哺乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異の検出と抑制に関する研究

黒田 行昭 (国立遺伝学研究所)

1. 培養細胞を用いた遺伝子突然変異検出系の確立

高等動物の体内で起こっている変化を知るために、組織や細胞を体外に取出し、人為的環境条件の下で培養しようとする試みは、前世紀からの科学者の夢であった。1950 年までの体外培養の研究は、血球やリンパ球など単細胞以外では、組織片を中心とした培養が行われ、組織や臓器から細胞を遊離して、個々の細胞を独立した生物として扱う細胞培養が行われるようになったのは、1950 年代に入ってから合成培養液の開発と細胞株の樹立が行われたことによる。安定な細胞株を合成培養液で培養することによって、極めて再現性と定量性にすぐれた実験系が確立された。

1960 年代になって、アメリカでは Puck が HeLa 細胞を用いて放射線の影響をしらべていたが、わが国では、いち早く阪大の黒田を中心としたグループがこの手法を取入れて、化学物質マイトマイシンの細胞増殖や DNA, RNA, タンパク合成などに対する影響評価を定量化した(1)。1970 年代になって、環境化学物質のヒトへの影響が問題とされるようになり、三島市内の産院の協力を得て、妊娠中絶したヒト胎児の肺由来の正常二倍体細胞を用いて、8AG 抵抗性 (HGPRT 欠損) を指標とした遺伝子突然変異の検出系を確立するとともに、食品添加物として使用されていた AF2 や赤色 104 号のヒト細胞に対する突然変異誘発性を検出することに成功した(2,3)。さらに、チャイニーズ・ハムスターの V29 細胞を用いて、遺伝的マーカーの選択や播種細胞数、前培養時間、変異原物質処理時間、突然変異発現時間、再播種法の採用などの詳細な検討を行い、培養細胞を用いた遺伝子突然変異検出系を用いた変異原検出系の一般的利用への途を開いた。

一般に放射線の生体に対する影響は、その線量率と照射時間の積に比例するが、同一線量の放射線でも、線量率が高いほど効果が大きい(線量率効果)。哺乳類の培養細胞に対する化学物質の作用においても、その濃度と処理時間に関して、作用量が同じでも濃度が高いほど効果が大きいことを見出し、これは細胞の突然変異修復作用が関与し、化学物質のある濃度以下では無作用量が存在することを明らかにした(4,5)。

2. 培養細胞を用いた非変異原性発がん物質の検出

Ames の系など微生物の系では、短時間に効率よく化学物質の変異原性を検出することができるが、1980 年代中頃に微生物の系では変異原性が検出できない発がん物質が数多く見出されてきた。このような問題に対処するために、IPCS/WHO では非変異原性発がん物質の短期検索法に関する国際協力研究が行われ、主として哺乳類細胞を使用している世界各国の 100 名余の第一線の研究者が参加して、Ames 陰性の発がん物質を含む共通の 10 種類の化学物質について培養細胞の染色体異常、遺伝子突然変異、不定期 DNA 合成、トランスフォーメーション、DNA 単鎖切断、SCE、小核テスト、代謝共同などを指標に変位原性が調べられ、黒田はこの協力事業に参加して V79 細胞の遺伝子突然変異検出系を使用して、ベンゼン、サフロール、トルイジン、ジエチルスチベステロールなどについて、いずれも変異原性を検出した(6)。このほか、アニリン、クロロアニリン、ニト

ロベンゼンなど多くの発がん性芳香族化合物についても、微生物の系では検出されない変異原性が培養細胞の遺伝子突然変異検出系で検出された。

3. 培養細胞を用いた変異原物質の複合効果

われわれの人間環境では、単一の変異原が単独で作用することはない。2種以上の多くの変異原が同時に存在するとき、変異原物質の間に相乗・抑制などの相互作用が働く。このような2種以上の変異原物質の複合効果を調べるのに、培養時間を的確に設定できる培養細胞の系は適している。EMS と MMS のような作用点の類似したアルキル化剤どうしや、変異原性のある EMS と変異原性のない Ara C との組合わせで、その複合効果がどのように現れるかを調べた。EMS と MMS のように作用点が類似していると考えられる物質どうしても、両物質は競合抑制することなく、むしろ増強作用のあることや(7)、単独では変異原性のない Ara C でも EMS と同時に作用させると、EMS の変異原性を高める作用のあることが分った(8)。

4. 培養細胞を用いた変異原抑制物質の研究

1985 年、遺伝研の同僚であった賀田恒夫博士が、微生物の系を用いて、野菜や果物のジュースが、変異原を抑制することを発見した。環境中にはこのほか突然変異や発がんを抑制する物質が数多く存在する。チャイニーズ・ハムスターの V79 細胞を用いて変異原と抗変異原の処理時間を変えたり、両物質をあらかじめ混合したもので細胞を処理することによって、抗変異原の作用機序を調べることができる。ビタミンCおよびその誘導体について、EMS に対する抗変異原性を調べると、ビタミンCとEMSとを同時処理したり、あらかじめ混合したもので処理すると、最も強く変異原性を抑制することが分り、ビタミンCはEMSに直接作用する消変異原 (desmutagen) であることを明らかにした(9)。また、緑茶の成分カテキンである ECG や EGCG が 4NQO による遺伝子突然変異を抑制するが、この場合は、これらのカテキンを 4NQO 処理後に作用させた場合にのみ効果があり、4NQO による DNA 損傷の修復に作用することが分かった(10)。

文 献

- (1) Kuroda, Y. and J. Furuyama: *Cancer Res.*, 23: 682-687 (1963).
- (2) Kuroda, Y.: *Mutation Res.*, 30: 229-238 (1975).
- (3) Kuroda, Y.: *Mutation Res.*, 30: 239-248 (1975).
- (4) Sugiura, K., M. Goto and Y. Kuroda: *Mutation Res.*, 51: 99-108 (1978).
- (5) Kuroda, Y.: *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis* (eds. Tajima, Y. et al.), *Environ. Mutagen Soc. Japan*, pp. 99-108 (1984).
- (5) Kuroda, Y., A. Yokoiyama and T. Kada: *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogenesis* (eds. Ashby, J. et al.), *Elsevier Sci. Publ.*, pp. 537-542 (1985).
- (7) Kojima, K., H. Konishi and Y. Kuroda: *Mutation Res.*, 266: 171-180 (1992).
- (8) Tachi-Shinkawa, K., K. Kuroda, K. Morimoto and K. Koizumi: *Mutation Res.*, 191: 34-40 (1987).
- (9) Kuroda, Y.: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II* (eds. Kuroda, Y. et al.), pp. 233-256 (1990).
- (10) kuroda, Y.: *Mutation Res.*, 361: 179-186 (1996).