

能であるので、複数の動物種を用いて毒性試験が実施される必要がある。毒性発現に著しい動物種差が認められるときには、薬物動態や胚/胎児の組織の感受性に差がある可能性を考察する必要がある。薬物代謝が類似している多くの動物種において、母体毒性量よりも低用量で同じ型の発牛毒性が発現するときには、ヒトでの毒性が発現する可能性が高くなる。動物実験では通常健康な動物を使って行われることがヒトの場合とは異なっている。ヒトでは、例えば、抗癌薬の場合、治療に複数の医薬品が使われ、また、癌などの母体の要因が介在するために、これらの要因による作用の増強または軽減の影響を考慮しなければならない。また、当然のことながら医薬品は比較的大量を意図的に与えるものであり、処方する者が医薬品についての情報を熟知している必要がある。

これまで述べたような動物実験の特徴を十分に理解し、動物実験のデータを適切に評価して、ヒトへの外挿が行われることが望まれる。

## 文 献

- 1) OECD Environment:Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, No. 43. Draft Guidance Document on Reproductive Toxicity Testing and Assessment (November 10, 2004)
- 2) 厚生省医薬安全局：医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について、医薬審第1834号、2000。
- 3) 柏森良一：サリドマイド物語、医歯薬出版、1997。
- 4) 厚生省医薬安全局：医薬品の承認申請に添付すべき資料の取り扱いについて、医薬発第663号、2001
- 5) Schardein JJ:Chemically Induced Birth Defects,

3rd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York, 2000.

- 6) Kalter H:Teratology in the Twentieth Century: Congenital Malformations in Humans and how their Environmental Causes were Established. Elsevier, Amsterdam, 2003.
- 7) Schardein JJ, Macina OT:Human Developmental Toxicants:Aspects of Toxicology and Chemistry. Taylor & Francis, Boca Raton, 2007.
- 8) 谷村 孝：成績の評価とヒトへの外挿。谷村孝編、毒性試験講座11、発生毒性、地人書館、pp389-412, 1992.
- 9) Shepard TH:Catalog of Teratogenic Agents, 11th Edition, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2004.
- 10) Wise LD, et al.:Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). Teratology 55:249-292, 1997. (日本語版/堀本政夫・他：実験動物の発生異常用語集, Cong Anom 38:153-237, 1998)
- 11) Chahoud I, et al.:Classification terms in developmental toxicology:Need for harmonisation. Reprod Toxicol 13:77-82, 1999.
- 12) Solecki R, et al.:Harmonisation of rat skeletal terminology and classification. Report of the third workshop on the terminology in developmental toxicology, Berlin, 14-16 September 2000. Reprod Toxicol 15:713-721, 2001.
- 13) Solecki R, et al.:Harmonisation of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the fourth workshop on the terminology in developmental toxicology, Berlin, 18-20 April 2002. Reprod Toxicol 17:625-637, 2003.

## 著者連絡先

(〒158-8501)

東京都世田谷区上用賀1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター  
総合評価研究室  
江馬 眞

**Table 1** Tester strains used in the present study

Strain	Description	Reference
<i>Salmonella typhimurium</i>		
TA1975	<i>hisG46, rfa</i>	Maron and Ames, 1983
TA1535	as TA1975, but $\Delta$ <i>uvrB</i>	Maron and Ames, 1983
YG7104	as TA1535, but $\Delta$ <i>ogt</i> <sub>ST</sub> , Km <sup>r</sup>	Yamada et al., 1995
YG7108	as TA1535, but $\Delta$ <i>ada</i> <sub>ST</sub> and $\Delta$ <i>ogt</i> <sub>ST</sub> , Km <sup>r</sup> and Cm <sup>r</sup>	Yamada et al., 1995
YG3001	as TA1535, but $\Delta$ <i>mutM</i> <sub>ST</sub> , Km <sup>r</sup>	Suzuki et al., 1997
YG3002	as TA1975, but $\Delta$ <i>mutM</i> <sub>ST</sub> , Km <sup>r</sup>	Suzuki et al., 1997
TA100	as TA1535, but harboring pKM101, Ap <sup>r</sup>	McCann et al., 1975
YG7112	as TA100, but $\Delta$ <i>ogt</i> <sub>ST</sub> , Cm <sup>r</sup>	Yamada et al., 1997
YG7113	as TA100, but $\Delta$ <i>ada</i> <sub>ST</sub> and $\Delta$ <i>ogt</i> <sub>ST</sub> , Km <sup>r</sup> and Cm <sup>r</sup>	Yamada et al., 1997
TA102	<i>hisG428, rfa</i> , harboring pKM101, Ap <sup>r</sup>	Suzuki et al., 1997
YG3003	as TA102, but $\Delta$ <i>mutM</i> <sub>ST</sub> , Km <sup>r</sup>	Suzuki et al., 1997
TA1978	<i>hisD3052, rfa</i>	Maron and Ames, 1983
TA1538	as TA1978, but $\Delta$ <i>uvrB</i>	Maron and Ames, 1983
<i>Escherichia coli</i>		
WP2	<i>trpE65</i>	Gatehouse et al., 1994
WP2 <i>uvrA</i>	as WP2, but $\Delta$ <i>uvrA</i>	Gatehouse et al., 1994

Km<sup>r</sup>: resistant to kanamycin, Cm<sup>r</sup>: resistant to chloramphenicol, Ap<sup>r</sup>: resistant to ampicillin

**Table 2** List of 20 test compounds

Abbreviation	Test compound	Source	Solvent
MNNG	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	Dr. M. Nakadate, NIHS, Tokyo	Dimethyl sulfoxide
ENNG	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	Dr. M. Nakadate, NIHS, Tokyo, and Sigma-Aldrich	Dimethyl sulfoxide
PNNG	<i>N</i> -Propyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	Dr. M. Nakadate, NIHS, Tokyo	Dimethyl sulfoxide
BNNG	<i>N</i> -Butyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	Dr. M. Nakadate, NIHS, Tokyo	Dimethyl sulfoxide
MMS	Methyl methanesulfonate	Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo	Dimethyl sulfoxide
EMS	Ethyl methanesulfonate	Aldrich Chemical, Milwaukee	Dimethyl sulfoxide
MNU	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea	Sigma Chemical Co., St. Louis	Dimethyl sulfoxide
ENU	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea	Sigma Chemical Co., St. Louis	Dimethyl sulfoxide
EDB	Ethylene dibromide	Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Dimethyl sulfoxide
DMN	Dimethylnitrosamine	Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Water
DEN	Diethylnitrosamine	Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Water
4-NQO	4-Nitroquinoline 1-oxide	Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo	Dimethyl sulfoxide or ethanol
AF-2	2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (Furylfuramide)	Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Dimethyl sulfoxide
2-NF	2-Nitrofluorene	Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, and Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Dimethyl sulfoxide or ethanol
MX	3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone	Dr. N. Kinai, Shizuoka Prefectural Univ., and Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Dimethyl sulfoxide
NPD	<i>p</i> -Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine (1,2-diamino-4-nitrobenzene)	Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Dimethyl sulfoxide
AZ	Sodium azide	Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Water
HP	Hydrogen peroxide	Wako Pure Chemical Industries, Osaka	Water
MB (+light)	Methylene blue (+visible light)	Sigma Chemical Co., St. Louis	Water
NR (+light)	Neutral red (+visible light)	Junsei, Tokyo	Water

( $\Delta$ *mutM*<sub>ST</sub>)とその野生株 TA102をそれぞれ用いた。

これらの変異原物質の入手先と用いた溶媒の種類を Table 2に示した。

## 2) 被験物質

DNAを直接標的とする代表的な物質として主にアルキル化剤を、また、その比較対照として塩基置換変異やフレームシフトを誘発する変異原物質や酸化的DNA損傷をもたらすものなど、20種類について検討した。そ

## 3) 試験方法

復帰突然変異試験は通常のプレインキュベーション法を用い、主に非代謝活性化法で行ったが、必要に応じてラット肝S9 mixによる代謝活性化法で行った。保存菌

**Table 3** Number of His<sup>+</sup> revertants per plate in TA1535, YG7104 and YG7108 treated with MNNG in the absence of S9 mix

Experiment-1																						
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0			0.1			0.25			0.5			1								
Plate No.	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean							
TA1535	12	10	11	11	7	9	4	9	7	21	14	18	361	489	425							
YG7104	11	14	13	480	400	440	1344	1120	1232	1752	1920	1836	4000	2568	3284							
YG7108	23	26	25	2704	2568	2636	3656	3968	3812	5520	5664	5592	4160	7024	5592							
Experiment-2																						
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0			0.01			0.025			0.05			0.1			0.25			0.5		
Plate No.	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	
TA1535	6	8	7	8	6	7	6	2	4	2	4	3	4	4	4	8	2	5	18	34	26	
YG7104	10	10	10	78	87	83	162	152	157	342	350	346	620	588	604	1601	1620	1611	5004	5508	5256	
YG7108	37	46	42	824	962	893	1432	1346	1389	1230	1492	1361	1808	1846	1827	4008	5706	4857	5922	4888	5405	
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1			2																	
Plate No.	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean																
TA1535	860	986	923	2116	2126	2121																
YG7104	5718	6066	5892	6218	8706	7462																
YG7108	6006	6186	6096	7626	7326	7476																
Experiment-3																						
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0			0.0001			0.00025			0.0005			0.001			0.0025			0.005		
Plate No.	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	
TA1535	7	5	6	10	11	11	7	ND	7	8	4	6	5	5	5	10	7	9	9	9	9	
YG7104	22	20	21	27	27	27	37	25	31	24	23	24	36	29	33	38	39	39	71	76	74	
YG7108	35	19	27	40	38	39	49	61	55	46	80	63	116	75	96	173	173	173	348	376	362	
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0.01																				
Plate No.	#1	#2	Mean																			
TA1535	8	9	9																			
YG7104	103	122	113																			
YG7108	452	488	470																			

(ND: No data)

液を解凍し、5~6 mLのニュートリエントブロスに5  $\mu\text{L}$ の接種量で植え、37°Cで15~16時間振盪培養した菌液を用いた。被験物質溶液 0.1 mLと0.1 M Na-リン酸緩衝液 0.5 mL(またはS9 mix)とテスト菌株の培養液0.1 mLを試験管に入れ、よく混合し37°Cで20分間ブレインキュベーションした。2 mLのトップアガーを加え、直ちに最少グルコース寒天プレート上に広げて固めた。プレートを37°Cで48または72時間培養した後、His<sup>+</sup>またはTrp<sup>+</sup>復帰変異コロニー数を測定した。各用量毎に2~3枚のプレート(対照群は2~5枚)を用い、その平均値を求めた。

## 結 果

### 1) MGT欠損株( $\Delta\text{ogt}_{\text{ST}}$ , $\Delta\text{ada}_{\text{ST}}$ )による比較

代表的なアルキル化剤であるMNNGの結果をTable 3に示す。ここにはMGT欠損株であるYG7104( $\Delta\text{ogt}_{\text{ST}}$ )とYG7108( $\Delta\text{ogt}_{\text{ST}}$ ,  $\Delta\text{ada}_{\text{ST}}$ )、及びそれらの野生株TA1535についての3回の実験結果を示してある。TA1535の突然変異誘発に比べるとYG7104よりもYG7108の方がその

差が大きいため、以後はYG7108のデータを用いて比較することにした。Fig. 1にYG7108とTA1535についての3回の実験結果をグラフで示してある。ここでは低用量域での反応を見やすくするため、X軸およびY軸共に対数で表示してある。YG7108では0.00025  $\mu\text{g}/\text{plate}$ より明らかな変異コロニー数の増加がみられ、それ以後用量依存的に変異コロニー数が増加している。一方、TA1535の0.00025~0.25  $\mu\text{g}/\text{plate}$ では陰性対照と同等の値を示し、0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ でようやく変異コロニー数の増加傾向がみられ、1.0  $\mu\text{g}/\text{plate}$ より顕著な増加がみられている。YG7108で突然変異が誘発される用量域(0.00025~0.25  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )において、TA1535では $\text{ogt}_{\text{ST}}$ と $\text{ada}_{\text{ST}}$ の2つ遺伝子が正常に機能していることによって、突然変異の誘発が完全に抑えられていることが示されている。

ENNGについても同様の結果が得られている(Fig. 2)。YG7108では0.00025  $\mu\text{g}/\text{plate}$ で変異コロニー数の増加傾向がみられ、それ以後用量依存的に変異コロニー数が増加している。一方、TA1535の0.01~0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ では陰性対照と同等の値を示し、1.0  $\mu\text{g}/\text{plate}$ で変異コロニー数の増加傾向がみられ、2.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ で明らかな増加が

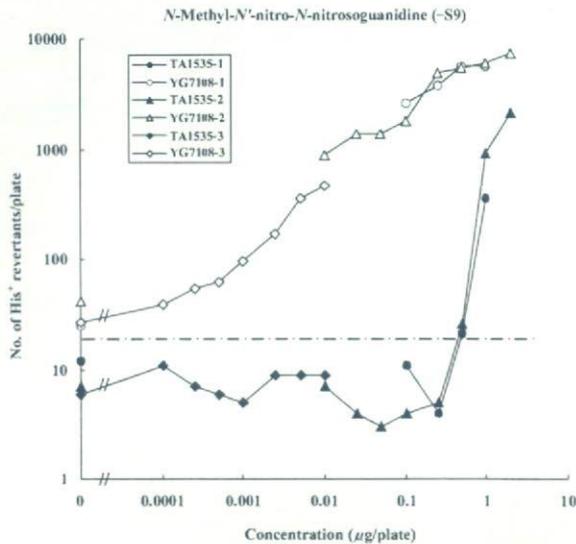


Fig. 1 Comparison of mutagenic responses of MNNG in TA1535 and YG7108 without S9 mix (3 experiment's data)

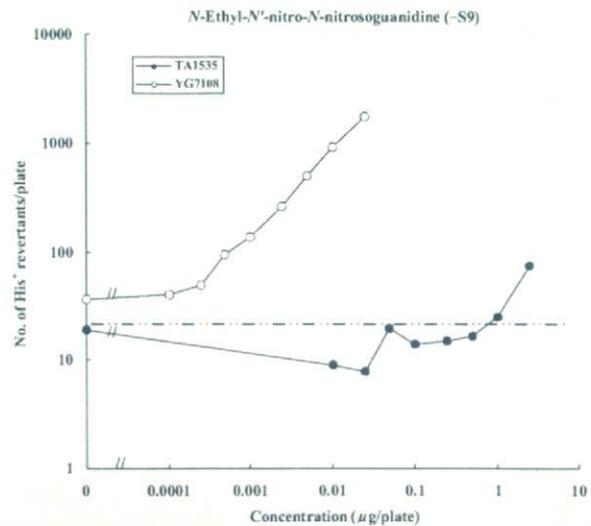


Fig. 2 Comparison of mutagenic responses of ENNG in TA1535 and YG7108 without S9 mix

Table 4 Number of His<sup>+</sup> revertants per plate in TA100, YG7112 and YG7113 treated with EMS in the absence of S9 mix

Experiment-1																											
Dose (µg/plate)		0						5						10						25		50		100		250	
Plate No.	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean																					
TA100	71	69	70	73	72	73	71	66	69	79	69	74	76	65	71	61	85	73	89	80	85						
YG7112	78	70	74	240	216	228	328	320	324	800	880	840	1248	1232	1240	2304	1920	2112	2400	3040	2720						
YG7113	70	79	75	216	236	226	448	456	452	1008	784	896	1280	1360	1320	2368	2784	2576	3040	3584	3312						
Dose (µg/plate)		500						1000																			
Plate No.	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean																					
TA100	88	88	88	86	87	87																					
YG7112	3264	3456	3360	4160	4800	4480																					
YG7113	4224	3750	3987	4832	5824	5328																					
Experiment-2																											
Dose (µg/plate)		0						500						1000						2500		5000					
Plate No.	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean																					
TA100	82	60	71	78	63	71	83	75	79	170	168	169	1360	1120	1240												
YG7113	120	129	125	4192	4224	4208	4012	4800	4406	5504	5600	5552	4800	5408	5104												

認められている。2つの菌株で突然変異の誘発傾向のみられる用量で比較するとTA1535(1.0 µg/plate)はYG7108(0.00025 µg/plate)のおよそ4,000倍も高い用量となる。なお、MNNGでのこの差異はおよそ2,000倍である。

PNNGとBNNGについてもYG7108とTA1535との間で明らかな違いがみられているが、MNNGやENNG程の大きな違いではなく、突然変異の誘発傾向のみられる用量の差異はおよそ100倍程度と判断された(データを省略)。

EMSとMMSについてはTA100とそのMGT欠損株であるYG7112( $\Delta og_{ST}$ )とYG7113( $\Delta og_{ST}$ ,  $\Delta ada_{ST}$ )とで比較した。Table 4にEMSでの2回の実験結果を示す。1回目の実験でYG7113の方がYG7112より変異コロニーの

誘発頻度が高い傾向にあるので、2回目の実験ではTA100とYG7113とで比較した。Fig. 3に両菌株での1回目と2回目の実験結果をグラフで示してある。YG7113では5.0 µg/plateで明らかな変異コロニー数の増加がみられ、それ以後用量依存的に変異コロニー数が増加している。一方、TA100では2,500 µg/plateから明らかな変異コロニー数の増加がみられており、その用量の差異は少なくとも500倍程になる。MMSではEMS程顕著な違いはみられておらず、およそ20倍程度の用量差にすぎなかった(データを省略)。

MNUおよびENUについてはTA1535とYG7108で比較を行い、ENUでは100倍を超える用量差があるものと判断され(Fig. 4)、MNUでも100倍に近い用量差があるものと判断された(データを省略)。EDBについて同

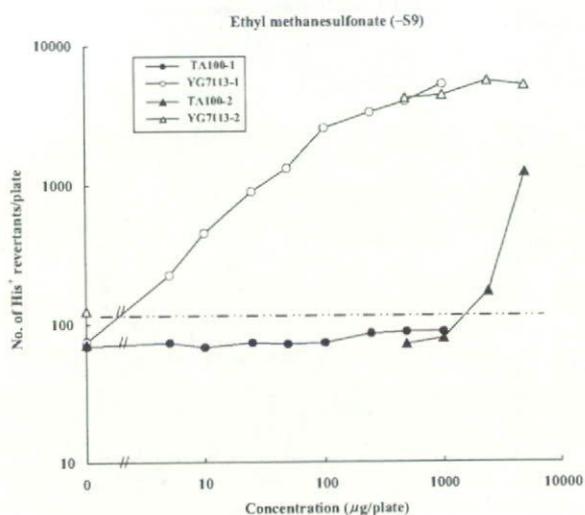


Fig. 3 Comparison of mutagenic responses of EMS in TA100 and YG7113 without S9 mix (2 experiment's data)

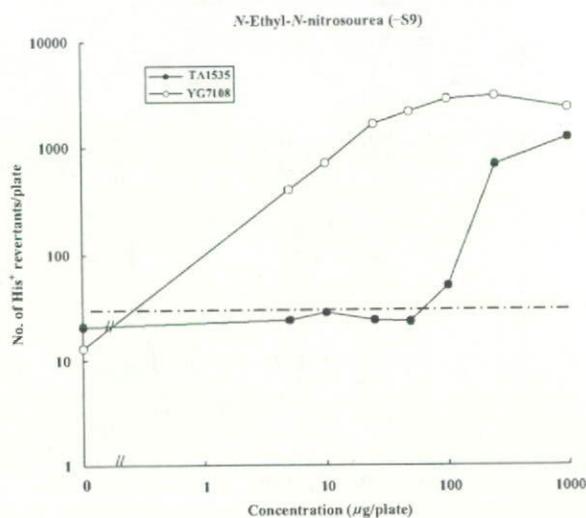


Fig. 4 Comparison of mutagenic responses of ENU in TA1535 and YG7108 without S9 mix

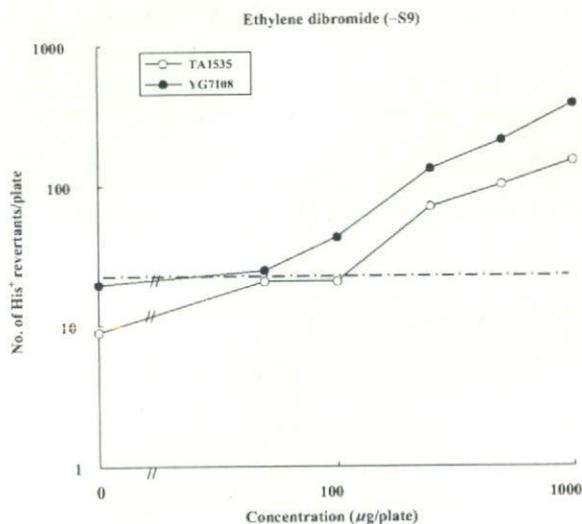


Fig. 5 Comparison of mutagenic responses of EDB in TA1535 and YG7108 without S9 mix

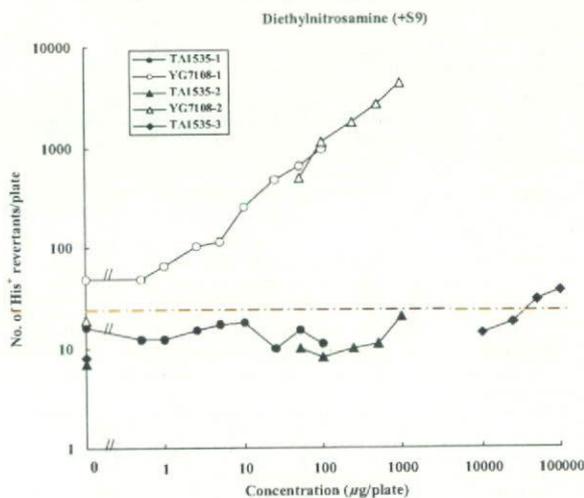


Fig. 6 Comparison of mutagenic responses of DEN in TA1535 and YG7108 with S9 mix (3 experiment's data)

様の比較を行ったが、両菌株での用量依存性には違いがあるものの、その用量差は10倍以下で明らかなものではなかった (Fig. 5)。

これまでは非代謝活性化法での実験であるが、代謝活性化法 (ラット S9) を用いて DMN と DEN について TA1535 と YG7108 で比較検討した。DMN では明らかに100倍を超える用量差があるものと判断された (データを省略)。DEN の YG7108 では 2.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  より変異コロニー数の明らかな増加がみられ、それ以後用量に依存して変異コロニー数が増加している (Fig. 6)。一方、YG1535では 50,000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  という高用量で変異コロニー数の明らかな増加が認められている。これを直接比較すると 20,000倍という極めて大きな違いになる。

非代謝活性化法を用いて 4-NQO (Table 5)、AF-2 (Fig. 7)、2-NF および MX について TA100 と YG7113 とで比較したところ、両菌株の変異コロニー数の用量依存性はほとんど同じで、なんらの違いもみられなかった (2-NF と MX についてはデータを省略)。

## 2) ヌクレオチド除去修復欠損株 (*uvrA* または *uvrB*) による比較

Ames 試験に用いられている TA1535 ( $\Delta uvrB$ ) および TA1538 ( $\Delta uvrB$ ) は除去修復の欠損株として知られており、それぞれの野生株である TA1975 と TA1978 とで比較を行った。さらに大腸菌株 WP2 *uvrA* ( $\Delta uvrA$ ) とその野生株 WP2 との比較も行った。用いた被験物質は、

**Table 5** Number of His<sup>+</sup> revertants per plate in TA100, YG7112, YG7113, TA1978, TA1538, TA1975 and YG3002 treated with 4-NQO in the absence of S9 mix

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0			0.01			0.025			0.05			0.1			0.25			0.5		
Plate No.	#1	#2	Av.	#1	#2	Av.	#1	#2	Av.	#1	#2	Av.	#1	#2	Av.	#1	#2	Av.	#1	#2	Av.
TA100	100	132	116	175	158	167	286	270	278	474	462	468	740	870	805	1338	1188	1263	1238	1194	1216
YG7112	184	154	169	212	226	219	324	284	304	462	454	458	742	684	713	1230	1234	1232	1618	1634	1626
YG7113	180	142	161	114	134	124	236	278	257	370	366	368	600	630	615	1192	1444	1318	1614	1526	1570

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0					0.0003				0.001				0.003				
Plate No.	#1	#2	#3	#4	#5	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean
TA1978	11	10	10	11	9	10	10	9	14	11	9	9	10	9	11	12	7	10
TA1538	12	12	8	15	9	11	10	11	11	11	12	12	13	12	8	16	9	11

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01				0.03				0.1				0.3				0.5			
Plate No.	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean
TA1978	12	7	13	11	8	12	10	10	10	12	14	12	13	13	7	11	15	11	15	11
TA1538	13	14	12	13	30	22	23	25	75	72	69	72	169	197	170	179	246	236	243	242

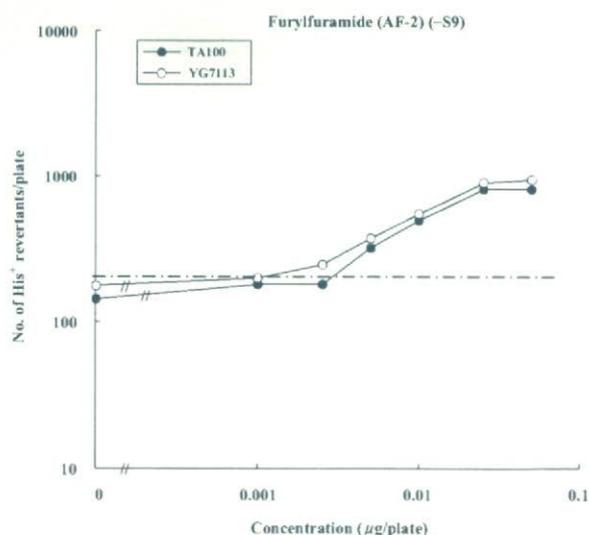
  

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1				2			
Plate No.	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean
TA1978	10	12	17	13	21	22	25	23
TA1538	94	120	106	107	(21)	(25)	(28)	(25)

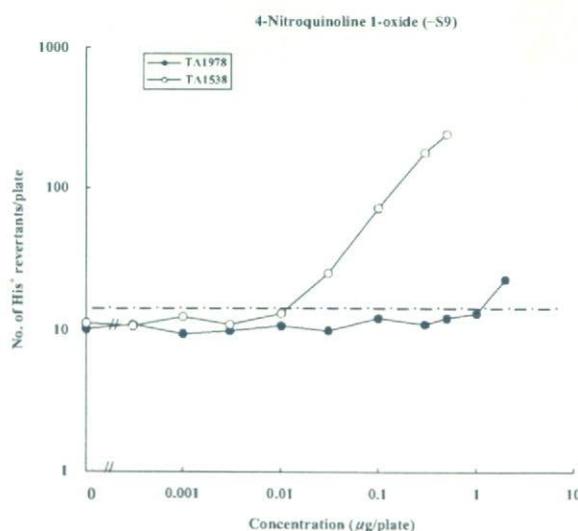
  

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0			0.5			1			2.5			5			10		
Plate No.	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean	#1	#2	Mean
TA1975	1	0	1	2	1	2	3	0	2	3	2	3	21	17	19	32	25	29
YG3002	1	2	2	8	7	8	8	21	15	92	84	88	630	600	615	630	563	597

(Parentheses indicate that apparent antibacterial activity was observed)



**Fig. 7** Comparison of mutagenic responses of AF-2 in TA100 and YG7113 without S9 mix



**Fig. 8** Comparison of mutagenic responses of 4-NQO in TA1978 and TA1538 without S9 mix

TA100とYG7113との間で全く違いのみられなかった4-NQO, MX, 2-NFと、新たにNaN<sub>3</sub>とNPDとを加えた5物質である。いずれも非代謝活性化法を用いた。

4-NQOについてTA1978とTA1538とで比較すると、TA1538では0.03  $\mu\text{g}/\text{plate}$ より変異コロニー数の増加がみられ、以後用量依存的に増加した。一方、TA1978では2  $\mu\text{g}/\text{plate}$ より変異コロニー数の明らかな増加がみら

れており、60倍程の用量差があった (Table 5, Fig. 8)。同様の菌株の組み合わせで2-NFとNPDについて比較したところ、前者ではその差異が少なくなり、およそ30倍程度であったが、後者では両菌株の違いが大きくなり、100倍程度の差がみられた (2-NFとNPDについてはデータを省略)。MXについてはWP2とWP2uvrAとで比較したところ、WP2uvrAでは0.03  $\mu\text{g}/\text{plate}$ より明らかな変

**Table 6** Number of Trp<sup>+</sup> revertants per plate in WP2 and WP2uvrA treated with MX in the absence of S9 mix

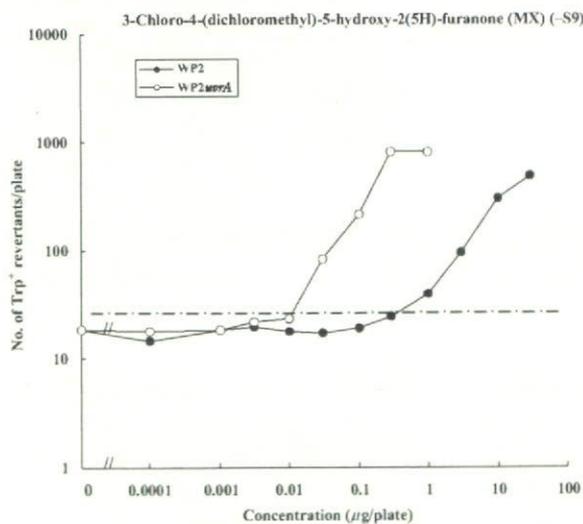
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0				0.0001				0.001				0.003				0.01				
Plate No.	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	
WP2	19	23	19	14	19	15	15	14	15	23	13	19	18	20	21	18	20	17	22	15	18
WP2uvrA	19	17	17	21	19	19	12	22	18	15	19	22	19	24	19	24	22	23	23	24	23
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.03				0.1				0.3				1				3				
Plate No.	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	
WP2	11	21	20	17	20	23	14	19	22	25	25	24	31	42	44	39	99	102	88	96	
WP2uvrA	81	85	81	82	222	202	228	217	852	755	843	817	796	812	836	815	(0)	(0)	(0)	(0)	
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	10				30																
Plate No.	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean													
WP2	319	286	295	300	427	448	574	483													
WP2uvrA	(0)	(0)	(0)	(0)	ND	ND	ND	ND													

(Parentheses indicate that apparent antibacterial activity was observed, ND: No data)

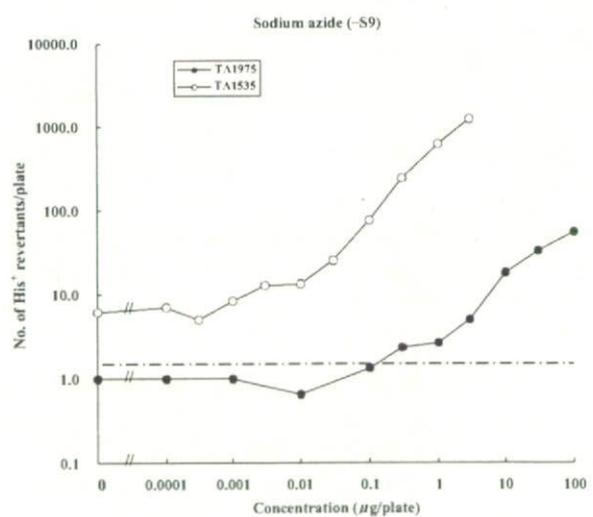
**Table 7** Number of His<sup>+</sup> revertants per plate in TA1975 and TA1535 treated with AZ in the absence of S9 mix

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0					0.0001					0.0003					0.001					0.003				
Plate No.	#1	#2	#3	#4	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean
TA1975	1	1	0	2	1	2	0	1	1	ND	ND	ND	ND	1	0	2	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
TA1535	5	6	8	6	6	6	7	8	7	2	5	8	5	9	5	11	8	12	12	15	13				
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01					0.03					0.1					0.3					1				
Plate No.	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	
TA1975	0	0	2	1	ND	ND	ND	ND	2	1	1	1	1	2	4	2	2	3	3	3					
TA1535	12	13	16	14	25	26	27	26	66	83	87	79	247	246	243	245	607	670	594	624					
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	3					10					30					100									
Plate No.	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean	#1	#2	#3	Mean					
TA1975	7	4	4	5	16	19	20	18	37	35	26	33	62	49	56	56									
TA1535	1278	1171	1319	1256	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND									

(ND: No data)



**Fig. 9** Comparison of mutagenic responses of MX in WP2 and WP2uvrA without S9 mix



**Fig. 10** Comparison of mutagenic responses of AZ in TA1975 and TA1535 without S9 mix

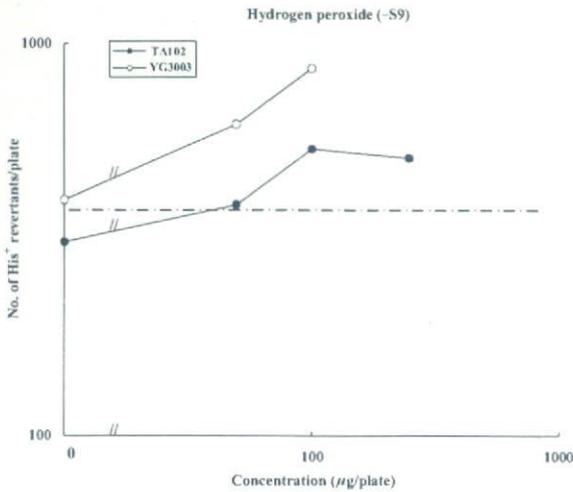


Fig. 11 Comparison of mutagenic responses of HP in TA102 and YG3003 without S9 mix

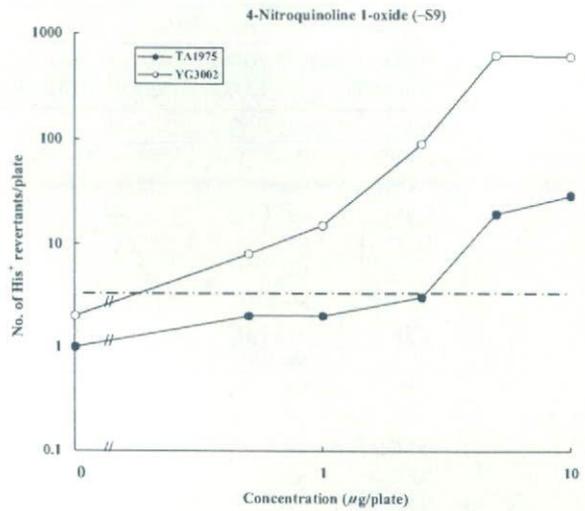


Fig. 12 Comparison of mutagenic responses of 4-NQO in TA1975 and YG3002 without S9 mix

異コロニー数の増加がみられ、WP2では1.0 µg/plateよりみられており、その用量差はおよそ30倍程度であった (Table 6, Fig. 9)。AZについてTA1975とTA1535とで比較すると、両菌株での用量差はNPDと同様に100倍程度であった (Table 7, Fig. 10)。なお、ENNGについてはTA1975とTA1535とで近似した用量依存性が得られたこと、およびTA1535とYG7104とでは突然変異の誘発に大きな違い (およそ3,000倍) のあることを別途確認している (データを省略)。

### 3) 酸化的損傷修復欠損株 (*mutM<sub>ST</sub>*) による比較

DNA損傷の重要なものの1つである酸化的損傷について、YG3001 (*ΔmutM<sub>ST</sub>*) とその野生株TA1535、YG3002 (*ΔmutM<sub>ST</sub>*) とその野生株TA1975、YG3003 (*ΔmutM<sub>ST</sub>*) とその野生株TA102を用いて検討した。HPについては非代謝活性化法を用いてTA102とYG3003とで比較したが、その反応性に違いはあるものの、10倍以下であった (Fig. 11)。代謝活性化法を用いてMB + 可視光、NR + 可視光についてTA1535とYG3001およびTA1975とYG3002とでそれぞれ比較したが、いずれもHPと類似した反応を示した (データを省略)。一方、4-NQOについてTA1975とYG3002を用いて比較したところYG3002では0.5 µg/plateで変異コロニー数の増加がみられるのに対して、TA1975では5 µg/plateより変異コロニー数の増加がみられており、10倍程の用量差がみられた (Table 5, Fig. 12)。2-NFについてもTA1535とYG3001で比較したが、HPにおける反応と類似したものであった (データを省略)。

## 考 察

本研究結果のまとめをTable 8に示す。代表的なアルキル化剤であるMNNGやENNGでは、MGT欠損株YG7108で突然変異が誘発されている用量においても、その野生株TA1535では突然変異の誘発は全くみられず、両菌株間で突然変異の誘発傾向のみみられる用量で比較すると、野生株では数千倍もの高い用量となる。このことは野生株においてはDNA損傷によって突然変異が生じる場が十分にありながら、その修復系の存在によって突然変異に固定されるまでの過程を完遂できない用量域、即ち生物学的な閾値が存在していることを示している。

PNNGとBNNGでも同様に明らかな違いがみられるが、MNNGやENNGに比べると、野生株と欠損株での違いの程度は低くなっているが、これは側鎖が大きくなるにつれてMGTによる修復が低下する一方で、他の修復系例えばヌクレオチド除去修復系が関与してくるなどが考えられる。ENUではMNNGやENNGとほぼ同様に野生株と欠損株とに違いがみられたが、MNUではPNNGやBNNGと同程度の違いがみられている。EDBでは、両菌株での用量依存性に差異はあるものの、その違いは10倍以下であり、突然変異の誘発にMGTが関与するDNA損傷の占める割合は少ないものと考えられる。

代謝活性化法を用いた場合にも同様の結果が得られている。DMNとDENは共に野生株と欠損株で比較すると100倍以上の差異がみられている。特に、DENの場合には直接的に比較すると20,000倍もの違いになっている。但し、野生株で変異コロニーが明らかに増加している用量は著しく高用量で、そのような高用量での代謝産

Table 8 Summary of the results in 20 test compounds compared with different tester strains

Deficient marker	<i>ogt<sub>ST</sub></i> and <i>ada<sub>ST</sub></i>		<i>uvrA</i> or <i>uvrB</i>			<i>mutM<sub>ST</sub></i>		
Deficient strain	YG7108	YG7113	TA1535	TA1538	WP2 <sub><i>uvrA</i></sub>	YG3001	YG3002	YG3003
Wild strain	TA1535	TA100	TA1975	TA1978	WP2	TA1535	TA1975	TA102
MNNG - S9	◎							
ENNG - S9	◎		×					
PNNG - S9	○							
BNNG - S9	○							
MMS - S9		○						
EMS - S9		◎						
MNU - S9	○							
ENU - S9	◎							
EDB - S9	△							
DMN + S9	◎							
DEN + S9	◎							
4-NQO - S9		×		○			○	
AF-2 - S9		×						
2-NF - S9		×		○		△		
MX - S9		×			○			
NPD - S9				○				
AZ - S9			○					
HP - S9								△
MB + light + S9						△		
NR + light + S9							△	

Differences of the lowest effective concentration between two tester strains were, ◎: more than 100-fold, ○: about 10- to 100-fold, △: less than 10-fold, ×: no difference

物の生成が低用量と同じ効率であるとは考えがたく、実際の差異はもっと小さいものと推測される。

TA1535で突然変異の誘発が認められない物質については、TA100(野生株)とYG7113(欠損株)とで比較したところ、EMSでは100倍以上、MMSでは10倍以上の違いがみられ、MGTが関与する生物学的な閾値が存在するものと考えられる。一方、4-NQO、AF-2、MXおよび2-NFではTA100とYG7113の変異コロニーの用量依存性に全く違いがみられず、これらの物質ではMGTが関与するようなDNA損傷が突然変異の誘発要因とはなっていないものと考えられる。

TA100とYG7113で全く違いのみられなかったもののうち、塩基置換変異を誘発するAZとMXについては、ヌクレオチド除去修復欠損株のTA1535( $\Delta uvrB$ )、WP2<sub>*uvrA*</sub>( $\Delta uvrA$ )とそれらの野生株TA1975、WP2株を用いて、フレームシフトを誘発する4-NQO、2-NF、NPDについてはTA1538( $\Delta uvrB$ )株とその野生株TA1978株を用いて比較したところ、いずれの場合も修復欠損株と野生株とは30~100倍程の差異がみられており、これらの変異原物質では除去修復系が生物学的閾値に寄与しているものと考えられる。

酸化損傷については、*mutM<sub>ST</sub>*欠損株YG3001( $\Delta mutM_{ST}$ )、YG3002( $\Delta mutM_{ST}$ )、YG3003( $\Delta mutM_{ST}$ )とそれらの野生株TA1535、TA1975、TA102を用いて比較したところ、HP、MB + 可視光、NR + 可視光ではい

ずれも差異はあるものの、その違いは10倍以下であった。酸化損傷修復には*mutM<sub>ST</sub>*に加えて*mutY<sub>ST</sub>*も関与している。また、活性酸素などによるDNAの酸化損傷は構造的に極めて多様であり、他の修復系が関与していることも考えられ、単一の修復酵素欠損株と野生株との比較ではその違いが明確には把握しにくい可能性が考えられる。一方、4-NQOではYG3002とTA1975との間に10倍以上の差異があり、*mutM<sub>ST</sub>*による生物学的な閾値の存在を示唆している。4-NQOについては付加体形成に加えて8-OH-Gの生成が知られていることから、酸化損傷修復系が寄与する生物学的閾値が存在する可能性がある。今後より適切な実験系を組み立てることにより、酸化損傷修復系による生物学的閾値の存在をより明確に確認できるものと考えられる。

チャイニーズ・ハムスター卵巣由来の細胞株CHOの亜株であるCHO-9ではMGT活性が検出限界以下であり、この細胞にヒトのMGTのcDNAおよび大腸菌の*ada*を導入したクローンが作られている(Kaina et al., 1993)。これらの細胞を用いて1  $\mu$ M MNNGによるHPRT突然変異(6-TG抵抗性)を調べたところ、CHO-9では突然変異の誘発がみられているが、ヒトのMGTが発現している細胞では突然変異の誘発がほとんどみられていない。同様に2 mM ENUでの処理の場合、ヒトのMGTを発現している細胞では突然変異の誘発はあるものの、CHO-9での誘発のおよそ1/5に低下していた。

20  $\mu$ M MNNGによる染色体異常誘発についても検討しており、CHO-9では70%以上の細胞に染色体異常がみられたが、ヒトのMGTを発現している細胞では40%近くに低下し、さらに大腸菌 *ada* 導入細胞では染色体異常の誘発がほとんど抑えられていた(4%)。これらの結果はほ乳類培養細胞においても、細菌と同様の修復機構が存在し、それが遺伝子突然変異のみならず染色体異常にも生物学的閾値をもたらす可能性を示唆するものと考えられる。

ほ乳類では細菌の *MutM* 遺伝子に相当するものとして *Ogg1* が知られており、この遺伝子のノックアウトマウスが作製され、突然変異検出系である *gpt* トランスジェニックマウスと交配させて、*gpt/Ogg1*<sup>-/-</sup>マウスが作製されている。このマウスに腎臓がん物質である臭素酸カリ (KBrO<sub>3</sub>) 2 g/Lを飲水で12週間投与したところ、*Ogg1*<sup>-/-</sup>マウスの腎臓における8-OH-Gのレベルは *Ogg1*<sup>+/+</sup>マウスの70倍程高く、*gpt* 遺伝子の突然変異頻度も3倍程高まっていた(Arai et al., 2002)。この報告では1用量のみであるが、さらに低い用量段階をとると *Ogg1*<sup>-/-</sup>マウスでは突然変異の誘発がみられる用量で、*Ogg1*<sup>+/+</sup>マウスでは突然変異の誘発がみられない生物学的な閾値用量が見出される可能性が考えられる。

遺伝毒性発がん物質として知られている MeIQx について *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて突然変異の誘発が検討されている(Masumura et al., 2003)。3, 30, 300 ppmの MeIQxを12週間混餌で投与したところ、肝臓での *gpt* の突然変異頻度は30, 300 ppmで有意な増加が認められたが、3 ppmでは陰性対照と同等の突然変異頻度で有意な差異は認められなかった。さらに変異体について塩基配列を解析したところ、30, 300 ppmでは MeIQx 特有の G:C → T:A トランスバージョンの増加がみられたが、3 ppmでは陰性対照にみられるものと同様であった。一方、MeIQx についてのラットを用いた実験では0.01 ppmよりDNA付加体の増加がみられるとの報告がある(Fukushima, 1999)。これらの報告は実験動物でも、DNA損傷をもたらすような用量においても種々の修復系によって突然変異に固定されない生物学的な閾値が存在することを示唆している。

変異原物質の閾値の問題についてはかなり以前からたびたび議論が繰り返されてきているが、その中でも日本環境変異原学会が1984年に開催した国際シンポジウムは注目に値する(Tazima et al., 1984; 黒田, 1984)。ここでは生殖細胞を経由して次世代に現れる突然変異と投与効果(単回高用量 vs. 複数回低用量)や代謝活性化による影響の問題等に加えて、DNA修復能の影響も論議されている。DNA修復と細胞交替についての論文(Kondo et al., 1984)では、ショウジョウバエの除去修復欠損系 (*mus201/mus201*) とその野生系とで紫外線照射による眼色突然変異の誘発を比較しており、欠損系で突然変異

の誘発がみられる照射量の40倍の照射量においても、野生系では明らかな突然変異の誘発はみられないことが報告されている。この論文では大腸菌でのデータに加えて、種々のヒトがん細胞株のうち O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase 欠損株 (Mer<sup>-</sup>) と野生株 (Mer<sup>+</sup>) とで MNNG による姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange: SCE) の誘発を比較した論文 (Day et al., 1980) をも引用し (欠損株で SCE が誘発される用量において、野生株では SCE の誘発がみられず、その10倍以上の用量からようやく SCE の誘発がみられている)、生物学的障害をもたらす DNA 損傷を「完全に」取り除ける高効率な修復系が発現している場合には閾値効果が認められるものと論じている。

このシンポジウム開催の基点となったと考えられる論文がシンポジウム開催2年前に報告されている(田島, 1982)。この論文では閾値の可能性が考えられるものとして4つの場合を提示し、その1つが DNA 損傷の完全な修復としている。また、変異原物質の投与から生物学的障害が成立するまでにさまざまな段階があるのに、どの段階なのかの区別がないままに閾値の議論がされていることの問題点を指摘しており、今日なおそれに近い状況にあるといえよう。さらに、自然発生レベルの生物学的障害に妨げられて低用量での閾値を明確にできないような場合においても、「risk-benefit balance を良く考えて」(原文引用) 判定すべきで、「こうした実際的方法を非科学的と非難することは必ずしも当たらないと思う」(原文引用) とも述べており、ヒトへのリスク評価に向けて閾値を適用すべきスタンスを示している。20年以上も前に既にこのような見解が示されていることに改めて注目すると共に、科学的な実証をベースにしながらも、具体的に社会的な貢献ができる道筋を明確にしていくことが重要であると考えられる。

生物学的閾値とはほぼ同様の考え方が本邦において既に提示されている(田島, 1980)。この論文では、標的に物質が到達していながらも無作用域がある場合を真の閾値とし、標的に物質が到達していないことによる無作用域を見かけ上の閾値と定義している。前者については農薬(シメトリン)による染色体異常誘発の例を引用し、ある用量以下では染色体異常の誘発がみられないが、そのような用量でも SCE の誘発がみられていることから、物質が標的に到達していながらも染色体異常の誘発がみられない、つまり染色体異常において真の閾値の存在を示す例として述べている。さらに、防かび剤 (methyl-2-benzimidazolyl carbamate) による小核誘発の例が紹介されており、腹腔内投与と経口投与による小核誘発の違いが血中濃度の違いに依存している、つまり腹腔内投与ではあるレベル以上に血中濃度が上がらずしかも小核の誘発がないが、経口投与ではその倍以上に血中濃度が上がり小核の誘発がみられている。これは標的が暴露されて

いながらも、ある一定量を超えないと影響がみられないことから、真の閾値の存在する例として引用している。本稿の緒言で示した生物学的閾値の引用論文(Kirsch-Volders et al., 2000)には“Real(or biological) threshold”と記載されているのだが、「真(real)」という言葉の意味が伝わりにくいと判断し、あえて本稿では「生物学的(biological)閾値」という用語で通した。しかし、標的に物質が到達している状況が確認できる用量で、生物学的障害がみられない事例については、「真の閾値」という用語の使用が普及していくことになるものと思われる。

## 結 語

DNAを直接標的とする変異原物質について細菌を用いる復帰突然変異試験でDNA修復能の有無による突然変異誘発の違いを検討した。DNA修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまりDNA損傷により突然変異が生じる用量においても、DNA修復能をもつ野生株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在すると考えられる。細菌のみならず他の生物種においてもそのようなメカニズムの存在を示唆する研究成果が散在しており、生物学的な閾値が普遍的な考え方としてヒトのリスク評価に応用できるようになることを期待している。そのため今後特に実験動物等でのこのような事象の確認の積み重ねが重要であると考えられる。

## 謝 辞

MGT欠損菌株を用いて追加の実験をして頂きました国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部、松井恵子技術補助員、並びに貴重な助言を頂きました同部、本間正充室長、山田雅巳主任研究官および同所安全情報部、森田健主任研究官に深謝致します。本研究に協力して頂きました日本環境変異原学会臨時委員会「食品および食品添加物等に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」の委員、並びに厚生労働科学研究費「既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究」の班員に感謝致します。

本研究の一部は平成16年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)「既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究(H15-食品-009)」により実施した。

## 参 考 文 献

- Arai, T., V.P. Kelly, O. Minowa, T. Noda and S. Nishimura (2002) High accumulation of oxidant DNA damage, 8-hydroxyguanine, in *Mmh/Ogg1* deficient mice by chronic oxidative stress, *Carcinogenesis*, 23, 2005-2010.
- Elhajouji, A., P. Van Hummelen and M. Kirsch-Volders (1995) Indications for a threshold of chemically induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.*, 26, 292-304.
- Elhajouji, A., F. Tibaldi and M. Kirsch-Volders (1997) Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes, *Mutagenesis*, 12, 133-140.
- Day, R.S. III, C.H.J. Ziolkowski, D.A. Scudiero, S.A. Meyer, A.S. Lubiniecki, A.J. Girardi, S.M. Galloway and G.D. Bynum (1980) Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains, *Nature*, 288, 724-727.
- Fukushima, S. (1999) Low-dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline: relevance to risk assessment, *Cancer Lett.*, 143, 157-159.
- Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nomi, T. Ohta, S. Venitt and E. Zeiger (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays, *Mutat. Res.*, 312, 217-233.
- Hakura, A., K. Morimoto, T. Sofuni and T. Nohmi (1991) Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium* *ada* gene, which encodes *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, *J. Bacteriol.*, 173, 3663-3672.
- Kaina, B., C. Fritz and T. Coquerelle (1993) Contribution of *O*<sup>6</sup>-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: New insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines, *Environ. Mol. Mutagen.*, 22, 283-292.
- Kim, S.-R., K. Matsui, M. Yamada, T. Kohno, H. Kasai, J. Yokota and T. Nohmi (2004) Suppression of chemically induced and spontaneously occurring oxidative mutagenesis by three alleles of human *OGG1* gene encoding 8-hydroxyguanine DNA glycosylase, *Mutat. Res.*, 554, 365-374.
- Kirsch-Volders, M., M. Aardema and A. Elhajouji (2000) Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis, *Mutat. Res.*, 464, 3-11.
- Kondo, S., H. Ryo, K. Fujikawa and A. Fukunaga (1984) The threshold effect in mutagenesis by radiation and chemicals in relation to DNA repair and cell replacement, In: Y. Tazuma, S. Kondo and Y. Kuroda (Eds), *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis*, The Environmental Mutagen Society of Japan, Shizuoka, pp. 125-131.
- 黒田行昭 (1984) 環境化学物質の遺伝的影響の投与量-効果関係、とくに閾値の問題に関する国際シンポジウム、トキシコロジーフォーラム, 7, 655-659.
- McCann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori and B.N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 979-983.
- Maron, D.M. and B.N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-215.
- Masumura, K., M. Horiguchi, A. Nishikawa, T. Umemura, K. Kanki, Y. Kanke and T. Nohmi (2003) Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in *gpt* delta transgenic mice, *Mutat. Res.*, 541, 91-102.
- Sofuni, T., M. Hayashi, T. Nohmi, A. Matsuoka, M. Yamada and E. Kamata (2000) Semi-quantitative evaluation of genotoxic activity of chemical substances and evidence for a biological threshold of genotoxic activity, *Mutat. Res.*, 464, 97-104.
- Suzuki, M., K. Matsui, M. Yamada, H. Kasai, T. Sofuni and T. Nohmi (1997) Construction of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in 8-hydroxyguanine DNA glycosylase and their sensitivities to oxidative mutagens and nitro compounds, *Mutat. Res.*, 393, 233-246.

- Tazima, Y., S. Kondo and Y. Kuroda (1984) Problems of threshold in chemical mutagenesis: Proceedings of the symposium on dose-response relationship for genetic effects of environmental chemicals, Keidanren Kaikan, Tokyo, May 7-9, 1984, The Environmental Mutagen Society of Japan, Shizuoka.
- 田島弥太郎(1980)環境変異原研究当面の課題, 環境変異原研究, 2, 2-9.
- 田島弥太郎(1982)化学変異原における閾値の問題, 環境変異原研究, 4, 32-36.
- Yamada, M., B. Sedgwick, T. Sofuni and T. Nohmi (1995) Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of  $O^6$ -methylguanine, J. Bacteriol., 177, 1511-1519.
- Yamada, M., K. Matsui, T. Sofuni and T. Nohmi (1997) New tester strains of *Salmonella typhimurium* lacking  $O^6$ -methylguanine DNA methyltransferases and highly sensitive to mutagenic alkylating agents, Mutat. Res., 381, 15-24.
- 山田雅巳 (1999) 遺伝子工学的手法を用いたアルキル化剤高感受性サルモネラ試験菌株の作製とその応用, 環境変異原研究, 21, 123-130.