

## *In Vivo* における生体内物質とニトロソ化合物の 複合作用に関する研究

平良昌彦, 藤井智子, 松井久美, 長門谷博子, 張美和, 宇治田純子,

濱本宏子, 田上雅美, 高橋希美, 谷川由美子, 黒木博美

(武庫川女子大学家政学部食物学科)

## The Combined Effects of Vital Substances and Nitroso Compounds on Mutagenicity *in Vivo*

Masahiko Taira, Tomoko Fujii, Kumiko Matui, Hiroko Nagatoya,

Miwa Tyo, Junko Ujita, Hiroko Hamamoto, Masami Tanoue,

Kimi Takahasi, Yumiko Tanigawa, and Hiromi Kuroki

*Department of Food Sciences, Faculty of Home Economics,*

*Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan*

Nitroso compounds are formed easily under physiological conditions, but are not so carcinogenic as might be expected from the amount formed. Based on the assumption that a factor must exist that modifies the carcinogenicity of these compounds, this study was made.

Through this study, TA1535, The most sensitive strain of the model compound MNNG, not requiring metabolic activation, was found; the detection density threshold of 1  $\mu\text{g}/\text{p}$  was determined. This study produced a new finding; in the presence of toxic elements such as cadmium and mercury, or even non-toxic elements such as calcium and magnesium, the mutagenicity of MNNG is multiplied at a density level equal to or below the threshold value.

A micro-nucleus test was established as a system allowing continuous tracing of *in vivo* mutagenicity in the same animal. Aiming at extrapolation to human beings, the model compounds were integrally studied by adding an SCE test using human lymphocytes, which was a mutagenicity test carried out as an intermediate step between *in vivo* and *in vitro*.

Then a study was made using DMN (dimethylnitrosoamine) model compounds. Food-derived amine and nitrite, dimethylamine and nitrite, vitamin C, NaCl, and DMN-positive control, and normal food-control were administered to mice for 90 days; changes in body weight, compound intake level, water intake volume, and feed intake level were measured every week. After autopsy, body organ weight ratio, blood free radical density, and blood peroxide density were measured. *In vivo* mutagenicity was continually traced by micro-nucleus testing of peripheral blood at 30-day intervals, but due to the great intra-class variation, analysis was difficult.

Nitroso reaction of intestinal flora is necessary for nitrosamines to be formed under neutral or weak alkaline conditions like those in the intestines. Little is known about the role of intestinal flora. It will be necessary to clarify that role, while at the same time analyzing the degree of intervention of nitrosamines in colon cancer, breast cancer, and other human cancers.

## 緒言

ニトロソ化合物は、生理的条件下において容易に生成する。しかし、その生成量から予測されるほど発癌は起っていない。そこで、この化合物による発癌を修飾している因子の存在を考え、本研究に着手した。代謝活性化を必要としないモデル化合物 N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (以下 MNNG) の最も鋭敏な菌株, TA1535 を見出し、検出濃度の閾値  $1\mu\text{g/p}$  を決めた。この研究過程で MNNG は、閾値以下の濃度においてカドミウム、水銀の毒性元素はもちろん非毒性元素カルシウム、マグネシウムなどの 2 価の陽イオン存在下で MNNG の変異原性に対して相乗作用のあることを新知見として得たので、そのメカニズムについて、ESR (電子スピン共鳴) により検討したところ・OH ラジカルは補足できたが、そのメカニズムの解明は出来ていない。

*In Vivo* における変異原性を同一個体で継続的に追跡できる系としての末梢血を用いる小核試験を確立した。次に、ヒトへの外挿を目的にモデル化合物について *In Vivo* と *In Vitro* の中間系としての変異原性試験であるヒトリンパ球を用いた SCE 試験を加え、総合的に検討した。

そして、ジメチルニトロソアミン (以下 DMN) モデル化合物を用いた研究を実施した。

マウスに 1) 食事由来のアミンと亜硝酸塩、2) ジメチルアミンと亜硝酸塩、3) ビタミン C、4) 食塩、5) DMN (陽性対照) と 6) 普通食 (対照) を 90 日間与え、体重の変化、薬物摂取量、水摂取量、餌摂取量、については毎週測定した。解剖時には体臓器重量比、血液中フリーラジカル濃度、血液中過酸化脂質濃度を測定した。更に 30 日毎にマウスの末梢血を用いる小核試験により *In Vivo* の変異原性を継続的に追跡した。しかし、級内変動が大きく、解析は困難であった。研究-1 カドミウムの MNNG の変異原性に対する相乗作用

MNNG の変異原性に対して、カドミウムイオンを中心に数種の二価イオンがその変異原性を修飾することを明らかにした。

方法 エームス試験: 検体と S-9mix (加えないものにはリン酸緩衝液) と前培養したサルモネラ菌 TA1535 および TA100 を  $37^\circ\text{C}$  で 20 分間ブレインキューベーション、常法通り、寒天平板上に生じたリバートコロニー ( $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ ) をカウントすることにより検定した。DNA 致死感受性試験: *E. coli* の 4

株① WP2( $\text{uvrA}^+$ ,  $\text{recA}^+$ ), ② WP2uvrA( $\text{uvrA}^-$ ,  $\text{recA}^+$ ), ③ CM571( $\text{uvrA}^+$ ,  $\text{recA}^-$ ), ④ WP100( $\text{uvrA}^-$ ,  $\text{recA}^-$ ) を寒天平板上に放射状に塗布し、中心に試料を含ませたディスクを置き、 $4^\circ\text{C}$  で 24 時間拡散させ、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養後、阻止幅を測定することにより検定した。

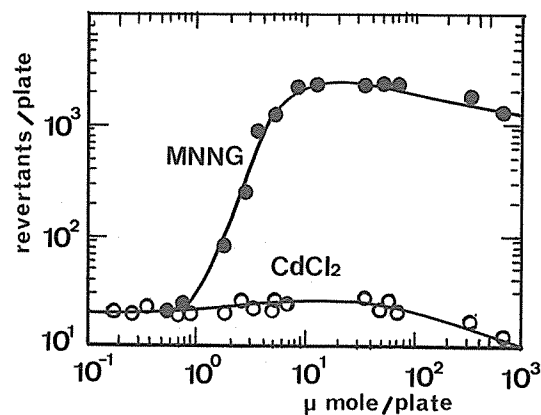


Fig. 1. Mutagenicity of MNNG and  $\text{CdCl}_2$  in salmonella typhimurium TA1535.

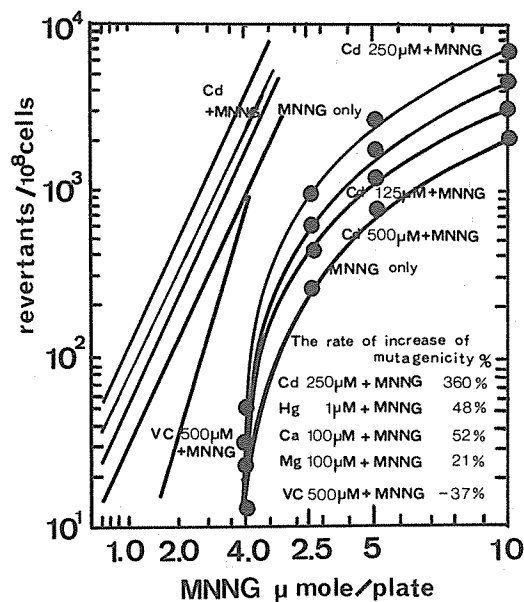


Fig. 2. Combined effects of  $\text{CdCl}_2$  and MNNG on mutagenicity.

Table 1. Result of DNA repair test (Rec assay) by MNNG, CdCl<sub>2</sub> and mixture of MNNG and CdCl<sub>2</sub>

Sample	①WP2	②WP2urA	③CM571	④WP100	③/②
Control	0	0	0	0	
Kanamycin (0.7mg/disk)	18.4	18.2	19.2	19.8	
AF-2 (0.5μg/disk)	5.0	16.0	23.0	28.0	1.4
MMC (10μg/disk)	2.8	13.2	18.0	21.6	1.4
CdCl <sub>2</sub> (500μg/disk)	3.4	4.2	5.2	4.7	2.5
MNNG (50μg/disk)	3.0	4.5	20.4	24.8	4.5
CdCl <sub>2</sub> (500μg/disk)→MNNG (10μg/disk)	5.4	4.6	15.2	15.3	2.8
MNNG (10μg/disk)→CdCl <sub>2</sub> (500μg/disk)	3.8	4.2	15.2	13.2	3.6
CdCl <sub>2</sub> (500μg/disk) + MNNG (10μg/disk)	5.0	4.6	14.0	15.4	3.0

## 結果および考察

N-ニトロソアミンの変異原性は一般にDNAのアルキル化機構が考えられている。アスコルビン酸はMNNGのTA1535株に対する変異原性を大きく阻害するが、これはメチルラジカルが、DNAと結合する以前にアスコルビン酸と結合してしまうからと考えられる。このように自然界には変異原性や発癌性を阻害する物質も存在しているが、反対に微量のCd<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>がその変異原性を増強することは重大な意味をもつものと思われる<sup>1)</sup>。

これらの作用にはラジカルの関与する可能性が示唆されるので、つづいてESRによるラジカルの検討をおこなった結果、・OHラジカルは補足できたが、そのメカニズムの解明は困難であった。

## 研究-2 末梢血 (peripheral blood) を用いる小核試験及びSCE試験

離乳したばかりのマウスに被検物質を投与し、末梢血 (peripheral blood) の塗抹標本を常法通り作成し、蛍光下で観察、小核を有する赤血球の出現頻度の増加から、被検物質の染色体異常誘発能を推定するもので、同一固体の追跡を可能にし、ヒトのCytogenetic monitoringとして期待がもてた。さらに、ヒトへの外挿を目的にモデル化合物について*In Vivo*と*In Vitro*の中間系としての変異原性試験であるヒトリンパ球を用いたSCE試験を加え、総合的に検討した。

方法 小核試験 ① Weanling マウス雄 (約10gB.W.) に所定濃度に溶解した被検物質を所定量腹腔内投与し、所定時間後、②動物を固定筒で固定し、尾静脈から血液が自然に湧出するように、できるだけ細い注射針 (25G) で穿刺し、マイクロピペット (5μl用) で約3μl採血する。③スライドガラス上にあらかじめ

ウシ胎児血清を小滴 (3~4μl) のせておき、この上に採血した血液約3μlをのせ、カバーガラスを約30°~45°の角度で接触させ、血液と血清をよく混和させ、塗抹する。④塗抹した標本は、十分に乾燥させ、無水メタノールで1分間固定し、風乾する。⑤染色液は、Absolute Methanol 1pt (473.2ml), Wright's (powder) stain 1.7g, Gimsa powder 0.17gで溶解したものを1週間~1ヶ月放置後、Whatman No2濾紙で濾過したWright-Gimsa液を用いた。すなわち、固定した標本の上に染色液をのせ7分間放置する。その後この上に、pH6.8リン酸緩衝液 (1/15M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:1/15M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>=1:1) を等量重層し、さらに6分間放置し、水洗する。この際、色素顆粒などが標本表面に付着しないよう注意して洗い流す。⑥観察法はSchmidの方法に準じた。すなわち、1個体につき2000個の多染性赤血球 (PCE) を観察し小核を有するPCEを計数する。また、同時にPCEと正染性赤血球 (NCE) の割合も観察する。あるいは、アクリジンオレンジ (A.O.) の0.1%水溶液を用意する。これを、上記リン酸緩衝液で30倍希釈して使用する。固定後の標本を1分間染色し、蛍光顕微鏡下で蛍光状態をチェックしながら緩衝液で洗浄しカバーガラスの周囲をシールする。励起フィルターにはBG-12、吸収フィルターには0-530を使用して観察する<sup>2)</sup>。

## 結果および考察

ギムザ法で小核が青紫色に染まるのに対してA.O.法では黄緑色の蛍光を発する。また、ギムザ法ではPCEは青く染まり、NCEは桃色に染まるがA.O.法ではPCEは橙赤色の蛍光を発するのに対しNCEは蛍光を発しないため識別はぎわめて容易である。マイトマイシンC(MMC), 3mg/kg ip投与で細胞1000個あたり6~12, ビンクリスチン(VCR), 0.1mg/ml ip投与で細胞1000個あたり5~10, 自然

(平良, 藤井, 松井, 長門谷, 張, 宇治田, 濱本, 田上, 高橋, 谷川, 黒木)

**Table 2.** The spontaneous micronucleus rate and the induced micronucleus rate in peripheral blood

Chemicals	Dose	Observed number of cell (number of animals and slides)	Polychromatid erythrocytes			Normochromatid erythrocytes		Polychromatid erythrocytes
			hemacytes <sup>1)</sup>	micronucleus <sup>2)</sup>	hemacytes/ micronucleus <sup>3)</sup>	micronucleus	hemacytes/ micronucleus	Normochromatid erythrocytes
spontaneous		(8,80) 199660	22962	78	0.003	354	0.002	0.115
MMC <sup>4)</sup>	0.1	(2,7) 18450	2214	6	0.003	7	0.001	0.12
	1.0	(2,9) 23178	3245	53	0.016	18	0.001	0.14
	1.5	(2,18) 44514	6232	287	0.046	115	0.003	0.14
	3.0	(2,12) 30550	6110	233	0.038	94	0.004	0.20
	6.0	(2,23) 56672	6234	245	0.039	68	0.001	0.11
	10.0	(2,23) 57166	3430	70	0.020	30	0.001	0.06
VCR <sup>4)</sup>	0.063	(2,25) 61214	4285	22	0.005	113	0.007	0.07
	0.125	(2,45) 116316	69779	156	0.022	185	0.002	0.06
	0.250	(2,24) 59076	3840	157	0.041	290	0.005	0.07

1)number of hemacytes 2)number of micronucleus  
3)2)/1) 4)24hour treatment of MMC and VCR(i·p)

小核出現頻度は, 細胞 1000 個あたり 0~3 (平均 2.3) で骨髓細胞の増殖抑制の指標となる全赤血球に対する多染性赤血球の比率は, 2~5% (平均 4.3) をえた<sup>3)</sup>.

**方法** SEC 試験 5% 仔牛血清入りイーグル MEM 培地に対数増殖期にある V-79 細胞を  $5 \times 10^5$  となるよう播種し, 24 時間培養後 BUDr16 $\mu$ M, 及び, 検体を DMSO に溶解後添加し, 40 時間の培養を行なった. ただし, DMSO 最終濃度は 1% 以下になるようにした. 培養終了 2 時間前に colcemid 0.25 $\mu$ M を添加し, 常法通り Air-dry 法により標本を作成後, FPG 法により染色を行ない SCE 頻度を分析した. ヒトの採血は早朝空腹時に施行し, ヘパリン添加の注射器で溶血には十分気をつけ, 採血し試料とした.

SCE 頻度の測定は 25% 仔牛血清入り RPMI 1640 培地に採血した血液 0.5ml を加え, 24 時間培養後 BUDr 16 $\mu$ M を添加し, 72 時間の培養を行なった. ただし, 培養終了 2 時間前に colcemid 0.25 $\mu$ M を添加, 常法通り Air-dry 法により標本を作成後, FPG 法により染色を行ない SCE 頻度を分析した.

#### 結果および考察

MNNG を 0.75 $\mu$ M, 1.5 $\mu$ M, 3.0 $\mu$ M 含む培地で 2 サイクル V-79 細胞を培養し SCE 頻度を求め,  $Y=9.25X+16.6$  の回帰式をえた. 遺伝子の変化の総合的な指標として, 現在注目されているのが Sister chromatid exchange(SCE) である. すなわち, 化学

物質によって遺伝子上の損傷を与えた結果, aberration よりもより感度が高く認められる現象で, 生体内の細胞でも培養中の細胞でも測定可能であることは, 両者を比較する意味で興味もたれる.

spontaneous なレベル (background レベル) としてマウスやラットでは, 若齢と高齢の材料ではほとんど差がなく, 自然の状態では SCE は, 細胞老化に無関係な変化といえる. しかし, その細胞にある種の mutagen (例えばマイトマイシン C など) を加えると SCE が誘導され, その際に, 明らかに加齢の効果が現われる. すなわち, 老齢の donor から得た細胞の方が, 若齢の donor から得た細胞の SCE より誘導率が低い値を示している. このことが何を意味しているかについては, SCE の機構自体が十分解明されなければ説明することができない.

#### 研究-3 In Vivo におけるニトロソ化反応を修飾する因子

1) 食事由来のアミンと亜硝酸塩, 2) ジメチルアミンと亜硝酸塩, 3) ビタミン C, 4) 食塩, 5) DMN (陽性対照) と 6) 普通食 (対照) を 90 日間マウスに与え, In Vivo の変異原性および血液中フリーラジカル濃度, 血液中過酸化脂質濃度を継続的に追跡した.

**方法** 1) 食事由来のアミンと亜硝酸塩, 2) ジメチルアミンと亜硝酸塩, 3) ビタミン C, 4) 食塩, 5) DMN (陽性対照) と 6) 普通食 (対照) を 90 日間与

え、30日毎にマウスの末梢血を用いる小核試験により、*In Vivo*の変異原性を継続的に追跡した。さらに、体重の変化、薬物摂取量、水摂取量、餌摂取量、についても毎週測定した。解剖時には、体臓器重量比、血液中フリーラジカル濃度、血液中過酸化脂質濃度を測定した。

#### 結果および考察

級内変動が大きく、解析は困難であった。腸内のような中性または弱アルカリ条件下でニトロソアミンが産成されるためには、腸内菌のニトロソ化反応が必要である。これらそれぞれの腸内菌の役割については、まだほとんどわかっていない。今後、これらの点を明らかにしなければならない<sup>4,5)</sup>。

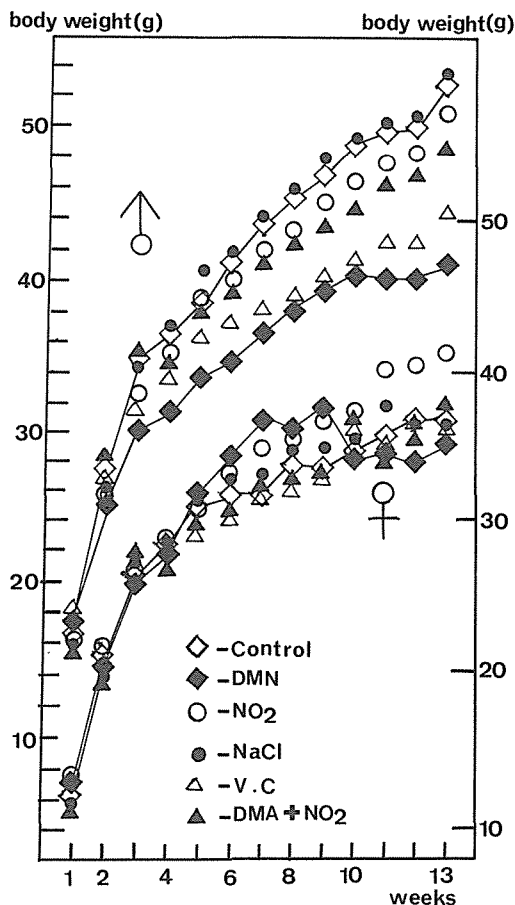


Fig. 3. Increase curve in body weight.

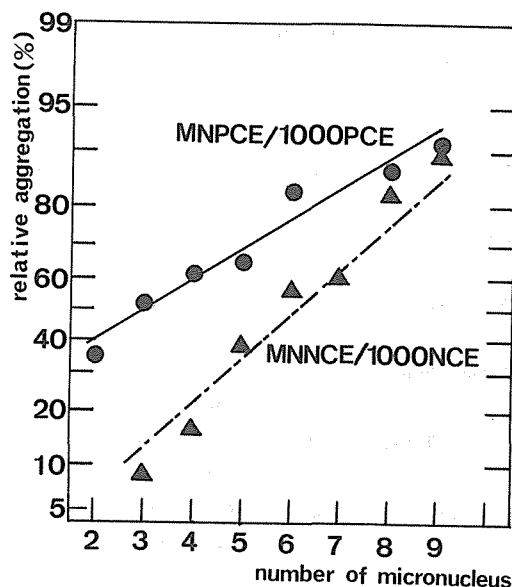


Fig. 4. Frequency distribution of the spontaneous micronucleus.

#### まとめ

代謝活性化を必要としないモデル化合物 MNNG の最も鋭敏な菌株、TA1535 を見出し、検出濃度の閾値  $1\mu\text{g/p}$  を決めた。この研究過程で MNNG は、閾値以下の濃度においてカドミウム、水銀の毒性元素はもちろん非毒性元素カルシウム、マグネシウムが存在すると MNNG の変異原性に対し相乗作用のあることを新知見として得た。次に *In Vivo* における変異原性を同一個体で継続的に追跡できる系としての末梢血を用いる小核試験を確立した。次にヒトへの外挿を目的にモデル化合物について *In Vivo* と *In Vitro* の中間系としての変異原性試験であるヒトリンパ球を用いた SCE 試験を加え総合的に検討した。そして、DMN モデル化合物を用いた研究を実施した。

1) 食事由来のアミンと亜硝酸塩、2) ジメチルアミンと亜硝酸塩、3) ビタミン C、4) 食塩、5) DMN (陽性対照) と 6) 普通食 (対照) を 90 日間マウスに与え体重の変化、薬物摂取量、水摂取量、餌摂取量、については毎週測定した。解剖時には体臓器重量比、血液中フリーラジカル濃度、血液中過酸化脂質濃度を測定した。更に 30 日毎にマウスの末梢血を用いる小核試験により *In Vivo* の変異原性を継続的に追跡した。しかし、級内変動が大きく、解析は困難であった。

腸内のような中性または弱アルカリ条件下でニトロソアミンが産成されるためには、腸内菌のニトロソ化

(平良, 藤井, 松井, 長門谷, 張, 宇治田, 濱本, 田上, 高橋, 谷川, 黒木)

**Table 3.** Chemical intake, the ratio of organ weight to body weight, the density of free radicals and lipid peroxides in the blood.

Experimental groups, chemicals	Concentration ppm	Total intake for 90 days mg	mg/kg B.W/day (B.W)	Total water intake for 90 days ml	Total food intake for 90 days g	The ratio of liver	The ratio of line	The ratio of kidney	Free radicals $\times 10^{15}$ spins/ml	Lipid peroxide MDA (nmol/ml)
Control	♂		(52.9)	680.4	414.9	3.93	0.19	1.15	1.25	4.82
	♀		(36.0)	691.1	345.1	4.21	0.28	1.15	2.97	5.92
Dimethyl nitrosamine	20 ♂	12.0	3.2(41.2)	600.7	321.3	4.25	0.36	1.19	1.57	6.32
	♀	10.4	3.3(35.2)	515.2	261.3	5.17	0.37	1.21	1.28	5.53
Sodium Nitrite	200 ♂	131.4	28.5(51.2)	657.1	389.2	4.14	0.20	1.25	3.26	7.40
	♀	126.9	34.3(41.1)	634.6	326.8	4.19	0.24	1.16	4.20	5.00
Sodium Chloride	200 ♂	123.6	25.6(53.6)	618.3	422.5	3.99	0.31	1.29	2.61	7.11
	♀	153.5	46.6(36.6)	768.0	346.7	4.43	0.27	1.34	2.38	5.20
L(+)-Ascorbic Acid	10000 ♂	3955.1	987.5(44.5)	395.5	355.3	3.77	0.22	1.19	2.45	8.28
	♀	3289.1	1041.4(35.2)	329.9	303.6	4.19	0.28	1.26	7.72	6.71
Dimethyl aniline + Sodium Nitrite	20 ♂	13.3	3.0(48.7)	633.3	391.8	4.39	0.20	1.40	3.66	5.89
	200 ♀	132.7	30.3							
		13.3	3.9(36.6)	663.3	391.8	4.24	0.29	1.16	1.42	6.43
		130.4	39.6							

反応が必要である。これらそれぞれの腸内菌の役割については、まだほんの一部しかわかっていない。今後、これらの点を明らかにしていくと同時に、ニトロソアミンがはたして大腸癌、乳癌などのヒトの癌にどの程度寄与するか、動物実験などで追求することが必要である。

(本研究は昭和 62 年度, 63 年度及び平成元年度文部省科学研究費補助金(課題番号 62580066)を受けて行ったものである)

## 文 献

- 1) 平良昌彦, 西和子, 井ノ上一子, 藤井智子, 武庫川女子大学紀要, **35**, 373-377(1987).
- 2) 平良昌彦, 藤井智子, 日本衛生学雑誌, **43**, 125(1988).
- 3) 平良昌彦, 藤井智子, 松井久美, 日本公衆衛生雑誌, **35**, 489(1988).
- 4) 平良昌彦, 藤井智子, 日本公衆衛生雑誌, **36**, 851(1989).
- 5) 平良昌彦, 藤井智子, 日本衛生雑誌, **45**, 297(1990).