〈総 説〉

環境変異原性物質検出法の現状とその評価

石 館 基^{*}
Motoi ISHIDATE, Jr.

1. は じ め に

米国の調査によると、現在CASナーバーに登録されている化合物の数は、約400万種といわれる。日常生活でわれわれが日頃接しているものは、そのうちの数万種であろう。これらの物質は、近代産業の発展に大きな貢献をしてきた。しかしながら、それらの生体に及ぼす影響についてはなお不明な点が多い。

数年前、本邦においては、食品添加物として豆腐に使用されていた殺菌剤A F-2の安全性が問題となった。最初、遺伝学者によって、この物質に変異原性、すなわち、細菌などの微生物に対して突然変異を誘発したり、またヒトのリンパ球に対して、染色体異常を誘発する性質のあることがわかった。その後マウスに発癌性が認められるに及んで、行政的な処置がとられたのである。ちょうどその頃、諸外国でも、われわれの生活環境中に存在する種々の化学物質を早急に見直す必要性が叫ばれてきた。1969年、まず、米国に環境変異原学会が誕生した。次いで1970年欧州に、そして、1972年本邦にも同じ学会が発足した。その後、1973年には、さらに国際環境変異原学会が設立され、今年1981年9月には、東京で第3回目の学会が開催された。

とくに米国では、DDT、PCB、水銀、石綿、塩化ビニール・モノマーなどによる汚染が社会問題となった。そこで学会当局は、環境中の種々の化学物質の人への影響を、発癌性および遺伝毒性、両者の立場から考慮し、従来の長期動物実験法もさることながら、微生物その他を用いる、変異原性試験法を適用することによって、早急に、なるべく多くの物質を検索する必要性のあることを勧告した¹⁾。

本邦においても、A F-2問題を機会に、食品衛生調査会に属する専門部会の手で、まず「食品添加物などの遺伝的安全性評価基準」が作製された²⁾。また、1973年からは厚生省がん研究班が組織され、生活環境中の発癌

性物質を短期に選別し得るようなスクリーニング試験法の開発が試みられてきたのである。

以下、変異原性試験の有用性ならびに本邦あるいは諸外国における現状について、その概略を述べる。

2. 変異原性試験法の概略

1976年10月に成立した米国のTSCA(毒物規制法)には、環境中の有害性化学物質を規制するため、とくに生物学的試験法として、表1に示すような、変異原性試験項目があげられている。大別すると、微生物その他を用いる遺伝子突然変異(点突然変異)を指標とするもの、哺乳動物細胞その他を用いる染色体異常を指標とするもの、および微生物その他を用いるDNA傷害を指標とするものなどである。

第1の遺伝子突然変異試験には、サルモネラ菌を用いるいわゆるAmes法が最も広く用いられている。米国カリフォルニア大学のAmes博士は、種々の化学物質に感

表1 米国EPAのTSCA中に示された変異原性試験項目の概略

I	突然変異性試験(3項目必要)
1)	細菌による検出法(代謝活性化を含む)
2)	有糸菌類による検出法(代謝活性化を含む)
3)	昆虫による検出法
4)	哺乳動物培養細胞による検出法(代謝活性化を含む)
5)	マウスを用いる特定座位試験
II	染色体異常試験(3項目必要)
1)	哺乳動物生体内染色体異常
2)	昆虫による染色体異常
3)	マウスまたはラットによる優性致死
4)	マウスまたはラットによる遺伝子転座(位)
III	DNA損傷試験(2項目必要)
1)	細菌のDNA修復試験(代謝活性化を含む)
2)	哺乳動物細胞のDNA修復試験
3)	酵母による遺伝子組換えおよび塩基対置換試験
4)	哺乳動物細胞によるS.C.E.

* 国立衛生試験所安全性生物試験研究センター 変異原性部長・医博 〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1.

受性を高めたサルモネラ菌数種を用いる実験系を考案し、発癌性物質のほとんどすべてのものは、この試験によって陽性となり、その強さは、動物による発癌性の強さと良く相関することを示した。本邦では、早速、本試験法の有用性を評価したうえ昭和54年より、労働安全衛生法に基づき、化学物質の安全性を評価するうえの一つの指標として採用したことは、すでに周知のとおりである。試験法ガイドラインの詳細については、中央労働災害防止協会により、労働省安全衛生部化学物質調査課でまとめたものが発行されている。

微生物以外の材料を用いる方法としては、ショウジョウバエやカイコなどの昆虫を用いる方法、あるいはヒトその他の哺乳動物の培養細胞を用いる方法などが知られている。動物個体を用いる方法に、マウスを用いる特定座位試験、あるいは毛色の斑点を指標とするスポット法などがあるが、特定なマウスを入手しなければならない理由もあって、一般に広く普及はされていないのが現状である。

第2の染色体異常を指標とする方法には、哺乳動物の培養細胞や、生体内骨髓細胞を用いる方法が広く用いられている。特に前者では試験管内で直接検体を加えるため、微生物を用いる試験と同様に、ラット肝S9などによる代謝活性化の工夫も必要である。後者には染色体異常を観察する代りに、赤芽球の分化過程で起きた染色体異常を赤血球に残存する小核の出現頻度を指標として観察する方法もある。これは小核試験と呼ばれているものであるが、生体内での反応を確認するために有効な手段である。染色体の異常によって起ると考えられている優性致死法もまた広く用いられてきた。通常、マウスが用いられるが、妊娠13日目頃に、母体を解剖、妊娠成率、黄体数、着床数あるいは死胚数あるいは生存胎仔数を求めるものである。さらに、生れてきた動物を交配し、染色体の異常を観察する方法もある。ヒトの場合、流産児の約半数に染色体異常が見受けられる事実もあるので、この分野の研究開発はきわめて重要な意味を持つ。

第3のグループは、細胞のDNA損傷を指標とするものである。枯草菌を用いるrec法は、DNA損傷を修復できない菌との組合せによって、化学物質の性質を簡単に見分けるうえで有用な方法である。特に胞子を用いることによって、大気中のガス状の有害物質を検索し得る利点を持っている。DNA損傷の有無は、細胞の不定期に起るDNA合成によって観察することも可能である。このためには、細胞あるいは組織を³H-チミジンでラベルし、オートラジオグラフによって細胞核上に出現する銀粒子を計測すればよい。また、哺乳動物培養細胞を細胞2周期にわたってBUdRをとり込ませると、染色体の二本の染色分体をそれぞれ染め分けることができる。

発癌物質を同時に与えると二本の染色分体間で交換が起っていることがわかる。本法はSCE法と呼ばれるものであるが、発生機構はあまり明らかではない。

DNA損傷は、染色体異常と同じく、遺伝子の変化を見ているわけではなく、もっと広範囲の変化を対象としている。したがって細胞にとって、その変化が致命的である場合には、突然変異細胞は出現することはない。もしも染色体異常の誘発によって、新しく染色体構成の違った細胞群が誕生した場合には、染色体変異と呼び、通常、染色体異常とは区別している。

変異原性試験法の詳細については、いくつかの総説があるので、それを参照されたい^{3~5)}。

3. 変異原性試験法の組合せ

英国のBridgesは1974年に3段階説を提唱した。まず、微生物を用いる試験をやり、次に、動物個体を用いる試験、最後に哺乳動物生体内試験によって、ヒトに対する危険性を定量的に評価しようとするものである⁶⁾。当然のことながら、試験法は、試験されるべき物質によって変わってくる。試験管内(in vitro)で行われる簡易試験は、あくまでもプレスクリーニングとしての役割をもつ。したがって、環境中の汚染物質、あるいは工場内で暴露されるような一般化学物質は、まず、この試験によって定性的に取り扱われるべきであろう。一方、食品添加物、農薬、あるいは医薬品類など、生体内で代謝あるいは蓄積され得るような物質については、第二次、第三次の試験を施行し、定性的というよりは、むしろ、定量的な尺度から取り扱われるべきものである。

昨年の10月に、東京で開催されたOECDの専門家会議では、変異原性試験の基本的概念と、試験法のガイドラインに関する討議がなされた⁷⁾。これによると、生活環境中に存在する種々化学物質のうちから、発癌性あるいは遺伝毒性を持つ物質を選別するために、少なくとも2つの試験が必要であるという。すなわち、微生物に対して遺伝子突然変異を誘発するかどうか。他の1つは、哺乳動物細胞に対して染色体異常を誘発する性質があるかどうかという問題である。これらの2つの試験は、企業が新たに市場に持ち込む化学物質について要求される最少事項である。前者の試験には、従来から行われているサルモネラ菌あるいは大腸菌を用いる検索であり、後者では、まず哺乳動物の培養細胞を用いる簡単な試験法が好ましいとされている。その他の試験は、これらを代行するか、あるいはさらに確認するための追加試験としてあげられている。OECDの見解は、まだ最終的に決定されたものではない。しかしながら、国際間の流通を考慮し、なるべく簡便な最少試験項目を統一的にとり上げようとする努力がうかがわれる。本邦はもとより、諸外

国においても、OECDの考え方を参考とし、それぞれの分野で安全性にまつわる行政的規制が検討されることになる。

4. 変異原性と癌原性との相関

1973年、厚生省にがん研究班が組織された。動物を用いる発癌試験は2.3年間を要し、その経費は莫大なるものである。もっと短期間で、疑わしい物質を選別できないかというのがそのねらいである。本研究班の設立にあたっては、去年、急逝された当試験所の病理部長であられた小田嶋博士の尽力を忘れることはできない。本班では、最初の2年間は、全国に分布する班員に対し、発癌性の知られたものと、化学的構造は似ているが、発癌性のないと思われるものが配布された。微生物、原生動物、昆虫類、あるいは哺乳動物細胞を用いる検索が行われた。3年目からは、本班は二分され、一つは“スクリーニング班”（河内班）、他の一つは“テスト班”（小田嶋班）として再出発することとなった。前者では、サルモネラ菌を用いるAmes法、枯草菌を用いるrec法、哺乳動物細胞を用いる染色体異常試験、ならびに昆虫を用いる突

然変異試験法が採用された。本来は試験法の開発を目的とするものであるが、毎年約30種の化合物について、数年間にわたる検索が行われた。その実験結果の概略は、毎年出版される厚生省がん研究報告書に記載されている⁸⁾。

上記スクリーニング班で浮び上がってきた化合物について、選別委員会を設け、特に社会的に重要と思われるものを7検体にしぼり、第2のテスト・グループによって、翌年から発癌実験が開始された。ここでは、発癌試験ガイドラインにそって、マウスおよびラットの2系統が用いられる。現在もなお進行中のものもあるが、今までに得られた成績を要約すると表2のごとくなる。

上記の研究グループの業績から次のようなことがいえる。

- (1) 発癌性物質のほとんどすべてのものは、いずれかの変異原性試験法によって陽性となる。
- (2) 変異原性試験法の違いによって陽性となる確率は異なる。したがって、発癌性物質をもれなく選別するためには、一種類の変異原性試験法だけでは不十分である。

表2 厚生省がん研究班“スクリーニング班”より“発癌性テスト班”に廻された検体とその成績（1981年6月現在）

化 合 物 名	検体番号	Rec 法	Ames 法	染色体異常*		発 癌 性	
				in vitro	in vivo	マウス	ラット
JCT 74-01 AF-2	(74-20)	+	+	+	0.04	+	+
JCT 75-01 Sodium benzoate	(75-15)	+	-	+	1.1	-	-
-02 Sodium nitrate	(-)		+	+	7.9	-	-
-03 Sodium nitrite	(73-18)	+	+	+	0.4	-	-
-04 Erythrosine	(73-15)	+	-	+	0.4	-	-
-05 Caffeine	(-)		+	+	0.4	-	±
-06 Acetylsalicylic acid	(73-02)	+	-	-	-	-	-
-07 Phenacetin	(74-06)	-	+	+	7.8	-	+
JCT 76-01 Potassium sorbate	(75-14)	+	-	+	17.0	-	-
-02 Potassium metabisulfite	(75-27)	+	-	-	-	-	-
-03 Barbitol	(75-21)	-	-	+	6.6	+	-
-04 n-Butyl p-hydroxybenzoate	(76-15)	-	-	-	-	-	-
-05 Butylated hydroxy toluene	(75-08)	+	-	-	-	-	-
-06 Acid red	(77-20)	-	+	+	7.0	-	-
-07 iso-Butyl p-hydroxybenzoate	(76-16)	-	-	-	-	±	-
JCT 77-01 Potassium bromate	(76-31)	-	+	+	0.09	+	
-02 Hydrogen peroxide	(76-30)	+	-	+	0.1	-	+
-03 Acetoaminophen	(76-05)	+	-	+	0.02	+	
-04 Thiram	(76-09)	+	+	-	-	+	
-05 DDVP	(76-22)	+	+	+	0.1	±	
-06 Diphenyl	(75-01)	-	-	-	-	-	
-07 Sodium propionate	(76-19)	-	-	-	-	-	
JCT 78-01 Nitrofurantoin	(77-16)	+	+	+	0.06	-	
-02 Sodium hypochlorite	(77-34)	+	+	+	0.5	-	
-03 Caramel	(77-35)	+	+	+	23.0	-	
-04 Sulpirin	(77-32)	+	+	+	1.0	-	
-05 Propyl gallate	(77-13)	+	-	+	0.02	-	
-06 Sodium erythorbate	(77-14)	-	+	-	-	+	
-07 Butylated hydroxy anisole	(75-07)	+	-	-	-	-	

* in vitro : チャイニーズ・ハムスター培養細胞, in vivo : ラットの骨髓細胞 数字はD 20値 (mg/ml) を示す。

- (3) Ames テストで陰性であっても、染色体異常を誘発するものは多い。このうちには、いくつかの既知発癌性物質も含まれている。
- (4) 変異原性試験が陽性であっても、必ずしも発癌性があるとは限らない。
- (5) 長期発癌実験を代行し得るような短期スクリーニング法を確立するためには、なお技術的改良が必要である。

上記の結論は、国際間の協力によって、発癌性物質のスクリーニング法を開発している他のグループで得られた結論と大差はないように思われる^{9,10)}。

変異原性の本来の目的は、発癌性物質の検索にとどまらず、ヒトへの遺伝的障害性を疑わしめる物質の検索にある。現在、発癌実験に相当する遺伝毒性試験法の開発が急がれている。あるいは、発癌性はなくとも子孫に悪い影響を及ぼすようないわゆる遺伝毒性物質があるかも知れない。変異原性が高く、しかも発癌性が認められなかった物質について、今後、この分野の確認が必要となる。

本研究班では、食品添加物その他の生活関連化合物の安全性を評価するため、本邦で広く実験可能と思われる変異原性試験項目について検討した。その結果、従来の成績から次の5つの試験項目が浮び上った¹¹⁾。

- 1) 微生物を用いる遺伝子突然変異試験
- 2) 微生物を用いるDNA修復試験
- 3) 哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験
- 4) マウスあるいはラットを用いる小核試験
- 5) マウスその他を用いる優性致死試験

これらの試験項目をどのような順序で行うべきかについては未だ結論が得られていない。

われわれの研究室では、過去数年間にわたり、合計500

種以上の検体を取り扱った。既知発癌性物質54種、食品添加物100種、医薬品94種、農薬30種、天然物46種、その他研究室で合成したものあるいは実験室または工場などで使用されている試薬類などを含める約200種のものなどである。そのうちの約3分の1程度のものが、変異原性試験にかかってきた。

チャイニーズ・ハムスターの肺から分離された線維芽細胞株のCHL細胞は、ヒトの細胞などと比較してかなり感受性は高い。この細胞に対して、染色体異常を誘発したもの¹²⁾、およびサルモネラ菌を用いるAmes試験で陽性となったものについて、発癌性物質と比較し、それを模式的に示すと図1のごとくなる。

大きな輪、すなわち染色体異常陽性物質(Clastogen)と中型の輪、すなわちAmes試験陽性物質(Mutagen)とは必ずしも一致してはいないが、その大半は重なっていることがわかる。最も重要なことは、小型の輪、すなわち発癌性物質(Carcinogen)の90%以上のものが、上記2つの輪の中に含まれている事実である。このことは、少なくとも両者のスクリーニング法が、発癌性物質の選別法として有用であることを示している。ただし、よく見ると発癌性が疑われていながら、Ames法あるいは染色体法または、その両者でかかってこない物質もある。しかしながら、これらの物質(図の右側に示す)の発癌性はあるとしてもきわめて弱いものであると思われる。数種の発癌性物質は、Ames法で陰性であるが、染色体異常を誘発する場合もある。このことは、発癌性の疑いのある化合物をもれなくスクリーニングするために、少なくとも2つ以上の試験系を併用した方が良いことを示すものである。いわゆる子孫に影響を及ぼすような遺伝物質について、新たな輪を画くとすれば、どの位置にくるか、これについては今後の研究を待たねばならない。

図1 Ames法陽性化合物(MUTAGEN)、染色体異常試験陽性化合物(CLASTOGEN)および発癌性物質(CARCINOGEN)との相関

変異原性と発癌性の輪が大きさも、位置も一致するならば、最早、動物による長期発癌実験は不用となる。しかしながら、変異原性試験の感度が高まれば、それだけ変異原性物質の輪は広がってくるはずである。

5. 変異原性の強さの比較

前項では変異原性があるかないかについて述べた。しかし、これはあまり重要な意味を持たない。試験法の種類によって、その指標や感度が異なるためである。東大、医科研の松島らの調査によれば、図2に示すように、合成化合物、天然物質を問わず、われわれの環境中に存在する変異原の強さは、ものによって1,000万倍もの開きがあるという¹³⁾。これは、Ames試験のデータを整理し、一定濃度(nmol)あたりの変異コロニー数で示したものである。

図2 Ames法で陽性となった物質の変異原性強度の比較(松島らによる)¹³⁾

一方、われわれはチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常誘発性試験から、中期分裂像20%に異常を認めた場合の検体濃度(D₂₀値)を比較検討した。表3に示すように、その濃度の開き、すなわち、異常を起す強さは、ものによって10⁶以上の開きが見られる。図のうち、右側の化合物はAmes試験と染色体試験との両者が陽性となったものであり、左側は染色体試験のみで陽性となったものである。*印を持つ物質には、発癌性が知られている(下線は進行中)。

Ames試験で示された強さと、染色体試験で示された強さとの間ではどのような相関があるであろうか。図3に示すごとく、Ames試験で強くでる物質は染色体試験でも強くでる傾向にある。天然添加物として食品に広く用いられているカラメル類は、変異原性の最も弱いものとして知られているが、図中で右上に位置する。一方、発

癌性が高いものとして知られる4-ニトロキノリン1-オキサイド(4NQO)、ニトロソグアニジン(MNNG)あるいはニトロソ尿素(ENU)などは、最も変異原性の高い群(図の左下)に属している。

個々の試験系で変異原性が高くでるものは、概して他の試験系でも陽性となる傾向にある。しかしながら、ある物質の変異原性の強さを評価する場合には、一つの系で陽性となるものよりも、いくつかの系で同時に陽性となる物質のほうが危険度が高いと考えた方が妥当かも知れない。試験指標が異なる系に広く影響することは、それだけその物質の標的分野が広く、ヒトへの影響の可能性も考えられるからである。この考えは、あくまでも憶測であり、後で訂正しなければならないかも知れない。

染色体異常試験では、染色体の数の変化と型の変化を問題とする。発癌性が問題となった合成女性ホルモン剤、DES(ジエチルスチルベステロール)は、チャイニーズ・ハムスター細胞の染色体数を倍化する作用を持っている。植物中にあるアルカロイドは同じ作用を持つが発癌性はまだ認められていない。ニトロソ化合物には発癌性のあるものが多く知られているが、これらのものは、染色体の構造上の異常を誘発する。構造上の異常は、大別して、切断型と交換型に区別できるが、発癌性を示す物質のほとんどすべてのものは、この両者を誘発する傾向にある(図4)。われわれはこの事実に基づき、個々の化合物の一定濃度(1mg/ml)当りの交換型異常出現値(TR値と呼ぶ)を計算した。既知発癌性物質について、TR値の高いものから順に並べると表4のごとくなる。これらの物質はすべて(maleic anhydrideを除く)Ames試験で陽性である。食品添加物、あるいは医薬品を例にあげ、そのTR値を示すと表5のごとくなる。この表で右側は、Ames試験では陰性(M(-))であるが、染色体試験では陽性(CH(+))となったものである。問題となったAF-2や、過酸化水素(hydrogen peroxide)などは比較的高い値を示し、カラメルは弱く、プロピレングリコールは、またその5分の1程度に弱いことがわかる。医薬品では、抗生物質や制癌剤などは比較的高い値を示すが、アスピリンやイソニアチッドなどは比較的弱い。この表に示されていない化合物で切断型異常を起すが、交換型異常を殆ど起さないものはかなり多い。このうちにはわれわれの日常食用している食塩や砂糖なども含まれている¹⁴⁾。

6. 環境汚染物質に対する対策

本邦ではPCB問題を契機として、昭和48年、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」が制定された。環境庁、通産省、労働省および厚生省では、それぞれ、これを骨子とする各種行政対策が推進されている。

表 3 染色体異常誘発性の定量的比較 チャイニーズ・ハムスター培養細胞

染色体(+)	Ames (-)	D_{20}^{*1} (mg/ml)	染色体(+)	Ames (+)
		10^{-4}	4-NQO *	
		10^{-3}	Trp-P-1 *	
			0-Phenylenediamine, ENU *	
			Hydralazine-HCl	
			MNNG *, Trp-P-2	
			2-Amino-5-nitrophenol, ENNG *	
			NO-carbaryl, MNUR *	
		10^{-2}	m-Phenylenediamine	
			Captan	
			β -Propiolactone *	
			AAF *, 2-Nitro-p-phenylenediamine	
			AF-2 *, Propan sultone * Acrylonitrile	
			Rhodamine B *, BNU *	
		10^{-1}	Nitrofurantoin	
			Potassium bromate, PNU *	
			DEP *, DDVP, Sodium hypochlorite	
			Styrene monomer, Sodium nitrite	
			Tris-dibromopropylphosphate *	
		10^0	Quinoline *, B(a)P *, DMN *	
			Sulpyrin, Pyrovatex CP	
			Tris-dichloropropylphosphate	
			Isoniazid *, Stevioside, DEN *	
			Cochineal, Caramel C, D	
			Phenacetin *	
			Soy sauce	
		10^1	Acid red	
			Caramel E	
			Caramel B	
		10^2	Caramel A	
NO-propazine				
Diethylstilbestrol *				
Carbaryl				
Propyl gallate				
Acetaminophen				
Hydrogen peroxide				
4-AQO, Noscapine				
Maleic anhydride *				
Caffeine *				
Ethionamide *				
Methyl p-hydroxybenzoate				
Phenylbutazone, Furosemide				
Sodium benzoate, Ethenzamide				
Aspirin, ENG, Barbitol *				
Sodium nitrate				
Urea, NaCl				
Saccharine sodium				
Urethane *				
Potassium sorbate				
Diazinon				
Saccharose				

*1 D_{20} : 中期分裂像の20%に異常が認められる濃度

*印 : 発癌性が知られているもの

下線 : 現在、発癌性実験が進行中のもの

図 3 チャイニーズ・ハムスター培養細胞による染色体異常誘発性と Ames テストによる変異原性の強さとの相関 (D_{20} : 細胞 20 % に異常を誘発せしめるに要する濃度)

表5 食品添加物および医薬品によって誘発された交換型染色体異常の出現度 (TR 値)

食品添加物の例

CH(+) M(+)	TR	CH(+) M(-)
(AF-2)*	400	Curcumine
	280	Propyl gallate
	140	Hydrogen peroxide*
Potassium bromate	50	Ethyl p-hydrobenzoate
	33	Caffeine
Sodium nitrite	20	
Stevioside (50 %)	10	Lacchaic acid
Caramel	1	Xylitol
	0.4	Acetone
	0.2	Propylene glycol

医薬品の例

	180000	Saframycin
	9300	Triamterene
	580	Acetaminophen
Nitrofurazone	230	Levodopa
Sulpyrine	110	Papaverine
Sodium hypochlorite	20	Theophylline
LSD	10	
Phenacetin*	5	Aspirin
	5	Phenylbutazone
	5	Isoniazid*

* 印：発癌性が知られているもの

図4 チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) に見られる染色体異常 A: 未処理 B: 発癌性物質で処理し、交換型異常 (矢印) が多発した例

表4 既知発癌性物質によって誘発された交換型染色体異常の出現度 (TR 値)

チャイニーズ・ハムスター培養細胞

発癌性物質 (厚生省検体番号)	TR 値	Ames 試験
4-NQO (74-27)	30000	+
Trp-P-1	12800	+
ENNG	9600	+
MNNG	6200	+
Trp-P-2	4667	+
MNUR	3400	+
β -Propiolacton (75-13)	2267	+
BNNG	1800	+
PNNG	1733	+
Styrene oxide	1567	+
Butyl(1-acetoxy)butylnitrosamine	1317	+
ANNG	1167	+
ENUR	1067	+
IBNNG	767	+
BNUR (74-12)	750	+
Propan sultone (75-28)	728	+
Nitrosohydantoic acid	635	+
MNU (74-14)	580	+
IBNU	512	+
PNUR	467	+
PNU	200	+
Rhodamine B (77-30)	183	+
BNU (73-24)	155	+
N-Methyl-N-acetyl-N-nitrosamine	152	+
ANU	104	+
Methylazomethanolacetate (75-16)	80	+
2Me DAB (75-17)	71	+
DPN	66	+
ENU	56	+
BBNU	48	+
Maleic anhydride (76-17)	40	-
Caffeine	35	±
DBN (74-10)	33	+
BBN (73-22)	21	+
DMN (73-20)	16	+
Isoniazid (77-27)	7	-

特に環境庁では、昭和49年より、環境を母体とする化学物質の挙動に関する全国的調査研究を開始し、昭和54年度からは、既存化学物質点検10年計画が始められた。上記化審法においては、既存化学物質は審査の対象ではなく、原則として国がその安全性を確認し、必要であれば特定化学物質として指定することによって、所要の規制措置をとることになっている。通産省では化学物質の分解性、生物濃縮性を調査し、厚生省では動物に対する毒性に関する調査試験を主体とする。

環境汚染問題は国際的社会問題である。1975年OECD環境委員会は加盟国に対し、ケミカル・アセスメントに関する理事会勧告を行うことを決議した。1977年、化学品グループの勧告を受け、新たにケミカル・テスト・イング・プログラムが生まれ、化学品の安全性を評価するための試験法の国際統一化をはかることとなった。一方、UNEP(国連環境計画)でも、IRS(国際環境情報源照会制度)、あるいはIRPTC(有害物質国際登録システム)などが企画された。またWHOにおいては、1979年よりIPCS(国際化学物質安全性計画)を進め、医薬品を除く環境化学物質の健康評価に関する調査を開始した。その他、ILO(国際労働機構)およびEC(欧州共同体)などの国際機関の活動も、その例外ではない。

環境汚染物質はまず、分析化学的手法によって種類と分布、あるいはその根源について調査されるべきものである。その調査によって、浮きぼりにされた物質は、

次に、その生物活性が問われる。微生物あるいは哺乳動物細胞を用いる変異原性試験はここでも大きな役割を演じてくれる。現在、環境庁ではいくつかの研究プロジェクトを立て、この問題に対処している。たとえば、水の汚染につながる低沸点性有機ハロゲン化合物類について変異原性試験を試みている。また、大気汚染については同じく公害防止の立場から、ガス状物質ならびに揮発性物質の変異原性試験法の開発を試みている。特に、空気汚染につながる自動車排気ガスの問題については、ガソリン車のみならず、ディーゼルエンジンの排気物質について、変異原性試験による検索も進められている。

前記した厚生省がん研究班で配布された検体のうち、環境汚染に無関係であり得ない物質について、変異原性試験結果をまとめると表6のごとくなる。これらの物質のうち、すでに発癌性が認められているものもあるが、それらの多くはAmes法、rec法あるいは染色体異常試験で陽性となっている。表中+Sとあるのは、ラット肝S9で代謝活性化処理を行って陽性となったものである。アクリルニトリルの関連化合物であるメチルアクリレートおよびエチルアクリレートは、いずれも比較的低濃度(0.015 mg/ml)で、チャイニーズ・ハムスター培養細胞に対し高率に染色体異常を起すことが確かめられている。この値は、スチレン・オキサイドと同程度のものであり、特に、S9による代謝活性化を必要としなかった。

表6 環境汚染に関連する化学物質の変異原性試験結果の比較

化 合 物	Ames テスト	Rec- assay	染色体 異 常	カイコ	発 性
アクリロニトリル	±	+	+	—	+
ベンツバイレ	+S	+S	+S	?	+
ジメトエイト	+S	+	+	—	+
ジメチルベンツアントラセン	+S	—	+S	+	+
β-BHC	—	—	+S	—	+
PCB (KC 500)	—	—	?	—	+
アントラセン	+S	—	—	—	—
BHT	—	+	—	—	—
カブタン	+	+	+	—	—?
ブチルフラレート	—	—	—	—	—
DDVP	+	+	+	—	—
DOP	—	—	—	—	—
過酸化水素	—	+	+	?	+
マラチオン	+S	±	+	—	—
ビレン	+S	—	—	±	—
ジコフォール	—	—	—	?	?
マネブ	—	+	+	—	?
チラム	+	+S	+S	+	?

? : テスト結果なし +S : S-9 添加

環境調査の結果、水質、底質、魚あるいは大気などの環境相で、広範囲または高濃度に検出されたものから、

14種(異性体を含む)の化合物を選び、検索した結果を表7に示す。Ames試験では、パラニトロトルエンのみTA 100株に対して、S9 mix存在下で陽性となった。アニリンおよびパラクロロアニリンについては本試験では陰性に終わったが、別に陽性であるという報告もある。恐らく、方法の違いあるいは、使用したS9の違いによるためであろう。これら2つの物質は、S9添加によってチャイニーズ・ハムスター細胞に染色体異常を誘発させる性質がある。ニトロベンゼンおよびニトロトルエンの異性体は染色体の構造的異常を誘発しないが、染色体数の変化、すなわち倍数体を出現させる性質を示した。恐らく細胞分裂に重要な役割を持つ紡垂系の形成あるいは機能を抑制しているのであろう。

表7 環境中汚染物質の変異原性試験結果(直接法 S9無添加)

化 合 物	Ames テスト		染色体異常	
	濃度(mg/plate)	判定	濃度(mg/ml)	判定
Aniline	3.0	—	1.0	±*2
o-Chloroaniline	3.0	—	0.5	—
m-Chloroaniline	3.0	—	0.125	—
p-Chloroaniline	3.0	—	0.25	—*2
Nitrobenzene	3.0	—	0.5	(+)*3
o-Nitrotoluene	3.0	—	0.25	(+)
m-Nitrotoluene	3.0	—	0.25	(+)
p-Nitrotoluene	1.0	+*1	0.25	(+)
1,2,3-Trichlorobenzene	3.0	—	0.06	—
1,2,4-Trichlorobenzene	3.0	—	0.125	—
1,3,5-Trichlorobenzene	3.0	—	0.625	—
Hexachlorobenzene	1.0	—	2.0	—
Trichloroethylene	3.0	—	0.06	—
1,1,1-Trichloroethane	3.0	—	1.0	—

*1 TA 100株に対して弱陽性(+S9)

*2 S9 mix 併用によって陽性となる

*3 (+)構造上の異常を認めないが倍数体が出現する

表8 低沸点性有機塩素化合物の変異原性試験結果

化 合 物	Ames テスト		染色体異常	
	濃度(μmole/plate)	判定	濃度(μL/ml)	判定
CHBr ₃	0.5	+*1	0.157	(+)*2
CHCl ₂ Br	1.0	+	0.25	±
CHClBr ₂	0.5	+	0.25	±

*1 TA 100で弱陽性(—S9)

*2 倍数体を出現させる

水道水を塩素処理することによって形成されると思われる低沸点性有機ハロゲン化合物、プロモホルム(CHBr₃)、プロモジクロロメタン(CHCl₂Br) およびク

ロジブロモメタン(CHClBr_2)について変異原性試験を行った結果を表8に示す。

Ames試験では、上記3検体はいずれも、サルモネラ菌TA100株に対して弱いながら陽性となり、S9mixを添加すると陰性となった。ただし、プリインキューション法を採用すると陰性となる。TA100株を用いるスポット法では、いずれも陽性となった。一方、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では、いずれもはっきりした結果が得られず、疑陽性に終わった。ただし、プロモホルムには染色体の数を倍加する性質があるようである。

環境汚染の一つとして重油による海洋汚染もまた深刻な問題である。われわれの研究室ではB重油の成分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび、液-液分配法に

表9 多環含窒素化合物の染色体異常試験結果
(チャイニーズ・ハムスター培養細胞)

化 合 物	直接法(-S9)		代謝活性化法(+S9)	
	濃度(mg/ml)	判定	濃度(mg/ml)	判定
Acridine	0.04 *1	++*2	0.3	+
Benzo(h)quinoline	0.06	+	0.4	-
Benzo(f)quinoline	0.02	+	0.3	+
Dibenz(c, h)acridine	0.17	-	0.1	+
Dibenz(a, h)acridine	0.6	-	1.0	-
Dibenz(a, j)acridine	0.6	-	0.75	+
Pyrenoline	0.02	+	0.04	+
Pyrenoline-4,5-oxide	0.2	+	0.8	+

*1 陽性の場合には最低、陰性の場合には細胞致死濃度に近い最高濃度を示す。

*2 異常出現率 5%未満(-), 10%以上20%未満(+), 20%以上50%未満(++)

表10 スチレン・モノマー関連物質の変異原性試験成績*

化 合 物	Ames試験		染色体異常試験	
	濃度(mg/plate)	判定	濃度(mg/ml)	判定
Styren monomev	0.15	-	0.25	+(+S9)
Styven oxide	0.5	+	0.0038	+
Acrylonitrile	5.0	-	0.015	+
Methyl acrylate	0.5	-	0.0075	+
Ethyl acrylate	0.5	-	0.11	+
Acrylic acid	0.5	-	0.75	+

* 表中の注は表8と同じ

よっていくつかの分画に分け、それぞれについて染色体異常誘発性試験を行った。その結果、未分画の重油および、塩基性窒素化合物を含む分画が陽性となり、この活性は、いずれもラット肝S9を併用した場合に出現した。東大薬学部の手藤助教授のもとで合成された数種の多環含窒素化合物について同様な検索を行った成績を表9に示す。これらの物質は、重油の塩基性窒素化合物の分画

に含まれる可能性のあるものである。

スチレンモノマーおよびその代謝中間物として知られるスチレンオキシド、あるいはアクリロニトリルなどもまた、工業用環境汚染物質の一つである。これらの変異原性試験結果を表10に示す。

農薬も環境汚染の重要な要因である。われわれの検索した範囲で、変異原性があると思われるものを表11に示す。研究室内で数種の農薬類のニトロソ化体を合成すると、その変異原性はさらに高くなる。

表11 農薬類およびそのニトロソ化体の変異原性試験結果*1

化 合 物	Ames試験		染色体異常試験	
	濃度(mg/plate)	判定	濃度(mg/ml)	判定
Captafol	0.005	-	0.008	+
Captan	0.4	+	0.015	+
NAC	30.0	-	0.03	+
Maneb	5.0	-	0.03	+
Sumithion	5.0	+	0.1	+
DDVP	2.0	+	0.08	+
DEP	5.0	+	0.125	+
Dimethoate	5.0	+	1.0	++
MTMC	30.0	-	0.125	+
NO-MTMC *2	1.0	+	0.0075	++
NO-MPMC	1.0	+	0.015	++
NO-NAC	1.0	+	0.015	++
NO-CAT	1.0	-	0.015	++
NO-Atrazine	1.0	-	0.015	++

*1 表中の注は表8と同じ *2 NO-ニトロソ化体

農薬類については、特に生体内の蓄積性が問題となるが、残留した場合には食品添加物などと同様、不特定多数の人畜が影響を受ける可能性がある。したがって、新規化合物の申請にあたっては、その安全性評価に、変異原性試験データも加味されている。

環境中に存在する有害性物質の影響は、必ずしも単純なものではない。いくつかの要因が相乗的に働き合う場合もある。現在、検索すべき物質があまりにも多いために、それら物質間の相互作用を検索するところまでには至っていない。まず、個々の物質の有毒性を定量的に把握し、さらにそれらの生物活性の域値の問題を考慮したうえで、上記問題を早急に解決して行く必要がある。

7. お わ り に

以上、われわれの研究室のデータをもとに、環境汚染に関連すると思われる化学物質の変異原性について述べてきた。

変異原性に関する学問は、目下進展中といってよいであろう。その発展にはあらゆる分野からの知識と協力が必要である。長期の動物実験にひきかえ、微生物や動物細胞レベルでの短期検索法はきわめて能率的であり、正

に省エネ時代にふさわしい手法でもある。しかしながら、短期で簡単に得られる情報は、それなりの限界を有している。癌の発生には引金を引く要因 (initiator) とそれを助長する要因 (promoter) とが必要であるといわれているように、生体内での事象はかなり複雑である。われわれは変異原性試験をうまく利用することによって、まずわれわれの生活環境中から、まず疑わしき物質を選別することができる。従来を検索によれば、その疑わしい物質は、人工的に合成された化学物質だけとは限らない。われわれが日常、接している天然物質の中にもかなりの灰色物質が含まれている。今後、変異原性試験法の感度が上るならば、あるいは真白い物質はなくなるのではないかと思えるほどである。要は、これらの物質の中から、真に人体に有害な物質を選別するために、得られたデータを定量的に表現して行くことであろう。そして、さらに、動物生体を用いるより高次の実験系によって、その有害性を再確認して行かなければならない。

環境中に存在する種々化学物質の変異原性に関しては、米国のオークリッジ国立研究所から出版されている EMIC のリストが有用であろう¹⁵⁾。これには、世界各国の文献がコンピューターで集録されているが、それぞれのデータは文献を読まなければならない。最近、われわれの手で編集した環境変異原データ集は、必ずしも完全なものではないが、物質について試験法別に整理され、陰性結果も供覧し得るので参考にされたい¹⁶⁾。また、本邦における変異原関係雑誌は少いが、「変異原と毒性」¹⁷⁾には重金属類その他の文献が整理されている。

謝 辞

このたび第15回日本水質汚濁研究会年次学術講演会に特別講演を行う榮に浴しましたことを感謝申し上げます。また、その機会をつくってくださいました佐谷戸安好運営委員に厚くお礼申し上げます。この機会に、協同研究に従事された諸兄姉に厚くお礼申し上げます。

(原稿受理 昭和56年6月26日)

— 引 用 文 献 —

- 1) The Environmental Mutagen Society, Committee 17: Environmental Mutagenic Hazards, Science, **187**, 503-514 (1975)
 - 2) 食品衛生調査会編: 食品添加物の遺伝的安全性評価の暫定基準, 薬局, **26**(1), 115-118 (1975)
 - 3) 田島弥太郎ら編: 化学物質の突然変異検出法, 講談社 (1973, 1981)
 - 4) Kilbey, B.J. ら: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Sci. Pub., Amsterdam (1977)
 - 5) Hollaender, A.: Chemical Mutagens, New York, Vol. 1-6 (1971-1980)
 - 6) Bridges, B.A.: Mutat. Res., **26**, 335-340 (1974)
 - 7) OECD 東京大会記録, 10月東京 (1980)
 - 8) 厚生省がん研究報告書 (1973-1979)
 - 9) Internat, Programme for the Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogenicity, Mutat. Res., **54**, 203-206 (1978)
 - 10) The Foundation of the "Internat. Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens", Mutat. Res., **46**, 311-312 (1977)
 - 11) 厚生省, 小田嶋班編: 食品添加物等の安全性評価指標としての変異原性試験 (1979)
 - 12) 石館基: 組織培養, **5**, 115-122 (1979)
 - 13) Nagao, M. and T. Sugimura: Ann Rev. Genet., **12**, 117-59 (1978)
 - 14) 石館基ら: 衛生試験所報告, **98**, 1-19 (1980)
 - 15) Environmental Mutagen Information Center: Oak Ridge Nat. Lab. (1976-1979)
 - 16) 賀田恒夫, 石館基編: 環境変異原データ集, サイエンス・フォーラム社 (1980)
 - 17) 変異原と毒性: サイエンス・フォーラム社 (1977-1981)
- (本稿は日本水質汚濁研究会第15回年次学術講演会における特別講演を収録したものである)