

II-452 枯草菌 Rec-assay 法による 抗ガン剤の遺伝毒性評価

京都大学工学部付属環境微量汚染制御実験施設 正 員 松井 三郎
京都大学工学部付属環境微量汚染制御実験施設 学生員 ○松田 知成

1. はじめに

現在ガンの化学療法には多くの種類の抗ガン剤が使われるが、それらの多くは抗ガン作用と同時に発ガン作用も併せ持っている。化学療法を受けているガン患者の排せつ物の中には当然多量の抗ガン剤が含まれており、多くの場合、これらの物質はノーチェックで都市下水に流れ込む。従って、もし処理場で処理しきれなければ、これらの抗ガン剤は環境水中にばらまかれることになるのである。将来、病院廃水におけるこれらの抗ガン物質は当然規制されるべきであるが、そのためには抗ガン剤の遺伝毒性を検出する方法が必要である。従って今回は抗ガン剤のDNA損傷性をRec-assay液体法によって検出できるかどうか確認した。

2. 検定物質

今回調べた抗ガン剤は、代謝キック抗剤である5-アザシチジン及び5-フルオロウラシルの2物質と、抗生物質であるアクチノマイシンD、マイトマイシンC及びブレオマイシンの3物質であり、合わせて5物質についてRec-assay液体法による遺伝毒性試験を行った。

3. 実験結果及び考察

これら5物質についてRec-assay液体法を行った結果を表-1に示す。Rec-assay液体法によるDNA損傷性の判定基準によると「S-probitが0.593以上」の物質はDNA損傷性強陽性であるので、今回調べた抗ガン剤はすべて極めて強いDNA損傷性を持っていると考えられる。

次に同じ物質について、文献検索から得られているAmesテスト、umuテスト及び動物実験による発ガン性のデータとの比較を表-2に示す。これを見ると今回調べた5物質全てに動物実験による発ガン性が認められているのに対して、サルモネラ菌TA100株を用いたAmesテストではデータ不足の5-アザシチジンを除いてすべて変異原性は陰性であった。また改良型のTA102株でも5-フルオロウラシルとアクチノマイシンDは変異原性陰性であった。umuテストではアクチノマイシンDが陰性であった。これに対してRec-assay液体法ではすでに述べたように5物質全

表-1 抗ガン剤のRec-assay液体法の結果

サブ*ル	C50Rec+ (ppm)	C50Rec- (ppm)	S-probit	Rec-gram (1/ppm)	DNA damag
5-アザシチジン	3036	1.397	6.67	4.8	++
5-フルオロウラシル	1.997	7.89×10^{-3}	4.81	611.3	++
アクチノマイシンD	0.095	0.0107	1.90	178.0	++
マイトマイシンC	8.89×10^{-3}	7.36×10^{-4}	2.16	2937	++
ブレオマイシン	0.471	0.047	2.01	43.1	++

表-2 抗ガン剤のRec-assayの結果と変異原性及びガン原性との比較

サブ*ル	Rec-assay	umuテスト	Amesテスト	ガン原性
5-アザシチジン	+	?	?	+
5-フルオロウラシル	+	+	-	+
アクチノマイシンD	+	-	-	+
マイトマイシンC	+	+	-*	+
ブレオマイシン	+	+	-*	+

+ 陽性 - 陰性 *TA102で陽性 ? データ不足

てに強いDNA損傷性が検出されている。発ガンの疑いのある物質全てを検出するのが変異原テストの目的とするならば、この5つの抗ガン剤に限って言えば他の変異原テストに比べてRec-assay液体法の結果が最も優れていたと行うことができる。データの蓄積が乏しいのでまだはっきりしたことは言えないが、umuテストやAmesテストでは原理上検出不可能な物質もRec-assayならば検出できると言った場合が多いと思われる。例えばアクチノマイシンDはDNAの転写を抑制する働きがあるのでUmuDCタンパクの発現量が抑えられるためumuテストやAmesテストでは陰性になると考えられるが、Rec-assayではDNA損傷性は強陽性である。

4. 代謝キック抗剤のDNA損傷性

多くの化学物質や放射線の場合、線量-生存率曲線は標的理論に従うが、代謝キック抗剤である5-アザシチジンや5-フルオロウラシルの線量-生存率曲線(下図)は明らかに標的理論に従っていないことが今回の研究で明らかになった。それではどのような理由で代謝キック抗剤はこのような線量-生存率曲線を示すのだろうか。また表-1から明らかなようにこれらの物質は強いDNA損傷性を持っている。いったいどのような作用で代謝キック抗剤はDNAを損傷するのだろうか。この2つの疑問をうまく説明するために次のような仮説を立ててみた。5-フルオロウラシルは生体内でdUMPをdTTPにかえるチミジル酸シンターゼをキック抗阻害することによってdTTPの生成を抑える。この結果細胞はチミジル酸ストレスの状態になる。チミジル酸ストレスとは細胞内のdTTP、dTDP、dTTPの供給が不足した状態を指す。細胞がチミジル酸ストレスになるとDNAの2重鎖切断が起こることが知られている。チミジル酸シンターゼの活性が低くなればなるほど、細胞内のチミジル酸ストレスは増大し、その結果DNAの2本鎖切断の頻度も上がり生存率は低くなる。そこで非常に大ざっぱに考えて、チミジル酸シンターゼの活性と生存率が比例するとする。すなわち

$$\text{生存率 } S = k * (\text{チミジル酸シンターゼの酵素活性}) \quad (k: \text{定数})$$

一般に酵素活性は阻害剤の濃度を x とすれば、

$$\text{酵素活性} = 1 / ax + b \quad (a, b: \text{定数})$$

で表せる。従って

$$\text{生存率 } S = k / ax + b \quad \text{となる。}$$

従って5-フルオロウラシルの線量-生存率曲線は下図の様な双曲線状になると考えられる。

次に5-アザシチジンは生体内でリン酸化されてdCTPのアナログとして働く。いままで核酸アナログは正常ヌクレオチドの代わりにDNA中に取り込まれてトランジションやトランスバージョン変異を誘発するのが主な作用であると考えられていた。しかしこのような小さな変異で表-1で示したような強いDNA損傷性を示すとは考えにくいので、次のように考えられる。細胞内のdCTPの量はフィードバック制御によって恒に一定に保たれているが、5-アザシチジンがdCTPのアナログとして働くと、このフィードバック制御によって細胞内のdCTPの生成は著しく阻害されるだろう。もしチミジル酸の欠乏によって、チミジル酸ストレスと同じ様なDNA切断が生じるとすれば、5-アザシチジンによるDNA損傷の機構をうまく説明することができる。

