

## &lt;特集論文&gt;

# 動物およびヒト由来株化細胞を使った 天然有機物質の突然変異抑制作用の評価

Antimutagenic Activities of NOMs in Chinese Hamster Cells  
and Human Colon Carcinoma Cells

牟礼佳苗\*, 竹下達也

和歌山県立医科大学医学部公衆衛生学

Kanae Mure\* and Tatsuya Takeshita  
Department of Public Health, Wakayama Medical University School of Medicine

## Abstract

In this study, the antimutagenic effects of dietary NOMs, such as tomato derived lycopene (LYC) and classic antioxidant  $\alpha$ -tocopherol (TOC), on renowned carcinogen-induced and spontaneous mutagenesis were tested. Chinese hamster lung fibroblast V79 cell line was chosen for the carcinogen-induced mutagenesis assay, and human colon carcinoma HCT116 cell line which exhibits elevated levels of spontaneous mutagenesis was chosen for the spontaneous mutagenesis assay. Both LYC and TOC showed strong effects on reducing both induced and spontaneous mutagenesis, suggesting their important role on cancer prevention. The assays we have used in this study can be useful tools to evaluate the role of NOMs on cancer prevention.

**Key Words :** NOM, lycopene,  $\alpha$ -tocopherol, mutagenesis, HPRT

## 1. はじめに

近年、天然有機物質（NOM）が、環境中においてはダイオキシン等の環境汚染物質や発がん物質を吸着したり、また体内にとり込まれたこれらの物質の代謝に影響を与えることで、毒性や発がん性を抑制することが報告されている<sup>1)</sup>。近年の日本人の第1死因はがんであり、3人にひとりががんで死亡していることから、発がん抑制効果のある NOM の発見や開発は、非常に重要である。

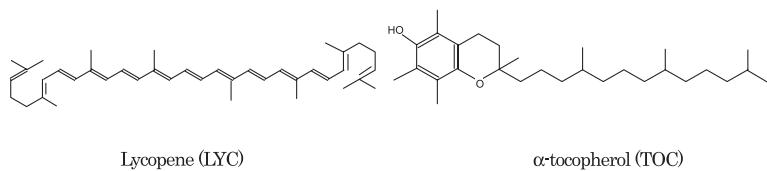
本研究では、NOM の発がん抑制作用のメカニズムを詳細に知ることを目的とし、動物由来細胞およびヒト由来株化細胞を用い、発がんの第一過程である突然変異に対する NOM の影響評価について検討した。

体内に取り込まれた毒性・発がん物質は、まず遺伝子に付加体等の傷をつけて突然変異を引き起こし、その傷が治らない場合に細胞分裂・増殖に伴って傷が蓄積し、

その後のさまざまな細胞の営みに狂いが生じ、がん化する。この遺伝子の変異は環境変異原物質により引き起こされるだけでなく、自然発生しており<sup>2)</sup>、特定の発がん物質で誘発された突然変異への影響だけでなく、自然発生突然変異への影響をあわせて調べることが重要であると考えられる。

本研究では、まず突然変異試験によく用いられているチャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽V79細胞を用いて、作用機序のよくわかっている発がん物質 *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)  $\sim$  24時間曝露させることで誘発される突然変異を、食品由来 NOM であるトマト由来リコ펜 (LYC) およびビタミン E (TOC) がどのように抑制するかについて調べた。また、ヒト由来株化細胞として、DNA 修復系に異常がある為に高い自然発生突然変異率を示す大腸がん由来細胞<sup>3)</sup>を選び、LYC および TOC がどのように自然発生突然変異を抑制するかについて、最大3週間 LYC および TOC で処理して検討した。

\* 〒641-8509 和歌山市紀三井寺811-1  
TEL: 073-441-0647 FAX: 073-448-0238  
E-mail: kana@wakayama-med.ac.jp



**Fig. 1** Chemical structures of lycopene and  $\alpha$ -tocopherol.

## 2. 材料と方法

### 2.1 細胞

動物細胞は、チャイニーズハムスター肺由来 V79 細胞を、ヒト細胞は大腸がん患者由来 HCT116 細胞を用いた。V79 細胞（理化学研究所）は、5%の牛胎児血清 (FBS, Invitrogen 社製) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で、HCT116 細胞 (American Type Culture Collection) は、10%の非働化した FBS 含有 DMEM : Ham's F12 (1:1) で培養した。試験に臨む前に、両細胞とも HAT (100  $\mu$ M hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16  $\mu$ M thymidine) 含有培地で 10 日以上培養し、バックグラウンドの突然変異細胞を除去した。

### 2.2 被験物質

LYC および TOC の化学構造を Fig. 1 に示す。MNNG は DMSO に、LYC は tetrahydrofuran (THF) に、TOC はエタノール (EtOH) に溶かした。

### 2.3 毒性試験 (clonal survival assay)

突然変異試験を始める前に、各被験物質とその組み合わせについて、毒性のない濃度を選ぶために、clonal survival assay を行った。各被験物質の濃度については、予備実験でヒト細胞において毒性のないことがわかっている濃度を基に、新たにその 2 倍の濃度 (MNNG: 5, 10  $\mu$ M, LYC: 5, 10  $\mu$ M, TOC: 50, 100  $\mu$ M) を設定して、毒性を調べた。また、各溶媒については、THF は培地内最終濃度 0.05 %, EtOH は培地内最終濃度 0.1 % について毒性を調べた。1000 個の細胞を各濃度に調節した被験物質を含む培地で 1 週間培養し、メタノールで固定後、0.1 % クリスタルバイオレット液で染色し、生存した細胞数を求め、control (未処理) に対する % で survival (生存率) を算出した。

### 2.4 被験物質への曝露方法

#### 2.4.1 V79 細胞

$2 \times 10^5$  個になるように調整した V79 細胞をディッシュ

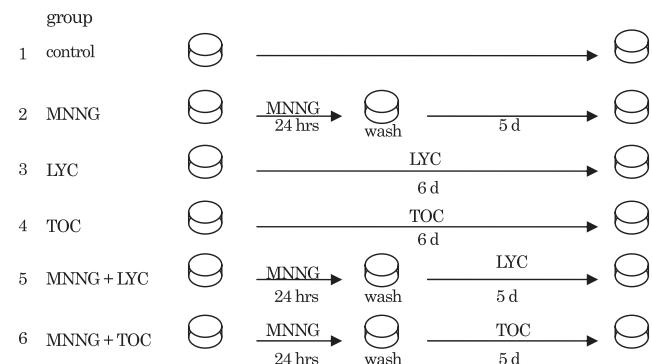
に入れ、Fig. 2 に示すように各被験物質に曝露した。Control 群 (group 1) は通常培地で、LYC 群 (group 3) および TOC 群 (group 4) は 5  $\mu$ M の LYC および 50  $\mu$ M の TOC 含有培地で 6 日間培養した。MNNG 曝露群については、MNNG に 24 時間培養したのち Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) で 2 回洗浄して MNNG を除き、通常 (group 2), あるいは LYC (group 5) および TOC (group 6) 含有培地に替えてさらに 5 日培養し、突然変異試験に用いた。

#### 2.4.2 HCT116 細胞

HCT116 細胞に関しては、Fig. 3 に示したように、まず試験開始時の自然発生突然変異頻度を検出するため、HAT 培地で 10 日以上培養した HCT116 細胞について突然変異試験を行った。同時に、 $2 \times 10^5$  個になるように通常、あるいは LYC または TOC 含有培地に調整して培養し、1 週間ごとに新たに  $2 \times 10^5$  個になるようにそれぞれの培地に細胞を移し替え、最高 3 週間まで被験物質で処理した。突然変異試験は、1 週間ごとに行った。

### 2.5 突然変異試験

突然変異を検出する方法としては、HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 法を用いた。HPRT は DNA 合成に必要な酵素で、細胞を DNA の構成成分であるグアニンの類似体である 6-thioguanine (6-TG) を含んだ培地



**Fig. 2** Treatments of V79 cells with MNNG and/or dietary NOMs.

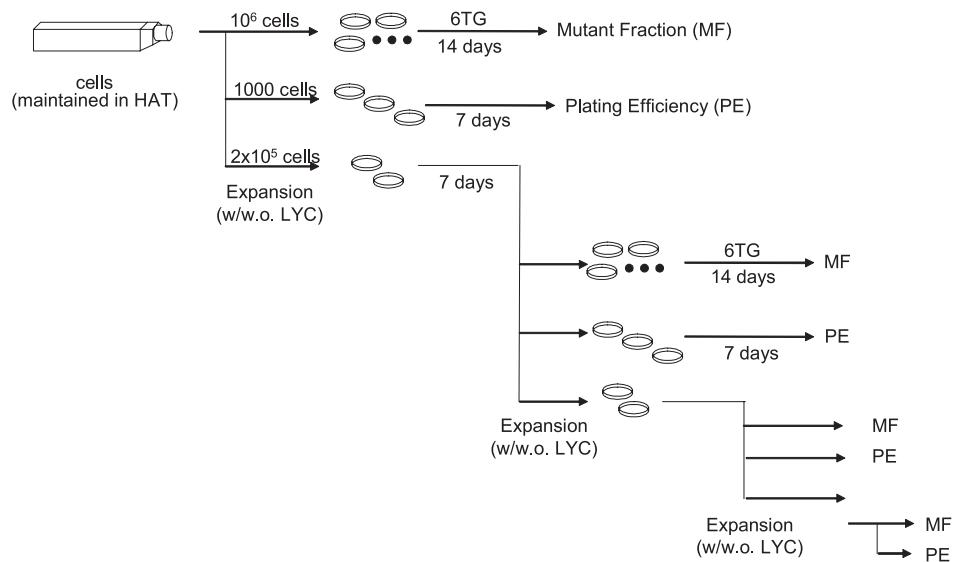


Fig. 3 Spontaneous mutagenesis assay in HCT116 cells.

で培養すると、HPRT 酵素により DNA 合成時にグアニンと誤って 6-TG が利用され、細胞は死滅してしまう。ところが、*HPRT* 遺伝子に突然変異が起きて HPRT が失活していると、6-TG が利用されないために細胞は生き残り、コロニーとして観察される。HPRT 試験はこの原理を利用した突然変異検出試験法で、変異原物質で処理した細胞を 6-TG 添加培地で培養し、コロニーとして観察された 6-TG 耐性細胞（突然変異細胞）数を数えることで行う<sup>4)</sup>。

具体的には、6-TG含有培地にV79細胞あるいはHCT116細胞を10<sup>6</sup>個になるように調整し、100mmのディッシュにまいて2週間後にメタノールで固定し、クリスタルバイオレットで染色して突然変異細胞数を算出した。また同時に1000個の細胞を通常培地で培養し、1週間後に固定、染色して、観察されるコロニー数を1000で割って Plating Efficiency (PE) を算出した。突然変異抑制頻度 (Mutant Fraction, MF), generation (世代数) および自然発生突然変異率 (Mutation Rate) は下記の式にて算出した<sup>5)</sup>。

$$MF = \frac{\text{突然変異細胞数}}{10^6 \times PE}$$

$$G = \frac{\ln(\text{final number of cells}) - \ln(2 \times 10^5 \times PE)}{\ln(2)}$$

$$MR = \frac{2 \times MF}{G}$$

（グラフにgenerationごとのMFをプロットした場合の slope にあたる）

### 3. 結果・考察

#### 3.1 各被験物質の毒性評価

各被験物質の毒性を、clonal survival assay を用いて評価したところ、Fig. 4 に示すようになった。被験物質の溶媒として使用した THF, EtOH ともに、各培地内最終濃度で毒性を示さなかった。各被験物質とも、単独では試験に用いた濃度での survival は 80%以上で、毒性はほとんどないと考えられるが、高濃度の組み合わせでは毒性を示した。

そこで、毒性を示さなかった、グラフ内に影付の bar で示した濃度、MNNG および LYC は 5 μM, TOC は 50 μM を突然変異試験用の曝露濃度として用いた。

#### 3.2 V79 細胞を用いた MNNG が誘発する突然変異への影響評価

V79 細胞を用いた LYC および TOC の MNNG 誘発突然変異抑制効果を Fig. 5 に示す。MNNG は control に比べて 12 倍高い突然変異頻度を誘発した。LYC および TOC は、突然変異を誘発せず、MNNG が誘発した突然変異を抑制した。突然変異抑制率は、LYC が 31%, TOC が 62% で、TOC の方がより高く MNNG の誘発する突然変異を抑制する結果を得た。MNNG は、DNA をアルキル化することで突然変異を誘発することが知られている<sup>6)</sup>。したがって、LYC、特に TOC は、DNA の修飾等突然変異を誘発する段階に働きかけて突然変異頻度を抑制する可能性が示唆される。

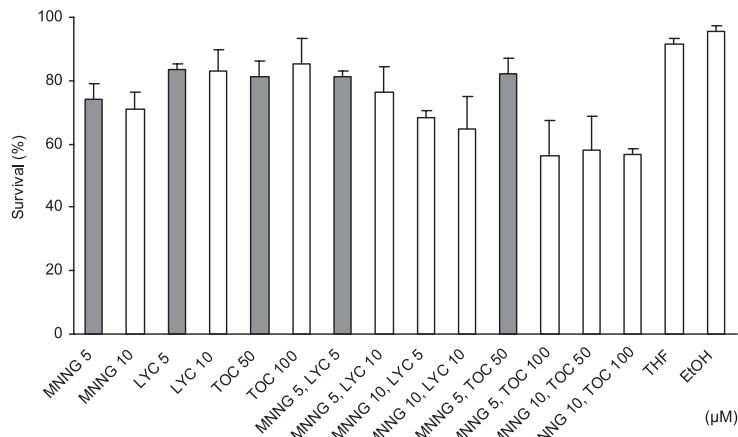


Fig. 4 Toxieties of MNNG, LYC and TOC in V79 cells.

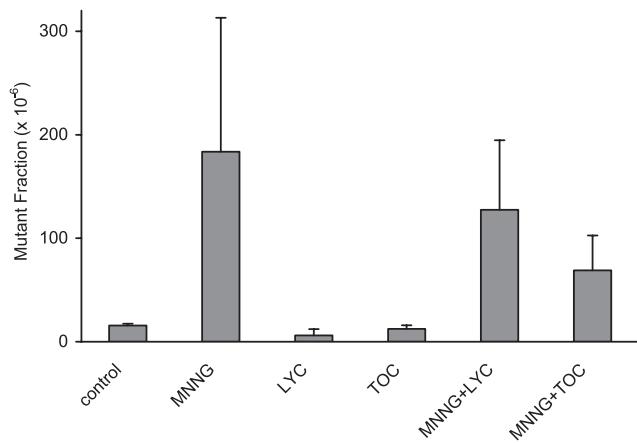


Fig. 5 Antimutagenic effects of LYC and TOC on MNNG-induced mutagenicity in V79 cells.

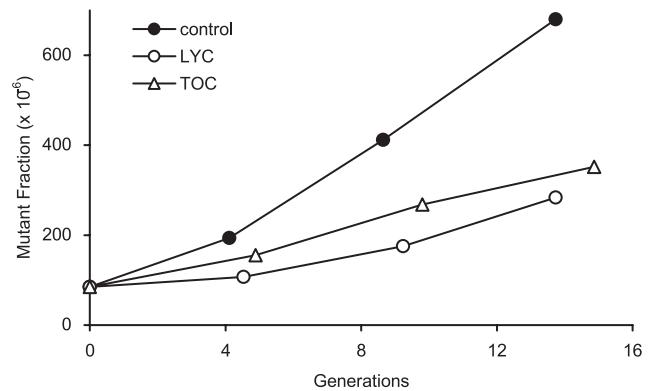


Fig. 6 Reduction of spontaneous mutagenesis by LYC and TOC in HCT116 cells.

### 3.3 HCT116 細胞を用いた自然発生突然変異への影響評価

LYC および TOC の自然発生突然変異への影響を 1 週間ごとに 3 週間まで調べたところ、Fig. 6 に示すような結果になった。自然発生突然変異率を算出したところ、control 群は 81.7, LYC は 24.9, TOC は 35.9 であった。この自然発生突然変異率から算出した LYC の自然発生突然変異抑制率は 69.6%, TOC は 56.1% であり、LYC の方がより高くヒト大腸がん由来細胞中の自然発生突然変異を抑制する結果を得た。

### 4. 考察

LYC および TOC は、ともに抗酸化物質であり、作用機序については、TOC の方がより明らかになっている。TOC は脂溶性で細胞膜に存在し、過酸化脂質の酸化を防御する<sup>7)</sup>。著者らの研究においても、主に抗酸化作用により突然変異を抑制することが明らかになっている<sup>5)</sup>。一方 LYC は Fig. 1 に示したように 13 の二重結合を持つ長い鎖状の物質で、活性酸素に直接働きかけることで抗酸化作用を示すといわれており、二重結合の数の違いから、β-carotene よりも強い抗酸化作用を示すことが報告されている<sup>8)</sup>。しかしながら、著者らによって抗酸化作用以外に重要な抗変異原性作用を示すことが明らかになっており<sup>5)</sup>、本研究において LYC が示した突然変異抑制効果にも、抗酸化作用以外の機構が働いていると考えられる。

本研究において、LYC は自然発生突然変異を、TOC は MNNG が誘発した突然変異をより効果的に抑制したことから、各 NOM 特有の突然変異抑制機構が存在することが示唆される。今後各 NOM に抑制された突然変異のタイプを調べることで、詳細なメカニズムの解明が必要であると考えられる。

## 5. まとめ

今回、2種類の細胞を用いて、NOM が変異原物質誘発発突然変異および自然発生突然変異に与える影響について調べた。本研究では、NOM を MNNG 曝露時および洗浄後と一貫して培地内に存在させたが、MNNG 曝露時のみ、あるいは洗浄後のみに加える等すれば、各 NOM が突然変異誘発過程そのものに関わっているのか、あるいは DNA 修復等、誘発された突然変異が固定され、蓄積される過程に関与しているのかが検討できる。

本研究で用いた動物由来（V79）細胞およびヒト由来株化（HCT116）細胞における誘発突然変異および自然発生突然変異測定法は、さまざまな NOM の発がん予防効果を調べる際に有用なツールとなると考えられる。

## 〔参考文献〕

- 1) Matubara, J., Takahashi, J., Ikeda, K., Shimizu, Y. and Matsui, S.: The effects of humic substances on the intake of micro-organic pollutants into the aquatic biota, *Water Sci. Technol.*, **47**(7-8), 117-124 (2003).
- 2) Benitt, S.: Mechanisms of spontaneous human cancers, *Environ. Health Perspect.*, **104** (Suppl. 3), 633-637 (1996).
- 3) Glaab, W.E. and Tindall, K.R.: Mutation rate at the *hprt* locus in human cancer lines with specific mismatch repair gene defects, *Carcinogenesis*, **18**, 1-8 (1997).
- 4) Myhr, B.C. and Dipalo, J.A.: Requirement for cell dispersion prior to selection of induced azaguanine-resistant colonies of Chinese hamster cells. *Genetics*, **80**(1), 157-169 (1975).
- 5) Mure, K. and Rossman, T.G.: Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants, *Mutat. Res.*, **480-481**, 85-95 (2001).
- 6) Sugimura, T. and Terada, M.: Experimental chemical carcinogenesis in the stomach and colon. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **28**(3), 163-167 (1998).
- 7) Lábj, J., Slamečová, D. and Košikova, B.: Reduction of genotoxic effects of the carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by dietary lignin in mammalian cells cultured *in vitro*, *Nutr. Cancer*, **47**(1), 95-103 (2003).
- 8) Mortensen, A., Skibsted, L.H., Sampson, J., Rice-Evans, C. and Everett, S.A.: Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants, *FEBS Lett.*, **418**, 91-97 (1997).

（受付 2005. 3. 31）

（受理 2005. 6. 10）