
環境化学物質の高等動植物に及ぼす遺伝的障害の比較生物学的解析

Comparative biological studies on the environmental chemical mutagenesis
in higher organisms

代表研究者	東京大学農学部教授 Fac. of Agri., Univ. of Tokyo Hikoyuki YAMAGUCHI	山口彦之
協同研究者	東京大学農学部研究生 Fac. of Agri., Univ. of Tokyo Eiichi INAGAKI	稲垣栄一
	国立遺伝学研究所室長 Natl. Inst. Genet. Akio MURAKAMI	村上昭雄
	国立遺伝学研究所主任研究員 Natl. Inst. Genet. Kiyoshi TSUCHIKAWA	土川清
	東京大学農学部助教授 Fac. of Agri., Univ. of Tokyo Shigemitsu TANO	田野茂光

This work has been done to clarify the presence or absence of a threshold dose in the treatment of chemical mutagen. Genetic effects of EMS or DEN on the germ cells of *Drosophila* were analyzed by using Muller-5 method. Frequencies of recessive lethal mutations were increased linearly with increasing doses in either spermatogonia or oogonia treated with EMS and in spermatogonia exposed with DEN, indicating an absence of the threshold dose for EMS or DEN. Dose-mutation frequency relationship was studied by specific locus method after treating with several kinds of chemical mutagens, such as EMS, AFTB₁, chlorodiazepoxide-HCl, mitomycin C, ENU and dimethyl benzantracene in the presence of rat S-9, to spermatozoa and oocytes of silkworm. These relationship by every mutagen showed no linear, indicating the presence of the threshold dose in silkworm. The lower the threshold dose, the more the mutagenicity of the compound. Inflorescences of *Tradescantia* 02 and 4430 strains were treated with various doses of several chemical mutagens, such as EMS, NDEA, NDMA, NEU and NMU. For the treatment of ethylating agent, except EMS, the mutation frequency was increased linearly at the lower doses, while the frequency was saturated at the higher doses. For the treatment of methylating agent, the dose-mutation frequency relationship was biphasic. The frequency was increased slightly at lower doses, and steeply at the higher doses. It was suggested that there is the quasi-threshold dose after exposing the *Tradescantia* inflorescence to methylating compounds. KYF/2 male mice were treated by various doses of EMS. On 6.5 to 9.5 days after administration, treated mice were mated with female mice of KYF/2 or BDF₁. Higher frequency of dominant lethal mutations was found if mated with KYF/2 female than with BDF₁ female. The presence of threshold dose was observed for EMS-induced dominant lethal mutations. On 7 and 21 days after pretreatment of EMS with 150 mg/kg, the treated female mice were mated with male mice treated by EMS of 180 mg/kg. Frequency of dominant lethal mutations induced in sperm was decreased by the pretreatment, suggesting the involvement of in-egg recovery.

環境中には、生物活性を有する化学物質が多数存在するのに加えて、新しい化学物質が急激に増加している。従来、これらの物質が遺伝物質に影響を及ぼすかどうかの検出法としては、細菌における突然変異形成、またはフェージの誘発などのほか、哺乳動物培養細胞が用いられ、遺伝的障害の誘発機構の解析やヒトへの危険度の推定が行なわれてきた。

高等動植物に誘発された遺伝的障害は、培養細胞系にはみられない真核生物特有の複雑な生物過程を経るため、培養細胞をもってしても必ずしも正確に評価されるものではない。そこで本研究では遺伝的解析の進んでいる動植物を実験材料とし、投与量（作用量）誘発突然変異頻度の関係を求め、閾値の有無、その大小などを明らかにすることを目的とした。

この実験では、共通のモデル変異原物質としてエチルメタンスルホン酸（EMS）を選定し、同一ロット番号の製品を用いてそれぞれの実験系で投与濃度と誘発頻度との関係をまず調べた。

研究経過

(1) ショウジョウバエにおける化学変異原の投与濃度-突然変異頻度関係

化学変異原によって誘発される突然変異の出現頻度は生殖細胞形成の時期に強く依存するので、代表的な EMS と DEN を用い、雄および雌生殖細胞の各発育時期において投与濃度-突然変異頻度関係を明らかにしようとした。

投与方法は、EMS および DEN を 3 齢幼虫の初期または成虫時に経口投与した。突然変異は、M-5 法によって伴性劣性突然変異を検出した。

(a) 精子における EMS の投与濃度と突然変異頻度の関係

精子における EMS の投与濃度-突然変異頻度関係についてはすでに Aaron & Lee (1976, 1978) や Vogel & Natarajan (1979) らによって信頼しうるデータが得られている。したがって、本研究では精子や精細胞については EMS の投与濃度-突然変異頻度関係の解析は行なわなかった。Aaron & Lee (1978) によれば、成虫時に経口投与した EMS の投与濃度-突然変異頻度関係は

表 1. ショウジョウバエの精原細胞における EMS 誘発伴性劣性致死突然変異頻度

Concentration of EMS (mM)	Recessive lethals (%)
0.0	0.20 (3/1501)
0.75	0.75 (13/1726)
1.5	1.34 (31/2322)
3.0	1.95 (34/1744)
6.0	2.62 (30/1143)
12.0	3.11 (49/1575)

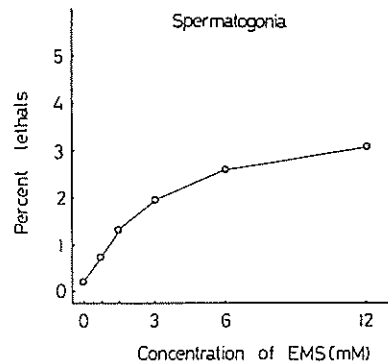


図 1. EMS による男性致死誘発の投与濃度-頻度関係

0.1~1.0 mM の低濃度領域においてはほぼ直線的比例関係が認められる。しかし 25 mM のような高濃度領域になると突然変異頻度は直線的比例関係によって期待される値よりかなり低いが、これはハエの feeding-rejection behaviour のためであると考えられる。一方、近似的標的細胞到達量 (Dose-ethylations/nucleotide in sperm DNA) と突然変異誘発頻度関係には直線的比例関係が認められる。

(b) 精原細胞における EMS の投与濃度-突然変異頻度

遺伝的危険度の評価においては通常精原細胞に生ずる突然変異が重要視される。精原細胞における EMS の投与濃度-突然変異頻度について実験結果を表 1 および図 1 に示す。

表 2. ショウジョウバエの成熟卵母細胞と卵原細胞における EMS 誘発性劣性致死突然変異頻度

Exposure (mM)	Mature oocytes ^a	Oogonia ^b
0	0.13% (3/2391)	0.09% (1/1134)
1.25	4.18% (62/1481)	0.46% (23/4984)
2.5	6.59% (78/1184)	0.61% (25/4120)
5.0	15.72% (141/897)	1.62% (45/2708)
10.0	20.95% (141/673)	3.18% (57/1791)

^a Germ cells sampled within 0-20 h after the treatment.

^b Germ cells sampled within 13-19 days after the treatment.

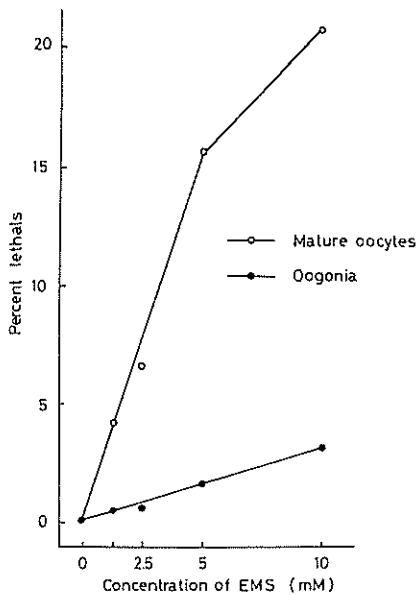


図 2. EMS による劣性致死誘発の投与濃度と頻度関係

精原細胞に対する突然変異誘発は、上述の精子の場合と比較してかなり弱い。EMS の投与濃度-突然変異頻度関係は 0.75~3 mM のような低濃度領域においてほぼ直線的比例関係がみられる。しかし 6~12 mM のような高濃度領域になると投与濃度に対する突然変異頻度は、Aaron & Lee

(1978) の精子実験でみられたように直線性によって期待される値よりもかなり低い。

(c) 卵原細胞における EMS の投与濃度-突然変異頻度関係

得られた実験結果を表 2 および図 2 に示す。

卵原細胞に対する EMS の突然変異誘発は精原細胞とほぼ同程度である。卵原細胞における EMS の投与濃度-突然変異頻度関係は用いた 1.25~10 mM の投与濃度領域において直線的比例関係が認められる。

(d) 卵母細胞における EMS の投与濃度-突然変異頻度関係

得られた実験結果を表 2 および図 2 に示す。

卵母細胞に対する EMS の突然変異誘発作用は精子とほぼ同程度である。卵母細胞における EMS の投与濃度-突然変異頻度関係は用いた 1.25~10 mM の投与濃度領域においてほぼ直線的比例関係を示す。

(e) 考察

EMS の突然変異誘発効果は精子や卵母細胞において非常に高く、逆に精原細胞や卵原細胞において極端に低い。このように EMS 感受性は生殖細胞の形成時期によって著しく異なるが、EMS の投与濃度-突然変異頻度関係は少なくとも低濃度領域に関する限りどの发育段階の生殖細胞においてもほぼ直線的比例関係が見られる。

(f) 精原細胞における DEN の投与濃度-突然変異頻度関係

得られた結果を表 3 および図 3 に示す。代謝活性化を必要とする DEN の精原細胞における投与濃度-突然変異頻度関係は少なくとも用いた 0.625~5 mM の投与濃度領域においてほぼ直線的比例関係が認められる。

(g) 精原細胞における γ 線の照射線量-突然変異頻度関係

得られた実験結果を表 4 および図 4 に示す。野生型系統 (j) の精原細胞における γ 線の線量-突然変異頻度関係は予想に反して直線的比例関係は見られない。すなわち少なくとも 1000 R 照射では突然変異の誘発率に明確な増加が認められない。このことは明らかに EMS や DEN の低濃度

表 3. ショウジョウバエの精原細胞における DEN 誘発性劣性致死突然変異頻度

Concentration of DEN (mM)	Recessive lethals (%)
0	0.20 (3/1501)
0.625	1.44 (15/1045)
1.25	3.85 (40/1038)
2.5	3.45 (21/609)
5.0	6.82 (26/381)

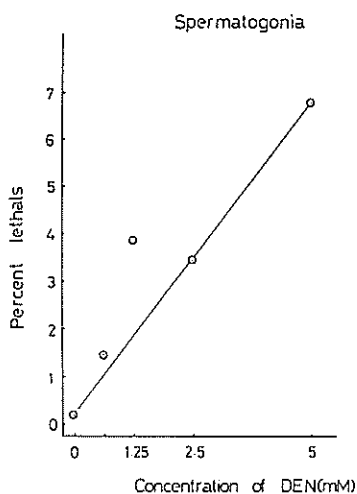


図 3. DEN による劣性致死誘発の投与濃度-頻度関係

表 4. y および $y\ mei-9^a$ の精原細胞における γ 線誘発性劣性致死突然変異頻度

Stocks	Dose (rad)	Recessive lethals (%)
y	0	0.20 (3/1501)
	1000	0.12 (1/837)
	2000	0.44 (9/2047)
$y\ mei-9^a$	0*	0.26 (9/3437)
	1000	0.70 (5/714)
	2000	0.79 (5/630)

* From data of Mason, J. M. (1980).

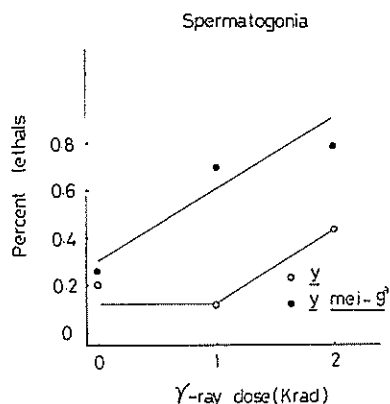


図 4. γ 線による劣性致死誘発の照射線量-頻度関係の y 系統と $y\ mei-9^a$ 系統との差異

領域の場合と異なる。一方、DNA 修復能欠損系統 ($y\ mei-9^a$) では、照射線量の増加に伴って突然変異頻度のほぼ直線的増加がみられる。この事実は γ 線の低線量領域における突然変異の生成に DNA 修復機構が重要な役割を演じていることを示唆している。

(2) カイコにおける化学変異原の投与濃度-突然変異頻度関係

カイコ雌蛹に各種化学物質を注射法で投与し、化蛾後に標識 (*pe re*) 系統雄と交配し、そこに産下された F_1 体 (卵) のしょう膜に発現する可視突然変異体の検出を行なった。

(a) 精子、卵母細胞における EMS の投与量と突然変異頻度関係

実験結果を図 5 に示す。EMS は精子で高濃度において直線性がみられたが、図 5 に見られるように、低濃度領域では対照と有意差がなく、閾値が存在するようであった。

(b) 卵母細胞における AFTB₁ の投与量と突然変異頻度関係

AFTB₁ は生理食塩水中に溶解し、1 個体 (ほぼ 1 g の蛹体重) 当たり 0.01 から 10 μ g の 8 濃度の実験区を設けて注射法によって投与した。その結果得られた AFTB₁ の薬量-突然変異頻度関係はシグモイド型であった。図 6 には、5, 10 μ g 投与区を除いた中程度以下の濃度域の薬量-効果関係を図示した。図から明らかなように、個体当た

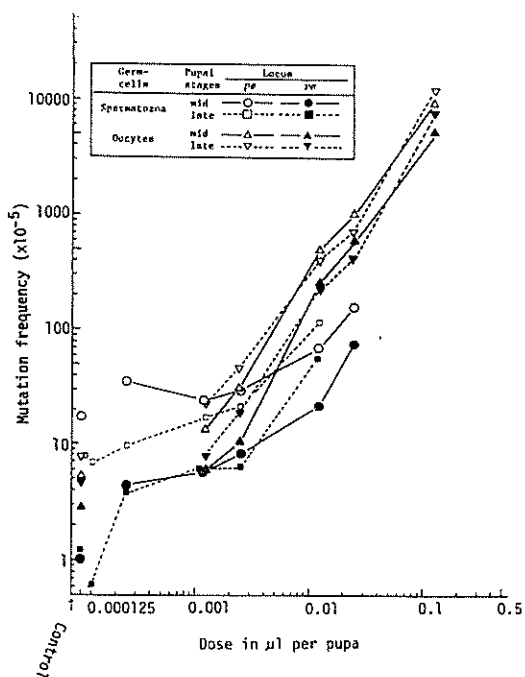


図 5. カイコの精子と卵母細胞における EMS 誘発突然変異頻度

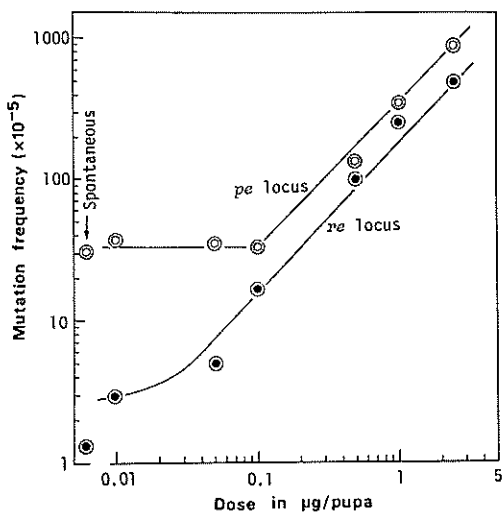


図 6. カイコ卵母細胞における AFTB₁ の投与薬量と突然変異誘発頻度

り 0.05~2.5 μg の濃度域ではほぼ直線的な薬量-効果関係がみられ、0.1~0.01 μg の低薬量域ではほぼ自然突然変異率と有意差を認めることができなかった。薬量-効果関係は遺伝子座位によって多

少異なり、 pe^+ は一般に高い感受性を示し、数十 ng において自然突然変異率と有意差を認めることができず、この前後の閾値があることが推察された。一方、高い抵抗性を示す re^+ では 10 ng より低い濃度域に閾値が存在するものと推察される。

[³H]-AFTB₁ の 1 卵母細胞 (卵) への取り込み量を液体シンチレーション計測器で測定し、上述の突然変異誘発効果との関係を追求した。その結果、1 細胞当たりの取り込み量は 1 (蛹) 個体当たりの投与量と直線的な比例関係が観察され、1 個体当たりの投与量の約 0.02% が 1 細胞に取り込まれることが明らかとなった。そこで、この取り込み率を基準として 1 個体当たりの AFTB₁ の投与量を 1 細胞当たりの取り込み量に換算してみた。その結果、1 個体当たり 1 μg の投与量は 1 細胞当たり 375 pg に相当し、 pe^+ 座位で 1 細胞当たり約 37.9 pg、また re^+ 座位において 3.79~7.58 pg の間に閾値が存在すると計算された。これらの数値からみる限り、AFTB₁ はかなり低い薬量域においても突然変異誘発作用のあることを示唆し、AFTB₁ の突然変異作用は閾値が存在しないともいえる。しかし、この取り込み実験において親化合物としての AFTB₁ とその代謝産物も一括して計測されていることや、測定された放射能が細胞核内の遺伝物質に取り込まれた AFTB₁ か、あるいは遺伝物質と結合状態にある AFTB₁ であるかなどの点は未解決なので、結論は差しひかえない。

(c) 卵母細胞における chlorodiazepoxide-HCl の投与量と突然変異頻度の関係

精神安定剤の chlorodiazepoxide-HCl の卵母細胞における投与量-効果関係も、図 7 に示すように、シグモイド型をとり、100 μg 前後の投与量で両遺伝子座位の突然変異頻度は自然突然変異率と有意差を認めることができなかった。これと全く同じ傾向は diazepam の卵母細胞において観察されている。

(d) 精子、卵母細胞における mitomycin C の投与量と突然変異頻度の関係

MC はカイコ生殖細胞に対して AFTB₁ と同

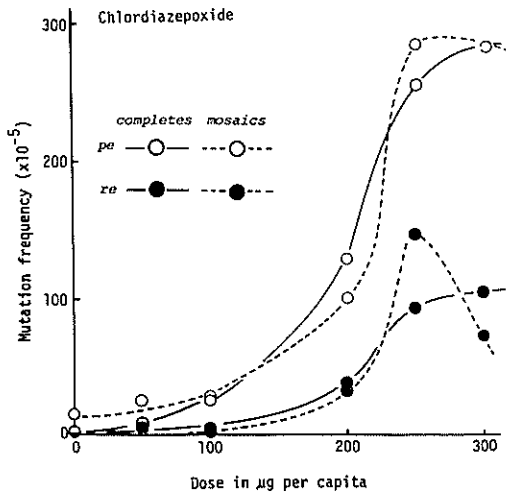


図 7. カイコ卵母細胞における chlorodiaze-poxide-HCl の投与薬量と突然変異誘発頻度

程度の最強の突然変異誘発物質であった (図 8)。4 齢幼虫の精母細胞に対する MC の注射法と添食性による突然変異作用を比較したところ、前者は後者に比して数百倍も強い効果を与えることが明らかとなった。図 8 にみられるように、MC は卵母細胞に対してもかなり強い変異原性を有することが認められた。精子に対しては個体当たり 0.1~0.5 µg、卵母細胞に対しては個体当たり 0.05~0.1 µg に閾値が認められた。

(e) 卵母細胞における ENU の投与量と突然変異頻度の関係

蛹期卵母細胞に対する ENU の変異原性を分析した。その結果は、図 9 にみられるように、非常に高い変異原感受性がみられ、精子の場合と同程度であった。図 9 に示すように、 10^{-5} ~ 10^{-4} M では対照区と統計的に有意差は認められず、閾値は存在するといえる。図に示さないが、精子でもほぼ同様な傾向が観察された。

(f) 卵母細胞に対する dimethyl benzanthracene の投与量と突然変異頻度の関係

前変異原化合物の *in vitro* 代謝活性化法による突然変異検出法を検討した。ラット (フッシャー系) を用い、polychlorinated biphenyl を誘導剤として S-9 分画を調製した。問題となる検体と S-9 分画および補酵素を 37°C で 20 分間インキ

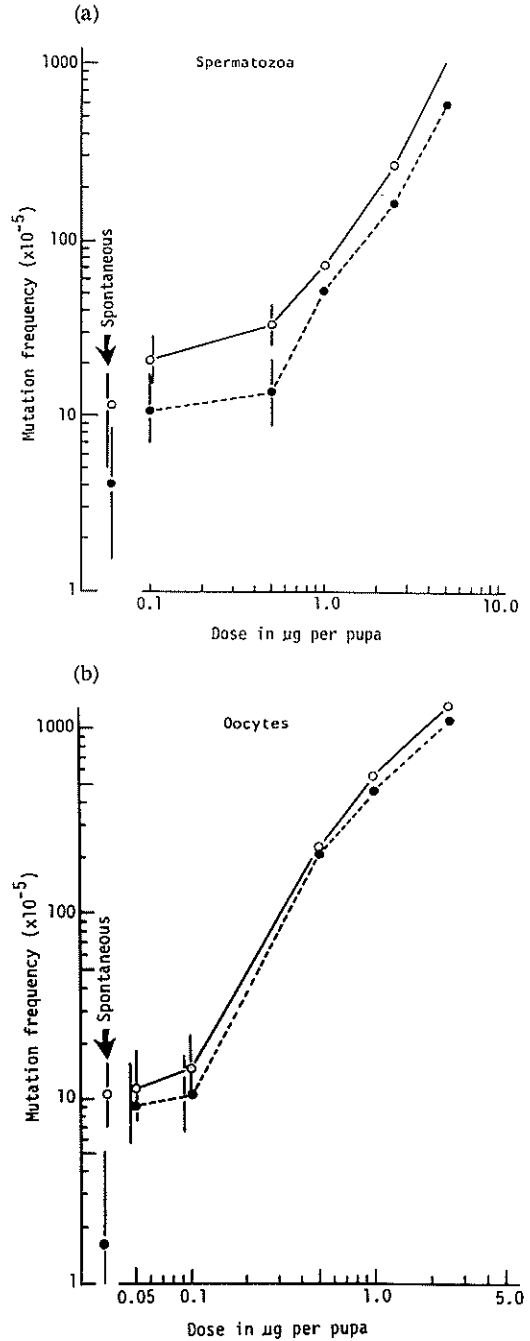


図 8. カイコの精子 (a) と卵母細胞 (b) における MC の投与薬量と突然変異誘発頻度

ュベートし、その反応溶液を野生型の蛹 (幼) 体に注射法で投与した。以上の操作を図 10 に示す。処理個体は羽化後、標識系統 (pe re) と交配

し、産下された F₁ 個体の卵のしょう液膜の色の変化を観察した。カイコ雌蛹中期の卵母細胞に対する dimethyl benzanthracene の突然変異誘発作用を *in vitro* 代謝活性化法によって調べた。

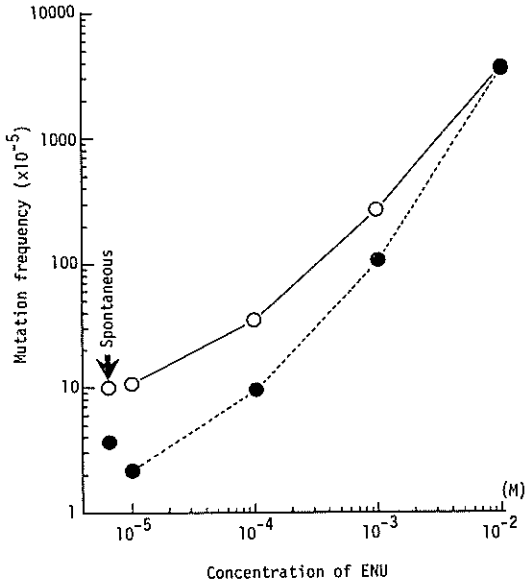


図 9. 蛹期卵母細胞における ENU の投与量と突然変異頻度との関係
各濃度の ENU 溶液を 1 個体あたり 0.025 ml 注射法によって投与した。

その結果を表 5 に示した。図 11 で明らかなように、dimethyl benzanthracene は S-9 分画による代謝活性化を行なわないときは変異原物質とならなかった。S-9 で処理したときは、蛹当たり 10 μg 投与で閾値の存在が認められた。

(3) ムラサキツクサにおける化学変異原の投与量-突然変異頻度関係

使用した植物はムラサキツクサの化学変異原高感受性系統 4430 と放射線高感受性系統 02 である。これらの系統は青紫色の花弁と雄しべ毛をもち、色素発現遺伝子をヘテロにもっている。遺伝子突然変異またはこの遺伝子を含む染色体の欠失によって青紫色色素が形成されず、ピンク色となる。突然変異の検出は雄しべ毛によったが、これは細胞が一系列に連なっていて先端の 2 個の細胞のみが分裂能力をもつ。したがってピンク色に変異した細胞の検出が容易にできる。植物体は昼温 23°C、夜温 18°C、17 時間照明の制御環境下で育成した。

使用した変異原は種類により 0~100 ng を 5 μl の水溶液にして花序中心部に投与した。それぞれの濃度に対して最低 30 個の花序を使用した。突然変異の検出は処理後 7 日目から開花した花の雄しべ毛で行なった。また処理した化学変異原の花

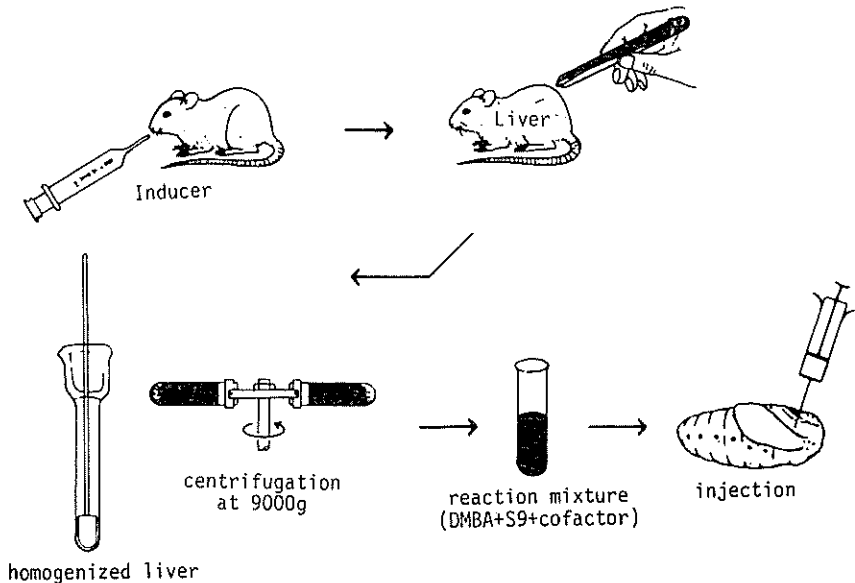


図 10. カイコ生殖細胞における前変異原化合物の *in vitro* 代謝活性化による突然変異検出法

表 5. カイコ雌蛹中期における卵母細胞に対する dimethyl benzantracene の変異原性

Dose in (μg)	Total No. of eggs observed	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)			
		<i>pe</i> locus		<i>re</i> locus	
		Completes	Mosaics	Completes	Mosaics
DMBA in the absence of rat liver S9					
0	66,990	1 (1.5)	7 (10.4)	0 (0.0)	2 (3.0)
5	56,420	0 (0.0)	29 (51.4)	1 (1.8)	0 (0.0)
10	64,792	10 (15.4)	21 (32.4)	2 (3.1)	1 (1.5)
20	78,057	9 (11.5)	16 (20.5)	1 (1.3)	0 (0.0)
40	71,676	3 (4.2)	30 (41.9)	1 (1.4)	1 (1.4)
50	54,165	5 (9.2)	21 (38.8)	0 (0.0)	2 (3.7)
DMBA in the presence of rat liver S9					
0	62,664	5 (8.0)	14 (22.3)	0 (0.0)	1 (1.6)
10	42,768	3 (7.0)	12 (28.1)	0 (0.0)	2 (4.7)
20	75,402	2 (2.7)	32 (42.4)	2 (2.7)	12 (15.9)
40	57,424	6 (10.4)	38 (66.2)	2 (3.5)	16 (27.9)
50	33,189	9 (27.1)	10 (30.1)	1 (3.0)	10 (30.1)

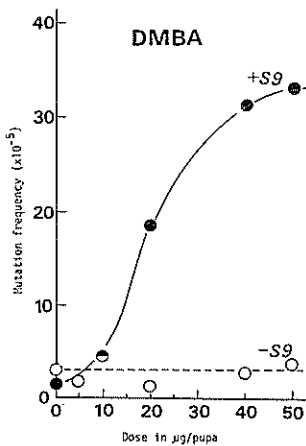


図 11. 卵母細胞に対するラット肝 S-9 経由の dimethyl benzantracene の変異原性

への吸収を知るために ^{14}C 標識化合物を花序当たり 100 nCi 投与し、24 時間ごとに花中に存在した放射能を測定した。

(a) EMS 処理における投与量と突然変異頻度との関係

EMS 処理では突然変異の誘発頻度は投与量との間に直線関係にあり、系統間の感受性が明らかであった (図 12)。

(b) NDEA 処理における投与量と突然変異頻度との関係

NDEA 処理では低濃度で突然変異頻度は直線

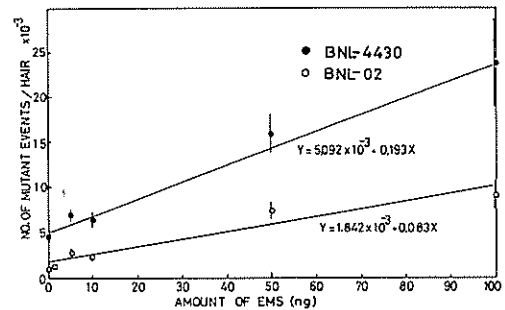


図 12. EMS の投与量と突然変異頻度との関係

的に上昇したが、花序当たり 10 ng を超えると突然変異頻度は飽和状態となった (図 13)。

(c) NDMA 処理における投与量と突然変異頻度との関係

NDEA と異なり、NDMA 処理では低濃度域での突然変異頻度の増加は非常にゆるやかであった。しかし、4430 株では 50 ng から、また 02 株では 100 ng を超えると急激な上昇がみられた (図 14)。

(d) NEU 処理における投与量と突然変異頻度との関係

NEU 処理における投与量-突然変異頻度関係は NDEA の場合と類似しており、低濃度で突然変異頻度は直線的に増加したが、高濃度では飽和状態となった (図 15)。

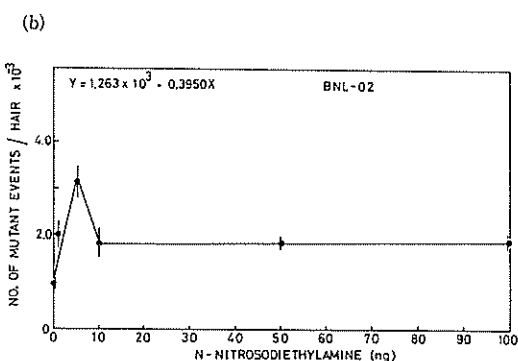
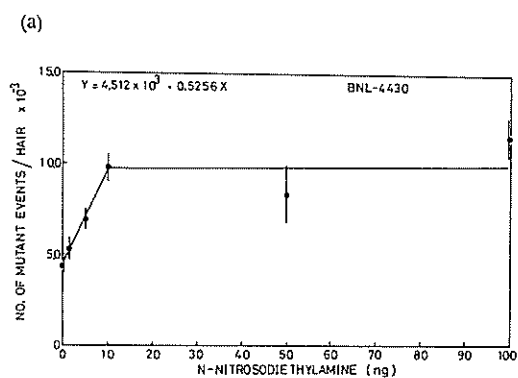


図 13. NDEA の投与量と突然変異頻度との関係

(e) NMU 処理における投与量と突然変異頻度との関係

図 16 で明らかなように、NMU 処理における突然変異誘発は NDMA の場合と類似し、低濃度での頻度増加は非常にゆるやかであった。しかし 10 ng 以上では頻度の急激な上昇がみられた。

(f) 標識化合物の花への取り込み

花序に処理した標識化学変異原物質の花中への取り込みには、図 17 に示すように、一定の傾向はみられなかったが、EMS, NDEA については処理後数日経過してから最高値に達したのに対して、NDMA, NEU, NMU では、すでに最初の 24 時間で最高となり順次減少した (表 6~8)。

(g) 考察

ムラサキツユクサの雄しべ毛細胞に生ずる突然変異を指標として放射線や環境変異原を検出する系は Sparrow によって報告された。この実験では、5 種類の化学変異原について投与量-効果関

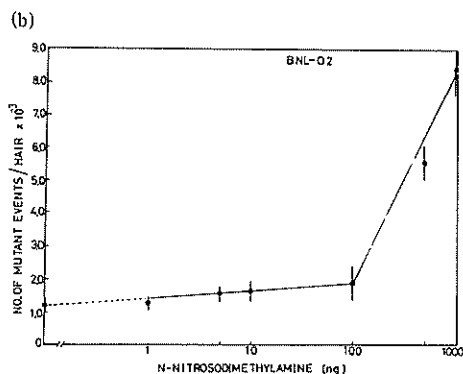
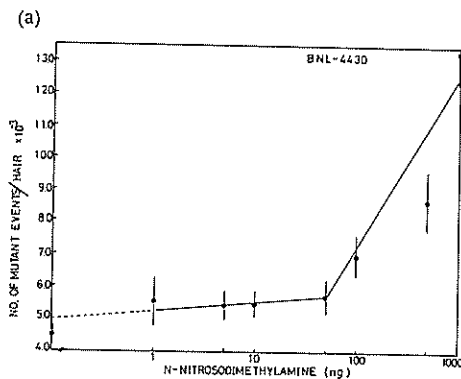


図 14. NDMA の投与量と突然変異頻度との関係

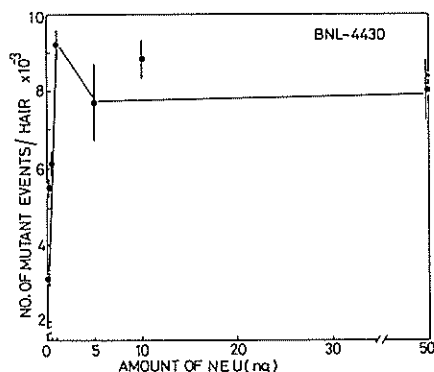


図 15. NEU の投与量と突然変異頻度との関係

係、閾値の有無を検討した。得られた実験結果から、次の 3 種の投与量-効果関係を明らかにすることができた。i) 直線関係, ii) 二相性直線関係: 低濃度域で突然変異頻度が急増し、高濃度で飽和する, iii) 二相性直線関係: ii) と逆に低濃度域でゆるやかに増加し、ある濃度以上になると頻度

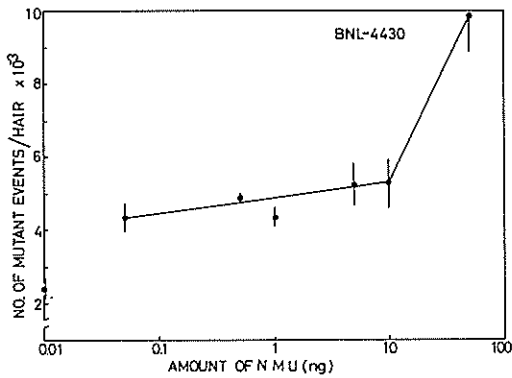


図 16. NMU の投与量と突然変異頻度との関係

表 6. [¹⁴C] *N*-nitroso-*N*-methylurea を花序あたり 100 nCi を投与したときの花への取込み

Days after treatment	$\mu\text{Ci}/\text{mg}$ fresh weight	$\mu\text{Ci}/\text{flower}$
1	7.93×10^{-5}	9.04×10^{-3}
2	5.90×10^{-5}	6.73×10^{-3}
3	6.33×10^{-5}	7.22×10^{-3}
4	5.82×10^{-5}	6.64×10^{-3}
5	6.77×10^{-5}	7.72×10^{-3}
6	—	—
7	5.61×10^{-5}	6.39×10^{-3}
8	2.82×10^{-5}	3.21×10^{-3}
9	1.96×10^{-5}	2.24×10^{-3}
10	2.14×10^{-5}	2.44×10^{-3}
11	1.54×10^{-5}	1.75×10^{-3}
12	6.46×10^{-6}	7.36×10^{-4}

表 7. [¹⁴C] *N*-nitroso-*N*-ethylurea を花序あたり 100 nCi を投与したときの花への取込み

Days after treatment	$\mu\text{Ci}/\text{mg}$ fresh weight	$\mu\text{Ci}/\text{flower}$
1	3.87×10^{-5}	4.41×10^{-3}
2	3.11×10^{-5}	3.55×10^{-3}
3	2.88×10^{-5}	3.28×10^{-3}
4	2.53×10^{-5}	2.88×10^{-3}
5	2.68×10^{-5}	3.05×10^{-3}
6	—	—
7	1.31×10^{-5}	1.49×10^{-3}
8	9.99×10^{-6}	1.13×10^{-3}
9	1.13×10^{-5}	1.29×10^{-3}
10	8.26×10^{-6}	9.42×10^{-4}
11	4.63×10^{-6}	5.28×10^{-4}
12	3.96×10^{-6}	4.52×10^{-4}

表 8. [¹⁴C] *N*-nitrosodiethylamine を花序あたり 100 nCi を投与したときの花への取込み

Days after treatment	$\mu\text{Ci}/\text{mg}$ fresh weight	$\mu\text{Ci}/\text{flower}$
1	9.01×10^{-5}	1.05×10^{-2}
2	1.40×10^{-4}	1.60×10^{-2}
3	1.53×10^{-4}	1.73×10^{-2}
4	—	—
5	1.31×10^{-4}	1.48×10^{-2}
6	1.44×10^{-4}	1.65×10^{-2}
7	1.17×10^{-4}	1.35×10^{-2}
8	6.31×10^{-5}	6.95×10^{-3}
9	6.31×10^{-5}	7.08×10^{-3}
10	5.41×10^{-5}	6.16×10^{-3}
11	—	—
12	2.25×10^{-5}	2.52×10^{-3}
13	1.35×10^{-5}	1.44×10^{-3}

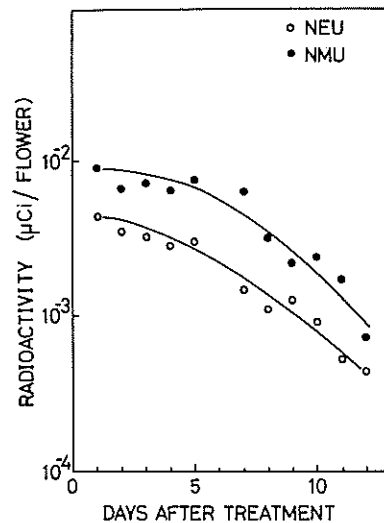
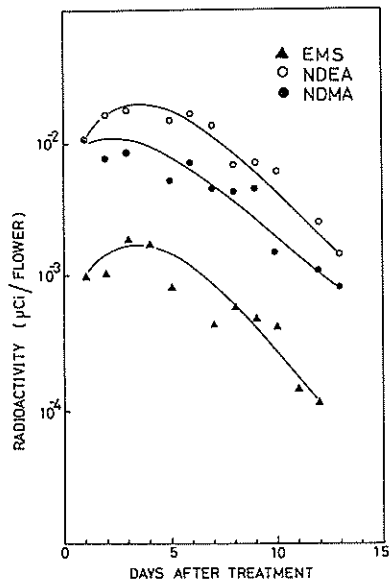


図 17. 花序あたり 100 nCi 処理後の花への取込み量の変化

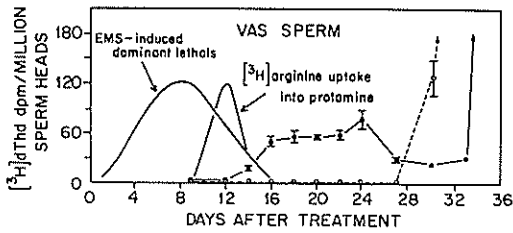


図 18. (Sega 1980)

- : EMS 投与マウスの精子の $[^3\text{H}]$ dT の放射能測定値
- : 対照マウスの精子の $[^3\text{H}]$ dT の放射能測定値

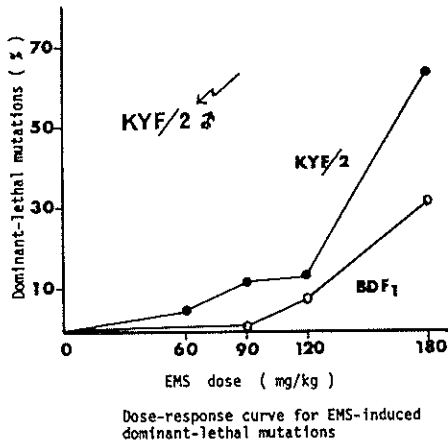


図 19. EMS 誘発優性致死突然変異の用量効果曲線

が急激に増加する。iii) の場合には低濃度域での反応は閾値の存在を示唆するが、この部分でもゆるやかな増加があるから完全な閾値とは考えにくく、“quasi-threshold” であるといえる。

変異原の化学構造と投与量-効果関係とを比較してみると、エチル基をもつ変異原 (NDEA, NEU) は類似の反応を示し、メチル基をもつ変異原 (NDMA, NMU) は類似の反応を示したことから、効果曲線の形は変異原の化学構造と何らかの関係があるようである。

変異原の種類によって花序から花への移行は多少異なったが、その取り込まれ方から推定すると、突然変異誘発に必要な量は花当たりピコグラムのオーダーで十分であると考えられた。

(4) マウスの優性致死突然変異を指標とした環境化学物質の用量-突然変異効果の関係とその修飾要因の解析

マウスの精子分化の中期から後期精細胞期以降の段階では、不定期 DNA 合成 (UDS) が起こらない (図 18)。EMS や MMS を投与した場合、UDS がみられない後期精細胞～初期精子の時期に優性致死突然変異が高率に誘発される。Sega (1983) によると、この分化段階ではプロタミン合成が最も盛んに行なわれ、EMS や MMS による優性致死突然変異の誘因は、これらの化学物質によるプロタミンのアルキル化であろうと考えられている。

(a) 用量-突然変異効果の関係と系統差

KYF/2 系統雄マウスに EMS を腹腔内注射して、6.5～9.5 日後に無処置の雌と交配し、後期精細胞～初期精子のときに EMS の作用を受け、受精にあずかった精子の誘発優性致死突然変異を調べると、その測定値は交配に用いた系統の雌によって異なることがわかった。すなわち KYF/2 雌との交配では、BDF₁ 雌と交配した場合よりも優性致死突然変異率が高く (図 19)、見掛けの閾値は KYF/2 雌と BDF₁ 雌に交配したときと異なり、雄への EMS 投与量はそれぞれ 90 mg/kg と 120 mg/kg であった。

(b) 卵内修復とその誘導

異なる系統の雌との交配によって、優性致死突然変異率の測定値に差異が現われたのは、精子に生じた前突然変異損傷に対する、卵内での修復が関与しているものと考えられ、卵母細胞の修復能と特にその増強 (人為的誘導) の可否を検討した。すなわち KYF/2 雌にあらかじめ EMS を 150 mg/kg 注射し、7 日と 21 日後に EMS を 180 mg/kg 投与した雄と交配して、精子の誘発優性致死突然変異率を調べると、前処置をした雌との交配では、すべて優性致死突然変異率が低くなり (表 9)、前処置によって卵母細胞に修復能を誘導しうることがわかった。それと同時に卵内修復機構の関与も明らかになった。

卵内修復能の誘導は、卵母細胞の優性致死突然変異の誘発についてみるともっとも顕著で、

表 9. EMS であらかじめ処理した雌マウスと処理雄マウスと交配したときに EMS で生ずる精子, 精細胞の優性致死 (DL) 突然変異

Females Pretreatment		Males Treatment EMS dose (mg/kg)	Mated females	Females with implants	Living embryos	Percent DL
EMS dose (mg/kg)	Interval (days)					
—	—	—	52	24	8.08 ^a	
—	—	180	31	16	2.88	64.4 ^a
150	7	—	36	22	6.82 ^b	
150	7	180	38	31	5.36 ^{**}	21.4 ^b
150	21	—	40	31	7.23 ^c	
150	21	180	42	19	5.58 ^{**}	22.8 ^c

$$\text{Percent DL} = \left[1 - \frac{\text{LE/per preg. female (exp.)}}{\text{LE/per preg. female (cont.)}} \right] \times 100$$

表 10. EMS または MMS 前処理条件下における EMS 処理の成熟卵母細胞の DL 突然変異

Pretreatment		Challenge dose (mg/kg)	Mated females	Females with implants	LE/CL	Percent DL
Dose (mg/kg)	Interval (days)					
—	—	NaCl	52	39	0.845 ^a	
—	—	EMS 250	57	23	0.554	34.4 ^a
EMS 200	32	NaCl	32	22	0.732 ^b	13.4 ^a
EMS 200	32	EMS 250	48	25	0.721 ^{**}	1.5 ^b
MMS 100	7	NaCl	30	19	0.723 ^c	14.4 ^a
MMS 100	7	EMS 250	28	18	0.711 [*]	1.7 ^c

$$\text{Percent DL} = \left[1 - \frac{\text{LE/CL (exp.)}}{\text{LE/CL (cont.)}} \right] \times 100$$

表 11. EMS 前処理雌マウスと交配した雄マウスにおける DL 突然変異

(CRJ: ICR×KYF/2)

Females Pretreatment		Males Treatment EMS dose (mg/kg)	Mated females	Females with implants	Living embryos	Percent DL
Mutagen dose (mg/kg)	Interval (days)					
—	—	—	35	29	12.21 ^a	
—	—	180	32	27	6.52	46.6 ^a
EMS 150	7	—	29	22	12.27 ^b	
EMS 150	7	180	39	30	7.33	40.3 ^b
EMS 150	21	—	30	17	11.59 ^c	
EMS 150	21	180	42	37	7.46	35.6 ^c
EMS 200	21	—	30	22	12.50 ^d	
EMS 200	21	180	32	30	9.60 ^{**}	23.2 ^d
MMS 100	7	—	30	25	11.16 ^e	
MMS 100	7	180	19	15	9.47 ^{**}	15.1 ^e
MMS 100	21	—	30	27	12.30 ^f	
MMS 100	21	180	31	26	7.58	38.4 ^f

表 12. 雄生殖細胞に誘発した DL 突然変異頻度に対する EMS, MMS 前処理雌マウスの影響

Females Pretreatment		Males EMS dose (mg/kg)	Mated females	Females with implants	Living embryos	DL percent
Dose (mg/kg)	Interval (days)					
(BDF ₁ ♀×KYF/2♂)						
0		0	33	27	9.22 ^a	—
0		180	36	30	6.30	31.7 ^a
150 (EMS)	21	180	37	37	5.86	36.4 ^a
(BDF ₁ ♀×BDF ₁ ♂)						
0		0	31	22	9.00 ^b	—
0		180	62	52	2.67	70.3 ^b
150 (EMS)	21	180	40	26	3.27	63.7 ^b
100 (MMS)	7	0	35	33	8.36 ^c	(7.1)
100 (MMS)	7	180	37	28	2.36	71.8 ^c

表 13. 雄生殖細胞に誘発した DL 突然変異頻度における系統差

(6.5-9.5 days posttreatment)

Mating	EMS dose (mg/kg)	Mated females	Females with implants	Living embryos	DL Percent
KYF/2♀×KYF/2♂	0	52	24	8.08	—
	180	31	16	2.88	64.4
BDF ₁ ♀×KYF/2♂	0	33	27	9.22	—
	180	36	30	6.30	31.7
KYF/2♀×BDF ₁ ♂	0	50	45	8.31	—
	180	45	31	1.74	79.1
BDF ₁ ♀×BDF ₁ ♂	0	31	22	9.00	—
	180	62	52	2.67	70.3

KYF/2 雌に EMS を 200 mg/kg または MMS を 100 mg/kg 投与し、それぞれ 32 日と 7 日後に、それらの雌に再び EMS を 250 mg/kg 投与して、優性致死突然変異を調べると、前処置をしていない雌での誘発率 34.4% と比較して、前処置をしたものではそれぞれ 1.5%、1.7% に激減した (表 10)。

ところが雌の前処置による修復能誘導の度合いに系統差があって、CRJ: ICR マウスでは EMS 200 mg/kg 投与後 21 日と、MMS 100 mg/kg 投与後 7 日の交配では、それぞれ精子の優性致死突然変異の測定値に減少がみられ (表 11)、修復能の増強が認められたが、BDF₁ 雌への EMS 150 mg/kg 投与による前処置では、修復能の誘導はみられなかった (表 12)。

(c) 前突然変異損傷の系統差

一方、EMS によって精子に誘起される優性致死の前突然変異損傷にも、系統の間で違いのあることが示唆された。すなわち BDF₁ 雄に EMS を 180 mg/kg 投与して卵内修復能が異なる KYF/2 と BDF₁ 雌とそれぞれ交配し、優性致死突然変異を調べると、両者の測定値に差異が認められなかった (表 13)。つまり KYF/2 の精子に誘起された優性致死損傷に対して、BDF₁ の卵の修復機構は、KYF/2 のそれよりも効果的であったが、BDF₁ の精子に生じた損傷に対しては、KYF/2 の卵内修復とほぼ同程度であった。

そこで [1-¹⁴C] EMS を KYF/2 と BDF₁ 雄に注射して、精巣、精巣上体、肝および血液中の、ラベルした EMS の組織内濃度の経時的推移

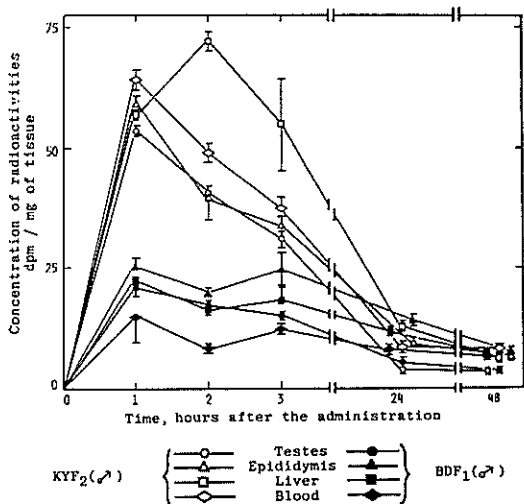


図 20. ^{14}C -EMS の腹腔内注射後のマウス組織における放射能濃度

を放射能測定によって調べた。その結果 KYF/2 では注射後 1~2 時間で、それぞれの組織内の濃度がピークに達し、その後低下した。一方 BDF₁ では KYF/2 のような、急速な組織内濃度の上昇はみられず、しかも精巣と精巣上体では、24 時間後において KYF/2 よりも高い濃度分布を示した (図 20)。この結果から EMS の生体内での代謝に系統差があり、BDF₁ の精子の染色体には卵内で修復されにくい過度の前突然変異損傷がより多くできるのであろうと考えられる。

(d) 優性致死と相互転座の生成との関係

KYF/2 雄に EMS を 180 mg/kg 投与し、優性致死損傷に対する卵内修復能の異なる KYF/2 と BDF₁ 雌と交配して、EMS が後期精細胞~初期精子に作用している精子の受精によって、生まれた F₁ 雄を対象にして相互転座の頻度を調べた。その結果、KYF/2 雌との交配による F₁ 83 頭のうち 7 頭 (8.4%)、BDF₁ 雌との交配による F₁ 79 頭のうち 9 頭 (11.4%) が、それぞれ相互転座ヘテロであることが確認され、両群の出現頻度に差異が認められなかった ($\chi^2=0.135, p>0.50$)。すなわち遺伝性相互転座に導く精子の染色体損傷、またはその成立過程に対して、卵内修復機構は関与していないと考えられ、また EMS による

相互転座誘発の閾値は、優性致死突然変異のそれよりも低いという報告もある。

(e) まとめ

以上の結果から、マウスにおける誘発優性致死突然変異は、従来考えられていたような、生殖細胞に誘起された染色体損傷の様子をそのまま呈示するものではなく、卵内修復を介して示される指標であり、閾値が比較的高いこともそれを裏づけている。

またマウスの系統間における生体内代謝の違いによって、精子の染色体に誘発される損傷も異なる。これらが化学物質の用量と優性致死突然変異効果の関係を修飾する主な要因であろうと考えられる。

発表論文

- 1) 稲垣栄一, 藤川和男: ショウジョウバエを用いる環境変異原の遺伝毒性検出. 環境と人体 II: pp. 123-136 (1983).
- 2) 村上昭雄: カイコによる環境変異原の検出. 環境と人体 II, pp. 105-122 (1983).
- 3) 村上昭雄: カイコを用いた環境変異原研究の現況—特に前変異原物質に関する研究—について. 変異原と毒性 4 (5) pp. 58-72 (1981).
- 4) 土川 清: マウスの骨異常を指標にした放射線誘発突然変異の検出. I. 頭蓋骨卵門孔の形状に関する優性突然変異. 静岡実験動物研究会会報, 16, pp. 25-26 (1981).
- 5) 土川 清, 原田和昌: KYG と PW マウスを用いる体細胞突然変異検出法 (スポットテスト). 静岡実験動物研究会会報, 16, pp. 27-29 (1981).
- 6) 八木康興, 中村好志, 富田 勲, 土川 清, 下井信夫: Teratogenic potential of di- and mono-(α -ethyl hexyl) phthalate in mice. J. Environ. Pathol. Toxicol., 4-2, 3, pp. 533-544 (1980).
- 7) 村上昭雄: カイコ生殖細胞を用いた環境変異原物質による遺伝的障害の解析. 人体影響研究, 3, pp. 64-77 (1982).
- 8) 渋谷 徹, 室田哲郎, 土川 清: Mouse spot tests with alkyl nitrosoureas. Mutation Res., 104, pp. 311-315 (1982).
- 9) 室田哲郎, 渋谷 徹, 土川 清: Genetic analysis of an N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutation at the hemoglobin β -chain locus in mice. Mutation Res., 104, pp. 317-321 (1982).
- 10) 富田 勲, 中村好志, 八木康興, 土川 清: Teratogenicity/fetotoxicity of DEHP in mice. Environ. Health Perspect. 45, pp. 71-75 (1982).
- 11) 土川 清: エチルメタンサルホネートによって誘発された転座ヘテロマウスの後代にあらわれた発生異常. 静岡実験動物研究会会報, 18, pp. 7 (1982).
- 12) 土川 清: マウスのスポットテストの結果と尾の白斑の測定値との関係. 静岡実験動物研究会会報, 18, pp. 6 (1982).
- 13) 山口彦之: 環境影響を検索するための植物. 生態化学, 5 (2), pp. 41-48 (1982).