

本稿は1997年12月3-5日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第26回大会で発表された1997年度学術賞受賞講演である(座長:祖父尼俊雄)。

染色体異常を指標としたがん原性物質検出法の開発と評価

石館 基

オリンパス光学工業株式会社 染色体研究センター (CRC) 〒192-8512 東京都八王子市久保山町2-3

Development of the *in vitro* Chromosomal Aberration Test System for screening environmental carcinogens —Quantitative evaluation of the results—

Motoi Ishidate, Jr.

Chromosome Research Center (CRC), Olympus Optical Co., Ltd.,
2-3 Kuboyama-cho, Hachioji, Tokyo 192-8512

Summary

The Chromosomal Aberration Test using cultured mammalian cells, was proposed as an alternative screening tool to bacterial mutation assays (Ames test), for the detection of environmental mutagens and/or carcinogens. The Micronucleus Test in mice was also proposed as an additional *in vivo* test for evaluating the genotoxic potential of those chemicals which were positive in the *in vitro* systems.

Mutagenic potency in the Ames test was estimated from the number of revertant colonies induced per unit dose (mg/plate) and in the Chromosomal Aberration Test was calculated from the minimum dose (mg/ml) inducing at least 20% aberrant cells (D_{20} value). It was found from these assays that there were some 10^6 fold differences in their mutagenic/clastogenic potencies and that only potent chemicals may give positive responses in the *in vivo* Micronucleus Test. It was also found that, in the Chromosome Aberration Test, the incidence of exchange-type rather than break-type aberrations is more important in predicting the carcinogenic risk of exposure to clastogens.

In this review, the significance of a battery system comprising at least three different mutagenicity tests is discussed together with the importance of quantitative rather than qualitative evaluation in the genotoxicity of chemicals. In addition, recent analytical studies on the mechanisms of induced chromosomal aberrations in cultured cells, using the Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) technique and Laser Scan Cytometry (LSC) are presented.

(This paper, chaired by Toshio Sofuni, is the lecture of The JEMS Award (1997) presented at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

Keywords : chromosomal aberration, a battery system for mutagenicity testing, D_{20} value, TR value, FISH, LSC

1. はじめに

今回、本学会の名誉ある学術賞を受けるにあたり、著

者が本学会にどの程度の貢献をしてきたのか、改めて反省させられた。一昨年の本学会第25周年に、清水英佑会長が過去25年間に発表された会員の演題のリストを作成されたので、その中から、著者の関連した演題を拾ってみたが、合計約100題であった。これらのほかに、癌学会や組織培養学会その他の国内外での発表を加えな

受付：1998年3月9日

受理：1998年3月29日

©日本環境変異原学会

Table 1 Screening tests on paired compounds, carcinogenic and non-carcinogenic or chemically related substances.

Pairs of compounds [CAS No.]	Ames test	Chromosome test <i>in vitro</i>
4-Nitroquinoline-1-oxide [56-57-5]	+	+
4-Aminoquinoline-1-oxide [2508-86-3]	+	+
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine [70-25-7]	+	+
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitrosoguanidine [4245-76-5]	-	+
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourethane [615-53-2]	+	+
<i>N</i> -Methylurethane [105-40-8]	-	-
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea (MNU) [684-93-5]	+	+
<i>N</i> -Methylurea [598-50-5]	-	-
Dimethylnitrosamine (DMN) [62-75-9]	+(S9)	+(S9)
Dimethylamine [124-40-3]	-	-
Butylbutanolnitrosamine (BBN) [3817-11-6]	+(S9)	+(S9)
Butylbutanolamine [4543-95-7]	-	-
Benzo(a)pyrene (B(a)P) [50-32-8]	+(S9)	+(S9)
Pyrene [129-00-0]	-	-
Furylfuramide (AF-2) [3688-53-7]	+	+
Nirotfurantoin (Furadantin) [67-20-9]	+	+
Maleic anhydride (2,5-Furandione) [108-31-6]	-	+
Succinic anhydride [108-30-5]	-	-
7,12-Dimethylbenz(a)anthracene [57-97-6]	+(S9)	+(S9)
Anthracene [120-12-7]	+(S9)	+(S9)
Phenacetin [62-44-2]	+(S9)	+(S9)
Acetaminophen (Paracetamol) [103-90-2]	-	+
Thiourea (Thiocarbamide) [62-56-6]	-	-
Urea (Carbamide) [57-13-6]	-	+
4-Dimethylamino-3'-methylazobenzene	+(S9)	+(S9)
4-Dimethylamino-2-methylazobenzene	+(S9)	+(S9)
Styrene oxide (Epoxyethylbenzene) [96-09-3]	+	+
Styrene (Vinylbenzene) [100-42-5]	+(S9)	+(S9)
Tris-dibromopropylphosphate [126-72-7]	+(S9)	+
Tris-dichloropropylphosphate [78-43-3]	+(S9)	+(S9)
Progesterone [57-83-0]	-	-
17-Ethinylestradiol [57-63-6]	-	-

ればならないが、いずれにせよ、これらの研究は、著者の実績というよりも、著者の属する研究室の協力者の実績であり、また、研究室以外の諸先輩の援助によって初めて得られたものであることを痛感している。

著者が、財団法人癌研究所から前国立衛生試験所に入所したのは、昭和47年(1972)であった。当初は病理部の室長の一人として、故小田島成和部長の許で、種々のアルキルニトロソ尿素によってラットに誘発された白血病細胞の染色体分析などを手掛けていた。ちょうどその頃、米国のAmesらによって開発されたサルモネラ復帰突然変異試験(Ames試験)が注目を浴びていた。食品添加物の一つとして使用されてきたAF-2に強い変異原性が認められ、その後、国立衛試の実験(故池田良雄部長ら)によって、発がん性の実証され、その使用が禁止さ

れるという事件が起こったのもこの頃である。発がん性を実証するためには、莫大な経費と試験期間を要する。厚生省では、食品化学課が中心となり、生活環境中の発がん性物質を早期に予測し得るような短期スクリーニング法の開発の重要性を考慮し、国内における研究班を組織した。行政的需要から昭和53年(1978)には国立衛試(現在の国立衛研)に変異原性部(現在の変異遺伝部)が新設されることになった。

2. 発がん性物質の短期スクリーニング

厚生省の研究班は大きく2つのグループに分かれた。第1は、微生物あるいは哺乳類培養細胞を用いる試験法によって年間約25種類の化学物質を検索するグループ(河内卓班)であり、主に細胞学あるいは遺伝学分野の

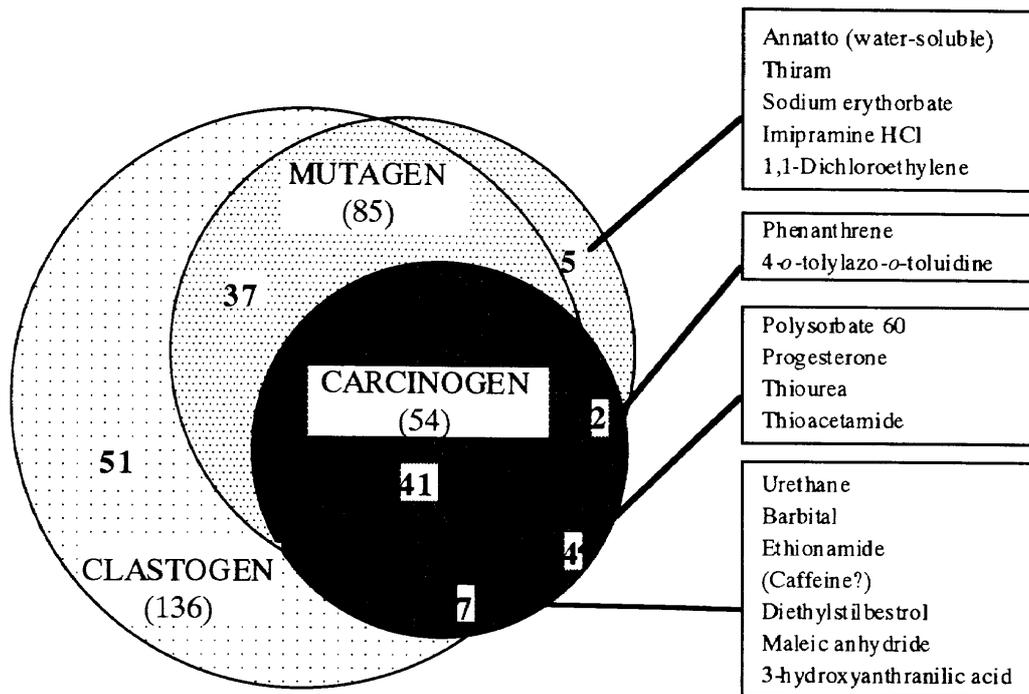


Fig. 1 Correlation among clastogens (positive in CHL cells), mutagens (positive in the Ames test) and carcinogens. The chemicals outside of the carcinogen-circle, have not been tested for their carcinogenic potential (Ishidate, M., Jr., et al., 1981).

研究者が担当した。第2のグループは、第1のグループで陽性となった化合物について、実際に動物を用いて発がん性試験を実施するグループ(小田島成和班)であり、主に実験病理学者が担当した。本研究班は、その後も約10年以上継続したが、このように全国的な協力体制のもとに同じ目標に取り組んだ例は他にはなく、諸外国でも注目されることとなった(Kawachi et al., 1980)。

1980年頃からスタートした米国の毒性計画(NTP)もその刺激を受けた結果とも考えられる。厚生省の研究班と平行して、科学技術庁でも短期スクリーニング法の開発グループ(故賀田恒夫班)が発足しているが、この機会に、わが国におけるがんの研究者と遺伝学者との今までにない協力体制が確立したといっても過言ではあるまい。

3. 既知発がん性物質と変異原性との比較

上記の研究班では、まず、既知発がん性物質とそれらに構造が似ているが、発がん性のない物質との比較がなされた。その結果、両者の間にはかなり良い相関が得られた(Table 1)。既知発がん物質54種類とAmes試験で陽性となった化合物85種類、さらに染色体異常試験(CHL/IU細胞)で陽性となった化合物136種類とを定性的に比較してみた結果をFig. 1に示す。発がん性物質の輪は上記2試験の大きな輪の中に重なってくる。すなわち、発がん性物質の大部分は、どちらか一方の試験で陽性となり、しかも、両者で同時に陽性となる場合の多

いことがわかった。ただし、ある発がん性物質は、上記の2つの輪からはずれてくる。その数は少ないが、この中にはTween 60, progesterone, thioureaあるいはthioacetamideなどが含まれている。Phenanthreneや4-o-tolylazo-o-toluidineなどは、Ames試験でかかっても、染色体試験ではかかりにくいが、逆に、urethan, barbital, ethionamideあるいはethylstilbestrol(DES)などは、前者ではかかりにくく、後者では陽性となる(Ishidate et al., 1977)。

後に、試験結果を定量的に評価する必要性を論じるが、上記の研究班で得られたAmes試験の活性値(mg当たりの復帰コロニー数)と、染色体の異常誘発性の強さ(D₂₀値)とを比較した場合をFig. 2に示す。これによると、指標の異なる試験法でも、活性の強弱はかなり平行する可能性があることがわかる。

4. 染色体異常試験に関する国際協力

1983年から1988年にかけて発がん性物質の短期スクリーニング法の評価に関する国際協力事業であるWHOの企画によるIPCS(国際化学物質安全性計画)事業に参加した。英国のDr. J. Ashby, 米国のDr. F. J. de SerresやDr. M. Shelbyらが中心となって行われた。ここでは、Ames試験では検出されないか、あるいは、検出しにくい化合物8種類(Table 2)について、種々の指標をもつ変異原性試験が実施された。著者は、CHL/IUを用いる染色体異常試験を分担した。結果は単行本

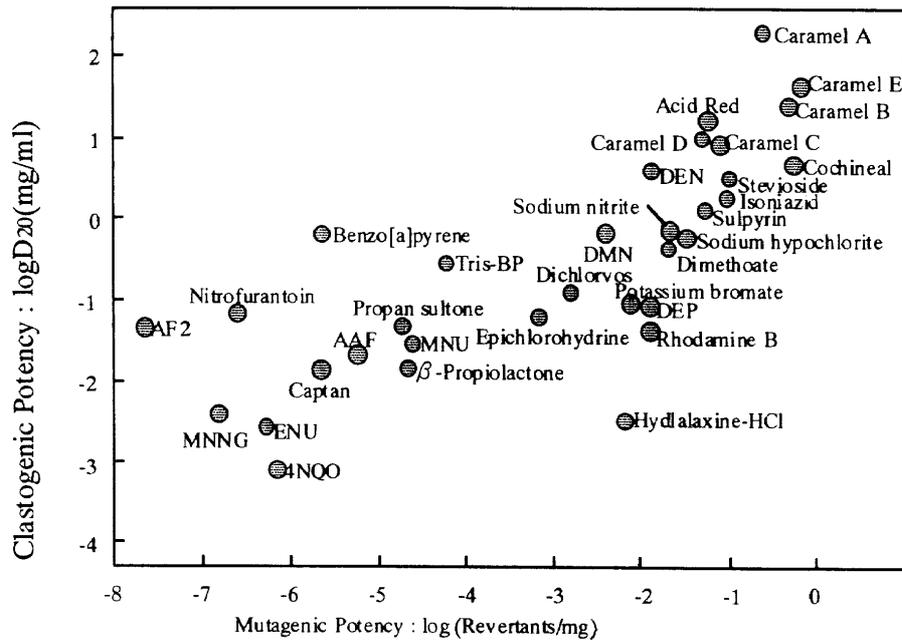


Fig. 2 Quantitative comparison of the clastogenic and mutagenic potential of chemicals tested in the chromosomal aberration test in CHL/IU cells and in the Ames test, respectively.

Table 2 Eight carcinogens which were tested in the CSSTT/IPCS/WHO collaborative study.

Carcinogens tested	AT [±]	CA [±]	MN [±]
1) Hexamethylphosphoramide (HMPA)	-	+	+
2) <i>o</i> -Toluidine	+	+	-
3) Benzene	-	+	+
4) Safrole	+	+	-
5) Acrylonitrile	+	+	-
6) Diethylhexylphthalate (DEHP)	-	-	-
7) Diethylstilbestrol (DES)	-	+	+
8) Phenobarbital	+	+	+

AT[±]: Ames test, CA[±]: Chromosome test *in vitro*, MN[±]: Micronucleus test *in vitro*.

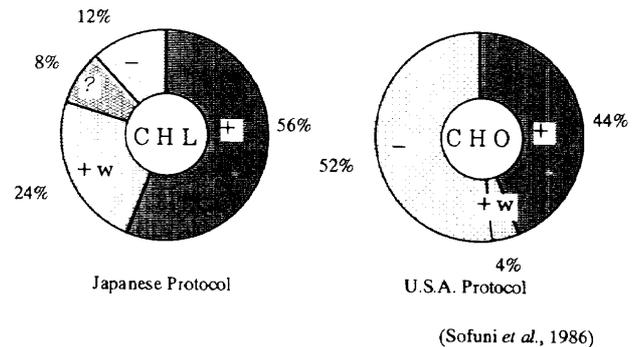


Fig. 3 Comparison of the results in the chromosomal aberration tests carried out with CHO cells (in the NTP protocol) and CHL cells (in the Japanese protocol).

(グリーンブック)にまとめられている (Ashby et al., 1985). 全体を通して、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が Ames 試験を補足し得る試験法として、最も良い成績を示した。

上記の国際協力事業は、さらに日米間における協力研究に発展した。米国では、1980 年以來、NTP(毒性計画)事業を開始しているが、そこでは、年間いくつかの選ばれた化学物質について、変異原性試験および齧歯類による発がん性試験が実施されている。著者らは、特に、培養細胞を用いる染色体異常試験の結果に注目したが、同じ化合物でも、NTP とわが国での結果との間にかなりの隔たりのあることに気づいた。そこで、米国から同じロットの化合物 25 種類を取り寄せ、日本のガイドライン

に沿って試験を実施した。NTP では、チャイニーズ・ハムスター由来の CHO 系細胞を用い、わが国では、CHL/IU 細胞が用いられている。細胞も違うが、試験法プロトコールも違う。細胞とプロトコールを入れ換えて実験を繰り返したところ、わが国のプロトコールで陽性率がかなり向上し、その原因は、細胞の違いというよりも、試験条件の違いによるものであることがわかった (Fig. 3) (Sofuni et al., 1986)。近年、OECD あるいは ICH などによって、毒性試験法ガイドラインの見直しが行われ、プロトコールに関する国際間での調和が叫ばれるようになったのも、上記のような共同研究の一つの産物であるといってもよいかも知れない。

Table 3 Chromosomal aberration test *in vitro* combined with S9mix.

Carcinogenic compounds	Cell suspension method ^{a)}		Monolayer method ^{b)}	
	Dose(mg/ml)%	Aberrants	Dose(mg/ml)%	Aberrants
Benzo(a)pyrene (B(a)P)	0.5	22.0	0.04	47.6
3-Methylcholanthrene (3 MC)	2.0	3.0	0.08	12.3
Dimethylnitrosamine (DMN)	4.0	77.3	1.0	73.3
7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)	0.5	25.0	0.1	60.6
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'Me-DAB)	8.0	10.0	0.05	25.6
Phenacetin	3.2	51.0	0.8	23.3

a) Cultures were treated for 3 hours with rat S9 mix in a cell suspension, shaking gently.

b) Cultures were treated for 6 hours with rat S9 mix directly on the monolayer.

5. 染色体試験実験条件の吟味

1) 最高濃度の設定

In vitro の試験は、生体と異なり、いくらでも濃度を上げることができる。しかし、著者らは、培養液中の浸透圧の影響を考慮し、被験物質が水溶性の場合は、最高 10 mM までとし、不溶の場合でも、細胞毒性が現れない場合には、5 mg/ml を限度とするべきことを提唱した。砂糖や塩でも 100 mM も作用させると染色体異常（主に切断型の構造異常）を誘発するが、細胞にとってこのような非生理的な条件で試験を行うこと自体に問題がある（Fig. 4）。このことは、国際的にも受け入れられるようになった（Scott et al., 1990）。

2) 代謝活性化法の吟味

培養株細胞には多少の薬物活性化能力を維持しているものもあるが、CHL/IU あるいは CHO 細胞では、Ames 試験の場合と同様、ラット S9 の添加が必要である（Natarajan et al., 1976; Matsuoka et al., 1979）。著者らは、Natarajan の手法を改良し、細胞を単層培養のまま、約 5% の S9 mix を 6 時間作用させる方法を提唱した。この方法によると、代謝活性化を要する既知発がん性物質の多くは、より低濃度で、より高い効果を示すことがわかった（Table 3）（松岡ら, 1982）。

3) 染色体異常の判定

染色体異常は、構造的異常と数的異常に大別される。化学物質は多くの場合、DNA 合成の前の時期に作用して、染色体型の異常を誘発する。本学会の MMS 分科会では、染色体異常の基準となるアトラスを編集し、異常の種類とその発生機構について解説を加えた（MMS 分科会編, 1985）。特に、ギャップの定義については、必ずしも、国際的な基準に沿っていないため、近年の国際的調和の要望に従い、将来訂正せざるを得ないと思われる。

試験結果の陽性の判定については、10%法（石館法）（石館ら, 1987）を提唱した。背景データを基に、10%以上の異常細胞が出現した場合を陽性とし、5%以下を陰性、その間を疑陽性とした。観察細胞数が 100~200 個であり、培養条件によって対照値が左右される可能性もあ

るため、統計学的な有意差によって判定を下すよりも、経験を積んだ観察者による生物学的判定による方が正しい場合もあろう。また、生物現象には、つねに、疑陽性が存在する。これを無理に陰性、あるいは陽性と決めつけることにも問題があるように思える。

6. 変異原性試験結果の定量的評価

米国では、変異原性のデータを定性的にのみ評価し定量的に取り扱うことに抵抗があるようである。その理由は、試験法の違いや担当者によって、かなりデータがばらつくためであるという。しかしながら、わが国では、Ames 試験など、学会の分科会を通して試験条件の精度管理が行われており、同じ手法で、同じ土俵の上でデータを比較し得る体制にある。したがって実際に、労働省の調査会では、試験結果についての定量的な評価を行っている。

著者らは、染色体異常試験の結果を定量的に評価するため、 D_{20} 値および TR 値という概念を提唱した。すなわち、前者は、中期分裂像の 20% に何らかの異常を誘発するに要する濃度 (mg/ml) であり、後者は、特に交換型の異常の相対的な出現頻度を示す。発がん性のある 4-NQO の D_{20} 値は 0.0003 であり、TR 値は 30,000 であるが、活性の弱い Isoniatid では、 D_{20} 値が 2.1 で、TR 値はわずかの 4.3 である。これらをともに陽性であると一括して評価すべきではないように思われる（石館ら, 1987）。

これまでに試験を行い、陽性となった化合物約 150 種類について、 D_{20} 値の分布を Fig. 5 に示す。グラフ上の線は、 D_{20} 値にある化合物の中で発がん性物質がどの位含まれているかを示しており、 D_{20} 値の低い、すなわち、活性の高いグループに属するものの中には、発がん性が疑われるものがより多く含まれていることを示唆している。一方、同じように、TR 値の分布をみると、この値が高いグループに発がん性物質がより多く含まれている傾向にある（Fig. 6）。

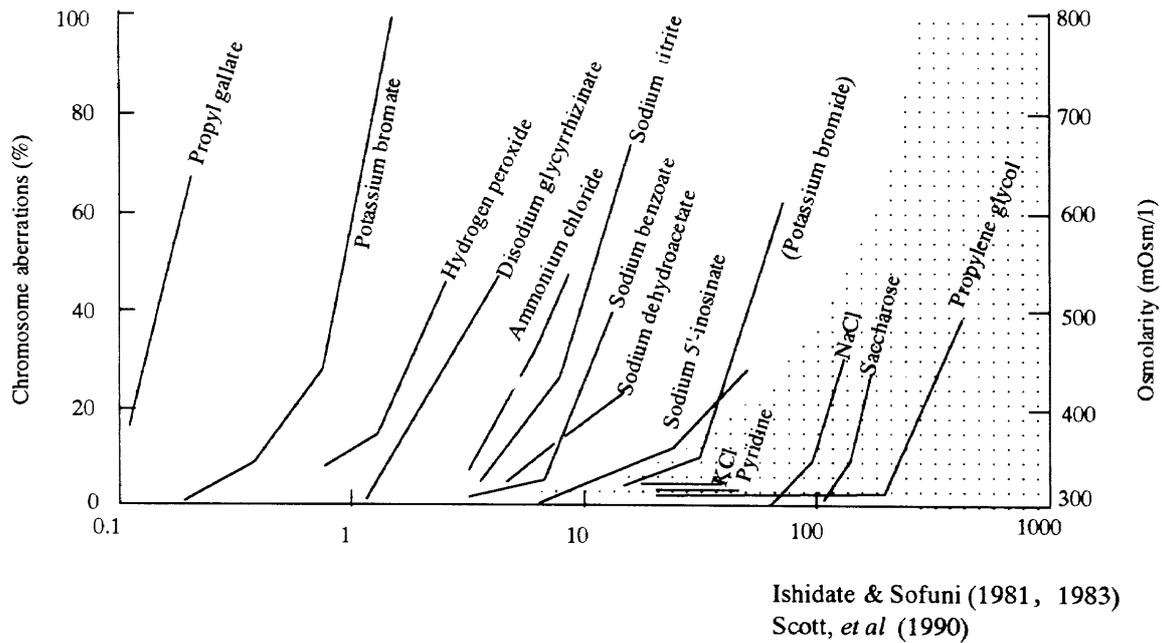


Fig. 4 False positive results in the chromosomal aberration tests in the culture medium with a high osmolarity.

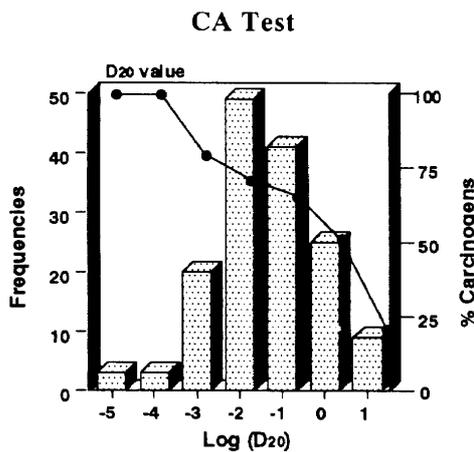


Fig. 5 Distribution of D_{20} values of the clastogens positive in the CHL test. The line indicates the percent incidence of carcinogens in each range of the D_{20} values.

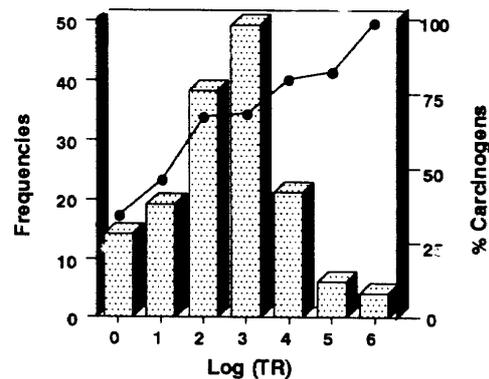


Fig. 6 Distribution of TR values of the clastogens positive in the CHL test. The line indicates the percent incidence of carcinogens in each range of the TR values.

7. 染色体異常の生成機構

化合物の種類によって、染色体の切断を多く誘発するもの、交換型を多く誘発するもの、および、これらの構造異常を誘発しないが、倍数体などの数的異常を多く誘発するものがある。もちろん、これらのものが同時に出現してくる場合もある。たとえば、食品加熱変異原として知られている Me-AαC の 0.06 mg/ml を CHL/IU 細胞に 48 時間連続的に処理すると、50%以上の倍数体が出現する。しかし、ラット S9 mix を併用し、短時間処理すると、0.125 以上の濃度で、構造異常が出現してくる。代謝産物の作用機序が全く異なることを示す良い例である。

染色体の構造異常の生成機構の詳細については、なお不明な点があるが、著者らは、最初の分裂期に切断あるいは交換型を生ずる場合とがあるが、第2回目の分裂で、交換型が起こり、さらに、異常を伴った倍数体が形成され、生き延びた細胞が、変異細胞として、新しい細胞集団を形成してくるという仮説を立てている (Fig. 7)。現在、この問題について、FISH (Fluorecence *In Situ* Hybridization) を用いる染色体ペイント法による解析を試みている (佐藤ら, 1996)。

細胞に紫外線を照射すると、典型的な交換型異常が多発する。化学物質や X 線の場合とはかなり様相が異なっているが、染色体の融合あるいは相互転位の解析に良い

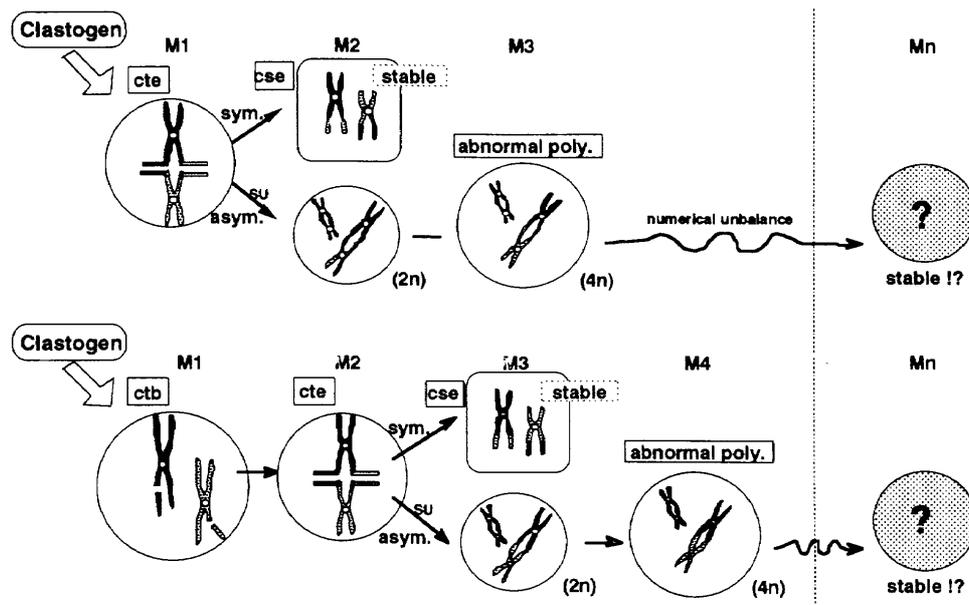


Fig. 7 A possible scheme to induce stable or unstable type of structural aberrations induced by clastogens in cultured cells.

材料と思われる。

数的異常については、異数体が種々の遺伝病に関係している事実から、今後も重要な課題と思われる。しかし、発がん性との関連性についてはいまだに不明であるため、現行の試験法ガイドラインではその評価を避けている感もある。おそらく、将来、異数性を目的とする別の試験法が作成されると思われる。ただし、著者らは、発がん性の知られる合成女性ホルモン剤 diethylstilbestrol (DES) が 0.01 mg/ml の低濃度で、85% の細胞に倍数性を誘発する性質があることを見出した (Sawada et al., 1978)。

8. マウス小核試験の導入

従来、変異原性試験のうち、生体内における影響を評価するためには、主に、ラットの骨髄を用いる染色体異常試験が起用されてきた。Schmid らは、これらの代りに、骨髄中の小核を持つ幼若赤血球 (PCE) の出現率を求める小核試験を提唱した (Schmid et al., 1975)。また一方、スイスでは、環境変異原に対して高い感受性を示す MS/Ae マウス (CD-1 系由来) が開発されていた。著者らは、早速このマウスを入手し、わが国における SPF 化をはかるとともに、小核試験の有用性について確証試験を実施した (林ら, 1984)。本試験は、前記した *in vitro* の試験系で、陽性となった場合、生体内でも同様な効果があるか否かを吟味するうえで、きわめて重要な試験である。小核は、血芽球の分化増殖中に生じた染色体の切断あるいは不分離によって PCE 中に形成される。結果が陰性の場合には、被験物質が骨髄に到達していることを実証する必要がある。諸外国では、肝臓その他の

臓器を用いる試験法(たとえば、不定期 DNA 合成試験など)を追加することを推奨している。あるいは、肝臓を用いる小核試験なども有効かも知れない。

本学会の分科会 MMS 研究会では、骨髄あるいは末梢血を用いる小核試験法のプロトコールについて精力的な共同研究を繰り広げてきた。これらの業績は国際的にも高く評価され、現行の試験法ガイドラインにも広く反映されている (Sutou et al., 1997)。

合計 119 種の化合物について小核試験を行った結果と、*in vitro* の染色体異常試験の結果とを比較すると、両者で陽性となるものが約 31%、両者でともに陰性となるものが約 20%、染色体異常試験だけが陽性となるものが約 44% であった。染色体異常試験で陰性であり、小核試験で陽性となるような化合物はほとんど見受けられないのは、小核の生成が染色体の異常に起因するためであろう。これらの結果を定量的に比較すると、染色体異常誘発性が強い場合、すなわち、 D_{20} 値が低いほど、本法で陽性となる傾向にある (Table 4)。生体内における臓器特異性あるいは代謝機構の多様性を考慮すれば、*in vitro* 系で陽性であっても、*in vivo* 系で陽性となるとは限らない。

9. 試験法のバッテリーによる結果の評価

被験物質に変異原性があるか否かは、まず、第一段階として、遺伝学的に指標を異にする 2 種以上の *in vitro* 系の試験を行う。ここで、いずれかの試験で陽性となったものは、“*in vitro* mutagens” と呼ばれる。“*in vitro* mutagens” は必ずしも “*in vivo* mutagens” とは限らないため、少なくとも 1 種類の生体内の試験を追加する。

Table 4 Specific clastogenic activity *in vitro* (D_{20} value) and the micronucleus test in mice.

Compounds tested [CAS No.]	Clastogenic activity		Micronucleus test in mice	
	D_{20} value (mg/ml)		The minimum effective dose (mg/kg, single, i. p.)	
Mitomycin C (MMC) [50-07-7]	0.00001		3	(+)
4-Nitroquinoline-1-oxide(4-NQO) [56-57-5]	0.0003		80	(+)
5-Fluorouracil (5-FU) [51-21-8]	0.0004		100	(+)
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (MNGG) [70-25-7]	0.003		50	(+)
Acetaldehyde [75-07-0]	0.03		190	(+)
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea [759-73-9]	0.06		50	(+)
Potassium bromate [7758-01-2]	0.07		100	(+)
Sodium nitrite [7632-00-0]	0.3		200	(-)
Fast Green FCF [2353-45-9]	2.0		2000	(-)
Potassium bromide [7758-02-3]	3.7		500	(-)
Propylene glycol [57-55-6]	20.0		15000	(-)

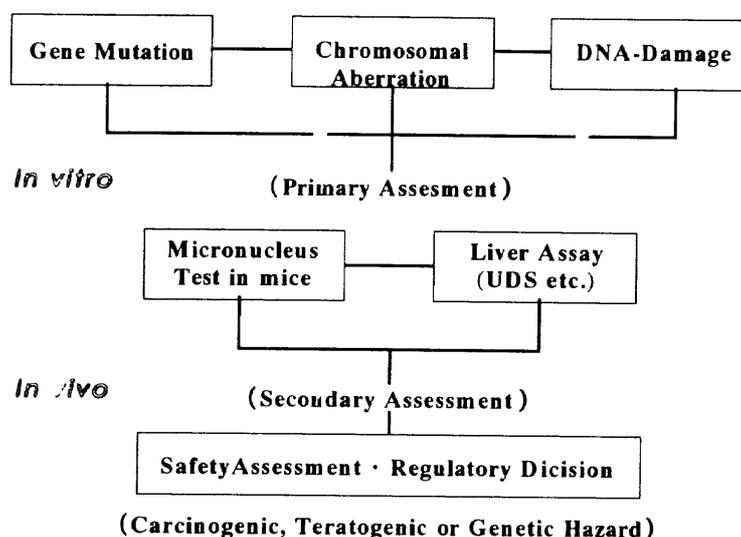


Fig. 8 A battery scheme for the evaluation of genotoxic potency of chemicals.

これらの試験は最少単位のバッテリーであるが、試験の数を増す方が、より確実な情報が得られる。もしも、これらのすべての試験で陰性に終わったものは、変異原性がなく、また、発がん性の疑いもきわめて低いといえよう。 *in vitro* 系で陽性となった場合には、その活性値を比較し、さらに *in vivo* 試験を追加する。 *in vivo* 系でも陽性となった場合には、発がん性および遺伝毒性を疑う必要がある。

しかしながら、変異原性試験はいずれもきわめて短期間に生ずる遺伝学的変化であるため、多くの要因が長期間にわたって関与する発がん性試験を代行するわけには行かないのは当然である。ヒトへの安全性を確認するためには、さらに、高次の動物試験が必要である (Fig. 8)。ただし、最近、発がん性の有無あるいはその機構を解析するうえで、変異原性試験のデータが改めて重要視されつつある。

10. 変異原性データ集の作成

現在、化学工業界で使用されている化学物質の総数は数万種に及び、毎年、新しく数千種類の物質が市場に登場するといわれる。既存物質の変異原性については、専門誌に報告されてはいるが、それを検索することは必ずしも容易ではない。そこで、著者らは、故賀田恒夫博士らと共同して、「環境変異原データ集」の作成を試みた (賀田・石館監修, 1981)。約 1000 種類の専門誌から、1708 種の化合物の変異原性情報を抽出した。パソコンの普及していない時代であり、約 2 年間に要したため、第 1 巻で終了せざるを得なかった。

同一のプロトコルを用い、構造の異なった化合物の活性を比較することはきわめて重要と思われる。著者らは、さらに、「染色体異常試験のデータ集」を編集し、781 種の物質に関する情報を公開した (石館監修, 1987)。また、305 種類の化合物に関する「微生物を用いる変異原性試験データ集」を出版した (石館監修, 1990)。特に、後

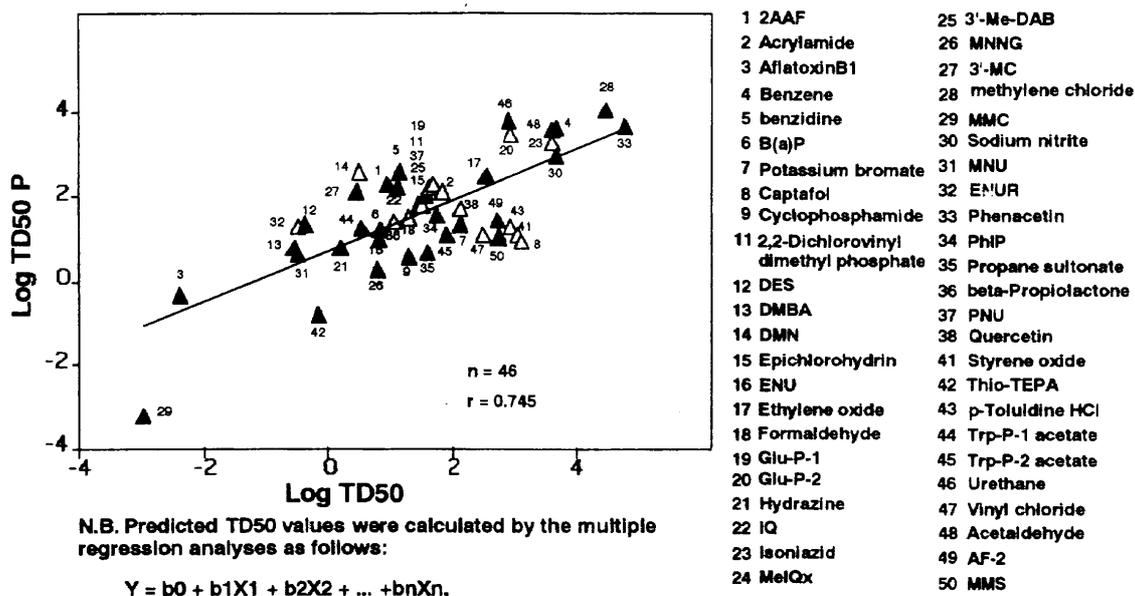


Fig. 9 A trial to predict carcinogenic potentials from the genotoxic data quantitatively evaluated in the battery system. TD₅₀ values were cited from the US/NTP data of animal bioassays. TD₅₀ P means the predictive TD₅₀ value calculated.

者のデータ集には、能美および渡辺らによって新しく開発された高感受性菌株 (YG 株) を用いたデータも記載されている。YG 株は、遺伝子操作によって、ニトロ還元酵素あるいはアセチルトランスフェラーゼ遺伝子が組み込まれているために、環境中に微量に存在するニトロアレン類あるいはヘテロサイクリックアミン類の検出にきわめて有用であり、国内外で広く利用されている (渡辺ら, 1987)。

11. 変異原活性による発がん性の予測

変異原性試験は、当初、発がん性物質の短期スクリーニング法としての役割を演じてきた。そのためには、発がん性の疑わしい物質を逃さず拾い上げることが肝要である。換言すれば、偽陽性は許されても偽陰性は許されない。しかしながら、ホルモン類やプロモータの範疇に入るものは変異原性試験では検出できない。現在、いわゆる“non-genotoxic carcinogens”とよばれる発がん性物質は現行の変異原性試験の対象とはなりにくい。最終的には遺伝物質の損傷によって細胞の変異につながる問題と思われるが、その機構の解明は今後の問題であろう。

一方、変異原性のあるものについて、その活性値から、発がん性を予測できないものであろうか。最近、著者らは、(財)日本化学品協会 (通産省の依頼による) の研究班に加わり、上記問題に取り組んでいる。まず、米国

NTP のデータから、適切な発がん性物質を選び、それらについて、複数の変異原性試験で得られた活性値の総和から発がん性の強さ (TD₅₀ 値) の予測値を算出した (Fig. 9)。これによると、実際の動物試験による TD₅₀ 値と予測値との間に予想以上の相関がみられた。今後、化合物の種類を増やし、TD₅₀ のみならず、用量の信頼限界を考慮した LED₁₀ との相関性もみたいと考えている。

12. その他の活動

上記の試験法およびその結果の定性的ならびに定量的評価に関する研究のほか、特記すべき研究業績を下記に示す。誌面の都合上、その詳細については割愛する。

- 1) ガス状物質の染色体異常試験法の開発 (環境庁関連)
- 2) 水道水中の有機化合物の変異原性 (厚生省関連)
- 3) 照射食品成分の変異原性 (厚生省関連)
- 4) 食品添加物の変異原性 (厚生省関連)
- 5) *In vitro* 小核試験法の開発 (労働省関連)
- 6) 細胞バンクの運営および細胞品質管理 (厚生省関連)
- 7) 本学会第 10 回大会 (東京) の開催
- 8) IARC/WHO, FAO/WHO, IPCS/WHO, OECD, および日米医学協力, ICPENC などの国際協力
- 9) 本学会誌「環境変異原研究」の編集

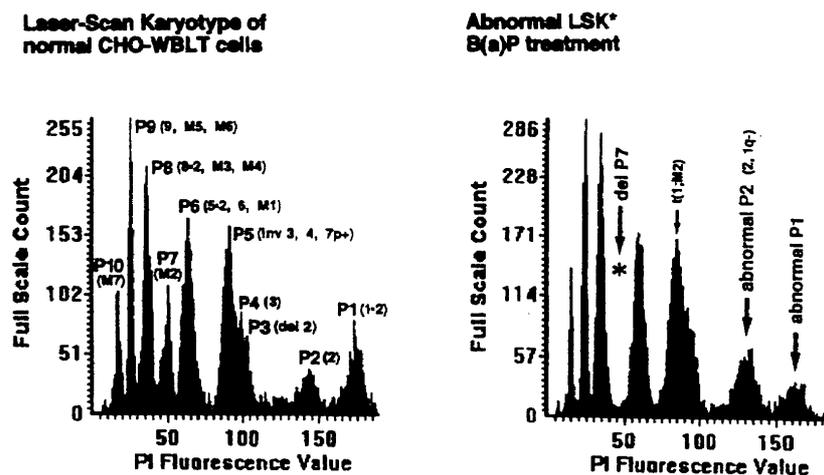


Fig. 10 Laser-Scan Karyotypes. Left : Normal pattern of karyotype of CHO cells. Right : Abnormal pattern detected in a CHO variant subclone isolated after treatment with benzo(a)pyrene. P : The Peak of DNA absorption ; Del P7 : A deletion of the Peak No. 7. It was confirmed by the Q-banding technique that the long arm of No. 2 (2q) was translocated to one of marker chromosomes, No. 15. A conversion between Peak No. 1 and No. 2 (the largest 2 chromosome) was also noted in this Laser-Scan Karyotype.

10) Mutation Res. 誌 Review の編集

13. 染色体異常解析技術の開発

近年、染色体の異常の検出には、従来の形態学的観察の検出に加え、種々の分子生物学的手法が取り入れられるようになった。著者らは、染色体の FISH 法あるいは、その応用である Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法を導入し、発がん性物質によって誘発される染色体あるいはゲノムの異常の解析を行っている。現在までのところ、化学物質の種類によって特異的な異常は見出されていないが、チャイニーズ・ハムスターの株化細胞 (CHO, CHL/IU, V 79 など) 間では、X 染色体の長腕部が共通して欠損していることを確認している。

また、Laser-Scanning Cytometry (LSC) を用い、細胞周期の解析あるいは Laser-Scan Karyotype (LSK 核型) による染色体異常の検出法を確立した (Fig. 10)。後者では、従来の Flow Cytometry と原理は同じであるが、いわゆる “Re-call System” の機能によって、顕微鏡下で、観察した個々の細胞を再度確認できるという利点がある (佐藤ら, 1997)。

14. おわりに

変異原性試験は、単に、発がん性の予測ばかりではなく、われわれの子孫に伝わる本来の遺伝毒性を予測し得るものでなければならない。今後、試験の結果を安易に評価することなく、その機構についてさらに解明して行く必要があろう。

本稿は、本学会の学術賞受賞講演の内容を紹介したものである。過去約 25 年間の研究業績の集約であるため、

個々の研究課題について詳細に触れることはできなかった。この点、共同研究者の方々にお詫びしなければならない。もし、著者に業績があったとすれば、それらは全て、研究協力者の賜物である。前職場の国立衛生試験所 (現在の国立医薬品食品衛生研究所) 変異遺伝部の方々、および、研究の指導と鞭撻を仰いだ国内外の研究者の方々に、この場を借りて心より感謝申し上げる。

参考文献

- Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B. H. Margolin, B. E. Matter and M. D. Shelby (1985) Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Report of the IPCS on Chemical Safety's Collaborative Study on *In Vitro* Assays, Progress in Mutat. Res., 5, Elsevier.
- 賀田恒夫・石館 基 (監修) (1981) 環境変異原データ集 (1), サイエントリスト社, 東京.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1982) High-sensitive in micronucleus induction of a mouse strain (MS), Mutat. Res., 105, 253-256.
- Ishidate, M. Jr. and S. Odashima (1977) Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* a screening for chemical carcinogens, Mutat. Res., 48, 337-354.
- Ishidate, M., Jr., M. C. Harnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, Mutat. Res., 195, 151-213.
- 石館 基 (監修) (1987) 染色体異常試験データ集, LIC, 東京.
- 石館 基 (監修) (1990) 微生物を用いる変異原性データ集, L. I. C., 東京.
- Kawachi, T., T. Yahagi, T. Kada, Y. Tajima, M. Ishidate, Jr., M. Sasaki and T. Sugiyama (1980) Cooperative programme on short-term assays for carcinogenicity in Japan.

- In: R. Montesano et al., (Eds), *Molecular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening Test*, Lyon, IARC Scientific Publications, No. 27, pp. 323-330.
- Matsuoka, A., M. Hayashi, and M. Ishidate, Jr. (1979) Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S 9 mix *in vitro*, *Mutat. Res.*, 66, 277-290.
- 松岡厚子, 祖父尼俊雄, 石館 基 (1982) 染色体異常試験における代謝活性化法について…振盪法と静置法の比較, 第11回日本環境変異原学会.
- Natarajan, A. T., A. D. Bates, P. P. W. van Buul, M. Meijers and N. Vogel (1976) Cytogenetic effects of mutagens/ carcinogens after activation in a microsomal system *in vitro*. I. Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchange by diethylnitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of Rat-liver microsomes. *Mutat. Res.*, 37, 83-90.
- 日本環境変異原学会・MMS 分科会編 (1988) 化学物質による染色体異常アトラス, 朝倉書店, 東京.
- 坂本宙子, 坂本 優, 佐藤卓朋, 石館 基 (1996) CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法を用いたチャイニーズ・ハムスター由来培養細胞株の分子細胞遺伝学的解析, 第25回日本環境変異原学会.
- 佐藤卓朋, 山本清高, 坂本宙子, 三浦邦彦, 石館 基 (1996) SCDS と Chromosome Painting の併用による安定型構造異常の解析, 第25回日本環境変異原学会.
- 佐藤卓朋, 山本清高, 佐々木功典, 石館 基 (1996) Laser-Scan Karyotypingによる染色体変異の解析, *Cytometry Res.*, 6, 5-8.
- Sawada, M., and M. Ishidate, Jr. (1978) Colchicine-like effect of diethylstilbestrol (DES) on mammalian cells *in vitro*, *Muta. Res.*, 57, 175-182.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Muta. Res.*, 31, 9-15.
- Scott, D., S. M. Galloway, R. R. Marshall, M. Ishidate, Jr., D. Brusick, J. Ashby and B. C. Myhr (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions, A Report from ICPEMC Task Group 9, *Muta. Res.*, 257, 147-205.
- 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 (CHO and CHL) systems in culture. *Mutat. Res.*, 241, 175-213.
- Sutou, S. (1996) Achievements by CSGMT/JEMS/MMS: the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test in the Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environment Mutagen Society of Japan, *Mutat. Res.*, 340, 151-174.
- 能美健彦 (1993) 環境変異原検出系・評価系の開発, 環境変異原研究, 15, 203-212.