ショウジョウバエを用いる化学変異原検出法の新たな展開

藤川 和男*

A Novel Methodology of Chemical Mutagenicity Assays in *Drosophila melanogaster*

Kazuo FUJIKAWA

(Drug Safety Evaluation Laboratories, Central Research Division, Takeda Chemical Industries,
Ltd.: 2-17-85, Josohonmachi, Yodogawa-ku, Osaka, Japan)

環境変異原が怖いのは、それらがバクテリアで突然変異を起こしたり、培養細胞で染色体異常を誘発したりするからではなく、人体に取り込まれて、体細胞で突然変異を誘発することによってガンを起こしたり、生殖細胞で突然変異を誘発することによって子孫の健康に悪影響を及ぼすかもしれないからである。このような可能性は、問題の性質上、マウスやラットなどの哺乳動物の個体丸ごとを用いる長期毒性試験で検証するのが望ましい。しかしながら、調べなくてはならない化学物質はあまりにも多く、この種の試験は手軽に実施できるものではない。そこで短期 *in vivo* 試験が意味をもってくる。この試験で、人体に対する危険性が正当に疑われたものだけを長期 *in vivo* 試験でじっくり調べればよい。

短期 *in vivo* 系としてかような動物種が、取り扱いが比較的簡単で、豊富な関連情報と技術を備えているショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* である。Auerbach と Robson¹⁾ の前駆的研究以来、この小さな昆虫における変異原研究は、もっぱら伴性劣性致死法を用いて行われてきた。これは処理を受けた個体の生殖細胞の X 染色体上に生じた遺伝子突然変異を孫の代で検出する方法で、当然、交配実験を必要とするものである^{2), 3)}。このような生殖細胞テストは、化学物質の遺伝毒性が問題となった場合には不可欠である。しかし、化学物質の *in vivo* 変異原性の有無の判定やその強度の測定で、生殖細胞にこだわる必要はない。また、Ames のサルモネラ菌株 TA シリーズを用いる復帰変異試験のように、簡便で迅速な *in vitro* テストでさまざまな変異原性物質がわ

れわれの環境から続々と見つけ出されている現状において、生殖細胞テストは短期 *in vivo* 試験として十分に機能しない。ショウジョウバエはマウスやラットに比肩する薬物代謝酵素系をもっているにもかかわらず、Ames テストで変異原性を示す発ガン物質のあるものが、伴性劣性致死試験や他の生殖細胞テストで、変異原性効果を発揮しにくいことも無視できなくなってきた^{4)~6)}。

上記のような背景のもとに、短期 *in vivo* 系としてのショウジョウバエの特色を最大限に生かすべく、体細胞を処理対象とする試験法が開発されてきた^{7), 8)}。体細胞テストは、いうまでもなく、1 代限りの試験で、特別な遺伝学の知識も交配技術も不要である。著者は、その開発により、ショウジョウバエを用いる変異原性試験が少数の専門家の独壇場である時代は終わった、と思っている。本稿では、現在我が国の変異原研究の現場で、実際に使われている 3 種の体細胞テストを紹介する。

1. 体細胞テストとは

ショウジョウバエの生活史で、体のサイズが著しく増加するのは幼虫期である (図 1)。この現象は幼虫体内に存在する成虫原基サイズの著増を伴っている。成虫原基とは、胚期に将来成虫の体の各部分になるべくつくられた未分化細胞集団のことで、幼虫期に細胞分裂を繰り返して成長し、蛹期に成虫器官へと大変態する。このようにしてできた成虫の体の細胞は分裂能を失っており、成虫期では体のサイズの増加も体組織の細胞の入れ替りも生じない。

細胞分裂なしに突然変異は生じない。従って、本稿の主題である体細胞テストでは、伴性劣性致死試験のような生殖細胞テストとは異なり、成虫は検体の処理対象とはならない。体細胞テストの「体細胞」とは、成虫原基

* 武田薬品工業株式会社中央研究所薬剤安全性研究所：大阪市淀川区十三本町 2 丁目 17-85

図1. ショウジョウバエの生活史

E: 胚期, L₁: 1 令幼虫期, L₂: 2 令幼虫期, L₃: 3 令幼虫期, P: 蛹期, A: 成虫期
 図中の日数は 25℃ 恒温条件下での値。

図2. 体細胞テストの基本的手順

I: 親バエを飼育瓶(例, 15 ml の培地を含む 5.3 cm² × 11 cm の管瓶)に入れる。培地は水 100 ml 当たり乾燥ビール酵母「エビオス」5 g, グルコース 8 g, 寒天 1 g を含む。
 I ~ II: 産卵期間, II: 親バエを飼育瓶から出す, III: 幼虫を滴下法(A)あるいは混餌法(B)で処理。Bの方法では, インスタント培地(North Carolina Biological Supply 社製)を使用, IV: 成虫の観察

の細胞のことで, 「体細胞テスト」とは, 幼虫(図1, L₁ ~ L₃)を処理して原基細胞に生じたDNA, 遺伝子, あるいは染色体の障害を, 成虫期に, 適当な指標を利用して, 検出する試験のことである。検体の処理法としては, その安定性とか蒸留水や有機溶媒への溶解性にかかわら

図3. 翅毛スポットテストのための交配

mwh: 第3染色体上の劣性突然変異で表現型は多翅毛, *flr*: 第3染色体上の劣性突然変異で表現型は炎毛, +: *mwh* あるいは *flr* の正常な対立遺伝子, ○: 動原体, TM: 複雑な逆位を持つ第3染色体で, 図中には示していないが, *mwh* 座も *flr* 座も正常(+), A: 正常な体細胞染色体組換え能を有する幼虫, B: TM のため組換え能が著減している幼虫

ず, 給餌法と呼ばれている経口投与法が用いられている。具体的には, 検体の溶液やけん濁液を幼虫が生育している培地上に滴下するか(図2A, 滴下法), あらかじめ検体を混入しておいた培地上で幼虫を成虫期まで生育させる(図2B, 混餌法)だけでよい。活発な摂食活動なくしては幼虫の急激な成長はありえないので, これらの給餌法が効率よく実施できるのである。消化管を通った物質は, 体液中を拡散して各組織に浸透する。昆虫は血管系をもたないので, 吸気は気管と呼ばれている特別な管を通して体の隅々まで運ばれる。気管系が十分に発達

図4. 翅毛スポットテストの概略(A)と染色体組換えによる標識遺伝子のホモ接合化様式(B)

I:「ふたごスポット」の成因, II:「シングルスポット」の成因

している3令幼虫に対しては、ガス状検体の処理も行うことができる。かように、体細胞テストにおける検体処理法は、幼虫の特徴を利用した自然な方法であるが、処理対象となる幼虫は、次章以降で述べるように、特別な細工がほどこされたものを用いる。

2. 翅毛スポットテスト

ショウジョウバエは典型的な高等真核生物なので、その体細胞は2倍体である。それゆえ、たとえ、父親由来の染色体上に劣性突然変異が乗っていても、母親由来の相同な染色体上に正常な対立遺伝子が存在している限り、その変異は発現しない。真核細胞のこのような基本的性質をうまく利用しているのが、Zürich大学の研究者達が開発した翅毛スポットテストである⁹⁾。

このテストでは、第3染色体上の劣性突然変異 mwh (multiple wing hairs, 多翅毛) と flr (flare, 炎毛) の両方を潜在因子としてもつ幼虫を処理する。このような幼虫は、実際には、 $[mwh/mwh]$ 株と $[flr/TM]$ 株の交配から得られるので、標識遺伝子をトランスヘテロの状態 $[mwh+/+flr]$ でもっている (図3A)。この交配からは $[mwh/TM]$ 型幼虫も得られ、実験手順は図2のとおりなので、この型の幼虫も $[mwh+/+flr]$ 型と同時に処理されるが、あくまでも主役はこのトランスヘテロ体である。

処理を受けた $[mwh+/+flr]$ 型幼虫が成虫になると、その翅を検鏡し、標識遺伝子が発現した翅毛集落 (スポット) を検出する (図4A)。スポットの成因として重要

図5. w^i 四重複系統を用いる眼色復帰変異試験の概略 (A) と w^i の復帰変異機構 (B)

なのは、相同染色体間の染色分体交換として生ずる染色体組換えである。組換えが *flr* 座と動原体の間で起きると、娘細胞の一方は *mw*h 変異に関してホモ接合 [*mw*h/*mw*h] 他方は *flr* 変異に関してホモ接合 [*flr/flr*] となる (図 4B, I)。それぞれの変異細胞は細胞分裂を繰り返して隣接したコロニーをつくり、成虫翅表面で、多翅毛集落と炎毛集落からなる「ふたごスポット」を形成する (図 3A)。組換えが *mw*h 座と *flr* 座の間で生ずると、娘細胞の一方が *mw*h ホモ接合となり、成虫翅表面で多翅毛の「シングルスポット」を形成する (図 4B, II)。

次のようなメカニズムでも「シングルスポット」は生じる^{9), 10)}。(1) 図 4B, I の組換えで生じた *mw*h クローンと *flr* クローンのどちらか一方の消失。(2) *flr* 染色体上の正常な *mw*h 座、あるいは *mw*h 染色体上の正常な *flr* 座における遺伝子突然変異。(3) 端部欠失による正常な *mw*h 座を含む染色体片の消失。(4) 染色体不分離による染色体消失。これらのメカニズムのうち、(3) と (4) では異数性のクローンができ、それは生存力が低いので、変

異翅毛 1~2 本程度の「小さなシングルスポット」しかつからない。ところが、(2) による「シングルスポット」は、(1) とか図 4B, II のような染色体組換えによるスポットと同様、変異翅毛 3 本以上からなる「大きなシングルスポット」を形成することができる。従って、ある化学物質が「大きなシングルスポット」の誘発に有効であった場合、それが主に遺伝子レベルでの作用によるものか、染色体レベルでの作用によるものかは区別がつかない。遺伝子突然変異誘起作用に関する情報が必要であれば、次章で紹介する眼色復帰変異試験系を用いて、再テストすればよい。ただ、誘発された「大きなシングルスポット」のうちどの程度が染色体組換えによるものかを推定する方法はある。*mw*h 染色体の相方として、染色体組換えのサプレッサーとして働く逆位染色体 *TM* をもつ個体 (図 3B) の成虫翅表面で「大きなシングルスポット」の出現頻度を調べればよい。このスポットが遺伝子突然変異によるものである可能性は高いが確証はない。確かなことは、「大きなシングルスポット」の誘発頻度が

図6. Rec^{-} 変異 *mei-9^a* と *mei-41^{D5}* によって阻害される DNA 修復過程

A: 除去修復¹⁷⁾, B: 複製後修復¹⁸⁾, ▽: 紫外線 (UV) によって生じたピリミジンダイマー, —: 娘ストランド, ~~~: 修復合成された DNA

[*mwh*+/*flr*]>[*mwh*/*TM*]であった場合、その差は染色体組換えによるスポットの頻度であるということである。

要するに翅毛スポットテストは染色体突然変異が確実に検出できる試験である。

3. 眼色復帰変異試験

翅毛スポットテストとは対照的に、ここで紹介するテストは遺伝子突然変異のみを検出するものである。

遺伝子の変化は、その方向として、正常から異常への前進変異と、異常から正常への復帰変異に分けられる。前者のメカニズムとして塩基変化から染色体異常まで多様で、生殖細胞で生じたものならいざ知らず、体細胞で生じたものは、その本性を正確に知ることは不可能に近い。その点、復帰変異は、メカニズムの多様性に悩まされることなく、遺伝子突然変異の指標として比較的信頼できる。特定の変異は特定の遺伝的变化によって生じたものであるから、その変化に特異的なメカニズムで野生型へと復帰するはずだからである。

ショウジョウバエの体細胞テストとして最初に実用化に成功した復帰突然変異検出系は *unstable white-zeste* (UZ) 系である¹¹⁾。これは X 染色体上の *zeste* 座の変異 *z'* と *white* 座のトランスポゾン挿入変異 *w⁺(TE)* の相互作用による黄眼色から、野生型の赤眼色に戻る変化を検出するもので、復帰変異を起こすのは *w⁺(TE)* である。*w⁺(TE)* から *w⁺* への変化には、トランスポゾン TE の変化が関係していると考えられているが^{12), 13)}、残念ながら、その分子機構は不明である。

そこで、最近、著者らは、トランスポゾンが関係していない比較的シンプルな眼色変異 *white-ivory* (*wⁱ*) に着目して、高感度な復帰変異検出系を開発した¹⁴⁾。*wⁱ* は *white* 座の DNA の一部 (2.9 kb) が重複したために生じた劣性変異で、その重複した DNA 片が正確に切り出さ

れると、野生型の DNA に戻る (図 5B)。このメカニズムは、体細胞とか生殖細胞を問わず、また変異原の種類にかかわらず、変異眼色から正常眼色への変化を説明するものである。変異遺伝子はいくつ重複させても変異遺伝子に変わりはないが、そのうち一つでも復帰変異を起こすと、表現型は野生型に戻るので、同一の X 染色体上に *wⁱ* を 4 コピー重複して持つ系統 *Dp(1:1:1:1) wⁱ* を作成して復帰変異の検出効率を高めた (図 5A)。

実際の試験では、付着 X 染色体を担う雌をパートナーとする *wⁱ* 四重複の雄系統の幼虫を処理し、成虫期に、実体顕微鏡下で、黄眼色のバックグラウンドに赤いスポットとして出現する復帰変異コロニーを検出する (図 5A)。スポットの観察が済んだ雄バエを、別の株で *white* 座の欠失のため白眼を呈している XX 型雌バエと交配すれば、生殖細胞で生じた *wⁱ*→*w⁺* の変化を、次世代で赤眼を呈す雌バエとして検出できる。なお、*wⁱ* 四重複で標識された X 染色体を雌にもたせると、雌は X 染色体に関しても 2 倍体なので、1 個の細胞当たり 8 個の標的遺伝子が存在することになり、復帰変異の検出効率はさらに上昇する。しかし、*wⁱ* 四重複ホモ接合系統の維持には、技術的に種々の困難が伴うので、雌の利用はテストの簡便さを損う恐れがある。

4. DNA 修復試験

枯草菌の *rec*-assay のショウジョウバエ版で、化学物質の DNA 損傷性を、組換え能欠損 (Rec^{-}) 個体の選択的致死現象を指標にして検出する試験である^{7), 15)}。

利用する Rec^{-} 変異は *mei-9^a* と *mei-41^{D5}* で、前者は除去修復能欠損、後者は複製後修復能欠損を伴っている (図 6)。*mei-9^a* 変異体も *mei-41^{D5}* 変異体も、ショウジョウバエで得られている数多くの DNA 修復能欠損変異体の中では、紫外線やアルキル化剤の致死作用に最も高い感受性を示す¹⁶⁾。幸いなことに、いずれの Rec^{-} 変異も

図7. DNA修復テスト用の株(A)とテストの原理(B)

X: Rec^- 変異 ($mei-9^a$ と $mei-41^{Ds}$) に加えて眼色を黄色にする変異で標識された X 染色体, Y: Y 染色体, XX: 体色を黄色にする変異で標識された付着 X 染色体

X 染色体に関連しているので, Rec^- 二重変異体 $mei-9^a\ mei-41^{Ds}$ は, 図 7A に示しているように, 常に雄として維持できる。パートナーとして, Rec^+ で正常な修復遺伝子を持つ $\widehat{X}XY$ 型の雌を使用すればいいのである。 $\widehat{X}X$ は 2 本の X 染色体がくっついてあたかも 1 本の染色体のごとくふるまうようになったもので付着 X 染色体と呼ばれている。 $\widehat{X}XY$ 型の雌と正常な性染色体組成を持つ雄からなる株では, 父親の X 染色体は常に息子に, 母親の付着 X 染色体は常に娘に伝わる。XY 雄と $\widehat{X}XY$ 雌の交配から生ずる 4 種の接合子 XY, YY, $\widehat{X}XY$, $\widehat{X}XX$ のうち, YY と $\widehat{X}XX$ は成虫期まで生き残れないからである。

上記の [Rec^- 雄・ Rec^+ 雌] 株の幼虫は, 当然のことながら, 同じ発育段階にある Rec^- 個体と Rec^+ 個体がほぼ同数混在する集団である。この幼虫集団に, DNA 損傷作用を有す検体を投与すると, Rec^- 個体の方が死にやすいので (図 7B), 成虫になった段階で, Rec^- 個体の Rec^+ 個体に対する数の比は, 無処理対照群における

比よりも, 低くなる。ただし, この比は雄/雌なので, Rec^- とか Rec^+ に関係なく, 単に致死感受性の性差を観ている可能性がある。このような可能性は, 雄も $\widehat{X}XY$ 型雌も Rec^+ である株を用いて, [Rec^- 雄・ Rec^+ 雌] 株処理実験と同様な実験を行えば, 検証できる。[Rec^- 雄・ Rec^+ 雌] 株を処理した場合に限って, 用量依存的に性比が対照区レベル以下に減少すれば, 被験検体に DNA 損傷性有りと, 自信をもって判定できる。いずれの株でも, 雄と雌の成虫は, 眼の色や体の色で一目で区別できるように工夫してあるので, 性比を求める段階でも何ら支障はない¹⁹⁾。

5. 体細胞テストの守備範囲

今まで紹介した体細胞テストの中で, 最も簡単に実施できるのは, DNA 修復テストである。簡単であっても変異原検出能力が劣っている話にならないが, そうではないようだ。表 1 にまとめている資料から明らかにように, このテストで陽性効果を示す細胞毒物は, アルキル化剤, クロスリンク剤, UV 型変異原, インターカレート剤, ラジカル形成剤, 核酸前駆体合成阻害剤と多様である。DNA 修復テストをバクテリアの *rec*-assay のショウジョウバエ版とみなすゆえんである。

表中には示していないが, DNA 修復テストがとりわけ威力を発揮するのは, UV 型変異原に分類される発ガン性 polycyclic hydrocarbon 類と aromatic amine 類に対してである。ショウジョウバエの生殖細胞テストでは, それらの変異原性の検出がきわめて困難であることが, 古くから問題になっており, 体細胞テスト開発の契機となった⁶⁾。しかし, 翅毛スポットテストにおいても UZ 系を用いる眼色復帰変異試験においても, B[a]P や 2-AAF の変異原性は, それらの発ガン性から予測されるよりは強くなかった^{20), 21)}。B[a]P, 2-AAF のいずれの処理区における突然変異頻度も, 対照区における頻度の数倍にすぎなかったのである。B[a]P や 2-AAF でこうなので, 他の発ガン性が比較的弱い関連物質の場合は推して知るべしである。ところが, DNA 修復試験では, B[a]P や 2-AAF に限らず, DMBA, B[a]A, 2-AA などが明瞭な陽性効果を示した (図 9)。

w^i 四重複系を用いる眼色復帰変異試験でも, アルキル化剤, クロスリンク剤, UV 型変異原, インターカレート剤及びラジカル形成剤が陽性効果を示す (表 1)。この事実, 幅広いスペクトラムの DNA 損傷が 2.9 kb DNA の欠失を誘起しうることを示唆し, w^i 四重複系が変異原検出系としての資格を有していることを物語る。しかし, いろいろな既知変異原を用いた評価研究は, この系では, 他の二つのテスト系やその先輩格にあたる UZ 系ほどは進んでいないので, それがどのような毒物群に対してきわだった威力を発揮するかは, 今のところ定かではない。ただ, 限られた資料からでも, w^i 四重複系は遺伝子突然変異のみを検出する系であるがゆえの限

表 1. ショウジョウバエ体細胞テストにおける各種細胞毒物の活性

	テ ス ト 系		
	DNA 修復	w^i 四重複眼色復帰変異	翅毛スポット
アルキル化剤			
Methylmethanesulfonate	+	+	+
Diethylnitrosamine	+	+	+
クロスリンク剤			
Diepoxybutane	+	+	+
Mitomycin C	+	+	+
UV 型変異原			
Aflatoxin B ₁	+	+	+
Furylfuramide	+	+	+
インターカレート剤			
9-Aminoacridine	+	+	+
ラジカル形成剤			
Procarbazine	+	+	+
Bleomycin	+	+	+
核酸前駆体合成阻害剤			
5-Fluorouracil	+	ND	+
Methotrexate	+	ND	+
RNA 合成阻害剤			
Actinomycin D	—	—	+
紡錘体毒			
Vincristine	—	—	+
Demecolcin	—	—	+

+: 陽性, —: 陰性, ND: 未決定

界を有することは明らかである。RNA 合成阻害剤の actinomycin D や紡錘体毒の vincristine などの陰性結果 (表 1) がそのような限界を例示する。これらの細胞毒物は、DNA 修復試験でも不活性で、生殖細胞テスト²²⁾や Ames テスト²³⁾の結果も考慮すると、染色体レベルで特異的に毒性を発揮するものと思われる。

翅毛スポットテストで上記の細胞毒物が陽性効果を示すのは、このテストが真核細胞の基本的性質を利用しているので、理にかなっている。Actinomycin D は、RNA 合成阻害を介して DNA 合成を阻害するもので、翅毛スポットテストでは、染色体組換えによるスポットの誘発に著効を示した。一方、紡錘体毒の vincristine や demecolcin は、染色体不分離の結果生ずる異数性によるものと思われる「小さなシングルスロット」の誘発に著効を示した。これらの染色体毒物のみならず、DNA 修復試験でも眼色復帰変異試験でも毒性を発揮するいろいろなタイプの変異原も陽性効果を示すので、翅毛スポットテストは、生物作用が未知な化学物質の変異原性の有無を知るためには、比較的安心して実施できる。なお、このテストで、今まで調べられた化学物質とその結果は、Würgler と Vogel の近著⁸⁾に詳しい。

6. 体細胞テストは役に立つか?

現在世界的に最も普及している変異原検出法は、

Ames テストで、このテストは化学物質の変異原性に関する最大の情報源である。それゆえ、現実には、Ames テストの結果に基づいて下された変異原性の評価が、ヒトに対する危険性をどの程度予測しうるものかが往々にして問題になるし、短期 *in vivo* テストにはその評価の再検討が要求される。この点に関してショウジョウバエの体細胞テストが役に立つかどうかを判断するには、必要な資料、とりわけ、Ames テストで変異原性を示す非発ガン物質の体細胞テストにおける活性についてのデータが決定的に欠けている。しかし、Ames テストにおける変異原のみおとしをチェックする短期 *in vivo* 系として有望視できるだけの材料はある。

その 1. ショウジョウバエの体細胞テストに供された 76 種の発ガン物質のうち 67(88%) が、翅毛スポットテスト、UZ 系を用いる復帰変異試験、 w/w^{co} 系^{*1)}を用いる眼色スポットテストのいずれかで変異原性を示した⁸⁾。

その 2. 下記の発ガン物質は Ames テストでは不活性だがショウジョウバエの体細胞テストでは活性を示す。
() 内は陽性結果をもたらしたテスト系で、W は翅毛スポット、E は UZ 系あるいは w^i 四重複系を用いる眼

*1) 翅毛スポットテスト系と同じ原理を利用して染色体組換えが眼色スポットとして検出できるように工夫してある系。

図8. 各種焼けこげ変異原の突然変異誘発力と発ガン力の比較²⁹⁾

TD₅₀: マウスの肝ガンをも50%の頻度で誘発するのに必要な餌中の検体濃度, MD₁₀: ショウジョウバエの翅毛スポットテストで「小さなシングルスロット」を10%の頻度で誘発するのに必要な餌中の検体濃度, RD₁₀₀₀: サルモネラ TA 100 株の復帰変異コロニーが1,000 個/プレートになるときの前培養液中の検体濃度, 1: Trp-P-2, 2: Trp-P-1, 3: IQ, 4: Glu-P-2, 5: Glu-P-1, 6: MeAaC, 7: AaC

色スポットテスト, D は DNA 修復試験.

Actinomycin D (W)

Benzene (W)²⁴⁾

p,p'-DDT (W)^{*2}

Hexamethylphosphoramide (D^{*3}, E²⁵⁾, W²⁶⁾)

Procarbazine (D^{*3}, E²⁶⁾, W⁸⁾)

Safrole (W)²⁴⁾

o-Toluidine (W)²⁴⁾

Urethane (D, E, W)^{*4}

その3. 制ガン剤の多くはヒトの体内でガン細胞に毒性を示すがゆえに薬効が認められている点に着目し, 坂本²³⁾は44種の制ガン剤の変異原性をAmesテスト(A)とショウジョウバエ体細胞テスト(S)で検討して, 下記のような結果を得た. 体細胞テストとして翅毛スポットテストとUZ系を用いる復帰変異試験を実施した.

AとSの両方で陽性……23種

Aで陰性, Sで陽性……11種

AとSの両方で陰性……10種

では, 変異原の怖さの定量的予測に関してはどうであろう. 以下紹介する研究成果が参考になる.

その1. 焼けこげ変異原として得られた heterocyclic amine 類のマウスにおけるガン原性とショウジョウバエ翅毛スポットテストにおける変異原性が強い相関を示した(図8). すなわち, マウスの肝腫瘍を50%の頻度で誘発するときの餌中の検体濃度 TD₅₀ と, 翅毛スポット

テストで「小さなシングルスロット」を10%誘発するときの餌中の濃度 MD₁₀ がかなりよく似た値を示し, 発ガン力(1/TD₅₀)と変異原強度(1/MD₁₀)はともに10倍の幅の中におさまった. Amesテストの結果との比較では, 図8に示しているように, 正常スケールの縦軸のTD₅₀に対して, 復帰変異コロニーを1,000個/プレートの頻度で誘発するのに必要な前培養液中の検体濃度 RD₁₀₀₀ を横軸に対数目盛でプロットしても, 明瞭な相関はみられなかった.

その2. 発ガン性 polycyclic hydrocarbon 類と aromatic amine 類がDNA修復テストで示した構造-活性関係は, マウスやラットで知られている構造-ガン原性関係と一致した(未発表). 図9にはそのような結果の一部を示している. この図から, DNA損傷力は B[a]P ≫ B[e]P, 2-AA ≫ 1-AA, DMBA ≫ B[a]A となり, ベンゼン環配列の違い, アミノ基の位置の違い, 及びメチル基の有無が, 活性の顕著な差をもたらしていることが分かる.

その3. TEM, MMC, ENU, EMSのショウジョウバエ体細胞での変異原強度関係は, (TEM, MMC) > ENU ≫ EMSとなり(図10), マウスのスポットテストの結果²⁷⁾と一致する. TEM, MMC, ENUはマウスの精原細胞でも著しい活性を示す強力な遺伝毒物で²⁸⁾, その強弱関係も(TEM, MMC) > ENUである. Cisplatinがショウジョウバエ体細胞でTEMやMMC以上に強力な変異原であることも明らかになった. マウスの体細胞や精原細胞でも同様であると予測している.

変異原を正當に怖がるのにショウジョウバエの体細胞テストは役に立つと期待してもよさそうだ.

*² 井上裕章, 梁 治子, 藤川和男: 日本環境変異原学会第16回大会講演要旨集 p. 138 (1987).

*³ 藤川和男, 坂本 豊, 菊池康基: 同上 p. 137 (1987).

*⁴ 梁 治子(阪大医)私信.

図9. DNA修復テスト系における同族化合物の活性

縦軸: 処理を受けた Rec⁻ あるいは Rec⁺ 幼虫の成虫期までの相対的生存率, 横軸: [Rec⁻ 雄・Rec⁺ 雌] 株あるいは [Rec⁺ 雄・Rec⁺ 雌] 株の3令幼虫が生育している培地上に滴下した検体けん濁液の濃度

B[e]P: benzo[e]pyrene, B[a]P: benzo[a]pyrene, 1-AA: 1-aminoanthracene, 2-AA: 2-aminoanthracene, B[a]A: benzo[a]anthracene, DMBA: 7, 12-dimethylbenzo[a]anthracene

7. おわりに

Ames テストの開発なくして変異原研究は今日ほどの進歩はみられなかったであろう。われわれが日常摂取する食物にも、飲み物にも、大気中にも、実にさまざまな変異原が存在していることは、このテスト系を駆使した研究で明らかにされたことである。しかし、最近、Ames テストや哺乳動物細胞 *in vitro* 試験は、化学物質のガン原性の予測にあまり役立たないことが指摘され始め^{30)~32)}、短期 *in vivo* テストが従前にも増して重要なもの

図10. 強力な *in vivo* 変異原に対するショウジョウバエ体細胞の突然変異反応¹⁴⁾

縦軸: 成虫雄 100 個体当たりの眼色復帰変異コロニー数, 横軸: w^i 四重複系統の1令幼虫が生育している培地上に滴下した検体溶液の濃度, TEM: triethylenemelamine, MMC: mitomycin C, ENU: ethylnitrosourea, EMS: ethylmethanesulfonate

のとなってきた。環境化学物質の人体影響の評価研究に役立つ短期 *in vivo* テストは、この種の研究が学際的にならざるを得ない性質のものであるため、特別な技術や知識を必要とせず異なる学問的背景をもった研究者らが手軽に実施できる Ames テストのようなものであることが要求される。本稿で紹介した3種のショウジョウバエ体細胞テストはそのような短期 *in vivo* テストの有力候補である。

文 献

- 1) Auerbach, C., Robson, J. M.: Proc. Roy. Soc. Edinburgh B 62, 271~283 (1947).
- 2) 稲垣栄一, 藤川和男: "環境と人体" II p. 123~136 (1983), 東京大学出版会.
- 3) 吉川 勲, 綾木歳一, 大嶋加代子: トキシコロジーフォーラム 7, 409~420 (1984).
- 4) Fujikawa, K.: Japan J. Genetics 57, 569~574 (1982).
- 5) Fujikawa, K., Inagaki, E., Uchibori, M., Kondo, S.: Mutation Res. 122, 315~320 (1983).
- 6) Vogel, E., Blijleven, W. G. H., Klapwijk, P. M., Zijlstra, J. A.: "The Predictive Value of Short-Term Screening Tests in Carcinogenicity Evaluation" p. 125~147 (1980), Elsevier, Amsterdam.
- 7) 梁 治子, 劉 美愛, 藤川和男, 近藤宗平: トキシコロジーフォーラム 8, 587~596 (1985).
- 8) Würzler, F. E., Vogel, E. W.: "Chemical Mutagens" Vol. 10, p. 1~72 (1986), Plenum Press, New York.
- 9) Graf, U., Würzler, F. E., Katz, P. G., Frei, H., Juon, G., Hall, C. B., Kale, P. G.: Environ. Mutagen. 6, 153~188 (1984).
- 10) 藤川和男, 梁 治子, 近藤宗平: 環境変異原研究. 6, 107

- ~113 (1984).
- 11) Rasmuson, B., Svahlin, H., Rasmuson, Å., Montell, I., Olofsson, H.: *Mutation Res.* **54**, 33~38 (1978).
 - 12) Rasmuson, B., Westerberg, B. M., Rasmuson, Å., Gvozdev, B. A., Belyava, E. S., Ilyin, Y. V.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**, 545~551 (1981).
 - 13) Fujikawa, K., Kondo, S.: *Genetics* **112**, 505~552 (1986).
 - 14) Green, M. M., Todo, T., Ryo, H., Fujikawa, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6,667~6,671 (1986).
 - 15) Nguyen, T. D., Boyd, J. B., Green, M. M.: *Mutation Res.* **63**, 67~77 (1979).
 - 16) Boyd, J. B., Harris, P. V., Presley, J. M., Narachi, M.: "Cellular Response to DNA Damage" p. 107~123 (1983), Alan R. Liss, New York.
 - 17) Harris, P. V., Boyd, J. B.: *Biochim. Biophys. Acta* **610**, 116~129 (1981).
 - 18) Brown, T. C., Boyd, J. B.: *Mol. Gen. Genet.* **183**, 356~362 (1981).
 - 19) 藤川和男: 環境変異原研究 **8**, 69~73 (1986).
 - 20) Graf, U., Würgler, F. E.: "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" in press, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
 - 21) Fujikawa, K., Ryo, H., Kondo, S.: *ibid.* in press.
 - 22) Lee, W. R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Hall, E., Würgler, F. E., Zimmering, S.: *Mutation Res.* **123**, 187~279 (1983).
 - 23) 坂本 豊: 大阪大学医学雑誌 **36**, 407~414 (1986).
 - 24) Würgler, F. E., Graf, U., Frei, H.: "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" p. 325~340 (1985), Elsevier, Amsterdam.
 - 25) Fujikawa, K., Ryo, H., Kondo, S.: *ibid.* p. 319~324 (1985), Elsevier, Amsterdam.
 - 26) Michell, I. de G., Gilbert, J. P., Brice, A. J., White, D. J.: *Carcinogenesis* **2**, 783~786 (1981).
 - 27) Russell, L. B., Selby, P. B., von Hall, E., Sheriden, W., Volcovic, L.: *Mutation Res.* **86**, 355~379 (1981).
 - 28) Russell, L. B., Selby, P. B., von Hall, E., Sheriden, W., Volcovic, L.: *ibid.* **86**, 329~354 (1981).
 - 29) Yoo, M. A., Ryo, H., Todo, T., Kondo, S.: *Japan J. Cancer Res.* **76**, 468~473 (1985).
 - 30) Shelby, M. D., Stasiewicz, S.: *Environ. Mutagen.* **6**, 871~878 (1984).
 - 31) Johnson, F. M., Snell, M. L.: *Cancer Invest.* **4**, 271~280 (1986).
 - 32) Tennant, R. W., Margolin, B. H., Shelby, M. D., Zeiger, F., Haseman, J. K., Spalding, J., Caspary, W., Stasiewicz, S., Anderson, B., Minor, R.: *Science* **236**, 933~941 (1987).