# サルモネラ-肝細胞システムを用いての芳香族アミンのDNA傷害性と変異原性の検討


| メタデータ | 言語: jpn |
| --- | --- |
| | 出版者: |
| | 公開日: 2017-10-04 |
| | キーワード (Ja): |
| | キーワード (En): |
| | 作成者: 林, 暁 |
| | メールアドレス: |
| | 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/8163 |

金沢大学十全医学会雑誌　第98巻　第6号　1248－1258（1989）

# サルモネラ－肝細胞システムを用いての芳香族アミンのDNA 傷害性と変異原性の検討

金沢大学医学部薬理学講座（主任：正印　達教授）
林　　暁

（平成1年12月16日受付）

芳香族アミンである 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline (IQ) および 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) の代謝活性化系路は主に，肝ミクロゾームや肝ホモジェネートのS-9 分画を代謝活性化系とするサルモネラ法 (Ames 法) により研究されてきた．著者は IQ または Trp-P-2 が同時に受ける，活性化と不活性化の2方向の代謝の影響の総合的な結果を調べるために，サルモネラ－肝細胞システム：(Salmonella/hepatocyte system, S/H システム) を用いた．S/H システムでは，サルモネラ菌と単離した肝細胞を一緒にインキュベートして，バクテリアにおける変異原性と，単離肝細胞に対する DNA 損傷性を同時に検出することが出来る．肝細胞は，cytochrome P-450 誘導物質に感受性の強い arylhydro-carbon 応答性の C57BL/6N マウスから単離した．正常単離肝細胞を用いた実験では，IQ および Trp-P-2 はともに明らかな *Salmonella typhimurium* strain TA98 (TA98) の変異原性を示したのに対して，その DNA 損傷はわずかであった．Cytochrome P-448 の強力な誘導物質である 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 前処置により，IQ および Trp-P-2 の変異原性は著しく増加し，また，TCDD 投与マウスからの単離肝細胞に対して，両者とも強い DNA 傷害作用を示した．IQ および Trp-P-2 の変異原性は cytochrome P-448 の特異的な阻害剤である α-Naphthoflavone (ANF) により強く抑制された．これらの結果から，S/H システムにおいても Ames 法と同様，IQ および Trp-P-2 の活性化代謝は cytochrome P-448 依存性の N-hydroxylation が第一ステップであること，そして，これら IQ および Trp-P-2 の生体内での毒性や発癌性が cytochrome P-450 系の代謝活性酵素の活性や組成を変える薬物により，大きな影響を受けることが示唆された．

**Key words** サルモネラ－肝細胞システム，アルカリ溶出法，単離肝細胞，変異原性，DNA 損傷

環境中に存在する種々の発癌性ないし変異原性物質を，短期間かつ安価にスクリーニングする方法として，*Salmonella typhimurium* や *Escherichia coli* の変異株を用いてその変異原性を検出する微生物を用いた突然変異テストがある．これらの検出法のうち特に Ames ら[1)2)] により開発された histidine 要求性の *Salmonella typhimurium* strain TA98 や *Salmonella typhimurium* strain TA100 の復帰突然変異を検出する Ames 法が一般的な方法である．多くの発癌物質は動物細胞のミクロゾーム分画の酵素により代謝活性化を受けて，DNA と反応する最終発癌物質になるが，バクテリアには発癌物質を代謝活性化する酵素が多くの場合存在していない．このため，肝ミクロゾームや肝ホモジェネートの S-9 分画を代謝活性化系として，

Abbreviation: ANF, α-Naphthoflavone; IQ, 2-amino-3-methyl-imidaz-[4,5-f] quinoline; S/H システム, Salmonella/hepatocyte system; TA98, *Salmonella typhimurium* strain TA98; TCDD, 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; Trp-P-2, 3-amino-1-metyl-5H-pyrido[4,

変異原性物質およびバクテリアとインキュベートすることにより変異原性を検出している．しかしながら，これらの発癌・変異原性物質は，生体内において，活性化と不活性化の2方向に代謝されること，また活性化代謝物の一部は体内の標的分子(主に DNA)と反応し発癌の引き金となり，一方，活性代謝物のうち蛋白質などの非標的高分子と結合したものは解毒されることが知られている．肝ミクロゾームや肝ホモジェネートの S-9 分画を用いた従来の Ames 法では，発癌物質の活性化代謝系路のみ強調されて，実際に生体内で惹起されていると考えられる不活性化代謝系路を含めた解毒代謝機構 (detoxification) が多くの場合反映されていない欠点がある．この欠点を補うために，肝ミクロゾームや肝ホモジェネートの S-9 分画の代わりに，活性化代謝および不活性化代謝の両者を備えている正常単離肝細胞を用いた Ames の変法がおこなわれている．本論文では，この Ames の変法に加えて，Kohn らにより開発されたアルカリ溶出法を併用して，変異原性と同時に，単離肝細胞の DNA 損傷を検出することの出来るサルモネラー肝細胞システム：Salmonella/hepatocyte system (S/H システム) を用いて[3)4)]芳香族アミンの DNA 傷害性，変異原性につき検討することを目的とした．S/H システムとは図1に概説したが，単離肝細胞をホスト細胞，バクテリアを標的細胞として，バクテリアに対する変異原性と同時に単離肝細胞の DNA 損傷をアルカリ溶出法 (alkaline elution) により検出する方法である．更に，S/H システムでは，ホスト細胞を単離肝細胞のみならず培養細胞等の他の細胞に置き換えることも出来るし，酵素誘導物質や阻害剤 (inhibitor) によりホスト細胞における発癌・変異原性物質 (化学物質) の代謝系路に様々な修飾を加えることが出来る利点がある．このようにして，S/H システムにおいて得られた結果より下記のことを知ることができる．すなわち，1) 化学物質がホスト細胞内で代謝をうけた後に，標的細胞に起こした変異原性，2) 化学物質のホスト細胞内で受ける代謝 (活性化代謝と不活性化代謝) のバランス，3) 化学物質が代謝を受けた後にホスト細胞に与える DNA 損傷の程度，4) 化学物質がホスト細胞で代謝を受けて生じた代謝産物の安定性，つまり，(a) 代謝産物が主にホスト細胞の DNA に損傷を与えるだけなのか，(b) ホスト細胞から遊出されて標的細胞の DNA に損傷を与えるだけの十分な安定性をもっているかなどである．

本論文では，発癌・変異原物質として，最近注目されている食品中に含まれている発癌性 heterocyclic amines である 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f] quinoline (IQ) と 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole (Trp-P-2) を用いた．両者とも，私達の日常，身近に接触する物質でありその発癌機序の解明が急務とされている物質である．そして，本論文では，両者の変異原性および DNA 損傷の程度を S/H システムに

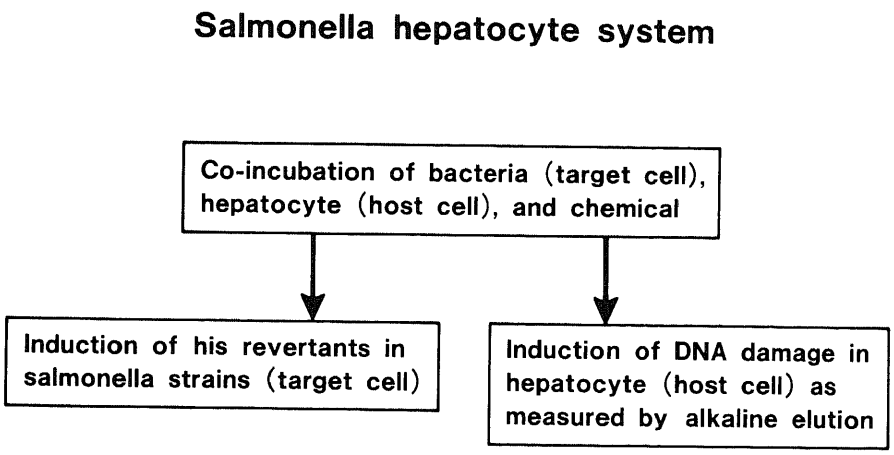
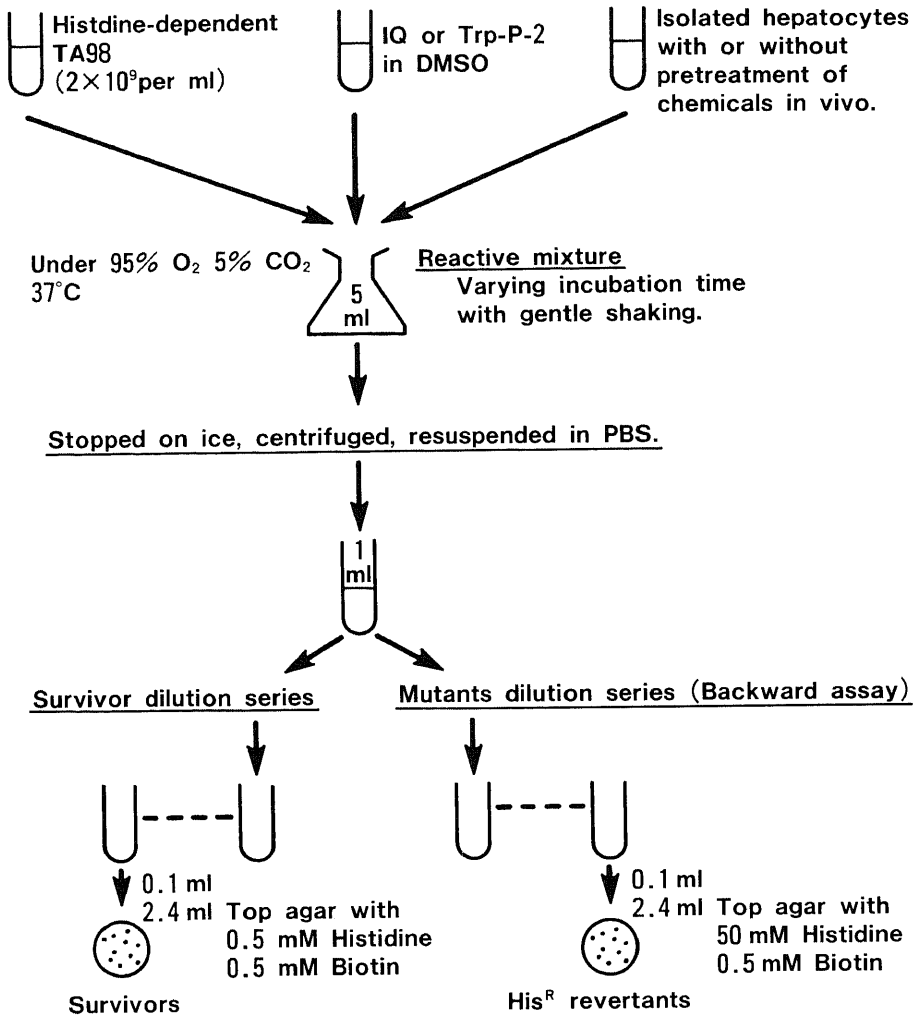



Fig. 1. Schematic representation of Salmonella/hepatocyte system.

3-b] indole; DMSO, dimethyl sulfoxide; PBS, phosphate-buffered saline; FCS, fetal calf serum; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; SDS, sodium laury salfate; WME, William Medium E




$$\text{Mutation frequency } (\text{His}^R/10^7) = \frac{\#\ \text{His}^R \times 10^7}{\#\ \text{Survivors}}$$

(R : revertants)

Fig. 2. Schematic representation of mutagenicity assay in the Salmonella/hepatocyte system. Formation and release of mutagenic intermediates from IQ or Trp-P-2 into the incubation media were determined by incubating freshly isolated hepatocytes and IQ or Trp-P-2 in the presence of *Salmonella typhimurium* strain TA98. Hepatocytes ($1\times10^6$) in 5ml of phosphate-buffered saline were incubated with gentle shaking with 50$\mu$ g of various concentrations of IQ or Trp-P-2 and $2\times10^9$ TA98 under an atomosphere of 95% oxygen: 5% carbon dioxide at 37°C for up tp 90 min. After incubation hepatocytes were rapidly cooled down to 0~5°C and spun down at 55*g* for 5min. The supernatants were then centrifuged at 10,000*g* for 20min and pellets contained TA98 were suspended in 10ml of cold PBS (pH 7.2), and recentrifuged at 10,000*g* for 20min. The washed TA98 pellets were then resuspended in 0.1ml PBS, and aliquots were plated in top agar. Following mutagenesis assay was carried out according to Ames et al[1] with slight modifications.

おいて明らかにして，その代謝系路に考察を加えた結果を総括し，今後も簡便にして汎用性の広い S/H システムが試験管内だけでなく，生体内も含めた他の生物資料ならびに化学物質の発癌・変異原性検出に応用することの可能性について報告する．

## 対象および方法

### I．実験動物

実験には，体重 20～25g の純系 C57BL/6N 雄マウス (B6 マウス，National Institutes of Health Animal Supply, Bethesda, Md.) を使用し[5]，2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, Dow Chemical co., Midland, Mich.) はコーンオイルに溶解し実験開始 48hr 前に 56$\mu$g/kg 腹腔内投与した．IQ および Trp-P-2 は実験開始 4hr 前に dimethyl sulfoxide (DMSO, Fisher Scientic Co., Pittsuberg, Pa.) に溶解して 10mg/kg 腹腔内投与した．

### II．ミクロゾームの調製

動物は一昼夜絶食させた後，断頭屠殺し，すみやかに肝を摘出した．摘出した肝はただちに氷冷した緩衝液 (potasium phosphate KCI 緩衝液 pH 7.4) につけ，ハサミで細切し，よく洗った後に，肝の重量の 3 倍量の緩衝液を加えてホモジェナイズした．以下の操作はすべて 0～4℃でおこなった．ホモジェナイズした肝は9,000$g$ 20分間遠心後，その上清を105,000$g$ 60分間超遠心し，30% Glycerol を加えた0.4M sodium phosphate 緩衝液 (pH 7.35) で再浮遊し—80℃で保存した．蛋白質量は Lowry 法[6]で定量した．ミクロゾームの代謝活性化能の確認は，既知の変異原性物質である 2-acetylamino-fluorene (Eastman Organic Chemical Co., Rochester, N. Y.) により，TA98 を用いた Ames 法でその変異原性の発現を測定し，変異原性陽性のものを以後の実験に用いた[7]．

### III．肝細胞の単離

肝細胞の単離は Klauning らの方法[8][9]より，灌流液として0.05% collagenase (collagenase Type II, Worthington Biochemical Co., Freehold, N. J.) を添加した Williams Medium E (WME, Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Y.) を用いた．肝細胞の凝集は0.01% DNA ase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) により抑制した．灌流後，肝細胞に 0.05%グルコース添加 WME を加えて 500rpm で 2 分間遠心し，さらに同じ操作をくりかえし，単離肝細胞を得た．単離肝細胞の生存率は trypan blue で染色し光学顕微鏡下で算定した．実験には生存率90%以上を示す単離肝細胞を用いて，肝細胞単離後 1 時間以内に実験を開始した．

### IV．変異原性検出法

1．Ames 法

変異原性の検出は Ames らの方法[1]より，以下の操作はすべて無菌的におこなった．0.4M sodium phosphate 緩衝液 (pH 7.4) に，70mM $MgCl_2$, 130mM KCI, 0.5mM biotin, 0.5mM histidine を加えた溶液を，完全に溶解した Top agar (0.6% Difco agar, 0.5% NaCl) に，9：1の割合でよく混合して45℃で保温する．この Top agar 2.2ml に，0.1ml TA98 (2～3×$10^9$ bacteria/ml), 0.1ml の DMSO に溶解した IQ または Trp-P-2, 更に0.1ml ミクロゾームと0.1ml NADPH (Sigma Chemical Co.) 溶液を加えて混合し，寒天平板の上に注ぎ，手早く広げて37℃ 48時間暗室でイキュベートする．TA98 のヒスチジン要求性がヒスチジン非要求性 ($His^R$) となる復帰突然変異のコロニー数は，コロニーカウンター (Count-All model 60, Fisher Scientic Co.) で数えた．変異原性の抑制効果は，50$\mu$l の $\alpha$-Naphthoflavone (ANF,

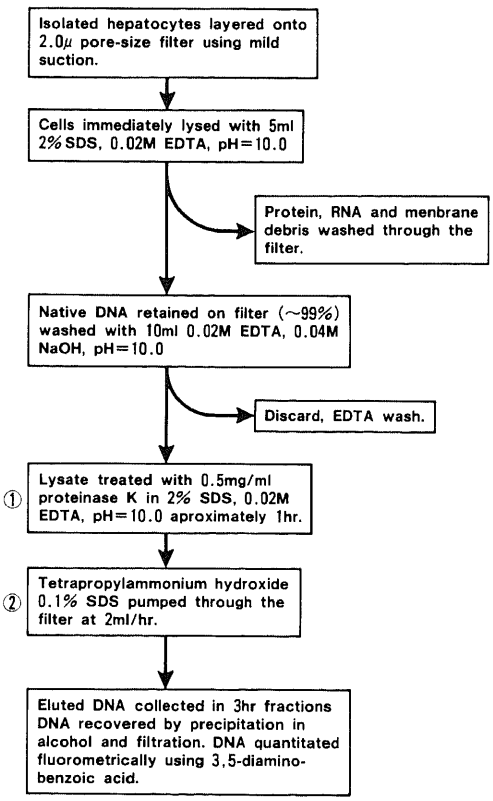



Fig. 3. Schematic representation of alkaline elution.

Aldrich Chemical Company., Milwaukee, Wis.) をTA98らとともにTop agarに加えて混合し，寒天平板に注ぐ操作を加えることにより検出した．なお，TA98はカリフォルニア大学バークレー校のAmes博士より，IQおよびTrp-P-2は国立ガンセンターの佐藤茂秋博士より分与して頂いた．

2．S/Hシステム

実験はThorgeirssonらの方法[4)10)]より行い，その概略を図2に示した．$1\times10^6$個の単離した肝細胞を浮遊させた5mlのphosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) に，50μlのTA98 ($2\times10^9$ bacteria/ml) と50μlのIQまたはTrp-P-2 DMSO溶液を加え，95% $O_2$と5% $CO_2$の混合気下で，ゆっくりと揺すりながら37℃でインキュベートする．インキュベート後，ただちに0～5℃に冷却し，55g 5分間遠心する．肝細胞が除去されTA98だけとなった上清を10,000g 20分間遠心して出来たTA98のペレットを10mlのPBS (pH 7.2) にかくはん浮遊し，更に10,000g 20分間遠心した後のペレットに0.1mlのPBS (pH 7.2) を加えTA98浮遊液を作る．以後の操作はAmes法と同じであるが，図2に示したようにMutation frequencyを求めるため，生存TA98細胞数の測定に0.5mM, $His^R$ TA98細胞数測定に50mMヒスチジン濃度のTop agarをそれぞれ用いた．変異原性の抑制効果の検出は，以下の操作で行った．$1\times10^6$個の単離した肝細胞を浮遊させた5ml PBS (pH 7.2) に50μlのANFを加え，95% $O_2$と5% $CO_2$の混合気下で，10分間ゆっくりと揺すりながら37℃でプレインキュベート

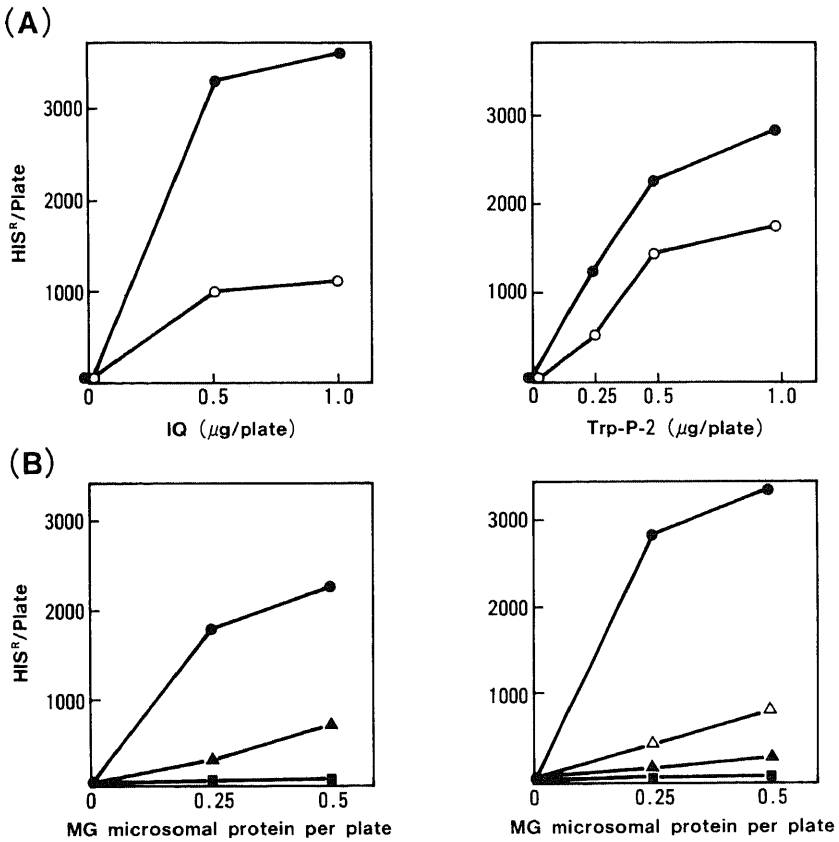



Fig. 4. (A) Mutagenic activation of IQ or Trp-P-2 in Ames assay using microsomes from livers of untreated C57BL/6N min (○), or TCDD treated mice (●). TCDD (50μg/kg ip) was administered 48 hr prior to isolation of hepatocytes. (B) Efect of α-Naphthoflavone (ANF) on mutagenicity of IQ or Trp-P-2 in Ames assay using liver microsomes from TCDD treated mice. Dose of ANF: ●, 0μM; △, 5μM; ▲, 10μM; ■, 100μM.

する．肝細胞はプレインキュベート後ただちに500rpm で 2 分間遠心沈殿させ，5ml PBS (pH 7.2) に浮遊させ，trypan blue の算定で生存率90%以上を示す肝細胞を用いて，ひきつづき，上記の変異原性検出の実験を行った．

**V．アルカリ溶出 (Alkaline elution)**

この方法は Kohn らにより開発され[11)12)]，本実験では蛍光々度計により DNA 検出を行う Erickson らの方法によった[13)]．概略を図 3 に示した．すなわち，$1.2\times10^6$個の単離した肝細胞を浮遊させた 5ml PBS (pH 7.2) に，50$\mu$l の IQ または Trp-P-2 DMSO 溶液を加え，95% $O_2$と 5 % $CO_2$の混合気下でゆっくりと揺すりながら37℃で60分間インキュベートした後，0～5℃に冷却した約 10ml の 5 % fetal calf serum (FCS, Grand Island Biological Co.) を含む WME を加え，4 分間 55$g$ で遠心した．沈殿した肝細胞は，上清を除去した後に，約 10ml の同じ FCS 添加 WME でサスペンドして，実験開始まで 0 ～ 5 ℃に保った．肝細胞浮遊液を，2.0$\mu$m 細孔のポリクロライドフィルター (Millipore Type BSWP 02500, Millipore Corp., Bedford, Mass.) に静かに注いだ後，ただちに0.02M $Na_2$ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)，0.10M glycine を含んだ 10ml の 2 % sodium laury salfate (SDS) 溶液 (pH 10.0) をフィルターに注ぎろ過させた．この操作により，肝細胞は溶解して，DNA の水素結合が切れて一本鎖となった DNA がフィルター上に残った．続いて，約 10ml の 0.2M EDTA を含んだ0.04MNaOH 溶液 (pH 10.0) を用いてフィルター上の一本鎖 DNA を洗いろ過し，更に，0.5mg/ml proteinase K (E. M. Laboratory,

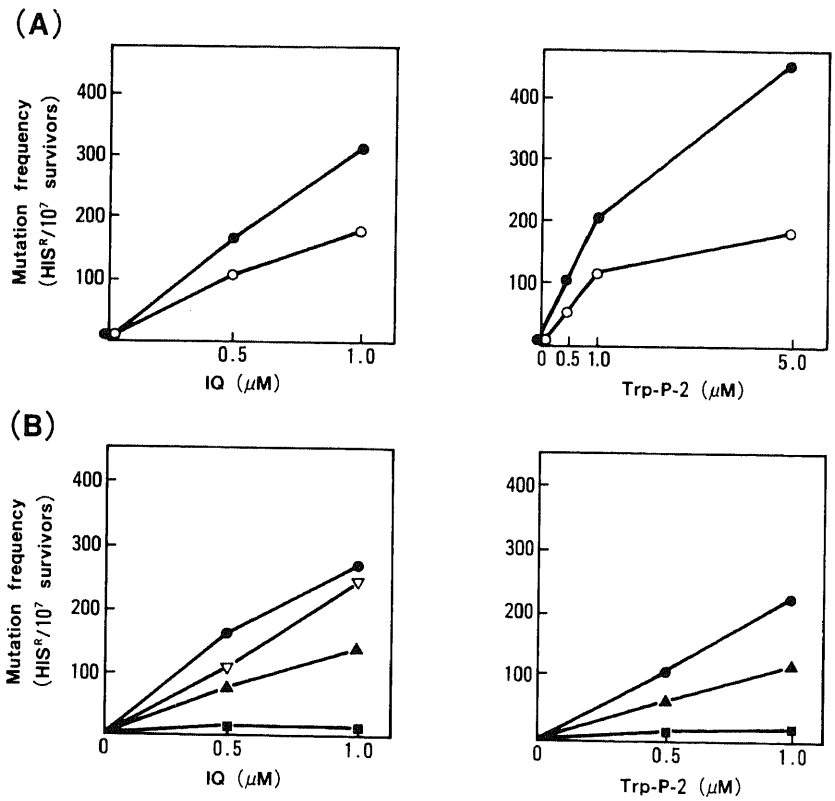



Fig. 5. (A) Mutagenicity of IQ or Trp-P-2 in the Salmonella/hepatocyte system. TA98 were incubated with the compound and hepatocytes ($1\times16^6$ cells in 5ml) from untreated C57BL/6N mice (O), or TCDD treated mice (●). (B) Effect of ANF pretreatment on the mutagenicity of IQ or Trp-P-2 in the Salmonella/hepatocyte system. The hepatocytes were incubated with ANF 10min prior to addition of IQ or Trp-P-2, and TA98. Dose of ANF ; ●, O$\mu$M ; △, 5$\mu$M ; ▲, 10$\mu$M ; ■, 100$\mu$M.

Elmosford,N. Y.), 0.02M EDTA, 0.10M glycine を含んだ2％ SDS 溶液 (pH 10.0) で，洗浄した．このフィルター上の一本鎖 DNA にアルカリ溶液を連続的に流すことにより，IQ または Trp-P-2 により損傷を受けた DNA の部位は切断される．一本鎖切断を多く含む DNA は，その分子量が小さいためフィルターを通過し易くなる．このため，フィルター上の一本鎖 DNA に tetrapropyl-ammonium hydroxide (RSA Co., Ardsley, N. Y.) により pH 12.1に調整した0.02 M EDTA を含んだ0.1% SDS 溶液を連続的に 2ml/hr の速度でフィルターを通過させ，その溶出液を3時間毎に15時間まで5回経時的にサンプリングした．15時間の時点でフィルターも回収する．このようにして経時的にサンプリングした溶出液中の DNA の量とフィルター上に残った DNA の量を測定することにより，初期損傷を示す DNA 単鎖切断を高感度に検出することが出来る．DNA の量は，Farrand Ratio-2 flurometer (FOCI Co., Valhalla, N. Y.) を使用して，Erickson らの方法[13]に従い測定した．

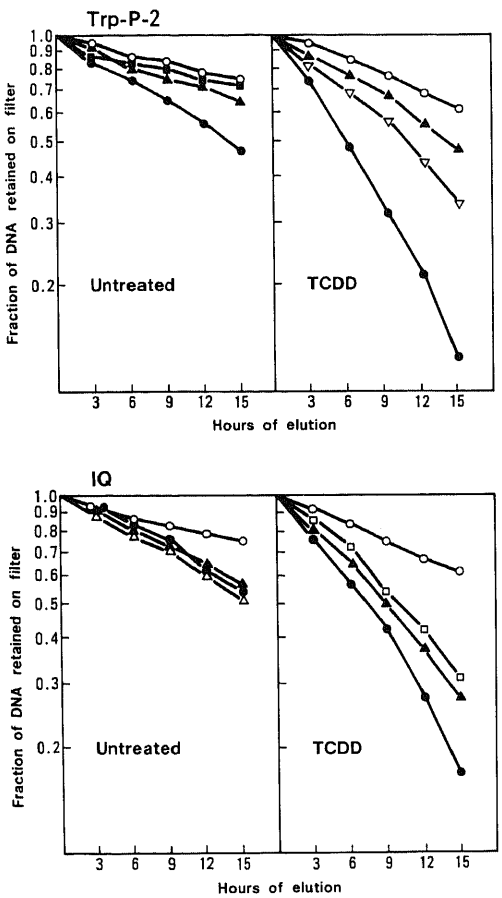



Fig. 6. DNA damage induced by IQ or Trp-P-2 in hepatocytes from CB57BL/6N mice. Cells were incubated for 60min in the presence of various concentrations of IQ or Trp-P-2. Data shown are from one representative experiment. TCDD treatment was performed as descrided in the legend to Fig. 4. Concentration of IQ or Trp-P-2: ○, 0μM; □, 1μM; ■, 5μM; ▲, 10μM; ▽, 25μM; ●, 50μM; △, 100μM.

## 成　　績

### I．変異原性

無処置および TCDD 前処置 B6 マウスの肝ミクロゾームを用いた Ames 法の結果を図4に示した．IQ, Try-P-2 ともに明らかに用量依存的な変異原性を示し，TCDD 前処置群は無処置群に比べて IQ では約4倍，Try-P-2 では約2倍の高い変異原性を示した．なお，この変異原性は Cytochrome P-448 に特異的な阻害剤である α-Naphthoflavone (ANF) 10μM で IQ は約70%，Trp-P-2 は約90%の変異原性は抑制され，100μM ではほぼ完全に抑制された．単離肝細胞を用いた S/H システムにおいても肝ミクロゾームを用いた Ames 法と同様に用量依存的な変異原性を示し，その変異原性は TCDD 前処置で増強され ANF によって抑制された (図5)．

### II．DNA 損傷

S/H システムの肝細胞 DNA をアルカリ溶出法により測定した (図6)．無処置マウスからの肝細胞を用いた時は DNA 損傷の程度は IQ, Try-P-2 ともに，わずかであったが，TCDD 前処置マウスからの肝細胞においては両者とも，明らかな用量依存的な DNA 損傷を認めた．なお，30，60，90分のインキュベーション間には，ともに時間と DNA 損傷について有意の差を認めなかった (データは示していない)．更に IQ および Try-P-2 の生体内投与時の DNA 損傷を調べるため，肝細胞単離4時間前に，IQ 10mg/kg, Try-P-2 10mg/kg を未処置および TCDD 前処置マウスの腹腔内に投与した．IQ および Try-P-2 投与により，両者ともに，未処置マウスでは軽度の DNA 損傷が認められたが，TCDD 前処置マウスにおいては，DNA 損傷の明らかな増強が認められた (図7)．

## 考　　察

環境中の発癌因子のなかで食習慣による因子の占める割合は大きい．最近，食品中に含まれる発癌・変異原性物質として一群の heterocyclic amine が注目さ

れている[14~16]これら heterocyclic amine はアミノ酸や蛋白質の熱分解物であり，魚や肉の焼け焦げの部分から分離することが出来る．これら heterocyclic amine は，Ames 法で強い変異原性を示し動物実験において主に肝臓癌を生じさせる．IQ および Try-P-2 は heterocyclic amine であり，特に IQ は，既知の変異原物質の中で単位重量あたりの変異原性活性の最も強いものの一つである．事実，TA98 を使う Ames 法では，最強と言われる発癌物質である aflatoxin $B_1$ よりも変異原性がさらに強い[15] IQ および Trp-P-2 も含めた幾つかの heterocyclic amine は肝臓のみならず種々の臓器に癌を生じさせる[17~19]．Heterocyclic amine の活性化代謝の第一ステップは，cytochrome P-448 依存性の N-hydroxyration と考えられている[20]．著者は単離肝細胞を用いて IQ ならびに Trp-P-2 の変異原性および DNA 損傷について検索した．なお，肝細胞は cytochrome P-450 誘導物質に感受性の強い arylhydrocarbon 応答性の C57BL/6N マウス (B6 マウス) から単離した．実験結果より IQ および Trp-P-2 の Ames 法により示される変異原性と，S/H システムにより測定される変異原性には密接な関連が認められた．特に IQ に関する肝ミクロゾームを用いた実験では，Yamazoe ら[21]によって cytochrome P-448$II_a$ (Yamazoe らの分類の P-448II の high-spin 型) により IQ は活性化代謝を受けて直接の変異原性物質である 2-N-hydroxy IQ に代謝させることが報告されている．本実験でも，cytochrome-P-448 の強力な誘導物質である TCDD により Ames 法および S/H システムのいずれの方法でも IQ および Trp-P-2 の変異原性が増強され，cytochrome-P448 に特異的な阻害剤である ANF により変異原性が抑制されたことから，S/H システムにおいても Ames 法と同様に IQ および Trp-P-2 の活性化代謝は cytochrome P-448 依存性の N-hydroxylation が第一ステップであることが示唆された．最近，変異原性を検出する実験系において，代謝活性系として用いられる肝ミ

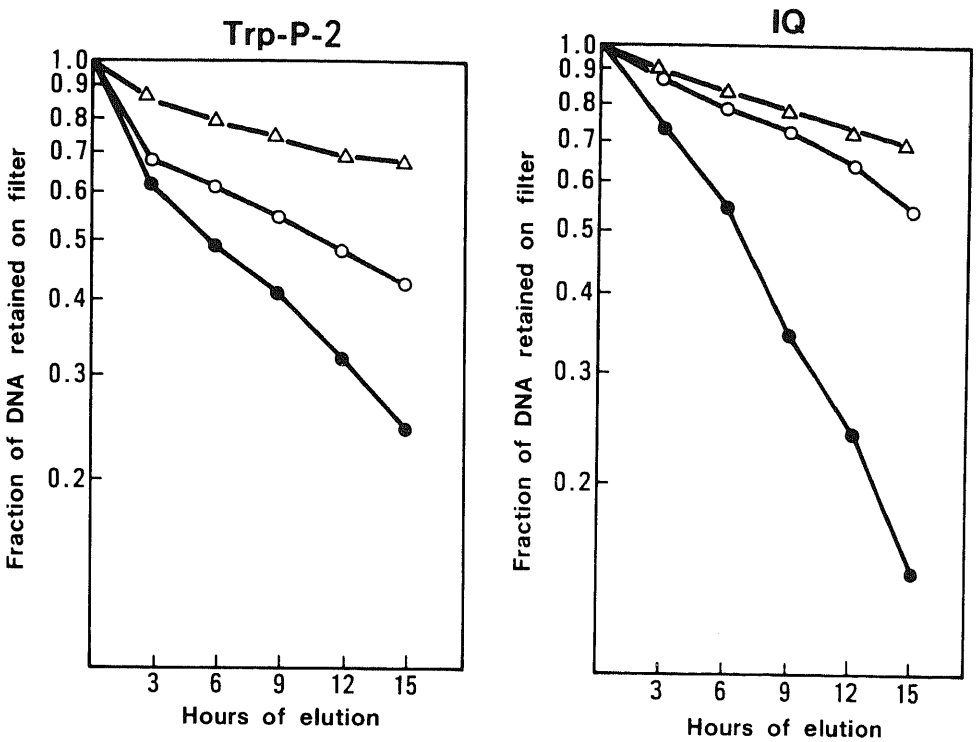



Fig. 7. DNA damage induced in hepatocytes from C57BL/6N mice *in vivo* by IQ or Trp-P-2. Animals were given an ip injection 4 hr before isolating hepatocytes of IQ (10mg/kg body weight) or Trp-P-2 (10mg/kg body weight). TCDD treatment was performed as described in the legend to Fig. 4.: △, control; ○, test compound only (IQ or Trp-P-2); ●, TCDD+test compounds (IQ or Trp-P-2).

クロゾームや肝ホモジェネートおよび単離肝細胞の量が重要な因子であることが報告されている[22)~24)]．しかし，無処置および TCDD 前処置マウスから単離肝細胞を$0.5\times10^6$～$1.5\times10^6$細胞の範囲で量を変えて試みたが，IQ および Try-P-2 の変異原性に対しては何らの影響も認められなかった．そのため，本実験系では$1.2\times10^6$個の単離肝細胞を使用した．IQ および Trp-P-2 は試験管内で単離肝細胞の DNA を損傷し，その DNA の損傷は TCDD 前処置マウスからの単離肝細胞を用いると明らかに増強した．更に IQ および Trp-P-2 の生体内での DNA 損傷も TCDD 前処置マウスが，未処置マウスに比べて高値を示した．ANF による損傷の抑制効果を検出する実験は，ANF 自身が単離肝細胞の DNA 損傷を誘起するため行うことが出来なかったが，すくなくとも生体内および生体外の両者において cytochrome P-448 依存性の N-hydroxylation が IQ および Trp-P-2 による DNA 損傷を誘起させる重要な経路であることを示唆している．更に，IQ および Trp-P-2 の DNA 損傷作用を検出するためには，それらの変異原性を検出するために必要な量に比べて，およそ10倍以上の量を必要とした．このことは，heterocyclic amines は強い変異原性を示すが，発癌性はその変異原性の強さから当初予期されたよりはるかに小さかったことに関連しているものと思われる[15)]．Yamazoe ら[21)]は，2-N-hydroxy-IQ が PBC (polychlorinated biphenyl) 前処置ラットより得たミクロゾームによりさらに非変異原性物質へと不活性化されてゆく可能性を報告している．単離肝細胞内に生成された IQ の活性代謝物が更に代謝されて解毒されるのか，DNA 損傷を与える前に他の生体高分子と結合してしまうのか，あるいは，それ以外の機序によって不活性されるのかについては今後の検索が必要であろう．

## 結　　論

S/H システムは，生体内条件に近い正常単離肝細胞を用いて，発癌・変異原物質の変異原性と同時に DNA 損傷を検出する簡便にして汎用な実験系である．本論文では S/H システムを用い日常身近に接触する発癌性物質として注目を集め，その発癌機序の解明が急がれている IQ ならびに Try-P-2 の heterocyclic amines につき実験しその代謝経路に考察を加えた．その結果

1．単離肝細胞を用いて行った変異原性試験 (S/H システム) において，ICDD 前処置により変異原性は著しく増加した．この変異原性は cytochrome P-448 の特異的な阻害剤である ANF により強く抑制された．

2．これらの結果は，ミクロゾーム系を用いた Ames 変異原性試験の結果と一致した．

3．IQ および Trp-P-2 は正常単離肝細胞に対して軽度な DNA 傷害作用しか示さなかったが，TCDD 投与マウスからの単離肝細胞に対しては強い傷害作用を示した．同様な結果はマウスに投与したときにも認められた．

以上の結果から，IQ および Trp-P-2 は肝細胞内で cytochrome P-448 により N-hydroxylation を受け，DNA を損傷すると共に，一部は細胞外に遊出し，サルモネラ菌に変異を引き起こすものと考えられた．このように，S/H システムはより生体に近い環境下での変異原・発癌性を考慮した場合には有用な手段であり，今後の発展が期待されるものといえよう．

## 謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました正印達教授に深甚なる謝意を表します．また，始終，御指導，御教示を頂きました川尻博男先生に心から感謝いたします．

## 文　　献

1) **Ames, B. N., Macann, J. & Yamasaki, E.:** Method for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutat. Res., **31,** 347-364 (1975).

2) **Macann, J., Choi. E., Yamasaki, E. & Ames, B. N.:** Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella microsome test. Assay of 300 chemicals. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA., **72,** 5135-5139 (1975).

3) **Green, M. H. L., Bridges, B. A., Rogers, A. M., Horspool, G., Muriel, W. J., Bridges, J. W. & Fry, J. R.:** Mutagen screening by a simprified bacterial fractation test. Use of microsomal preparation and whole liver cells for metabolic activation. Mutat. Res., **48,** 287-294 (1977).

4) **Staiano, N., Erickson, L. C. & Thorgeirsson, S. S.:** Bacterial mutagenicity and host cell DNA damage by chemical carcinogens in the Salmonella/hepatocyte system. Biochem. Biophys. Res. Commun., **94,** 837-842 (1980).

5) **Thorgeirsson, S. S., Felton, J. S. & Nebert, D. W.:** Genetic differences in the aromatic

hydrocarbon-inducible N-hydroxylation 2-acetylaminofluorene and acetaminophen produced hepatotoxicity in mice. Mol. Pharmacol., **11**, 159-165 (1975).

6) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.:** Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).

7) **Sakai, S., Reinhold, E. R., Wirth, P. J. & Thorgeirsson.:** Mechanism of in vitro mutagenic activation and covalent binding of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in Isolated liver cell nuclei from rat and mouse. Cancer Res., **38**, 2058-2067 (1978).

8) **Klauning, J. E., Goldblatt, P. W., Hinton, D. E., Lipsky, M. M., Chacko, J. & Trump, B. F.:** Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. In vitro, **17**, 913-925 (1981).

9) **Seglen, P. O.:** Preparation of rat liver cells. III Enzymatic Requirement for tissue dispersion. Exp. cell. Res., **82**, 391-398 (1973).

10) **Satiano, N., Erickson, L. C., Smith, C. L., Marsden, E. & Thorgeirsson, S. S.:** Mutagenicity and DNA damage induced by arylamines in the Salmonella/hepatocyte system. Carcinogenesis, **4**, 161-167 (1983).

11) **Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewing, R. A. G. & Friedman, C. A.:** Fraction of DNA from mammalian cells by alkaline elution. Biochemistry, **15**, 4629-4637 (1976).

12) **Kohn, K. W., Ewing, R. A. G., Erickson, L. C. & Gwelling, L. A.:** Measurement of strand breaks and cross-links by alkaline elution. In E. C. Friedberg & P. C. Hanawalt (eds.), DNA repair: A Laboratory Manual of Recent Procedures, 1st., p 379-401, Macer Dekker, New York, 1981.

13) **Erickson, L. E., Osieka, R., Sharkey, N. A. & Khon, K. W.:** Measurement of DNA damage in unlabeled mammalian cells analyzed by alkaline elution and fluorometric assay. Anal. Biochem., **106**, 167-174 (1980).

14) **Sugimura, T.:** Mutagens, carcinogens, and tumor promotors in our daily food. Cancer, **49**, 1970-1984 (1982).

15) **Sugimura, T.:** The Ernst W. Bertner memorial award lecture. Tumor initiation and promotors associated with ordinary foods. In M. A. Arnott, J. ran Eys, & Y. W. Wang, (eds.), Molecular Interactions of Nutrition and Cancer, 1st., p 3-24, Raven press, New York, 1982

16) **Sugimura, T., Nagao, M. & Wakabayashi, H.:** Mutagenic heterocyclic amines in cooked food. In H. Eagan, L. Fishbein M. Castegnao, I. K. O'Neil, H. Bartsch, & W. Daivis (eds.), Environmental Carcinogens-Selected Method and Analysis, 1st., p 251-267,IARC Sci. Publ., Lyon, No 40, 1981.

17) **Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., Sugimura, T. & Takayama, S.:** Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolysate. Science, **213**, 346-347 (1981).

18) **Sugimura, T.:** Diet and cancer. Recent advance in cancer control. In S.Yamagata, T. Hirayama & S. Hisamichi (eds.), Excerpta Medica, 1st., p 63-72, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1983.

19) **Takayama, S., Masuda, M., Mogami, M., Ohgaki, H., Sato, S. & Sugimura, T.:** Induction of cancer in the intestine, liver, and various other organs of rat by feeding mutagens from glutamic acid pyrolysate. Gann., **75**, 207-213 (1984).

20) **Kato, R., Kamataki, T. & Yamazoe, Y.:** N-hydroxyration of carcinogenic and mutagenic aromatic amines. Environ. Health Perspect., **49**, 21-25 (1983).

21) **Yamazoe, Y., Simada, M., Kamataki, T. &Kato, R.:** Microsomal activation of 2-amino-3 methylimidazo (4.5-f) quinoline, a pyrolysate of sardine and beef extracts, to a mutagenic intermediate. Cancer Res., **43**, 5768-5774 (1983).

22) **Ishii, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T. & Kato, R.:** Metabolic activation of mutagenicity tryptophan pyrolysis products by rat liver microsomes. Cancer Res., **40**, 2596-2600 (1980).

23) **Gayda, D. P. & Pariza, M. W.:** Activation of 2-amino-3-methylimidazo (4.5-f) quinoline and 2-aminofluorene for bacterial mutagenesis by primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. Mutat. Res., **118**, 7-14 (1983).

24) **Gayda, D. P. & Pariza, M. W.:** Activation

of aflatoxin B by Primary cultures of adult rat hepatocytes. Effect of hepatocyte density. Chem. Biol. Interactions, **35**, 255-265 (1981).

**Genotoxicity and Mutagenicity of Heterocyclic Amines in the Salmonella/Hepatocyte System**

Satoru Hayashi, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med. Soc., 98, 1248—1258 (1989)

**Key words** salmonella/hepatocyte system, alkaline elution, isolated hepatocyte, mutagenicity, DNA damage

## Abstract

The matabolic activation of 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f] quinoline (IQ) and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P-2) have mainly been studied in the Salmonella assay (Ames assay) using subcelullar liver fraction. In order to study the net effect of activation and detoxification processes for IQ and Trp-P-2, I used the Salmonella/hepatocyte system (S/H system). This system is based upon coincubation of isolated hepatocytes with a salmonella test strain, and both the mutation frequency in bacteria and the DNA damage in the hepatocytes can be measured. Hepatocytes from arylhydrocarbon responsive C57BL/6N mice were used for this study. Although IQ and Trp-P-2 showed clear mutagenic activation in the salmonella strain TA98, only a low level of DNA damage was observed. In vivo pretreatment of the mice with the cytochrome P-448 inducer 2, 3, 7, 8, -tetra-chlorocarbon-p-dioxin (TCDD) markedly increased both mutagenic effect and the DNA damage of IQ and Trp-P-2. The mutagenic activation of IQ and Trp-P-2 was completely blocked by the microsomal monooxygenase inhibitor $\alpha$-Naphthoflavone (ANF). These data indicated that cytochrome P-448 dependent N-hydroxylation of IQ and Trp-P-2 is an obligatory step in metabolic activation in both subcellular (Ames assay) and whole cell system (S/H system). It was suggested also that the agents capable of modulating the activity and composition of the cytochrome P-450 system may greatly influence both toxicity and carcinogenicity of IQ and Trp-P-2 *in vivo*.