.3% の還元糖濃度では変異原性は 2 倍に増強され、終濃度約 0.7% 以上では変異原性は約 1 / 2 に減少した (Kato et al., 2000b)。牛ひき肉に 33% の赤ワインまたは白ワインを添加すると糖の量は 0.3% となり、調理したハンバーグの変異原性は 2 倍に上昇した。ハンバーグの調理時に 33% のタマネギを加えると還元糖濃度は 0.9% になり、変異原性は 1 / 2 に低下した (Kato et al., 1998)。このように、ハンバーグを調理する際には糖濃度が微妙に変異原生成に影響を与え、0.7% 以上の糖濃度が変異原生成を低減するのに有効であることがわかった。日本の家庭で行われる多量のタマネギ添加のハンバーグ調理法は変異原生成を低減する方法といえる。

モデル系で変異原物質の生成を抑えた化合物のうち、ポリフェノールの EGCG を多量に含む茶葉抽出液でかつお節の変異原低減に応用を試みた。若干の効果は認め

られたものの、実用的な濃度ではほとんど効果がなかった (Kato and Kikugawa, 1999)。EGCG、システイン、アスコルビン酸、エリソルビン酸をハンバーグの変異原低減に試みた。EGCG、システインは高濃度用いれば、変異原低減効果はあるが、0.33% 程度の実用的に用いられる濃度では効果がなかった。アスコルビン酸、エリソルビン酸は実用的濃度で変異原性を 1 / 2 にまで低減した (Kato et al., 2000a)。以上のことから、食肉の加熱調理において生成する変異原の低減には、メイラード反応におけるピラチンカチオンラジカルの生成を抑制する糖濃度の調節、アスコルビン酸、エリソルビン酸の添加が実的に用いられうることが明らかになった。

結 語

本研究はフリーラジカルが環境変異・発がん物質の生成と発現に深く関与していることを明らかにしたものである。環境変異・発がん物質が DNA に損傷を与える過程で、炭素中心ラジカル、酸素中心ラジカルを発生し、これらフリーラジカルが DNA に損傷をきたすメカニズムが明らかになった。また、ピラチンカチオンラジカルの生成が食物中の加熱変異・発がん物質の生成に関与していることが明らかになった。さらにこれらフリーラジカルを消去することにより、変異・発がん物質の DNA 損傷を阻止できること、および変異・発がん物質の生成を低減できることが明らかになった。ESR 法による環境変異・発がん物質とフリーラジカルの関わり方の研究は、対象をさらに広げることにより、多くのフリーラジカルの消去が環境変異原発現の低減につながる研究に発展することが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、東京薬科大学薬学部 菊川清見教授、加藤哲太助教授ならびに第一衛生化学教室の諸氏に多大なご指導とご協力をいただいた。ここに深甚なる謝意を表します。

参 考 文 献

- Ando, K., K. Ogawa, X. Li and K. Kikugawa (2000) Inhibition of iron ion-induced oxidative damage of erythrocyte membranes and low density lipoprotein by a Maillard product, 4-hydroxy-2 (or 5) - ethyl-5 (or 2) methyl-3 (2H) -furanone (HEMF), Biol. Pharm. Bull., 23, 689-694.
- Hiramoto, K., H. Johkoh, K. Sako and K. Kikugawa (1993a) DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH), Free Rad. Res. Commun., 19, 323-332.
- Hiramoto, K., T. Kato and K. Kikugawa (1993b) Generation of DNA-breaking activity in the Maillard reaction of glucose-amino acid mixtures in a solid system, Mutat. Res., 285, 191-198.
- Hiramoto, K., M. Inoue, K. Maeda, T. Kato and K. Kikugawa (1994a) Generation of a carbon-centered radical with DNA-breaking activity from mutagenic fluorene-2-diazonium salt, Jpn. J. Toxicol.

- Environ. Health, 40, 413-421.
- Hiramoto, K., T. Kato and K. Kikugawa (1994b) Mechanisms of the DNA breaking activity of mutagenic 5-diazouracil, *Mutat. Res.*, 306, 153-163.
- Hiramoto, K., K. Kido and K. Kikugawa (1994c) DNA breaking by Maillard products of glucose-amino acid mixtures formed in an aqueous system, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 689-694.
- Hiramoto, K., M. Kaku, T. Kato and K. Kikugawa (1995a) DNA strand breaking by the carbon-centered radical generated from 4-(hydroxymethyl) benzenediazonium salt, a carcinogen in mushroom *Agaricus bisporus*, *Chem.-Biol. Interact.*, 94, 21-36.
- Hiramoto, K., M. Kaku, A. Sueyoshi, M. Fujise and K. Kikugawa (1995b) DNA base and deoxyribose modification of the carbon-centered radical generated from 4-(hydroxymethyl) benzenediazonium salt, a carcinogen in mushroom, *Chem. Res. Toxicol.*, 8, 356-362.
- Hiramoto, K., K. Sekiguchi, R. Aso-o, K. Ayuha, H. Ni-iyama, T., Kato and K. Kikugawa (1995c) DNA strand breaks induced through active oxygen radicals by fragrant component 4-hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-3 (2H) -furanone in Maillard reaction of hexose/amino acid, *Fd Chem. Toxicol.*, 33, 803-814.
- Hiramoto, K., R. Aso-o, H. Ni-iyama, S. Hikage, T. Kato and K. Kikugawa (1996a) DNA strand break by 2,4-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H) -furanone, a fragrant compound in various foodstuffs, *Mutat. Res.*, 359, 17-24.
- Hiramoto, K., N. Ojima, K. Sako and K. Kikugawa (1996b) Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical, *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 558-563.
- Hiramoto, K., K. Sekiguchi, K. Ayuha, R. Aso-o, N. Moriya, T. Kato and K. Kikugawa (1996c) DNA breaking activity and mutagenicity of soy sauce: Characterization of the active components and identification of 4-hydroxy-5-methyl-3 (2H) -furanone, *Mutat. Res.*, 359, 119-132.
- Hiramoto, K., A. Nasuhara, K. Michikoshi, T. Kato and K. Kikugawa (1997) DNA-strand breaking activity and mutagenicity of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine, *Mutat. Res.*, 395, 47-56.
- Hiramoto, K., A. Ishihara, N. Sakui, S. Daishima and K. Kikugawa (1998a) Formation of hydroxyfuranone and hydroxypyranone derivatives with DNA-breaking activity in the Maillard reaction of glucose and albumin under physiological conditions, *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 102-104.
- Hiramoto, K., M. Kaku, T. Kato and K. Kikugawa (1998b) 32p-Post labeling detection of DNA base adducts on mice induced by 4-(hydroxymethyl) benzenediazonium salt, a carcinogen in mushroom *Agaricus bisporus*, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 44, 300-304.
- Hiramoto, K., T. Kato, Y. Takahashi, K. Yugi and K. Kikugawa (1998c) Absorption and induction of micronucleated peripheral reticulocytes in mice after oral administration of fragrant hydroxyfuranones generated in the Maillard reaction, *Mutat. Res.*, 415, 79-83.
- Hiramoto, K., X. Li, M. Makimoto, T. Kato and K. Kikugawa (1998d) Identification of hydroxyhydroquinone (HHQ) in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands, *Mutat. Res.*, 419, 43-51.
- Hiramoto, K. and K. Kikugawa (2000) Effective generation of hydrogen peroxide from hydroxyhydroquinone roasted coffee beans and its inhibition by superoxide dismutase, *J. Oleo Sci.*, 50, 21-28.
- Hiramoto, K., T. Kida and K. Kikugawa (2002) Increased urinary hydrogen peroxide levels caused by coffee drinking, *Biol. pharm. Bull.*, in press.
- Kato, T., K. Kojima, K. Hiramoto and K. Kikugawa (1992) DNA strand breakage by hydroxyphenyl radicals generated from mutagenic diazoquinone compounds, *Mutat. Res.*, 268, 105-114.
- 加藤哲太, 福原亜紀, 菊川清見 (1994) 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) から生成する炭素ラジカルの変異原性, 環境変異原研究, 16, 217-221.
- Kato, T., Hiramoto and K. Kikugawa (1994) Possible occurrence of new mutagen with the DNA breaking activity in coffee, *Mutat. Res.*, 306, 9-17.
- 加藤哲太, 日景しおり, 菊川清見 (1995) 5-Diazouracil および 4-(hydroxymethyl) benzenediazonium 塩のマウス末梢血における小核誘発作用の vitamin E 欠乏による増強, 環境変異原研究, 17, 187-190.
- Kato, T., T. Harashima, N. Moriya, K. Kikugawa and K. Hiramoto (1996) Formation of the mutagenic/carcinogenic imidazoquinoxaline-type heterocyclic amines through the free radical Maillard intermediates and its inhibition by phenolic antioxidants, *Carcinogenesis*, 17, 2469-2476.
- Kato, T., K. Michikoshi, Y. Minowa, Y. Maeda and K. Kikugawa (1998) Mutagenicity of cooked hamburger is reduced by cooking ground beef with onion, *Mutat. Res.*, 420, 109-114.
- Kato, T. and K. Kikugawa (1999) Attempt to decrease the mutagenicity of smoked-and-dried bonito (Katsuoibushi) by boiling of bonito meat in green tea extract, *J. Health Sci.*, 45, 130-132.
- Kato, T., K. Hiramoto and K. Kikugawa (2000a) Mutagenicity of cooked hamburger is reduced by addition of ascorbate and erythorbate to ground beef, *J. Health Sci.*, 46, 389-392.
- Kato, T., K. Michikoshi, Y. Minowa and K. Kikugawa (2000b) Mutagenicity of cooked hamburger is controlled delicately by reducing sugar content in ground beef, *Mutat. Res.*, 471, 1-7.
- Kawanishi, S., S. Inoue and M. Kawanishi (1989) Human DNA damage induced by 1,2,4-benzotriol, a benzene metabolite, *Cancer Res.*, 49, 164-168.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1987) Effect of water content on the generation of mutagenicity in heated fish meats, *Eisei Kagaku*, 33, 62-65.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1988) Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite, *Food Chem. Toxicol.*, 26, 209-214.
- Kikugawa, K., T. Kato and K. Kojima (1992) Substitution of *p*- and *o*-hydroxyphenyl radicals at the 8-position of purine nucleosides by reaction with mutagenic *p*- and *o*-diazoquinones, *Mutat. Res.*, 268, 65-75.
- 菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太 (1996) 食品におけるフリーラジカル性変異原の生成とその阻止, 環境変異原研究, 18, 47-51.
- Kikugawa, K. (1999) Involvement of free radicals in the formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants, *Cancer Lett.*, 143, 123-126.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto and T. Kato (1999a) Generation of oxygen-derived radicals in the Maillard reaction that induce DNA strand cleavage, *Recent Res. Devel. Agric. Food chem.*, 2, 237-257.
- Kikugawa, K., T. Kato, K. Hiramoto, C. Takada, M. Tanaka, Y. Maeda and T. Ishihara (1999b) Participation of the pyrazine cation radical in the formation of the mutagens in the reaction of glucose/glycine/creatinine, *Mutat. Res.*, 444, 133-144.
- 菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太 (2000) フリーラジカルを経由する変異・発がん物質の生成と発現, 環境変異原研究, 22, 149-154.

- Kikugawa, K., K. Hiramoto and T. Kato (2000a) Prevention of the formation of mutagenic and/or carcinogenic heterocyclic amines by food factors, *BioFactors*, 12, 123-127.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto, T. Kato and Y. Yanagawa (2000b) Effect of food reductones on the generation of the pyrazine cation radical and on the formation of the mutagens in the reaction of glucose, glycine and creatinine, *Mutat. Res.*, 465, 183-190.
- Li, X., K. Hiramoto, M. Yoshida, T. Kato and K. Kikugawa (1998) Identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2*H*) -furanone (DMHF) and 4-hydroxy-2 (or 5) -ethyl-5 (or 2) -methyl-3 (2*H*) -furanone (HEMF) with DNA breaking activity in soy sauce, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 305-314.
- Long, L.H. and B. Halliwell (2000) Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers, *Free Rad. Res.*, 32, 463-467.
- Long, L.H., C. Veronique and B. Halliwell (2000) Artifacts in cell culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epicatechin, (+)-epigallocatechin gallate, (-)-catechin and quercetin to commonly used cell culture medium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273, 50-53.
- Mi, H., K. K. Hiramoto, K. Kujirai, K. Ando, Y. Ikarashi and K. Kikugawa (2001) Effect of food reductones, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2*H*) -furanone (DMHF) and hydroxyhydroquinone (HHQ), on lipid peroxidation and type IV and I allergy responses of mouse, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4950-4955.
- Namiki, M. and T. Hayashi (1975) development of novel free radicals during the amino-carbonyl reaction of sugars with amino acids, *J. Agric. Food Chem.*, 23, 487-491.
- Toth, B., D. Nagel and H. Jae (1981) Carcinogenicity of 4-(hydroxymethyl)-benzenediazonium ion (tetrafluoroborate) of *Agaricus bisporus*, *Cancer Res.*, 41, 2444-2449.
- Weisburger, W.H., M. Nagao, K. Wakabayashi and A. Oguri (1994) Prevention of heterocyclic amine formation by tea and tea polyphenols, *Cancer Lett.*, 83, 143-147.
- Yang, G.-Y., J. Liao, C. Li, J. Chung, E.J. Yurkow, C.-T. Ho and C.S. Yang (2000) Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformation and non-transformed human bronchial cell lines: Possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction, *Carcinogenesis*, 21, 2035-2039.
- Yasuhara, Y., K. Ando, K. Koyama, K. Hiramoto and K. Kikugawa (2002) Effect of supplementation of reductone in coffee, hydroxyhydroquinone, on lipid peroxidation and DNA damage of rat organs, *J. Oleo Sci.*, in press.

げっ歯類の培養細胞と個体を用いる 小核試験法の検討

若田 明裕*

山之内製薬株式会社安全性研究所 〒174-8511 東京都板橋区小豆沢1-1-8

Studies on in vitro and in vivo micronucleus tests using rodents

Akihiro Wakata

Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd.
1-1-8 Azusawa, Itabashi-ku, Tokyo, 174-8511

Summary

The cytokinesis-block method using cytochalasin B that was developed by Fenech and Morley for micronucleus assay using human lymphocytes was applied to the rodent CHL cell line. Consistent dose-response relationships were obtained in cultures treated with clastogens and an aneugen. Comparison with the chromosome aberration frequencies indicated that approximately 30 % of acentric chromosomes are expressed as micronuclei in the cells treated with mitomycin C and caffeine. The size distribution of the micronuclei suggested that the base-line frequency of micronuclei is mainly a reflection of mitotic dysfunctions rather than chromosome structural aberrations.

Conditions for route and frequency of administration in the mouse micronucleus test were evaluated. Both intraperitoneal injection and oral gavage were acceptable as routes of administration in this test. Double dosing, with a 24 h interval and sampling 24 h after the second dosing, was the most sensitive protocol compared to single, triple, or quadruple dosing protocols. The micronucleus test using bone marrow and peripheral blood from exposed rats was evaluated. It was concluded that the rat micronucleus test, using either bone marrow or peripheral blood, can be used as an alternative to the mouse micronucleus test.

Keywords : micronucleus test, cytokinesis-block method, cultured Chinese hamster cells, rats

緒 言

遺伝毒性評価において染色体異常誘発性は重要な指標の一つである。小核は染色体の構造異常や分裂異常の結果生じるもので (Heddle and Carrano, 1977), その分析が比較的簡単なことから, 小核試験として染色体異常の検出に in vivo の試験 (Schmid, 1975), 特にマウスの骨髓細胞を用いて広く実施されている (Mavournin et al., 1990)。しかし, 小核形成には細胞分裂が必要で, 培養

細胞においてはその分裂を経過した細胞が不明であることから, 培養細胞を用いる小核試験は定量性に欠けることが問題となっていた (Pincu et al., 1984; Brock et al., 1985)。そこで, 近年ヒトリンパ球を用いて開発された cytochalasin B により分裂細胞を特定する方法 (Fenech and Morley, 1985) を, 哺乳類培養細胞での染色体異常試験に繁用されているチャイニーズハムスターの樹立細胞株 (CHL) に応用し, 染色体異常試験に代わりうる培養細胞での定量性の高い小核試験法の検討を行い, その試験法を用い小核生成の機構の解明を行った。

また, 動物個体を用いるマウス小核試験の標準試験方法の確立を目的とし, 種々の処理方法における至適条件

* E-mail : wakata@yamanouchi.co.jp

受付 : 2002 年 6 月 21 日 受理 : 2002 年 6 月 21 日
日本環境変異原学会

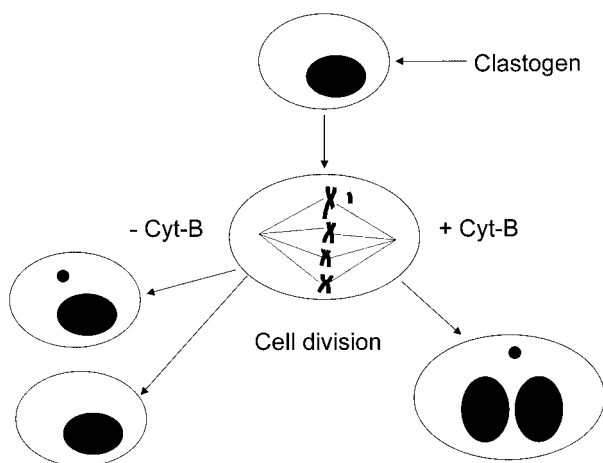


Fig. 1 Schematic diagram of the principal mechanism of micronucleated cells formation by a clastogen with and without cytochalasin B (Cyt-B).

の検討を行った。さらに、医薬品等のげっ歯類を用いる毒性試験では主にラットが用いられているため、ラットが小核試験にマウスと同様に用いることができれば他の毒性試験の結果と関連させることができ大変有用であることから、ラットを用いた小核試験の検討を行った。

1. 哺乳類培養細胞を用いる in vitro 小核試験の検討および小核生成機構の解析

日本において in vitro 染色体異常試験で汎用されているチャイニーズハムスター肺由来株化細胞である CHL 細胞を用いた。分裂細胞を識別するために用いられる cytochalasin B (cyt-B) は microfilament の合成阻害物質 (Carter, 1967) で、細胞質の分裂を阻害するが核の分裂は阻害しない (Wright and Hayflick, 1972) ので cyt-B を含む培養液で細胞を培養していると 1 回分裂期を経た細胞は 2 核細胞となる。このことから、cyt-B で処理した場合、変異原等で小核を誘発された細胞は小核を持った 1 つの二核の細胞として観察される。一方、cyt-B で処理しない場合は、1 核の小核を持つ細胞と小核を持たない 2 つの細胞となる (Fig. 1)。このように cyt-B で処理することにより分裂細胞を二核細胞として容易に識別できその細胞で小核を観察することでより定量的な小核誘発性の評価が可能になる (Fenech, 2000)。

1) Cytochalasin B (cyt-B) 処理条件の検討

まず最初に cyt-B の処理濃度の検討を行った。Cyt-B の処理濃度を変化させたときの出現する 1, 2, 3 および 4 核細胞の頻度を Fig. 2a に示す。

Cyt-B の処理濃度を高くするに従い 2 核細胞 (以下 CB 細胞と呼ぶ) の割合が高くなり、それによって単核細胞の割合が低下した。しかし、cyt-B 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では CB 細胞の割合が増えず、むしろ減少した。CB 細胞

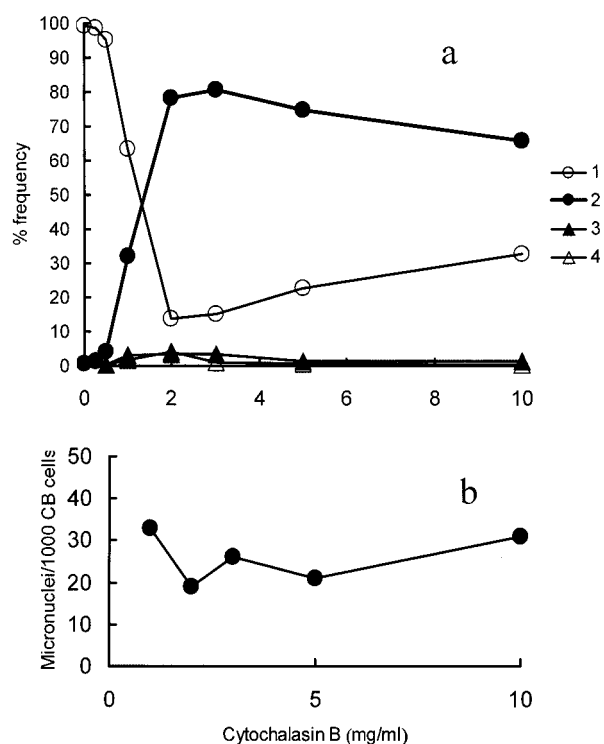


Fig. 2 Effects of cytochalasin B on the frequency of CB cells and micronuclei. The cells were grown for 24hr in the presence of cytochalasin B. (a) Frequency of cells with one (open circle), two (closed circle), three (closed triangle), and four (open triangle) nuclei. (b) Frequency of micronuclei in CB cells.

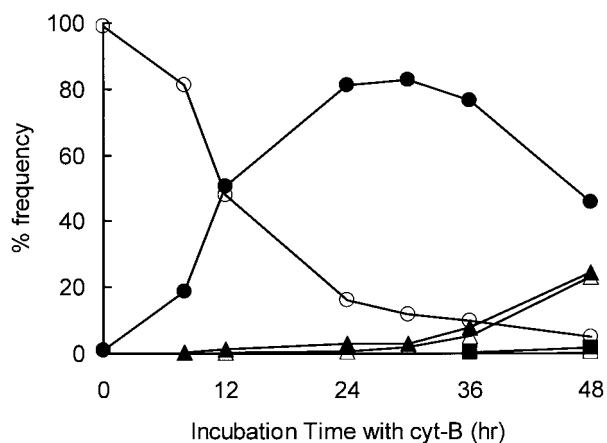


Fig. 3 Relationship between the frequency of CB cells and culture time in the presence of 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cytochalasin B. Cells with one (open circle), two (closed circle), three (closed triangle), four (open triangle), five (closed square) and six (open square) nuclei.

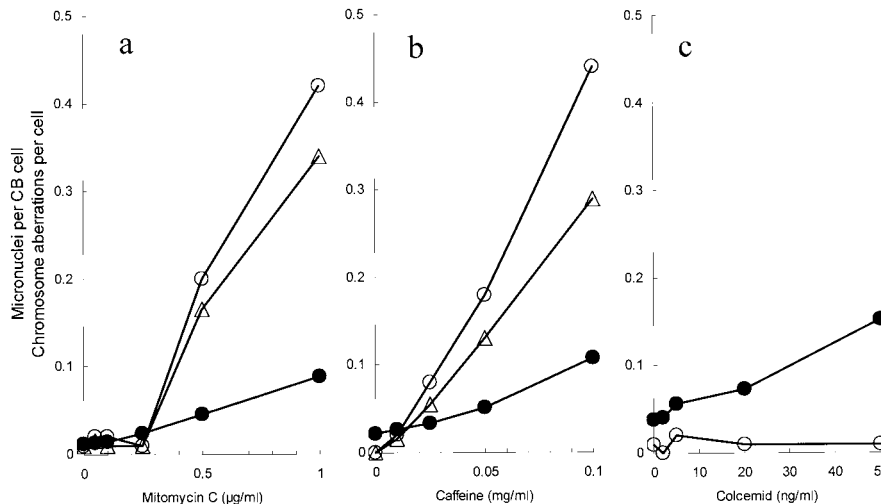


Fig. 4 Dose-response relationship of the frequencies of micronuclei and chromosome aberrations. (a) mitomycin C, (b) caffeine, (c) colcemid. Closed circle: micronuclei, open circle: chromosome aberrations, open triangle: number of chromosome aberrations from which a half number of exchange-type aberrations is subtracted.

の出現頻度の最大値はcyt-B 3μg/ml処理時の80.6%であった。この結果は、ヒトリンパ球での至適濃度 (Fenech and Morley, 1985) と同じであった。さらに cyt-B の濃度が高くなると単核細胞の割合が上昇する傾向が認められた。このことより過剰濃度の cyt-B は核の分裂をも阻害することがわかった。また、cyt-B の濃度が高くなると3核以上の細胞の出現が認められた。しかし、このような細胞は用量依存的には増えず、3核以上の細胞をすべて合わせても最高で8%以上にはならなかった。各濃度におけるCB細胞1000個あたりの小核の出現頻度を Fig. 2b に示す。小核の自然出現頻度は cyt-B の濃度に関わりなく10μg/mlまではほぼ一定の値を示した。このことより、cyt-B それ自体は小核誘発性 (染色体異常誘発性) がないことが示された。以上の結果より、CHL細胞に対しての cyt-B の至適処理濃度は2~3μg/ml であることがわかった。これより、以後の実験での cyt-B の濃度は3μg/mlとした。

次に cyt-B 処理時間の検討を行った。細胞を cyt-B とともに培養した時間と1および2核さらにそれ以上の核を持つ細胞の出現頻度の変化を Fig. 3 に示す。

培養時間とともに2核細胞の出現頻度が上昇し、それに伴って単核細胞の頻度が減少した。最大の2核細胞の出現頻度が得られたのは24~30時間であった。しかし、30時間以上培養を続けると、2核細胞の頻度は培養時間の延長とともに減少していった。また、単核細胞は培養時間によって減少する一方であった。それに対して、培養時間とともに3核以上の細胞の出現頻度が上昇し、48時間培養後では全細胞の約50%にまで達した。さらに、培養時間が長くなると、さらに多数の核を持つ細胞が観

察されるようになり6核の細胞まで現われた。このことは、cyt-B は細胞分裂時に、細胞が2つに分裂する過程を阻害する薬物であり、核の分裂は阻害しないため、核は細胞周期に従って分裂を繰り返すためだと考えられた (Wakata and Sasaki, 1987)。以上の結果より、2核細胞の出現ピークは24~30時間培養後であること、cyt-B 処理をあまり長い時間行うことはよくないことがわかった。用いたCHL細胞の倍加時間が約12時間であることを考えると3核以上の細胞は倍加時間の約3倍の36時間後あたりより顕著に増加することがわかった。以上のことより、培養時間は24時間とした。

2) 染色体異常出現頻度と小核出現頻度との比較

Fig. 4a, b, c にそれぞれ mitomycin C (MMC), caffeine, colcemid で処理したときの、染色体異常の出現頻度とCB細胞中の小核の出現頻度の濃度相関性の比較を示す。染色体異常および小核の頻度は1細胞あたりの数として示した。染色体異常には染色体の断片を生成しないと考えられているギャップは含まなかった。MMC および caffeine で処理した場合、染色体異常および小核の出現頻度は濃度依存的増加した (Fig. 4a, b)。ここで、小核の自然発生頻度は0.024/cellであり、染色体異常の自然発生頻度は0.017/cellとあまり変わらないにも関わらず、MMC や caffeine で誘発される染色体異常の数は小核の数よりもはるかに多くなる。このことは、1つの染色体断片が1つの小核を作るとは限らない (Evans et al., 1959; Carrono and Heddle, 1973) ことで説明できるし、1つの小核が複数の染色体断片を含んでいるとも考えられる。また、この染色体異常の数と小核の数との差

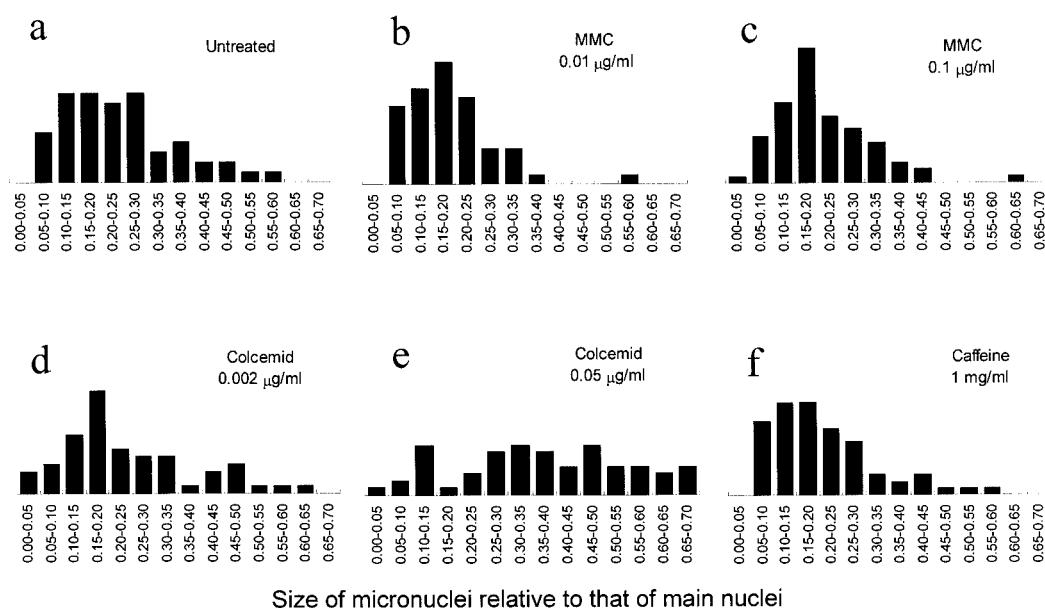


Fig. 5 Distribution of size of micronuclei in untreated control culture and cultures treated with mitomycin C (MMC), caffeine and colcemid. (a) untreated culture, (b) MMC 0.01 $\mu\text{g/ml}$, (c) MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$, (d) colcemid 0.002 $\mu\text{g/ml}$, (e) colcemid 0.05 $\mu\text{g/ml}$, (f) caffeine 1mg/ml. Diameters of fifty micronuclei were measured in each treatment.

はMMCの方がcaffeineより大きくなっている。これはMMCとcaffeineの誘発する異常の型が違うためで、MMCは交換型の異常を多く誘発しそれに比べcaffeineではるかに少ない。最高濃度での交換型異常の割合は、MMC処理で62.2%，caffeineでは14.3%であった。染色体分交換型異常は、対象型の異常は染色体断片を生成しないとされていて、その割合は全染色体分交換型異常の半数である（Buckton et al, 1978; Heddle, 1965; Seabright, 1978; Wolff, 1961）ため、染色体分交換型異常の半数を減じた異常の数を、生成する染色体断片の数として図に示した（△）。この染色体断片の生成率（△）と小核誘発率（●）を比べてみるとMMCとcaffeineの差は小さくなった。このように化学物質によって一見染色体異常と小核の出現頻度の差があるように見えるのは、その化学物質によって誘発される染色体異常の型と割合によることが示唆された。また、ここに示した濃度範囲では2個以上の異常を持った細胞はまれで、ほとんどの細胞が1つの異常しか持っていなかったため、単純に染色体断片の数と小核の数を比較してみると、MMC処理では約30%の染色体断片が小核を形成するという結果になった。しかし、Evansら（Evans et al., 1959）およびCarranoとHeddle（Carrano and Heddle, 1973）は電離放射線による染色体異常の誘発率と小核の誘発率との比較の結果はそれぞれ60%と70%の染色体断片が小核を形成すると報告していて、今回の結果はこの報告と大きな差がある。これは、電離放射線による染色体断片は染色体型のものがほとんどで、化学物質によるもの

は染色分体型のものがほとんどであるため、断片の大きさの違いにより小核を形成する割合が異なることが大きな要因であると考えられた。

Colcemidは紡錘糸の形成を阻害し細胞分裂時に染色体の不分離を起こす物質として知られているが、染色体の構造異常はほとんど誘発しない。しかし、*in vivo*の小核試験では小核を誘発する。今回の結果も、染色体の構造異常はほとんど認められなかったが、小核は用量依存的に直線的に増加した（Fig. 4c）。この結果より染色体の構造異常を起こす物質だけではなく、染色体の不分離を起こす物質も定量的に検出できることがわかった。Fig. 4に示されているように染色体の構造異常誘発物質および数次的異常誘発物質でも小核誘発率は濃度とともにほぼ直線的な増加を示し、高濃度でもその傾きが減少することなく定量性が高いことが示された。

また、それぞれの化学物質での無処理（濃度0）では小核の出現頻度が染色体の出現頻度を上回っていた。このことは、染色体の構造異常を起こさずに小核が生成されているということで、無処理での小核を形成するものは化学物質で誘発されるような染色体断片ではなく染色体の不分離により取り残された染色体によることが大きいことが示唆された（Wakata and Sasaki, 1987）。

3) 小核の大きさに関する解析

無処理, MMC 0.01 $\mu\text{g/ml}$, MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$, colcemid 0.002 $\mu\text{g/ml}$, colcemid 0.05 $\mu\text{g/ml}$, caffeine 1 mg/mlで処理した時に出現した小核の主核に対する大

きさの分布をそれぞれ Fig. 5a, b, c, d, e, f に示す。

これは、それぞれの処理で出現した小核 50 個を計測しその大きさの分布を示したものである。無処理で観察された小核の大きさの分布 (Fig. 5a) はある程度の広さをもって分布していたが、MMC 0.01 あるいは 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 処理でのものは無処理のものに比べて小さいものが多く分布の範囲も狭かった (Fig. 5b, c)。これは MMC 処理によって生ずる小核は染色分体の断片に由来するものであるが、無処理のものはこのような染色体の構造異常によって生じた染色体断片とは異なるものが小核のもととなっていると考えられた。また、低濃度の colcemid で処理 (0.002 $\mu\text{g/ml}$) した場合は出現した小核のサイズの分布は、小さいサイズの小核の頻度がやや減少していたものの無処理のものと同様に広いものであった (Fig. 5d)。サイズが大きくて様々な大きさの小核が出現するのは、colcemid による紡錘体の異常で生じた取り残された染色体が小核を形成するためだと考えられている (Yamamoto and Kikuchi, 1980 ; Hogsted and Karlsson, 1985)。このことより自然発生の小核は紡錘体の機能不全による染色体不分離によることが多いことが示唆された。また高濃度の colcemid 処理 (0.05 $\mu\text{g/ml}$) ではさらに大きなサイズの小核が大半を占めるようになる (Fig. 5e)。このように、ほとんど主核と変わらない大きさのものが出現することから、これらは核の異常分裂によるものだと考えられた (Wakata and Sasaki, 1987)。また、caffeine では MMC と同様にサイズの小さな小核が多く (Fig. 5f) 染色体構造異常による小核であることが示唆された。

In vitro 小核試験は近年注目度が高くなり、国際的な検討がなされている (Kirsch-Volders et al., 2000)。

2. げっ歯類個体を用いる小核試験法の検討

1) マウス小核試験における投与経路による小核誘発率の差の検討

制癌剤であり小核試験において陽性対照物質として広く用いられている Cyclophosphamide (CP) をマウスに腹腔内投与 (ip) あるいは経口投与 (po) したとき誘発された小核を持つ多染性赤血球の頻度を Table 1 に示す。

CP 投与後 24 時間に骨髓細胞標本作製し小核を持つ多染性赤血球を計数した。腹腔内投与では 50 mg/kg で 1.78 % の小核出現頻度であったのに対し、po の 50 mg/kg では 0.59 % であり 100 mg/kg では 1.89 % と、同じ投与量では ip の方が小核誘発率が高い結果となった。しかし、骨髓細胞に対する影響の指標である、PCE 比は同様な小核誘発率が観察された、ip の 50 mg/kg 投与では 28.2 % であり、po の 100 mg/kg 投与では 20.8 % と同様な値を示した。この結果より、ip 投与の方が少ない投与量で小核誘発が観察されることがわかった。しかし、CP は骨髓細胞に強く毒性を示すことが知られている物

質である。このような物質の場合毒性が強く出る ip 投与では小核の観察可能な用量範囲が狭くなることがわかった。それに対し、po 投与では低用量であり小核誘発が観察されないが、ip 投与と同じ程度に骨髓に影響を与える量投与すると ip 投与と同程度の小核が観察されることがわかったが、そのためには大量の投与が必要であった (Wakata et al., 1989)。

この研究は 34 機関の共同研究として 17 化合物を用いて行われた 1 つであるが、全化合物についてのそれぞれの投与経路での小核誘発率を比較した結果を Table 2 に示す。

Benzene を除くすべての化合物で、同用量を投与した場合には po より ip の方が小核誘発率が高いかあるいは同程度であったが、投与量をそれぞれの投与経路での LD₅₀ 値に対する比に換算した同投与量 (例えば、po の LD₅₀ が 200 mg/kg で ip の LD₅₀ が 100 mg/kg であった場合、po での 100 mg/kg と ip での 50 mg/kg はともにその投与経路の LD₅₀ の 1/2 量であるので、LD₅₀ 値に対する比としては同投与量と考える) では、7 化合物で po した場合の方が高い小核誘発率がえられることがわかった (Hayashi et al., 1989)。このことより、in vivo 小核試験に関しては投与経路はあまり大きな影響がなく、毒性を指標とした適切な投与量が設定されている場合は、投与経路のいかんにかかわらず、同程度の感度で小核誘発率が測定できることがわかった。しかし、ip では検体量が少なく済むこと、po より小核誘発率は低くなる化合物がほとんどなく、高くなる化合物が多いこと、手技が po に比べ簡単であることより、どちらかといえば ip を選んだ方がよいと考えられた。

2) マウス小核試験における投与回数に関する検討

Methotrexate (MTX) を 1, 2 および 4 回腹腔内投与後、6, 24, 48 および 72 時間後に骨髓塗抹標本作製し (1 回投与では 24 時間後から)、小核の誘発を観察した。その結果を Fig. 6 に示す。

1 回投与では 16 mg/kg 投与 48 時間後に最大値の 0.50 % の有意な小核誘発性が認められた。2 回投与では明らかに 1 回投与より高い小核誘発率が得られた。また、4 回投与では、低投与量から高い小核誘発率が得られたが、最大誘発率は 2 回投与とあまり変わらず、高用量になると骨髓毒性が強く出て観察不可能になり、小核の誘発が逆に減少した。以上の結果より、MTX は投与回数を多くすればするほどより低用量で小核を効率よく誘発することがわかったが、骨髓抑制も強く現われ、最大の小核誘発率に大きな増加は認められなかった。また、Schmid が小核試験のプロトコールとして最初に提案した方法 (Schmid, 1975) は、2 回投与後の 6 時間後に観察する方法であるが、今回の結果より、2 回投与後の 24 時間後に観察する方がより感度が良いことがわかった。

Table 1 Results of micronucleus test with cyclophosphamide administered by ip and po to CD-1 mice

Dose (mg/kg)	ip		po	
	MNPCE (%)	PCE (%)	MNPCE (%)	PCE (%)
Saline	0.03 ± 0.05 (4)	49.5 ± 0.7	0.05 ± 0.06 (4)	46.1 ± 3.2
25	0.42 ± 0.13 (4)	35.8 ± 5.6	nt	nt
50	1.78 ± 1.44 (4)	28.2 ± 2.3	0.59 ± 0.03 (4)	39.6 ± 8.8
100	4.46 (1)	8.8 ± 2.1	1.89 ± 0.88 (4)	20.4 ± 4.2
200	na	2.8 ± 2.5	2.09 ± 0.17 (3)	10.7 ± 2.2
400	nt	nt	1.33 ± 0.81 (3)	8.7 ± 5.2

() : number of animals analyzed, nt : not tested, na: not analyzed because of too low frequency of PCE, PCE: polychromatic erythrocyte, MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte

Table 2 Comparative sensitivity of administration routes, intraperitoneal injection and oral gavage, at same dosage

Compounds	Sensitivity	
	Dose (mg/kg)	Dose (% of LD ₅₀)
<i>Nucleic acid analogs</i>		
Ara-C	ip > po	ip > po
6-MP	ip = po	ip < po
<i>polycyclic hydrocarbons</i>		
B(a)P	ip > po	ip > po
DMBA	ip > po	ip < po
<i>Aromatic amines</i>		
2AAF	ip > po	ip > po
Phenacetin	ip = po	ip = po
<i>Alkylating agents</i>		
Cyclophosphamide	ip = po	ip < po
EMS	ip = po	ip = po
ENU	ip = po	ip = po
MMS	ip > po	ip < po
<i>Cross-linking agents</i>		
MMC	ip > po	ip < po
<i>Spindle poisons</i>		
Colchicine	ip > po	ip > po
Vincristine	ip > po	ip > po
<i>Inorganic chemicals</i>		
KBrO ₃	ip = po	ip < po
K ₂ CrO ₄	ip > po	ip > po
<i>Miscellaneous</i>		
Benzene	ip < po	ip < po
Procarbazine	ip > po	ip = po

Dose (mg/kg) : absolute dosage

Dose (% of LD₅₀) : relative dosage to LD₅₀ in each administration route.

Ara-C: 1-β-arabinofuranosylcytosine, 6-MP: 6-mercaptopurine, B(a)P: benzo[*a*]pyrene, DMBA: 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene, 2AAF: 2-acetylaminofluorene, EMS: ethyl methanesulfonate, ENU: *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, MMS: methyl methanesulfonate, MMC: mitomycin C

MTXについては、以上の結果より、1回投与では小核の誘発が弱いものでも2回投与することにより、明らかな小核の誘発が認められることがわかった。

この研究は33機関による共同研究で11化合物について投与回数を検討したうちの1つである。その11化合物のそれぞれの投与回数で得られた小核誘発率の最高値

をTable 3に示す。また、それぞれの化合物で得られた小核誘発率の最高値を太字下線で示し、2番目の値を太字で示した。

その結果、2回投与で最高値あるいは2番目に高い小核誘発率を示す化合物が1番多く、1回投与と4回投与ではほぼ同数であった。また、4回投与では2回投与よ

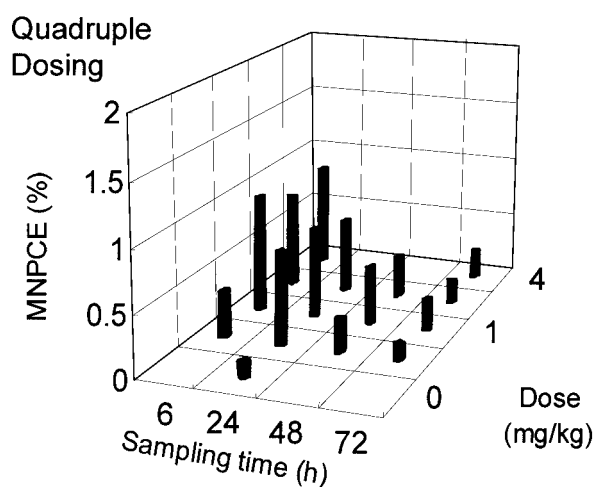
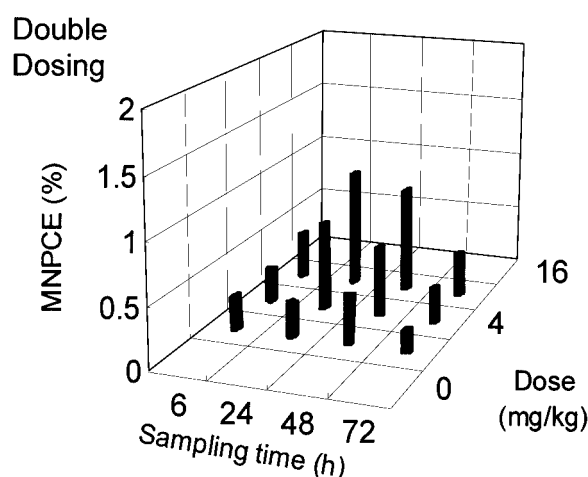
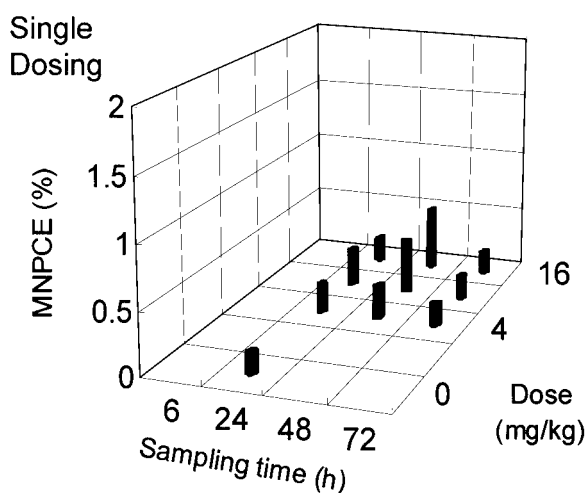


Fig. 6 Mean Induction of micronucleated polychromatic erythrocytes treated with methotrexate. MNPCEs were counted in 1000 PCE in the bone marrow cells of mice treated by single, double or quadruple dosing.

Table 3 Effect of frequency of administration on micronucleus induction

Compounds	MNPCE (%)		
	Frequency of administration		
	1	2	4
5-FU	3.13	4.17	1.60
6-MP	5.74	8.45	11.8
Ara-C	5.12	4.18	7.26
DMBA	2.54	3.67	2.08
2AAF	1.16	1.63	0.63
Phenacetin	1.23	2.38	0.95
ENU	3.13	4.72	6.06
EMS	2.43	1.48	1.63
K ₂ CrO ₄	0.93	0.85	0.80
Benzene	1.08	1.40	1.52
MTX	0.50	0.97	0.83

Maximum (bold underlined) and **Second** (bold) value in each chemical

5-FU: 5-fluorouracil, 6-MP: 6-mercaptopurine, Ara-C: 1- β -arabinofuranosylcytosine, DMBA: 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene, 2AAF: 2-acetylaminofluorene, ENU: *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, EMS: ethyl methanesulfonate, MTX: methotrexate

り高い小核誘発率を示すものもあったが、逆に小核誘発率が低下するもの、骨髄抑制のため観察が不可能になるものがあった (CSGMT, 1990). 投与回数を増すことは操作も煩雑になり、また毒性のある物質では投与量の設定も容易ではなく、あまり実用的ではないことがわかった. また、MTXのような1回投与では小核誘発性が弱く適切な標本作製時期 (投与48時間後) を設定しなければ、陽性結果を得られない化合物であっても、2回投与の24時間後には有意な小核誘発性が観察されることがわかった. これらをまとめると、スクリーニング的にある物質の小核誘発性を知るための試験としては、24時間間隔の2回投与後、24時間目に骨髄標本作製して観察すればよいことがわかった.

3) ラットを用いる小核試験の検討

医薬品等のげっ歯類を用いる毒性試験においてマウスはあまり用いられず、ラットが用いられることがほとんどである. そこで、小核試験においてもラットが用いられないかを検討した. 試験化合物として、マウス小核試験陽性でラットに発癌性が認められている28化合物、マウス小核試験陽性でラットでの発癌性は不明の6化合物、マウス小核試験陰性でラットに発癌性が認められている2化合物およびマウスとラットで小核試験において相違が報告されている3化合物 (George et al., 1990; Westmoreland and Gatehouse, 1991; Meli and Seeberg, 1990) を選んだ (Table 4).

これらの化合物についてラットを用い骨髄細胞と末梢血液で小核誘発性を調べた. まず、ラットの骨髄細胞お

Table 4 List of chemicals tested in the rat micronucleus assay

Mouse MN +ve rat carcinogens	Oil orange SS
Acetaldehyde	Phenacetin
2-Acetylaminofluorene	1, 3-Propane sultone
<i>p</i> -Aminoazobenzene	Propylene oxide
<i>o</i> -Aminoazotoluene	Triethylenemelamine
Arsenic acid solution	Urethane
Benzene	
Benzidine	Mouse MN +ve chemicals
4-Chloro- <i>o</i> -phenylenediamine	Azathioprine
Daunomycin	Colchicine
<i>N, N'</i> -Diacetylbenzidine	5-Fluorouracil
1, 2-Dibromo-3-chloropropane	6-Mercaptopurine
Diepoxybutane	Methotrexate
Diethyl sulfate	Vincristine
Ethy methanesulfonate	
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea	Mouse MN -ve carcinogens
Hydrazine	Acrylonitrile
Nitrogen mustard	4, 4'-Methylene bis (2-chloroaniline)
2-Methylaziridine	
Methyl methanesulfonate	Species difference reported chemicals
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea	Azobenzene
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N'</i> -nitrosoguanidine	1, 2-Dimethylhydrazine
<i>N</i> -Nitrosomorpholine	Solvent yellow 14

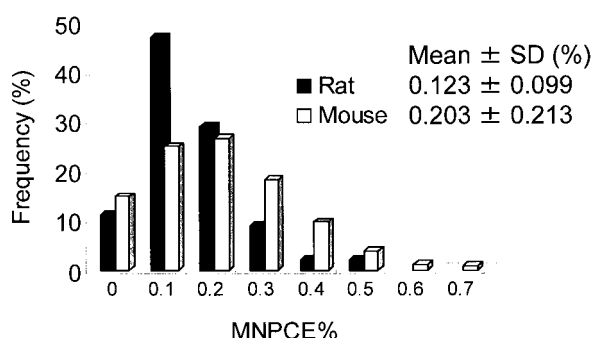


Fig. 7 Distribution of MNPCE frequencies in the solvent control rats (the present study) and mice (CSGMT, 1986; 1990; 1992; Hayashi et al., 1989a; Morita et al., 1997).

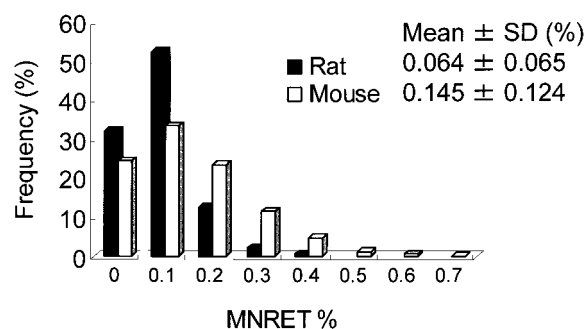


Fig. 8 Distribution of MNRET frequencies in untreated rats (the present study) and mice (CSGMT, 1992; Morita et al., 1997).

よび末梢血における自然発生の小核を持つ幼若赤血球の頻度を調べた。それらをマウスと比較した結果を Fig. 7 および Fig. 8 に示す。

骨髓細胞における小核を持つ幼若赤血球の頻度は、ラットで 0.123%，マウスで 0.203%，末梢血においては、ラットで 0.064%，マウスで 0.145% といずれの場合もラットがマウスの約 1/2 と低かった。今回試験した化合物については、マウス骨髓細胞において検出されなかったのは 5 化合物であるのに対し、ラット骨髓細胞では 4 化合物とほとんど変わりなく、骨髓細胞を用いる場合はマウスとラットで検出力に差はなく、全く同等であることが示された (Table 5)。

またこれまで、末梢血を用いた場合は、小核誘発性を

検出できなかった化合物が 4 化合物とマウスの 1 化合物に比べ少し多かったが、マウスでは試験されていない化合物も多く、従来ラットでは脾臓において小核を持つ赤血球が除去されるためその能力のないマウスに比べ検出力が落ちると思われるほど大きな検出力の差はなく、ラットの末梢血でも十分小核誘発性の評価が可能であることを示した。また、小核誘発率を比較してみると、小核誘発率の絶対値で比較するとマウスが高く、すべての化合物においてラットと同じか高かった。しかし、先に示したようにラットでは小核を持つ幼若赤血球の自然発生頻度が低いので、コントロールと比較しての誘発率に換算すると、マウスより高く小核を誘発する化合物があることがわかった (Table 6)。

Table 5 Rat and mouse micronucleus assay 39 chemicals with peripheral blood and bone marrow

No. of Chemicals	Mouse						Rat					
	PB			BM			PB			BM		
	+	ND	-	+	ND	-	+	INC	-	+	ND	-
	24	14	1	28	6	5	31	3	4	34	1	4

PB; peripheral blood, BM; bone marrow, +; positive, ND; no data, INC; Inconclusive, -; negative

Table 6 Comparative sensitivity of rat and mouse micronucleus assay

Chemicals	Species	Route	Bone marrow			Peripheral blood		
			Dose (mg/kg)	MNPCE		Dose (mg/kg)	MNRET	
				(%)	(Fold)		(%)	(Fold)
					inc.			inc.
p-Aminoazobenzene	Rat	ip	80	0.41	3.4	80	0.38	3.5
	Mouse	ip	150	0.70	5.0	150	1.14	8.1
o-Aminoazotoluene	Rat	ip	600	0.11	0.9	600	0.16	8.0
	Mouse	ip	400	0.60	3.0			
Benzene	Rat	po	2000	2.34	16.7	2000	2.16	18.0
	Mouse	po	2000	2.75	34.4	2000	2.75	8.1
Diepoxybutane	Rat	po	144	4.00	22.2	144	0.78	26.0
	Mouse	po	72	8.68	36.2			
Ethyl methanesulfonate	Rat	ip	300	1.36	45.3	300	0.75	12.5
	Mouse	ip	200	1.48	8.2			
N-Ethyl-N-nitrosourea	Rat	ip	75	2.78	27.8	75	1.36	12.4
	Mouse	ip	100	7.85	60.4	50	3.78	11.8
5-Fluorouracil	Rat	ip	40	1.39	10.7	80	0.69	34.5
	Mouse	ip	50	3.13	24.1	50	2.54	18.1
Hydrazine	Rat	ip	75	0.58	2.8	12.5	0.15	2.5
	Mouse	ip				50	1.18	5.9
6-Mercaptopurine	Rat	ip	50	0.92	6.1	25	0.53	5.3
	Mouse	ip	50	6.98	27.9	25	2.9	7.3
MNNG	Rat	ip	100	1.20	4.0	100	0.75	3.75
	Mouse	ip	150	2.55	10.2	100	0.8	3.1
Nitrogen mustard	Rat	ip	2	3.24	23.5	2	0.66	7.5
	Mouse*	ip	2	7.17	29.6	2	4.98	21.4
1, 3-Propane sultone	Rat	ip	60	2.15	13.4	30	0.66	7.3
	Mouse	ip				72	1.92	11.3
Propylene oxide	Rat	ip	200	0.33	2.2	300	0.4	3.1
	Mouse	ip	300	0.53	8.8	300	0.4	6.7
Triethylenemelamine	Rat	ip	0.5	5.58	11.8	0.125	1.08	6.8
	Mouse	ip	1	7.52	32.7	1	6.64	66.4
Urethane	Rat	ip	1000	1.29	11.7	1000	1.6	40
	Mouse					1000	3.28	16.4
Vincristine	Rat	ip	0.2	0.99	7.6	0.08	0.26	4.3
	Mouse	ip	0.125	11.68	89.8	0.25	4.34	54.3

Light shadow: frequency in mice was more than twice that in rats

Dark shadow: frequency in rats was more than twice that in mice

* MS/Ae strain mice

結 語

このことにより、他の一般毒性試験の動物を用いて小核の評価が行える可能性が示唆された (Wakata et al., 1998)。

小核は染色体異常を観察する簡便で感度の高い検出法であるが、培養細胞では分裂細胞の特定という技術的な問題点がありその定量性が確保できなかったが、今回検討した方法により培養細胞でも *in vivo* の骨髓細胞と同様に定量的に小核誘発性を評価することができるよう

になった。このことにより、培養細胞を用いる小核試験が染色体異常試験の代わりとなる可能性があることが示された。また、小核試験にラットを用いることができることと示されたことにより、他の毒性試験との関連もとれ小核試験にラットを用いる有用性を示した。

謝 辞

In vitro 小核試験の研究は、京都大学放射線研究センターの佐々木正夫教授のもとに染色体異常試験を教えて頂きに伺った時に運良く出会い、研究の機会を与えて頂き、多くの御指導を受けて成し得たものです。ここに心より感謝申し上げます。マウスおよびラットを用いた小核試験の検討は、本学会MMS研究会の共同研究の一環として行われたものであり共同研究者の皆様の御協力なしでは成し得なかったものです。本研究を進めるに当たって多くの御助力を頂きました国立医薬品食品衛生研究所 林真部長、グラクソ・スミスクライン株式会社 森田健博士ならびに日本環境変異原学会、MMS研究会、小核共同研究グループ (JEMS/MMS・CSGMT) の皆様に深く感謝致します。本研究を行うにあたり多くの御助力と御配慮を頂きました、山之内製薬株式会社 大島稔彦、山下智子、玉起美恵子、湯野幸一郎、宮内美津江、永井由美子諸氏に深く感謝致します。学生時代から現在まで長きにわたり広く御指導頂きました、就実女子大学 早津彦哉教授、岡山大学遺伝子実験施設 根岸和雄助教授、同薬学部 根岸友恵助教授、有元佐賀恵助教授に深く感謝致します。

参考文献

- Brock, W.A. and M. Williams (1985) Kinetics of micronucleus expression in synchronized irradiated Chinese hamster ovary cells, *Cell Tissue Kinet.*, 18, 247-254.
- Buckton, K.E., G. E. Hamilton, L. Paton and A.O. Langlands (1978) Chromosome aberrations in irradiation ankylosing spondylitis patients, in: H. J. Evans and D.C. Lloyd (Eds.), *Mutagen-induced Chromosome Damage in Man*, University Press, Edinburgh, pp. 142-154.
- Carrano, A.V. and J.A. Heddle (1973) The fate of chromosome aberrations, *J. Theor. Biol.*, 38, 289-304.
- Carter, S.B. (1967) Effects of cytochalasins on mammalian cells, *Nature*, 213, 261-264.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1986) Sex difference in the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 172, 151-163.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1990) Single versus multiple dosing in the micronucleus test: the summary of the 4th collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS. *Mutat. Res.*, 234, 205-222.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS. *Mutat. Res.*, 278, 83-98.
- Evans, H.J., G.J. Neary and F.S. Williamson (1959) The relative biological effectiveness 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. Radiat. Biol.*, 1, 216-229.
- Fenech, M. and A.A. Morley (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.*, 147, 29-36.
- Fenech, M. (2000) A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division, *Mutagenesis*, 15, 329-336.
- George, E., M. Andrews and C. Westmoreland (1990) Effects of azobenzene and aniline in the rodent bone marrow micronucleus test, *Carcinogenesis*, 11, 1551-1556.
- Hayashi, M., S. Sutou, H. Shimada, S. Sato, Y.F. Sasaki and A. Wakata (1989) Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test: The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS, *Mutat. Res.*, 223, 329-344.
- Heddle, J.A. (1965) Randomness in the formation of radiation-induced chromosome aberrations, *Genetics*, 52, 1329-1334.
- Heddle J.A. and A.V. Carrano (1977) The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments, *Mutat. Res.*, 44, 63-69.
- Hogstedt, B. and A. Karlsson (1985) The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used, *Mutat. Res.*, 156, 229-232.
- Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, Jr., E. Lorge, H. Norppa, J. Surralles, W. von der Hude, and A. Wakata (2000) Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- Mavournin, K.H., D.H. Blakey, M.C. Cimino, M.F. Salamone and J.A. Heddle (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.*, 239, 29-80.
- Meli, C. and A.H. Seeberg (1990) Activity of 1,2-dimethylhydrazine in the mouse bone marrow micronucleus assay using a triple- and a single-dosing protocol, *Mutat. Res.*, 234, 155-159.
- Morita T., N. Asano, T. Awogi, Y.F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS, *Mutat. Res.*, 389, 3-122.
- Pincu, M., D. Bass and A. Norman (1984) An improved micronucleus assay in lymphocytes, *Mutat. Res.*, 139, 61-65.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31, 9-15.
- Seabright, M. (1978) Participation of human chromosomes in induced changes. in: H.J. Evans and D.C. Lloyd (Ed.), *Mutagen-induced Chromosome Damage in Man*, University Press, Edinburgh, pp. 151-154.
- Wakata, A. and M.S. Sasaki (1987) Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in culture Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations, *Mutat. Res.*, 190, 51-57.
- Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo and M. Hayashi (1998) Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test.

- Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 84-100.
- Wakata, A., T. Yamashita, M. Tamaoki, T. Ohshima and M. Kojima (1989) Micronucleus test with cyclophosphamide administered by intraperitoneal injection and oral gavage, *Mutat. Res.*, 223, 369-372.
- Westmoreland, C. and D.G. Gatehouse (1991) The differential clastogenicity of Solvent Yellow 14 and FD & C Yellow No. 6 in vivo in the rodent micronucleus test (observations on species and tissue specificity) , *Carcinogenesis*, 12, 1403-1407.
- Wolff, S. (1961) Some postirradiation phenomena that affect the induction of chromosome aberrations, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, 151-162.
- Wright, W.E. and L. Hayflick (1972) Formation of anucleate and multinucleate cells in normal and SV40 transformed WI-38 by cytochalasin B, *Exp. Cell Res.*, 74, 187-194.
- 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.

入会手続きのご案内

入会申込書に必要事項をご記入の上、年会費とともに現金書留にて事務局宛てお送りください。

年 会 費 7,000 円 (正会員)

5,000 円 (学生会員)

事業年度 (1月1日～12月31日)

(お申し込みについて)

1. 入会申込書に必要事項を楷書でご記入の上、年会費とともに現金書留にて事務局までお送りください。
2. 正会員は評議員の推薦を必要とします。推薦者がおられない場合は、事務局にご相談ください。
3. 学生会員は指導教官の推薦と在学証明書を必要とします。翌年の3月31日まで会員として登録されます。
4. 年度末に入会申し込みをされる場合で、翌年度から入会希望の場合は、その旨お知らせください。
5. 学会誌は入会後に発行した号からお送りしますが、当該年度で入会前の学会誌をご希望の場合は事務局までご連絡ください。
6. 住所変更 (学会誌送付先の変更) の際は、会員番号 (学会誌等送付する際、宛名ラベルに印刷されています)、氏名、新・旧住所をご記入の上、事務局宛、書面にてご連絡ください。

日本環境変異原学会

〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9

駒込TSビル3F 財団法人 口腔保健協会内

電話 03-3947-8891(代) FAX 03-3947-8341

日本環境変異原学会入会申込書

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員の署名を添えて申し込みます。

フリガナ：		
氏 名：	㊟	
Name（ローマ字つづり）		
生年月日（性別）	年 月 日	（男・女）
所属機関名：		
住 所：〒		
TEL：		FAX：
電子メール：		
Affiliation Address Belong		
自 宅 住 所：		
電 話：		
Home address		
学会誌送付先：	①所属機関	②自 宅
学 位：	年取得	
研究領域（複数可）		
加入学会名：		

_____の本学会への入会を推薦致します。 日本環境変異原学会評議員 (署名) 日付 印
--

入会申込書の送付先：〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル
 (財)口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局
 TEL 03-3947-8891 FAX 03-3947-8341

日本環境変異原学会 学生会員申込書

[1年間（翌年の3月31日まで）のみ有効です]

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に学生会員として入会いたしたく貴学会員である指導教官の署名および在学証明書
（裏面に添付）を添えて申し込みます。

フリガナ：	
氏 名：	㊟
Name（ローマ字つづり）	
生年月日（性別）	19 年 月 日 （男・女）
校名／学部：	
住 所：〒	
TEL：	FAX：
電子メール：	
Affiliation Address Belong	
自 宅 住 所：	
電 話：	
Home address	
学会誌送付先：	①大 学 ②自 宅
研究領域（複数可）	
指導教官名：	
連 絡 先：	

_____の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。	
指導教官	
(署名)	印
日付	

入会申込書の送付先：〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル
（財）口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局
TEL03-3947-8891 FAX03-3947-8341

環境変異原研究 投稿規定

1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」、「一般論文」、「短報」、および「特別企画（受賞講演）」、「論説」、「資料・情報」などを掲載する。なお、投稿論文の採否は編集委員会の審査により決定する。

「総説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などである。原則として編集委員会より寄稿を依頼する。

「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の原著論文で、それ自身独立して価値ある結論あるいは事実を含むものとする。陰性データも受け付ける。

「短報」は、新しい技術の紹介や価値あるデータを含む短い報告とする。陰性データも受け付ける。

「論説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などで、会員からの投稿によるものとする。

「資料・情報」は、環境変異原に関する調査の結果などをまとめたもの、および公開シンポジウム、研究会の要旨などとする。

(Letter to Editor も受け付ける。)

2. 投稿資格

共著者のうちの1人は日本環境変異原学会会員でなければならない。ただし、招待寄稿の場合にはこの限りではない。

3. 論文原稿の書き方

論文原稿の用語は英語または日本語とし、最新の執筆規定に従い簡潔にわかりやすく書く。総説、一般論文、論説は、写真・図表を含めて刷り上がり8頁以内。短報は4頁以内とする。ただし規定の頁数を超えることが明らかな場合は、事前に編集委員に相談する。

4. 論文原稿の送付

論文原稿は5部と本誌に綴じ込みの「投稿論文チェックリスト」を、下記に（簡易）書留便または宅配便で送付する。

〒170-0003

東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル
インテルナ出版

日本環境変異原学会誌編集係

Tel. 03-3944-2591

Fax. 03-3947-8073

5. 著作権

本誌に掲載された記事、論文などの著作権は日本環境変異原学会に帰属するものとする。従って、本会が必要と認めた場合は転載し、また外部から引用の申請があった場合には、編集委員会において検討の上許可することがある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部の複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著作者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて学会長に申し出を行い、許諾を求めなければならない。

6. 校正

著者校正は原則として原稿に対する誤植の訂正に限る。原稿にない加筆・変更はしないこと。

7. 著者負担金

- 1) 投稿料は無料とする。ただし頁数の超過分や多額の経費を要する図表の実費は著者負担とする場合がある。
- 2) カラー印刷等の特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りはすべて著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申込書に50部単位で申し込む。

編集委員会からのお願い

「環境変異原研究 Environmental Mutagen Research」への投稿論文の、投稿から印刷までの時間の短縮を目指し、投稿論文の査読を評議員にお願いすることになりました。それに伴い、投稿規定の見直しも行い、今後は年大会での発表と同様に、投稿論文の分野を著者に申告していただき、同一分野を登録していただいている評議員に査読していただくことになります。今回投稿時のチェックリストをお届けしますので、投稿論文と一緒に必ずお送り下さい。

現在7名の編集委員が分担して学会誌、*Jems News*の編集作業を行っていますが、それぞれ自分の仕事を抱えボランティアとして活動しています。そこで、会員の皆様の積極的な雑誌作りへの協力として、年大会で発表されたものを一報でも多く論文にまとめ、本学会誌に投稿していただきますようお願い致します。また、*Jems News*への投稿、情報、意見、公募等もお願いします。

本誌の将来像に関する議論を進めております。英文誌化の話も出ており、編集委員を中心に検討を始めたところですが、皆様のご意見を是非お聞かせいただきたく思います。どんな些細なことでも結構ですから、学会誌に関することでコメント、提案等がありましたら、編集委員までE-mailにてお知らせください。編集委員一同

環境変異原研究 執筆規定

1. 用語は日本語または英語とする。
2. 原稿は原則としてワープロを用いて作成する。

日本文の原稿：

原稿は A4 判用紙に 1 行約 40 字、1 頁 30 ～ 31 行で印字する(刷り上がりの約 1/2 頁に相当する)。ただし、要約は英文(300 語以内)とする。また、別に題名、著者名(フルネーム)、所属機関名ならびに所在地を英文で付ける。

英文の原稿：

原稿は A4 判用紙にダブルスペースで印字(12 ポイント)する。1 頁 25 ～ 27 行を標準とする。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。

3. 論文の記述は、第 1 頁は表題、著者名、所属および所在地、第 2 頁は英文の要約(Summary)およびキーワード(英文 5 語以内、固有名詞や遺伝子名などで大文字の使用が必要な場合を除き、原則として小文字表記とする)、第 3 頁以下、緒言(Introduction)、実験材料および方法(Materials and Methods)、結果(Results)、考察(Discussion)または結果および考察、結語(Conclusion)、謝辞(Acknowledgments)、参考文献(References)、表、図の説明および図の順序とする。ただし、総説の記述は、第 3 頁以下、緒言、1. ……、2. ……、結語、謝辞、参考文献、表、図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明文はすべて英文とする。
4. 学名、遺伝子記号などはイタリックとし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
5. 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、化学物質の CAS 登録番号を記載する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる(文頭の場合は大文字)。
6. 数字は算用数字を用い、単位は慣用による省略記号を用いる。
7. 略語を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略語を括弧内に示す。
8. 句読点はカンマ(,)およびピリオド(.)とする。
9. 表、図は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号 Fig. 1, 2, …を付し、説明文(英文)を別紙に添える。

10. 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面に Fig. 1, 2, …および上下を鉛筆書きする。
11. 表は上部に一連の番号 Table 1, 2, …と英文の表題を記入する(文頭のみ大文字)。脚注を要するときに表示の語句の右肩に a, b, c, …を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
12. 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
13. 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名は Chemical Abstracts の記載方法に従う。記載順序は著者氏名、(年)、題名、雑誌名、巻、頁(単行本の一部引用の場合は著者氏名、(年)、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁)の順とする。単行本そのものを引用する場合は、編者名あるいは著者名、(年)、書名、発行所、発行地の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。

Ames, B.N., J. MaCann and E. Yamasaki (1975)
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-364.

Ashby, J., F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B.H. Margolin, B. Matter and M.D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In : J. Ashby, F.J. de Serres et al. (Eds), *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.

Friedberg, E.C., G.C. Walker and W. Siede (1995)
DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, Washington, D.C.

藤川和男、梁 治子、近藤宗平(1984)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.

佐々木正夫(1983)環境変異原と染色体異常、外村晶(編)、*染色体異常*、朝倉書店、東京、pp. 107-113.

松影昭夫(編)(1996)*DNA 複製、修復と発癌*、羊土社、東京。

(改訂 2000 年 12 月)

投稿論文チェックリスト

論文ご投稿の際、この用紙に必要事項をご記入のうえ、添付してください。

論文名（日本語）：

（英 語）：

窓口著者名：

連絡先（住所）

（TEL）

（FAX）

（E-mail）

分類（該当するものに印をつけてください）

☐ 突然変異のメカニズム

☐ 変異原の検出

☐ 環境汚染物質

☐ 抗変異原

☐ DNA 損傷（付加体）

☐ 変異原の代謝

☐ 変異原の修飾，発現

☐ 試験法の開発，改良

☐ その他（ ）

送付前のチェック項目

☐ 投稿規定，執筆規定に沿っていますか（特に引用文献）

☐ 英文校閲はお済みですか

☐ 投稿論文は5部ありますか

編集後記

本号は第30回（記念）大会の特集号です。ご存じのように、昨年は国際環境変異原学会と合同開催されたことにより、大会としては基調講演，特別講演それと受賞講演のみでした。そのため、例年のように大会シンポジウム等の論文もなく，少し寂しい号になってしまいました。しかし，このように本号を発行することができました。投稿して頂いた講演者の先生方に感謝いたします。ただ残念なことに，本号にはそれ以外の投稿論文がありません。これまでの編集委員も申していますように，本学会の発展には本誌の充実が欠かせません。皆様からのご投稿を切望いたします。

担当編集委員 若田 明裕

編 集 委 員

森田 健（委員長）（2002-）

〒151-8566 東京都渋谷区千駄ヶ谷4-6-15 GSKビル
グラクソ・スミスクライン株式会社
Tel：03-5786-5067 Fax：03-5786-5223
E-mail：takeshi.5.morita@gsk.com

矢嶋 信浩（1999-）

〒485-0059 愛知県小牧市小木東3-45
雪印ラビオ株式会社・開発研究所
Tel：0568-77-3235 Fax：0568-76-1046
E-mail：n-yajima@snowlabio.com

山田 雅巳（1999-）

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部
Tel：03-3700-1141(ext 282)
Fax：03-3707-6950
E-mail：myamada@nihs.go.jp

赤沼 三恵（2000-）

〒187-0011 東京都小平市鈴木町2-772
（財）残留農薬研究所・試験企画部
Tel：042-382-2146 Fax：042-383-7640
E-mail：mie.a@viola.ocn.ne.jp

若田 明裕（2001-）

〒174-8511 東京都板橋区小豆沢1-1-8
山之内製薬株式会社・安全性研究所
Tel：03-5916-2177 Fax：03-3960-5141
E-mail：wakata@yamanouchi.co.jp

若栗 忍（2002-）

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
財団法人 食品薬品安全センター・秦野研究所
細胞毒性試験班
Tel：0463-82-4751 Fax：0463-82-9627
E-mail：wakuri.s@fdsc.or.jp

高橋 和彦（2002-）

〒467-8603 愛知県名古屋市長区瑞穂区田辺通3-1
名古屋市立大学大学院薬学研究科
医薬品代謝解析学分野
Tel & Fax：052-836-3780
E-mail：takahasi@phar.nagoya-cu.ac.jp

評 議 員

赤沼 三恵	荒木 明宏	宇野 芳文	大澤 浩一	太田 敏博
大塚 雅則	大西 克成	葛西 宏	鎌滝 哲也	川西 正祐
木苗 直秀	後藤 純雄	佐々木 有	島田 弘康	清水 英佑
下位香代子	祖父尼俊雄	高橋 和彦	田中 憲穂	出川 雅邦
寺尾 良保	長尾美奈子	中嶋 圓	糠谷 東雄	布柴 達男
根岸 和雄	根岸 友恵	能美 健彦	林 真	早津 彦哉
藤川 和男	降旗 千恵	本間 正充	松元 郷六	宮川 誠
望月 正隆	森 秀樹	森 幸雄	森田 健	矢嶋 信浩
山添 康	吉川 邦衛	若田 明裕	若林 敬二（五十音順）	

環境変異原研究 第24巻 第2号 2002年

平成14年9月24日 印刷

平成14年9月30日 発行

発行者 日本環境変異原学会

発行責任者 林 真

製作 インテルナ出版

目 次

第30回大会基調講演

日本環境変異原学会創生の頃と今考えるべき改革

杉村 隆 63

環境変異原研究がめざす道

木苗直秀 69

第30回大会特別講演

変異原性試験で何がわかるか：21世紀の展望

能美健彦 75

第30回大会受賞講演

学術賞

変異・癌原性物質の産生・代謝とその活性抑制に関する研究

大西克成 81

研究奨励賞

フリーラジカルを経由する環境変異・発がん物質の生成と発現に関する研究

平本一幸 91

げっ歯類の培養細胞と個体を用いる小核試験法の検討

若田明裕 99

付 記

日本環境変異原学会 入会申込書
学生会員申込書

環境変異原研究

投稿規定
執筆規定