
環境変異原の作用閾値の迅速検定法開発に関する研究

The rapid screening method to determine threshold on environmental mutagens

代表研究者 日本専売公社中央研究所生物実験センター研究室長 乾 直道
Biol. Res. Center, The Japan Tobacco and Salt Public Corp.
Naomichi INUI

協同研究者 日本専売公社中央研究所生物実験センター 西 義介
Biol. Res. Center, The Japan Tobacco and Salt Public Corp.
Yoshisuki NISHI

日本専売公社中央研究所生物実験センター 岩田 邦男
Biol. Res. Center, The Japan Tobacco and Salt Public Corp.
Kunio IWATA

Studies of development on "The screening method to determine threshold on environmental mutagen" have continued for 3 years using Syrian hamster *in vivo-in vitro* combination assay.

Pregnant hamster on 11 or 12th of gestation were received various kinds of chemicals intraperitoneally or orally. For measurement of 8-azaguanine (8AG) resistant mutation, the embryos were removed from the treated mothers and cultured. After 7 days expression time culture, the cells inoculated into medium containing 10 $\mu\text{g/ml}$ of 8AG and continued culture for 21 days for selection of mutants. The marked dose dependency of induced mutants were observed on embryonic cells from mothers treated with dimethylnitrosamine (DMN). In this case, induced mutants appeared linearly in high dose treatment. However in low dose level, the pattern of appearance of mutants showed no lineal line and this line attached to spontaneous level between 12.5 and 25 mg/kg treatment. From this result threshold level of DMN for mutation could be in this range. Almost same result were obtained in the case of X-ray irradiation. The marked dose dependency of induced mutants were also observed on the cells from X-ray irradiated mothers in high dose level of irradiation from 125 to 500 rad and appearance pattern of mutants showed linear in this range. Contrary, in the low dose level of irradiation (from 10 to 40 rad) the induced mutations were also obtained dose-dependently, but no linear line of mutation induction was observed.

The treatment of caffeine, hydrocortison and oitphenilphenol (OPP) caused no induction of 8AG-resistant mutation, however other 11 chemicals examined induced a marked dose dependent of 8AG-resistant mutation. In these 11 kinds of chemicals, AF-2, endoxan (cyclophosphamide) and basic fraction of tryptophane pyrolyzate showed a marked strong dose dependent mutagenicity to the hamster embryonic cells. Moderrate mutagenicity were observed on embryonic cells treated with DMN, diethylnitrosamine, Trp-P-1, Trp-P-2 and n-nitrosomorpholine. In this system sodium nitrite, aminopyrine and ethylmethansulfornate caused a week mutagenicity on hamster embryonic cells.

These results show that this system *in vivo-in vitro* combination assay is useful for measurement of intensity of mutagen in our environment.

はじめに

我々をとりまく生活環境中に幾多の環境変異原が存在し、これら変異原が発癌・遺伝疾患の重要

な原因の一つになっているものと思われる。これら変異原を検出する方法は、ネズミチフス菌を始めたとするバクテリア、酵母、哺乳動物細胞、シヨ

ウジ、ウバエ、カイコ、小型哺乳動物を使用した多くの報告がある。しからば、これら変異原に生物に対する最大無作用量、すなわち作用閾値が存在するであろうか？ このことを結論することは大変重要で、かつ大きな問題であるといえよう。しかし現在、化学物質の閾値検索に関する実験系は存在しないと考えられる。しかし実用的に考えた場合、化学物質の生体に対する作用閾値は存在する可能性があるとして推察される。

それは次の四つの場合である。1) 変異原が標的まで到達しない場合、2) 多重標的の場合、3) 多段階の生物反応が変異形成に関与する場合、4) 標的が損傷しても完全な修復が行なわれる場合などである。事実、小型哺乳動物を使用した化学発癌実験においては最大無作用量、すなわち閾値の存在することが報告されている。しかし、現在動物実験その他の系を使用して化学物質の最大無作用量、すなわち閾値の有無を簡便に検出する系はほとんど存在しない。

我々は昭和 55 年以来、本助成を受けシリアンハムスターを使用し経胎盤 *in vivo-in vitro* combination assay の系が閾値検索に適用できるかいなかの検討を行なつて来たので報告する。

研究経過

初めに経胎盤法の大略を示す。妊娠 11~12 日目のシリアンハムスターに経口あるいは腹腔内注射で化学物質の投与を行なう。投与 24 時間後に親ハムスターを屠殺、全胎児を無菌的に摘出する。摘出した胎児を眼科用ハサミで細片する。細切した組織片をハンクス液に溶解した 0.25% トリプシン溶液で、室温 40~45 分分散する。分散した細胞を遠心して集め (600~800 rpm・5 分)、細胞をイーグルの最少必要培地 (MEM) に牛胎児血清 (FBS) を 10% 添加した正常培地で 5~7 日間、37°C、CO₂ ガス 5%、空気 95% の条件下で、突然変異の形質発現のため培養する。フラスコ面で細胞が単層培養状態に達したら必要に応じて Subculture を行ない培養を継続する。形質発

表 1. AF-2 経口投与によるハムスター 8 アザグアニン耐性細胞の出現^b

| Compound and dose | 8AG dose (μg/ml) | Survival ^a (%) | Mutant Colonies | | | Revertants/10 ⁷ cells ^e |
|--------------------|------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------|---|
| | | | Colonies/10 ⁷ cells | Induced colonies ^c | Induced ratio ^d | |
| Olive oil (0.5 ml) | | 100 | 5.5±0.45 ^f | — | — | N.D. |
| | | 100 | 1.5±0.15 | — | — | N.D. |
| AF-2 100 mg | 10 | 76.8 | 267.7±35.62 | 262.2 ^g | 48.7 | 0,0,0 |
| | 20 | 76.8 | 58.0±3.25 | 56.5 | 38.7 | N.D. |
| 50 mg | 10 | 66.6 | 97.5±7.38 | 92.0 | 17.7 | N.D. |
| | 20 | 66.6 | 26.3±3.50 | 24.8 | 17.5 | 2,1,0 |
| 20 mg | 10 | 87.7 | 38.2±2.50 | 32.7 | 6.9 | N.D. |
| | 20 | 87.7 | 10.8±3.50 | 9.3 | 7.2 | 0,0,0 |
| 10 mg | 10 | 83.6 | 43.1±16.79 | 37.6 | 7.8 | 0,0,1 |
| | 20 | 83.6 | 3.2±1.91 | 1.7 | 2.2 | N.D. |
| 5 mg | 10 | 90.1 | 28.3±11.22 | 22.8 | 5.1 | N.D. |
| | 20 | 90.1 | 9.8±4.16 | 8.8 | 6.5 | N.D. |
| 2 mg | 10 | 94.5 | 19.6±6.08 | 14.1 | 3.6 | N.D. |
| | 20 | 94.5 | 7.6±1.09 | 6.1 | 5.9 | N.D. |

^a 5×10⁶ cells were plated per 60-mm dish.

^b Over 10 dishes were used at each selection dose.

^c Values are corrected for the survival rate of the control.

^d The ratio of the induced mutation frequency to the spontaneous mutation frequency.

^e Numbers are those in separate tests.

^f Means and standard deviations of values in over 3 independent experiments.

^g Numbers of induced colonies were calculated as the difference between the mean numbers of mutant colonies from AF-2-treated cells and from control cells.

現時細胞を培養後、細胞を 0.25% トリプシンでフラスコ面より剝離し、 $1 \sim 5 \times 10^5$ /シャーレの割合で 6 cm シャーレに再播種し、突然変異細胞の選択培養を行なう。この選択培養中に正常細胞は死滅し、8AG 耐性突然変異細胞のみが生存してコロニーを形成する。選択培養終了後、突然変異コロニーを含んだシャーレをメタノールで固定し、ギムザ染色を行ない出現したコロニー数を算定する。細胞の生存率算定のため 60 mm シャーレに各 5000 個の細胞を播種し、正常 MEM 培地で 7 日間培養して形成したコロニーを固定染色し、細胞生存率を測定して対照群との相対生存率で表示した。対照としては無処理および DMSO 投与親より得た胎児細胞を使用した。

AF-2 経口投与による突然変異:

AF-2 を経口的に妊娠親ハムスターに 1 回 2~100 mg/kg 投与後、胎児細胞に出現した 8AG 耐性突然変異コロニーの出現頻度を表 1 に示した。表で明らかなように耐性コロニーの誘発数は 8AG 10 $\mu\text{g/ml}$ 選択 100 mg/kg 投与群で 262.2, 50 mg/kg 投与群で 92.0, 20 mg/kg 投与群で 32.7 個と明らかに AF-2 の投与濃度に依存して増加した。この事実は AF-2 の投与濃度を減少して行くとき、AF-2 のこの系における閾値の有無の検索が可能であることを示唆している。実際、

AF-2 5 mg/kg では 8AG 耐性コロニーの出現は対照に比較して 5.1 倍、2 mg/kg 投与では 3.6 倍であった。それ以下の投与量では標準誤差が大きく投与量と誘発コロニー数の関係ははっきりしない。以上の結果から AF-2 の突然変異の閾値は非常に低い値のところにあると推定し、表 1 の出現コロニー数を統計処理を行ない両対数で図表化したものが図 1 である。図 1 で明らかなように AF-2 投与細胞の突然変異コロニーの出現は、2 mg~100 mg 投与群の間で両対数グラフ上できれいな直線を示す。この直線を延長すると線は 0.35 mg/kg 投与を仮定した所で、対照群で出現する自然出現コロニー数と接する。この事象は AF-2 が本系においては 0.35 mg/kg に最大無作用量すなわち閾値をもち、この実験事実より本系が化学物質の最大無作用量、すなわち閾値の検索に使用できる可能性が示唆された。

ジメチルニトロサミンによる突然変異:

強力な発癌剤であり同時に強力な変異原であるジメチルニトロサミン (DMN) を、妊娠ハムスター腹腔内に投与して胎児細胞に出現する 8AG-耐性突然変異細胞の観察を行なった。経胎盤法を使用して出現する DMN 投与後胎児細胞に出現する耐性突然変異コロニー数は、200 mg/kg 腹腔内投与群で 187.8 個、150 mg/kg 投与群で 73.9 個、100 mg/kg 投与群で 39.3 個と DMN の投与

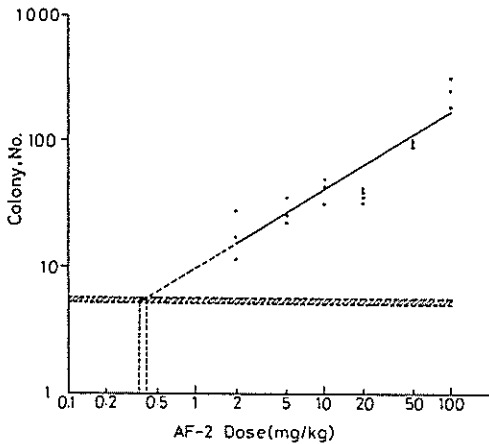


図 1. AF-2 経口投与による 8AG-耐性コロニーの出現 (両対数グラフによる)

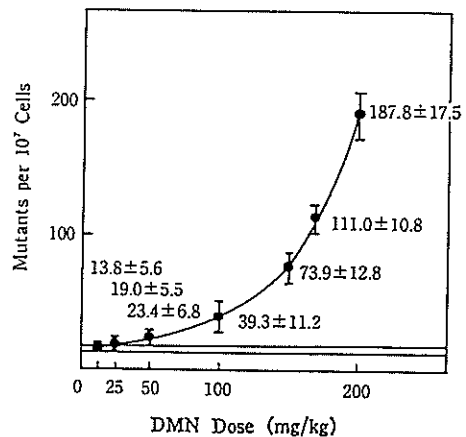


図 2. DMN 投与による 8AG-耐性コロニーの出現

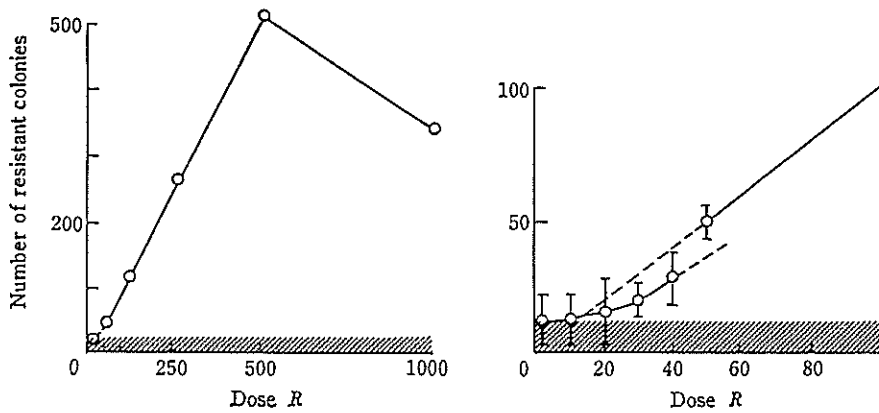


図 3. X線照射母体より得た胎児細胞に出現した 8AG-耐性細胞 (左図, 高照射域, 右図, 低照射域)

濃度に依存して著明な上昇を示した (図 2)。しかし、投与量-突然変異出現率は低用量域で曲線を描き 12.5 mg/kg~25 mg/kg 投与の間で自然誘発突然変異の水準に達する。すなわち、この値の間に最大無作用量、すなわち閾値があるものと推定される。

X 線による突然変異:

以上 2 種の化学物質を使用してその最大有用量の検索を行ってきたが、さらにこの系の安定性、鋭敏性を検討するために細胞を使用した実験系で、いわゆる閾値がないとされている X 線を使用した実験を行なった。その結果を図 3 に示す。図 3 左には ^{60}Co - γ 線 1000 rad から 125 rad の全射照射を行なった母体より得た胎児細胞の 8AG 耐性突然変異コロニーの出現率を示した。図で明らかかなように 125 rad~500 rad 照射群の細胞の突然変異出現率はほぼ直線的に上昇し、この直線を外挿した線は x-y 軸の 0 点と交わる。この結果から X 線には無作用量すなわち閾値がないと推察され、現在まで他の系で得られている知見とよく一致した。図 3 右は 40 rad 以下の低線量域について X 線による突然変異の閾値の有無を詳細に検討した結果である。図で明らかかなように低ドース照射域においては照射量-誘発突然変異の間に直線関係が存在しない。すなわち、X 線照射においても低ドース照射では閾値が存在するようにみえる。この原因は明らかでないが、低ドース照射で

は放射線によって生じた DNA の傷害が、選択培養前の培養中に部分的に修復され見掛け上の閾値が出現したものと考えられる。

以上、AF-2, DMN, X 線を標準物質として経胎盤法が閾値の検索に適用できるか否かを検討してきたが、本系は少なくとも化学物質の変異原性の強弱を検出することは十分可能であるが、その物質の真の閾値を同定するのはかなりむずかしい

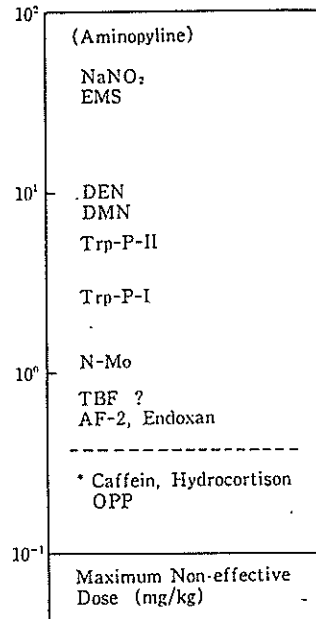


図 4. 経胎盤法による化学変異原の強弱の比較

系と考えられる。しかし、化学物質の見掛け上の閾値を推定することは可能と思われるので、以下数種の化学物質について最大投与量の検索を行った。

化学物質の最大無作用量の検索：

図4に経胎盤法で検索を行なった14種の化学物質の最大無作用量の大きさを示した。検索を行なった14種の物質中3種、すなわちカフェイン、ヒドロコチゾン、オルトフェニルフェノール(OPP)は経胎盤法では変異原作用を示さなかった。AF-2、エンドキサン(シクロフォスファミド)、トリプトファン燃焼成生物塩基性分画(TBF)は極めて強い変異原を示し、その最大無作用量は1 mg/kg以下であった。ニトロソモルホリ(N-Mo)の変異誘起能も強く、無作用量は1 mg/kg付近にあった。ジエチルニトロサミン(DEN)、ジメチルニトロサミン(DMN)、トリプトファン燃焼成生物(Trp-P-I, Trp-P-II)もやや強い変異原であり、その無作用量は10~1 mg/kg投与のところに存在した。メチルメタンスルホネート(EMS)、変異原性は知られているが動物実験で発癌性の証明できない亜硝酸ナトリウムのこの系における無作用はかなり低く20~40 mg/kgであった。本系すなわち経胎盤法で下熱剤として長期間にわたって使用されたアミノピリンにも弱いながら(250 mg/kg)変異原性が認められた。

以上、経胎盤法を使用して化学物質の閾値の検索を行ってきたが、本系では上記した3物質の他に有名な発癌物質であり、かつ変異原であるニトロソグアニジンの変異原性は検出できなかった。

亜硝酸ソーダ・アミノピリン同時投与による変異原性：

化学物質の変異原性、発癌性の検出において大変重要な課題として2種以上の物質の相加、相乗、相殺効果を検索することが大切である。これらの効果を検索する意味で、亜硝酸ソーダ(NaNO_2)、アミノピリン(Ap)を同時投与して、その最大無作用量の変動について実験を行なった。結果を図5に示した。図で明らかのようにAp、 NaNO_2 を各々妊娠ハムスターに50 mg/kg単独で投与した

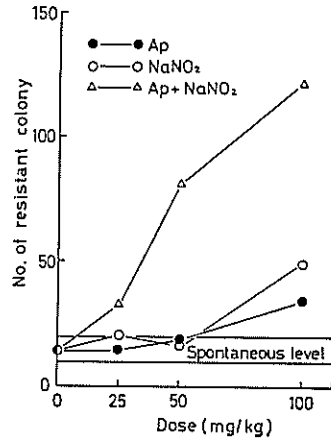


図5. Ap、 NaNO_2 単独あるいは同時投与による8-AG 耐性突然変異コロニーの出現

場合には、胎児細胞に8AG-耐性突然変異は誘発されない。しかしこれらの物質を25 mg, 50 mg/kg, すなわち突然変異が誘発されない量を、同時投与すると著明な突然変異が出現する。これはApと NaNO_2 がハムスターの胃の中で反応してDMNを主体としたニトロサミンが生成され、その生成されたDMNが胎児細胞の突然変異を誘発したと考えられる。このように弱い変異原が2種以上同時摂取される可能性は非常に多い。このような場合に変異原個々の最大無作用量が変わるかどうかは重大な問題である。我々の生活環境の中には多種類の化学物質が存在している。ある検定系で化合物一種数ずつの最大無作用量が検索された時、最大無作用量すなわち閾値以下の2種以上の化学物質が同時に摂取されると、その閾値同士が、相加、相乗的に働くかまたは、相殺的に働くかは非常に大切な問題である。

標的臓器スクリーニング：

変異原を広汎に解釈し、これを発癌のイニシエーターと同義と考えた時、ここに重要な問題がある。周知のように、癌には標的臓器が存在し、ある化学物質は特定な臓器にのみ癌を発生させるのが普通である。その標的臓器ごとに閾値があるか否かを検索する基礎研究として *in vivo-in vitro* combination 法を標的臓器スクリーニングに適用した。実験には生後7~10日目の授乳期シリアンゴールデンハムスターを使用した。N-ニトロソエ

表 2. ENU 投与授乳期ハムスター各臓器細胞に出現した Oua-耐性コロニー

| ENU mg/kg | 0 | | | |
|--------------|---|----|-----|-----|
| | 0 | 50 | 100 | 200 |
| Brain | 0 | 50 | 245 | — |
| Lung | 0 | 0 | 6 | 9 |
| Spleen | 0 | 1 | 0 | — |
| Liver | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kidney | 0 | 0 | 0 | 0 |

チルウレア (ENU) を DMSO に溶解し腹腔投与後 (50~200 mg/kg) 5 時間目に、動物を麻酔して開腹、開胸し心臓より 0.05% コラーゲナーゼを 50 ml 全身還流した。還流終了 5 分後、脳、肺、脾、腎、肝臓を個別に適出し細片、トリプシン分散後、MEM 培養液に牛胎児血清を 10% 添加した培地で 10 日間形質発現培養を行なう。形質発現終了後、同液に 1 mM ウェバイン (Oua) を添加した液で培地交換をしながら 1 か月間、耐性突然変異選択のための培養を行なった。培養終了後シャーレを固定、染色し、出現した Oua 耐性突然変異コロニーを各臓器由来細胞別に算出した。脳・神経系に腫瘍を選択的に発生させる ENU を投与した時出現した Oua 耐性突然変異コロニーの出現を表 2 に示した。表で明らかのように突然変異コロニーは投与濃度依存的に脳由来細胞に出現し、他臓器由来細胞ではほとんど出現しなかった。このことは癌発生の閾値を考える時、今後考慮すべき大きな問題であると推察される。

以上 3 年有余にわたり主として *in vivo-in vitro* combination 法を使用して、迅速、鋭敏かつ安定性のある最大無作用量、すなわち閾値検索系の開発を行ってきたが、本系は少なくとも化学物質の変異原性の強弱、また、ある化合物についてはその見掛け上の閾値の検索をすることは可能であるが、その閾値を正確に同定することはかなりむずかしい系であると考え。しかし、現時点でも化学物質の変異原性の強弱のオーダーエスティメーションを行なうことは可能であると考え。今後さらに系の安定性と鋭敏性をはかっていきたい。

発表論文*

- 1) Inui, N., Nishi, Y., and Hasegawa, M. M.: Induction of 8-azaguanine or ouabain resistant somatic mutation of Chinese hamster lung cells by treatment with tryptophan pyrolysis products. *Cancer Letters*, 9, 185-189 (1980).
 - 2) Nishi, Y., Hasegawa, M. M., Inui, N.: Chromosome changes and *in vitro* transformation of hamster embryonic cells induced by dimethyl-nitrosamine in combination with activation system. *Proc. Jap. Acad.*, 56, Ser B, 41-45 (1980).
 - 3) Iwata, K. and Inui, N.: Establishment of melanoma cell lines in chemically defined medium. *Proc. Jap. Acad.*, 56, Ser. B, 146-151 (1980).
 - 4) Inui, N., Nishi, Y., Hasegawa, M. M., Takeuchi, M., Yamamoto, M. and Tanimura, A.: Induction of 8-azaguanine-resistant mutation and neoplastic transformation of hamster embryonic cells by coadministration of sodium nitrite and aminopyrine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 97, 119-128 (1980).
 - 5) Iwata, K. and Inui, N.: Stimulation of melanogenesis in melanoma cells growing in serum-free medium by fetal bovine serum and dimethyl-sulfoxide. *Proc. Jap. Acad.*, 56, Ser. B, 562-567 (1980).
 - 6) Endo, H., Nada, H., Kinoshita, N., Inui, N. and Nishi, Y.: Formation of a transplacental mutagen, 1,3-di(4-sulfomoylphenyl) triazine, from sodium nitrite and salfanilamide in human gastric juice and in the stomachs of hamster. *J. Nat. Cancer Inst.*, 65, 547-551 (1980).
 - 7) Nishi, Y., Hasegawa, M. M., and Inui, N.: Comparative studies on chromosome aberrations induced by polycyclic hydrocarbons in cell-mediated and microsome-mediated assay. *Mutation Res.*, 79, 337-344 (1980).
 - 8) Inui, N., Nishi, Y., Hasegawa, M. M., and Kawai, K.: Biological activities of diesel exhaust particle on Chinese hamster V-79 cells *in vitro.*, *Proc. 8th. Conf. Occup. Health Chem. Indust.*, 84-88 (1981).
 - 9) Inui, N., and Nishi, Y.: Host-mediated mutagenesis for detection of mutagens/carcinogen. *Gann Mono. Cancer Res.*, 27, 78-84 (1981).
 - 10) Iwata, K., and Inui, N.: Melanogenesis of melanoma cells in a chemically-defined medium., *Pigment Cell* 1981, Univ. Tokyo Press (1981).
- Iwata, K. Inui, N., and Takeuchi, T.: Induction of active melanocyte in mouse skin

- by carcinogens: A new method for detection of skin carcinogens. *Carcinogenesis*, **2**, 589-593 (1981).
- 11) Nishi, Y., Hasegawa, M. M., and Inui, N.: Effect of 2', 3'-dideoxythymidine-a precursor of a specific inhibitor of DNA polymerase β - on induction of sister chromatid exchanges by ethyl methanesulfonate., A preliminary note. *Proc. Jap. Acad.*, **57**, Ser. B., 35-38 (1981).
 - 12) Nishi, Y., Hasegawa M. M., Inui, N., Ikegami, S., and Yamada, M.: Effect of post-treatment with aphidicolin-a specific inhibitor of DNA polymerase α - on sister chromatid exchanges induced by ethyl metansulfonate. *Mutation Res.*, **103**, 155-159 (1981).
 - 13) Nishi, Y., Hasegawa, M. M., Inui, N., Ikegami, S., Yamada, M.: "Effect of post-treatment with aphidicolin, —a specific inhibitor of DNA polymerase α — on sister-chromatid exchanges induced by ethyl methanesulfonate", *Mutation Res.*, **103**, 155-159 (1982).
 - 14) Inui, N., Nishi, Y., and Tanimura, A.: "Induction of 8-azaguanine resistant mutation and neoplastic transformation of hamster embryonic cells by coadministration of sodium nitrite and aminopyrine," *IARC Scientific Publication*, **41**, 585-590 (1982).
 - 15) Nishi, Y., Hasegawa, M. M., and Inui, N.: Production of chromosome pulverization specially associated with the effect of post-treatment with caffeine after treatment with different classes of clastogens in Chinese hamster V-79 cells, *Jan. J. Genet.*, **58**, 11-22 (1983).
 - 16) Shibuya, H. Nishi, Y., Kada, T., and Inui, N.: "Mutagenicity of cyclophosphamide in mammalian cells treated *in vitro* and *in utero*," *Jan. J. Genet.*, **58**, 23-31 (1983).