

化学物質の染色体異常誘発性検索のための代謝的活性化法の確立と応用に関する研究

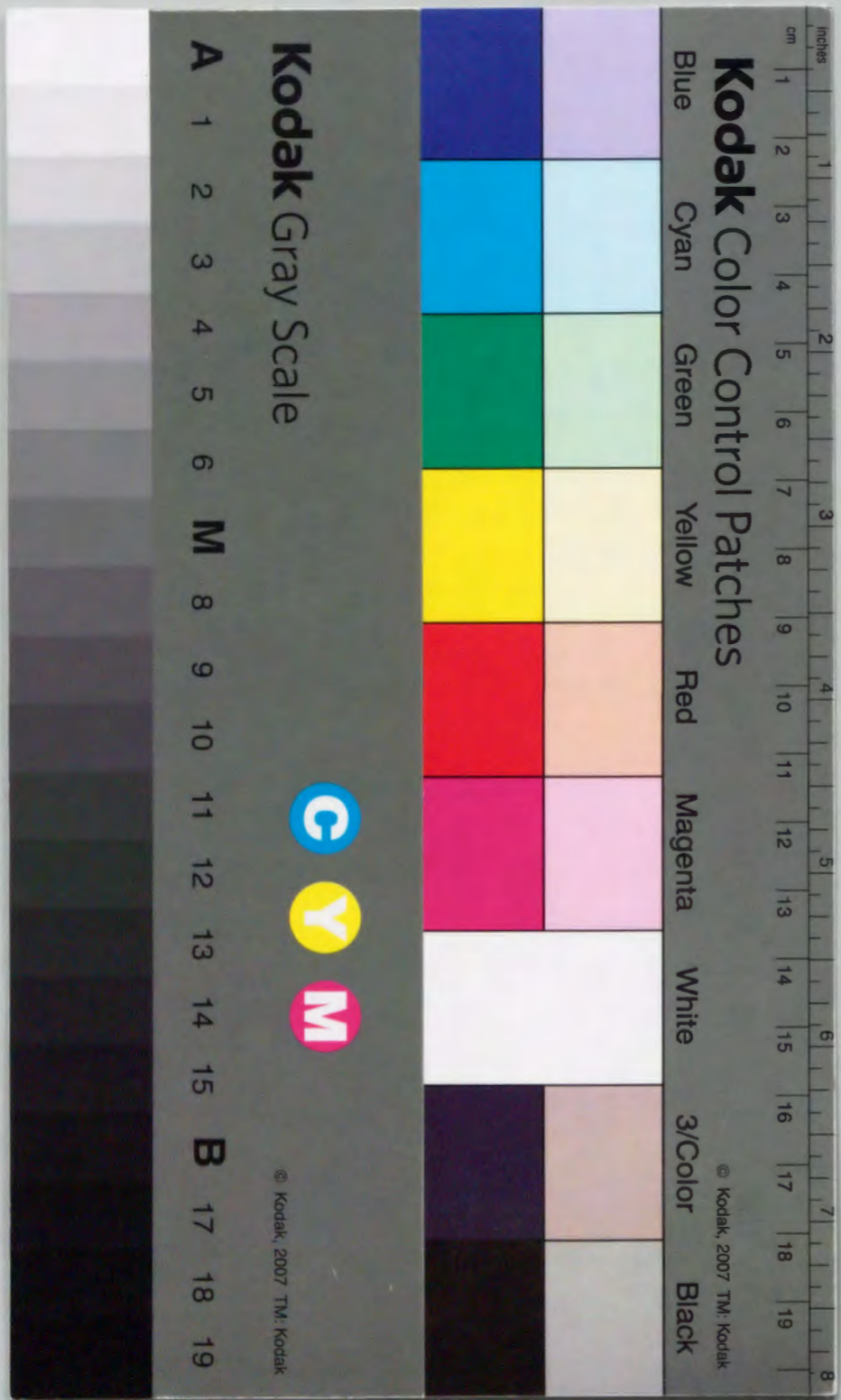
松岡, 厚子

<https://doi.org/10.11501/3054258>

出版情報 : 九州大学, 1990, 薬学博士, 論文博士
バージョン :
権利関係 :

化学物質の染色体異常誘発性検索のための
代謝的活性化法の確立と応用に関する研究

1991年
松岡厚子



①

化学物質の染色体異常誘発性検索のための
代謝的活性化法の確立と応用に関する研究

松岡厚子

目 次

第一章 緒言

第一節	研究の目的と概要	1
第二節	染色体異常	3
1)	染色体異常の意義	3
2)	染色体異常の分類と判定	4
3)	染色体異常誘発の基本原則	6
第三節	代謝活性化の意義と導入の必要性	10
1)	化学物質の代謝による活性化	10
2)	<i>In vitro</i> 細胞遺伝学的研究への代謝活性化系導入	10

第二章 代謝活性化法の確立

第一節	振盪法	14
1)	DMNのS9 mix存在下での染色体異常誘発性	14
2)	処理時間の検討	15
3)	回復時間の検討	16
4)	酸素ガス添加の必要性	17
5)	S9 mix中の各成分の誘発異常頻度に及ぼす影響	18
6)	酵素誘導剤の比較	19
7)	溶媒エタノールの影響	21
第二節	静置法	24
1)	S9濃度の影響および処理時間の検討	24
2)	回復時間の検討	26
3)	振盪法と静置法の比較	27

第三章 抗酸化剤BHAの染色体異常誘発性

第一節	BHA及びその代謝物	29
第二節	実験結果	30
第三節	考察	35

第四章	ニトロピレン類の染色体異常誘発性	
第一節	被験物質	37
第二節	実験結果	38
第三節	考察	43
第五章	水道水中に含まれる微量有機物質の染色体異常誘発性	
第一節	被験物質	45
第二節	実験結果	46
第三節	考察	52
第六章	総括	56
実験の部		59
1.	CHL細胞の継代と保存	
2.	染色体異常試験	
3.	培地, 試薬などの調製	
4.	TLC	
5.	HPLC	
参考文献		63
謝辞		73

本研究では, 以下の略語を用いた. [] 内の数字はChemical Abstract Registry Number である.

AAF	: 2-acetylaminofluorene	[53-96-3]
1-AP	: 1-aminopyrene	[1606-67-3]
B(a)P	: benzo[a]pyrene	[50-32-8]
BHA	: 3- <u>tert</u> -butyl-4-hydroxyanisole	[121-00-6]
BHA-OH	: 3- <u>tert</u> -butyl-4,5-dihydroxyanisole	[80284-15-7]
BHA-o-Q	: 3- <u>tert</u> -butylanisole-4,5-quinone	[2940-63-8]
BHQ	: <u>tert</u> -butylhydroquinone	[1948-33-0]
BHT	: 3,5-di- <u>tert</u> -butyl-4-hydroxytoluene	[128-37-0]
BQ	: <u>tert</u> -butylquinone	[3602-55-9]
BQO	: <u>tert</u> -butylquinone oxide	
CMC	: carboxymethylcellulose sodium	[9004-32-4]
DEN	: diethylnitrosamine	[55-18-5]
diBHA	: BHA dimer	[14078-41-2]
DMBA	: 7,12-dimethylbenz[a]anthracene	[57-97-6]
DMN	: dimethylnitrosamine	[62-75-9]
DMSO	: dimethyl sulfoxide	[67-68-5]
1,3-DNP	: 1,3-dinitropyrene	[75321-20-9]
1,6-DNP	: 1,6-dinitropyrene	[42397-64-8]
1,8-DNP	: 1,8-dinitropyrene	[42397-65-9]
G-6-P	: glucose 6-phosphate	[56-73-5]
HEPES	: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	[7365-45-9]
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography	
MC	: 3-methylcholanthrene	[56-49-5]
3'-MeDAB	: 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene	[55-80-1]
MEM	: minimum essential medium	
NADP	: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	[53-59-8]

1-NP : 1-nitropyrene

[5522-43-0]

PB : phenobarbital

[50-06-6]

PCB : polychlorinated biphenyl

TLC : Thin Layer Chromatography

第一章 緒言

第一節 研究の目的と概要

化学物質の安全性評価という観点から、実験動物を用いる毒性試験、発癌試験等の長期試験と並んで、短期検索法として変異原性試験が行われている。変異原性試験は、DNAに生じた損傷を検出する試験系で、その中に染色体異常を指標に検索する方法がある。

本研究で実施する *in vitro* 染色体異常検索法は、シャーレで培養している細胞を、一定時間被験化学物質で処理し、その細胞から作製した染色体標本を観察し、染色体の数や形の変化を分析して、その化学物質が染色体に傷害を及ぼすか否かを調べる方法である。

ところで、化学物質には、それ自体でDNAに作用して変異原性を示すものもあるが、生体内で代謝を受けて初めて変異原性を示すものもある。本研究で、化学物質の染色体異常誘発性を検索する目的で用いた細胞株 CHL (チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株) は、長い間継代培養してきたために、薬物を代謝する能力がないか、あっても非常に活性が低いと考えられており、化学物質の真の変異原性を検索することはできない。こうした化学物質の代謝活性化の重要性が認識され、1975年頃から培養細胞を用いる *in vitro* 試験系にも代謝活性化系を導入した研究が報告され始めた¹⁻⁷⁾。使用細胞、試験指標、処理方法などは研究者によってさまざまであるが、主にラットまたはマウスの肝臓のホモジネートの9000 x g上清あるいはそれに類する分画が代謝活性化系として用いられていた。

本研究では、これまでに行ってきた染色体異常検索法に代謝活性化系を導入することを目的として、1) 実験手技が簡便で、2) 結果の再現性が良く、3) 広範な化学物質の染色体異常誘発性を検出できる方法を目指して検討を行った。

まず第二章で、1976年にNatarajanらによって紹介された方法⁸⁾ (トリプシン処理後調製した細胞懸濁液、代謝活性化系および被験物質を恒温槽中で振盪させて処理するところから「振盪法」と称する) の追試から始めて、いくつかの実験条件を修正し確立した、当研究室の振盪法⁹⁾ について述べる。この方法を

用いて、実際に、1978年から1981年までの4年間に約70種の検体についてスクリーニングを行った。しかし、本来単層で増殖している細胞を振盪するという非生理的条件で処理をしていること、被験物質、特に多環芳香族炭化水素の処理濃度が非常に高いことの2点の問題点を改良するために、静置法（シャーレで増殖している細胞をそのまま処理するところからこう呼ぶ）を試みた。その結果、静置法の方が振盪法より優れた方法であることが明らかになり¹⁰⁾、現在では静置法を用いて被験物質の代謝活性化を行っている。

第三章では抗酸化剤3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) の¹¹⁾、第四章では環境汚染物質ニトロピレン類の¹²⁾、そして第五章では水道水中に含まれる微量有機物質の¹³⁾染色体異常誘発性を、静置法を使って検討した結果について述べる。

医薬品毒性試験法ガイドライン（厚生省）、農薬の毒性試験の適正実施に関する基準（農林水産省）、化審法毒性試験法（通産省）、OECDガイドラインの哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験にも代謝活性化法を併用することが要求されており、国内ではこの静置法が標準的な方法となっている。

第二節 染色体異常

1) 染色体異常の意義

染色体は遺伝子DNAの担体で、細胞分裂を経て2つの娘細胞へ均等に分かれる。染色体の数および形は、生物の種、系統で特異的であり、ヒトでは46本、本研究で用いているチャイニーズ・ハムスターでは22本である。細胞周期の分裂期（M期）にのみ染色体としての構造を観察することができ、特に分裂中期において最も凝縮して太くなり、塩基性色素によく染まり観察に最も適した状態になる。染色体の観察を容易にするために、染色体標本作製前に紡錘糸形成阻害剤（コルセミドまたはコルヒチン）で細胞を処理し、分裂中期像を呈する細胞を蓄積する。さらに、標本作製時に低張処理を行い、細胞を膨張させて染色体の広がりをよくしている。染色体の構造は、図1の模式図のように、細胞の有糸分裂の際に紡錘糸が付着する動原体を有し、その位置により腕の長さの比が異なる数種の形を示す。1本の染色体は2本の染色分体から成り、お互いを姉妹染色分体とよぶ。

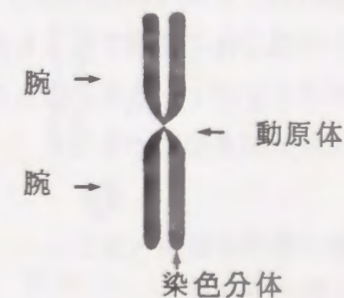


図1 染色体の模式図

これまでに染色体異常との関連が報告されている生物学的事象には次のようなものがある。

- 1] ヒトの先天性染色体異常疾患（ダウン症候群、ターナー症候群など）
- 2] 放射線や化学物質に起因する染色体異常（職業的暴露によるヒトリンパ球での染色体異常^{14,15)}など）
- 3] ヒトの癌での病型に特異的な染色体異常（慢性骨髄性白血病で観察されるPh¹染色体など）

染色体異常を指標に、広義の疾病（化学物質に起因するものも含む）の診断、分析が可能である。

こうしたことから、化学物質のヒトへの安全性を評価する際、染色体異常誘発性を検索することは、非常に重要な生物学的情報を我々に提供してくれる。

2) 染色体異常の分類と判定

染色体異常には、数的異常と構造異常とがある。

数的異常には、異数性と倍数性とがある。異数性とは、染色体の数が1～数本増加または減少するもので、倍数性は、染色体数が倍加する現象をいう。株細胞では、本来、染色体数にばらつきがあるため、異数性を検出することは困難である。

構造異常は大きく分けて染色分体型と染色体型とに分類される。前者は、細胞周期のS期（DNA合成期）以後にDNAに生じた損傷がその直後の分裂期で片方の染色分体に観察されるもので、後者は、G1期（S期前の間期）に生じた損傷がS期を経て形成されるものをいう。紫外線や化学物質で誘発される異常は、大部分前者の型である。

構造異常の分類（図2）

染色分体型

ギャップ (chromatid gap: ctg)

: 染色分体上にみえる、狭い非染色性の部分で、一見この部分で切れているようにみえるが、先端部は、染色分体の長軸上にある。（図2. 左上）

切断 (chromatid break: ctb)

: 染色分体上に明らかな不連続が生じ、その先の染色分体片が長軸からはずれている場合をいう。（図2. 右上）

交換 (chromatid exchange: cte)

: 2カ所以上で起こった切断が互いに結合する異常をいう。1本の染色体の中で交換が起こる場合と、別の染色体に生じた切断が交換を起こし、2本以上の染色体が関与して複雑な構造をとる場合もある。（図2. 左中）

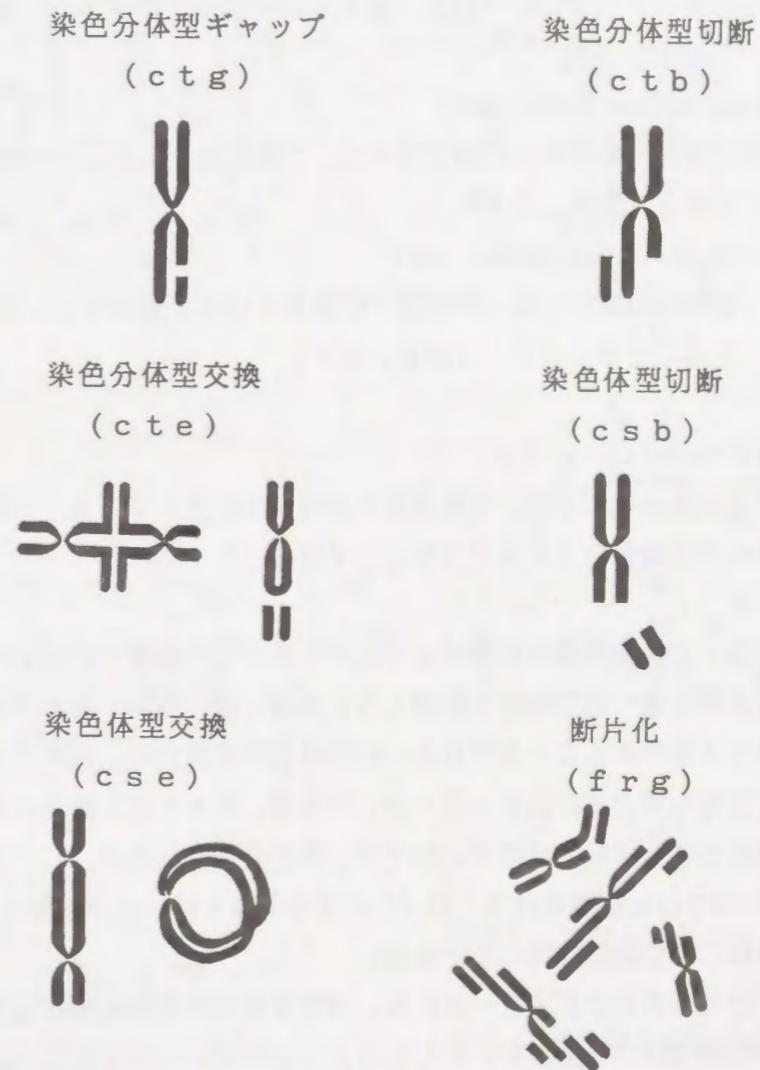


図2 染色体異常の模式図

染色体型

ギャップ (chromosome gap: csg)

: 2本の染色分体の同位置に見える非染色性の部分で、先端部は長軸上にある。

切断 (chromosome break: csb)

: 動原体をもたない切断端が生じ、この切断端は必ず対になっている。(図2. 右中)

交換 (chromosome exchange: cse)

: 交換の結果生じる二動原体染色体および環状染色体として識別することができる。(図2. 左下)

断片化 (fragmentation: frg)

染色体の形跡が確認でき、交換型異常を含まず、ギャップあるいは切断が全染色体の約80%以上に生じている。(図2. 右下)

本研究では、染色体異常の観察はよく広がった分裂中期像で行い、100個の細胞あたりの異常をもつ細胞の数を記録した。実際には、写真1のように、顕微鏡下で染色体を観察することができる。a)の分裂中期像には、25本の染色体が観察され、正常な染色体が広がっている。b)では、ギャップと染色体断片が、c)では、染色分体型切断と交換が、d)では、染色分体型交換が、e)では、染色分体型交換が4カ所に観察される。b), d), e)で全部または一部が観察される丸い影状のものは、静止期の細胞の核である。

これまでの当研究室の蓄積データから、無処理または溶媒処理の陰性対照群の染色体異常頻度は4%を越えないことから、当研究室での判定基準を基に、異常頻度が4%までを染色体異常誘発性を陰性、10% (陰性の約2倍) 以上を陽性とし、5%から9%を疑陽性と判定した。

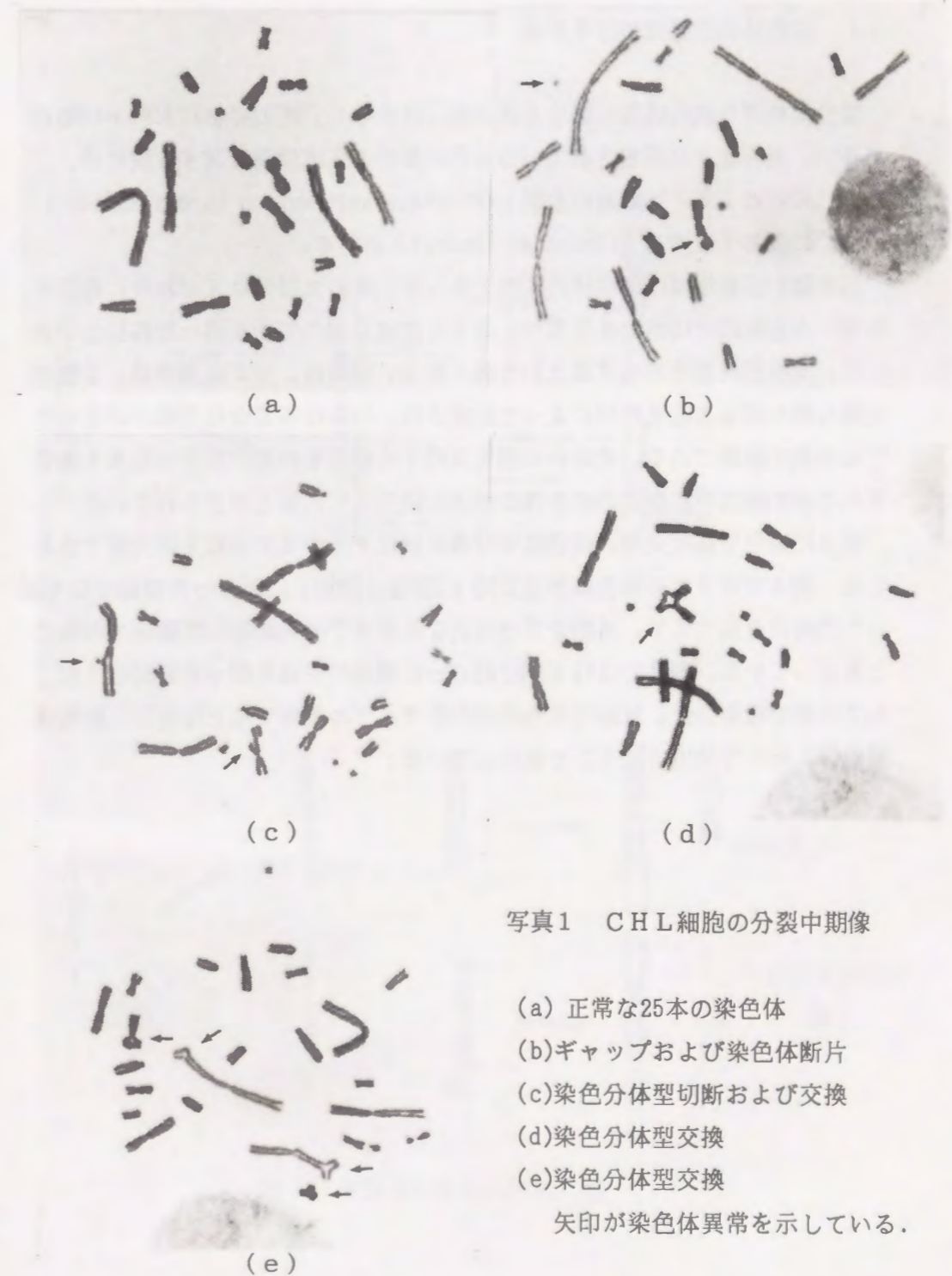


写真1 CHL細胞の分裂中期像

(a) 正常な25本の染色体

(b) ギャップおよび染色体断片

(c) 染色分体型切断および交換

(d) 染色分体型交換

(e) 染色分体型交換

矢印が染色体異常を示している。

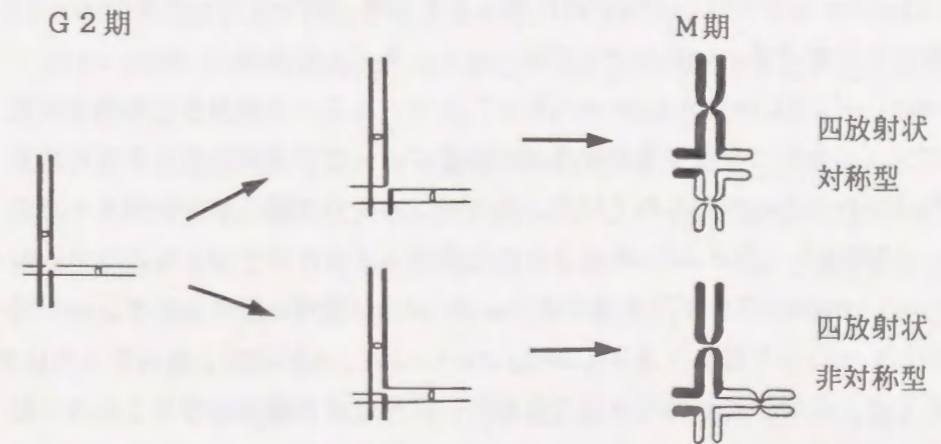
3) 染色体異常誘発の基本原則

染色体異常生成の機構に関する研究報告は少なく、その詳細は未だ不明の点が多い。現在までに提唱されている染色体異常の生成機構に関する説には、Sax (1938)による「切断再結合説」(Breakage-and-reunion theory)とRevell (1959)による「交換説」(Exchange theory)とがある。

前者は、初期損傷は染色体の切断であって、その大部分は元どおりに修復するが、あるものは切断のまま残り、あるものは2個の切断が誤った再結合をおこし、交換型異常を形成するという説である。後者は、全ての異常は、2個の回復可能な損傷の相互作用によって形成され、切断は不完全な交換によるものであるとする説である。その後両説を支持する結果も両説に反する結果も報告されており両方の説が染色体異常の形成に関与していると考えられている¹⁶⁾。

図3に染色分体型交換と染色体型交換を例にその形成の過程を模式図で表わした。例1では2本の染色体がG2期(S期後の間期)に起こった損傷部位で誤った再結合を起こして、M期で2つの異なるタイプの異常として検出できることを示している。例2ではG1期に起こった損傷がやはり誤った再結合を起こしてS期で複製され、M期で2つの異なるタイプの異常(相互転座と二動原体染色体)として検出できることを示している。

例1 染色分体型交換



例2 染色体型交換

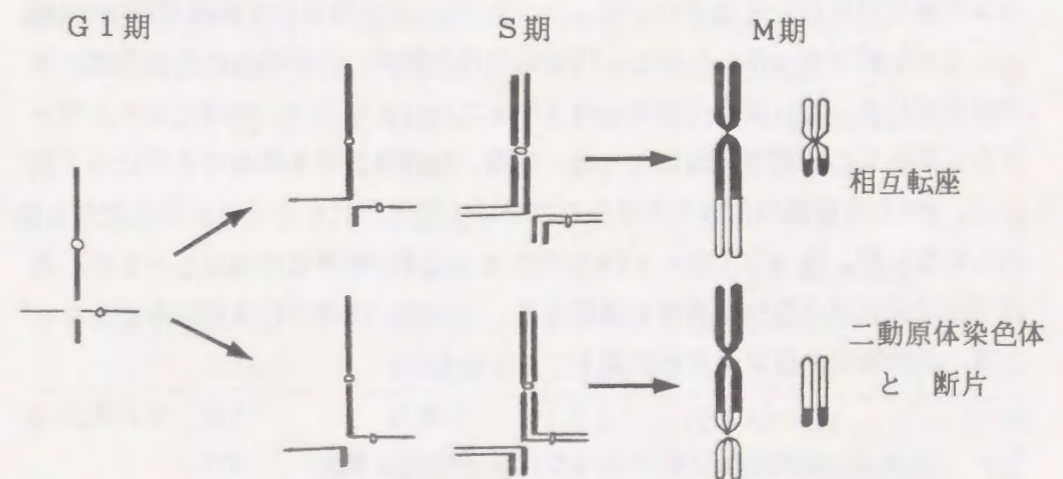


図3 染色体異常形成の模式図

第三節 代謝活性化の意義と導入の必要性

1) 化学物質の代謝による活性化

In vivoでの化学物質の生物学的作用を考える時、動物体内での代謝による化学物質の変化を考慮にいれなければならない。多くの発癌物質 (dimethyl-nitrosamine(DMN), benzo[a]pyrene(B(a)P)など) あるいは変異原性物質は主にミクロソーム分画に存在する薬物代謝酵素系によって代謝的に変化を受けて最終活性体になることが知られている。例えば、本研究で陽性対照物質として用いているDMNはチトクロムP-450により酸化的脱メチル化を受け、生成するmono-methylnitrosamineは分子内変換によりmethyldiazo hydroxideとなり、methyl-diazonium cationを経て生成するmethylcarbonium ionが核酸、蛋白質と反応する。さらに、化学物質は動物体内で代謝的に活性化されるだけでなく一連の酵素によって解毒化される。この代謝的活性化と解毒のバランスで化学物質の生物作用例えば毒性、発癌性などが現われてくる。

ところが、in vitroの系、たとえば細菌や株化された動物細胞などはそれ自身は代謝活性化能をもたないため、in vivoでの化学物質の生物作用評価の材料としては制約があった。しかし、代謝活性化の研究、活性化体の有機合成の研究の進展によって、薬物代謝系を導入することによりin vitroで代謝を必要とする化学物質の研究が可能になった。実際、染色体異常を検索する時にも、例えば、DMNを直接細胞に作用させただけでは、細胞毒性も染色体異常誘発性も認められないが、S9 mix (ラット肝の9000 x g上清に補酵素を添加したもの) 存在下では高頻度の染色体異常を誘発する。この時、代謝活性化系が存在しなければ、化学物質の変異原性を見逃すことになる。

2) In vitro細胞遺伝学的研究への代謝活性化系導入

化学物質の代謝活性化の重要性が認識されて、in vitroの系に代謝活性化系を導入する試みがなされてきた。一般に化学的に不安定であるとされる活性中間体をいかに効率よく指標生物に作用させるか、また、いかに広範囲の物質を

代謝できるようにするかが当面の課題であった。初めは、宿主経由法(host-mediated assay)^{17,18)}や細胞経由法(cell mediated assay)¹⁹⁾が報告されたが、Amesらが微生物と肝のミクロソームを組み合わせた系で代謝を必要とする化学物質の変異原性の検出を報告²⁰⁾して以来、哺乳類培養細胞を用いる系にも肝のミクロソームが導入されるようになった。

表1に1975年頃からin vitro細胞遺伝学的試験に導入された代謝活性化系の主なものをまとめた。

導入する代謝系としては、げっ歯類の肝臓の9000 x g上清 (S9) が主に用いられている。S9にはP-450を含む肝ミクロソームの薬物代謝酵素系の他に種々の酵素が存在しそれらが細胞に毒性を示す^{1,21,22)}という短所があるが、逆に、広範囲の物質を代謝できるという長所もある。

表1 動物細胞を用いるin vitro試験系への代謝活性化系の導入

検索指標	細胞*	代謝活性化			文献
		処理方法	処理時間	S9など**	
体細胞突然変異	L5178Y	回転ドラム	4 h	Aroclor-rat-S9	23
	L5178Y	静置法	2 h	PB-rat-S9	24
	V79	静置法	1 h	mice-S10,microsomes	1
	V79	静置法	3 h	MC,PB-rat-S9	3
	V79	静置法	1 h	PB-rat-S15	4
	V79	静置法	5 h	PB-rat, mice-S15	25
	V79	静置法	1h, 3 h	PB,MC,Aroclor-rat-S15	26
	FM3A	振盪法	30 min	mice-S15	27
	染色体異常	V79	静置法	3 h	PCB-rat-S15
V79		静置法	24 h	hamster feeder cell	28
V79-E		静置法	1 h	rat,human-S9	29
CHO		静置法	3 h	Aroclor-rat-S9	30
CHO		振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	31
CHO		静置法	5 h	Aroclor-rat-S9	21,32

表1 (つづき)

検索指標	細胞*	代謝活性化			文献
		処理方法	処理時間	S9など**	
染色体異常	CHO	静置法	1 h	PB-mice-S9	33
	CHO	振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	8
	C3H/10T1/2CL8	振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	34
	A(T ₁)Cl-3	振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	34
	ヒトリンパ球	透析バッグ	3 h	PB-mice-S9	22
	ヒトリンパ球	振盪法	45 min	PB-mice-microsomes	35
	ヒトリンパ球	静置法	3 h	rat liver perfusate	36
	ヒトリンパ球	透析バッグ	3 h	PB-mice-homogenate	36
	WI-38	静置法	1 h	Aroclor-rat-S9	7
	姉妹染色	V79-E	静置法	1 h	rat, human-S9
分体交換	CHO	静置法	1 h	PB, MC, Aroclor-rat-S9	2, 37
	CHO	静置法	30 min	Aroclor-rat-S9	6
	CHO	静置法	20 min	Aroclor-rat-S9	5
	CHO	振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	31
	CHO	静置法	1 h	PB-mice-S9	33
	CHO	静置法	2.5, 5 h	Aroclor-rat-S9	38
	CHO	振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	8
	C3H/10T1/2CL8	振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	34
	A(T ₁)Cl-3	振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	34
	WI-38	静置法	1 h	Aroclor-rat-S9	39
形質転換	C3H/10T1/2CL8	振盪法	1 h	Aroclor-rat-S9	34
	BHK-21/Cl 13	振盪法	4 h	Aroclor-rat-S9	40

* 細胞 L5178Y : DBA/2 マウスリンパ細胞性腹水腫瘍
 V79 : チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞株
 CHO : チャイニーズ・ハムスター卵巣由来細胞株

FM3A : C3H マウス乳癌由来細胞株
 C3H/10T1/2:C3H マウス胎児由来細胞株
 A(T₁)Cl-3 : シリアン・ハムスター由来疑 2 倍体細胞株
 WI-38 : ヒト胎児肺由来正常 2 倍体線維芽細胞株
 BHK-21/Cl 13 : シリアン・ハムスター腎由来線維芽細胞株

** 誘導剤—使用動物—肝の使用画分, Aroclor: Aroclor 1254, PB: pheno-
 barbital, MC: 3-methylcholanthrene

第二章 代謝活性化法の確立

第一節 振盪法

当研究室で発表した134種の化合物の染色体異常誘発性に関する研究⁴¹⁾では、dialkyl nitrosamine類やquinolineのような発癌前駆物質は培養細胞に直接作用させても明らかな染色体異常誘発性を示さなかった。

しかし、1976年にNatarajanら⁸⁾はDMNおよびdiethylnitrosamine(DEN)がS9 mix存在下、染色体異常を誘発することを示し、微生物の系で使われているミクロソーム活性化系を哺乳動物細胞の細胞学的研究に用いることができることを実証した。彼らの代謝活性化法(振盪法)の手順を以下に示す。

Natarajanらの方法

- 1) 細胞をトリプシンではがし、遠心して回収後、 $1 \sim 2 \times 10^7$ cells/mlの細胞浮遊液を調製する。
- 2) 試験管に0.5 mlのS9 mix, 0.1 mlの被験物質溶液, 0.1 mlの細胞浮遊液を入れて、数秒間酸素ガスを吹き込んで固くふたをする。
- 3) 37°C恒温槽中で1時間振盪しながら処理する。
- 4) 遠心して細胞を回収し、培養液で洗ってシャーレにまく。
- 5) 標本作製2時間前にコルセミド処理を行い、空気乾燥法で染色体標本作製し、ギムザで染色する。

Natarajanらは、CHO細胞(チャイニーズ・ハムスター卵巣由来の株細胞)を用いているが、本研究ではこれまでに蓄積された化学物質の染色体異常誘発性に関するデータがあることから、CHL細胞を用いて、陽性対照物質DMNに関するNatarajanらの方法の追試、実験条件の検討を行った。

1) DMNのS9 mix存在下での染色体異常誘発性

DMNは、当研究室の直接法(代謝活性化系を用いない化学物質のみによる培養

細胞の処理)の結果では、2.0 mg/mlまで処理しても染色体異常誘発性は認められなかった⁴¹⁾。そこで、PCB誘導を行ったWistarラット肝より調製したS9を用いて上記の振盪法でDMNの染色体異常誘発性を検討した。DMNの処理濃度を、1.0, 2.0, 3.0および4.0 mg/mlとし、37°Cの恒温水槽中で試験管を35°の角度で固定して振盪しながら3時間処理した。回復時間として24時間おいた後、染色体標本作製した。

その結果、図4のように4.0 mg/mlまで処理してもS9 mix非存在下では、陰性対照レベルと同等であったのに対し、S9 mix存在下では濃度依存性のある、著しい、染色体異常誘発頻度の増加が認められた。1.0 mg/mlでは40.0%、2.0 mg/mlでは54.7%、3.0 mg/mlでは62.0%、そして、最高濃度4.0 mg/mlでは77.3%という高頻度の異常をもつ細胞の出現が認められた。4.0 mg/mlより高い濃度では細胞に毒性効果が現れ観察可能な染色体標本作製は困難であった。

以上のように、Natarajanらの方法でDMNがS9 mix存在下、染色体異常を誘発することを確認できた。

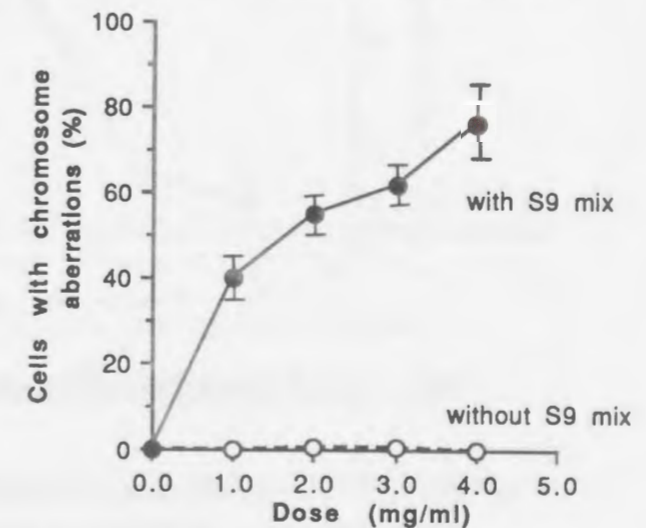


図4 DMNの染色体異常誘発性

2) 処理時間の検討

各点は3枚のシャーレの平均値±標準偏差を示している。

S9 mix存在下、DMN 3.0 mg/mlで4時間までの処理時間についてその影響を調べた。回復時間は24時間とした。

図5から明らかなように、染色体異常誘発頻度は処理時間に比例して増加し、3時間処理では48.0%、4時間処理では85.5%の染色体異常の出現が観察された。ただし、細胞の生存率は3時間の振盪処理だけで50%近くまで低下した。これは、本来、単層で増殖する細胞を浮遊状態で振盪することによる物理的影響のため

と考えられる。そこで、以後の実験における処理時間として、細胞を回収して染色体標本を作製できる範囲で最も長い時間である3時間を採用した。

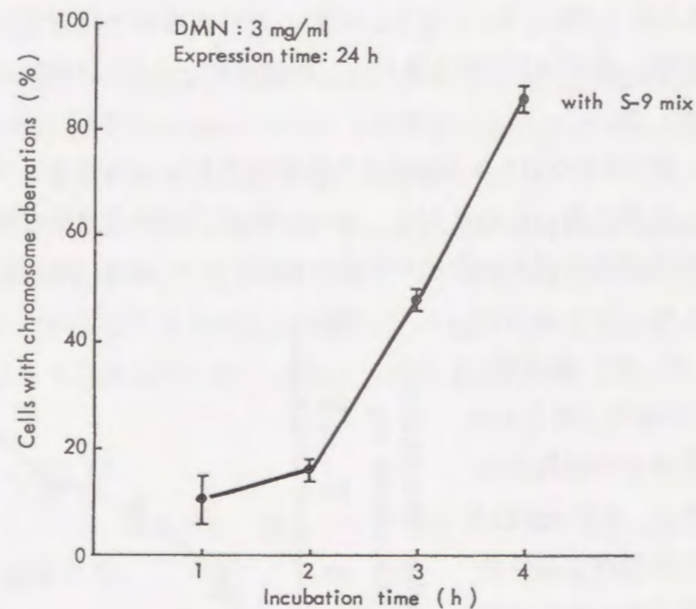


図5 DMNの染色体異常誘発頻度に及ぼす処理時間の影響

S9 mix存在下, 3.0 mg/mlのDMNで細胞を処理し, 24時間の回復時間をおいて染色体標本を作製した。各点は3枚のシャーレの平均値±標準偏差を示している。

3) 回復時間の検討

細胞をS9 mix非存在下および存在下, DMN 2.0 mg/mlで3時間処理後, 遠心して回収し, 新しい培養液で再播種後, 6時間から48時間までの, 6時間毎, 8点の回復時間をおいて染色体標本を作製した。

その結果図6のように, S9 mix存在下では, 24時間の回復時間をおいた時に, 最高頻度52.7%の染色体異常をもつ細胞の出現を観察できた。24時間以降48時間までは非常にゆっくりと出現頻度は低下していった。そこで, 回復時間は24時

間とした。

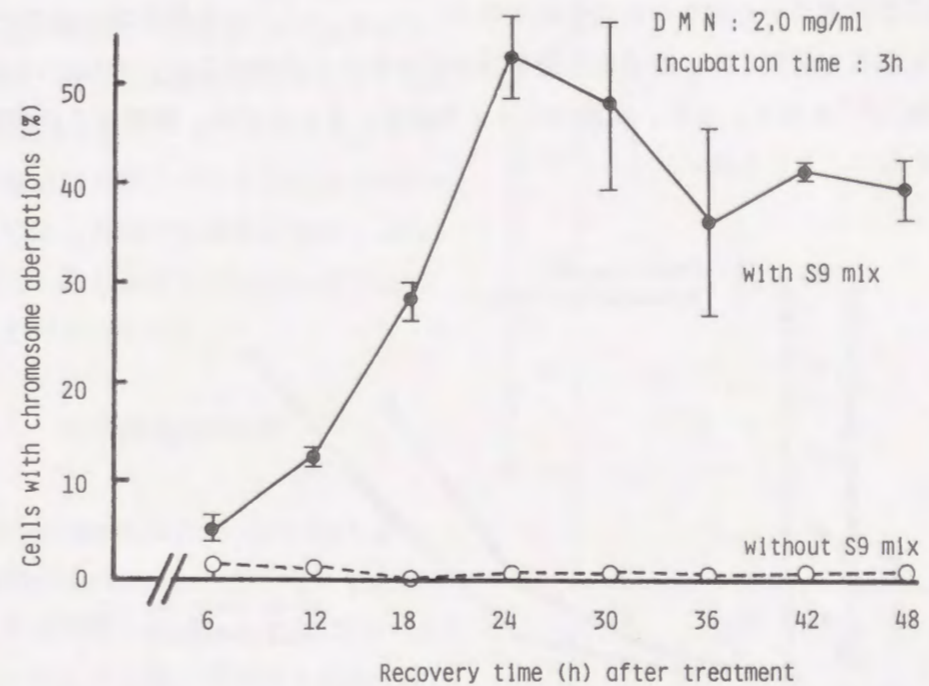


図6 DMNの染色体異常誘発頻度に及ぼす回復時間の影響

S9 mix非存在下および存在下, 2.0 mg/mlのDMNで細胞を3時間処理後, 図中の各回復時間をおいて染色体標本を作製した。各点は3枚のシャーレの平均値±標準偏差を示している。

4) 酸素ガス添加の必要性

本研究で用いているS9 mixは主に肝ミクロソームにある薬物代謝酵素系の活性を利用するものである。その活性発現には分子状酸素が必要とされることから, Natarajanらは酸素ガスを添加したものと推測される。そこで, 酸素の添加が染色体異常誘発頻度に及ぼす影響を調べた。

細胞をS9 mix存在下, 3.0 mg/mlのDMNで処理し, 酸素処理群には酸素ポンペより酸素ガスを試験管に数秒間吹き込んだ。

その結果図7のように、染色体異常出現頻度は、どの処理時間でも酸素を添加しない場合に比べて酸素を添加した群の方が高い値を示しているが、酸素を添加しない場合でも明らかな陽性結果を示した。このことから空気中の酸素で十分であると解釈した。高濃度の酸素は染色体異常を誘発するというSturrockらの報告⁴²⁾もあり、また、実験操作をより簡便にするために、酸素ガスの添加は行わないことにした。

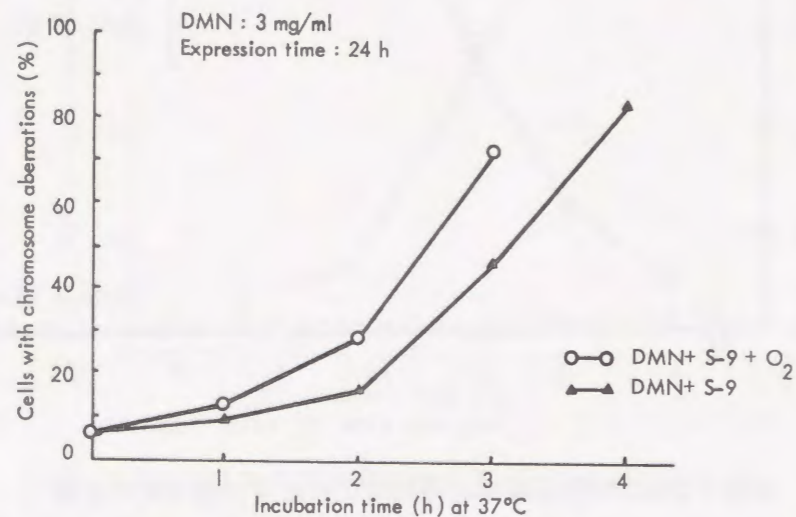


図7 DMNの染色体異常誘発頻度に及ぼす酸素ガス添加の影響

酸素ガス添加群 (○) には、細胞を3.0 mg/mlのDMNでS9 mix存在下処理する時に、数秒間酸素ガスを吹き込んで密閉した。酸素ガス非添加群 (▲) は細胞、DMN、S9 mixを試験管に入れてそのまま密閉した。

5) S9 mix中の各成分の誘発異常頻度に及ぼす影響

成分を一つずつ除いたS9 mixと2.0 mg/mlのDMNで細胞を3時間処理後、24時間の回復時間をおいて染色体異常を観察した。

図8にその結果を示した。完全なS9 mixあるいはKClを除いたS9 mix存在下で

は、それぞれ42%あるいは48%の異常の出現がみられたが、MgCl₂、G-6-PあるいはNADPを除いたS9 mix存在下では、異常出現頻度はそれぞれ、30%、24%あるいは3%にまで減少した。生理食塩液およびS9だけの存在下ではDMNは5%以上の染色体異常は誘発しなかった。最も必須な成分はNADPであることが判明した。

6) 酵素誘導剤の比較

Phenobarbital(PB)型P-450と3-methylcholanthrene(MC)型P-450の両方を誘導する基質としてPCBが用いられるが、その他の誘導剤も含めて実際に染色体異常誘発頻度にどのような影響を及ぼすかを調べた。S9はPCB以外にPB、MCで処理したWistarラット肝より調製したものと、無処理のラットから調製したS9を対照として用いた。染色体異常を誘発するモデル物質としてDMN 3.0 mg/ml, 2-acetylaminofluorene(AAF) 0.5 mg/ml, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)

0.5 mg/mlを用いた。CHL細胞を被験物質と各種S9 mix存在下、3時間の振盪処理を行い、24時間の回復時間後染色体標本作製した。

図9に示すように、同じモデル物質で処理しても、誘導剤によって異常頻度は変わる傾向を示した。DMNはPB処理のS9 mixを用いたときに、AAFはPCB処理のS9 mixを用いたときに、DMBAはMC処理のS9 mixを用いたときに、それぞれ最高

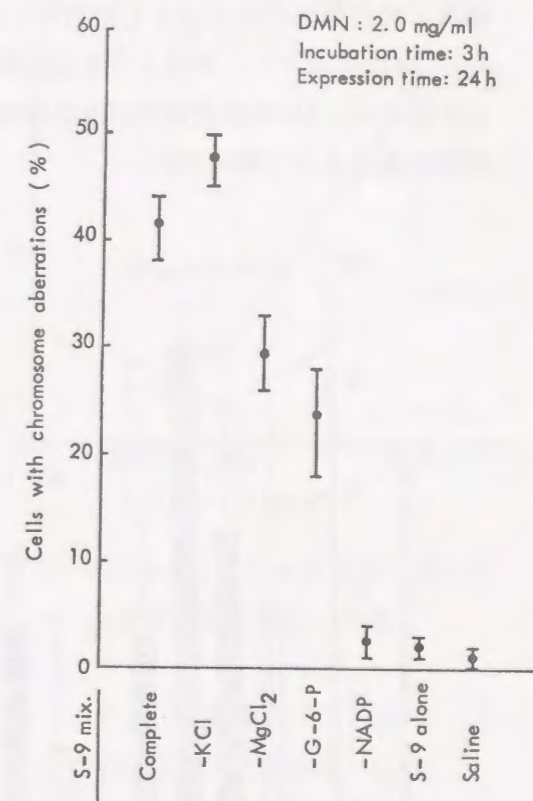


図8 DMNの染色体異常誘発頻度に及ぼすS9 mix中の各成分の影響

DMN 2.0 mg/mlで細胞を3時間処理し、24時間の回復時間をおいて染色体標本作製した。各点は3枚のシャーレの平均値±標準偏差を示している。

頻度の染色体異常を誘発する傾向を示した。PBはDMNでは最も効果的であったが、AAFでは無処理ラットのS9よりも低い頻度の異常しか誘発しなかった。しかし、この結果は、AAFの肝発癌性がPBの同時投与によって低下するという報告⁴³⁾と関連があるようで興味深い。

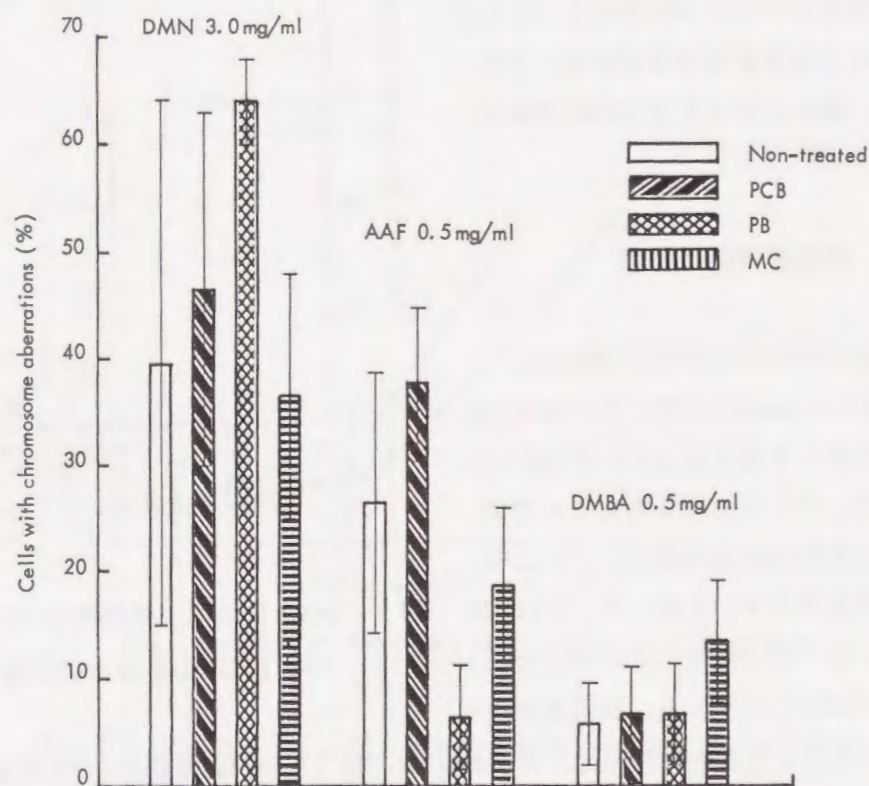


図9 染色体異常誘発頻度に及ぼす酵素誘導剤の影響

細胞をDMN 3.0 mg/ml, AAF 0.5 mg/mlおよびDMBA 0.5 mg/mlで、無処理およびPCB, PBあるいはMCで酵素誘導を行ったWistarラットから調製したS9 mix存在下処理した。各点は3枚のシャーレの平均値±標準偏差を示している。

また、styreneは、PCB誘導のS9よりもMC誘導のS9を用いたときに明らかな染色体異常を誘発した。(図10)

このように化学物質によってはPCBが必ずしも最も効果的な誘導剤とは限らない。しかし、本研究で用いているPCBすなわちKanechlor 400(KC-400)について、PB型のP-450ならびにMC型のP-450による代謝活性化を両方とも誘導し得るという生化学的報告⁴⁴⁾があり、広範な化学物質をスクリーニングする目的では、やはりPCBが適切な誘導剤といえる。

7) 溶媒エタノールの影響

当研究室では染色体異常誘発性を検索するときの被験物質の溶媒として生理食塩液(最終濃度10%), エタノール(1%), dimethyl sulfoxide(DMSO)(0.5%), 1%carboxymethylcellulose sodium(CMC)水溶液(10%)の4種を用いている。最終濃度は細胞毒性試験を行い、溶媒自身の細胞毒性が認められない濃度を選んで決定した。通常は、前3者の溶媒のうち最も溶解度の高い溶媒を選んで被験物質を溶解して、細胞を培養しているシャーレに添加しているが、どれにも溶解しない物質については、1% CMC水溶液に懸濁させて添加している。

ところが、S9 mixを用いる代謝活性化法では、エタノールを溶媒に用いた時に、溶媒対照で表2のような、これまで対照群では観察されなかった程の高率のcteを含む染色体異常の出現が認められた。

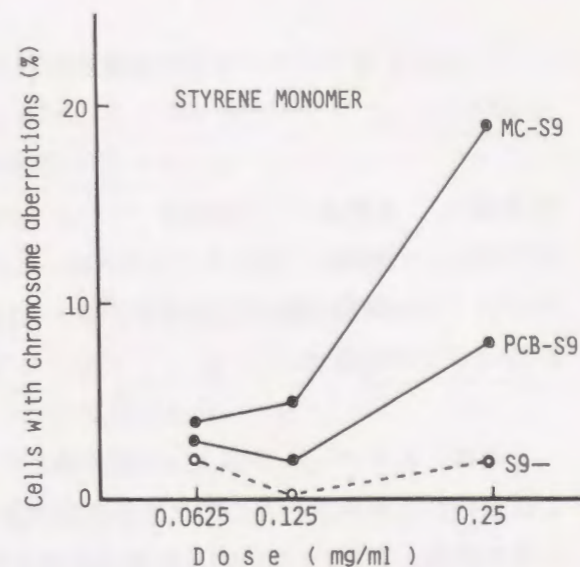


図10 Styreneの染色体異常誘発頻度に及ぼす酵素誘導剤の影響

MC-S9:MC誘導を行ったS9
PCB-S9:PCB誘導を行ったS9
S9- :S9非添加群

表2 エタノール対照群で観察された染色体異常

標本番号	実験条件	倍数体	染色体異常出現頻度 (%)					total
			ctg	ctb	cte	csb	cse	
B-2209	EtOH	0	0	0	0	0	0	0
B-2210	EtOH+S9 mix	0	2	11	17	0	0	21
B-3182	EtOH+S9 mix	2	0	2	5	0	0	6

これは、エタノールがS9 mixで酸化されてアセトアルデヒドを形成したためではないかと推察されたのでアセトアルデヒドの染色体異常誘発性を調べた。その結果、表3のように明らかな染色体異常誘発性が確認された。

表3 アセトアルデヒドの染色体異常誘発性

処理時間 (h)	濃度 (mg/ml)	倍数体 (%)	染色体異常出現頻度 (%)						total	判定
			ctg	ctb	cte	frg	csb	cse		
24	0(none)	0	0	1	0	0	0	0	1	
24	0(saline)	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	0.02	0	1	2	2	0	0	0	5	±
24	0.03	0	2	9	10	0	0	0	19	+
24	0.04	1	6	27	21	0	0	0	40	+
48	0(none)	1	1	0	0	0	0	0	1	
48	0(saline)	1	0	0	0	0	0	1	1	
48	0.02	1	0	11	16	0	0	0	23	+
48	0.03	0	1	16	25	0	0	0	35	+
48	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox

Tox: 分裂細胞がほとんど観察されなかった。

S9 mix存在下の被験物質処理群で染色体異常が観察された時、溶媒エタノールの影響か、被験物質の影響か、区別することができない。そこで、この検索法ではエタノールを溶媒としては用いないことにした。

最終的には以下の点についてNatarajanらの方法を修正した振盪法を用いて、1978年から1981年まで約70検体について染色体異常誘発性を検索した。

- 1] 酸素ガスの添加は行わない。
- 2] 処理時間は3時間とする。
- 3] 回復時間は24時間おく。

しかし、この振盪法には、基本的に以下の2つの問題点が含まれていた。

1. 本来単層で増殖している細胞を浮遊状態で振盪するという非生理的条件で実験を行っていること。実際、3時間振盪すると生存率は50%近くまで低下する。
2. 化学物質の処理濃度が非常に高い。特に、多環芳香族炭化水素においてその傾向が顕著で、溶解限界をこえて、懸濁状態で処理してやっと陽性結果を示した。

Natarajanらは1976年に発表した報告の中でDMNについて振盪法と静置法の簡単な比較も行っており、両法は、同程度に効果的であるとしながらも酸素ガス添加がやりにくい、より多くのS9 mixが必要であるという点から振盪法を採用した。

しかし、本研究では、酸素ガスの添加は行わないことにしたこと、また、S9 mixの量の問題は、処理時の液量を少なくすることによって解決できるのではないかと考え、細胞をシャーレに増殖している状態のまま処理する方法を試みることにした。

第二節 静置法

播種細胞数および処理までの培養日数は当研究室の直接法にならい、 2×10^4 cells/plateおよび3日とした。処理時の液量を3 mlにし、その内訳は、2.5 mlが培養液、0.5 mlがS9 mixとした。S9 mixの組成は、振盪法と同じである。ただし、処理時の最終S9濃度は振盪法では21.4%であったが、静置法では、5%になる。被験物質は、生理食塩液に溶解するものは、シャーレあたり0.3 ml、DMSOに溶解するものは0.015 mlの溶液を添加する。

1) S9濃度の影響および処理時間の検討

S9濃度について、低濃度のせまい範囲に至適濃度のある例がAF-2によるL5178Y細胞の突然変異²⁴⁾、B(a)P、aflatoxin B₁による姉妹染色分体交換⁶⁾、トリプトファン熱分解産物によるサルモネラ菌の突然変異^{4,5)}などで報告されている。また、西ら²⁸⁾は、細胞経由法とミクロソーム(S15)経由法を比較して、細胞経由法で良好な結果を示し、これは、ミクロソーム経由法では過剰の酵素が代謝反応を解毒の方へ押し進めているためではないかと考察し、添加ミクロソーム量の選択には注意を要すると結んでいる。

処理時間は、振盪法と同じ3時間と、この方法では細胞に対する物理的損傷が少ないようなので6時間についても検討した。

本研究では1%、2%、5%、7.5%、10%のS9濃度について染色体異常誘発頻度の変化を調べた。(図11)

DMN 1.0 mg/mlで細胞を処理すると、染色体異常頻度はS9濃度5%から、S9濃度の増加につれて直線的に上昇した。B(a)P 0.02 mg/mlでは、S9濃度5%で異常出現頻度が最高となり、その後はS9濃度の増加につれて異常頻度はゆるやかに減少していった。DMBA 0.025 mg/mlの処理では、染色体異常頻度は、S9濃度の増加につれて直線的に上昇していった。Phenacetin 1.6 mg/mlでは、S9濃度5%から10%の範囲で同程度の異常出現頻度が記録された。

処理時間については、どの物質についても6時間処理の方が高い染色体異常出現頻度を示した。

以上の結果から、S9濃度は5%、処理時間は6時間を採用することにした。

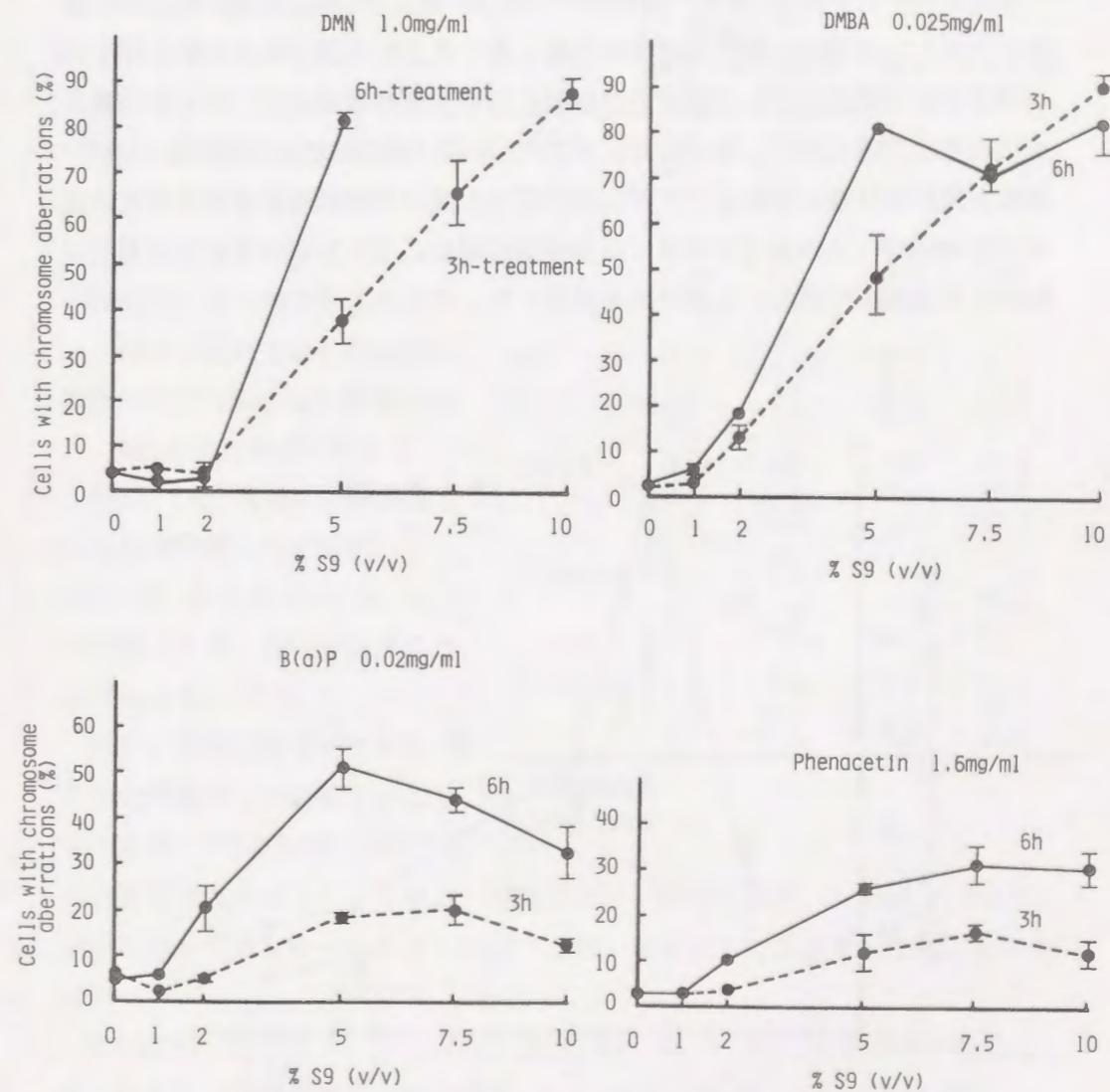


図11 染色体異常誘発頻度に及ぼすS9濃度および処理時間の影響

静置法で3時間(点線)あるいは6時間(実線), S9 mix存在下, 各化学物質で細胞を処理した。各点は3枚のシャーレの平均値±標準偏差を示している。

2) 回復時間の検討

細胞をDMN 1.0 mg/mlあるいはB(a)P 0.02 mg/mlで6時間処理後、新しい培養液と交換し、経時的に染色体標本を作製した。その結果図12のように、DMNでは18時間の回復時間をおいた時に染色体異常出現頻度が最高に達した。その後は、出現頻度は急速に低下していった。またB(a)Pは、測定した範囲内では12時間で異常出現頻度は最高値を示したが、18時間でも同程度の出現頻度を保っていた。そこでDMNとB(a)Pの両方が同時に最高の出現頻度に近いところで染色体異常を観察できる回復時間として18時間を採用した。

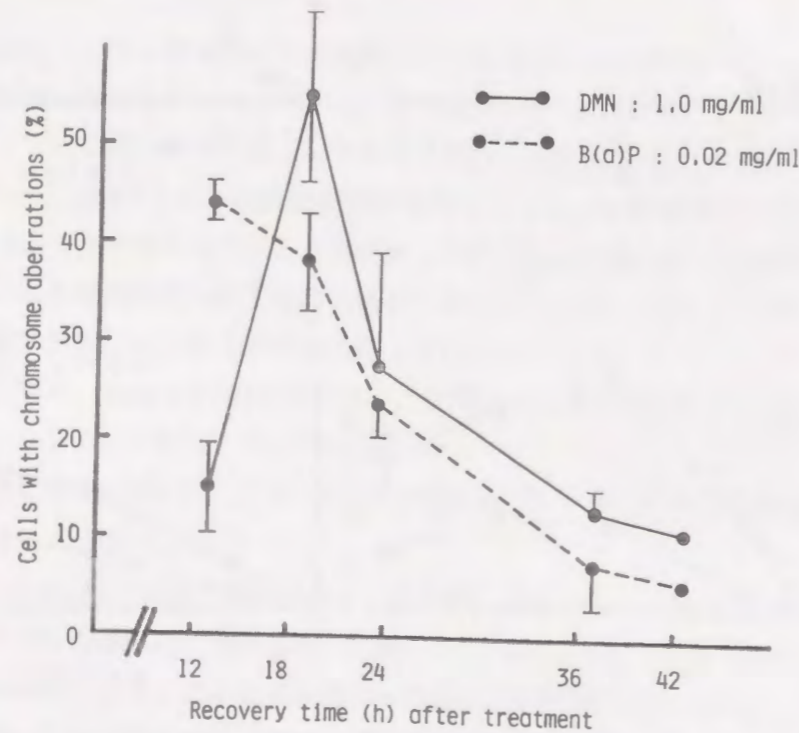


図12 DMNおよびB(a)Pの染色体異常誘発頻度に及ぼす回復時間の影響 (静置法, 6時間処理)

各点は3枚のシャーレの平均値±標準偏差を示している。

3) 振盪法と静置法の比較

6種の化学物質について振盪法と静置法を比較した。(表4) その結果、すべての化学物質において、静置法の方が振盪法に比べて明らかに低い濃度で染色体異常の出現が観察された。

DMNでは、約70%の染色体異常の出現が振盪法では4.0 mg/ml、静置法では1.0mg/mlで観察された。4倍の濃度の違いがある。

B(a)Pでは、22%の染色体異常の出現が、振盪法では0.51 mg/mlで、静置法では0.01 mg/mlで観察された。約50倍の濃度の差があった。

MCは、静置法を用いても約10%の染色体異常しか観察することができず、6種の物質の中で最も

低い異常頻度を示した。しかし、振盪法では、25倍の濃度、2.0 mg/mlでも全く陽性結果を示さなかったことと比較すると、静置法の方が効果的であるといえる。

DMBAでは、静置法で0.05 mg/mlの濃度で52.3%の染色体異常の出現が観察されたのに対し、振盪法では10倍の濃度、0.5 mg/mlで処理しても25.0%の異常しか出現しなかった。

3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-MeDAB)は、8.0 mg/mlと非常に高い濃度で処理した振盪法に比べ、静置法では100倍以上の低濃度、0.05 mg/mlで25.6%の明らかな異常の出現が認められた。

Phenacetinは静置法と振盪法との結果の差が一番小さい物質であった。振盪

表4 振盪法と静置法の比較

化合物	振盪法 ¹⁾		静置法 ²⁾	
	濃度 (mg/ml)	異常細胞 (%)	濃度 (mg/ml)	異常細胞 (%)
DMN	1.0	40.0	0.25	5.3
	2.0	54.7	0.5	13.0
	4.0	77.3	1.0	73.3
B(a)P	0.13	6.0	0.01	22.3
	0.26	8.0	0.02	48.0
	0.51	22.0	0.04	47.6
MC	0.5	1.0	0.02	10.3
	1.0	1.0	0.04	12.0
	2.0	3.0	0.08	12.3
DMBA	0.125	8.0	0.05	52.3
	0.25	16.0	0.1	60.6
	0.5	25.0	0.2	38.3
3'-MeDAB	2.0	4.0	0.025	2.6
	4.0	7.0	0.05	25.6
	8.0	10.0		
Phenacetin	0.8	9.0	0.4	19.0
	1.6	18.0	0.8	23.3
	3.2	51.0	1.6	26.0

1) 3時間処理

2) 6時間処理

法では直線的な用量反応関係がみられたのに対し、静置法での用量反応関係ははっきりしなかった。

静置法との比較で、特に、多環芳香族炭化水素について振盪法での処理濃度が異常に高かったことが明確になった。これは、振盪法でのS9濃度が21.4%と高かったことによるのではないかと推察される。高濃度の酵素の存在は、生成された活性中間体をすぐに解毒の方向へ進ませる可能性があるからである。

静置法では、大量の細胞の調製や処理後の細胞を回収して再播種する必要がなく、実験手順が簡便である。また、振盪による物理的損傷がないために、振盪法の約十分の一の細胞でも6時間の処理が可能である。

以上の結果から、処理時間6時間、回復時間18時間、S9濃度5%の条件を標準として、静置法で化学物質の代謝活性化を行うことにした。

第三章以下に、静置法で行った事例を示す。

第三章 抗酸化剤BHAの染色体異常誘発性

3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisole(BHA)は、食品、化粧品などに、抗酸化剤として世界的に広く利用されている。その変異原性についてはAmes試験では陰性、rec assayでは弱陽性という報告が⁴⁶⁾、また、染色体異常誘発性については陰性という報告^{41, 47)}があったが、1983年に、ラットおよびハムスターで発癌性が報告^{48, 49)}されて以来、BHAの安全性について再評価をしようという動きが高まり、その一環としてBHAの染色体異常誘発性の検討を行った。

第一節 BHAおよびその代謝物

BHAおよび現在までに報告されている代謝物の構造式を図13に示す。ただし、右下の*tert*-butyl-quinone oxide(BQO)は予想代謝物でまだ実際には代謝物としての存在は確認されていない。BHAは化学的にはアルカリ性あるいは中性条件下、酸素と反応して二量体となるが、Armstrongらによってラット肝ミクロソームを用いる代謝実験でもその生成が報告されている⁵⁰⁾。またベンゼン環の水酸化反応によって3-*tert*-butyl-4,5-dihydroxyanisole(BHA-OH)および3-*tert*-

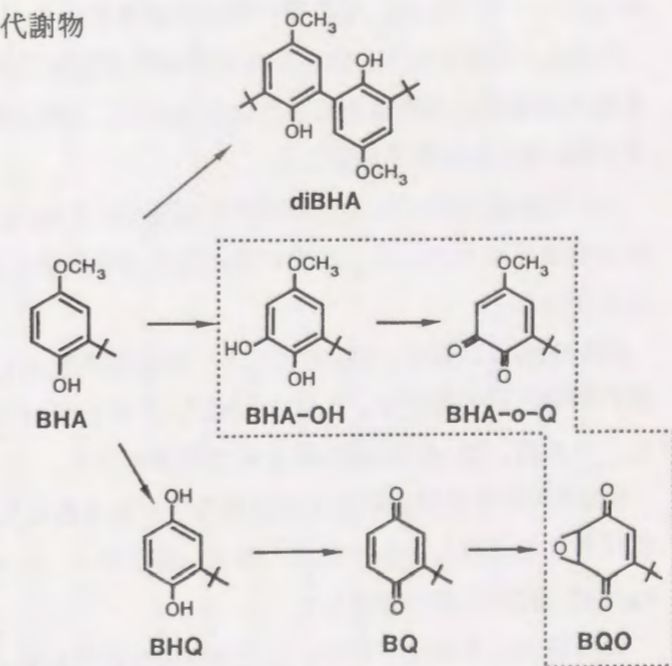


図13 BHAおよびその代謝物の構造式と代謝経路

右下のBQOは予想代謝物で、まだ実際には代謝物としての存在は確認されていない。点線で囲まれた物質が、S9 mix存在下、染色体異常を誘発した物質である。

butylanisole-4,5-quinone(BHA-o-Q)が、側鎖メトキシ基の脱メチル化反応によってtert-butylhydroquinone(BHQ)およびtert-butylquinone(BQ)が生成するという経路が考えられている。ラット、ウサギ、イヌなどの動物を用いたin vivo代謝実験では、主に、BHAの4位の位置のグルクロン酸あるいは硫酸抱合体が尿中に排泄されることが報告されている^{51,52,53}。

第二節 実験結果

BHAおよびその代謝物について直接法(表5中のS9 mix-)と静置法(表5中のS9 mix+)を行った。その染色体異常誘発頻度を表5に示す。

BHAは、直接法では、明らかな細胞毒性が観察される0.1 mg/mlまで処理しても染色体異常の出現は認められなかったが、S9mix存在下、0.125 mg/mlの処理で11%の染色体異常を誘発した。

BHA dimer(diBHA)は、溶解限界を越えて0.2 mg/mlまで処理したが、S9 mix添加の有無にかかわらず、細胞にならぬ毒性徴候も示さず、染色体異常も誘発しなかった。

BHA-OHおよびBHA-o-Qは非常によく似た結果を示した。6時間あるいは24時間の代謝物だけの処理で、0.02 mg/mlで13%から28%の明らかな染色体異常を誘発し、これは、S9 mixの添加によって抑えられた。

BHQは代謝物だけの処理では細胞毒性がみられる0.05 mg/mlまで処理しても染色体異常を誘発しなかったが、S9 mix存在下で、0.03 mg/mlで12%、0.04 mg/mlで19%の異常を誘発した。

BQはS9 mix非存在下では、染色体異常の出現は認められなかったが、S9 mix存在下では、非存在下の約10倍の濃度、0.02 mg/mlで処理したときに、11%と弱いながらも染色体異常を誘発した。この時の異常の種類は、染色分体型切断がほとんどで、他の代謝物が、陽性の時に少なくとも同程度の染色分体型交換も誘発しているのとは対照的であった。また、24時間処理において、2%から7%の倍数体の出現が認められたが、濃度依存性もなく疑陽性の範囲にとどまった。

BHQからさらに代謝されて生成すると想定されるBQOについては、他の代謝物の約10分の1の濃度でしか処理することができず、細胞毒性が最も強い物質であ

った。濃度依存性は明らかではないが直接的効果を示し、6時間処理では、0.006 mg/mlで22%、24時間処理では0.002 mg/mlで11%の染色体異常の出現がみられた。S9 mix存在下では、染色体異常の出現はコントロールレベルまで抑えられた。

表5 BHAおよびその代謝物の染色体異常誘発性

Compound	Dose (mg/ml)	S9 mix	Time ^a (h)	Pol ^b (%)	Cells with chromosomal aberrations(%) ^c						Judge ^d	
					ctg	cib	cte	frg	csb	cse		total
BHA	0(DMSO) ^e	-	24-0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.02	-	24-0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.04	-	24-0	0	3	1	0	0	0	0	4	-
	0.06	-	24-0	0	3	0	0	0	0	0	3	-
	0.08	-	24-0	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox ^f
	0(DMSO)	-	48-0	1	0	0	1	0	0	0	1	-
	0.02	-	48-0	0	1	0	1	0	0	0	2	-
	0.04	-	48-0	0	1	1	0	0	0	0	2	-
	0.06	-	48-0	0	1	1	1	0	0	0	3	-
	0.08	-	48-0	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox
	0(DMSO)	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.05	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.075	-	6-18	3	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.1	-	6-18	1	2	0	1	0	0	0	2	-
	0.125	-	6-18	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox
diBHA	0(DMSO) ^e	+	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.05	+	6-18	1	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.075	+	6-18	3	2	2	0	0	0	0	4	-
	0.1	+	6-18	2	0	2	2	0	0	0	4	-
	0.125	+	6-18	0	2	5	8	0	0	0	11	+
	0.15	+	6-18	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox
	0(DMSO)	-	24-0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.1	-	24-0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.15	-	24-0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.2	-	24-0	1	0	0	0	0	0	0	0	-
	0(DMSO)	-	48-0	0	0	0	0	0	0	1	1	-
	0.1	-	48-0	0	1	0	0	0	0	0	1	-
	0.15	-	48-0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.2	-	48-0	0	1	0	0	0	0	0	1	-
	0(DMSO)	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-
0.1	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
0.15	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
0.2	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
0(DMSO)	+	6-18	0	2	0	0	0	0	0	2	-	
0.1	+	6-18	0	2	0	0	0	0	0	2	-	
0.15	+	6-18	0	1	0	0	0	0	0	1	-	
0.2	+	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-	

表5 (つづき)

Compound	Dose (mg/ml)	S9 mix	Time ^a (h)	Pol ^b (%)	Cells with chromosomal aberrations(%) ^c						Judge ^d	
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse		total
BHA-OH	0(Sal)	-	24-0	0	1	0	0	0	1	0	2	
	0.01	-	24-0	4	0	2	1	0	1	0	4	-
	0.015	-	24-0	2	1	5	7	0	0	0	11	+
	0.02	-	24-0	1	8	13	15	0	0	0	25	+
	0(Sal)	-	48-0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.01	-	48-0	0	1	0	1	0	0	0	2	-
	0.015	-	48-0	1	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.02	-	48-0	4	4	1	2	0	0	0	7	±
	0(Sal)	-	6-18	0	0	1	0	0	0	0	1	
	0.005	-	6-18	1	0	0	1	0	0	0	1	-
	0.01	-	6-18	1	1	0	1	0	0	0	2	-
	0.02	-	6-18	1	6	17	20	0	0	0	28	+
	0(Sal)	+	6-18	1	0	1	1	0	1	0	2	
	0.005	+	6-18	0	1	0	0	0	0	0	1	-
	0.01	+	6-18	0	0	1	0	0	0	0	1	-
0.02	+	6-18	0	1	0	0	0	0	0	1	-	
BHA-o-Q	0(Sal)	-	24-0	0	1	0	0	0	1	0	2	
	0.01	-	24-0	2	0	1	2	0	0	0	3	-
	0.015	-	24-0	1	2	4	7	0	0	0	9	±
	0.02	-	24-0	3	9	11	16	0	0	0	24	+
	0(Sal)	-	48-0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.01	-	48-0	0	1	1	1	0	0	0	3	-
	0.015	-	48-0	3	0	3	2	0	0	1	4	-
	0.02	-	48-0	3	0	0	0	0	1	0	1	-
	0(Sal)	-	6-18	0	0	1	0	0	0	0	1	
	0.005	-	6-18	0	0	1	0	0	0	0	1	-
	0.01	-	6-18	0	0	1	1	0	0	0	2	-
	0.02	-	6-18	2	5	2	9	0	0	0	13	+
	0(Sal)	+	6-18	1	0	1	1	0	1	0	2	
	0.005	+	6-18	0	1	0	0	0	0	0	1	-
	0.01	+	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	-
0.02	+	6-18	3	0	1	0	0	0	0	1	-	
BHQ	0(DMSO)	-	24-0	0	2	2	0	0	1	0	4	
	0.0125	-	24-0	1	2	0	0	0	0	0	2	-
	0.025	-	24-0	3	3	0	0	0	0	0	3	-
	0.05	-	24-0	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox
	0(DMSO)	-	48-0	1	1	0	0	0	0	0	1	
	0.0125	-	48-0	0	2	0	0	0	0	0	2	-
	0.025	-	48-0	1	1	0	1	0	0	0	2	-
	0.05	-	48-0	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox
	0(DMSO)	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.02	-	6-18	1	2	0	0	0	0	0	2	-
	0.03	-	6-18	0	0	1	0	0	0	0	1	-
	0.04	-	6-18	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox
	0(DMSO)	+	6-18	0	2	0	0	0	0	0	2	
	0.02	+	6-18	0	1	3	2	0	0	0	5	±
	0.03	+	6-18	1	3	4	9	0	0	0	12	+
0.04	+	6-18	2	6	7	12	0	0	1	19	+	

表5 (つづき)

Compound	Dose (mg/ml)	S9 mix	Time ^a (h)	Pol ^b (%)	Cells with chromosomal aberrations(%) ^c						Judge ^d	
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse		total
BQ	0(DMSO)	-	24-0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	0.0015	-	24-0	5	3	2	1	0	0	0	6	±
	0.002	-	24-0	2	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.0025	-	24-0	5	0	2	2	0	0	0	3	-
	0.003	-	24-0	7	3	3	1	0	0	1	7	±
	0(DMSO)	-	48-0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	0.002	-	48-0	2	1	0	0	0	0	0	1	-
	0.0025	-	48-0	3	1	1	0	0	1	0	3	-
	0.003	-	48-0	2	0	0	0	0	0	0	0	-
	0(DMSO)	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.001	-	6-18	1	0	1	0	0	0	0	1	-
	0.002	-	6-18	2	2	3	1	0	0	0	5	±
	0.003	-	6-18	-	-	-	-	-	-	-	-	Tox
	0(DMSO)	+	6-18	0	2	0	0	0	0	0	2	
	0.005	+	6-18	0	1	0	0	0	0	0	1	-
0.01	+	6-18	2	0	1	0	0	0	0	1	-	
0.02	+	6-18	1	1	9	2	0	0	0	11	+	
BQO	0(Sal)	-	24-0	0	1	0	0	0	1	0	2	
	0.0005	-	24-0	1	1	0	0	0	0	0	1	-
	0.001	-	24-0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.002	-	24-0	1	2	5	6	0	0	0	11	+
	0(Sal)	-	48-0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.0005	-	48-0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.001	-	48-0	0	1	0	1	0	0	0	2	-
	0.002	-	48-0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0(Sal)	-	6-18	0	1	0	0	0	0	0	1	
	0.002	-	6-18	1	4	0	0	0	0	1	5	±
	0.004	-	6-18	1	1	0	1	0	0	0	2	-
	0.006	-	6-18	3	8	8	12	0	1	0	22	+
	0(Sal)	+	6-18	1	0	0	0	0	0	0	0	
	0.002	+	6-18	0	1	0	0	0	0	0	1	-
	0.004	+	6-18	0	1	1	0	0	0	0	2	-
0.006	+	6-18	0	2	0	0	0	0	0	2	-	

a : 処理時間-回復時間

b : 倍数体(polyploid)

c : 染色体異常を有する細胞の出現頻度

d : 判定 ; 異常出現頻度が4%以下の場合 -, 5%から9%の場合は ±, 10%以上の場合は + と判定した.

e : 溶媒, Sal:生理食塩液

f : 分裂細胞がほとんど観察されなかった.

BHAおよび代謝物間の、濃度および染色体異常出現頻度を比較するために、各処理条件毎に一つのグラフにまとめたのが図14,15,16である。ただし、直接法の48時間処理では陽性を示した物質はなかったもので、これは省いた。また、diBHAは細胞に何ら毒性を示さなかったもので除いてある。

BHA-OH, BHA-o-QおよびBQOは、S9 mix非存在下、6時間処理でも24時間処理でも染色体異常を誘発したが、S9 mixの添加によって、その効果は抑えられた。比較的高頻度の染色体異常を誘発した物質はBHA-OH (24時間処理で25%) およびBHA-o-Q (24時間処理で24%) であるが、処理濃度ではBQOがより低濃度で染色体異常を誘発した。(図14,15)

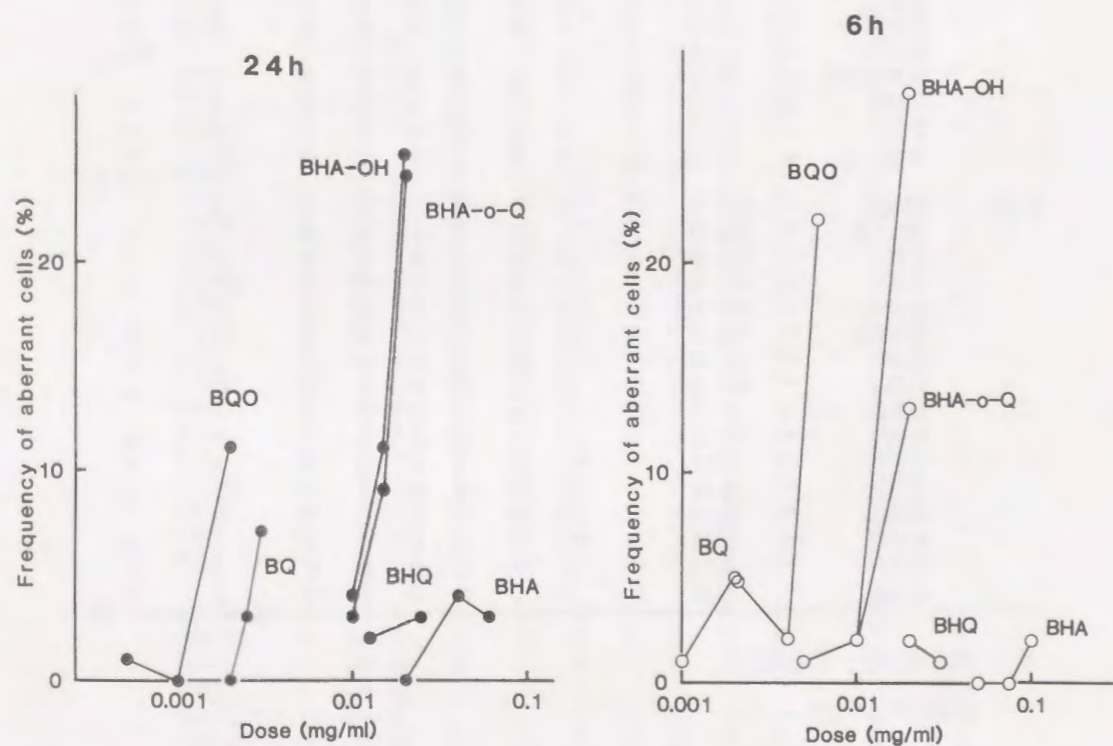


図14 直接法24時間処理でのBHAおよびその代謝物の染色体異常誘発頻度の比較

図15 静置法、対照群 (S9 mix非存在下、化学物質のみで6時間処理した群) でのBHAおよびその代謝物の染色体異常誘発頻度の比較

一方、BHA, BHQおよびBQは、誘発異常頻度は比較的低い傾向にあったが、S9 mix存在下でのみ染色体異常を誘発し(図16)、さらに代謝されて染色体異常を誘発する物質に変わっていくという可能性が示唆された。どの代謝物も細胞毒性効果が強く、異常を観察できる濃度範囲が非常に狭く、最高濃度でのみ陽性となるというパターンのグラフがほとんどであった。細胞毒性を比較するとBQO>BQ>BHA-OH, BHA-o-Q>BHQ>BHAの順であった。

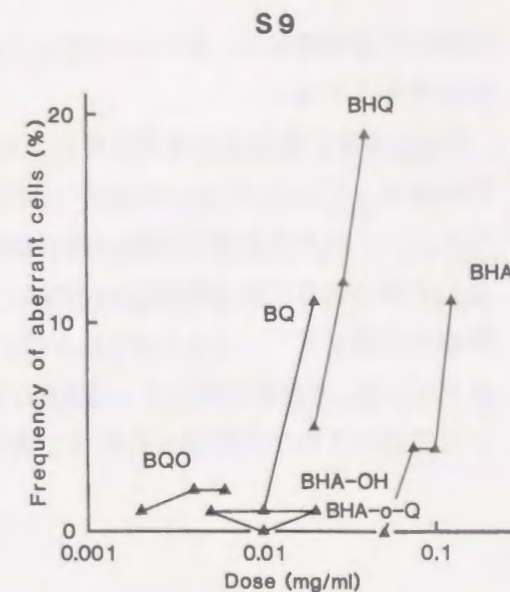


図16 S9 mix存在下でのBHAおよびその代謝物の染色体異常誘発頻度の比較

第三節 考察

BHAはS9 mix存在下でのみ弱いながらも染色体異常を誘発した。BHAの代謝物のうち、BHA-OH, BHA-o-QおよびBQOが直接、染色体異常を誘発し、BHAの染色体異常誘発性には、この3つの代謝物の関与が示唆された。また、BQはS9 mixによってさらに変化して活性物質になることが示唆され、その活性物質の一つとしてBQOが想定される。

Armstrongら⁵⁰⁾によれば、BHAの肝ミクロソームによる主な代謝物は、BHQおよびBHA-OHでこれらは、容易に自動酸化されてキノン体になり、この時H₂O₂を産生する。PhillipsらはCHO細胞でBHAがS9 mix存在下、100 μMで24%の染色体異常を誘発したと報告⁵⁴⁾している。彼らは、1984年に、活性酸素発生系において染色体異常が誘発されることを報告⁵⁵⁾しており、このBHAの染色体異常誘発性へのH₂O₂の関与を調べるため、カタラーゼ添加実験を行ったが、カタラーゼの添加によってBHAのミクロソーム存在下での誘発異常頻度 (BHA 250 μMで43%) が約半分 (20%) に抑えられたにとどまり、H₂O₂は部分的にBHAの染色体異常誘発性に関与していることが示唆されたと結んでおり、BHAおよびその代謝物の染

色体異常誘発性には、 H_2O_2 だけでなくその他の活性酸素種が関与している可能性が考えられる。

BHAの実験動物における発癌性については、伊東らの詳細な報告があり、F344ラット⁴⁸⁾およびシリアンゴールデンハムスター⁵⁶⁾の前胃で発癌性が認められ、ヒトへの安全性に疑問が投げかけられた。しかし、同じく合成抗酸化剤として用いられているBHTについては、シリアンゴールデンハムスターの前胃に腫瘍を誘発せず⁵⁷⁾、ラット⁵⁸⁾およびマウス⁵⁹⁾でも発癌性は陰性であると報告されている。BHAの代替品としてのBHTの使用の可能性も考えられるが、BHTについての他の生物学的情報も合わせて慎重に判断する必要がある。

第四章 ニトロピレン類の染色体異常誘発性

近年、ディーゼルエンジン排出ガス、石油ストーブ燃焼物中など、環境中に広く分布している汚染物質としてニトロアレン類が問題になっている⁶⁰⁻⁶³⁾。ニトロアレン類の中には、dinitropyrene(DNP)類のように微生物に対して強い変異原性を有し⁶⁴⁾、また、動物実験で発癌性が証明されている物質⁶⁵⁾が含まれており、我々の健康に重大な影響を及ぼす可能性が強い。

本研究では、ニトロアレン類のうち、4種のニトロピレン(NP)類についてその染色体異常誘発性を検討した。

第一節 被験物質

本研究に用いた4種のニトロピレン類の構造式を図17に示す。1-NP(純度99.8%)は東京化成工業(株)より購入し、1,3-, 1,6- および1,8-DNPは佐藤茂秋博士より分与していただいた。1-Aminopyrene(1-AP)はAldrich Chemical Co. Inc. より購入し、HPLCを用いて99.5%にまで精製したものをを用いた。

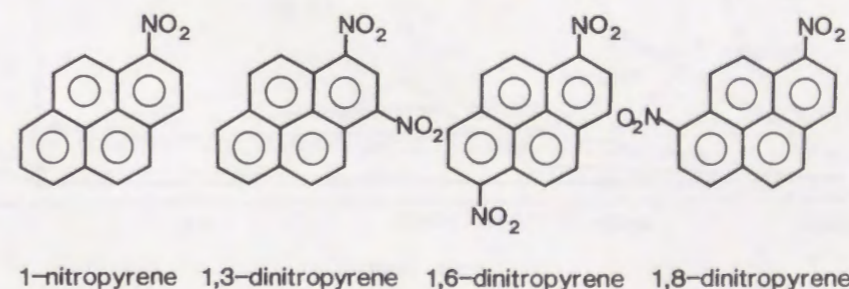


図17 ニトロピレン類の構造式

第二節 実験結果

直接法では、図18に示すように、3種のDNPは、非常に低い濃度で高頻度に染色体異常を誘発し、明らかに強い染色体異常誘発性を示した。48時間処理では、1,3-DNPは2 $\mu\text{g/ml}$ で43%、1,6-DNPは0.1 $\mu\text{g/ml}$ で55%、1,8-DNPは0.025 $\mu\text{g/ml}$ で45%の細胞に染色体異常を誘発した。その強さは、1,8->1,6->1,3-DNPの順であった。一方、1-NPは、ジニトロ体の100倍以上の濃度(150 $\mu\text{g/ml}$)まで処理したが、明らかな染色体異常誘発性を示さなかった。

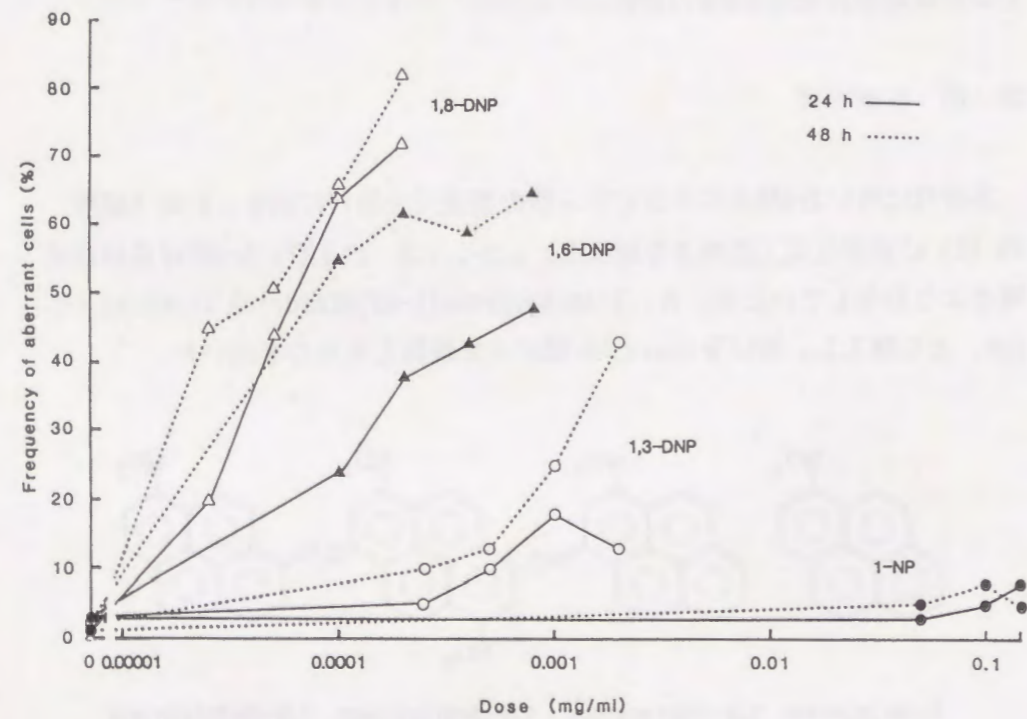


図18 直接法での1-NP (●), 1,3- (○), 1,6- (▲) および 1,8-DNP (△) の染色体異常誘発頻度

細胞を24時間(実線)または48時間(点線), 各物質で処理した。

静置法による結果を図19に示す。ジニトロ体では、S9 mix存在下で逆に染色体異常誘発性が抑えられ、S9 mix非存在下では、1,8-, 1,6-, 1,3-DNPの順で強い染色体異常誘発性を示し、直接法の結果と一致した。ただし、処理時間が6時間と短いため、処理濃度は高くなっている。すなわち、1,3-DNPは5 $\mu\text{g/ml}$ で21%、1,6-DNPは2 $\mu\text{g/ml}$ で42%、1,8-DNPは2 $\mu\text{g/ml}$ で65%の細胞に染色体異常を誘発した。一方、1-NPでは、S9 mix存在下で初めてわずかながら異常頻度の上昇が認められた。

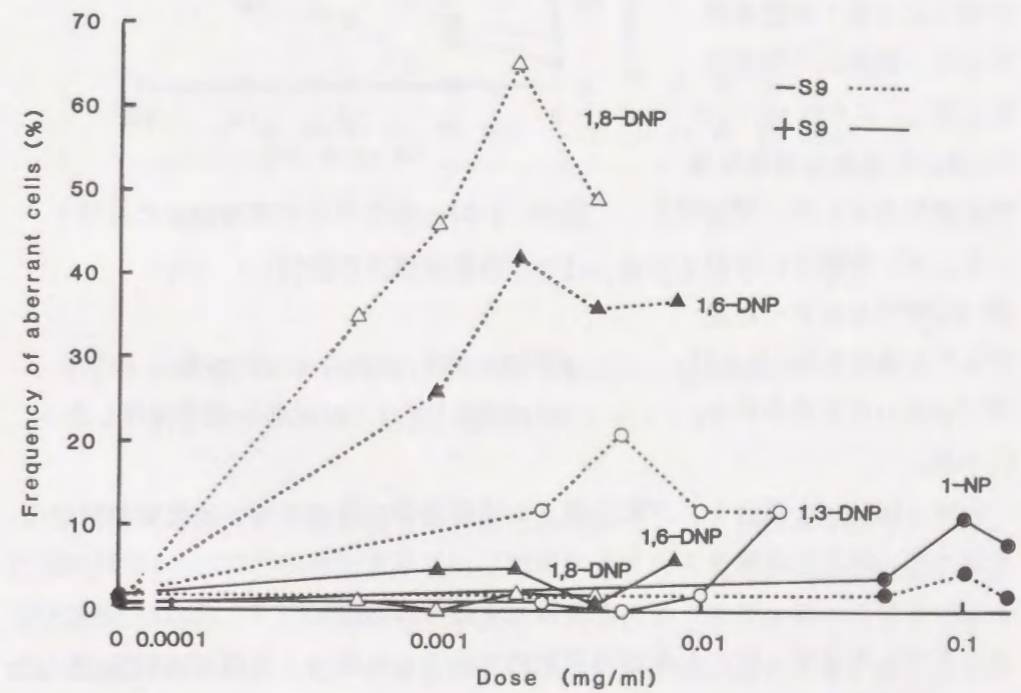


図19 静置法での1-NP (●), 1,3- (○), 1,6- (▲) および 1,8-DNP (△) の染色体異常誘発頻度

細胞をS9 mix非存在下(点線)または存在下(実線)各物質で6時間処理し、新しい培養液で18時間培養した後染色体標本作製した。

1-NPがS9 mix存在下で染色体異常誘発性を示す傾向が得られたので、さらにS9濃度の影響について検討を加えた。通常のS9法ではS9の最終濃度は5%であるが、20%まで添加濃度をあげると、S9濃度の増加につれて染色体異常をもつ細胞の出現頻度は上昇し、0.075 mg/mlで41.0%の明らかな染色体異常誘発性を示した。(図20)

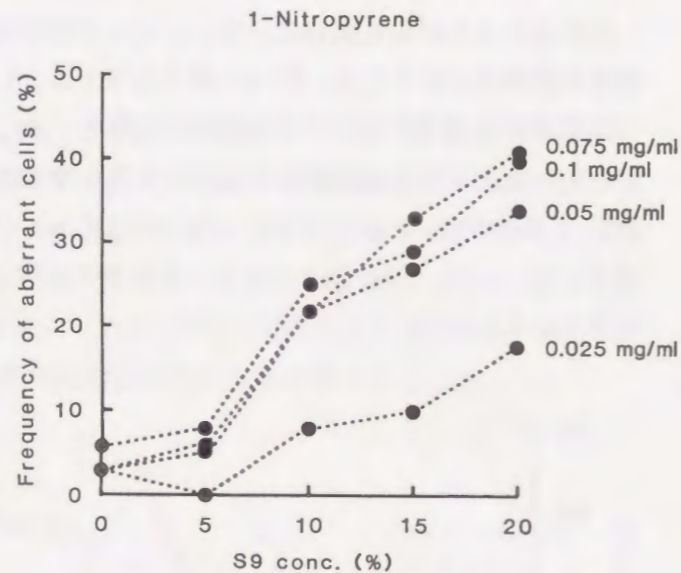


図20 1-NPの染色体異常誘発頻度に及ぼす添加S9濃度の影響

そこで、実際に1-NPがS9 mix中でどのように変化しているかをTLCおよびHPLCを用いて定性分析を行った。

1-NPとS9 mixを混合し、37°C炭酸ガス培養器中で反応させ、その経時的变化を調べた。反応生成物をエーテルで抽出し、シリカゲルのTLCプレートにスポットしヘキサン：エーテル 3：1の展開溶媒で1時間展開した。図21にそのクロマトグラムを示す。図の左側がS9濃度5%で処理した場合、右側が20%で処理した場合の結果である。検出されたスポットのうち同定できたものは1-NPと1-APのスポットである。一番上のスポットは原料の1-NPで黄色を呈しており、処理時間が長くなるにつれて薄くなり、20%という高濃度S9処理では、7時間後には全く検出できなくなった。1-APのスポットは蛍光を発しており、処理後2時間から検出でき時間と共に濃くなっている。その下に、4点のスポットがみられた。この結果から、1-NPがS9 mix中でより極性の高い物質に代謝されていることが確認された。

細胞を0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.075 mg/mlおよび0.1 mg/mlの1-NPで処理した。

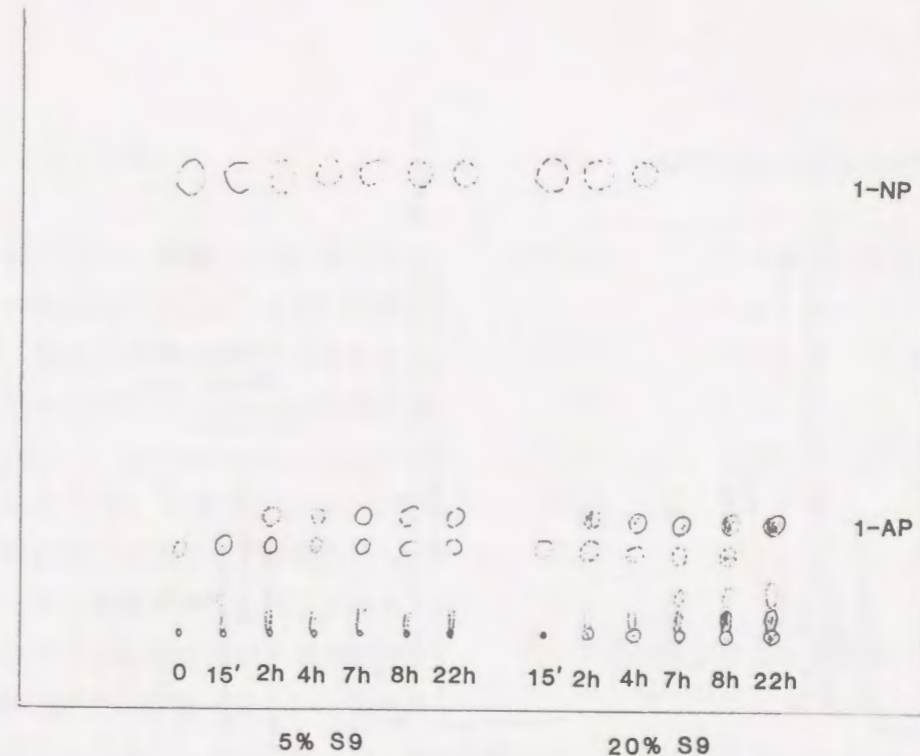


図21 1-NPのS9mix処理後の生成物の薄層クロマトグラム

1-NPを5%あるいは20%のS9濃度で処理し、経時的にサンプリングしてエーテルで抽出、薄層にスポットした。

染色体異常誘発性試験を行った反応液のHPLCクロマトグラムを図22に示す。上が好氣的条件下、下が嫌氣的条件下のものである。また、同時に作製した染色体標本から得られた異常頻度の平均値を同図の右上部に示した。クロマトグラムの保持時間26分のピークが1-NP、13分のピークが1-APである、嫌氣的条件下処理すると、1-APのピークが明らかに大きくなり、還元反応が進みやすいことを示した。しかし、誘発異常頻度は、好氣的条件下で27%、嫌氣的条件下で10%と、1-AP生成量とは逆に好氣的条件下の方が高くなった。1-NPのS9 mix存在下での染色体異常誘発性への1-APの関連性を調べるために、1-APについて直接法での染色体異常誘発性の検討を行った。その結果表6のように、細胞毒性効果が認められる濃度まで処理しても1-APは明らかな染色体異常誘発性を示さなかった。そのため1-NPのS9 mix存在下での染色体異常誘発性を1-APで説明することはできなかった。

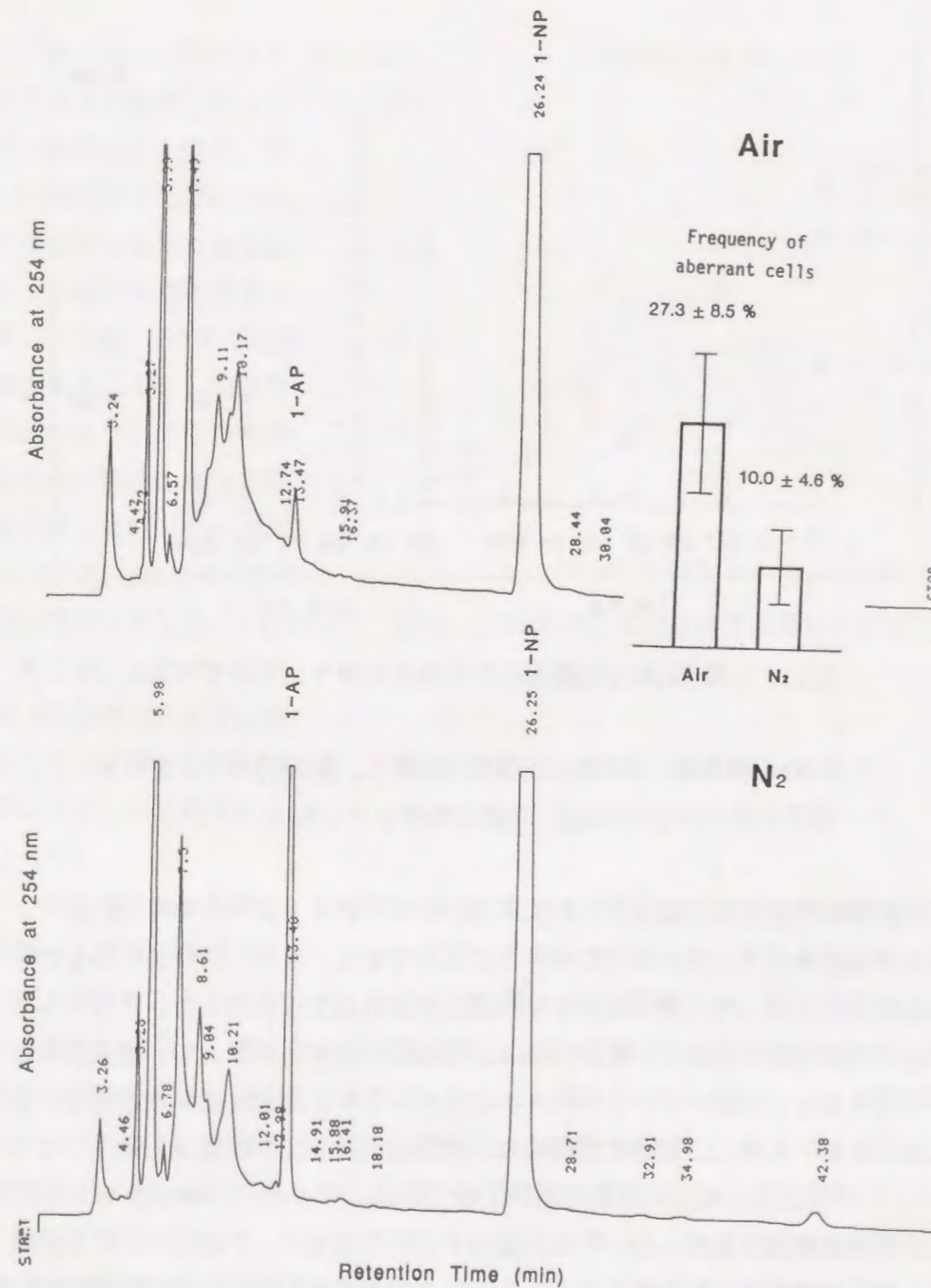


図22 好氣的条件下 (Air) および嫌氣的条件下 (N₂) での1-NPのS9 mix 処理後の生成物の液体クロマトグラム 同時に処理した細胞で観察された染色体異常頻度を右上に示す。

第三節 考察

同じピレンのニトロ体でもモノニトロ体(1-NP)とジニトロ体(DNP類)では、染色体異常誘発性に大きな違いが認められた。1-NPはAmes試験では、direct-acting mutagenとして知られている⁶⁴⁾が、培養細胞を用いる変異原性試験では陽性とする報告⁶⁶⁾と陰性とする報告^{67,68)}の両方がある。本研究で、1-NPは添加するS9濃度をあげることによって明らかに染色体異常を誘発することがわかった。Ames試験では、1-NPは細菌のもつニトロレダクターゼで還元されて、ヒドロキシルアミン体になり、さらに、O-アセチルトランスフェラーゼによる代謝を受けてDNAと結合するという活性化経路が報告されている⁶⁹⁾。染色体異常誘発性に関しては、1-NPそのものは、染色体異常を起こさず、また、S9 mixによって代謝されて、1-APが生成されるが、1-AP自身によっても染色体異常は誘発されない。しかし、1-NPをS9 mix存在下で処理すると、染色体異常の誘発が認められることから、ニトロソ体、ヒドロキシルアミン体または、芳香環の水酸化体のいずれかが、染色体異常を誘発する物質ではないかと推察される。図22に示されているように、好氣的条件下でむしろ染色体異常誘発頻度が高いことから、芳香環の水酸化が関与している可能性が考えられる。

DNP類については、Ames試験で強い変異原性が報告されているが、本研究でも培養細胞に対して非常に強い染色体異常誘発性を示した。当研究室では、これまでに染色体異常誘発性を検索した779種の検体についてのデータ集⁷⁰⁾を発表しているが、それらの中で陽性となった検体の有効濃度には、10⁷の開きがある。1,8-DNPの有効濃度は、その中の最低濃度に対応し、その濃度で陽性となったものは、陽性検体313種中、わずか2検体 (mitomycin C, actinomycin D) であった。

表6 1-APの染色体異常誘発性

濃度(mg/ml)	染色体異常出現頻度(%)
0	1.0 ± 0
0.01	3.67 ± 0.58
0.02	4.0 ± 1.0
0.04	4.33 ± 0.58
0.06	5.0 ± 1.73
0.08	7.23 ± 0.12
0.1	Tox

Tox: 分裂細胞がほとんど観察されなかった。

また、1-NPが直接、染色体異常を誘発しなかったのに対して、DNP類は直接、異常を誘発し、DNP類の染色体異常誘発性には1-NPとは別の機構が関与しているものと推測された。

Ames試験でのTA98株におけるrevertant/ μ gで比較してみると、1-NPとDNP類では200倍以上の差があるが、CHLでの染色体異常誘発性について20%の異常を誘発する濃度で比較してみると、100倍以上の差がある。1-NPとDNP類では、変異原性の作用機作に大きな違いが存在する可能性が示唆された。

第五章 水道水中に含まれる微量有機物質の染色体異常誘発性

近年、工場排水による河川の汚染、ドライクリーニングなどで使う有機溶剤による地下水の汚染⁷¹⁾、家庭排水による湖沼の富栄養化などが報告され、分析技術の発展により水道水中に従来検出されることのなかった微量の有機物質の存在状況が次第に明らかにされるようになった。それらの中には、塩素消毒により新たに生成してくると考えられる物質（トリハロメタン類）も含まれている。

本章は、水質管理の一環として厚生省より依頼を受けた研究の一部である。

第一節 被験物質

	純度	
有機塩素系化合物	dichloromethane	
	1,1-dichloroethane	(95%)
	1,2-dichloroethane	(99%)
	cis-1,2-dichloroethylene	
	1,3-dichloropropene	
	chlorobenzene	(98.0%)
	p-dichlorobenzene	(98.0%)
	1,2,3-trichlorobenzene	
	2,4,6-trichlorophenol	
	pentachlorophenol	
	heptachlor	(99.8%)
	heptachlor epoxide	
	methoxychlor	
芳香族化合物	benzaldehyde	(99.9%)
	acetophenone	(99%)
	phenylacetonitrile	
	1,3,5-trimethylbenzene	

	dibutylphthalate	(99%)
	di(2-ethylhexyl)phthalate	(98%)
	naphthalene	
	biphenyl	
	dibenzofuran	
脂環状化合物	cyclohexylamine	
	l-menthol	
	2-methylisoborneol	(99.9%)
	geosmin	(>98.0%)

塩素系の化合物についてはラットのS9よりマウスのS9の方が効果的であるとする報告^{72,73)}があり、有機塩素系化合物13種を含むこの一連の被験物質については、PCB誘導を行ったBALB/cマウスより調製したS9を用いて染色体異常誘発性の検索を行った。

揮発性の物質については、密閉状態で、6時間処理を行った。

第二節 実験結果

図23には静置法(6時間処理後18時間の回復時間)で行った時の染色体異常頻度を示してある。

Dichloromethane は、8 mg/mlという非常に高い濃度まで処理したが細胞に全く毒性を示さず、染色体異常も誘発しなかった。

1,1-dichloroethane とその位置異性体である1,2-dichloroethaneはS9 mix非存在下では共に染色体異常を誘発しなかったが、後者はS9 mix存在下、2.0 mg/mlで66.7%という高頻度の染色体異常を誘発した。

1,3-Dichloropropeneは、S9 mixの有無にかかわらず陽性結果を示した。S9 mix存在下、0.0625 mg/mlで18%の、0.0938 mg/mlで12%の倍数体の出現がみられたが、濃度依存性は認められなかった。

Benzeneの塩素置換体3種(chlorobenzene, p-dichlorobenzene, 1,2,3-tri-

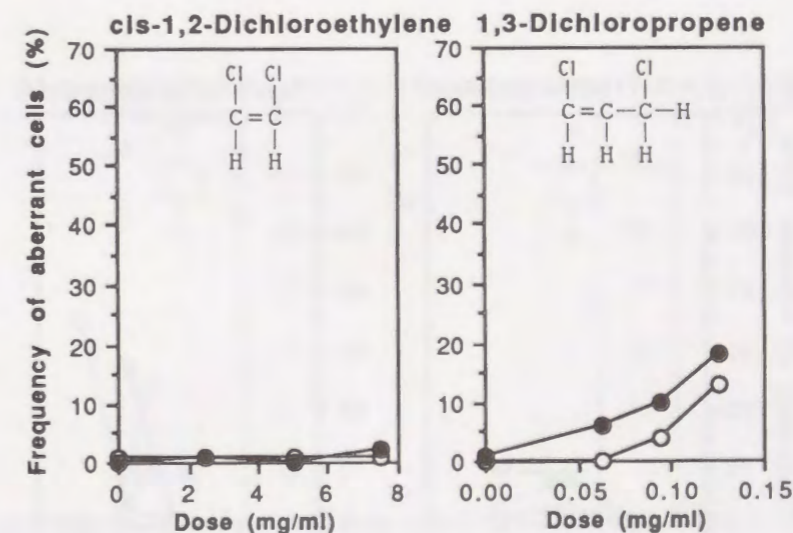
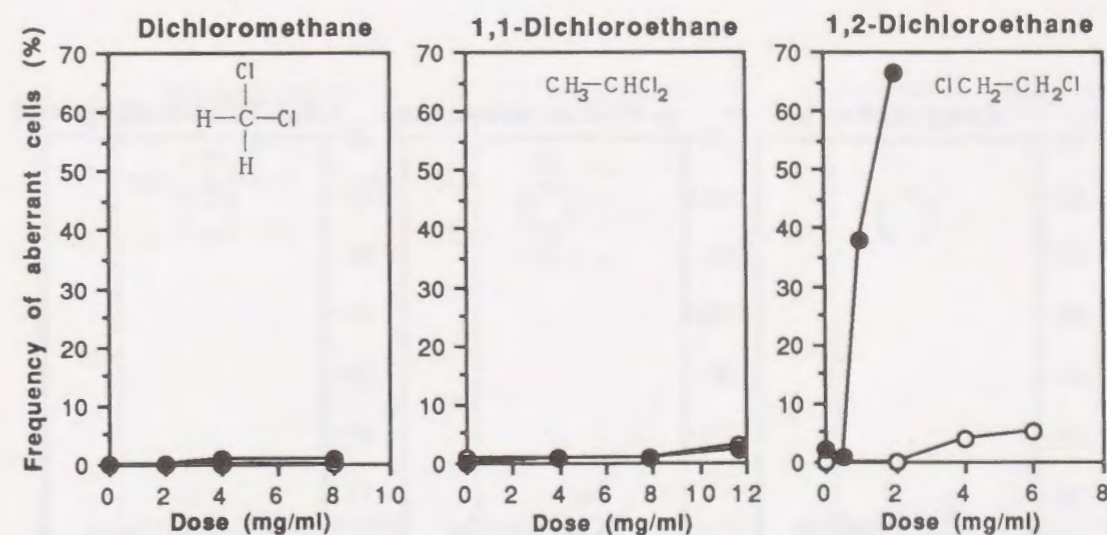


図23 水道水中に含まれる微量有機物質の染色体異常誘発性

細胞をS9 mix非存在下(○)および存在下(●)、各物質で6時間処理し、18時間の回復時間において染色体標本を作製した。

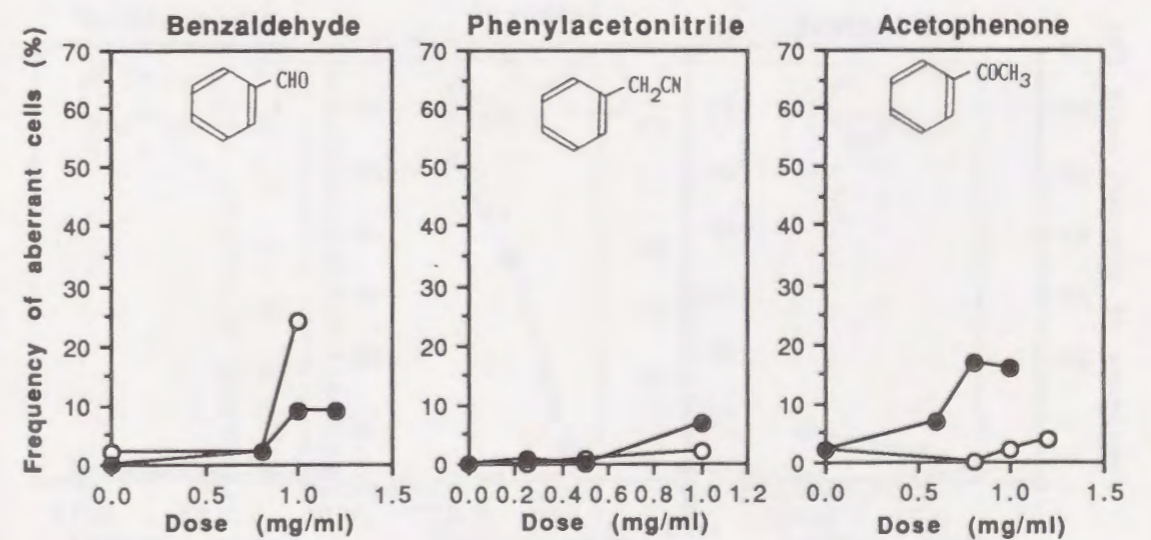
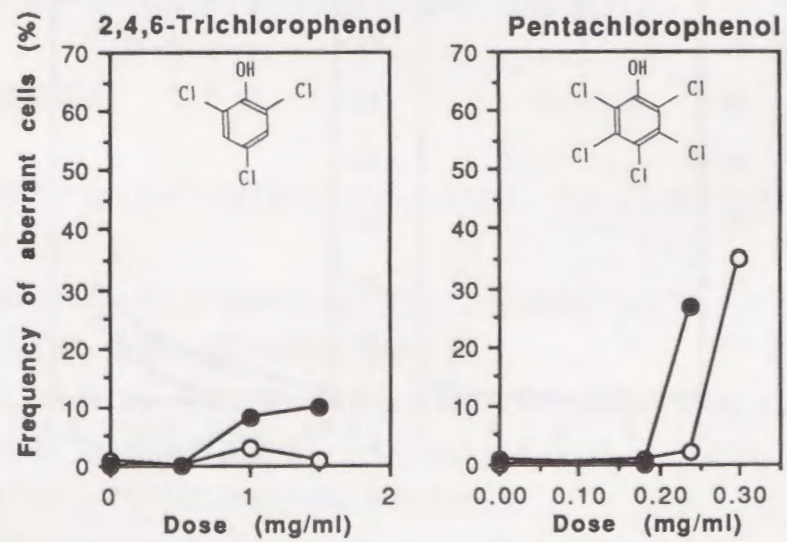
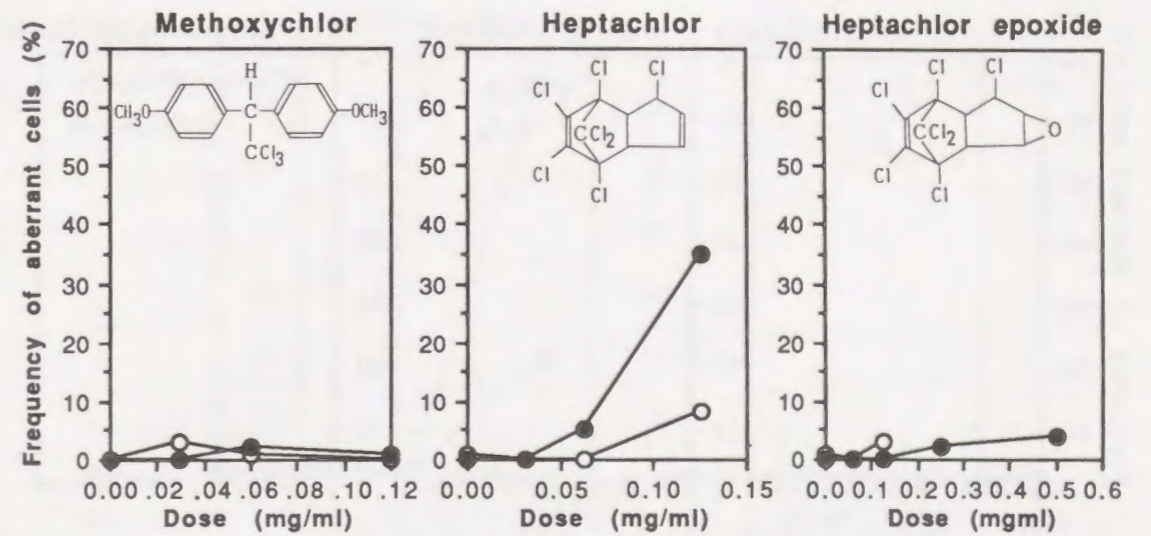
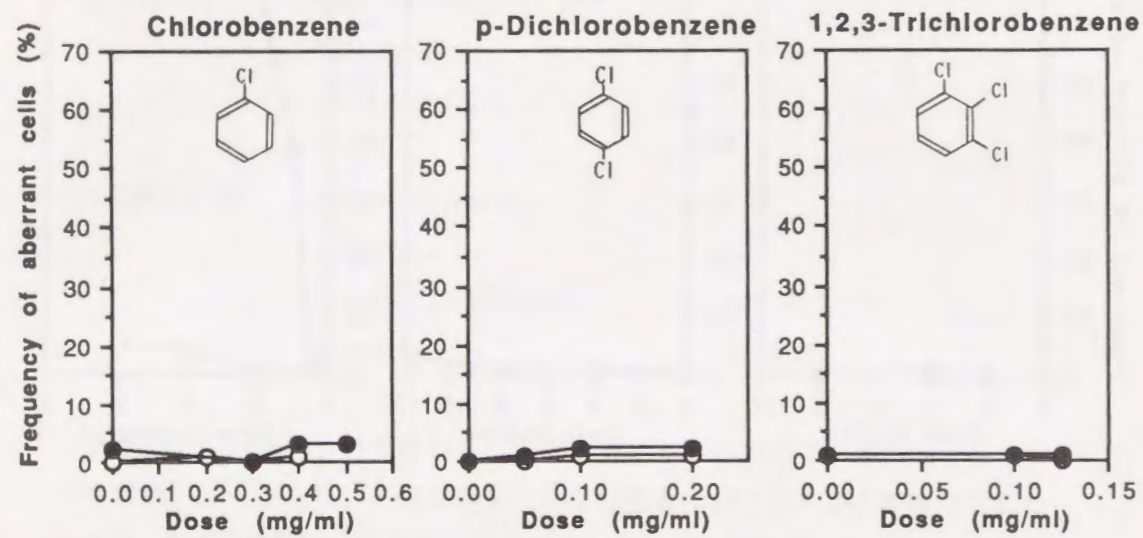


図23 (つづき)

図23 (つづき)

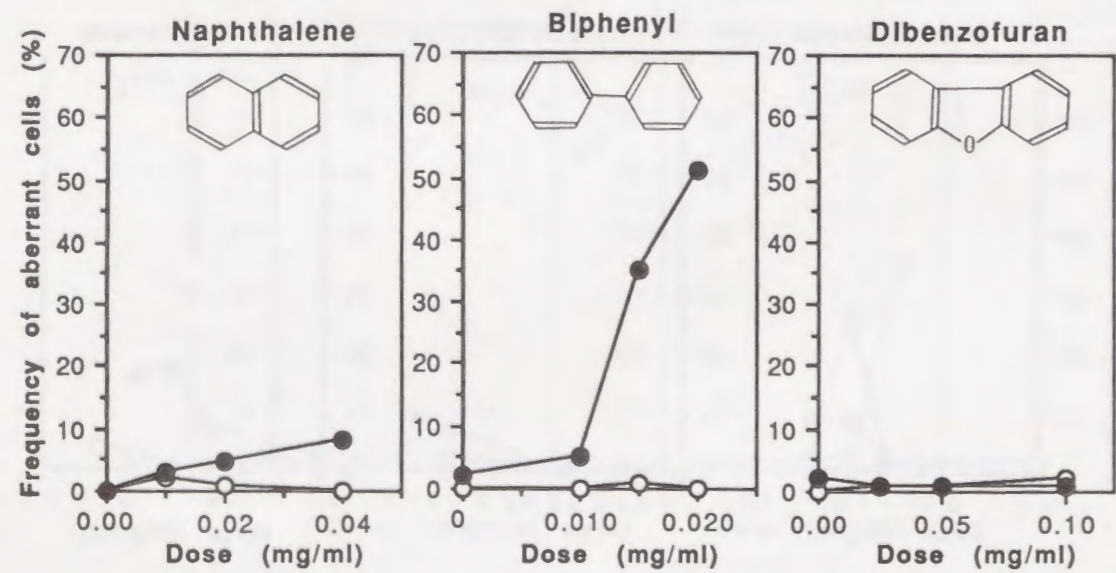
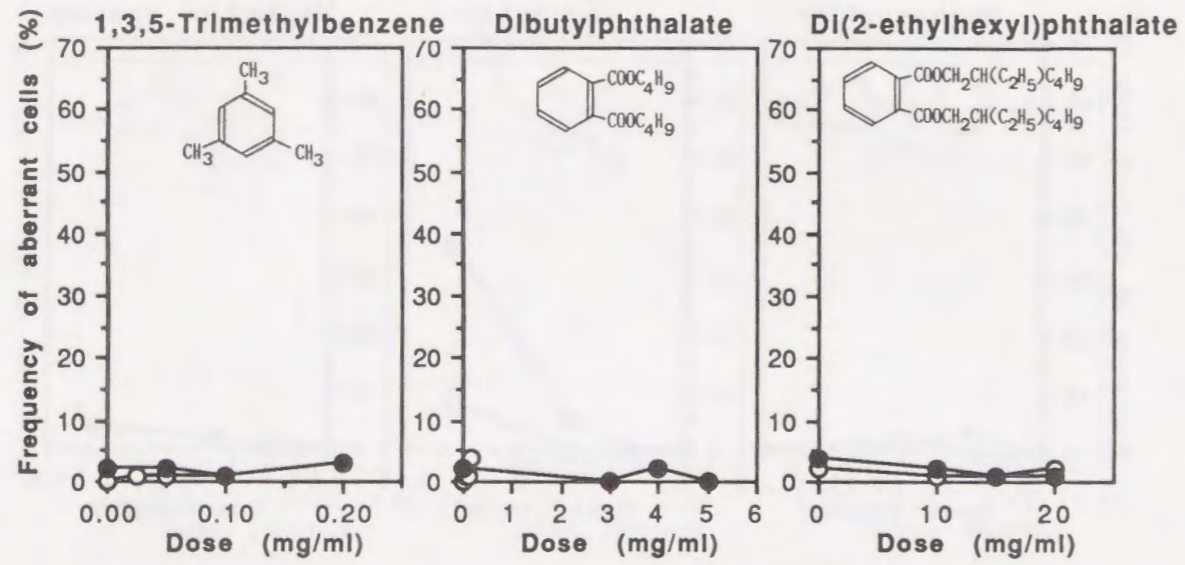


図23 (つづき)

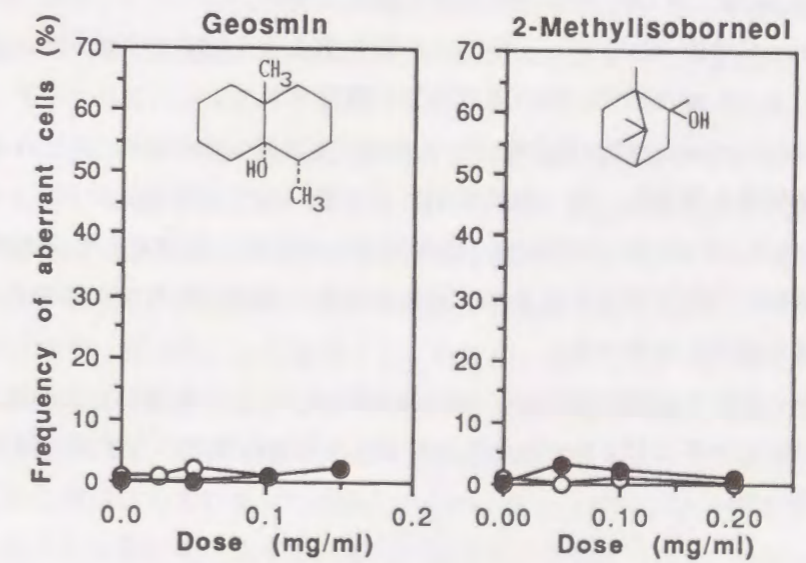
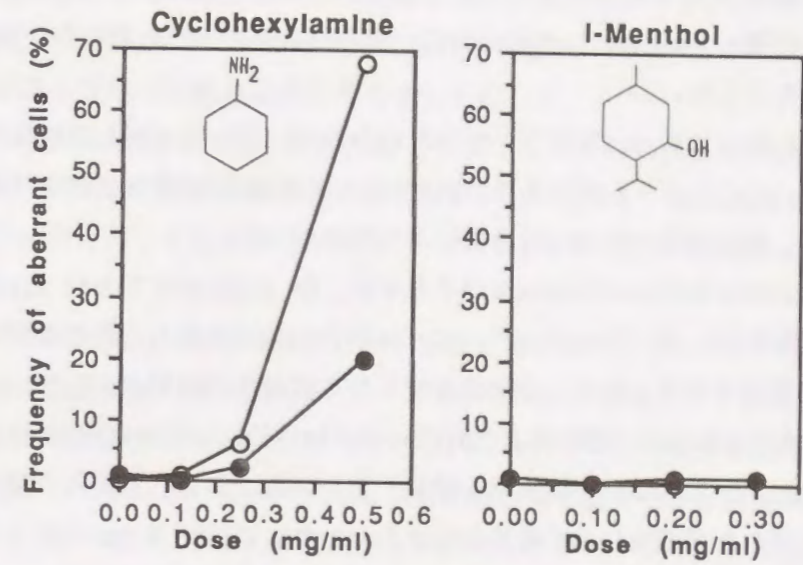


図23 (つづき)

chlorobenzene)は、いずれも染色体異常を誘発しなかった。しかし、phenolの塩素置換体(2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol)はS9 mix存在下染色体異常を誘発し、pentachlorophenolは、S9 mix非存在下でも明らかな染色体異常誘発性を示した。

HeptachlorはS9 mix存在下、0.125 mg/mlで35.0%の明らかな染色体異常を誘発した。そのエポキシ体であるheptachlor epoxideは染色体異常を誘発しなかったが、細胞毒性はS9 mixの添加によって低下した。

Benzaldehydeとacetophenoneはそれぞれ、S9 mix非存在下とS9 mix存在下で陽性結果を示した。Phenylacetonitrileは、S9 mix存在下、最高濃度で7.0%の染色体異常を誘発したが、濃度依存性もなく疑陽性の結果を示した。

Dibutylphthalate(DBP)およびdi(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)は、S9 mixの有無にかかわらず染色体異常を誘発しなかった。また、DEHPは非常に高濃度まで処理したが細胞に全く毒性を示さなかった。DBPは0.2 mg/ml以上で細胞毒性を示したが、その毒性はS9 mixの添加によって極端に低下した。

NaphthaleneはS9 mix存在下で異常頻度が上昇する傾向がみられたが、最高濃度0.04 mg/mlで8.0%の疑陽性の結果に終わった。

BiphenylはS9 mix存在下、明らかな染色体異常を誘発し、0.015 mg/mlで35.0%、0.02 mg/mlで51.0%の異常細胞が観察された。

Cyclohexylamineは、化合物だけの処理で、0.5 mg/mlで67.9%という高頻度の染色体異常を誘発し、S9 mixの添加によって、異常出現頻度は抑えられた。

Geosminと2-methylisoborneolは水道水のかび臭の原因としてしられる、放線菌や藻類の代謝生成物であるが、両化合物共、S9 mixの有無にかかわらず染色体異常を誘発しなかった。

cis-1,2-Dichloroethylene, methoxychlor, 1,3,5-trimethylbenzene, dibenzofuranおよびl-mentholは、S9 mixの有無にかかわらず染色体異常を誘発しなかった。

第三節 考察

26物質中、5物質(1,2-dichloroethane, 2,4,6-trichlorophenol, hepta-

chlor, acetophenone, biphenyl)がS9 mix存在下でのみ陽性となり、代謝活性化によって初めてその染色体異常誘発性を検出することができた。

表7に、本研究の結果と、当研究室で並行して行われた染色体異常試験の直接法の結果およびAmes試験の結果もあわせて要約した。

Dichloromethaneは、工場、実験室などで広く用いられている有機溶媒であるが、細胞毒性も染色体異常誘発性も示さなかった。しかし、Ames試験ではTA100, TA98株に対して変異原性が報告⁷⁴⁾されており、当研究室の結果と一致した。

1,2-Dichloroethaneは、世界的にみても生産量は多く、その80-90%はvinyl chlorideの製造に使用されている⁷⁵⁾。また、穀物の薫蒸剤としても用いられている。1,2-Dichloroethaneは、S9 mix存在下明らかな染色体異常を誘発したが、位置異性体である1,1-dichloroethaneは染色体異常も誘発せず、細胞毒性も非常に弱かった。McCallらは、PB処理ラットの肝ミクロソームを用いるin vitro代謝実験で、1,1-dichloroethaneは主に酢酸に、1,2-dichloroethaneはchloroacetaldehydeに変換されることを報告した⁷⁶⁾。Rannugらは、S9とミクロソームの比較などから、1,2-dichloroethaneはグルタチオン抱合によって活性化されると報告している⁷⁷⁾。2種のdichloroethaneの差は、これらの代謝の違いによるものと考えられる。

1,3-Dichloropropeneは土壌薫蒸剤として世界各地で使用されている。変異原性については、*S. typhimurium* TA100, TA1535や*E. coli* WP2 hcrなど塩基対置換型変異原検出用菌株に、より強く突然変異を誘発している^{78,79)}。また、雌マウスに皮下投与すると肉腫を形成することが報告されている⁸⁰⁾。

Heptachlorは、殺虫剤として使用されていたが、日本では、1972年に登録が取り消され、現在は使われていない⁸¹⁾。Heptachlor epoxideは、製品としては製造されていないが、環境中でheptachlorから形成されるようで、空気、水、食物などから検出されている⁸¹⁾。HeptachlorはS9 mix存在下染色体異常を誘発し、そのエポキシ体の染色体異常誘発性への関与が予想されたが、heptachlor epoxideは6時間の処理では全く染色体異常を誘発せず細胞毒性もheptachlorと同程度であった。ただ、直接法で化合物だけを24時間あるいは48時間処理すると、0.12 mg/mlでそれぞれ11.0%あるいは17.0%の異常を誘発したが、hepta-

表7 水道水中に含まれる微量有機物質の染色体異常試験
およびAmes試験結果の要約

被験物質	静置法	直接法	Ames試験
有機塩素系化合物			
dichloromethane	-	-	+
1,1-dichloroethane	-	-	-
1,2-dichloroethane	+	-	+
cis-1,2-dichloroethylene	-	-	-
1,3-dichloropropene	+	+	+
chlorobenzene	-	-	-
p-dichlorobenzene	-	-	-
1,2,3-trichlorobenzene	-	-	-
2,4,6-trichlorophenol	+	-	-
pentachlorophenol	+	-	-
heptachlor	+	±	-
heptachlor epoxide	-	+	-
methoxychlor	-	-	-
芳香族化合物			
benzaldehyde	±	NT	-
acetophenone	+	NT	-
phenylacetonitrile	±	NT	-
1,3,5-trimethylbenzene	-	NT	-
dibutylphthalate	-	-	-
di(2-ethylhexyl)phthalate	-	-	-
naphthalene	±	NT	-
biphenyl	+	-	-
dibenzofuran	-	NT	-
脂環状化合物			
cyclohexylamine	+	±	-
l-menthol	-	-	-
2-methylisoborneol	-	-	-
geosmin	-	-	-

NT: Not tested.

chlorと細胞毒性も変わらず、異常頻度も低く、heptachlorの活性体とは考えにくい。

Biphenylは主に有機合成の原料として使われているが、本研究では26化合物中、最も顕著にS9 mix存在下でのみ陽性結果を示した。Ames試験では陰性であるが、本研究の結果では濃度依存性もはっきりしており、明らかな染色体異常誘発物質であることが示された。

DBPおよびDEHPは、染色体異常誘発性を示さなかったが、DEHPはラットおよびマウスで発癌性が報告されている⁸²⁾。Phillipsらは、DEHPとその加水分解物 mono(2-ethylhexyl)phthalate(MEHP)の染色体異常誘発性を検討し、MEHPが染色体異常を誘発したと報告している⁸³⁾。DanielとBrattによれば、S9はDEHPをほとんど加水分解せず⁸⁴⁾、S9 mix存在下では、DEHPの染色体異常誘発性は検出できないことになる。また、DEHPの当研究室のAmes試験の結果も陰性であったが、TomitaらはDEHPがS9 mix存在下、*S. typhimurium* TA100に対して変異原性を示したと報告している⁸⁵⁾。

Geosminおよび2-methylisoborneolは、水道水のかび臭の原因物質であるが、本研究では細胞毒性は示したが、染色体異常誘発性は認められなかった。両化合物については、これまでに染色体異常誘発性に関する報告はなく、geosminについてはAmes試験で陰性であるというSimmonらの報告がある⁸⁶⁾。

第六章 総括

化学物質の安全性評価の観点から、実験動物を用いる長期試験と並んで、微生物や動物の培養細胞を用いる変異原性試験が行われている。当研究室では、後者に属する、哺乳動物培養細胞を用いる化学物質の染色体異常誘発性の検索を行ってきた。

この検索法は、*in vitro*で細胞を被験化学物質で処理し、その細胞を用いて染色体標本を作製し、染色体の数や形の変化を分析して、その化学物質の染色体傷害性を調べる方法である。

しかし、この細胞は薬物を代謝する能力が低く、代謝活性化を必要とする化学物質についてはfalse negativeの結果を示していた⁴¹⁾。そこで、結果の再現性が良く、広範な化学物質を検索でき、かつ実験手技が簡便な代謝活性化系の導入を目的として検討を始めた。(第一章)

1976年にNatarajanらはDMNおよびDENについて、細胞、被験物質およびS9 mixと一緒に、1時間振盪処理することによって、その染色体異常誘発性を明らかにした。そこで、本研究では、この方法の追試をDMNを用いて行い、S9 mix存在下、はっきりした濃度依存性のある染色体異常誘発性を確認することができた。

さらに、この方法を採用するにあたり、各種実験条件の検討を行い、次のような結論を得た。1) 処理時間は3時間まで延長可能で、時間を長くした方が同じ濃度のDMNではより高頻度の異常を観察できること、2) 回復時間は24時間が最適であり、3) 酸素ガスの添加については特に添加しなくても十分に陽性の結果が得られること、4) 酵素誘導剤については被験物質によって最適な誘導剤は異なるが、広範な化学物質をスクリーニングする目的では、PB型P-450とMC型P-450の両方を誘導するPCBが適切であること、また、5) エタノールを溶媒に用いるとS9 mixで酸化されて染色体異常誘発性のあるアセトアルデヒドを生成する可能性があるのを確認した。

実験条件を修正した振盪法で、4年間に約70検体の染色体異常誘発性を検索したが、1) 本来単層で増殖している細胞を浮遊状態で振盪するという非生理的

条件で実験を行っていること、2) 化学物質の処理濃度が非常に高いことの2点を改良するため、静置法についての検討を行った。

実験条件はできるだけ直接法に倣い、処理時間は6時間、回復時間は18時間、S9濃度は5%を採用して、この静置法と前の振盪法を6種の化学物質の染色体異常誘発性について比較した(表4)。いずれの化合物についても、静置法の方が振盪方に比べて明らかに低い濃度で染色体異常の出現が観察され、特に、多環芳香族炭化水素では10倍から100倍の濃度の開きがあった。以後、染色体異常誘発性の検索法での代謝活性化は静置法で行うことにした。(第二章)

BHAは、食品、化粧品などに抗酸化剤として世界的に広く利用されているが、1983年にラットおよびハムスターで発癌性が報告されて以来、BHAの安全性を再評価する動きが高まった。その一環としてBHAの染色体異常誘発性の検索を、すでに同定されているBHAの代謝物も含めて、直接法と静置法で行った。

その結果、BHAはS9 mix存在下でのみ、弱い染色体異常誘発性を示し、代謝物のうちBHA-OH、BHA-o-Qが直接、染色体異常誘発性を示した。このことから、BHAの染色体異常誘発性にはBHA-OH、BHA-o-Qが関与していることが示唆された。また、Armstrongらにより、代謝物BHA-OH、BHQは容易に自動酸化されてキノン体になり、この時H₂O₂が産生されることが報告され、Phillipsらのカタラーゼ添加実験により部分的にH₂O₂がBHAの染色体異常誘発性に関与していることが示唆された。BHAおよびその代謝物の染色体異常誘発性には、最終的には、それらが化学的に変化する時に並行して生成する活性酸素種に起因している可能性が示唆された。(第三章)

ディーゼルエンジン排ガス、石油ストーブ燃焼物中など、環境中に広く分布している汚染物質として、ニトロアレン類が着目され、その中にはDNP類のように強い突然変異作用および発癌性を有する物質が含まれている。本研究では、そのうち1-NPおよびDNP類について、直接法および静置法で染色体異常誘発性の検索を行った。

その結果、DNP類はCHL細胞に対して直接、非常に強い染色体異常誘発性を示した。これまでの研究で染色体異常誘発性陽性となった物質について、その濃

度には 10^7 の開きがあったが、その最低濃度に対応するところで、高頻度の異常を誘発した。

しかし、1-NPはS9 mix存在下でも非存在下でも、明らかな染色体異常を誘発せず、添加するS9濃度を10%、20%と上げることによって、最高、0.075 mg/mlで41.0%の異常細胞を観察できた。1-NPをS9 mixで処理すると1-APが生成することをTLCおよびHPLCで確認したが、1-AP自身は染色体異常誘発性を示さず、好気的条件下と嫌気的条件下の誘発異常頻度の比較から、前者において、より高い頻度の異常を誘発したことから、1-NPの芳香環の水酸化体が染色体異常誘発性に関与している可能性が考えられた。(第四章)

水道水中に含まれる微量有機物質として、有機塩素系化合物13種、芳香族化合物9種、および脂環状化合物4種について、静置法で染色体異常誘発性の検索を行った。塩素系の化合物についてはマウスのS9の方が効果的であるという報告があり、ここではPCB誘導を行ったBALB/cマウスより調製したS9を用いた。

その結果、26物質中、5物質(1,2-dichloroethane, 2,4,6-trichlorophenol, heptachlor, acetophenone, biphenyl)がS9 mix存在下でのみ陽性となり、代謝活性化によって初めてその染色体異常誘発性を検出することができた。(第五章)

以上のように、染色体異常を検索する方法に安定した代謝活性化系を導入(静置法)することによって、化学物質の安全性評価法としての有用性をさらに高めることができた。現在、この静置法も含めて当研究室(CHL細胞使用)と米国NIEHS(CHO細胞使用)との間で、染色体異常検索法の比較検討が行われている⁸⁷⁾。

実験の部

1. CHL細胞の継代と保存

CHL細胞は、チャイニーズ・ハムスター雄の肺から樹立した線維芽細胞株で、単層培養で増殖している。染色体数の最頻値は25本、倍加時間は約15時間である。通常、MEM培地に56°C 30分間の加熱処理(非働化)をした子牛血清を10%添加したものを培養液として用い、37°C、湿度100%、5%CO₂を含む空气中(炭酸ガス培養器(TE-HER WJ-22C))で培養している。細胞の維持は、細胞がシャーレに一杯になる前に、3~4日毎に継代することによって行っている。

細胞の保存は-80°Cのディープフリーザまたは液体窒素を用いている。対数増殖期の細胞を0.25%トリプシン溶液(GIBCO, 610-5050pG)ではがし、遠心して細胞を回収し、 $1\sim 2 \times 10^6$ /mlの細胞懸濁液を調製し、細胞凍結保存用チューブに1 mlずつ分注し、凍結保護剤としてDMSOを0.1 ml添加して、-20°Cに1時間放置後、-80°Cに移す。液体窒素に保存する場合は、翌日-80°Cから液体窒素タンクに移す。

2. 染色体異常試験

1) 直接法(図24)

継代培養している対数増殖期の細胞をトリプシンではがし、シャーレあたり 2×10^4 の細胞を播種する。3日後、被験物質溶液を添加し、24時間あるいは48時間、細胞を処理後、染色体標本を作製する。

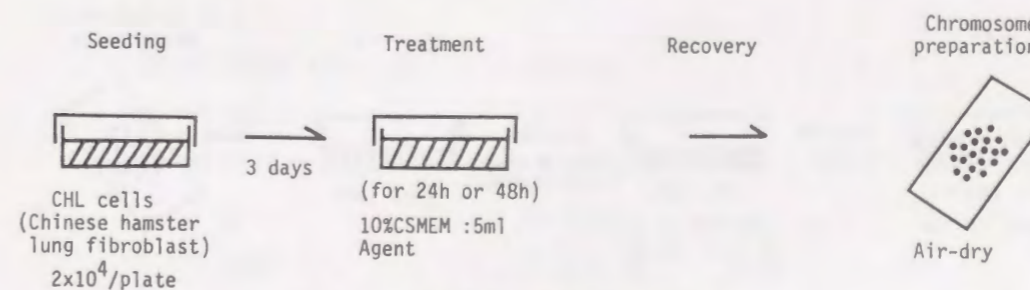


図24 直接法の実験手順

2) S9法 (振盪法) (図25)

対数増殖期の細胞をトリプシンではがし、 1.2×10^7 /mlの細胞浮遊液を調製する。試験管に0.2 mlの細胞浮遊液、0.2 mlの被験物質溶液および1.0 mlのS9 mixを入れて、37°Cの恒温水槽中に35°の角度で保持して、振盪しながら3時間処理する。遠心して細胞を回収後、シャーレに播種し、さらに24時間培養後染色体標本を作製する。

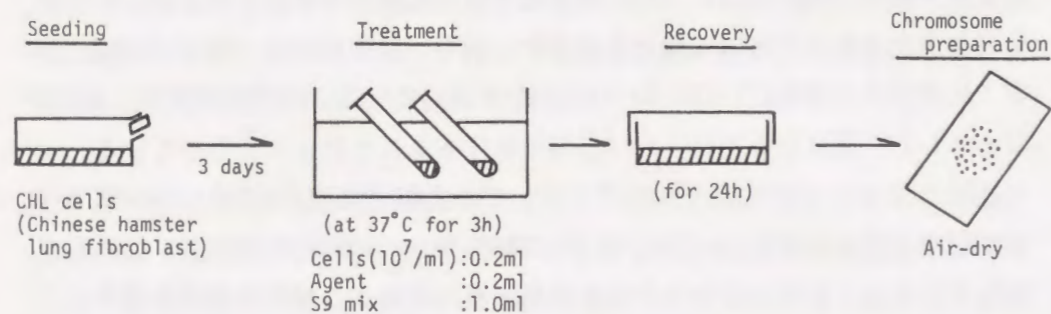


図25 振盪法の実験手順

3) S9法 (静置法) (図26)

継代培養している対数増殖期の細胞をトリプシンではがし、シャーレあたり 2×10^4 の細胞を播種する。3日後、シャーレから培養液を2 ml (S9 mix非添加群) あるいは2.5 ml (S9 mix添加群) 除き、S9 mix添加群のみに直前に調製したS9 mixを0.5 ml添加する。最後に両群に被験物質溶液を添加して、6時間培養後、シャーレの処理液を全部除き、新しい培養液を3 ml加えて、さらに18時間の培養後、染色体標本の作製を行う。

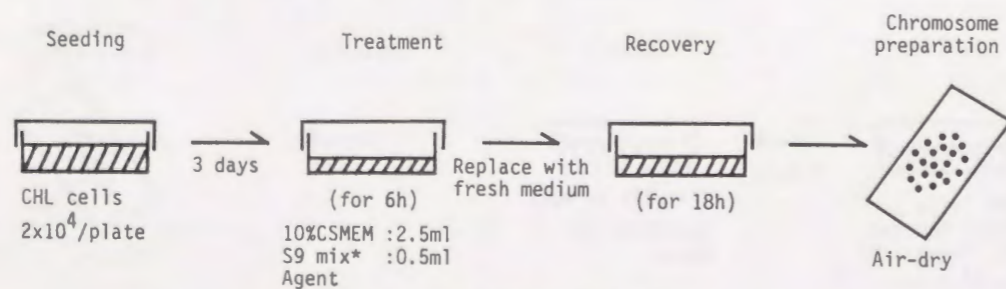


図26 静置法の実験手順

4) 染色体標本作製, 染色

標本作製2時間前に、分裂中期像を呈する細胞を蓄積する目的で、コルセミド (GIBCO, 120-5210AD)を最終濃度0.2 μ g/ml添加する。トリプシンで細胞をはがし、遠心 (1000 rpm, 5分) して細胞を回収後、0.075 M KCl溶液を添加して37°C恒温槽中で15分間低張処理を行う。遠心して細胞を回収後、氷酢酸1容:メタノール3容の混液で固定する。固定液は3回以上交換する。適当な濃度の細胞懸濁液を調製し、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に滴下し、自然に乾燥させる。pH6.8のリン酸緩衝液で、1.3%のギムザ溶液を調製し、20分間染色する。

5) 染色体の観察

光学顕微鏡を用いて、通常は、接眼レンズ10倍、対物レンズ40倍あるいは60倍で染色体標本の観察を行う。特に詳細に検討する時、または写真撮影時は、100倍の対物レンズを用いる。

3. 培地, 試薬などの調製

1) 培養液

MEM (GIBCO, 410-1100)	9.5 g
NaHCO ₃	2.2 g

約500 mlの蒸留水に上記の試薬を溶解し、1 N塩酸でpHを7.2に調整後、全量を1000 mlとする。ろ過滅菌後、450 mlずつ分注し、50 mlの非働化した子牛血清を加えて培養液とし、冷蔵庫に保存する。

2) S9 mix

20 mM HEPES (pH 7.2)	2.5 ml
50 mM MgCl ₂	1.25 ml
330 mM KCl	1.25 ml
G-6-P	19.0 mg
NADP	39.375 mg
蒸留水	3.75 ml

上記の試薬を混合し、ろ過滅菌後、ろ液7容に、室温融解したS9を3容添加する。使用するまで、水中に置く。

3) S9作製法

- 1) 屠殺5日前に、雄ラットにPCB(KC-400)を500 mg/kg腹腔内投与する。
- 2) 屠殺前日の夜から絶食させる。
- 3) 断頭遮血後、腹腔を開き、氷冷した1.15% KCl溶液で肝臓を灌流し、肝臓を摘出する。
- 4) 肝臓をハサミで細切し、0.9% NaCl溶液、続いて1.15% KCl溶液で洗う。
- 5) 肝臓細片を滅菌したろ紙上に置いて軽く水分を除き上皿天秤で湿重量を測る。
- 6) 肝臓湿重量10 gに対して20 mlの1.15% KCl溶液を加えて、電動テフロンホモジナイザーでホモジナイズする。
- 7) ホモジネートを遠沈管に移し、9000 x g, 20分間遠心する。
- 8) 上清を集め、凍結保存用チューブに分注し、ドライアイスを入れたアセトン中で急速凍結させ、-80°Cのディープフリーザで保存する。

4. TLC

吸着剤はシリカゲル 60 F₂₅₄ (メルク社製) を用い、ヘキサン:エーテル (3:1) 混液を展開溶媒とした。サンプルは反応液を2度エーテルで抽出して調製し、TLCプレートにスポットした。

5. HPLC

以下の条件で分析を行った。

装置: 島津 LC-6A型ポンプ

カラム: Shim-pack CLC-ODS 15 cm x 6.0 mmφ

移動相: アセトニトリル/水 3:1

流量: 0.5 ml/min

検出器: 紫外分光光度計 254 nm

TLCと同様、反応液をエーテルで抽出し、エーテルを自然飛散後、移動相に溶解したものをサンプルとした。

参考文献

- 1) Abbondandolo, A., S. Bonatti, G. Corti, R. Fiorio, N. Loprieno and A. Mazzaccaro (1977) Induction of 6-thioguanine-resistant mutants in V79 Chinese hamster cells by mouse-liver microsomal-activated dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, 365-373.
- 2) De Raat, W.K. (1977) The induction of sister chromatid exchanges by cyclophosphamide in the presence of differently induced microsomal fractions of rat liver, *Chem.-Biol. Interact.*, 19, 125-131.
- 3) Krahn, D.F. and C. Heidelberger (1977) Liver homogenate-mediated mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins, *Mutation Res.*, 46, 27-44.
- 4) Kuroki, T., C. Drevon and R. Montesano (1977) Microsomal-mediated mutagenesis in V79 Chinese hamster cells by various nitrosamines, *Cancer Res.*, 37, 1044-1050.
- 5) Stetka, D.G. and S. Wolff (1976) Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens, II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation, *Mutation Res.*, 41, 343-350.
- 6) Takehisa, S. and S. Wolff (1977) Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by carcinogenic mutagens requiring metabolic activation, *Mutation Res.*, 45, 263-270.
- 7) Weinstein, D., M.L. Katz and S. Kazmer (1977) Chromosomal effects of carcinogens and non-carcinogens on WI-38 after short term exposure with and without metabolic activation, *Mutation Res.*, 46, 297-304.
- 8) Natarajan, A.T., A.D. Tates, P.P.W. Van Buul, M. Meijers and N. De Vogel (1976) Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system in vitro I. Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by diethyl-

- nitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of rat-liver microsomes, *Mutation Res.*, 37, 83-90.
- 9) Matsuoka, A., M. Hayashi and M. Ishidate, Jr. (1979) Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutation Res.*, 66, 277-290.
- 10) 祖父尼俊雄, 松岡厚子 (1983) 染色体異常試験における代謝活性化法について, *環境変異原研究*, 5, 4-6.
- 11) Matsuoka, A., M. Matsui, N. Miyata, T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1990) Mutagenicity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and its metabolites in short-term tests *in vitro*, *Mutation Res.*, 241, 125-132.
- 12) Matsuoka, A., T. Sofuni, N. Miyata and M. Ishidate, Jr. (1990) Clastogenicity of 1-nitropyrene, dinitropyrenes, fluorene and mononitrofluorenes in cultured Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, in press.
- 13) 祖父尼俊雄, 林真, 松岡厚子, 沢田稔, 畑中みどり, 石館基 (1985) 水道水汚染有機化合物およびその関連物質の変異原性に関する研究 II. 哺乳動物培養細胞による染色体異常試験, *衛生試験所報告*, 103, 64-75.
- 14) Funes-Cravioto, F., B. Lambert, J. Lindsten, L. Ehrenberg, A.T. Natarajan and S. Osterman-Golkar (1975) Chromosome aberrations in workers exposed to vinyl chloride, *The Lancet*, I, 459.
- 15) Yoder, J., M. Watson and W.W. Benson (1973) Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides, *Mutation Res.*, 21, 335-340.
- 16) 化学物質による染色体異常アトラス (日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編) 朝倉書店
- 17) Capizzi, R.L., B. Papirmeister, J.M. Mullins and E. Cheng (1974) The detection of chemical mutagens using the L5178Y/Asn⁻ murine leukemia *in vitro* and in a host-mediated assay, *Cancer Res.*, 34, 3073-3082.
- 18) Fischer, G.A., S.Y. Lee and P. Calabresi (1974) Detection of chemical mutagens using a host-mediated assay (L5178Y) mutagenesis system, *Mutation Res.*, 26, 501-511.
- 19) Huberman, E. and L. Sachs (1974) Cell-mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens, *Int. J. Cancer*, 13, 326-333.
- 20) Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki and F.D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 70, 2281-2285.
- 21) Au, W.W., D.A. Johnston, C. Collie-Bruyere and T.C. Hsu (1980) Short-term cytogenetic assays of nine cancer chemotherapeutic drugs with metabolic activation, *Environ. Mutagenesis*, 2, 455-464.
- 22) Madle, S. and G. Obe (1977) *In vitro* testing of an indirect mutagen (cyclophosphamide) with human leukocyte cultures: Activation with liver microsomes and use of a dialysis bag, *Mutation Res.*, 56, 101-104.
- 23) Clive, D., K.O. Johnson, J.F.S. Spector, A.G. Batson and M.M.M. Brown (1979) Validation and characterization of the L5178Y/TK^{+/-} mouse lymphoma mutagen assay system, *Mutation Res.*, 59, 61-108.
- 24) Nakamura, N., N. Suzuki and S. Okada (1977) Mutagenicity of furyl-furamide, a food preservative, tested by using alanine-requiring mouse L5178Y cells *in vitro* and *in vivo*, *Mutation Res.*, 46, 355-364.
- 25) Drevon, C. and T. Kuroki (1979) Mutagenicity of vinyl chloride, vinylidene chloride and chloroprene in V79 Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 67, 173-182.
- 26) Kuroki, T., C. Malaveille, C. Drevon, C. Piccoli, M. Macleod and J. K. Selkirk (1979) Critical importance of microsome concentration in mutagenesis assay with V79 Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 63, 259-272.

- 27) Umeda, M. and M. Saito (1975) Mutagenicity of dimethylnitrosamine to mammalian cells as determined by the mouse liver microsomes, *Mutation Res.*, 30, 249-254.
- 28) Nishi, Y., M.M. Hasegawa and N. Inui (1980) Comparative studies on chromosome aberrations induced by polycyclic hydrocarbons in cell-mediated and microsome-mediated assay, *Mutation Res.*, 79, 337-344.
- 29) Thust, R. and S. Kneist (1979) Activity of citrinin metabolized by rat and human microsome fractions in clastogenicity and SCE assays on Chinese hamster V79-E cells, *Mutation Res.*, 67, 321-330.
- 30) Stich, H.F., W. Stich, M.P. Rosin and W.D. Powrie (1981) Clastogenic activity of caramel and caramelized sugars, *Mutation Res.*, 91, 129-136.
- 31) Tates, A.D. and E. Kriek (1981) Induction of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells *in vitro* by some proximate and ultimate carcinogenic arylamide derivatives, *Mutation Res.*, 88, 397-410.
- 32) Au, W., M.A. Butler, S.E. Bloom and T.H. Matney (1979) Further study of the genetic toxicity of gentian violet, *Mutation Res.*, 66, 103-112.
- 33) Roszinsky-Kocher, G. and G. Rohrborn (1979) Increase in genetic activity of the polycyclic hydrocarbon benzo[a]pyrene by inhibition of the epoxide hydrolase in an activation system *in vitro*, *Mutation Res.*, 66, 199-203.
- 34) Benedict, W.F., A. Banerjee and N. Venkatesan (1978) Cyclophosphamide-induced oncogenic transformation, chromosomal breakage, and sister chromatid exchange following microsomal activation, *Cancer Res.*, 38, 2922-2924.
- 35) Bimboes, D. and H. Greim (1976) Human lymphocytes as target cells in a metabolizing test system *in vitro* for detecting potential mutagens, *Mutation Res.*, 35, 155-160.
- 36) Madle, S., D. Westphal, V. Hilbig and G. Obe (1978) Testing *in vitro* of an indirect mutagen (cyclophosphamide) with human leukocyte cultures Activation by liver perfusion and by incubation with crude liver homogenate, *Mutation Res.*, 54, 95-99.
- 37) De Raat, W.K. (1979) Comparison of the induction by cigarette smoke condensates of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells and of mutations in *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, 66, 253-259.
- 38) Takehisa, S. and S. Wolff (1978) The induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by prolonged exposure to 2-acetylaminofluorene and S-9 Mix, *Mutation Res.*, 58, 103-106.
- 39) Yang, D.P., F. Graupensperger, L.C. Minecci and B.A. Rubin (1981) Induction of sister chromatid exchanges in human diploid fibroblasts by mutagens with and without rat liver microsomal activation, *Environ. Mutagenesis*, 3, 45-52.
- 40) Styles, J.A. (1977) A method for detecting carcinogenic organic chemicals using mammalian cells in culture, *Br. J. Cancer*, 36, 558-563.
- 41) Ishidate, M. Jr. and S. Odashima (1977) Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* -- A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354.
- 42) Sturrock, J.E., and J.F. Nunn (1978) Chromosomal damage and mutations after exposure of Chinese hamster cells to high concentrations of oxygen, *Mutation Res.*, 57, 27-33.
- 43) Peraino, C., R.J. Michael Fry and E. Staffeldt (1971) Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene, *Cancer Res.*, 31, 1506-1512.
- 44) Yoshimura, H., N. Ozawa and S. Saeki (1978) Inductive effect of polychlorinated biphenyls mixture and individual isomers on the hepatic microsomal enzymes, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 1215-1221.

- 45) Nagao, M., T. Yahagi and T. Sugimura (1978) Differences in effects of norharman with various classes of chemical mutagens and amounts of S-9, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 373-378.
- 46) Kawachi, T., T. Komatsu, T. Kada, M. Ishidate, Jr., M. Sasaki, T. Sugiyama and Y. Tazima (1980) Results of recent studies on the relevance of various short-term screening tests in Japan, in: G.M. Williams et al. (Eds.), *The Predictive value of short-term screening tests in carcinogenicity evaluation*, Elsevier, Amsterdam, pp. 253-267.
- 47) Abe, S. and M. Sasaki (1977) Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals, *J. Natl. Cancer Inst.*, 58, 1635-1641.
- 48) Ito, N., S. Fukushima, A. Hagiwara, M. Shibata and T. Ogiso (1983) Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, 343-349.
- 49) Ito, N., M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai and M. Tatematsu (1986) Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis, *Food Chem. Toxicol.*, 24, 1071-1082.
- 50) Armstrong, K.E. and L.W. Wattenberg (1985) Metabolism of 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole to 3-*tert*-butyl-4,5-dihydroxyanisole by rat liver microsomes, *Cancer Res.*, 45, 1507-1510.
- 51) Dacre, J.C., F.A. Denz and T.H. Kennedy (1956) The metabolism of butylated hydroxyanisole in the rabbit, *Biochem. J.*, 64, 777-782.
- 52) Astill, B.D., D.W. Fassett and R.L. Roudabush (1960) The metabolism of phenolic antioxidants 2. The metabolism of butylated hydroxyanisole in the rat, *Biochem. J.*, 75, 543-551.
- 53) Astill, B.D., J. Mills, D.W. Fassett, R.L. Roudabush and C.J. Terhaar (1962) Fate of butylated hydroxyanisole in man and dog, *J. Agric. Food Chem.*, 10, 315-319.
- 54) Phillips, B.J., D. Anderson and S.D. Gangolli (1987) Microsome-mediated clastogenicity of butylated hydroxyanisole, *Mutagenesis*, 2, 308-309.
- 55) Phillips, B.J., T.E.B. James and D. Anderson (1984) Genetic damage in CHO cells exposed to enzymically generated active oxygen species, *Mutation Res.*, 126, 265-271.
- 56) Ito, N., S. Fukushima, K. Imaida, T. Sakata and T. Masui (1983) Induction of papilloma in the forestomach of hamsters by butylated hydroxyanisole, *Gann*, 74, 459-461.
- 57) Hirose, M., A. Masuda, Y. Kurata, E. Ikawa, Y. Mera and N. Ito (1986) Histologic and autoradiographic studies on the forestomach of hamsters treated with 2-*tert*-butylated hydroxyanisole, 3-*tert*-butylated hydroxyanisole, crude butylated hydroxyanisole, or butylated hydroxytoluene, *J. Natl. Cancer Inst.*, 76, 143-149.
- 58) Hirose, M., M. Shibata, A. Hagiwara, K. Imaida and N. Ito (1981) Chronic toxicity of butylated hydroxytoluene in Wistar rats, *Food Cosmet. Toxicol.*, 19, 147-151.
- 59) Shirai, T., A. Hagiwara, Y. Kurata, M. Shibata, S. Fukushima and N. Ito (1982) Lack of carcinogenicity of butylated hydroxytoluene on long-term administration to B6C3F1 mice, *Food Cosmet. Toxicol.*, 20, 861-865.
- 60) Rosenkranz, H.S., E.C. McCoy, D.R. Sanders, M. Butler, D.K. Kiriazides and R. Mermelstein (1980) Nitropyrenes: Isolation, identification and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners, *Science*, 209, 1039-1043.
- 61) McCoy, E.C. and H.S. Rosenkranz (1982) Cigarette smoking may yield nitroarenes, *Cancer Letters*, 15, 9-13.
- 62) 大西克成, 木内武美, 真鍋芳樹, 筒井英士 (1984) ニトロアレーンの重要性, *環境変異原研究*, 6, 29-37.
- 63) 松下秀鶴, 河合昭宏, 後藤純雄, 久松由東 (1984) ニトロアレーン系変異原

- の環境分布は何故広いと推定されるのか, 環境変異原研究, 6, 39-47.
- 64) Mermelstein, R., D.K. Kiriazides, M. Butler, E.C. McCoy and H.S. Rosenkranz (1981) The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria, *Mutation Res.*, 89, 187-196.
- 65) Ohgaki, H., C. Negishi, K. Wakabayashi, K. Kusama, S. Sato and T. Sugimura (1984) Induction of sarcomas in rats by subcutaneous injection of dinitropyrenes, *Carcinogenesis*, 5, 583-585.
- 66) Patton, J.D., V.M. Maher and J.J. McCormick (1986) Cytotoxic and mutagenic effects of 1-nitropyrene and 1-nitrosopyrene in diploid human fibroblasts, *Carcinogenesis*, 7, 89-93.
- 67) Berry, D.L., G.M. Schoofs and W.A. Vance (1985) Mutagenicity of nitrofluoranthenes, 3-aminofluoranthene and 1-nitropyrene in Chinese hamster V79 cells, *Carcinogenesis*, 6, 1403-1407.
- 68) Heflich, R.H., E.K. Fifer, Z. Djuric and F.A. Beland (1985) DNA adduct formation and mutation induction by nitropyrenes in *Salmonella* and Chinese hamster ovary cells: Relationships with nitroreduction and acetylation, *Environ. Health Perspect.*, 62, 135-143.
- 69) Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki and R. Kato (1985) Metabolic activation of mutagenic N-hydroxyarylamines by O-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA98, *Arch. Biochem. Biophys.*, 239, 286-295.
- 70) 染色体異常試験データ集 (1987) 石館基 監修, エル・アイ・シー
- 71) 杉戸大作 (1983) 地下水汚染 - 地下水汚染実態調査結果から -, 水道協会雑誌, 52, 53-61.
- 72) 宮田ルミ子, 能美健彦, 吉川邦衛, 石館基 (1981) サルモネラ菌株を用いたラット肝及びマウス肝S9分画によるp-NitrotolueneとTrichloroethyleneの代謝的活性化試験, 衛生試験所報告, 99, 60-65.
- 73) Bartsch, H., C. Malaveille, R. Montesano and L. Tomatis (1975) Tissue-mediated mutagenicity of vinylidene chloride and 2-chloro-butadiene in *Salmonella typhimurium*, *Nature*, 255, 641-643.
- 74) Jongen, W.M.F., G.M. Alink and J.H. Koeman (1978) Mutagenic effect of dichloromethane on *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, 56, 245-248.
- 75) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (1979) 20, 429-448.
- 76) McCall, S.N., P. Jurgens and K.M. Ivanetich (1983) Hepatic microsomal metabolism of the dichloroethanes, *Biochem. Pharmacol.*, 32, 207-213.
- 77) Rannug, U., A. Sundvall and C. Ramel (1978) The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *Salmonella typhimurium* I. Activation through conjugation with glutathion *in vitro*, *Chem.-Biol. Interactions*, 20, 1-16.
- 78) Stolzenberg, S.J. and C.H. Hine (1980) Mutagenicity of 2- and 3-carbon halogenated compounds in the *Salmonella*/mammalian-microsome test, *Environ. Mutagenesis*, 2, 59-66.
- 79) Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato and Y. Shirasu (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutation Res.*, 116, 185-216.
- 80) Van Duuren, B.L., B.M. Goldschmidt, G. Loewengart, A.C. Smith, S. Melchlonne, I. Seidman and D. Roth (1979) *J. Natl. Cancer Inst.*, 63, 1433
- 81) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans (1979) 20, 129-154.
- 82) NTP (1981) Bioassay of di(2-ethylhexyl)phthalate for possible carcinogenicity, National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC, OHHS Publication No.(NIH) 81-1773.
- 83) Phillips, B.J., T.E.B. James and S.D. Gangolli (1982) Genotoxicity studies of di(2-ethylhexyl)phthalate and its metabolites in CHO cells, *Mutation Res.*, 102, 297-304.

- 84) Daniel, J.W. and H. Bratt (1974) The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats, *Toxicology*, 2, 51-65.
- 85) Tomita, I., Y. Nakamura, N. Aoki and N. Inui (1982) Mutagenic/carcinogenic potential of DEHP and MEHP, *Environ. Health Perspect.*, 45, 119-125.
- 86) Simmon, V.F., K. Kauhanen and R.G. Tardiff (1977) Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water, in: D. Scott et al. (Eds.) *Progress in Genetic Toxicology*, Elsevier, pp. 249-258.
- 87) Sofuni, T., A. Matsuoka, M. Sawada, M. Ishidate, Jr., E. Zeiger and M.D. Shelby (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHL and CHO) systems in culture, *Mutation Res.*, 241, 175-213.

謝辞

本研究に際し、御教示ならびに御校閲を賜りました九州大学薬学部吉村英敏教授に深甚なる謝意を表します。また御助言をいただきました同大学薬学部堀内忠郎教授、小栗一太博士ならびに姫野勝博士に深謝致します。

本研究の実施にあたり、BHAの代謝物を分与して頂いた国立衛生試験所有機化学部 宮田直樹博士、およびDNP類を分与して頂いた当時国立がんセンター研究所 佐藤茂秋博士（現富山県衛生研究所所長）に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、終始直接の御指導と御助言を頂きました、国立衛生試験所変異遺伝部 祖父尼俊雄部長、元変異遺伝部 石館基部長、林 真室長に深く感謝の意を表します。

本研究を進める上で、終始御協力頂いた国立衛生試験所 元変異原性部細胞変異研究室の方々に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文作成の機会を与えて下さいました国立衛生試験所食品添加物部 義平邦利部長に厚く御礼申し上げます。

