

本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデルDNA損傷と変異機構」(企画:根岸和雄,早津彦哉)で発表された(座長:須藤鎮世)

## DNA付加体, 突然変異と発がん

長尾 美奈子<sup>1</sup>, 牛島 俊和<sup>2</sup>, 大河内 江里子<sup>2</sup>, 落合 雅子<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学応用生物科学部 〒156-0054 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1-1

<sup>2</sup>国立がんセンター研究所発がん研究部, <sup>3</sup>同 生化学部 〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

---

### Relationships between DNA adduct levels, mutant frequency and carcinogenicity

Minako Nagao<sup>1</sup>, Toshikazu Ushijima<sup>2</sup>, Eriko Okochi<sup>2</sup>  
and Masako Ochiai<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Nutrition and Health, Department of Biosciences, Tokyo University of Agriculture  
1-1-1, Sakuragaoka, Setagayaku, Tokyo, 156-0054

<sup>2</sup>Carcinogenesis Division and <sup>3</sup>Biochemistry Division,  
National Cancer Center Research Institute  
1-1, Tsukiji 5, Chuo-ku, Tokyo 104-0045

#### Summary

Relationships between DNA adduct levels, mutant frequency and carcinogenicity were studied using a food mutagen/carcinogen, MeIQ, to which humans are exposed on a daily basis. There was no direct correlation between adduct levels and mutant frequencies in various organs (heart, liver, colon, forestomach and bone marrow) of Big Blue mice (C57BL/6N) after administration of MeIQ for 12 weeks at a concentration of 300 ppm in diet. Further, we found no direct correlation between mutant frequency and carcinogenicity in various organs in the same animals (which are sensitive to colon carcinogenesis) after feeding of MeIQ for 92 weeks; mutant frequency was highest in the colon among the 5 organs examined, but cancer incidence was highest in the liver. In the colon, mutations occurring in the stem cells of crypts are considered to be amplified 200-300 fold, however, no such amplification is present in the liver. The kinetics of mutant cell-turnover seems to be different in different tissues. This may be an important factor for the absence of a direct correlation between mutant frequency and carcinogenicity.

(This paper, chaired by Shizuyo Sutou, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

**Keywords** : ヘテロサイクリックアミン, 遺伝子毒性発がん物, DNA-付加体, <sup>32</sup>P-ポストラベル法, MeIQ, *in vivo* 突然変異, AαC, IQ, MeIQx, 突然変異スペクトル, *Apc*, *p53*, PhIP

---

#### 緒 言

遺伝子毒性発がん物質 (genotoxic carcinogen) によ

る発がんの過程では, まず DNA 付加体が生成され, その一部は突然変異として固定される. その変異によりがん遺伝子等の活性化が起こり, また, がん抑制遺伝子等の不活性化が起こると, 細胞は腫瘍形成能を獲得する. したがって, 突然変異頻度は, DNA 付加体レベルより発がん標的臓器との相関が高い, すなわち突然変異頻度の高い臓器こそが発がん標的臓器であろうと誰しも容易に想

受付: 1998年9月17日  
受理: 1998年11月28日  
©日本環境変異原学会

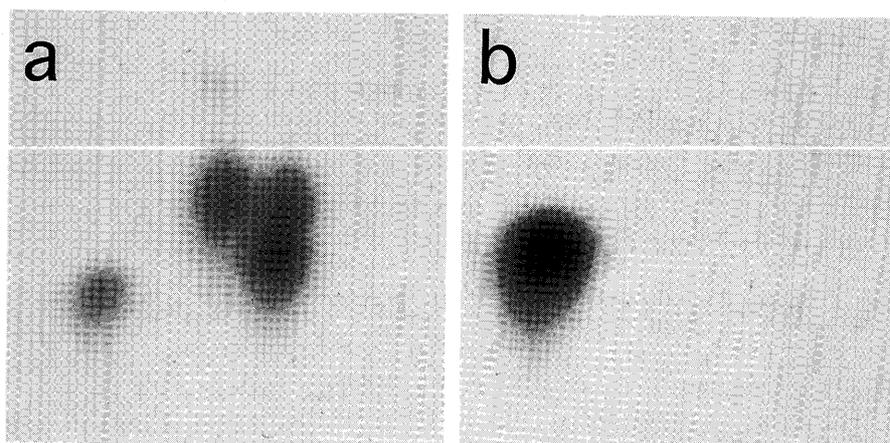


Fig. 1  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル-改良法(1)によるグアニン-MeIQ 付加体の検出  
 a: 従来用いられている intensification 法 b: Intensification 法で得られたものをさらに NP-1 と PDE-I で消化する改良法-I で得られたスポット

像するが、事実は異なる。

ヒトがほとんど毎日摂取しているヘテロサイクリックアミン(HCA)について、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の改良を行い、それを用いて各臓器における付加体レベルを解析し、*in vivo* 突然変異頻度との相関を検討した。DNA 付加体レベルより突然変異頻度の方が発がんより良い相関を示すことを期待したが、事実はそれほど簡単ではない事が本実験を通して明らかになった。各臓器によって細胞増殖、細胞回転のカイネティクスは異なるうえ、さらに発がんの過程はいろいろな遺伝的要因によって修飾を受けるので簡単ではない。我々の行った Big Blue マウス(♀; C 57 BL/6 N)を用いた解析を中心に、この問題に関連する最新の情報を含めて紹介する。

### 1. $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の改良

$^{32}\text{P}$ -ポストラベル法は Randerath ら(1985)により開発され、約 15 年を経過するが、bulky な構造をもつ化合物の形成する DNA 付加体を解析するには便利な方法である。ただし、原法では付加体ヌクレオチドがモノヌクレオチドに完全に分解されないという欠点がある。我々はこの点に改良を加えた(Tada et al., 1994; Ochiai et al., 1998)。HCA の 1 つである 2-アミノ-3,4-ジメチルイミダゾ [4,5-f] キノリン (MeIQ) を Big Blue マウス (C 57 BL/6 N) に、餌に 300 ppm 混ぜて投与し、各臓器から DNA を抽出し、マイクロコッカスヌクレアーゼ (MCN) と脾臓ホスホジエステラーゼ (PDE-II) で DNA を消化し、intensification 法に従い、 $\text{T}_4$  ポリヌクレオチドキナーゼ ( $\text{T}_4$ -PNK) でリン酸化した後、TLC で解析すると Fig. 1 に示すように多数の付加体が検出される。 $\text{T}_4$ -PNK でリン酸化したものをさらに、ヌクレアーゼ P 1 (NP-1) 1.6 U, pH 5.3-6 で処理した後、蛇毒ホスホジエステラーゼ (PDE-I, 30 mU) pH 8-9 でインキュベートし、TLC を行くと、1 つのスポットになる (Fig.

1 b)。NP-1 はホスファターゼ活性をもつので、さらに PDE-I で処理すると付加体をもつオリゴヌクレオチドは 5'-モノヌクレオチドになる。得られたスポットは  $N^2$  (Guanin-8-yl)-MeIQ-5'-リン酸であった。なお、改良法による付加体の回収率は原法の 90% 以上であった。MeIQ を 12 週間投与した後、肝臓、心臓、前胃、骨髄および大腸における付加体を上記改良法で解析した結果、いずれも 1 スポットを与えた。すなわち、臓器間で付加体の形に差はなかった。しかし、原法の回収率は約 50% であった点には留意する必要がある。

本改良法(改良法 I)は 2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ [4,5-b] ピリジン (PhIP) および 2-アミノ-3,8-ジメチルイミダゾ [4,5-f] キノキサリン (MeIQx) にも有用である (Fukutome et al., 1994; Totsuka et al., 1996)。2-アミノ-3-メチルイミダゾ [4,5-f] キノリン (IQ) に応用する場合には、NP-1 処理の前に PNK (30 U/13  $\mu\text{l}$ ) pH 5.7 で処理する必要がある(改良法 II)。これは IQ がグアニン-C 8 付加体の他グアニン- $N^2$  付加体を生成し(その他少量の第 3 の付加体ができる)、その 3'-リン酸が NP-1 に抵抗性なためである (Ochiai et al., 1999)。

付加体の形が複数ある場合は、その形によって修復速度が異なる場合がある。ただし大腸粘膜など細胞の回転の速い臓器では細胞回転による除去が大きく効いて、がん化するポテンシャルをもつと考えられる細胞、例えば幹細胞 (stem cells) における修復の付加体に対する特異性の解析は、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法では不可能であろう。

MeIQ を 12 週間連続投与した時の DNA 付加体レベルの経時的变化を Fig. 2 に示す。細胞回転の遅い、またはほとんどない肝臓および心臓では 12 週まで直線的に増加する。それに対し細胞回転の速い大腸、骨髄、前胃では 1-4 週間でプラトーに達する。

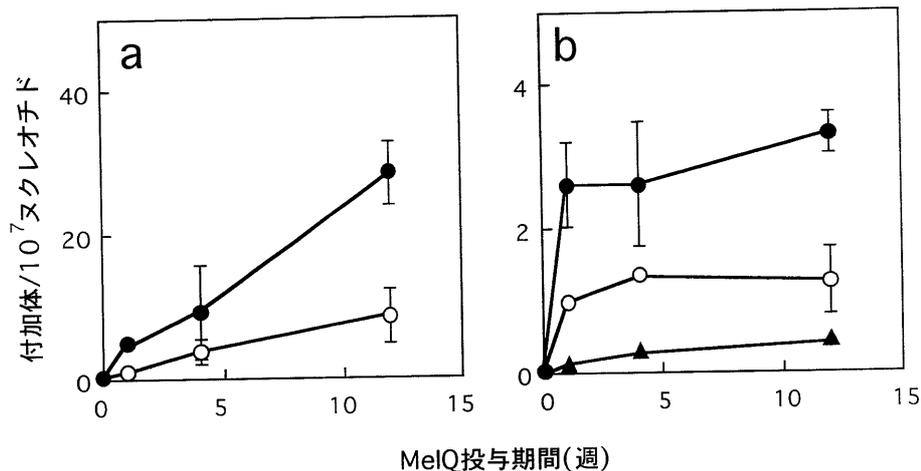


Fig. 2 種々臓器における MeIQ-DNA 付加体生成の経時的変化  
a. 肝(●), 心(○) b. 大腸(●), 前胃(○), 骨髄(▲) (Ochiai et al., 1998)

Table 1 MeIQ 投与により Big Blue マウスの種々の臓器において誘発された *lacI* 突然変異の経時的変化

臓器	化合物	突然変異頻度×10 <sup>6</sup>		
		MeIQ 投与期間(週)		
		1	4	12
Liver	None	20.7		30.6
	MeIQ	21.2	31.0	142
Heart	None	15.8		29.1
	MeIQ	26.4		20.8
Colon	None	13.2		29.2
	MeIQ	155	289	1105
Forestomach	None	32.8		38.2
	MeIQ	25.6	32.0	97.6
Bone marrow	None	9.8		18.9
	MeIQ	39.5	75.9	109

MeIQ は 300 ppm の濃度で CE-2 に混ぜて投与 (Suzuki et al., 1996)

## 2. DNA 付加体レベルと *in vivo* 突然変異の相関

Big Blue マウスは *lacI-lacZ* オペロンを含む  $\lambda$  ショトルベクターを第 4 番染色体上に約 40 コピーもち、誘発された変異を青色の  $\lambda$  フェージプラークとして検出できる系である。Big Blue マウスに MeIQ を投与した時の、1, 4, 12 週における突然変異頻度を Table 1 に示す。1 週における肝臓での DNA 付加体レベルは大腸のそれより高い。したがって、突然変異頻度は DNA 付加体レベルには一義的に比例しない事は明らかである (Ochiai et al., 1998)。細胞回転の速い骨髄および大腸ではすでに 1 週で変異フェージの数の増加が認められるのに対し、肝臓では 12 週になってはじめて有意な増加が認められる。

Table 2 に種々の臓器の 12 週における DNA 付加体

レベルと突然変異頻度を示す。細胞増殖のほとんどない心臓では突然変異頻度の増加は認められない。骨髄における付加体レベルは肝臓の約 1/70 であるにも拘らず、肝臓と同じレベルの変異が誘発されていた。突然変異頻度は付加体レベルと細胞増殖の両因子が大きく関与することが示唆される。同一臓器における異なった化合物に由来する DNA 付加体レベルと突然変異頻度の関係を比較した Davis ら (1996) の結果を Table 3 に示す。付加体レベルと突然変異頻度に直線的相関関係はない。A $\alpha$ C は付加体当りの変異原性が比較的弱い。MeIQx および A $\alpha$ C の主な DNA 付加体はグアニン C8 である (IQ については前述)。したがって、変異原性の強さは DNA 塩基のどの部位が修飾されたかによって決まるといふよりは、付加体全体の構造によって決まると思われる。

## 3. 突然変異頻度と発がん

Big Blue (C 57 BL/6 N) マウスにおける突然変異頻度と発がんとの相関を Fig. 3 に示す。発がん実験は 300 ppm の MeIQ を含む餌を連続投与し、実験期間は 92 週である。85% のマウスに肝細胞がんが認められたのに対し、最も変異頻度の高かった大腸においては 42% に腺がんが認められたに過ぎない。肝臓とほぼ同じ変異頻度を示した骨髄には悪性化は認められなかった (Nagao et al., 1998)。Hakura ら (1998) は Muta マウス (Balb/c × DBA/2) F1 に B[a]P を 25 mg/kg/day 5 日間胃内投与して、最終 B[a]P 投与 2 週間後に変異頻度を測定し、41 週の発がん実験で両者を比較した。変異頻度が最も高かったのは大腸で小腸、前胃、骨髄、脾がこれに次いだ。一方発がんの標的臓器は前胃であり、脾臓における悪性リンパ腫がこれに次いだ。以上のように突然変異頻度と発がん性に相関がないのは、MeIQ のみが特殊なのではなく、むしろほとんどの化合物で観察されるのではないだろうか。

Table 2 Big Blue マウス各臓器における DNA 付加体レベルと突然変異頻度の比較

化合物	臓器	lacI 突然変異頻度 (10 <sup>-6</sup> )	DNA 付加体レベル (付加体/10 <sup>7</sup> ヌクレオチド)
None	Liver	30.6	0
	Heart	29.1	0
	Colon	29.2	0
	Forestomach	38.2	0
	Bone marrow	18.9	0
MeIQ	Liver	142	28.3
	Heart	20.8	8.4
	Colon	1105	3.3
	Forestomach	97.6	1.3
	Bone marrow	109	0.4

300ppm MeIQ を含む餌を 12 週投与した。各群 3 匹ずつ用いた。ただし前胃に関しては 8 匹に投与し、4 匹からの前胃をプールし、2 サンプルを解析した (Ochiai et al., 1998)

Table 3 DNA 付加体レベルと突然変異の頻度：化合物による相違<sup>a</sup>

化合物	C57BL/6J lacZ	
	Adduct mol×10 <sup>7</sup> ヌクレオチド	MF×10 <sup>6</sup>
None		29.0±3.6
IQ	1.3±0.5	134.1±10.8
MeIQx	0.5±0.3	112.7±14.6
AαC	12.7±2.2	78.2±9.5

<sup>a</sup>Davis et al., 1996

Adduct : 24 hr after 10 daily doses (20mg/g, P.O.)

MF : 4 weeks after 10 daily doses (20mg/g, P.O.)

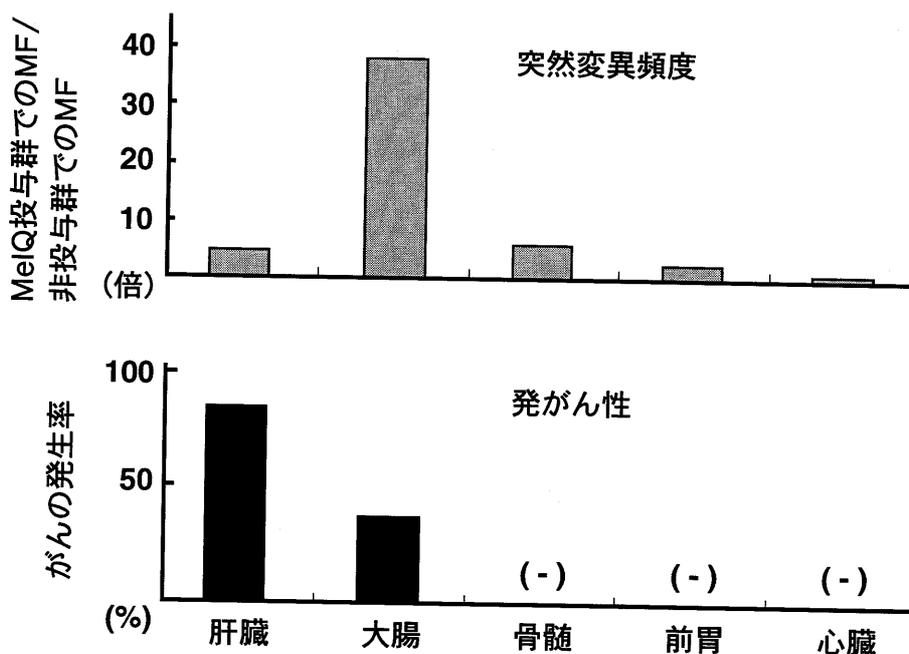


Fig. 3 MeIQ を投与した Big Blue マウス (C57BL/6N) における各臓器の突然変異頻度と発がん性 (Nagao et al., 1998)

Table 4 種々の細胞の種々の遺伝子における PhIP 誘発突然変異

遺伝子	宿主	サンプル数	突然変異の数(%)			文献
			G:C 欠失	GGGA → GGA	その他	
<i>Apc</i>	ラット大腸癌	4	5 <sup>a</sup> (100)	5 <sup>a</sup> (100)		Kakiuchi et al., 1995
<i>lac I</i>	BBM(大腸)	115	30 ( 26)	8 ( 7)		Okonogi et al., 1997a
	BBR(大腸)	227	82 ( 36)	18 ( 8)		Okonogi et al., 1997b
<i>supF</i>	ヒト線維芽細胞	172	7 ( 4)	5 ( 3)		Endo et al., 1994
<i>Hprt</i>	ヒトリンパ芽球様細胞	55	5 ( 9)	5 ( 9)	AAGGGGGC → AAGGGGC	Morgenthaler et al., 1995
						Farsani et al., 1996
<i>hprt</i>	チャイニーズハムスター線維芽細胞	40	5(12.5)	4 ( 10)		

<sup>a</sup>: 1つの腫瘍は2つの *Apc* 変異を持っていた

この相違の原因となっている因子には、いくつかあると想定されるが、突然変異しうるポテンシャルをもつ細胞の増殖カイネティクスが各臓器によって異なることが重要な因子の1つである。肝細胞は増殖速度が遅く、変異した細胞は悪性化への変異を受けない限り、ゆっくり増殖する。さらに、肝では変異を受ける細胞と癌化のポテンシャルをもっている細胞との関係は良くわかっていない。

それに対し大腸では幹細胞は各陰窩当り1個ある。この細胞に突然変異が起これば、その陰窩にある200-300の細胞はすべて、その変異細胞で占められる。すなわち幹細胞に生じた変異は200-300倍に増幅されている。幹細胞以外の細胞に生じた変異は、発がん物質投与を休止している間に粘膜から消滅することが考えられる。発がんのポテンシャルを持っている細胞は幹細胞に限られるという説があるが、決定にはいたっていないと思われる。いずれにしても、突然変異頻度が何を表わしているかは各臓器によって著しく異なる。

次に重要な因子は、細胞が腫瘍化するのに必要な遺伝子変異の数である。これは組織ごとに異なると考えられる。さらに、発がんの過程を修飾する遺伝子の関与がある。例えば、がん抑制遺伝子に変異のある *Min* マウスも遺伝的背景が異なると腸管の腫瘍発生が顕著に抑えられる。これは *Mom* という分泌型ホスホリパーゼ A2 (*PLA2s*) 遺伝子の発現レベルによる事が明らかにされている。その他、発がん感受性を制御している遺伝子は多数ある。

PhIP は F344 ラット雄に大腸がんを誘発するが雌ラットには大腸がんを誘発せず、乳がんを誘発する。Big Blue ラット (F344) 雌および雄に、発がん実験と同じ投与用法で餌に 400 ppm の PhIP を混ぜて投与(ただし変異テストの場合は60日間投与し、1週間後に解析)した場合、大腸粘膜における、突然変異頻度は雌雄で差がない(Okonogi et al., 1997 a)。PhIP による大腸の前がん病変ともいべき異常腺窩 (Aberrant Crypt Focus, ACF) の誘発は大腸がんと同様に雄で有意に増加する

が、雌では対照群よりわずかしき増加しない。去勢雄ラットでは ACF の数は雌ラットと同程度に低下していた。すなわち突然変異誘発後の細胞の運命がホルモンにより修飾されていることが示唆された。

#### 4. 突然変異スペクトルと発がん

ここでは2つの問題を取りあげる。1つは各化合物は、どの臓器でも同じ変異スペクトル(型と部位)を与えるか、各化合物はそれぞれ特異的な変異スペクトルを与えるか、動物の種が異なっても同じスペクトルを与えるかという問題である。第2は変異スペクトル解析により発がんリスク評価に関して重要な情報が得られるかという問題である。

1) の問題でまず各臓器で同じ変異スペクトルを与えるかという問題である。MeIQ は大腸、肝臓では主として G:C → T:A 変異を誘発し、G:C → A:T トランジションがこれに次ぐ。しかし骨髄では G:C → T:A, G:C → A:T, 一塩基対欠失、およびその他の複合した変異、の4種類がほぼ等頻度に誘発されていた。この変異スペクトルの差は細胞増殖速度に直接関わるものではないことは、大腸が肝臓と同じスペクトルであることから推定される。骨髄の DNA 修復系または DNA 複製系になんらかの特異性の存在が推定される。

次に PhIP, AαC および MeIQ の3つの HCA について、これらはいずれも主としてグアニン C8-付加体を生成するのであるが、Big Blue マウス大腸における変異スペクトルを比較した。いずれの化合物でも G:C → T:A 変異が最も多く、全突然変異の約50%を占めた。それに続く変異としては、PhIP による G:C 欠失が約30%であることが特徴で、その他の化合物では G:C → A:T 変異がこれに次いだ。さらに詳しく検討すると、MeIQ は 5'-GC-3' に、PhIP は 5'-GGG-3' に、AαC は CGT に塩基置換変異が最も高頻度に観察された。一塩基欠失の頻度は MeIQ, PhIP, AαC で 8/92, 30/115 および 8/105 であり、PhIP で有意に高かった。さらに PhIP では8個が GGGA → GGA の変異であったのに対し、MeIQ では

1/92, AαCでは0/105でありGGGA→GGA変異はPhIPにきわめて特異的であることがわかった (Okonogi et al., 1997 b). すなわちグアニンC8-付加体を生成する化合物でも, その変異スペクトルはそれぞれの化合物に特異的であり, 化合物特定変異として使えるものがある事がわかった.

**Big Blue** ラット大腸粘膜では, PhIPにより誘発される変異は一塩基対欠失が最も高頻度でG:C→TA塩基置換がこれに次いだ. GGGA→GGAの変異は雌雄のラット大腸粘膜で同じように観察された. すなわち, PhIPによる大腸発がんの差異は, 突然変異頻度, 変異スペクトルいずれでも説明できないことがわかった (Okonogi et al., 1997 a).

ところで我々はPhIP誘発ラット大腸がんにおけるがん遺伝子およびがん抑制遺伝子変異を解析しているが, 50%の腫瘍に*Apc*変異を見出した. そのすべてがGGGA→GGAの変異であり, この変異がPhIPの化合物特定変異としてヒト発がんにおけるPhIPの関与を説明する手がかりに使えるか否か検討の必要性があった. 幸いなことにTable 4に示すように, ヒト線維芽細胞, ヒトリンパ芽球, チャイニーズハムスター線維芽細胞における*supF*および*H(h)pert*遺伝子の変異が報告された. ヒトリンパ芽球*Hprt*変異をのぞいてすべての系でGGGA→GGA変異が変異の3-10%で検出された. ヒト*Hprt*ではG:Cの欠失はすべてAAGGGGGC→AAGGGGGCであった. チャイニーズハムスターの*hprt*遺伝子には4つのGGGA配列があるが線維芽細胞における4つの変異はすべてそのうちの1カ所で起こっていた. その配列はヒトでは保存されていない. このように突然変異の特異性には一次構造が重要なことはもちろんである. しかし変異の起こりやすさには, 標的配列の周辺の一次構造あるいは2次, 3次構造が大きく関与していることが推定される (長尾美奈子, 1998). したがって, 化合物特定変異を異なる遺伝子に应用する場合には, この点を考慮する必要がある.

*p53* 遺伝子は種々のヒトがんで変異を起こしており, *Apc*と同様にかん抑制遺伝子である. これまでに7000例以上の変異スペクトルが報告されているが, そのうち21例にGGGA→GGA変異があることがわかった. これらの変異がすべてPhIPにより誘発されたと仮定すると, そしてPhIP誘発突然変異の3-10%がGGGA→GGA変異であるとする, PhIPはヒトがん*p53*変異の3-10%に関わっていると算出される.

現在のところB[a]Pのようなヒトが暴露されているPhIP以外の発がん物質ではGGGA→GGA変異は報告されていない. また, AAFのように*in vitro*または大腸菌ではフレームシフトが優先的に起こるDNA付加体を形成するものでも, *in vivo*ではフレームシフトが起こらないと報告されている. もちろんその他どのような化

合物がPhIPと同じ化合物特定変異を持っているかが今後の問題であるが, 一応PhIPのヒト発がんにおけるリスクを考える手がかりができたと考えている.

## 結 語

HCAのようにほとんどのヒトがほとんど毎日食べている発がん物質で, それに対する代謝活性化能はヒトそれぞれ異なるし, さらにDNA付加体生成以後の過程で作用する因子の遺伝的背景もヒトそれぞれ異なる. このような環境発がん物質のヒト発がんにおける役割の解明はきわめて困難である. PhIPが幸い化合物特定変異とも呼ばれるべき変異を誘発することは幸いであった.

突然変異と発がんの関係は一見単純な問題に思えるが実はよくわかっていない事が多々ある. **Big Blue** 動物やMutaマウス, *lacZ*-プラスミドマウス, その他Δ*gpt*マウスなどそれぞれ特徴がある. これらを使って環境変異原研究に新しい展開があることを願っている.

## 参 考 文 献

- Davis, C. D., E. J. Dacquel, A. J. Schut, S. S. Thorgeirsson and E. G. Snyderwine (1996) *In vivo* mutagenicity and DNA adduct levels of heterocyclic amines in Muta™ Mice and *c-myc/lacZ* double transgenic mice, *Mutat. Res.*, 356, 287-296.
- Endo, H., H. A. J. Schut and E. G. Snyderwine (1994) Mutagenic specificity of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-*f*] -quinoline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-*b*] -pyridine in the *supF* shuttle vector system, *Cancer Res.* 54, 3745-3751.
- Yadollahi-Farsani, M., N. J. Gooderham, D. S. Davies and A. R. Boobis (1996) Mutational spectra of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-*b*]pyridine (PhIP) at the Chinese hamster *hprt* locus, *Carcinogenesis*, 17, 617-624.
- Fukutome, K., M. Ochiai, K. Wakabayashi, S. Watanabe, T. Sugimura and M. Nagao (1994) Detection of guanine-C8-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-*b*] pyridine adduct as a single spot on thin-layer chromatography by modification of the <sup>32</sup>P-postlabeling method, *Jpn J. Cancer Res.*, 85, 113-117.
- Hakura, A., Y. Tsutsui, J. Sonoda, J. Kai, T. Imade, M. Shimada, Y. Sugihara, and T. Mikami (1998) Comparison between *in vivo* mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[*a*]pyrene in the *lacZ* transgenic mouse (Muta™ Mouse). *Mutat. Res.*, 398, 123-130.
- Kakiuchi, H., M. Watanabe, T. Ushijima, M. Toyota, K. Imai, J. H. Weisburger, T. Sugimura and M. Nagao (1995) Specific 5'-GGGA-3'→5'-GGA-3' mutation of the *Apc* gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-*b*]pyridine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 910-914.
- Morgenthaler, P.-M.L. and D. Holzhauser (1995) Analysis of mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in human lymphoblastoid cells, *Carcinogenesis*, 16, 713-718.
- Nagao, M., H. Fujita, M. Ochiai, K. Wakabayashi, T. Sofuni,

- T. Matsushima, T. Sugimura and T. Ushijima (1998) No direct correlation between mutant frequencies and cancer incidence induced by MeIQ in various organs of Big Blue™ mice, *Mutat. Res.*, 400, 251-257.
- 長尾美奈子 (1998) 分子レベルからみた化学発癌研究の展望, *Mol. Medicine*, 35 : 708-716.
- Ochiai, M., K. Ishida, T. Ushijima, T. Suzuki, T. Sofuni, T. Sugimura and M. Nagao (1998) DNA adduct level induced by 2-amino-3, 4-dimethylimidazo [4, 5-*f*] quinoline in Big Blue™ mice does not correlate with mutagenicity, *Mutagenesis*, 13, 381-384.
- Ochiai, M., H. Nakagama, R. J. Turesky, T. Sugimura and M. Nagao (1999) A new modification of the <sup>32</sup>P-post-labeling method to recover IQ-DNA adduct as mononucleotides, *Mutagenesis*, in press.
- Okonogi, H., G. R. Stuart, E. Okochi, T. Ushijima, T. Sugimura, B. W. Glickman and M. Nagao (1997a) Effects of gender and species on spectra of mutation induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-*b*] pyridine in the *lacI* transgene, *Mutat. Res.*, 395, 93-99.
- Okonogi, H., T. Ushijima, X. B. Zhang, J. A. Heddle, T. Suzuki, T. Sofuni, J. S. Felton, J. D. Tucker, T. Sugimura and M. Nagao (1997b) Agreement of mutational characteristics of heterocyclic amines in *lacI* of the Big Blue® mouse with those in tumor related genes in rodents, *Carcinogenesis*, 18, 745-748.
- Randerath, E., H. P. Agrawal, J. A. Weaver, C. B. Bordelon and K. Randerath (1985) <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of DNA adducts persisting for up to 42 weeks in the skin, epidermis and dermis of mice treated topically with 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene, *Carcinogenesis*, 6, 1117-1126.
- Suzuki, T., M. Hayashi, M. Ochiai, K. Wakabayashi, T. Ushijima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Sofuni (1996) Organ variation in the mutagenicity of MeIQ in Big Blue™ *lacI* transgenic mice, *Mutat. Res.*, 369, 45-49.
- Tada, A., M. Ochiai, K. Wakabayashi, H. Nukaya, T. Sugimura and M. Nagao (1994) Identification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-*f*]quinoline (dG-C8-MeIQ) as a major adduct formed by MeIQ with nucleotides *in vitro* with DNA and *in vivo*. *Carcinogenesis*, 15, 1275-1278.
- Totsuka, Y., K. Fukutome, M. Takahashi, S. Takahashi, A. Tada, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1996) Presence of *N*<sup>2</sup>-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3, 8-dimethylimidazo-[4, 5-*f*]quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues, *Carcinogenesis*, 17, 1029-1034.