

遺伝子工学的手法を用いた新しい遺伝毒性試験法の開発

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
能美健彦

Development of novel genotoxicity assays by genetic engineering methods

Division of Genetics and Mutagenesis
National Institute of Health Sciences
Takehiko Nohmi

Novel genotoxicity assays have been developed to efficiently detect the genotoxicity of various environmental chemicals, and to evaluate the potential hazards to man. *Salmonella typhimurium* strains harboring plasmids carrying the genes encoding drug metabolizing enzymes, such as acetyl Co-A O-acetyltransferase, or the strains lacking DNA repair enzymes, such as O⁶-methylguanine DNA methyltransferase, are highly sensitive to the mutagenicity of particular classes of mutagens. Thus, they are widely used for the efficient detection of genotoxicity of complex mixtures. Transgenic mice, named *gpt* delta, have been established for the detection and molecular analysis of mutations in various organs of rodents induced by chemicals. Future perspective of the genotoxicity assays using genetically engineered organisms is discussed.

Keywords: genotoxicity, complex mixture, *Salmonella typhimurium*, transgenic mouse, risk evaluation

はじめに

疫学的調査によればヒトの癌の発生に大きな影響を与える因子の一つは食品であり、また喫煙であるという。こうした食品やタバコに含まれる化学物質が、ヒトのDNAに作用し発がんにおいて重要な役割を果たしていることは想像に難くない。DNAは「生物の設計図」と呼ばれており、生物の形態や機能、すなわち生命を規定している。化学物質がヒトのDNAに変異を起こすと、遺伝情報の変化は我々の体に不可逆的な変化を与え、変異したDNAは次のDNAを作る鋳型として働く。このことは体細胞や生殖細胞に変異が起これば、遺伝的に異なった性質を持つ新しい細胞集団や個体群が生ずることを意味する。癌や遺伝的疾患の発生には、こうした遺伝情報の変化が重要な役割を果たしている¹⁾。本稿で詳述する遺伝毒性試験（変異原性試験とも呼ぶ）とは、「生物の設計図」であるDNAに対する化学物質の作用を調べる試験であると言えるだろう。

遺伝毒性試験に限らず、毒性試験一般ではさまざまな生物が化学物質の作用を調べるために使われる。しかし、こうした生物の多くは「あるがままの生物」であり、必ずしも試験を実施するために最適化されたものではない。このため、化学物質に対する感受性や、試験法としての迅速性、さらに試験結果をヒトへ外挿する際の根拠などに関し問題が存在する。こうした点を乗り越えることを目的に、遺伝子工学、発生工学の手法を用いて、新しい遺伝毒性試験法が開発されてきた。本稿では、微生物からトランスジェニ

ックマウスまで、さまざまな遺伝的改変を施されたテスターを用いる新しい遺伝毒性検出系・評価系について、研究開発の現状を紹介する。

1. 環境変異原の検出と評価

遺伝毒性試験の中心的なテーマは①環境中に存在する変異原を如何に効率よく検出・同定し②ヒトに対する遺伝的影響あるいは遺伝子に対する作用を科学的に推測・評価することにある。

変異原物質は、文字どおり我々の環境中すべてに存在し、我々は不断に変異原に暴露されながら生活している²⁾。したがって大気や水、食品、生体成分に存在する変異原を迅速・高感度に検出し、その動態を明らかにすることは、遺伝毒性試験の重要な役割の一つである。実際、*Salmonella typhimurium*を用いるエームステストを「生物検出器 (Bio-detector)」として用い、これまでに多数の変異原が検出され、その構造が明らかにされている。迅速・高感度な遺伝毒性試験を用いることにより①大気、河川、食品、ヒトの尿や血液に含まれる変異原の高感度モニタリングが可能となり②変異原・発がん物質の代謝活性化機構の研究や③化学構造と変異原活性との相関に関する研究が進歩した。また、検出された新しい変異原物質を合成して実験動物に長期投与することで、その発がん性との相関が追究された例も少なくない。

一方、新たに市場に出される医薬品、化学工業原料、農

薬、食品添加物などは、見方を変えれば新しい環境変異原、環境発がん物質の供給源でもある。したがって、新しく市場に出される物質の多くは、事前に遺伝毒性試験を実施することが求められている。こうした新規化学物質のヒトDNAに対する作用を予知、予測する、すなわち評価することは遺伝毒性試験のもう一つの重要な役目である。評価を行う場合には、上記の *S. typhimurium* 以外に、哺乳類培養細胞やマウスを用いる試験を組み合わせを行い、その結果から実験動物に対する発がん性やヒトに対する影響を推測する。

2. 微生物を用いる変異原検出系の開発

カリフォルニア大学のエームス博士によって開発された微生物を用いる遺伝毒性試験、いわゆるエームステストは、現在でも最も汎用されている遺伝毒性試験法の一つである³⁾。このテストは、テスターとなる *S. typhimurium* を試験化合物と混ぜて最少培地上でインキュベーションし、*his*⁻ (ヒスチジン要求性) から *His*⁺ (ヒスチジン非要求性) へ復帰変異したコロニー数を計測し、試験化合物の変異原性を調べるというものである。また代謝活性化が必要な場合には、薬物で誘導処理したラットの肝臓から調製したホモジェネート (S9) をいっしょにインキュベーションする。エームステストでは遺伝学的にいろいろと工夫された菌株が使われている。除去修復系の欠損 ($\Delta uvrB$)、膜の変異 (*rfa*)、誤りがちDNA修復蛋白質をコードしたプラスミド (pKM101) の導入などがそれである。「エームステストなどの遺伝毒性試験で実験動物に発がん性を示す物質 (rodent carcinogen) を同定できるか」という問いは古くからあり、現在でも議論の続いている点である^{4,6)}。だがエームステストを用いて環境変異原の単離、同定、モニタリングを行うことに異論は少ない。事実、エームステストを用いて数多くの新しい変異原物質、発がん物質が見いだされてきた。エームステストや *umu* テスト⁷⁾ などの微生物を用いる遺伝毒性試験は、環境変異原の検出の面で重要な役割を果たしている。

我々は「検出系としての微生物遺伝毒性試験の価値」を高めることを目的に、遺伝子工学的手法を用いて新しい *S. typhimurium* テスター株を開発してきた (Table 1)。このうちのいくつかのものについて開発の経緯と応用例を紹介する。

3. ニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示す *S. typhimurium* テスター株の開発

ニトロアレーン、芳香族アミンは、いずれも代表的な環境変異原のクラスであり、この中には微生物や哺乳類細胞に対し強い変異原性を示す化合物が少なくない。変異原性を示すニトロアレーンとしては2-nitrofluorene (2-NF), 1,8-

dinitropyrene (1,8-diNP) をあげることができる。変異原性を示す芳香族アミンとしては2-acetylaminofluorene (2-AAF), 2-aminonaphthalene, 2-amino-6-methyldipyrido [1, 2- α : 3', 2'-d]imidazole (Glu-P-1) をあげることができる。こうしたニトロアレーンおよび芳香族アミン系の変異原は、大気、水、食品、ヒトの尿などの complex mixture 中に存在している。Complex mixture 中に含まれるニトロアレーンおよび芳香族アミンの変異原性検出には、従来、*S. typhimurium* TA100, TA98 が汎用されてきた。TA100, TA98 は比較的感受性の高い菌株であるが、環境中に実際に存在する微量のニトロアレーン、芳香族アミンの変異原性を検出するためには、通常、大量のサンプルの採取、抽出が不可欠であり、より高い感受性を示すテスター株の開発が望まれていた。

ニトロアレーンはバクテリアの持つニトロ還元酵素により *N*-水酸化体に還元され、その後 *O*-アセチル転移酵素により活性化され、最終的に生じたニトロニウム・イオンがDNAを攻撃するものと考えられている (Fig. 1)。一方、芳

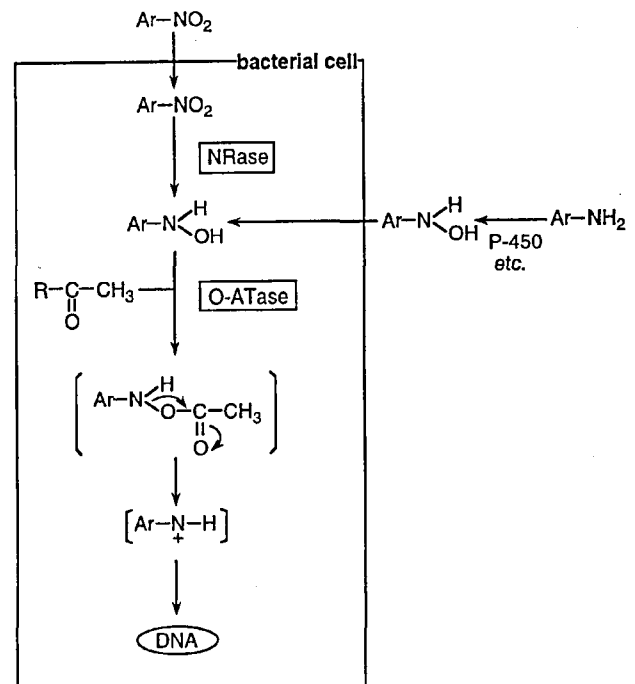


Fig. 1. Metabolic activation pathways of nitroaromatics and aromatic amines in *Salmonella typhimurium*. NRase and O-ATase stand for nitroreductase and O-acetyltransferase, respectively.

香族アミンは微生物細胞の外でS9の中にも含まれるCYP酵素 (cytochrome P-450) などの酸化酵素により *N*-水酸化され、その後 *N*-水酸化体が微生物細胞に入ってから、ニトロアレーンと同一の経路を経てDNAに作用する。したがってニトロ還元酵素とアセチル転移酵素はこれら化合物の変異原性発現の律速因子と考えられる。我々は環境中に存在する微量のニトロアレーン、芳香族アミン系変異原の高感受性検出を目的に、*S. typhimurium* のニトロ還元酵素、アセ

Table 1. Bacterial strains and mammalian cell lines

Strain	Description	Reference
<i>Salmonella typhimurium</i>		
YG1021	As TA98 but has pYG216; nitroreductase overproducer	8
YG1026	As TA100 but has pYG216; nitroreductase overproducer	8
YG1024	As TA98 but has pYG219; acetyltransferase overproducer	10
YG1029	As TA100 but has pYG219; acetyltransferase overproducer	10
YG1012	As TA1538/1,8-DNP but has pYG213; acetyltransferase overproducer	146
YG1041	As TA98 but has pYG233; nitroreductase and acetyltransferase overproducer	12
YG1042	As TA100 but has pYG233; nitroreductase and acetyltransferase overproducer	12
YG2975	As TA1975 but has pKM101	147
YG3001	As TA1535 but is deficient in <i>mutM_{ST}</i>	94
YG3002	As TA1975 but is deficient in <i>mutM_{ST}</i>	94
YG3003	As TA102 but is deficient in <i>mutM_{ST}</i>	94
YG7100	As TA1535 but is deficient in <i>ada_{ST}</i>	83
YG7104	As TA1535 but is deficient in <i>ogt_{ST}</i>	83
YG7108	As TA1535 but is deficient in <i>ogt_{ST} ada_{ST}</i>	83
YG7126	As TA100 but is deficient in acetyltransferase gene	148
YG7127	As TA1535 but is deficient in nitroreductase gene	149
YG7130	As TA98 but is deficient in acetyltransferase gene	148
YG7131	As TA1538 but is deficient in nitroreductase gene	149
YG7128	As TA100 but is deficient in nitroreductase gene	149
YG7132	As TA98 but is deficient in nitroreductase gene	149
YG5144	As TA2659 but is deficient in <i>umuDC_{ST}</i> and <i>samAB</i>	150
<i>Escherichia coli</i>		
YG6020	As DH10B but is $\Delta(gpt-proA)62 cre^+$	112
YG5132	As CC104 but is deficient in <i>mutM</i> and <i>mutY</i>	99
YG5152	As SCS-8 but is deficient in <i>ada</i> and <i>ogt</i>	151
Chinese hamster lung (CHL) cell line		
YG10003	As CHL but is expressing acetyltransferase of <i>S. typhimurium</i>	152
YG10007	As CHL but is expressing human NAT1	152
YG10008	As CHL but is expressing human NAT2	152

チル転移酵素遺伝子のクローニングを行い、それぞれの遺伝子を持つプラスミドを従来からエームテストに用いられてきたTA100, TA98へ導入した。

このようにして作製した菌株が YG1021, YG1024,

YG1026, YG1029である (Table 1)。YG1021, YG1026はTA98, TA100に *S. typhimurium* のニトロ還元酵素遺伝子を持つプラスミド pYG216を導入した菌株であり、このプラスミドのためニトロ還元酵素活性が親株に比べ約50倍増大

している^{8,9)}。YG1024, YG1029はTA98,TA100に*S. typhimurium*のアセチル転移酵素遺伝子を持つプラスミドpYG219を導入した菌株であり、このプラスミドのためアセチル転移酵素活性が親株に比べ約100倍増大している¹⁰⁾。30種類以上の様々な構造の化合物につき、これらの株を用いて試験を行いYG1021,YG1026はニトロアレーンを含む芳香族ニトロ化合物に、YG1024, YG1029は芳香族ニトロ、アミノ化合物から生ずる芳香族ヒドロキシアミノ化合物に対し、特異的に高い感受性を示す菌株であることが明らかにされている¹¹⁾。さらに*S. typhimurium*のニトロ還元酵素とアセチル転移酵素遺伝子の両方を持つプラスミドpYG233をTA98,TA100に導入しYG1041,YG1042を作製した¹²⁾。YG1041,YG1042はTA98,TA100よりも約50倍高いニトロ還元酵素活性を示し、アセチル転移酵素活性も約300倍高い値を示した (Table 1)。これまでに29種類のさまざまな構造を持つ化合物について試験を行い、YG1041,YG1042は変異原性発現のためにニトロ還元酵素とアセチル転移酵素の両方を必要とする芳香族ニトロ化合物に対し、特異的に高い感受性を示すことが明らかにされた。したがってYG1041,YG1042株は complex mixture 中に含まれるニトロアレーンの高感度検出に有効である。

以下に YG1021, YG1024, YG1026, YG1029, YG1041, YG1042を用いて行われた実験例を紹介する (Table 2)。

4. Complex mixture中に含まれるニトロアレーン、芳香族アミンの高感度検出

4.1 大気

Seraら¹³⁾はチリのサンチャゴ由来の大気粉塵中から新しい変異原3,6-dinitrobenzo[a]pyreneを同定し、その変異原性をアセチル転移酵素活性の異なる*S. typhimurium*株 (TA98, YG1024, TA98/1,8-DNP₆)を用いて試験し、アセチル転移酵素活性の高いYG1024が最も高い感受性を示すことを報告した。また、Seraら¹⁴⁾は、ニトロ還元酵素、アセチル転移酵素活性の高くなったYG1021, YG1024, YG1026, YG1029を用い、nitrophenanthrene誘導体の変異原性について構造活性相関を検討している。Houkら¹⁵⁾は東京の大気由来の抽出物について、S9mixによる代謝活性化なしに変異原性を検索し、アセチル転移酵素活性の高いYG1024,YG1029においてより高く変異原性が現れることから、東京の大気の変異原性には芳香族ニトロ化合物の寄与が大きいことを示唆した。Suzukiら¹⁶⁾は東京の樹木の葉についた変異原を有機溶媒で抽出し、S9mixによる代謝活性化なしにYG1021, YG1024を用いて変異原性を検索した。その結果、従来からの株に比べこれらの株でより高い変異原性が検出されることから、大気中のニトロアレーンの存在を示唆した。東京以外に金沢¹⁷⁾、Mexico City (メキシコ)¹⁸⁾、Bohemia (チェコ)¹⁹⁾、Raleigh (米国)²⁰⁾の大

Table 2. Chemicals whose mutagenicities are detected by genetically-engineered bacterial strains or mammalian cells

1. Urban air, tobacco smoke and indoor air

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
Diesel particle extracts	Diesel exhaust	Japan	YG3003	96
PM-10	Airborne particle	Czech	YG1041	155
4-ABP, 4-AABP	Tobacco smoke	U.S.A.	YG1029	156
Tobacco smoke extracts	Cigarette smoke	U.S.A.	YG1024	171
Extracts of diesel exhaust particles	Diesel exhaust	Japan	YG1024	172
Extracts of airborne particles	Indoor air	Japan	YG1021 YG1024 YG1041 YG1042	21
Volatile organic samples	Outdoor air in Raleigh, North Carolina	U.S.A.	YG1021 YG1026	20
Dichloromethane extract of combustion particulate matter	Diesel exhaust	U.S.A.	YG1021 YG1026	175
Incense smoke condensates	Indoor pollution	Taiwan	YG1024	184
Nitrophenanthrenes	Air pollution	Japan	YG1021 YG1026	14
1-NP, 1,8-diNP, 1,3-diNP, 1,6-diNP	Airborne particles	Japan	YG1024	17
1-NP	Diesel exhaust	The Netherlands	YG1021 YG1024	194
Extracts of urban air	Air samples in Mexico City	Mexico	YG1021 YG1024	18
Extracts of urban air	Air samples in Tokyo	Japan	YG1024 YG1029	15
Extracts of woody plants	Leaves of plants in urban area of Tokyo	Japan	YG1021 YG1024	16
3,6-dinitrobenzo[a]pyrene	Air borne particle	Japan	YG1024	13

2. Drinking water, river water and soil

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
PBTA-1, PBTA-2	River water	Japan	YG1024	30
Soil extracts	Soil contaminated with PAHs	U.S.A.	YG1041 YG1042	161
Soil extracts	Creosote-contaminated soil before and after bioremediation	U.S.A.	YG1041 YG1042	162
1,6-diNP, 1,8-diNP	Soil in Osaka	Japan	YG1021 YG1024	163
Water extracts	Drinking water	Czech	YG1041 YA1042	166
PBTA-2	River water	Japan	YG1024	29
PBTA-1	River water	Japan	YG1024	28
Extracts from industrial effluents and river water	Water pollutants	Czech	YG1021 YG1024 YG1041	25
River water extracts	Water from the Chao Phraya river in Bangkok	Thailand	YG1024	24
Extracts of river water	Samples from Katsura River	Japan	YG1024	23
Extracts of river water	Samples from Katsura River	Japan	YG1021 YG1024	22

3. Food

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, Trp-P-1	Food mutagens	Austria	YG1024	154
Milk extracts	Human milk	U.K.	YG1019	158
8-MeIQx, 4,8-diMeIQx, IQ, AαC, Me AαC, PhIP	Food mutagens	Germany	YG1019	160
PhIP	A food mutagen	U.S.A.	YG1024	183
MTCCA	A component of soy source	Japan	YG1029	187
Extracts of several grain-based coffee-substitute blends and instant coffees	Food	U.S.A.	YG1024 YG1029	192
Imidazonaphthyridines Imidazoquinolines	Food mutagens	U.S.A.	YG1024	193
Heterocyclic amines	Food mutagens	Germany	YG1024	31
7,9-DiMeIgQx	Food mutagens	Japan	YG1024	34
4-CH ₂ OH-8-MeIQx				
7,9-diMeIgQx	A food mutagen	Japan	YG1024	33
4,8-diMeIQx	A food mutagen	Japan	YG1024	32

4. Urine

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
Human urine extracts	Patients treated with ointment containing 2% coal tar	Italy	YG1024	39
Human urine extracts	Humans exposed to the combustion product of liquid petroleum gas	China	YG1021 YG1024	40
Hamburger extracts	24 hour post-meal urine	Italy	YG1024	41
Human urine extracts	Effects of fried-meat consumption	U.S.A.	YG1024	42
Human urine extracts	Antimutagenesis study of Tochu tea	Japan	YG1024	179
Human urine extracts	Women working outdoors in Bohemia	Czech	YG1041	19
Human urine extracts	Humans exposed to benzidine	U.S.A.	YG1024	44
Human urine extracts	Urine of tobacco smokers	U.S.A.	YG1024	38
Human urine extracts	Humans exposed to environmental tobacco smoke	Germany	YG1024	37
Human urine extracts	Antimutagenesis study of <i>N</i> -acetylcysteine	Italy	YG1024	185
Human urine extracts	Workers in a glass factory	Italy	YG1024 YG1029	190
Urine extracts of rats treated with 1-NP and 2-NF	Combustion products	The Netherlands	YG1012 YG1024	207
Urine extracts of rats treated with 2,4,6-trinitrotoluene	Occupational exposure	Finland	YG1021 YG1024	43
Human urine extracts	Smokers' urine	Japan	YG1024 YG1021	35
Cigarette smoke condensates Smokers' urines	Main stream cigarette smoke	Italy	YG1024 YG1029	36
Urine extracts of smokers	Polymorphism of glutathione <i>S</i> -transferase	Finland	YG1024	198

5. Metabolites or metabolic activation

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
PDT-1	An oxidized product of <i>m</i> -phenylenediamine	Japan	YG1024	153
1-NP-3-ol, 1-NP-4-ol, 1-NP-6-ol, 1-NP-8-ol	Urine metabolites of 1-NP	U.S.A.	YG1024	181
B[a]P	Metabolic activation by plant leaves	Thailand	YG1029	57
<i>N</i> -Nitroso compounds	Metabolic activation by human CYP2A6 and 2E1	Japan	YG7108	85
Aminophenylnorharman	A metabolite formed from norharman and aniline	Japan	YG1024	61
2,4-dinitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene	Metabolic activation of nitro compounds	Japan	YG1041 YA1042	165
AF	Metabolic activation by green alga	Slovak	YG1024	58
Benzidine, 4-AB	Metabolic activation by plants	U.S.A.	YG1021 YG1024 YG1026 YG1029	56
2,3-diaminophenazine, benzidine phenylenediamines, AF	Metabolic activation by plants	U.S.A.	YG1024	55
<i>m</i> -Phenylenediamine	Metabolic activation by plants	Czech	YG1024	54
Benzidine, 4-ABP	Metabolic activation by plants	U.S.A.	YG1024 YG1029	53
NDP	Metabolite of propranolol	Japan	YG1029 YG1042 YG3003	178
2,3-Diaminophenazine	Metabolic activation by plants	U.S.A.	YG1024	52
2-Amino-3-hydroxyphenazine				
<i>m</i> -phenylenediamine	Metabolic activation by plants	Czech	YG1024	186
2-Acetoxyacetylaminofluorene				
<i>m</i> -Phenylenediamine, AF	Metabolic activation by plants	U.S.A.	YG1024	51
2-AF, 2-AAF	Metabolic activation by hepatoma cell (Hep G2)	Belgium	YG1024	49
IQ	Metabolic activation by cytochrome P-450 1A2 supported by hydrogen peroxide	Canada	YG1012	176
<i>N</i> -Nitrosodialkylamines	Metabolic activation by a model system	Japan	YG7108	86
IQ, Azo-IQ, Nitro-IQ	Metabolic activation by prostaglandin-H synthase	Germany	YG1024	47
AF, Benzidine, <i>m</i> -Phenylenediamine, 4-ABP, 2,4-Diaminotoluene, 2-Naphthylamine	Metabolic activation by plants	U.S.A.	YG1024	50
ABP	Metabolic activation by human uroepithelial cells	U.S.A.	YG1024	201
MeIQx	Metabolic activation by human liver	U.K.	YG1024	48
Anisidine isomers	Metabolic activation of aromatic amines	U.S.A.	YG1024	205
Benzidine	Metabolic activation by prostaglandin H synthase	U.S.A.	YG1012	46
2,4-diaminotoluene	Metabolic activation of aromatic amines	U.S.A.	YG1024	208
2,4-Diaminoanisole	Metabolic activation by prostaglandin H synthase	U.S.A.	YG1006 YG1024	45

6. Antimutagenesis

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
1-NP, B[a]P	Antimutagenesis study of natural phenolic compounds	Mexico	YG1024	159
B[a]P, AF, 2-AA, 4-NQO, MNNG	Antimutagenesis study of flavones	France	YG1041	167
1,6-diNP, 1,8-diNP, 1-NP	Antimutagenesis study of green peppers	Mexico	YG1024	168
Aflatoxin B ₁	Antimutagenesis study of natural xanthophylls	Mexico	YG1024	173
1-NP	Antimutagenesis study of xanthophylls	Mexico	YG1024	177
AF	Antimutagenesis study of aminobenzoic acids	Czech	YG1024	196

7. Pharmaceuticals and herbicides

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
4-nitro-imidazoles and pyrazoles	Antimycotics	Italy	YG1026 YA1029	170
Tinidazole	An antiprotozoal drug	India	YG1029	180
Chlornitrofen, Nitrofen, Chlormethoxynil	Herbicides	Japan	YG1026 YG1029	182
Nitroscanate	An antischistosomal drug	India	YG1024	188
5-Nitro-3-thiophenecarboxanilide	Pharmaceutical	Italy	YG1021 YG1024	189
1-Hydrazinophthalazine	An antihypertensive agent	U.S.A.	YG1029	191
CNP (chlornitrofen), Chlormethoxynil, Bifenox	Herbicides	Japan	YG1021 YG1026	195
Glyceryl trinitrate	Clinical nitrovasodilator	U.S.A.	YG1026	204
Chlorambucil	A chemotherapeutic agent	Japan	YG2975	147
Niclosamide	An anti-helminthic drug	Mexico	YG1021 YG1024	206

8. Strain construction

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
ENU	Transgenic mouse study	Japan	YG5152	151
1-NP, 1,8-diNP, Glu-P-1, PhIP, AF	Construction of strains deficient in <i>O</i> -acetyltransferase	Japan	YG7126 YG7130	148
ENNG, EMS, DMN	Construction of strains deficient in <i>O</i> ⁶ -methylguanine methyltransferase	Japan	YG7104 YG7108	83
Methylene blue plus visible light Neutral red plus visible light Hydrogen peroxide, AF, 4-NQO	Construction of strains deficient in 8-hydroxyguanine DNA glycosylase	Japan	YG3001 YG3002 YG3003	94
Furylfuramide 2-Nitronaphthalene	Construction of strains deficient in classical nitroreductase	Japan	YG7127 YG7131 YG7128 YG7132	149
Ultraviolet light	Construction of strains carrying <i>mucA B</i>	Japan	YG5144	150
ENU, gamma-ray	Development of transgenic mice	Japan	YG6020	112
1-NP, 2-Nitrofluorene	Construction of strains overexpressing nitroreductase and <i>O</i> -acetyltransferase	Japan	YG1041 YG1042	12
1-NP, 1,8-diNP, 2-nitronaphthalene, 2-AA, Glu-P-1	Construction of strains overexpressing <i>O</i> -acetyltransferase	Japan	YG1012 YG1024	146
Aromatic amines Nitroarenes	Validation of strains overexpressing either nitroreductase or <i>O</i> -acetyltransferase	Japan	YG1021 YG1024 YG1026 YG1029	11
Glu-P-1, AF, 2-Nitrofluorene, 1-NP, 1,8-diNP, 2-AA	Construction of strains overexpressing either nitroreductase or <i>O</i> -acetyltransferase	Japan	YG1021 YG1024 YG1026 YG1029	10

9. Miscellaneous

Mutagen	Source or purpose	Country	Tester strain	Reference
Naphtho[2,1- α]pyrene, Naphtho[2,3- α]pyrene	Coal tar	Canada	YG1025	157
AF, 2-Acetoxyacetylaminofluorene	Enhancement by pentachlorophenol	Czech	YG1024	164
1-NP	DNA adducts formation	Japan	YG1021	169
2,4,6-trinitrotoluene	Occupational exposure to 2,4,6-trinitrotoluene	Finland	YG1021 YG1024	174
Fullerene C60	Photoactivation	Japan	YG3003	95
Coal dust and smokeless tobacco extracts	Gastric neoplasia in coal miners	U.S.A.	YG1021 YG1024	197
Nitrites	Model compound	Belgium	YG1024	199
Compounds produced during mild gasification of coal	Safety evaluation of a coal conversion technology	U.S.A.	YG1024	200

2-AA, AF, Glu-P-1, MeIQ	Stability of YG1024 during mutagenicity assays	U.S.A.	YG1021 YG1024 YG1026 YG1029	202
Aristolochic acid I and II	Naturally occurring nitroaromatics	Germany	YG1021 YG1024 YG1026 YG1029	203

2-AA, 2-aminoanthracene; AαC, 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole; 4-AABP, 4-acetylamino-biphenyl; 4-ABP, 4-aminobiphenyl; AF, 2-aminofluorene; Azo-IQ, 2,2'-azo-bis-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 4-CH₂OH-8-MeIQx, 2-amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline; Biphenox, 2,4-dichlorophenyl 3-methoxycarbonyl-4-nitrophenyl ether; Chlomethoxynil, 2,4-dichlorophenyl 3-methoxy-4-nitrophenyl ether; CNP (Chlornitrophen), 4-nitrophenyl 2,4,6-trichlorophenyl ether; 4,8-diMeIQx, 2-amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline; 7,9-diMeIQx, 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline; 1,3-diNP, 1,3-dinitropyrene; 1,6-diNP, 1,6-dinitropyrene; 1,8-diNP, 1,8-dinitropyrene; DMN, dimethylnitrosamine; EMS, ethyl methanesulfonate; ENNG, N-ethyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine; ENU, ethylnitrosourea; Glu-P-1, 2-amino-6-methyldiprido[1,2-α:3', 2'-d]imidazole; IQ, 2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline; MeAαC, 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole; MeIQ, 2-amino-3, 4-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline; MeIQx, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline; MNNG, N-nitro-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; MTCCA, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid; NDP, 1-amino-3-(1-naphthyl-2-yl)propanol; Nitro-IQ, 3-methyl-2-nitroimidazo[4,5-f]quinoline; 1-NP, 1-nitropyrene; 4-NQO, 4-nitroquinoline N-oxide; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; PDT-1, 2-amino-5-[(3-aminophenyl)amino]-4-[(3-aminophenyl)imino]-2,5-cyclohexadien-1-one; PBTA-1, 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole; PBTA-2, 2-[2-(acetylamino)-4-[N-(2-cyanoethyl)ethylamino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole; PhIP, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine; Trp-P-1, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole

気の変異原性が YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 を用いて調べられている。YG1041, YG1042 はニトロ還元酵素とアセチル転移酵素活性の両方が上昇しており、ニトロアレーンに対し極めて高い感受性を示す¹²⁾。小型のエアー・サンプラーを用いて室内の空気から試料を採取し、得られた微量の試料について YG1041, YG1042 を用いその変異原性がモニターされている²¹⁾。

4. 2 水

河川水に含まれる変異原の活性を YG1021 や YG1024 を用いて検出する試みが桂川^{22, 23)}, 隅田川²⁴⁾, タイ²⁴⁾, チェコ²⁵⁾で行われている。特に多環芳香族系の変異原を、ブルーレーヨンなどの吸着剤^{26, 27)}を用いて収集し、その変異原性を S9 mix の存在下 YG1024 を用いて調べる方法が汎用されている。Nukaya ら²⁸⁾ および Oguri ら²⁹⁾ は、この手法を用い京都の西高瀬川から新しい変異原 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-1), 2-[2-(acetylamino)-4-[N-(2-cyanoethyl)ethylamino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-2) を同定した。PBTA-2 はエームテストを行うと、 μg あたり TA98, YG1024 に S9mix 存在下において 98,000His⁺ 復帰株, 3,200,000His⁺ 復帰株を誘発する。これらの変異原は、川の上流域にある染色工場が使われたアゾ色素が、途中の污水处理場で処理される過程で生ずるものと考えられている^{29, 30)}。

4. 3 食品

焦げた食品中から単離された変異原性ヘテロサイクリックアミンの多くは、S9 mix の存在下で YG1024 に強い変異原性を示す。このため YG1024 は、食品中に含まれる変異原の同定やモニタリングに汎用されている³¹⁾。Beef extract

からブルーレーヨンを用いて変異原を吸着し、その変異原を S9 mix の存在下 YG1024 を用いてモニタリングすることで、新しい変異原 2-amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline (4-CH₂OH-8-MeIQx) と 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g] quinoxaline (7,9-DiMeIQx) が同定された^{32, 33)}。4-CH₂OH-8-MeIQx および 7,9-DiMeIQx は、beef extract 1g 中にそれぞれ 6.0 ng, 53 ng 存在している³⁴⁾。エームテストを行うと、4-CH₂OH-8-MeIQx は μg あたり 326,000 His⁺ 復帰株 (YG1024), 99,000 His⁺ 復帰株 (YG98) を誘発し、7,9-DiMeIQx は μg あたり 138,000 His⁺ 復帰株 (YG1024), 670 His⁺ 復帰株 (TA98) を誘発する³⁴⁾。

4. 4 尿

ヒトの尿に含まれる変異原の検索は、ヒトがどのような変異原にどの程度暴露されているかをモニターする簡便かつ迅速な手法である。主に YG1024 (+S9 mix) を用いて、喫煙者³⁵⁻³⁸⁾, コールタールを含む塗布薬で治療を受けた患者³⁹⁾, 液化石油ガスの燃焼物に暴露された労働者⁴⁰⁾, ハンバーガーや揚げた肉を食べたヒト^{41, 42)}, 2,4,6-trinitrotoluene に暴露された労働者⁴³⁾, 高濃度および低濃度の benzidine に暴露された労働者⁴⁴⁾ の尿について変異原性が検索されている。

4. 5 代謝物

芳香族アミン系の変異原をさまざまな方法を用いて *in vitro* で代謝活性化させ、代謝物の変異原性を YG1024 を用いて検出する試みが多数報告されている。Prostaglandin H synthase⁴⁵⁻⁴⁷⁾, ヒト肝臓ホモジェネート⁴⁸⁾, ヒト hepatoma 細胞ホモジェネート⁴⁹⁾, 植物ホモジェネート⁵⁰⁻⁵⁷⁾, 緑藻⁵⁸⁾ が代謝酵素源として用いられている。また YG1024 にヒト

のCYP1A2, NADPH-P450還元酵素の発現プラスミドを導入したテスター株がKamatakiら⁵⁹⁾により作製され、2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)の変異原性が親株のTA1538と比較されている。膀胱癌を誘発するanilineはTA98には変異原性を示さないが、S9 mixの存在下でnorharmanと共にインキュベートすると強い変異原性を示すようになる⁶⁰⁾。最近、aniline, norharmanからS9 mix存在下で生ずる変異原性代謝物として9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (aminophenylnorharman)が同定された⁶¹⁾。AminophenylnorharmanはS9 mix存在下でエームテストを行うと μg あたり1,783,000 His⁺復帰株 (YG1024), 187,000 His⁺復帰株 (TA98)を誘発する。

5. ヒトおよび*S. typhimurium*のアセチル転移酵素を発現する哺乳類細胞

芳香族アミンや芳香族ニトロ化合物に高い感受性を示す*S. typhimurium*の中で発現しているアセチル転移酵素は、バクテリアにのみ存在するわけではなく、ヒトを含む高等生物にも存在する。*S. typhimurium*のアセチル転移酵素はヒトのアセチル転移酵素とアミノ酸配列上の相同性を示し、特にアセチル転移酵素の活性中心部位と考えられる69番目のシステイン残基を含むArg-Gly-Gly-X-Cys配列は高度に保存されている⁶²⁾。ヒトに存在する2種類のアセチル転移酵素NAT1とNAT2はいずれも8番染色体に存在し、アミノ酸配列上の相同性を示すが、その基質特異性は異なっている⁶³⁻⁶⁶⁾。またNAT2については遺伝的多型のあることが古くから知られており、NAT1についても多型のあることが近年明らかにされている⁶⁵⁾。NAT1, NAT2の遺伝的多型については、膀胱癌、直腸・結腸癌、頭頸部の癌、乳癌、肺癌、前立腺癌との関連が論議されている。結核治療薬であるisoniazidに対する個体差は、NAT2の遺伝的多型に依存している⁶⁶⁾。

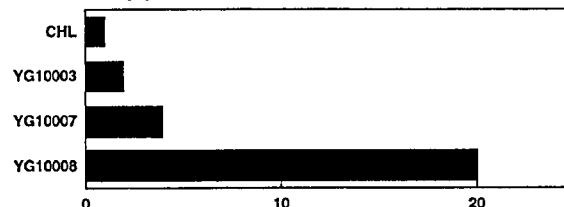
我々はヒトNAT1, NAT2をChinese hamster lung cells (CHL)にトランスフェクトし、ヒトのアセチル転移酵素を安定に発現する形質転換細胞株を樹立した⁹⁾(Table 1)。また*S. typhimurium*のアセチル転移酵素遺伝子を哺乳類細胞用の発現ベクターに連結しCHLへトランスフェクトした。樹立した細胞につき、芳香族ニトロ化合物である1,8-diNP, 2-nitrofluoreneそして芳香族アミンであるIQに対する感受性を*in vitro*小核出現を指標に比較した⁶⁷⁾。

6. アセチル転移酵素の遺伝的多型と発がんリスク

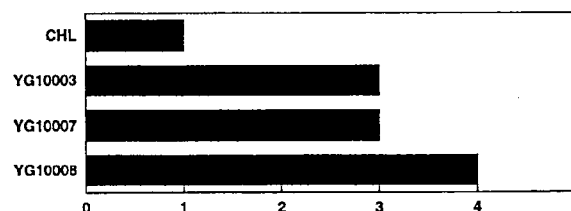
樹立した各細胞は1,8-diNPに対し異なった感受性を示し

た (Fig. 2)。ヒトのNAT2を発現する細胞 (YG10008)は1,8-diNPに対し最も高い感受性を示し、ついでヒトのNAT1 (YG10007), *S. typhimurium*のアセチル転移酵素 (YG10003), 親株のCHLの順であった。2-Nitrofluoreneを

1,8-dinitropyrene



2-nitrofluorene



IQ(+microsome)

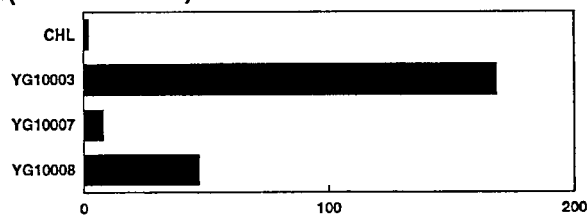


Fig. 2. Relative sensitivities of the sublines of Chinese hamster lung (CHL) cells expressing bacterial and human acetyltransferase against 1,8-dinitropyrene, 2-nitrofluorene and IQ. The clastogenicities were determined by scoring the number of cells with micronuclei among 1000 intact interphase cells. When IQ was tested, the microsomes prepared from the liver of rats pretreated with phenobarbital and 5,6-benzoflavone plus NADPH-generating system were added to the culture. The sensitivity of control CHL is set at 1.0 and the relative sensitivities are presented as bar length. CHL, the parent CHL cells; YG10003, as CHL but expressing *O*-acetyltransferase gene of *S. typhimurium*; YG10007, as CHL but expressing human NAT1 gene; YG10008, as CHL but expressing human NAT2.

用いた場合にも、ヒトのNAT2を発現する株 (YG10008)は、*S. typhimurium*のアセチル転移酵素 (YG10003)や親株のCHLよりも高い感受性を示した。この結果は、ヒトのNAT2が1,8-diNPや2-nitrofluoreneの代謝活性化に関与していることを示唆している。ヒトのNAT2は遺伝的多型を示し個体差が存在することから、今回得られた結果は1,8-diNPや2-nitrofluoreneに対する発癌リスクには個体差が存在する可能性を示唆している。芳香族アミンについては、NAT2の遺伝的多型と膀胱癌、直腸・結腸癌との間に関連のあることが疫学的に示唆されている⁶⁵⁾。ニトロアレーン

に対する発癌リスクの個体差と NAT2 アセチル転移酵素の遺伝的多型との関連については、今後さらに検討する必要がある。

芳香族アミンである IQ に対する感受性を、誘導処理したラットのミクロソーム存在下で調べると、*S. typhimurium* のアセチル転移酵素を発現する YG10003 が最も高い感受性を示した (Fig. 2)。ついでヒトの NAT2 (YG10008) およびヒトの NAT1 (YG10007) そして親株の CHL の順であった。この結果はバクテリアのアセチル転移酵素が、ヒトのアセチル転移酵素よりも IQ に対し高い代謝活性化能を持っていることを示唆している。*S. typhimurium* のアセチル転移酵素を発現する YG10003 は、1,8-diNP, 2-nitrofluorene に対しては感受性が低かったことから、YG10003 が IQ に対し高い感受性を示すのは、単にアセチル転移酵素の発現量が高いためではなく、3種類のアセチル転移酵素の基質特異性を反映しているものと考えられる。IQ は長期投与するとラットの大腸に癌を誘発するほか、トランスジェニックマウスに投与すると colon に変異を誘発する^{68, 69)}。*S. typhimurium* は大腸菌の近縁のバクテリアであり、そのゲノム配列は大腸菌と約 80% 相同であることが知られている。したがって大腸菌や他の腸内細菌もアセチル転移酵素を持つ可能性がある。大腸菌のアセチル転移酵素については、最近、精製標品の性質が明らかにされた⁷⁰⁾。今回得られた結果は、腸内細菌の持つアセチル転移酵素が、IQ の代謝活性化に関与している可能性を示唆している。

ヒトの NAT1, NAT2 を発現する CHL を用いて PhIP の変異原性が試験されている⁷¹⁾。また、ヒトの CYP1A2 あるいは CYP3A7 をヒトのアセチル転移酵素とともに発現させる CHL が構築されている^{72, 73)}。Chinese hamster ovary cell (CHO) を基にして、除去修復能を欠いた UV5P3 細胞にヒトの CYP1A2 と NAT2 あるいは *S. typhimurium* のアセチル転移酵素を発現させる細胞株が樹立されている⁷⁴⁾。こうしたヒトの代謝酵素を発現する細胞株は、遺伝毒性試験の結果をヒトへ外挿する際に、重要な役割を果たすものと期待されている。

7. アルキル化剤に高感受性を示す *S. typhimurium* テスター株の開発

メチル化剤、エチル化剤などのアルキル化剤は、重要な環境変異原のグループであり、この中には実験動物に対し発がん性を示すものが少なくない。メチル化剤による DNA 損傷のうちで、変異の誘発に最も重要な役割を果たしているのが *O*⁶-methylguanine である。*O*⁶-methylguanine は、多くの場合 *O*⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) によって修復され、この DNA 修復酵素はバクテリアからヒトまで広く存在している⁷⁵⁾。

大腸菌は 2 種類の MGMT, Ada と Ogt を持っている。

Ada 蛋白は分子量 39kDa で、*O*⁶-methylguanine のほか *O*⁴-methylthymine, methylphosphotriester の修復を行い、その発現は低濃度のメチル化剤処理により誘導される⁷⁶⁾。これに対し Ogt は分子量 19kDa の蛋白質で *O*⁶-methylguanine, *O*⁴-methylthymine の修復は行うが methylphosphotriester の修復は行えず、その発現は誘導されない点で Ada とは異なっている。また Ogt はエチル化剤による DNA 損傷を Ada よりも効率よく修復する⁷⁷⁾。

我々は *S. typhimurium* の *ada* 遺伝子 (*ada*_{ST})、*ogt* 遺伝子 (*ogt*_{ST}) の一方あるいは両方を特異的に破壊すれば、アルキル化剤に高感受性を示す *S. typhimurium* テスター株ができるものと考え、*ada*_{ST}, *ogt*_{ST} のクローニングと遺伝子破壊を行った。*ada*_{ST} 遺伝子は、大腸菌の *ada* 遺伝子と塩基配列レベルで約 70% の相同性を示し、分子量約 39kDa の蛋白質をコードしていた⁷⁸⁾。この *S. typhimurium* の Ada 蛋白質が実際に *O*⁶-methylguanine や methylphosphotriester の修復を行うことは英国の B. Sedgwick らにより明らかにされた⁷⁹⁾。クローニングした遺伝子をもとに、相同的組換えを利用して *S. typhimurium* ゲノム上の *ada*_{ST} 遺伝子の破壊を行った。

S. typhimurium の *ada*_{ST} 遺伝子欠損株 (YG7100) は、大腸菌の *ada* 遺伝子欠損株と同様、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) の致死作用に対して高い感受性を示した⁸⁰⁾。MNNG の突然変異誘発作用に関しては、大腸菌の *ada* 欠損株が親株よりも約 10 倍高かったのに対し、*S. typhimurium* の *ada*_{ST} 欠損株の場合には親株である TA1535 とほぼ同様の感受性を示したにすぎなかった。この結果から、大腸菌とは異なり *S. typhimurium* の場合には、Ada よりも Ogt が MNNG による変異誘発作用から細胞を守っているものと考え、*ogt*_{ST} 遺伝子の破壊を行った。

S. typhimurium の *ogt*_{ST} 遺伝子は、大腸菌の *ogt* 遺伝子とヌクレオチド配列上で 77% の相同性を示し、分子量 19kDa の蛋白質をコードしていた⁸¹⁾。クローニングした *ogt*_{ST} 遺伝子を基に相同的組換えを用いてゲノム上の *ogt*_{ST} 遺伝子を破壊した。*S. typhimurium* TA1535 の *ogt*_{ST} 遺伝子破壊株を YG7104, *ada*_{ST}, *ogt*_{ST} 破壊株を YG7108 と命名した (Table 1)。YG7104, YG7108 はアルキル鎖長の異なる MNNG, *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG), *N*-propyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (PNNG), *N*-butyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (BNNG) に対し、親株である TA1535 よりも高い感受性を示した (Fig. 3)。*ogt*_{ST} 欠損株では、親株が閾値を示す低い濃度から誘発復帰株数の増加が観察された^{81, 82)}。これまでに 15 種類のさまざまなアルキル化剤について感受性の比較が行われ、TA1535 の *ogt*_{ST} 欠損株である YG7104, *ada*_{ST}, *ogt*_{ST} 二重欠損株である YG7108 は、ethylmethane sulfonate (EMS), dimethylnitrosamine (DMN) など各種アルキル化剤に高感受性を示すことが明らかにされている⁸³⁾。Ethylene oxide ガス滅菌したプレートを用いて YG7108 の変異テストを行うと、残留している微量の ethyl-

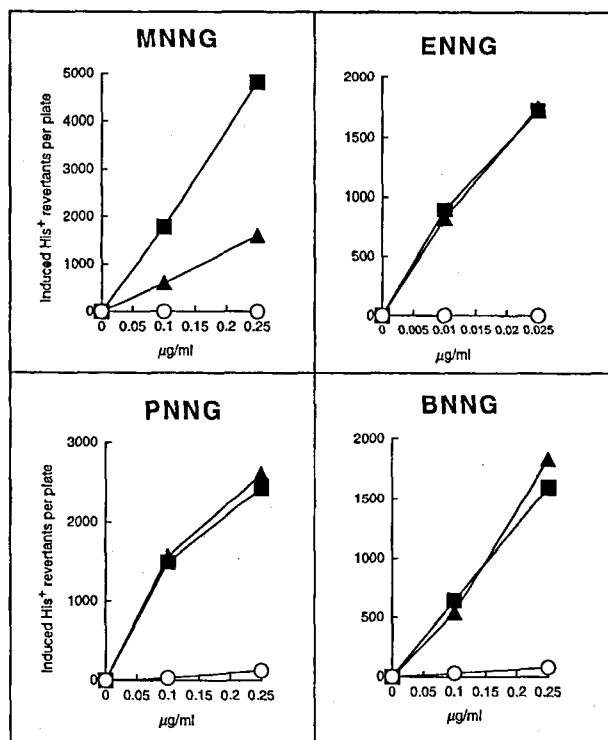


Fig. 3. Sensitivities of *Salmonella typhimurium* strain TA1535 and its derivatives against alkylating agents. Closed square, *S. typhimurium* YG7108 deficient in *adaST* and *ogtST*; closed triangle, *S. typhimurium* YG7104 deficient in *ogtST*; open circle, *S. typhimurium* TA1535.

ene oxide ガスのために「自然突然変異」がきわめて高くなる。このため YG7108 を用いるテストでは、ガンマー線滅菌したプレートを用いることが必須である。Kushida ら^{84, 85)} は、YG7108 にヒト CYP2E1 と cytochrome P-450 reductase あるいは CYP2A6 と cytochrome P-450 reductase を発現させ各種 *N*-nitrosamine の変異原性を調べることで、CYP2E1 は比較的アルキル鎖長の短い *N*-nitrosamine の代謝活性化に関与し、CYP2A6 はアルキル鎖長の長い *N*-nitrosamine の代謝的活性化に関与していることを示した。また Okochi ら⁸⁶⁾ は、*N*-nitrosodialkylamine の cytochrome P-450 モデル系による代謝活性化について、YG7108 に対する変異原性を指標に検討を行っている。

8. 活性酸素種に高感受性を示す *S. typhimurium* テスター株の開発

活性酸素は bleomycin, paraquat, hydrogen peroxide などの化学物質や電離放射線で細胞を処理した時に生ずるほか、内因性的変異原として正常な代謝過程でも生ずる。活性酸素により生ずる修飾塩基は数十以上あるが、その中で生物学的作用が詳しく研究されているものの一つに 8-oxoguanine (8-oxoG) がある⁸⁷⁾。8-oxoG は DNA 複製の際に cytosine 以外に adenine と対合を作るため G:C から T:A への

transversion 変異の原因となる⁸⁸⁾。このため細胞は 8-oxoG によって起こる突然変異を抑制するためいくつかの DNA 修復系を備えており⁸⁹⁾、その代表的な修復酵素が 8-oxoG DNA glycosylase である。8-oxoG DNA glycosylase は cytosine と対合した 8-oxoG を、その glycosylase 活性により切り出し、さらに脱塩基部分の 5'側と 3'側の DNA 鎖に切れ込みを入れる lyase 活性も有している⁹⁰⁻⁹²⁾。DNA 鎖に切断が起きた後は、脱リン酸化酵素、DNA polymerase、DNA ligase の作用により無傷の DNA に修復される。8-oxoG DNA glycosylase は、大腸菌では *mutM* 遺伝子にコードされており、*mutM* 株は内因性的酸化的損傷により自然突然変異が高くなった株 (mutator) である⁹³⁾。

我々は活性酸素を増産する変異原に対し特異的に高い感受性を示す *S. typhimurium* 株を開発することを目的に、*S. typhimurium* の *mutM* 遺伝子 (*mutM_{ST}*) のクローニングならびに遺伝子破壊株の作製を行った⁹⁴⁾。*mutM_{ST}* 遺伝子は、大腸菌の *mutM* 遺伝子とヌクレオチド配列上の同一性を示し、分子量 30.2kDa の蛋白をコードしていた。クローニングした *mutM_{ST}* 遺伝子を基に相同的組換えを用いてゲノム上の *mutM_{ST}* 遺伝子を破壊した。*S. typhimurium* TA1535 の *mutM_{ST}* 遺伝子破壊株を YG3001、TA1975 の *mutM_{ST}* 遺伝子破壊株を YG3002、TA102 の *mutM_{ST}* 遺伝子破壊株を YG3003 と命名した (Table 1)。YG3001 は methylene blue + visible light, neutral red + visible light, 2-nitrofluorene に対し親株の TA1535 よりも 2-8 倍高い感受性を示した。YG3002 は 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) に対し親株 TA1975 よりも 30 倍以上高い感受性を示した。YG3003 は hydrogen peroxide に対し親株 TA102 よりも約 2 倍高い感受性を示した。YG3003 は fullerene C60 + visible light, diesel particle extracts の変異原性検出にも利用されている^{95, 96)}。

9. ヒト DNA 修復酵素 OGG1 の遺伝的多型と発がんリスク

8-oxoG DNA glycosylase 活性がヒトを含む真核生物にも検出されることから、ヒトの 8-oxoG DNA glycosylase をコードする遺伝子 *hOGG1* の探索が進められ、1997 年にその遺伝子がクローニングされた⁹⁷⁻¹⁰¹⁾。ヒトの OGG1 蛋白質は大腸菌の MutM とはアミノ酸配列上の同一性を示さないが、酵母の Ogg1 蛋白質とは 37% の同一性を示し、マウスの Ogg1 とは 84% 同一性を示す。ヒトの *hOGG1* は第 3 染色体の短腕 3p26 に位置し、7 つのエクソンからなる¹⁰²⁾。*hOgg1* は cytosine と対合した 8-oxoG を glycosylase 活性により切り出し、さらに脱塩基部分の DNA 鎖を切断する lyase 活性を有している。

ヒトの *hOGG1* には遺伝的多型が存在しており、ヒトの集団中には 326 番目のアミノ酸に serin を持つ *hOGG1-Ser³²⁶* と、cystein を持つ *hOGG1-Cys³²⁶* が存在する¹⁰³⁾。日本人の

健常者84名, 肺癌患者90名について調べた結果では, いずれの場合も Ser³²⁶:Cys³²⁶の比はほぼ3:2であると報告されている. hOGG1-Ser³²⁶およびhOGG1-Cys³²⁶の酸化突然変異に対する抑制能を調べるため, 内因性の酸化DNA損傷により自然突然変異がきわめて高くなった大腸菌 YG5132 (*mutM*, *mutY*) に, hOGG1-Ser³²⁶およびhOGG1-Cys³²⁶を glutathion S-transferase (GST) 融合蛋白質として大腸菌で発現させるプラスミド (GST-hOGG1-Ser³²⁶, GST-hOGG1-Cys³²⁶) を導入し, その自然突然変異抑制能を比較した¹⁰³⁾. どちらのプラスミドも YG5132 の高い自然突然変異を効率良く抑制したが, hOGG1-Cys³²⁶の方がhOGG1-Ser³²⁶に比べ抑制する能力は低かった (Fig. 4). しかし,

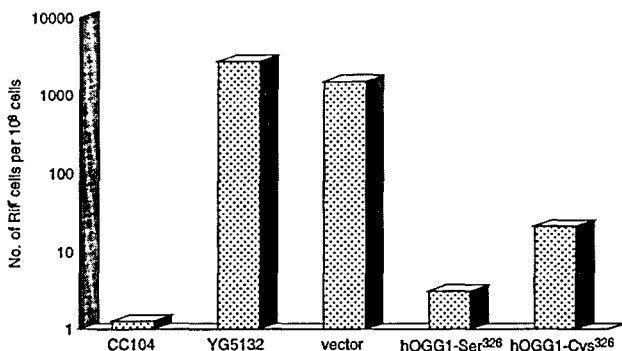


Fig. 4. Complementation of an *Escherichia coli* YG5132 with hOGG1-overexpressing plasmids. Strain YG5132 is a *mutM mutY* double mutant of *E. coli* CC104.

生化学的な活性測定の結果では, hOGG1-Ser³²⁶とhOGG1-Cys³²⁶の間に顕著な差異は見いだされていない¹⁰⁴⁾. hOGG1遺伝子の多型については, 沖縄において男性の肺癌患者を対象に疫学的な調査が行われ, Cys/Cysのalleleを持つヒトはCys/SerあるいはSer/Serのヒトに比べ, squamous cell carcinomaとnon-adenocarcinomaに関しリスクが高いと報告されている¹⁰⁵⁾. hOGG1の遺伝的多型あるいは発現量の多寡と発がんリスクとの関係については, さらに詳細な研究が行われることが期待される.

10. トランスジェニックマウスを用いた遺伝毒性評価系の開発

化学物質のヒトに対するリスクを評価するためには, 微生物や哺乳類培養細胞だけではなく, 動物個体を用いた遺伝毒性検出系が重要である. 近年, 大腸菌やファージの遺伝子をレポーター遺伝子として組み込んだトランスジェニックマウスを用いて遺伝子突然変異を検出し, 変異を分子レベルで解析することが可能になりつつある. これらのマウスでは全ての細胞にレポーター遺伝子を持っており, 原理的には全臓器・全組織を対象に遺伝毒性の検索を行うことが可能である. このことは, 試験物質の臓器特異性や,

標的臓器における発がんとの関係, さらに加齢や生殖細胞への影響などを考慮した遺伝毒性評価を可能にする点で意義が大きい. 現在商業的に入手できるトランスジェニックマウスには大腸菌 *lacZ* 遺伝子をレポーターとする MutaTM mouse¹⁰⁶⁾, *lacI* 遺伝子をレポーターとする Big Blue^R mouse¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾ がある. しかし, 既存のトランスジェニックマウス突然変異検出系は必ずしも普及しているとは言えない. 原因としては, 変異体の検出や変異部位の同定に要するコストや労力の問題や, 放射線等で誘発される欠失変異の検出に効果的な系がないなどの点が挙げられる^{110, 111)}. 我々はこうした点を克服することを目的に, λEG10DNAを組み込んだ新しいトランスジェニックマウス *gpt delta* を開発した¹¹²⁾. このマウスは, 2つの検出法によって異なるタイプの突然変異を効率よくポジティブセレクションできる点に特徴がある. すなわち①大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとする 6-thioguanine (6-TG) セレクションでは, 主に点突然変異 (塩基置換変異とフレームシフト) を検出し, ②λファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターとする Spi-セレクションでは, 主に欠失変異を検出する.

新しいトランスジェニックマウスを開発するため, トランスジーンとしてマウス受精卵へ導入する新規なλファージ (λEG10) DNA を作製した (Fig. 5). λEG10は点突然

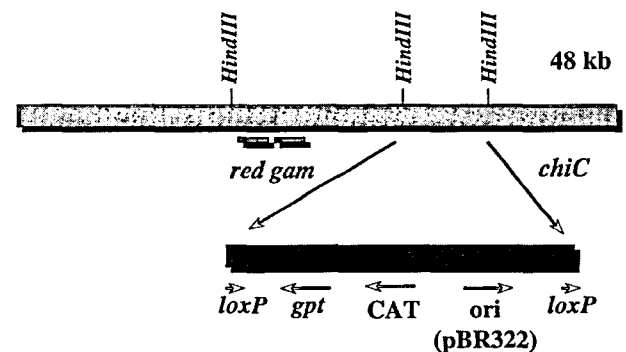


Fig. 5. Schematic representation of λEG10 DNA used to generate transgenic mouse. *gpt* and CAT stand for *E. coli gpt* and chloramphenicol acetyltransferase genes, respectively.

変異の検出に用いる大腸菌 *gpt* 遺伝子と欠失変異検出用の標的遺伝子であるλファージ *red/gam* 遺伝子を持つλファージである. このファージDNAは, λ2001DNAの *HindIII* 部位に直線状にしたプラスミドDNAを挿入して作製した. プラスミドDNA領域は2つの *loxP* 配列に囲まれており, この中にはchloramphenicol耐性遺伝子 (CAT), 大腸菌 *gpt* 遺伝子, pBR322由来の複製開始部位 (*ori*) が含まれている. λEG10 DNAをマイクロインジェクション法により C57BL/6J マウス受精卵に導入し, トランスジェニックマウス産仔を得た¹¹²⁾. サザンブロット法により導入遺伝子コピー数を概算したところ, ハプロイドあたりの導入コピー数は約80コピーと算出された. 現在 *gpt delta* として汎用さ

れているマウスは、C57BL/6Jマウス由来の系統をホモ化したもので、両方の17番染色体にトランスジーンが挿入されている¹¹³⁾。

10.1 6-Thioguanin 選択法を用いた点突然変異の検出

大腸菌 *gpt* 遺伝子は、purine サルベージ回路に関わる guanine phosphoribosyltransferase をコードしている。この酵素はグアニンのフォスホリボシル化を触媒し、グアニンのDNAへの取り込みに関与しているほか、6-TGを基質とするため、野生型の *gpt* 遺伝子を持つ大腸菌は6-TGを含む培地上で生育することが出来ず、*gpt* 遺伝子に変異を持った大腸菌のみが6-TGを含む寒天培地上で生育できる。このため *gpt* 遺伝子をレポーター遺伝子に用いると、多数の野生型株の中から変異体のみを選択するポジティブ・セレクションが可能である。大腸菌 *gpt* 遺伝子はコード領域が456 bpと小さいためシーケンス解析による変異の同定も容易である。このため大腸菌、*S. typhimurium* あるいは培養細胞の系でも突然変異検出のレポーター遺伝子として用いられてきた。同一のレポーター遺伝子を用いて *in vitro* と *in vivo* で化学物質の遺伝毒性を検索することは意義あるものと考え、大腸菌 *gpt* 遺伝子を点突然変異検出のレポーター遺伝子として用いることとした。

実験方法の概略を Fig. 6 に示す。変異原で処理したマウ

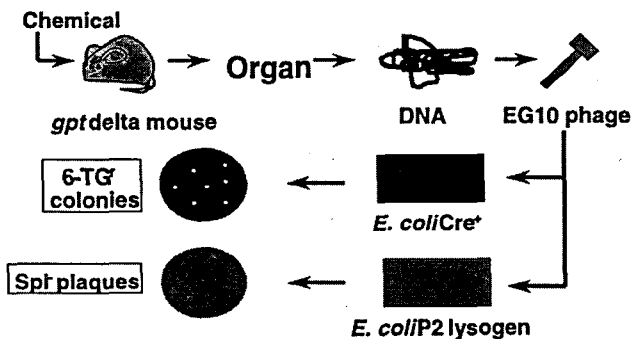


Fig. 6. A protocol of *gpt* delta transgenic mouse mutagenicity assay. After treatment with a chemical, genomic DNAs are extracted from various organs and the transgene λ EG10 is rescued as phage particles by *in vitro* packaging reactions. For 6-thioguanine (6-TG) selection, *E. coli* YG6020 expressing Cre recombinase is infected with the rescued λ EG10. The phage DNA is converted to plasmid DNA by cre-loxP site specific recombination. The *E. coli* cells harboring the plasmids carrying the mutant *gpt* gene can be identified as colonies on plates containing chloramphenicol and 6-TG. For Spi⁻ selection, P2 lysogen is infected with the rescued phages and the deficient in *red* and *gam* can be identified as Spi⁻ plaques.

スから組織DNAを抽出し、 λ ファージ *in vitro* パッケージング反応によってトランスジーン λ EG10 をファージ粒子として回収する。回収したファージを Cre 組み換え酵素を

発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λ EG10 上にある *loxP* 配列に挟まれた領域が Cre 組み換え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが 6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率が求められる。従って、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異体頻度を算出する。

マウスの背部を除毛して UVB (0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 kJ/m²) を照射し、4 週間後に屠殺して、表皮と真皮について *gpt* 遺伝子突然変異体頻度 (MF) を測定した¹¹⁴⁾。UVB 照射量 0.3 kJ/m² および 0.5 kJ/m² で比較すると、表皮の MF が非照射群の 9 倍以上に達したのに対し、真皮の MF は 2-3 倍であり、表皮が真皮よりも UVB の変異作用に対し、高い感受性を示すことが示された。表皮由来の *gpt* 変異体について自動シーケンサーを用いて変異部位の同定を行うと、変異の多くは 5'-TC-3', 5'-CC-3' などの dipyrimidine 部位で起きた G:C から A:T への transition 変異であった。CC から TT への tandem transition 変異も観察された。Dipyrimidine 部位には、UVB 照射により cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) や pyrimidine-(6,4)-pyrimidone photoproducts (6,4-PP) が形成されることが知られている¹¹⁵⁾。このことから今回観察された変異には、CPD や 6,4-PP が関与していることが示唆された。Dipyrimidine 部位での G:C から A:T への transition 変異や CC から TT への tandem transition 変異は、non-melanoma skin cancer の *p53* 遺伝子に起きた変異としても報告されている¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾。一方、無処理群においては G:C から T:A への transversion や、CpG 部位での G:C から A:T への transition 変異が多く観察され、これらは DNA の酸化的損傷や 5-methylcytosine の脱アミノ化が *gpt* 遺伝子で見られる自然突然変異に寄与していることを示している¹²⁰⁾。大腸菌でおこる *gpt* 遺伝子の自然突然変異で高頻度にみられる ISI の挿入は、今回無処理マウスから回収した *gpt* 変異体では全く観察されておらず、このことは *gpt* 遺伝子上の突然変異がマウス個体内で固定されていることを示唆している。

10.2 Spi⁻ selection による欠失突然変異の検出

トランスジェニックマウス *gpt* delta は Spi⁻ セレクションを用いて欠失変異を検出できる点の特徴の一つである。トランスジーン λ EG10 には *red/gam* 遺伝子および *chi* 配列が存在する。野生型の λ ファージが大腸菌に感染すると、 λ ファージは大腸菌の細胞内で複製して子ファージを作り、最終的には大腸菌を溶菌させ溶菌斑 (プラーク) を生ずる。これに対し大腸菌の染色体上に P2 ファージの DNA

が挿入されたP2溶原菌では、野生型の λ ファージが感染してもプラークを生じない。この野生型 λ ファージのP2溶原菌に対する表現型をSpi⁺ (sensitive to P2 interference)と呼ぶ。一方、*red/gam* 両遺伝子機能が不活化している変異体ファージはP2溶原菌に対してもプラークを形成することができる (Spi⁻)。Spi⁻表現型は*red/gam* 両遺伝子機能の不活化によりもたらされるため、Spi⁻変異体は主に欠失型の変異を持つと考えられる。*red, gam* 遺伝子にそれぞれ独立した点突然変異が同時に生じる確率は非常に低いと考えられるためである。Spi⁻セレクションが検出できる欠失変異の大きさは*in vitro* パッケージングを阻害しない範囲 (約10 kb) が上限と考えられるが、 λ EG10がマウスゲノム上にタンデムに挿入されていることから、複数のユニットにまたがった大きな欠失変異も原理的には検出可能と思われる。

Spi⁻セレクションの実験方法の概略をFig. 6に示した。*in vitro* パッケージングによって λ EG10を回収する段階までは6-TGセレクションと共通である。回収されたファージをP2溶原菌に感染させた後、37℃で一晩培養し、Spi⁻変異体プラークを得る。また、非溶原菌に感染させると全ファージが溶菌してプラークを作るので、ファージの回収効率が求められる。従って、変異プラーク数を回収ファージ数で除して突然変異体頻度が算出される。

λ EG10を導入したトランスジェニックマウスに γ 線5, 10, 50 Gyを照射し、3日後に臓器を回収したところ、脾臓におけるSpi⁻突然変異頻度はそれぞれ 0.7×10^{-5} , 1.2×10^{-5} , 2.0×10^{-5} であり、明らかな上昇が認められた^{112, 121)}。照射マウス由来のSpi⁻変異体について欠失部位を解析したところ、最大で約9 kbに及ぶ様々な大きさの欠失変異が同定された。UVB処理したマウスの表皮についてもSpi⁻セレクションを用いて欠失変異の解析を行ったところ、UVBドーズ 0.5 kJ/m^2 においてSpi⁻MFは、非照射群よりも顕著に上昇し、1kb以上の大きな欠失は非照射群に比べ10倍以上増大した。 γ 線照射や紫外線照射により誘発された大きな欠失変異体の多くは、連結部位に1-8塩基対の短い相同な配列を持っているか、まったく相同性を示さない配列間で連結していることが多かった。このためSpi⁻変異の多くは、二重鎖切断を起こしたDNA末端同士が非相同的組換えにより連結して生じたものと考えられる。

10. 3 トランスジェニック遺伝毒性試験の今後

*p53*遺伝子や*APC*遺伝子のように発がん過程に直接関わる遺伝子の変異を同定することは、発がんの機構を考える上で重要な情報を提供する。だが癌の誘発には数ヶ月以上の期間を要し、発がん以前の段階で*p53*や*APC*の変異を検出することは多くの場合困難である。トランスジェニック遺伝毒性試験では、導入したレポーター遺伝子を大腸菌に回収し変異体を検出・解析するため、比較的短期間に変異

を定量的に解析することが可能である。しかも全臓器を解析の対象としているため、脳や生殖細胞など従来突然変異の解析が困難であった臓器でも変異を検出し分子レベルで解析することが可能となった。

今回開発した*gpr delta*マウスは、同一の臓器について2つの検出法により点突然変異 (塩基置換, フレームシフト) と欠失変異を効率良く検出する。このマウスを用いては、紫外線照射, γ 線照射以外に、加熱食品中に含まれるヘテロサイクリックアミンや, ethylnitrosourea, mitomycin Cなどにより誘発される突然変異の解析が進められている^{113, 122, 123)}。またマウスの8-oxoG DNA glycosylaseをコードするMmh/Ogg1ノックアウトマウスとの交配により、生体内で生ずる内因性の酸化損傷に基づく変異の検出・解析にも用いられている¹²⁴⁾。

今後はDNA修復酵素遺伝子を欠損したノックアウトマウスやヒト代謝酵素を発現するトランスジェニックマウスとの交配を通じて、化学物質の遺伝毒性発現あるいは抑制にどのような遺伝子が重要な役割を果たしているのかを*in vivo*で明らかにする研究が進むと予想される。特にSpi⁻セレクションは、非相同的組換えに基づく欠失変異を検出するユニークな検出系であり、DNA鎖の切断と再結合の過程がどのように進むのかを*in vivo*において研究する際に有効である。また、トランスジェニックマウスを用いて発がん試験を行うことにより、発がんと変異の関係をより詳細に検討することが可能である。発がん試験をはじめ毒性試験においてはラットがより広範に使われている。こうした点からすると、同一のレポーター遺伝子を導入したトランスジェニックラットの開発は重要である。また、水圏での化学物質による変異作用を解析するという意味では、トランスジェニック Zebra fish¹²⁵⁾の樹立は興味ある課題である。

おわりに

以上、微生物からトランスジェニックマウスまで、遺伝的改変を加えた遺伝毒性試験用テスターの開発とその応用例について紹介した。先に記したように遺伝毒性試験の目的の一つは、化学物質のヒト遺伝子に対する安全性を予測・評価する点にある。未知の事象を予測するという意味では、火山の噴火や地震の予知、また天気予報などと共通するところがあるかもしれない。だが安全性の予知の場合、予測対象となるヒトは実験動物とは異なり遺伝的に不均一であり、個々人の遺伝的素因の違いは、さらに生活習慣や食生活によって影響を受けていることが予想される。またヒトは低濃度の化学物質に複数暴露されながら生活しており、この点でも動物実験モデルとは異なっている。そしてテスターとして用いられる実験動物には種差、系統差のあることが知られており、動物実験の結果を直接ヒトへ当て

はめることを困難にしている。したがって、今後、遺伝毒性試験を開発して行く際には①ヒトの個体差や②低濃度・複合暴露をどのようにして予測の中に取り込むかと言うことが重要であろう。またテスターとして用いる③動物の種差、系統差をどのようにして克服するかという点も、今後の重要課題である。

本稿で取り上げたアセチル転移酵素遺伝子 (NAT1, NAT2) や *hOGGI* 遺伝子で見られる遺伝子多型は、化学物質に対するヒトの個体差を考える上で重要な因子である。NAT2に関しては人種ごとに rapid acetylator の比率が異なることが知られており、個体差だけではなく人種差・民族差にも遺伝的多型は関連しているかもしれない¹²⁶⁾。だが NAT や CYP など薬物代謝酵素遺伝子の多型に比べ、DNA 修復酵素遺伝子や発がん (抑制) 遺伝子に関する多型の研究は緒についたばかりであると言える¹²⁷⁾。今後、世界的な single nucleotide polymorphism (SNP) 探索の深まりと共に、薬物代謝酵素以外の遺伝子についても SNP 情報が集積され、毒性あるいは発がん感受性との関係が明らかになることが望まれる。米国環境保健研究所 (National Institute of Environmental Health Sciences) では、こうした視点から Environmental genome project

(<http://www.niehs.nih.gov/envgenom/>) の名の下に遺伝的多型と個体差との関係を大規模に解析しようとしている。またゲノムプロジェクトやマウス分子遺伝学の進展に伴い、実験動物の種差、系統差の遺伝学的根拠が分子レベルで明らかにされることが期待される。こうした知見は、毒性試験に関して適切な動物種 (あるいは系統) を選択する場合や、異種遺伝子を導入した細胞やトランスジェニックマウス・ラットを用いる安全性試験に科学的根拠を提供することとなる。またノックアウトマウスと交配した突然変異検出用マウスは、変異原の閾値の研究に新しい可能性を開くかもしれない。

最後に、今後重要になると思われる遺伝毒性分野のトピックスの一つを紹介する。化学物質や紫外線で起こる突然変異の多くは、DNA に付加体が形成されることによって始められる¹¹⁵⁾。染色体の複製を行う DNA ポリメラーゼの多くは、DNA 上の付加体を乗り越えることができず、損傷部位で複製を停止する。だが、一部の複製は付加物を乗り越えて進み、その際に複製エラー (塩基配列変化) が起こる。複製エラーにより生じた DNA 配列は、次の複製の際に鋳型として働き、「正しい」塩基対合を持った二重鎖 DNA が作られ、最初に起きたエラーは固定され突然変異が起こる。この損傷部位を越えて進む DNA 複製は translesion DNA synthesis (TLS) と呼ばれ、突然変異誘発において重要な役割を果たしていると考えられている。最近、TLS に関わる新規な DNA ポリメラーゼが、バクテリアからヒトまで広範な生物種で見いだされた^{128,129)}。興味深いことに、大腸菌に 2 種類存在する TLS 型の DNA ポリメ

ラーゼ (DNA polymerase IV, V)¹³⁰⁻¹³⁴⁾ は、ヒトで見いだされた 4 種類の TLS 型 DNA polymerase¹³⁵⁻¹⁴⁵⁾ と共通する機能領域 (ドメイン) を有している。ヒトの TLS 型 DNA polymerase の 1 つは、紫外線に高発がん性を示す遺伝病 Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) の原因遺伝子であることが明らかにされている^{140,143)}。これらの DNA polymerase は突然変異の機構研究のみならず、変異や発がんの個体差や抑制法を考える上で重要な因子となることが予想される。TLS 型の DNA polymerase がヒトの突然変異誘発において果たす役割については、今後さらに検討する必要がある。

謝 辞

ここで紹介した研究の多くは、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部において行ったものであり、石館基元部長、祖父尼俊雄前部長をはじめ共同研究を賜った方々にお礼申し上げます。またヒト *hOGGI* 遺伝子に関する研究は、国立がんセンター研究所生物学部 (横田淳部長) との共同研究であり、トランスジェニックマウスの開発は、北里大学池田日出男教授、中外製薬鈴木宏志博士、チリ大学加藤基恵博士をはじめ多数の研究者との共同研究である。トランスジェニックマウスの UVB 照射に関する研究は、東北大学医学部小野哲也教授、池畑広伸博士との共同研究である。

文 献

- 1) Kinzler, K. W. and Vogelstein, B.: *Cell*, **87**, 159-170 (1996)
- 2) Sugimura, T., Nagao, M. and Wakabayashi, K.: *Mutat. Res.*, **447**, 15-25 (2000)
- 3) Maron, D. M. and Ames, B. N.: *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983)
- 4) Ashby, J. and Tennant, R. W.: *Mutat. Res.*, **257**, 229-306 (1991)
- 5) Zeiger, E., Ashby, J., Bakale, G., Enslein, K., Klopman, G. and Rosenkranz, H. S.: *Mutagenesis*, **11**, 471-484 (1996)
- 6) Zeiger, E.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**, 82-85 (2000)
- 7) Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagawa, H.: *Mutat. Res.*, **147**, 219-229 (1985)
- 8) Watanabe, M., Ishidate, M., Jr. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **216**, 211-220 (1989)
- 9) Watanabe, M., Nohmi, T. and Ishidate, M., Jr.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 974-979 (1987)
- 10) Watanabe, M., Ishidate, M., Jr. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **234**, 337-348 (1990)
- 11) Einisto, P., Watanabe, M., Ishidate, M., Jr. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **259**, 95-102 (1991)
- 12) Hagiwara, Y., Watanabe, M., Oda, Y., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **291**, 171-180 (1993)
- 13) Sera, N., Kai, M., Horikawa, K., Fukuhara, K., Miyata, N. and Tokiwa, H.: *Mutat. Res.*, **263**, 27-32 (1991)

- 14) Sera, N., Fukuhara, K., Miyata, N. and Tokiwa, H.: *Mutat. Res.*, **349**, 137-144 (1996)
- 15) Houk, V. S., Goto, S., Endo, O., Claxton, L. D., Lewtas, J. and Matsushita, H.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **20**, 19-28 (1992)
- 16) Suzuki, J., Kuwayama, K. and Suzuki, S.: *Mutat. Res.*, **271**, 89-96 (1992)
- 17) Hayakawa, K., Kawaguchi, Y., Murahashi, T. and Miyazaki, M.: *Mutat. Res.*, **348**, 57-61 (1995)
- 18) Espinosa-Aguirre, J. J., Reyes, R. E., Rubio, J., Ostrosky-Wegman, P. and Martinez, G.: *Mutat. Res.*, **303**, 55-61 (1993)
- 19) Cerna, M., Pastorkova, A., Myers, S. R., Rossner, P. and Binkova, B.: *Mutat. Res.*, **391**, 99-110 (1997)
- 20) de Pollok, F. S., Aneja, V. P., Hughes, T. J. and Claxton, L. D.: *Chemosphere.*, **35**, 879-893 (1997)
- 21) Azuma, S., Kishino, S., Katayama, S., Akahori, Y. and Matsushita, H.: *Mutagenesis*, **12**, 373-377 (1997)
- 22) Sayato, Y., Nakamuro, K., Ueno, H. and Goto, R.: *Mutat. Res.*, **242**, 313-317 (1990)
- 23) Sayato, Y., Nakamuro, K., Ueno, H. and Goto, R.: *Mutat. Res.*, **300**, 207-213 (1993)
- 24) Kusamran, W. R., Wakabayashi, K., Oguri, A., Tepsuwan, A., Nagao, M. and Sugimura, T.: *Mutat. Res.*, **325**, 99-104 (1994)
- 25) Cerna, M., Pastorkova, A., Smid, J., Bavorova, H., Ocadlikova, D., Rossner, P. and Zavadil, J.: *Toxicol. Lett.*, **88**, 191-197 (1996)
- 26) Hayatsu, H.: *Yakugaku. Zasshi.*, **120**, 534-547 (2000)
- 27) Sakamoto, H., Ohe, T., Hayatsu, T. and Hayatsu, H.: *Mutat. Res.*, **371**, 79-85 (1996)
- 28) Nukaya, H., Yamashita, J., Tsuji, K., Terao, Y., Ohe, T., Sawanishi, H., Katsuhara, T., Kiyokawa, K., Tezuka, M., Oguri, A., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.: *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1061-1066 (1997)
- 29) Oguri, A., Shiozawa, T., Terao, Y., Nukaya, H., Yamashita, J., Ohe, T., Sawanishi, H., Katsuhara, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.: *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1195-1200 (1998)
- 30) Ohe, T., Takeuchi, N., Watanabe, T., Tada, A., Nukaya, H., Terao, Y., Sawanishi, H., Hirayama, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.: *Environ. Health. Perspect.*, **107**, 701-704 (1999)
- 31) Wild, D.: *Z. Ernährungswiss.*, **34**, 22-26 (1995)
- 32) Kim, I. S., Wakabayashi, K., Kurosaka, R., Yamaizumi, Z., Jinno, F., Koyota, S., Tada, A., Nukaya, H., Takahashi, M. and Sugimura, T.: *Carcinogenesis*, **15**, 21-26 (1994)
- 33) Nukaya, H., Koyota, S., Jinno, F., Ishida, H., Wakabayashi, K., Kurosaka, R., Kim, I. S., Yamaizumi, Z., Ushiyama, H. and Sugimura, T.: *Carcinogenesis*, **15**, 1151-1154 (1994)
- 34) Wakabayashi, K., Kim, I. S., Kurosaka, R., Yamaizumi, Z., Ushiyama, H., Takahashi, M., Koyota, S., Tada, A., Nukaya, H. and Goto, S.: *Princess. Takamatsu. Symp.*, **23**, 39-49 (1995)
- 35) Einisto, P., Nohmi, T., Watanabe, M. and Ishidate, M., Jr.: *Mutat. Res.*, **245**, 87-92 (1990)
- 36) De Flora, S., Balansky, R., Gasparini, L. and Camoirano, A.: *Mutagenesis*, **10**, 47-52 (1995)
- 37) Scherer, G., Doolittle, D. J., Ruppert, T., Meger-Kossien, I., Riedel, K., Tricker, A. R. and Adlkofer, F.: *Mutat. Res.*, **368**, 195-204 (1996)
- 38) Smith, C. J., McKarns, S. C., Davis, R. A., Livingston, S. D., Bombick, B. R., Avalos, J. T., Morgan, W. T. and Doolittle, D. J.: *Mutat. Res.*, **361**, 1-9 (1996)
- 39) Gabbani, G., Pavanello, S., Nardini, B., Tognato, O., Bordin, A., Fornasa, C. V., Bezze, G. and Clonfero, E.: *Mutat. Res.*, **440**, 27-33 (1999)
- 40) Yin, X. J., Liu, J. Z., Kong, X. H., Chu, J. H., Wang, H. and Xiao, Z. X.: *Biomed. Environ. Sci.*, **11**, 251-257 (1998)
- 41) Gabbani, G., Nardini, B., Bordin, A., Pavanello, S., Janni, L., Celotti, L. and Clonfero, E.: *Mutagenesis*, **13**, 187-191 (1998)
- 42) DeMarini, D. M., Hastings, S. B., Brooks, L. R., Eischen, B. T., Bell, D. A., Watson, M. A., Felton, J. S., Sandler, R. and Kohlmeier, L.: *Mutat. Res.*, **381**, 83-96 (1997)
- 43) Einisto, P.: *Mutat. Res.*, **262**, 167-169 (1991)
- 44) DeMarini, D. M., Brooks, L. R., Bhatnagar, V. K., Hayes, R. B., Eischen, B. T., Shelton, M. L., Zenser, T. V., Talaska, G., Kashyap, S. K., Dosemeci, M., Kashyap, R., Parikh, D. J., Lakshmi, V., Hsu, F., Davis, B. B., Jaeger, M. and Rothman, N.: *Carcinogenesis*, **18**, 981-988 (1997)
- 45) Pan, Y. H., Reddy, G. R. and Reed, G. A.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **19**, 201-208 (1992)
- 46) Smith, B. J., DeBruin, L., Josephy, P. D. and Eling, T. E.: *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 431-439 (1992)
- 47) Wolz, E., Wild, D. and Degen, G. H.: *Arch. Toxicol.*, **69**, 171-179 (1995)
- 48) Rich, K. J., Murray, B. P., Lewis, I., Rendell, N. B., Davies, D. S., Gooderham, N. J. and Boobis, A. R.: *Carcinogenesis*, **13**, 2221-2226 (1992)
- 49) Duverger-van Bogaert, M., Dierickx, P. J. and Crutzen, M. C.: *Mutat. Res.*, **335**, 219-227 (1995)
- 50) Wagner, E. D., Smith, S. R., Xin, H. and Plewa, M. J.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **23**, 64-69 (1994)
- 51) Plewa, M. J., Wagner, E. D., Yu, T. W. and Anderson, D.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**, 171-177 (1995)
- 52) Wagner, E. D., Cebulska-Wasilewska, A., Connolly, S. and Plewa, M. J.: *Mutat. Res.*, **372**, 65-74 (1996)
- 53) Ju, Y. H. and Plewa, M. J.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **29**, 81-90 (1997)
- 54) Stavreva, D. A., Wagner, E. D., Plewa, M. J. and Gichner, T.: *Mutat. Res.*, **379**, 191-199 (1997)
- 55) Wagner, E. D., Repetny, K., Tan, J. S., Gichner, T. and Plewa, M. J.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **30**, 312-320 (1997)
- 56) Ju, Y. H. and Plewa, M. J.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **30**, 330-338 (1997)
- 57) Tepsuwan, A., Kupradinun, P. and Kusamran, W. R.: *Mutat. Res.*, **428**, 363-373 (1999)

- 58) Miadokova, E., Vlckova, V., Podstavkova, S., Slaninova, M. and Vlcek, D.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **31**, 383-389 (1998)
- 59) Kamataki, T., Suzuki, A., Kushida, H., Iwata, H., Watanabe, M., Nohmi, T. and Fujita, K.: *Cancer Lett.*, **143**, 113-116 (1999)
- 60) Nagao, M., Yahagi, T. and Sugimura, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 373-378 (1978)
- 61) Totsuka, Y., Hada, N., Matsumoto, K., Kawahara, N., Murakami, Y., Yokoyama, Y., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.: *Carcinogenesis*, **19**, 1995-2000 (1998)
- 62) Watanabe, M., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 8429-8436 (1992)
- 63) Brockton, N., Little, J., Sharp, L. and Cotton, S. C.: *Am. J. Epidemiol.*, **151**, 846-861 (2000)
- 64) Millikan, R. C.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, **9**, 217-219 (2000)
- 65) Hein, D. W., Doll, M. A., Fretland, A. J., Leff, M. A., Webb, S. J., Xiao, G. H., Devanaboyina, U. S., Nangju, N. A. and Feng, Y.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, **9**, 29-42 (2000)
- 66) Grant, D. M., Hughes, N. C., Janezic, S. A., Goodfellow, G. H., Chen, H. J., Gaedigk, A., Yu, V. L. and Grewal, R.: *Mutat. Res.*, **376**, 61-70 (1997)
- 67) Matsuoka, A., Yamazaki, N., Suzuki, T., Hayashi, M. and Sofuni, T.: *Mutat. Res.*, **272**, 223-236 (1992)
- 68) Bol, S. A., Horlbeck, J., Markovic, J., de Boer, J. G., Turesky, R. J. and Constable, A.: *Carcinogenesis*, **21**, 1-6 (2000)
- 69) Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H. and Sugimura, T.: *Cancer Res.*, **52**, 2092s-2098s (1992)
- 70) Yamamura, E. T., Sayama, M., Kakikawa, M., Mori, M., Taketo, A. and Kodaira, K. I.: *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1475**, 10-16 (2000)
- 71) Otsuka, C., Miura, K. F. and Ishidate, M., Jr.: *Mutat. Res.*, **371**, 23-28 (1996)
- 72) Yanagawa, Y., Sawada, M., Deguchi, T., Gonzalez, F. J. and Kamataki, T.: *Cancer Res.*, **54**, 3422-3427 (1994)
- 73) Hashimoto, H., Yanagawa, Y., Sawada, M., Itoh, S., Deguchi, T. and Kamataki, T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **320**, 323-329 (1995)
- 74) Wu, R. W., Tucker, J. D., Sorensen, K. J., Thompson, L. H. and Felton, J. S.: *Mutat. Res.*, **390**, 93-103 (1997)
- 75) Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y., Sakumi, K. and Tuzuki, T.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **122**, 199-206 (1996)
- 76) Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M. and Nakabeppu, Y.: *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 133-157 (1988)
- 77) Margison, G. P., Cooper, D. P. and Potter, P. M.: *Mutat. Res.*, **233**, 15-21 (1990)
- 78) Hakura, A., Morimoto, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *J. Bacteriol.*, **173**, 3663-3672 (1991)
- 79) Vaughan, P. and Sedgwick, B.: *J. Bacteriol.*, **173**, 3656-3662 (1991)
- 80) Yamada, M., Hakura, A., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *J. Bacteriol.*, **175**, 5539-5547 (1993)
- 81) Yamada, M., Sedgwick, B., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *J. Bacteriol.*, **177**, 1511-1519 (1995)
- 82) Sofuni, T., Hayashi, M., Nohmi, T., Matsuoka, A., Yamada, M. and Kamata, E.: *Mutat. Res.*, **464**, 97-104 (2000)
- 83) Yamada, M., Matsui, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **381**, 15-24 (1997)
- 84) Kushida, H., Fujita, K., Suzuki, A., Yamada, M., Endo, T., Nohmi, T. and Kamataki, T.: *Carcinogenesis*, **21**, 1227-1232 (2000)
- 85) Kamataki, T., Nunoya, K., Sakai, Y., Kushida, H. and Fujita, K.: *Mutat. Res.*, **428**, 125-130 (1999)
- 86) Okochi, E., Namai, E., Ito, K. and Mochizuki, M.: *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 49-52 (1995)
- 87) Kasai, H. and Nishimura, S.: *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **165-167** (1983)
- 88) Kasai, H., Chung, M. H., Jones, D. S., Inoue, H., Ishikawa, H., Kamiya, H., Ohtsuka, E. and Nishimura, S.: *J. Toxicol. Sci.*, **16** Suppl 1, 95-105 (1991)
- 89) Michaels, M. L. and Miller, J. H.: *J. Bacteriol.*, **174**, 6321-6325 (1992)
- 90) Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M. H., Laval, J., Grollman, A. P. and Nishimura, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 4690-4694 (1991)
- 91) Boiteux, S., O'Connor, T. R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 3916-3922 (1990)
- 92) O'Connor, T. R. and Laval, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5222-5226 (1989)
- 93) Michaels, M. L., Pham, L., Cruz, C. and Miller, J. H.: *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3629-3632 (1991)
- 94) Suzuki, M., Matsui, K., Yamada, M., Kasai, H., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **393**, 233-246 (1997)
- 95) Sera, N., Tokiwa, H. and Miyata, N.: *Carcinogenesis*, **17**, 2163-2169 (1996)
- 96) Tokiwa, H., Sera, N., Nakanishi, Y. and Sagai, M.: *Free. Radic. Biol. Med.*, **27**, 1251-1258 (1999)
- 97) Radicella, J. P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M. S. and Boiteux, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 8010-8015 (1997)
- 98) Rosenquist, T. A., Zharkov, D. O. and Grollman, A. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 7429-7434 (1997)
- 99) Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S. R., Nohmi, T., Taniwaki, M., Ohwada, S. and Yokota, J.: *Oncogene*, **14**, 2857-2861 (1997)
- 100) Lu, R., Nash, H. M. and Verdine, G. L.: *Curr. Biol.*, **7**, 397-407 (1997)
- 101) Aburatani, H., Hippo, Y., Ishida, T., Takashima, R., Matsuba, C., Kodama, T., Takao, M., Yasui, A., Yamamoto, K. and Asano, M.: *Cancer Res.*, **57**, 2151-2156 (1997)
- 102) Tani, M., Shinmura, K., Kohno, T., Shiroishi, T., Wakana, S., Kim, S. R., Nohmi, T., Kasai, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. and Yokota, J.: *Mamm. Genome.*, **9**, 32-37 (1998)
- 103) Kohno, T., Shinmura, K., Tosaka, M., Tani, M., Kim, S. R., Sugimura, H., Nohmi, T., Kasai, H. and Yokota, J.: *Oncogene*, **16**, 3219-3225 (1998)

- 104) Dherin, C., Radicella, J. P., Dizdaroglu, M. and Boiteux, S.: *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4001-4007 (1999)
- 105) Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B. J., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C., Li, Z., Wang, J., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J. K., Martinson, J. J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K. and Yokota, J.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, **8**, 669-674 (1999)
- 106) Gossen, J. A., de Leeuw, W. J., Tan, C. H., Zwarthoff, E. C., Berends, F., Lohman, P. H., Knook, D. L. and Vijg, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 7971-7975 (1989)
- 107) Kohler, S. W., Provost, G. S., Kretz, P. L., Fieck, A., Sorge, J. A. and Short, J. M.: *Genet. Anal. Tech. Appl.*, **7**, 212-218 (1990)
- 108) Kohler, S. W., Provost, G. S., Fieck, A., Kretz, P. L., Bullock, W. O., Sorge, J. A., Putman, D. L. and Short, J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7958-7962 (1991)
- 109) Kohler, S. W., Provost, G. S., Fieck, A., Kretz, P. L., Bullock, W. O., Sorge, J. A., Putman, D. L. and Short, J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7958-7962 (1991)
- 110) Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T. and Myhr, B. C.: *Mutat. Res.*, **285**, 219-224 (1993)
- 111) Tao, K. S., Urlando, C. and Heddle, J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10681-10685 (1993)
- 112) Nohmi, T., Katoh, M., Suzuki, H., Matsui, M., Yamada, M., Watanabe, M., Suzuki, M., Horiya, N., Ueda, O., Shibuya, T., Ikeda, H. and Sofuni, T.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**, 465-470 (1996)
- 113) Masumura, K., Matsui, M., Katoh, M., Horiya, N., Ueda, O., Tanabe, H., Yamada, M., Suzuki, H., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **34**, 1-8 (1999)
- 114) Horiguchi, M., Masumura, K., Ikehata, H., Ono, T., Kanke, Y., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **34**, 72-79 (1999)
- 115) Friedberg, E. C., Walker, G. C. and Siede, W.: DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington D.C., pp. 1-697 (1995)
- 116) Ziegler, A., Leffell, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E. and Bale, A. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 4216-4220 (1993)
- 117) Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. and Ponten, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10124-10128 (1991)
- 118) Dumaz, N., van Kranen, H. J., de Vries, A., Berg, R. J., Wester, P. W., van Kreijl, C. F., Sarasin, A., Daya-Grosjean, L. and de Gruijl, F. R.: *Carcinogenesis*, **18**, 897-904 (1997)
- 119) Dumaz, N., Stary, A., Soussi, T., Daya-Grosjean, L. and Sarasin, A.: *Mutat. Res.*, **307**, 375-386 (1994)
- 120) de Boer, J. G., Provost, S., Gorelick, N., Tindall, K. and Glickman, B. W.: *Mutagenesis*, **13**, 109-114 (1998)
- 121) Nohmi, T., Suzuki, M., Masumura, K., Yamada, M., Matsui, K., Ueda, O., Suzuki, H., Katoh, M., Ikeda, H. and Sofuni, T.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **34**, 9-15 (1999)
- 122) Masumura, K., Matsui, K., Yamada, M., Horiguchi, M., Ishida, K., Watanabe, M., Ueda, O., Suzuki, H., Kanke, Y., Tindall, K. R., Wakabayashi, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Cancer Lett.*, **143**, 241-244 (1999)
- 123) Okada, N., Masumura, K., Nohmi, T. and Yajima, N.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **34**, 106-111 (1999)
- 124) Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H., Masumura, K., Nohmi, T., Nishimura, S. and Noda, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 4156-4161 (2000)
- 125) Amanuma, K., Takeda, H., Amanuma, H. and Aoki, Y.: *Nat. Biotechnol.*, **18**, 62-65 (2000)
- 126) Weber, W. W.: *Mol. Diagn.*, **4**, 299-307 (1999)
- 127) Hulla, J. E., Miller, M. S., Taylor, J. A., Hein, D. W., Furlong, C. E., Omiecinski, C. J. and Kunkel, T. A.: *Toxicol. Sci.*, **47**, 135-143 (1999)
- 128) Friedberg, E. C. and Gerlach, V. L.: *Cell*, **98**, 413-416 (1999)
- 129) Johnson, R. E., Washington, M. T., Prakash, S. and Prakash, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12224-12226 (1999)
- 130) Wagner, J., Gruz, P., Kim, S. R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. P. and Nohmi, T.: *Mol. Cell*, **4**, 281-286 (1999)
- 131) Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 8919-8924 (1999)
- 132) Tang, M., Pham, P., Shen, X., Taylor, J. S., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M. F.: *Nature*, **404**, 1014-1018 (2000)
- 133) Reuven, N. B., Arad, G., Maor-Shoshani, A. and Livneh, Z.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 31763-31766 (1999)
- 134) Maor-Shoshani, A., Reuven, N. B., Tomer, G. and Livneh, Z.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 565-570 (2000)
- 135) Lin, W., Wu, X. and Wang, Z.: *Mutat. Res.*, **433**, 89-98 (1999)
- 136) Lin, W., Xin, H., Zhang, Y., Wu, X., Yuan, F. and Wang, Z.: *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4468-4475 (1999)
- 137) Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S. and Hanaoka, F.: *EMBO J.*, **19**, 3100-3109 (2000)
- 138) Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F. and Kunkel, T. A.: *Nature*, **404**, 1011-1013 (2000)
- 139) Masutani, C., Araki, M., Yamada, A., Kusumoto, R., Nogimori, T., Maekawa, T., Iwai, S. and Hanaoka, F.: *EMBO J.*, **18**, 3491-3501 (1999)
- 140) Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K. and Hanaoka, F.: *Nature*, **399**, 700-704 (1999)
- 141) Ogi, T., Kato, T., Jr., Kato, T. and Ohmori, H.: *Genes Cells.*, **4**, 607-618 (1999)
- 142) Gerlach, V. L., Aravind, L., Gotway, G., Schultz, R. A., Koonin, E. V. and Friedberg, E. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 11922-11927 (1999)
- 143) Johnson, R. E., Kondratik, C. M., Prakash, S. and Prakash, L.: *Science*, **285**, 263-265 (1999)
- 144) Johnson, R. E., Prakash, S. and Prakash, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3838-3843 (2000)
- 145) Johnson, R. E., Washington, M. T., Prakash, S. and

- Prakash, L.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 7447-7450 (2000)
- 146) Watanabe, M., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **301**, 7-12 (1993)
- 147) Yamada, M., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **283**, 29-33 (1992)
- 148) Espinosa-Aguirre, J. J., Yamada, M., Matsui, K., Watanabe, M., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **439**, 159-169 (1999)
- 149) Yamada, M., Espinosa-Aguirre, J. J., Watanabe, M., Matsui, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **375**, 9-17 (1997)
- 150) Gruz, P., Matsui, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **354**, 157-170 (1996)
- 151) Sui, H., Suzuki, M., Yamada, M., Hara, T., Kawakami, K., Shibuya, T., Nohmi, T. and Sofuni, T.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **34**, 221-226 (1999)
- 152) Watanabe, M., Matsuoka, A., Yamazaki, N., Hayashi, M., Deguchi, T., Nohmi, T. and Sofuni, T.: *Cancer Res.*, **54**, 1672-1677 (1994)
- 153) Kami, H., Watanabe, T., Takemura, S., Kameda, Y. and Hirayama, T.: *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 165-169 (2000)
- 154) Knasmuller, S., Schwab, C. E., Land, S. J., Wang, C. Y., Sanyal, R., Kundi, M., Parzefall, W. and Darroudi, F.: *Mutagenesis*, **14**, 533-540 (1999)
- 155) Cerna, M., Pastorkova, A., Vrbikova, V., Smid, J. and Rossner, P.: *Mutat. Res.*, **444**, 373-386 (1999)
- 156) Dang, L. N. and McQueen, C. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **159**, 77-82 (1999)
- 157) Marvin, C. H., McCarry, B. E., Lundrigan, J. A., Roberts, K. and Bryant, D. W.: *Sci. Total. Environ.*, **231**, 135-144 (1999)
- 158) Martin, F. L., Cole, K. J., Weaver, G., Williams, J. A., Millar, B. C., Grover, P. L. and Phillips, D. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 319-326 (1999)
- 159) de Mejia, E. G., Castano-Tostado, E. and Loarca-Pina, G.: *Mutat. Res.*, **441**, 1-9 (1999)
- 160) Pfau, W., Martin, F. L., Cole, K. J., Venitt, S., Phillips, D. H., Grover, P. L. and Marquardt, H.: *Carcinogenesis*, **20**, 545-551 (1999)
- 161) Brooks, L. R., Hughes, T. J., Claxton, L. D., Austern, B., Brenner, R. and Kremer, F.: *Environ. Health. Perspect.*, **106** Suppl 6, 1435-1440 (1998)
- 162) Hughes, T. J., Claxton, L. D., Brooks, L., Warren, S., Brenner, R. and Kremer, F.: *Environ. Health. Perspect.*, **106** Suppl 6, 1427-1433 (1998)
- 163) Watanabe, T., Ishida, S., Minami, H., Kasai, T., Ogawa, S., Wakabayashi, K. and Hirayama, T.: *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1501-1507 (1998)
- 164) Gichner, T., Wagner, E. D. and Plewa, M. J.: *Mutat. Res.*, **420**, 115-124 (1998)
- 165) Sayama, M., Mori, M., Shoji, M., Uda, S., Kakikawa, M., Kondo, T. and Kodaira, K. I.: *Mutat. Res.*, **420**, 27-32 (1998)
- 166) Cerna, M., Pastorkovea, A., Smid, J., Dobias, L. and Rossner, P.: *Toxicol. Lett.*, **96-97**, 335-339 (1998)
- 167) Beudot, C., De Meo, M. P., Dauzonne, D., Elias, R., Laget, M., Guiraud, H., Balansard, G. and Dumenil, G.: *Mutat. Res.*, **417**, 141-153 (1998)
- 168) Gonzalez, d. M., Quintanar-Hernandez, A. and Loarca-Pina, G.: *Mutat. Res.*, **416**, 11-19 (1998)
- 169) Arimochi, H., Kinouchi, T., Kataoka, K., Kuwahara, T. and Ohnishi, Y.: *J. Med. Invest.*, **44**, 193-198 (1998)
- 170) Hrelia, P., Fimognari, C., Maffei, F., Brighenti, B., Garuti, L., Burnelli, S. and Cantelli-Forti, G.: *Mutat. Res.*, **397**, 293-301 (1998)
- 171) Bombick, B. R., Avalos, J. T., Nelson, P. R., Conrad, F. W. and Doolittle, D. J.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **31**, 169-175 (1998)
- 172) Hayakawa, K., Nakamura, A., Terai, N., Kizu, R. and Ando, K.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **45**, 1820-1822 (1997)
- 173) Gonzalez, d. M., Ramos-Gomez, M. and Loarca-Pina, G.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **30**, 346-353 (1997)
- 174) Vaatanen, A. K., Ridanpaa, M., Norppa, H. and Kociba, P.: *Mutat. Res.*, **379**, 185-190 (1997)
- 175) Hughes, T. J., Lewtas, J. and Claxton, L. D.: *Mutat. Res.*, **391**, 243-258 (1997)
- 176) Anari, M. R., Josephy, P. D., Henry, T. and O'Brien, P. J.: *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 582-588 (1997)
- 177) Gonzalez, d. M., Loarca-Pina, G. and Ramos-Gomez, M.: *Mutat. Res.*, **389**, 219-226 (1997)
- 178) Ono, Y., Wu, X., Noda, A., Noda, H., Takeo, S., Nasa, Y., Isayama, Y., Imai, M. and Sera, N.: *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 61-65 (1997)
- 179) Sasaki, Y. F., Chiba, A., Murakami, M., Sekihashi, K., Tanaka, M., Takahoko, M., Moribayashi, S., Kudou, C., Hara, Y., Nakazawa, Y., Nakamura, T. and Onizuka, S.: *Mutat. Res.*, **371**, 203-214 (1996)
- 180) Gupta, R. L., Vats, V. and Juneja, T. R.: *Mutat. Res.*, **370**, 195-201 (1996)
- 181) Rosser, P. F., Ramachandran, P., Sangaiah, R., Austin, R. N., Gold, A. and Ball, L. M.: *Mutat. Res.*, **369**, 209-220 (1996)
- 182) Kitamori, S.: *Fukuoka. Igaku. Zasshi.*, **87**, 142-150 (1996)
- 183) Malfatti, M. A., Connors, M. S., Mauthe, R. J. and Felton, J. S.: *Cancer Res.*, **56**, 2550-2555 (1996)
- 184) Chen, C. C. and Lee, H.: *Mutat. Res.*, **367**, 105-114 (1996)
- 185) De Flora, S., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., van Zandwijk, N., Wigbout, G., Qian, G. S., Zhu, Y. R. and Kensler, T. W.: *J. Cell Biochem. Suppl.*, **25**, 92-98 (1996)
- 186) Gichner, T., Veleminsky, J., Wagner, E. D. and Plewa, M. J.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **27**, 59-66 (1996)
- 187) Higashimoto, M., Yamamoto, T., Kinouchi, T., Matsumoto, H. and Ohnishi, Y.: *Mutat. Res.*, **367**, 43-49 (1996)
- 188) Gupta, R. L., Kaur, I. P. and Juneja, T. R.: *Mutat. Res.*, **334**, 273-281 (1995)
- 189) Hrelia, P., Vigagni, F., Maffei, F., Fimognari, C., Lamartina, L., Spinelli, D., Juric, P., Guerra, M. C. and

- Cantelli-Forti, G.: *Mutagenesis*, **10**, 171-177 (1995)
- 190) Rossi, C., Poli, P., Buschini, A., Cassoni, F., Magnani, F., Lucertini, S., Tolomei, S. and Gerbelli, C.: *Toxicol. Lett.*, **77**, 289-298 (1995)
- 191) Lemke, L. E. and McQueen, C. A.: *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 559-565 (1995)
- 192) Johansson, M. A., Knize, M. G., Jagerstad, M. and Felton, J. S.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **25**, 154-161 (1995)
- 193) Vikse, R., Hatch, F. T., Winter, N. W., Knize, M. G., Grivas, S. and Felton, J. S.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**, 79-85 (1995)
- 194) Scheepers, P. T., Martens, M. H., Velders, D. D., Fijneman, P., van Kerkhoven, M., Noordhoek, J. and Bos, R. P.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **25**, 134-147 (1995)
- 195) Oguri, A., Karakama, K., Arakawa, N., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.: *Mutat. Res.*, **346**, 57-60 (1995)
- 196) Gichner, T., Voutsinas, G., Patrinely, A., Kappas, A. and Plewa, M. J.: *Mutat. Res.*, **309**, 201-210 (1994)
- 197) Stamm, S. C., Zhong, B. Z., Whong, W. Z. and Ong, T.: *Mutat. Res.*, **321**, 253-264 (1994)
- 198) Hirvonen, A., Nylund, L., Kociba, P., Husgafvel-Pursiainen, K. and Vainio, H.: *Carcinogenesis*, **15**, 813-815 (1994)
- 199) Balimandawa, M., de Meester, C. and Leonard, A.: *Mutat. Res.*, **321**, 7-11 (1994)
- 200) Stamm, S. C., Lan, W., Zhong, B. Z., Whong, W. Z. and Ong, T.: *Mutat. Res.*, **320**, 261-271 (1994)
- 201) Hatcher, J. F., Rao, K. P. and Swaminathan, S.: *Mutagenesis*, **8**, 113-120 (1993)
- 202) Lake, R. S., Gaworski, C. L., Crouse, E. W. and Heck, J. D.: *Mutat. Res.*, **301**, 157-163 (1993)
- 203) Gotzl, E. and Schimmer, O.: *Mutagenesis*, **8**, 17-22 (1993)
- 204) Maragos, C. M., Andrews, A. W., Keefer, L. K. and Elespuru, R. K.: *Mutat. Res.*, **298**, 187-195 (1993)
- 205) Thompson, D. C., Josephy, P. D., Chu, J. W. and Eling, T. E.: *Mutat. Res.*, **279**, 83-89 (1992)
- 206) Espinosa-Aguirre, J. J., Reyes, R. E. and Cortinas, d. N.: *Mutat. Res.*, **264**, 139-145 (1991)
- 207) Scheepers, P. T., Theuws, J. L. and Bos, R. P.: *Mutat. Res.*, **260**, 393-399 (1991)
- 208) Cunningham, M. L. and Matthews, H. B.: *Mutat. Res.*, **242**, 101-110 (1990)

「抄録の日本語訳」

環境中に存在するさまざまな化学物質の遺伝毒性を効率よく検出し、そのヒトに対する危険性を評価するために新しい遺伝毒性試験法を開発した。アセチル Co-A O-アセチル転移酵素のような薬物代謝酵素遺伝子を持つプラスミドを導入した *Salmonella typhimurium* や、O⁶-メチルグアニン DNA メチル転移酵素のような DNA 修復酵素を欠損した菌株は、特定のグループの変異原にきわめて高い感受性を示す。このため、高感受性試験菌株は、さまざまな物質からなる混合物 (complex mixture) の遺伝毒性検出に汎用されている。化学物質によって誘発される突然変異を齧歯類のさまざまな臓器で検出し解析するため、*gpt delta* と名付けたトランスジェニックマウスを樹立した。遺伝的に改変された生物を用いる遺伝毒性試験の将来について考察する。