

## 高等動物細胞に対する環境変異原の複合効果に関する研究

Studies on the combined effects of environmental mutagens on mammalian cells in culture

代表研究者	国立遺伝学研究所教授 Prof., National Inst. of Genetics Yukiaki KURODA	黒田行昭
協同研究者	国立遺伝学研究所助手 Res. Assoc., National Inst. of Genetics Hideo TEZUKA	手塚英夫

During the last decade, a number of mutagens have been detected in our environment including medicines, insecticides, food additives, cosmetics, cooked foods, water, and atmosphere, by various test systems. These tests, however, have almost concerned with the quantitative effects of single mutagens and some detailed mechanism of their mutagenic activity. In our environment, more than two different mutagens are coexist and have complex effects on the human being. In the present study, the combined effects of some typical mutagens on the induction of mutations and chromosome aberrations were examined by using Chinese hamster V79 cells in culture.

### 1. Combined effects of two mutagens having the same action mechanism.

Two chemicals used as mutagens which have the same action mechanism were ethyl methanesulfonate (EMS) and methyl methanesulfonate (MMS). V79 cells were treated with EMS and MMS simultaneously for 3, 6, 9, and 12 hours. The surviving fractions and the frequencies of 6-thioguanine (6TG)-resistant and ouabain (OUA)-resistant mutations induced by treatment with these two chemicals were compared with the theoretical values calculated from those obtained by treatment of cells with these two chemicals separately.

When EMS at a concentration giving about 80% surviving fraction was combined with MMS at various concentrations, their cytotoxicity after simultaneous treatments for 3, 6, 9, and 12 hours was stronger than the theoretical values calculated from separate treatments with the single chemicals. When the concentration of MMS was fixed to give about 80% surviving fraction, and combined with EMS at various concentrations, the results obtained were the same. These indicate that a synergistic effect of EMS and MMS was detected on surviving fractions of Chinese hamster V79 cells.

When EMS at a concentration giving about 80% surviving fraction was combined with MMS at various concentrations, the frequency of 6TG-resistant mutations induced by simultaneous treatment with these two chemicals for 3, and 12 hours was higher than the theoretical values calculated from separate treatments with the single chemicals. When the concentration of MMS was fixed to give about 80% surviving fraction, and combined with EMS at various concentrations, the frequency of 6TG-resistant mutations induced after treatments for 6 and 9 hours was slightly higher than the theoretical values. These results indicate that a synergistic effect of EMS and MMS was partly found on the induction of 6TG-resistant mutations.

When an interval of 3 hours was inserted between two single treatments with EMS and MMS, the surviving fractions obtained were higher than those obtained without interval. The presence of this interval also reduced the frequency of 6TG-resistant mutations. This suggests that some repair mechanism(s) may be operated in the process of induction of cell killing and mutation after treatment with the first chemical.

### 2. Combined effects of two mutagens having different action mechanisms.

Two chemicals used as mutagens which have different action mechanisms were EMS which

was used in the previous experiment, and cytosine arabinoside (Ara-C) which inhibits the synthesis of DNA polymerase and produces DNA damages indirectly.

Cells was simultaneously treated with EMS and Ara-C for 6 hours and the surviving fractions and the frequencies of 6TG-resistant mutations of cells were compared with the theoretical values calculated from those obtained by treatment with single chemical of EMS or Ara-C separately.

The simultaneous treatment of cells with Ara-C at a concentration of  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $LD_{20}$ ) and EMS at various concentrations results in higher lethality of cells than the theoretical values. When EMS at a concentration of  $4 \times 10^{-3} \text{M}$  ( $LD_{20}$ ) was combined with Ara-C at various concentrations and used for simultaneous treatment of cells, a synergistic effect of both chemicals on survival of cells was also found.

Ara-C alone had no detectable activity in inducing 6TG-resistant mutations, while EMS had a strong mutation-inducing activity. When cells were treated with EMS in the presence of Ara-C at concentration of  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $LD_{20}$ ), the frequency of 6TG-resistant mutations enhanced as twice as that obtained by treatment with EMS alone. When Ara-C at various concentrations was combined with EMS at concentration of  $4 \times 10^{-3} \text{M}$  ( $LD_{20}$ ), the mutation frequency increased depending on the concentration of Ara-C.

These results indicate that EMS and Ara-C had a synergistic effects on survival of V79 cells and that Ara-C enhanced 6TG-resistant mutations induced by EMS, although Ara-C alone had no detectable effect on mutation induction of cells.

### 3. Combined effects of mutagens and antimutagens

The combined effects of mutagens and antimutagens were also examined by using the same system with Chinese hamster V79 cells. The chemical used as mutagen was EMS and the chemicals used as antimutagen were vitamin C and its derivatives.

EMS had a cytotoxic effect on the cells, showing an  $LD_{50}$  of  $541 \mu\text{g/ml}$ . In the presence of vitamin C or its derivatives at concentrations of 50 or  $100 \mu\text{g/ml}$ , the cytotoxicity of EMS expressed at  $LD_{50}$  was reduced to more than  $1,000 \mu\text{g/ml}$  for vitamin C, and  $639 \mu\text{g/ml}$  for *iso*-vitamin C. Dehydro-vitamin C enhanced the cytotoxicity of EMS, giving an  $LD_{50}$  of  $234 \mu\text{g/ml}$ . EMS showed a strong activity for inducing 6TG-resistant mutations in V79 cells. At a concentration of  $1,000 \mu\text{g/ml}$ , EMS induced 6TG-resistant mutations at a frequency of  $88 \times 10^{-5}$ . Vitamin C decreased EMS-induced mutations by 2/3-3/4. Dehydro-vitamin C and *iso*-vitamin C also decreased the EMS-induced mutations by 1/2 to 2/3.

When cells were treated with vitamin C after treatment with EMS, the induced mutation frequency was not affected, while pretreatment with vitamin C was effective in reducing EMS-induced mutations. Vitamin C mixed with EMS and incubated for 2 hours in the absence of cells had a strong effect in reducing mutations. This suggests that vitamin C was desmutagenic rather than antimutagenic against induction of mutations by EMS.

---

## 研究目的

我々人間の環境中に存在する多くの化学物質の中には、細胞中の遺伝子に変異を起こし、発がんの原因となり、また孫に遺伝的障害を起こす物質が少なからず存在する。最近10年余の間に医薬品、農業、食品添加物、化粧品その他、通常我々が摂取する食物や飲料の中、さらに生活環境中の大気、水などの中にも変異原物質の存在することが、種々の検出系を用いて明らかにされてきた。

このような変異原物質の作用については、これまで多くの研究機関でかなり詳細な研究が行なわ

れているが、その多くは単独物質についての量的効果や作用機序に関するものである。しかし、実際の環境中には、これらの変異原物質が単独に存在することは、むしろ希であり、通常は複数の変異原物質が共存し、それらが同時に生体に作用することの方が多と思われる。しかしこのような複数の変異原の生体に対する複合効果については、これまでほとんど研究されていない。哺乳類の培養細胞は、このような複数の化学物質の高等動物に対する複合効果を調べるのには、使用する物質の作用量や処理時間を厳密に規定でき、結果

を定量的に取り扱うことのできる点でもっとも適した検索系の一つである。

本研究は、ヒト、チャイニーズ・ハムスターなどの哺乳類の培養細胞を用いて、代表的ないくつかの環境化学物質について、細胞致死作用や突然変異誘発作用を指標に、それらの複合効果とその機構を明らかにすることを目的としている。

#### 研究経過

昭和59年度に研究助成の決定を受け、昭和60年4月より研究を開始した。まず、当初の研究計画に基づいて、第1年度は、高等動物細胞としてチャイニーズ・ハムスター V79 細胞のクローン系を用いて、6-チオグアニン (6TG) 抵抗性 (HGPR 酵素欠損) やウワバイン (OUA) 抵抗性 (Na/K-ATPase 活性) 突然変異を指標として、2種の異なる変異原物質を同時に作用させたときに誘発される突然変異の頻度が、両者をそれぞれ単独に作用させたときの頻度を加算したものか (加算効果)、加算以上のもの (相乗効果)、加算以下のものか (相殺効果) について調べた。

変異原物質としては、DNA のグアニンをアルキル化し、複製を通じて塩基置換を起こさせる物質で、共通の標的をもつと考えられる既知変異原物質であるエチル・メタンサルフォネート (EMS) とメチル・メタンサルフォネート (MMS) を用いて、6, 9, 12 時間の両物質同時処理、両物質それぞれ3時間ずつの継続処理、さらに両物質処理の間に3時間の保温時間を入れたものなどを行なった。

昭和61年度の第2年度には、作用機序を全く異なる2種の変異原物質について、それらを同時に作用させたときに、その複合効果がどのように現れるかについて調べた。変異原物質としては、DNA に直接塩基置換を通じて変異を起こすアルキル化剤で第1年度にも使用した EMS と、それとは全く作用機序が異なり、DNA ポリメラーゼ合成阻害により間接的に DNA 合成に障害を与える代謝拮抗剤であるシトシンアラビノシド (Ara-C) を使用し、これらを複合的に作用させたときに誘発される 6TG 抵抗性突然変異が、それぞれの物質を単独で作用させたときと比較して、

どのように現れるかを調べた。

昭和62年度の第3年度においては、変異原物質と変異原作用を抑制する作用のある抗変異原物質について、それらの複合効果を調べた。変異原物質としては、これまで使用してきた EMS を用い、抗変異原物質としては、緑茶やいちご、パイナップル、みかんなどの果物、キャベツ、ほうれん草、ピーマンなど緑色植物に多量に含まれ、壊血病に有効であることが知られているビタミン C およびその誘導体を用いた。使用した細胞はこれまでと同じくチャイニーズ・ハムスター V79 細胞で、EMS とビタミン C (L-アスコルビン酸)、またはその誘導体としてデヒドロ・ビタミン C (デヒドロ・アスコルビン酸)、およびイソビタミン C (D-イソ・アスコルビン酸) を単独、または同時に3時間、細胞を処理し、6TG 抵抗性を指標として、突然変異誘発率に与える影響を調べた。

このような研究経過をたどって作用機序を同じくする EMS と MMS の2種の変異原物質では、両物質の同時処理で、細胞生存率および突然変異誘発率において、相乗効果がみられたが、加算的な場合もあり、両物質の処理の時間の間に無処理の保温時間をおくと、細胞生存率および突然変異の修復が起こることが示唆された。一方、EMS と Ara-C のような作用機序を異にする2種の変異原物質では、ことに単独ではほとんど突然変異を誘発しない Ara-C のような変異原物質は、EMS の突然変異誘発率を著しく増加させた。さらに EMS と、抗変異原作用があると推測されたビタミン C を同時に作用させたときは、ビタミン C は EMS による細胞致死作用を約 1/2 に減少させ、6TG 抵抗突然変異誘発率を 1/3~1/4 に減少させた。デヒドロ・ビタミン C およびイソ・ビタミン C は、いずれも EMS による突然変異誘発率を 1/2~1/3 に低下させた。以上のように、本研究では非常に単純化された哺乳類の培養細胞を用いて、それぞれ作用の異なった2種の変異原物質を組み合わせて、その複合効果を検索し、化学物質の複合効果を推測する上でのきわめて示唆に富んだ研究成果を得た。

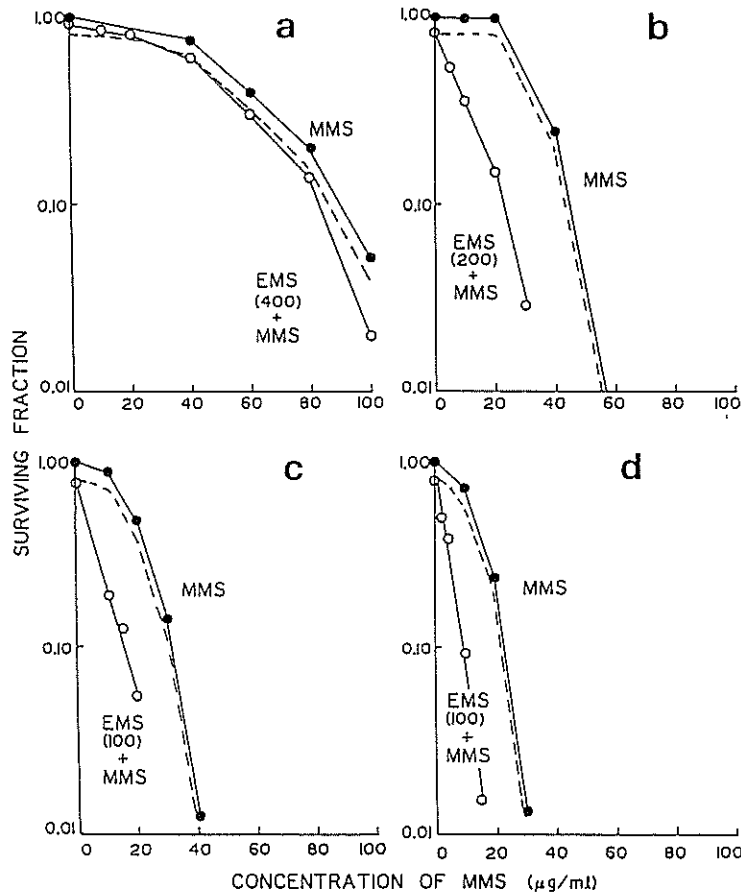


図1. チャイニーズ・ハムスター V79 細胞の細胞生存率に対する EMS と MMS の複合効果。 a: 3 時間処理, b: 6 時間処理, c: 9 時間処理, d: 12 時間処理。●: MMS 単独処理, ---- EMS と MMS の単独処理より得られた理論値, ○: EMS と MMS の同時処理。

## 研究成果

### 1. 作用機作を同じくする 2 種の変異原物質の複合効果

作用機作を同じくする変異原物質として, EMS と MMS を用い細胞生存率に対する両物質の影響は, 60 mm のシャーレにまいた  $4 \times 10^2$  個の細胞が形成するコロニー数で調べた。突然変異誘発作用の検索には, 100 mm のシャーレに  $2 \times 10^5$  細胞をまき, これを変異原物質で 3 時間処理し, 6 日間の突然変異発現期間において, 細胞を再播種し,  $5 \mu\text{g/ml}$  の 6TG, または  $1.25 \text{ mM}$  の OUA で選択培養して形成された 6TG または OUA 抵抗性細胞のコロニーを算定して, 突然変

異誘発率を算出した。

EMS 単独処理では, 細胞生存率は EMS の濃度の増大とともに低下するが, EMS の濃度を細胞生存率 80% にする濃度に一定にし, これに種々の濃度の MMS を 3, 6, 9, 12 時間同時に作用させたときの細胞生存率を, 両物質それぞれ単独で作用させたときの細胞生存率を相乗した理論値と比較して示したのが図 1 である。EMS および MMS をそれぞれ単独で作用させたときの細胞生存率の積に比較して, 両物質を同時処理したときの細胞生存率は, いずれの処理時間においても低く, 細胞は両物質の同時処理により強い致死作用を受けることが分かった。

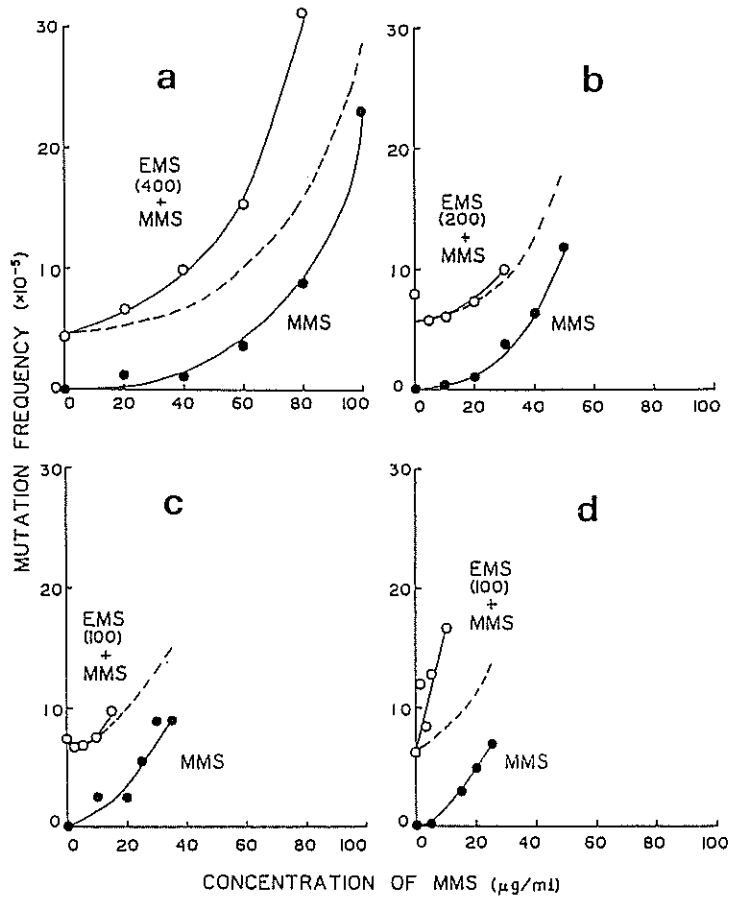


図2. チャイニーズ・ハムスター V79 細胞の 6TG 抵抗性突然変異誘発に対する EMS と MMS の複合効果. a: 3 時間処理, b: 6 時間処理, c: 9 時間処理, d: 12 時間処理. ●: MMS 単独処理, ---- EMS と MMS の単独処理より得られた理論値, ○: EMS と MMS の同時処理.

MMS の環境を一定にして、これに種々の濃度の EMS を同時処理したときの細胞生存率に対する影響もほぼ同様で、MMS と EMS を同時に処理した場合には、両物質をそれぞれ単独で作用させた場合の両物質の細胞生存率の積よりも低い値を示した。

突然変異誘発に対する EMS と MMS の複合効果については、EMS の濃度を一定にして、MMS の濃度を種々に変化させ、両物質を同時に作用させたときの 6TG 抵抗性突然変異の誘発率を、両物質それぞれ単独で作用させたときの突然変異誘発率の和と比較した結果を図 2 に示した。

6 時間処理および 9 時間処理の場合には、両物

質を同時に作用させたときの 6TG 抵抗性突然変異誘発率は、それぞれ単独で作用させたときの突然変異誘発率を加算した理論値とほとんど差異が認められないが、3 時間処理および 12 時間処理では、明らかに単独処理の値を加算した理論値よりも多くの突然変異を誘発することが分かった。

MMS の濃度を一定にして、EMS の濃度を種々に変化させ、両物質を同時処理させた場合の 6TG 抵抗性突然変異の誘発率は、両物質をそれぞれ単独で処理したときの突然変異の誘発率を加算した理論値と比較して、6 時間と 9 時間の処理でやや増大がみられるが、3 時間および 12 時間処理では、ほとんど差異が認められず、相乗効果

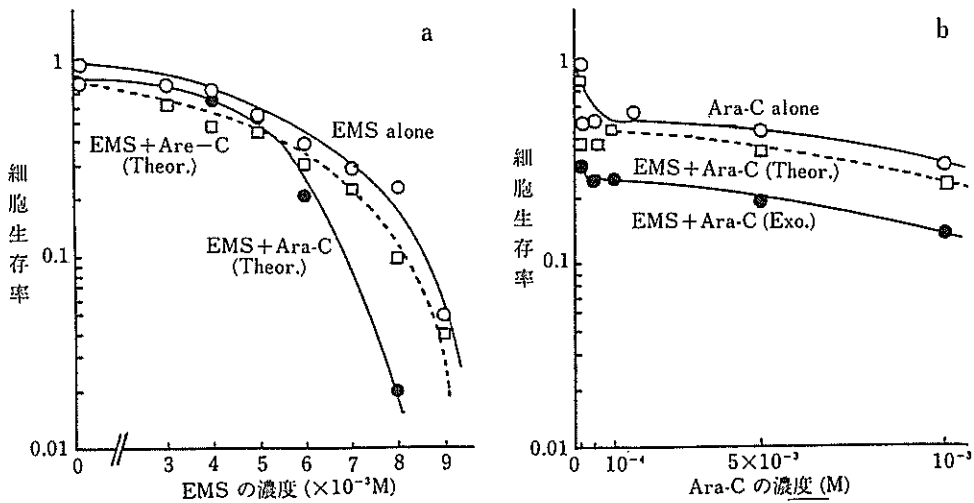


図3. チャイニーズ・ハムスター V79 細胞の細胞生存率に対する EMS と Ara-C の複合効果。 a: 一定濃度の Ara-C と種々の濃度の EMS の同時処理による複合効果, b: 一定濃度の EMS と種々の濃度の Ara-C の同時処理による複合効果, ○: EMS または Ara-C 単独処理, □: EMS と Ara-C の単独処理より得られた理論値, ●: EMS と Ara-C の同時処理。

はみられなかった。

EMS と MMS の両物質各 3 時間処理の間に、3 時間正常培養液中で細胞を保温すると、両物質同時処理の場合や両物質処理の間に保温時間をおかないで、連続処理をした場合に比較して、細胞生存率が増大し、また、6TG 抵抗性突然変異誘発率が減少することが認められた。

OUA 抵抗性を指標とした場合には、EMS は OUA 抵抗性突然変異を誘発するが、MMS は OUA 抵抗性突然変異をほとんど誘発しない。したがって EMS と MMS を同時処理した場合でも、突然変異の誘発率は、EMS 単独の場合とほとんど差異がない。しかし、両物質を 3 時間ずつ継続的に処理すると、誘発率は上昇し、また、両物質の 3 時間ずつの処理の中間に無処理の保温時間をおくと、誘発率が減少し、突然変異の修復の起こることが示唆された。

## 2. 作用機作を異にする 2 種の変異原物質の複合効果

作用機作を異にする変異原物質として、EMS と Ara-C を用いて、同時処理したときの細胞生存率および 6TG 抵抗性突然変異誘発率を、それぞれ単独で処理したときの細胞生存率の積および

6TG 抵抗性突然変異誘発率の和と比較した。細胞生存率に対する影響を調べた結果は図 3 に示したように、それぞれの  $LD_{50}$  の値は EMS が  $5.3 \times 10^{-3}$  M, Ara-C が  $3.5 \times 10^{-6}$  M であった。次に一方の物質の濃度を一定にして、他方の濃度を種々に変化させて、両物質を同時作用させたときの細胞生存率に与える影響を調べ、両物質をそれぞれ単独で作用させたときの細胞生存率の積と比較した。

まず、Ara-C の濃度を一定にして、EMS の濃度を変化させて同時処理した場合には、両物質をそれぞれ単独で作用させたときの細胞生存率の積よりも細胞生存率は低下し、両物質の細胞致死作用は相乗的なものであった。これに対して、EMS の濃度を一定にし、Ara-C の濃度を変化させて同時処理したときは、両物質を単独で作用させたときの理論値よりもやや低い値を示し、相乗的なものであった。

6TG 抵抗性突然変異誘発に対する作用は、EMS 単独では図 4a に示したように EMS の濃度の増大とともに多数の 6TG 抵抗性突然変異が誘発され、 $9 \times 10^{-3}$  M の EMS で  $54.4 \times 10^{-6}$  の突然変異誘発率を示した。一方、Ara-C 単独では図

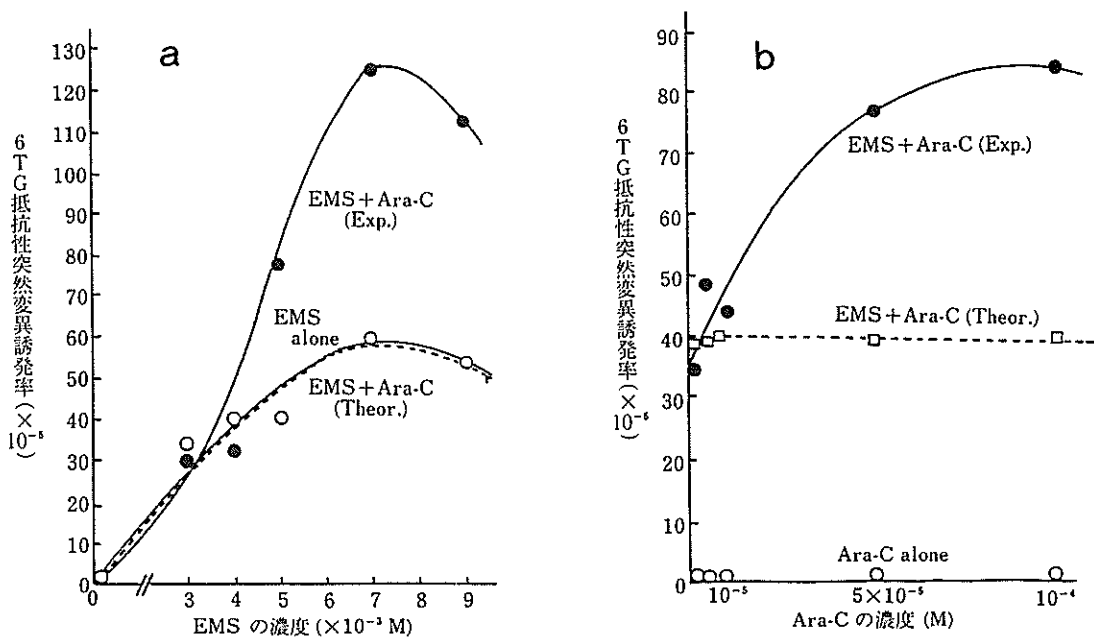


図4. チャイニーズ・ハムスター V79 細胞の 6TG 抵抗性突然変異誘発に対する EMS と Ara-C の複合効果。  
 a: 一定濃度の Ara-C と種々の濃度の EMS の同時処理による複合効果。 b: 一定濃度の EMS と種々の濃度の Ara-C の同時処理による複合効果。○: EMS または Ara-C 単独処理。□: EMS と Ara-C の単独処理より得られた理論値。●: EMS と Ara-C の同時処理。

4b に示したようにほとんど突然変異は誘発されず、細胞生存率を 24.5% に低下させる  $1 \times 10^{-4}$  M の Ara-C でも突然変異はまったく検出されなかった。

次に一方の物質の濃度を  $LD_{20}$  を与える濃度に一定にし、他方の物質の濃度を種々に変化させて同時処理したときの 6TG 抵抗性突然変異誘発率を調べ、両物質をそれぞれ単独処理した場合の突然変異誘発率の和と比較した。Ara-C の濃度を一定にして、EMS の濃度を変化させて同時処理したときの突然変異誘発率は、Ara-C が単独ではほとんど突然変異を誘発しないにもかかわらず、EMS の突然変異誘発率を約 2 倍に増大させ、明らかな相乗効果を示した。

これに対して、EMS の濃度を一定にして、Ara-C の濃度を変化させて同時処理したときの突然変異誘発率は図 4b のようになり、この場合も Ara-C 単独ではほとんど突然変異を誘発しないのに、EMS による突然変異誘発率を増大させ、

明らかに相乗効果のあることを示した。

このような EMS と Ara-C のように、作用機序を異にする変異原物質を同時に作用させたときは、Ara-C のように単独ではほとんど突然変異を誘発しないものでも、EMS の突然変異誘発率を著しく増大させ、作用機序を同じくする変異原物質の複合効果よりも著しく強い相乗効果を示すことが分かった。

### 3. 変異原物質と抗変異原物質の複合効果

変異原物質としてこれまで使用してきた EMS を用いて、EMS の変異原性を抑制する物質としてビタミン C およびその誘導体との複合効果について調べた。種々の濃度の EMS とビタミン C またはその誘導体としてデヒドロ・ビタミン C およびイソ・ビタミン C で細胞を 3 時間処理した場合の細胞生存率に対する複合効果を表 1 に示した。

ビタミン C を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加すると、EMS による細胞致死作用が著しく減少し、ビタミン C は

表1. チャイニーズ・ハムスター V79 細胞における EMS の細胞致死作用に対するビタミン C およびその誘導体の作用.

EMS の濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	細胞生存率			
	EMS 単独	ビタミン C 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加	デヒドロ・ビタミン C 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加	イソ・ビタミン C 50 $\mu\text{g/ml}$ 添加
0	1.00	1.00	1.00	1.00
100	0.72	1.29	0.69	1.06
200	0.70	0.99	0.56	0.99
400	0.68	1.39	0.29	0.94
600	0.44	1.26	0.13	0.66
800	0.29	1.29	0.04	0.16
1,000	0.09	0.58	0	0.13
EMS の $LD_{50}$ 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )	541	>1,000	234	639

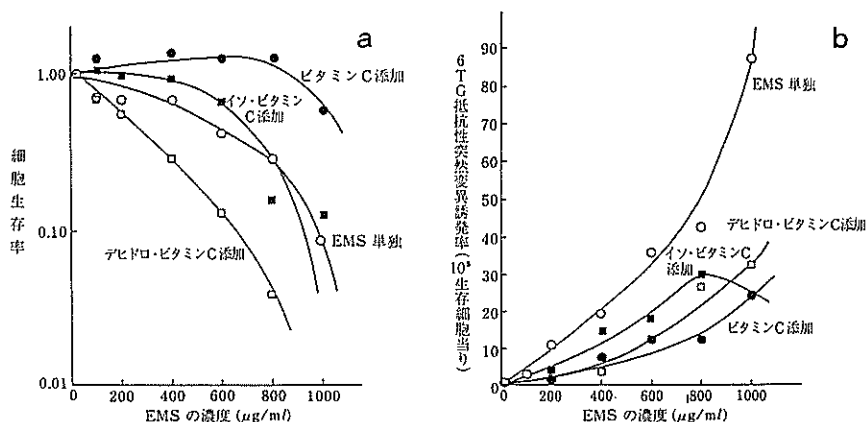


図5. チャイニーズ・ハムスター V79 細胞の細胞生存率 (a) および 6TG 抵抗性突然変異誘発 (b) に対する EMS とビタミン C およびその誘導体の複合効果. ○: EMS 単独処理. ●: EMS とビタミン C 同時処理. □: EMS とデヒドロ・ビタミン C 同時処理. ■: EMS とイソ・ビタミン C 同時処理.

EMS の細胞致死作用を強く抑制することが分かった。これに対して、デヒドロ・ビタミン C の 100  $\mu\text{g/ml}$  を EMS と同時に細胞に作用させると、EMS による細胞致死作用を増大させる傾向を示した。また、イソ・ビタミン C はビタミン C よりは弱いながらも、EMS の細胞致死作用を低下させる作用を示した。これら EMS 単独およびビタミン C またはその誘導体同時処理の場合の細胞生存曲線を図 5a に示した。

6TG 抵抗性突然変異誘発率に対する EMS 単独処理およびビタミン C またはその誘導体との同時処理の影響を調べた結果を表 2 に示した。

すなわちビタミン C を 100  $\mu\text{g/ml}$  添加する

と、EMS による突然変異誘発率は、EMS 単独の場合に比して著しく減少し、1/3~1/4 になった。デヒドロ・ビタミン C を 100  $\mu\text{g/ml}$  添加した場合も、EMS による突然変異誘発率が減少し、EMS 単独の場合の 1/2~1/3 になった。イソ・ビタミン C を 50  $\mu\text{g/ml}$  添加した場合も、デヒドロ・ビタミン C 添加の場合と同様に、EMS による突然変異誘発率を減少させる作用が認められた。これら EMS 単独処理、および EMS とビタミン C またはその誘導体の同時処理の場合の 6TG 抵抗性突然変異誘発率の比較を図 5b に示した。これによっても、ビタミン C およびその誘導体は、いずれも EMS による突然変異の誘発率



表2. チャイニーズ・ハムスター V79 細胞における EMS の突然変異誘発作用に対するビタミン C およびその誘導体の作用.

EMS の濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	6TG 抵抗性突然変異誘発率 $10^5$ 生存細胞当り			
	EMS 単独	ビタミン C 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加	デヒドロ・ビタミン C 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加	イソ・ビタミン C 50 $\mu\text{g/ml}$ 添加
0	0	0	0	0
100	3.0	2.5	1.5	3.6
200	11.0	1.2	3.5	5.6
400	19.5	7.7	13.9	15.4
600	36.0	12.3	13.4	18.1
800	43.0	12.2	26.7	30.7
1,000	87.5	24.7	32.7	25.0

を著しく減少させることが分かった。

#### 考察と今後の課題

本研究においては、高等動物の細胞としてチャイニーズ・ハムスター V79 細胞を用いて、代表的ないくつかの変異原物質とその抑制物質について、細胞致死作用や突然変異誘発作用を指標としてそれらの複合効果について検索した。この結果、EMS と MMS のようないずれも DNA の共通標的塩基をもつと考えられる物質の複合効果は、両物質の同時処理で、細胞生存率および突然変異誘発率において、相乗効果がみられたが、加算的な場合もあり、両物質の処理の中間に無処理の保温時間をおくと、細胞生存率および突然変異の修復が起こることが示唆された。

このような作用機作を同じくする変異原物質の複合効果については、今後さらに染色体異常や姉妹染色分体交換 (SCE) を指標にして、これらの物質の複合効果を調べると同時に、4NQO と紫外線などのような変異原の物理化学的な差異はあるが、作用機構が類似した変異原の複合効果についても研究を進めることが必要である。

次に、EMS と Ara-C のように作用機作を異にする変異原物質の同時処理による複合効果は、Ara-C のように単独ではほとんど突然変異を誘発しないものでも、EMS の突然変異誘発率を著しく増大させることが分かった。EMS は DNA のグアニン塩基をアルキル化し、DNA 複製を通じて塩基置換を起こさせることが知られている。したがって、DNA の複製に関与する DNA ポリ

メラーゼの阻害物質である Ara-C は、このような DNA 複製の過程で、間違った塩基を取込ませて、塩基置換によって突然変異の誘発を高めるのではないかと考えられる。これらの場合の複合効果については、さらに異なった変異原物質の組合せを用いて、研究を進める必要がある。

さらに、変異原物質と抗変異原物質との複合効果も重要な課題である。本研究では、変異原として EMS を、またその抑制物質としてビタミン C およびその誘導体について、EMS との同時処理による複合効果を調べた。この結果、ビタミン C およびその誘導体は、いずれも EMS の突然変異誘発率を著しく減少させることが分かった。ビタミン C は  $10^{-3}$  M (=172.12  $\mu\text{g/ml}$ ) 以上の高濃度では、染色体異常や不定期 DNA 合成を誘発し、Ames のサルモネラ菌によるテストでも、変異原性のあることが報告されている。本研究においても、チャイニーズ・ハムスター V79 細胞のビタミン C による細胞致死作用はかなり強く、高濃度のビタミン C は生体にとって有害であることが示されている。

我々が通常食物から摂取しているビタミン C の量は、20~500  $\mu\text{g/kg}$  体重といわれ、これは約  $1\sim 25 \times 10^{-4}$  M に相当する。本研究に使用した 100  $\mu\text{g/ml}$  (=5.7  $\times 10^{-4}$  M) までの低濃度のビタミン C は、チャイニーズ・ハムスター V79 細胞で、EMS によって誘発される突然変異を著しく低下させる作用があった。デヒドロ・ビタミン C はビタミン C より水素原子が 1 個少ないもので

あるが、イソ・ビタミンCとともに、細胞毒性はビタミンCよりも強く、またEMSによる突然変異誘発率の抑制効果は、ビタミンCよりも弱かった。ビタミンC以外のビタミン類やホルモンなど、生体内で代謝や分泌、その他種々の調節作用が知られている生理活性物質が、生体外から摂取された多くの変異原物質に対してどのような効果があるのかは今後検討されるべき重要な課題である。

#### 謝 辞

本研究は昭和60年度から3年間にわたって、日産科学振興財団の研究助成によって実施されたものである。ここに深甚なる感謝の意を表する。また、この研究の実施に当たっては、国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門および変異遺伝研究部門の研究員の方々のご助力を得た。ここに記して深く感謝を申しあげる。

#### 研究発表

- 1) Kuroda, Y., Hayatsu, H. and Negishi, K.: Mutagenic activity of cytidine analogs in cultured Chinese hamster V79 cells. 4th International Conf. on Environ. Mutagens, Stockholm, Sweden, (June 24 1985).
- 2) Kuroda, Y.: Genetic and chemical factors affecting chemical mutagenesis in cultured mammalian cells. International Conf. on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. Lawrence, Kansas, U. S. A., (October 9 1985).
- 3) 黒田行昭: 培養細胞に対する疑変異原性発がん物質の突然変異誘発作用. 日本組織培養学会第58回大会(箱根), (1985年5月16日).
- 4) 黒田行昭: 培養細胞におけるビタミンCの抗変異原作用. 日本環境変異原学会第14回大会(秋田), (1985年9月30日).
- 5) 黒田行昭: 環境化学物質の変異原性とそのとらえ方—試験方法の面から. 日本環境変異原学会第14回大会(秋田), (1985年10月1日).
- 6) 小島 肇, 小西宏明, 黒田行昭: 培養細胞に対する化学変異原の複合効果. I. MMSとEMSによる突然変異誘発作用. 日本環境変異原学会第14回大会(秋田), (1985年9月30日).
- 7) 新川加奈子, 黒田行昭, 森本兼麩, 小泉 明: 培養細胞に対する化学変異原の複合効果. II. EMSとAra-Cによる突然変異誘発作用. 日本環境変異原学会第14回大会(秋田), (1985年9月30日).
- 8) 手塚英夫, 玉井功一, 泉 早苗, 賀田恒夫: マウ

スにおけるプレオマイシンの小核誘起性. 日本環境変異原学会第14回大会(秋田), (1985年10月1日).

- 9) 井上 正, 手塚英夫, 高橋淳子, 相川勝弘, 賀田恒夫: ヒト遺伝病ATのモデル動物としての*wst*マウスの検討—分離細胞に対するDNA傷害物質の作用. 日本遺伝学会第57回大会(神戸), (1985年10月13日).
- 10) 黒田行昭: 哺乳類培養細胞を用いた突然変異検出の特異性. 日本たばこ産業(株)中央研究所セミナー(秦野), (1986年3月19日).
- 11) 黒田行昭: ヒト胎児組織における加令にともなう突然変異の集積. 日本基礎老化学会第10回大会(東京), (1986年7月14日).
- 12) 黒田行昭: 培養哺乳動物細胞に対するビタミンCおよびその誘導体の抗変異原作用. 日本組織培養学会第59回大会(東京), (1986年7月14日).
- 13) 黒田行昭: 哺乳動物細胞に対するビタミン類の変異原修飾作用. 日本環境変異原学会第15回大会(東京), (1986年10月3日).
- 14) 小島 肇, 黒田行昭: 哺乳動物培養細胞における突然変異試験. 日本産業皮膚衛生協会第12回研究発表会(京都), (1986年5月16日).
- 15) 小島 肇, 小西宏明, 黒田行昭: L-アスコルビン酸の抗変異原性. —哺乳動物培養細胞を用いて—, 日本化粧品科学会第11回学術大会(東京), (1986年6月5日).
- 16) 小島 肇, 小西宏明, 黒田行昭: 培養細胞に対する化学変異原の複合効果. III. MMSとEMS処理の時間差による影響. 日本環境変異原学会第15回大会(東京), (1986年10月3日).
- 17) 野村明徳, 根岸和雄, 早津彦哉, 黒田行昭: ヌクレオシドアナログによる動物細胞の突然変異. DNA非損傷型のイニシエーターを旨として, 日本癌学会第45回総会(札幌), (1986年10月21日).
- 18) 手塚英夫, 玉井功一, 村上和生, 賀田恒夫: マウス過令と小核誘発. 日本環境変異原学会第15回大会(東京), (1986年10月).
- 19) 手塚英夫, 玉井功一, 井上 正, 賀田恒夫: Wasted mouseの放射線感受性—染色体異常と小核による検討. 日本放射線影響学会第29回大会(金沢), (1986年10月).
- 20) 黒田行昭: 動物培養細胞を用いた突然変異試験の進め方. ソフト技研講習会, (東京), (1987年1月21日).
- 21) 黒田行昭: 動物培養細胞を用いた突然変異試験の進め方. ソフト技研講習会, (東京), (1987年6月22日).
- 22) 黒田行昭: 哺乳動物細胞に対するビタミンAおよびビタミンEの変異原修飾作用とその機作. 日本環境変異原学会第16回大会, (京都), (1987年10月28日).
- 23) 黒田行昭: 培養細胞を用いた変異原検出とその特

性。九動安全性研究所セミナー，(鳥栖)，1987年12月14日。

- 24) 手塚英夫，井上 正：放射線感受性変異体 wasted マウスにおけるガンマ線誘発染色体異常の組織特異性。日本環境変異原学会第16回大会，(京都)，(1987年10月28日)。
- 25) 手塚英夫，井上 正：放射線感受性変異体 wasted マウスにおけるガンマ線誘発染色体異常の組織特異性の解析。日本遺伝学会第59回大会(筑波)，(1987年10月29日)。
- 26) 手塚英夫，井上 正：放射線感受性変異体 wasted マウスにおけるガンマ線誘発染色体異常の組織特異性の解析と細胞分化との関連。日本放射線影響学会第30回大会，(東京)，(1987年11月30日)。

#### 発表論文

- 1) Kuroda, Y., Hayatsu, H. and Negishi, K.: Mutagenic activity of cytidine analogs in cultured mammalian cells. *Mutation Res.*, **147**, 262-263 (1985).
- 2) Kuroda, Y., Yokoiyama, A. and Kada, T.: Assays for the induction of mutations to 6-thioguanine resistance in Chinese hamster V79 cells in culture. (Eds. by Ashby, J., de Serres, F. J., Draper, M., Ishidate, Jr., M., Margolin, B. H., Matter, B. E. and Shelby, M. D.), pp. 537-542. Elsevier Sci. publ., Amsterdam, Oxford, New York (1985).
- 3) Kuroda, Y., Negishi, K. and Hayatsu, H.: Mutagenic activity of cytidine analogs in cultured Chinese hamster cells. *Ann Rep. Nat. Inst. Genet. Jpn.*, **35**, 35-36 (1985).
- 4) Kuroda, Y.: Antimutagenic activity of vitamin C in cultured mammalian cells. *Mutation Res.*, **164**, 273 (1986).
- 5) Kojima, H., Konishi, H. and Kuroda, Y.: Combined effects of chemicals on mammalian cells in culture. I. Effects of methyl methanesulfonate (MMS) and ethyl methanesulfonate (EMS) on the mutation induction. *Mutation Res.*, **164**, 272 (1986).
- 6) Shinkawa-Tachi, K., Morimoto, K., Koizumi, A. and Kuroda, Y.: Combined effects of chemicals on mammalian cells in culture. II. Effects of ethyl methanesulfonate (EMS) and arabinosyl cytosine (Ara-C) on mutation induction. *Mutation Res.*, **164**; 281 (1986).
- 7) Tezuka, H., Inoue, T., Noguchi, T., Kada, T. and Shultz, L. D. Evaluation of the mouse mutant

"wasted" as an animal model for ataxia telangiectasia. I. Age-dependent and tissue-specific effects. *Mutation Res.*, **161**, 83-90 (1986).

- 8) Inoue, T., Aikawa, K., Tezuka, H., Kada, T. and Shultz, L. D.: Effect of DNA damaging agents of isolated spleen cells and lung fibroblasts from the mouse mutant "wasted", a putative animal model for ataxia-telangiectasia. *Cancer Res.*, **46**; 3979-3982 (1986).
- 9) Kuroda, Y.: Genetic and chemical factors affecting chemical mutagenesis in cultured mammalian cells. In "Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: Mechanisms" (eds., Shankel, D. M., Hartman, P. E., Kada, T. and Hollaender, A.), Plenum Press, New York (1986).
- 10) Kojima, H., Konishi, H. and Kuroda, Y.: Combined effects of chemicals on mammalian cells in culture. Effects of order and intervals of administration of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate. *Mutation Res.*, **182**, 364 (1987).
- 11) Kuroda, Y.: Antimutagenic mechanism of vitamin C and its derivatives in mammalian cells in culture. *Mutation Res.*, **182**, 365, (1987).
- 12) 黒田行昭：第4回国際環境変異原学会報告4. 哺乳動物培養細胞を用いた突然変異，トランスフォーメーション。トキシコロジーフォーラム，**8**, 713-715 (1985).
- 13) 黒田行昭：培養細胞に対する疑変異原性発がん物質の突然変異誘発作用。組織培養研究，**4**, 29-31 (1985).
- 14) 黒田行昭，西 義介：哺乳動物細胞の突然変異と形質転換。組織培養研究，**4**, 31-32 (1985).
- 15) 手塚英夫：哺乳動物の器官分化と変異原。トキシコロジーフォーラム，**8**, 715-716 (1985).
- 16) Generoso, W. M. (手塚英夫訳)：哺乳動物の生殖細胞における突然変異誘発。トキシコロジーフォーラム，**8**, 716-721 (1985).
- 17) 黒田行昭：培養細胞における Vitamin C の抗変異原作用。環境変異原研究，**8**, 75-77 (1986).
- 18) 黒田行昭：環境化学物質の変異原性とそのとらえ方—試験方法の面から。環境変異原研究，**8**, 9-20 (1986).
- 19) 黒田行昭：ヒト胎児組織における加令にともなう突然変異の集積。基礎老化研究，**10**, 105-106 (1986).
- 20) 黒田行昭：培養哺乳動物細胞に対するビタミンC およびその誘導体の抗変異原作用。組織培養研究，**5**, 124-126 (1986).