"Rec assay" を用いたヒト胆汁の変異原性について

新潟大学医学部衛生学教室（主任：山本正治教授）
真 柄 純 子

Rec Assay of Human Bile for Mutagenicity and Co-mutagenicity

Junko MAGARA

Department of Hygiene and Preventive Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Masaharu YAMAMOTO)

An experiment was carried out to examine mutagenicity and co-mutagenicity of bile. Bile was obtained from the gallbladders resected from patients with various diseases. The bile samples were provided from several hospitals in Niigata Prefecture from September, 1987 to January, 1989. Of 113 samples tested by using Kada's spore rec assay method, 14 (12.4%) showed positive results.

The samples of mutagenic bile were from 3 cases of gallbladder cancer, 3 cholelithiasis, 2 gastric cancer with cholelithiasis, 1 polyp of the gallbladder, 1 gallbladder and lung cancers, 1 cervical cancer of the uterus, 1 liver cancer, 1 rectal cancer and 1 rectal cancer with cholelithiasis. Bile of the malignant disease was found to be more mutagenic than those of the benign ones. Bile of gallbladder cancer was more mutagenic than other benign diseases of the gallbladder. In addition to the examination of mutagenicity, it was tested whether or not the bile enhanced the mutagenic activity of a known mutagen, Mitomycin C (co-mutagenicity test). Of 30 samples tested, 22 (73.3%) showed positive results.

Key words: human bile, rec assay, mutagenicity, co-mutagenicity, biliary tract cancer
ヒト胆汁，レックアッセイ，変異原性，共変異原性，胆道癌

Reprint requests to: Junko MAGARA, Department of Hygiene and Preventive Medicine, Niigata University School of Medicine, Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先： 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部衛生学教室
真 柄 純 子

はじめに

わが国の胆道癌死亡率は世界主要39カ国中男性は世界第2位，女性は第5位である．さらに新潟県の胆道癌死亡率は男女共全国1位である．そこで新潟県は世界有数の胆道癌多発地域と言っても過言ではない．Yamamoto ら[1]は本症の成因として新潟の地域特性に問題があるとの作業仮説を立てた．その研究の一環として，胆汁の変異原性に注目して研究を行なった．

胆汁の変異原性については，Silverman ら[2]が市販の胆汁酸製剤30種を用いて Ames test を用いて検討している．彼らは検索した胆汁酸全てに変異原性を示したものはなかったが，二次胆汁酸であるリトコール酸がラット肝抽出物（S-9 mix）を加えた状態で，発癌物質 2-アミノアントラセンの変異原性を強める作用を示したと報告している．即ち二次胆汁酸リトコール酸が共変異原性（co-mutagenicity）をもつことを示した．次に Watabe ら[3]は，サルモネラ TA 100株，TA 98株を用いた Ames 変法（fluctuation test）で胆汁酸の変異原性を調べている．その結果，コール酸，ケノデオキシコール酸，デオキシコール酸，ウルソデオキシコール酸にやや弱い変異原性を認めたが，リトコール酸には認めないと発表した．その後 Venitt ら[4]は，Watabe ら[3]と同様の方法で実験を行なったが，量－反応関係を得られないことより，これら胆汁酸の変異原性を否定している．これらの実験は胆汁そのものでなく，胆汁酸を用いて行なわれたものである．その理由は，検体中のヒスチジンが Ames test の結果を混乱させるためである．このように胆汁の変異原性については用いた Ames test の限界から胆汁酸についての研究が殆どでありヒト胆汁全体の変異原性について検討したものはない．

最近 Kato ら[5]が rec assay を行ない高頻度に胆道癌を合併することで知られている先天性胆管拡張症の胆汁の変異原性を調べているが，胆石症や胆道癌等で胆汁は検索していない．このように，今までの諸家の研究はヒト胆汁全体としての突然変異原性について不十分なのでこの度 rec assay を用い検討を行なった．

材料と方法

胆汁の採取

1987年9月～1989年1月までに新潟市内の2病院及びその他新潟県内の2，3の病院にて種々の疾患で外科的胆嚢切除を受けた患者の胆嚢内胆汁138例を採取した．それらの胆嚢内胆汁 5 ml を直径 4.5 μm ミリポアフィルター（マイレクス HA）で濾過滅菌後，－20℃にて冷凍保存した．検索時胆汁は室温中で自然解凍後，使用した．

変異原性試験

採取胆汁の変異原性試験は spore rec assay 法[6)-8)]に従って行なった．枯草菌の DNA 修復能欠損株 M-45（rec－）と，修復可能株 H-17（rec＋）を用い，各々につき，芽胞浮遊液（M-45・1×10^7/ml：H-17・1×10^6/ml）を，作った．枯草菌は，（財）発酵研究所より購入した．購入した菌を B-2 ブロース（肉エキス 1 g，ポリペプトン 1 g，NaCl 0.5 g，H_2O 100 ml）でよく溶いてから三角フラスコに B-2 ブロース 20 ml と共にいれよく攪拌したのち37℃で16～18時間振盪培養した．その後予め作っておいた胞子形成用寒天培地に培養した菌液をぬりひろげた．菌をぬったシャーレは37℃で rec－菌は7日，rec＋菌は5日培養した．その後シャーレ表面に生えた茶色の芽胞をスプーンでかきとり滅菌試験管にいれた MM 培地（$(NH_4)_2SO_4$ 1 g，NH_2PO_4 10 g，$MgSo_4$．$7H_2O$ 0.1 g，クエン酸ナトリウム 0.5 g，KOH．94 g，H_2O 1000 ml）にといた．MM 培地で洗浄後，リゾチーム溶液を 1/10 量加え37℃で30分培養した．次に SDS（硫酸ドデシルナトリウム）の10％溶液を加え，37℃で30分培養した．これらを遠心にかけた後沈澱物を滅菌蒸留水で5回洗浄した．こうして出来上がった芽胞液の生菌数を数え上記の濃度液に滅菌蒸留水で調整し冷蔵保存した．

実験時には直径 90 mm のシャーレに，予め作っておいた B-2 ブロース 10 ml と各々の芽胞浮遊液 0.1 ml を流し入れ，固まらせ rec－入り寒天培地と rec＋入り寒天培地を作った．固まった寒天培地の上に，直径 8 mm 厚手のペーパーディスクを置いた．更に，そのペーパーディスクにフィルター滅菌済みの，試験胆汁 20 μl をしみこませた．このシャーレを冷蔵庫で30分冷やした後，37℃で24時間培養後，ペーパーディスクの回りにできた阻止帯長を測定した．変異原性試験は，まず原液胆汁 20 μl を用いて実験を行ない，原液で阻止帯を形成する胆汁を選びだした．それらの胆汁について，更に生食を用いて倍倍希釈を行ない，2倍，4倍，8倍と，更に阻止帯を形成するものについては，最高64倍まで希釈液を作った．反対に 10 μl，20 μl でわずかに阻止帯を形成する胆汁については胆汁量 40 μl についても実験を行なった．ペーパーディクスにしみこませる胆汁量としては，40 μl が限度であった．各々の希釈液 20 μl を用いて同様の変異原性試験を行ない，各希釈濃度におけ

る阻止帯長を測定した．なお一つのシャーレには，ペーパーディスク4枚をまわりに置いた．まんなかに陰性対照としてSM-PG（ストレプトマイシン－ペニシリンG；ストレプトマイシン 5000 mcgs/ml，ペニシリン G 5000 unit/ml）をしみこませたペーパーディスクを置き，SM-PG 単独による阻止帯長によって各胆汁による阻止帯長の補正をおこなった．上記試験をすべて rec－，rec＋倍地で並行しておこなった．判定は，両菌株につき，各々種々の胆汁濃度における，阻止帯長より量－反応関係カーブを描いた．又，阻止帯を形成する最少胆汁量；MIC（minimal inhibition concentration）を rec－，rec＋についてもとめ，その比（rec＋/rec－）を算出した．その結果グラフ上両－反応関係が認められ，かつ，MIC の比が2以上を示す胆汁を変異原性有りと判定した．

共変異原性試験

変異原性試験と同様，まず rec－入り寒天培地と rec＋入り寒天培地を用意した．また既知変異原性物質として，MMC（マイトマイシン C）を用い，希釈液（0.002 μg/20 μl）を作った．これは，rec－菌で阻止帯長約 3 mm，rec＋菌で阻止帯長が0となる濃度である．又胆汁を倍倍希釈し原液胆汁，1/2 希釈胆汁，1/4，1/8，1/16，1/32 を作った．固まった寒天培地の上にペーパーディスクを置き，それに MMC 溶液 20 μl をしみこませ更にその上に作成した検査胆汁の種々濃度液 20 μl をしみこませた．それらのディスクを rec－，rec＋各々の培地においた．またコントロールとして MMC 20 μl をしみこませたディスクと生食 20 μl をしみこませたディクスを置いた．その後シャーレを冷蔵庫で30分冷やした後37℃で24時間インキュベートした．その後ディスクのまわりにできた阻止帯長を測定した．胆汁添加時に MMC 単独時よりも大きな阻止帯形成をみたときその胆汁を共変異原性ありと判定した．これとは別に MMC 濃度を種々にかえてこれに胆汁を添加して rec assay を行ない形成される阻止帯長を測定しグラフを描いた．

結　　果

変異原性試験

各種疾患患者の摘出胆嚢より胆嚢内胆汁 138 例を採取した．この内，抗生剤又は抗癌剤投与患者より採取した胆汁，及び泥状で滅菌フィルターを通らない胆汁を除いた 113 胆汁について前記方法を用いて変異原性試験を行なった．試験胆汁の年令別内訳は，30代（4人；3.5％），40代（14人；12.4％），50代（39人；34.5％），60代（40人；35.4％），70代（16人；14.2％）であった（**図 1**）．また男女別では，男53人，女60人であった．疾病別分類は，**表 1** に示した．まず良性疾患は，総数72（男27：女45）．悪性疾患は，総数53（男29：女24）であった．悪性疾患，良性疾患合併例では，悪性疾患の方をとりあげ数えた．又悪性疾患のみの合併例，及び良性疾患のみの合併例については，すべての疾患を一つとして数えた．良性疾患の内訳としては，胆石53（男19：女34），胆嚢ポリープ13（男6：女7），胆嚢せんきん症1（男0：女1），胆嚢炎2（男1：女1），胆管炎2（男1：女1），先天性胆管拡張症1（女1）であった（**表 2**）．悪性疾患の内訳は，胆嚢癌10（男3：女7），胆管癌6（男5：女1），大腸癌7（男4：女3），膵臓癌3（男2：女1），肝臓癌4（男4：女0），胃癌20（男11，女9），食道癌1（女1），肺癌1（女1），子宮癌1（女1）であった（**表 3**）．検体は，摘出胆嚢内胆汁としたので，良性疾患は，胆嚢及び胆管系のみであった．悪性疾患は，消化管疾患が主であった．

これらの胆汁を用いて先に述べた方法で rec assay を行なった．**表 1** にその結果を示した．左より疾患名及び rec assay の結果を示す．結果は，rec＋の欄に rec＋菌が阻止体を形成しない試験胆汁の最大量を μl で示した．例えば2倍希釈で初めて阻止帯を形成しない場合は，試験胆汁 20 μl 中に 10 μl の胆汁が入っているので 10 μl となる．実験最大量（20 μl）にても阻止帯を形成しないものには－を記した．rec－欄には，rec－菌による同様の結果を示した．Ratio の欄には，rec＋／rec－（rec＋菌による最小阻止胆汁量を rec－菌による最小阻止胆汁量で除した値）を記した．rec＋／rec－の値（MIC 比）が2以上を示した胆汁を変異原性ありとしてとりあげた．113 例中，No.6，No.7，No.14，No.18，No.19，No.22，No.23，No.30，No.42，No.47，No.71，No.73，No.86，No.106，No.113，の15例であった．これら15例の胆汁で各々の胆汁濃度における阻止帯長を計り，ドーズレスポンスカーブを描いた（**図 2**）．横軸に希釈胆汁 20 μl 中の胆汁量（μl）縦軸に各試験胆汁で形成された阻止帯長（mm）をとった．●は rec－菌，○は rec＋菌の結果を示す．**図 2** をみると No.71 を除いて他14例では各試験胆汁に於いて rec－菌により形成される阻止帯長は rec＋菌による阻止帯長より大きく阻止帯形成の原因が胆汁による DNA 障害であることを示した．また試験胆汁中の胆汁量が少なくなると共にそれらにより形成される阻止帯長も小さくなり左下がりのカーブを描き胆汁量と阻止帯長の間に量－反応関係を認めた．No.71 ではグラフに交叉が見られ，10

表 1　ヒト胆汁の rec assay 結果

No	疾患	変異原性試験 最少阻止量胆汁 (μl/disc)[1]			No	疾患	変異原性試験 最少阻止量胆汁 (μl/disc)[1]		
		rec+	rec−	Ratio			rec+	rec−	Ratio
1	胆石	−	−	−	59	胆嚢ポリープ，胆石	0.62	1.25	0.5
2	胆石	−	−	−	60	胆石	−	−	−
3	胆石	−	−	−	61	胆石	10	10	1.0
4	胆石，直腸癌	5	10	0.5	62	胆石	−	−	−
5	胆石	−	−	−	63	胆石	5	5	1.0
6	子宮癌	5	2.5	2.0	64	食道癌，肝転移	−	−	−
7	直腸癌，肝転移	5	2.5	2.0	65	胆石	−	−	−
8	胆石	−	−	−	66	胆石	−	−	−
9	胃癌	−	−	−	67	胆管癌	−	−	−
10	胆石	−	−	−	68	胆嚢炎，胆管炎	−	−	−
11	膵臓癌	−	−	−	69	胆管癌，胆石，胃癌	−	−	−
12	胃癌	−	−	−	70	胆石	−	−	−
13	胆石	−	−	−	71	肝血管腫，胃癌	2.5	1.25	2.0
14	胆石	2.5	1.25	2.0	72	胆石	−	−	−
15	胆嚢癌	5	5	1.0	73	胆石	5	2.5	2.0
16	胆石，胃癌	−	−	−	74	胃癌，肝転移	−	−	−
17	胆嚢ポリープ	10	10	1.0	75	胆管癌	−	−	−
18	胆石，胃癌	0.039	0.010	4.0	76	胆石	−	−	−
19	胆嚢ポリープ	5	2.5	2.0	77	胆石，胃癌	−	−	−
20	胆石	−	−	−	78	胆嚢ポリープ，胆石	−	−	−
21	胆石	−	−	−	79	胆石	−	−	−
22	胆嚢癌	1.25	0.625	2.0	80	胆石	−	−	−
23	胆石	0.625	0.313	2.0	81	胆石	−	−	−
24	胆石，胃癌	−	−	−	82	胆嚢炎	−	−	−
25	胆嚢ポリープ，胃癌	−	−	−	83	胆嚢せんきん症，胆石	−	−	−
26	胃癌，大腸癌，肝転移	5	5	1.0	84	胆管癌	−	−	−
27	胃癌	−	−	−	85	胆石	−	−	−
28	胆嚢せんきん症，胃癌	−	−	−	86	肝臓癌	2.5	1.25	2.0
29	胆嚢ポリープ	−	−	−	87	胆石，胃癌	−	−	−
30	胆石，胃癌	0.07	0.035	2.0	88	胆石	−	−	−
31	胆嚢ポリープ	−	−	−	89	肝臓癌	2.5	2.5	1.0
32	胆嚢癌	−	−	−	90	胆嚢癌	−	−	−
33	胆嚢癌，胃癌	−	−	−	91	胆石，胆管炎	−	−	−
34	胆石，先天性胆管拡張症	−	−	−	92	大腸癌，肝転移	−	−	−
35	胆石	−	−	−	93	胃癌，骨・前立腺転移	−	−	−
36	胆嚢ポリープ	−	−	−	94	胆嚢癌	−	−	−
37	胆石	−	−	−	95	直腸癌，肝転移	−	−	−
38	胆嚢ポリープ	−	−	−	96	膵臓癌	−	−	−
39	胆嚢せんきん症，胃癌	−	−	−	97	胆石	−	−	−
40	胆石	−	−	−	98	胆石	−	−	−
41	胆石	−	−	−	99	胆石	−	−	−
42	胆嚢癌，肺癌	2.5	1.25	2.0	100	肝臓癌	1.25	1.25	1.0
43	胆嚢ポリープ	−	−	−	101	胆石	−	−	−
44	胆管癌	−	−	−	102	胆嚢ポリープ	10	10	1.0
45	胆石	−	−	−	103	胆石	−	−	−
46	胆嚢ポリープ	−	−	−	104	胆嚢癌，胃癌	−	−	−
47	胆石，直腸癌	27	13	2.0	105	胆石	−	−	−
48	胆嚢ポリープ	−	−	−	106	胆嚢癌	10	5	2.0
49	胆石	−	−	−	107	胆石	−	−	−
50	胆石	−	−	−	108	肝臓癌	−	−	−
51	胆石	−	−	−	109	胆石	−	−	−
52	大腸癌，肝転移	2.5	2.5	1.0	110	胆石	−	−	−
53	胆石	−	−	−	111	胆管癌	−	−	−
54	胆石，胃癌	5	5	1.0	112	膵臓癌	−	−	−
55	胆石	10	10	1.0	113	胆嚢癌	20	5	4.0
56	胆嚢ポリープ，胆石	−	−	−					
57	胆石	−	−	−		陽性対照（MMC, μg/disc）	0.004	0.0004	10.0
58	胆石	−	−	−		陰性対照（PG-SM, u/disc）	0.006	0.006	1.0

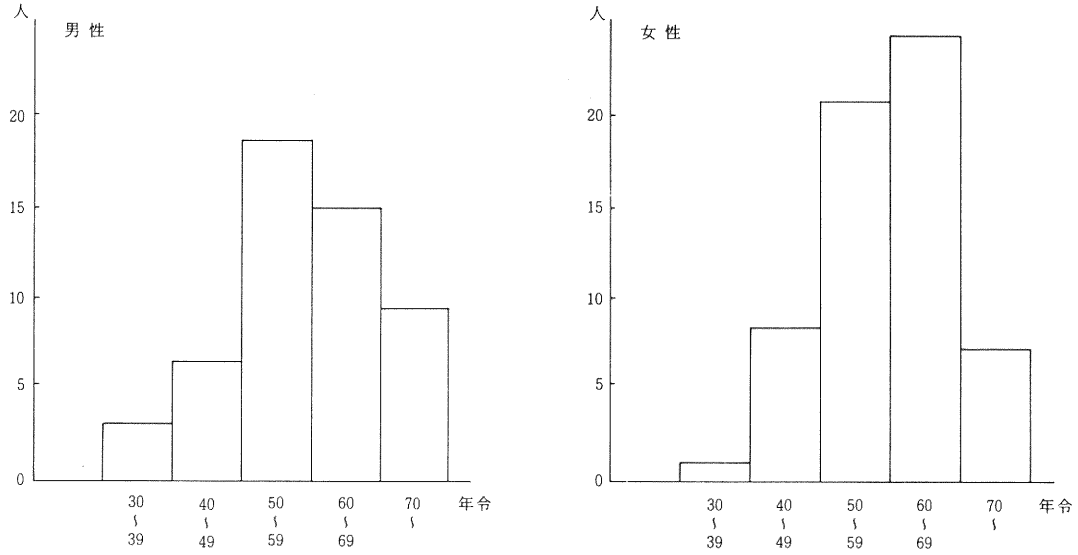

図 1　患者の年令分布

表 2　良性疾患別分析胆汁数と変異原性陽性胆汁数

疾患	男	女	合計
胆石	19 (3)	34	53 (3)
胆嚢ポリープ	6 (1)	7	13 (1)
胆嚢せんきん症	0	1	1
胆嚢炎	1	1	2
胆管炎	1	1	2
先天性胆管拡張症	0	1	1
計	27 (4)	45	72 (4)

良性疾患合併例は，すべての疾患について分けて記載．ただし良性，悪性疾患合併例は悪性疾患として表3に分類．（　）変異原性陽性胆汁の数を示す

表 3　悪性疾患別分析胆汁数と変異原性陽性胆汁数のまとめ

疾患	男	女	合計
胆嚢癌	3 (1)	7 (3)	10 (4)
胆管癌	5	1	6
大腸癌	4 (1)	3 (1)	7 (2)
膵臓癌	2	1	3
肝臓癌	4 (1)	0	4 (1)
胃癌	11 (1)	9 (1)	20 (2)
食道癌	0	1	1
肺癌	0	1 (1)	1 (1)
子宮癌	0	1 (1)	1 (1)
計	29 (4)	24 (7)	53 (11)

悪性疾患合併例は，すべての疾患について分けて記載．（　）変異原性陽性胆汁の数を示す
大腸癌は直腸癌を含む

μl と 5 μl に於いて rec＋菌に rec－菌より大きい阻止帯形成をみたため変異原性ありの中には含めなかった．結局，MIC が2以上を示し，**図 2** で，量－反応関係を認めた胆汁は，14例であった．これから113例中14例（12.4％）が変異原性ありと判定された．

変異原性を認めた14例胆汁の疾病内容をみると胆嚢癌3，胆石3，胆石＋胃癌2，胆嚢ポリープ1，胆嚢癌＋肺癌1，子宮癌1，肝臓癌1，直腸癌1，胆石＋直腸癌1であった．年令は，32才～79才で，平均年令55.4才であった．性別は，男8例・女6例であった．

MIC 比の値をみると，4.0が2例，2.0が12例であった．MIC 比4.0と最も強い変異原性を示したのは，No.18 胃癌＋胆石と，No.113 胆嚢癌であった．

さらに阻止帯を形成した28例の胆汁で，各胆汁の rec－と rec＋の阻止帯長差より各胆汁の変異原性の強さをみると（**表 4**），4 mm 以上の差を示したのは No.6，No.14，No.23 の3例であった．2 mm 以上 4 mm 未満の差を示したのは，No.7，No.18，No.42，No.47，No.113 の5例であった．年令別に rec assay の結果をみると，変異原性を示したものは30代1例（25％）40

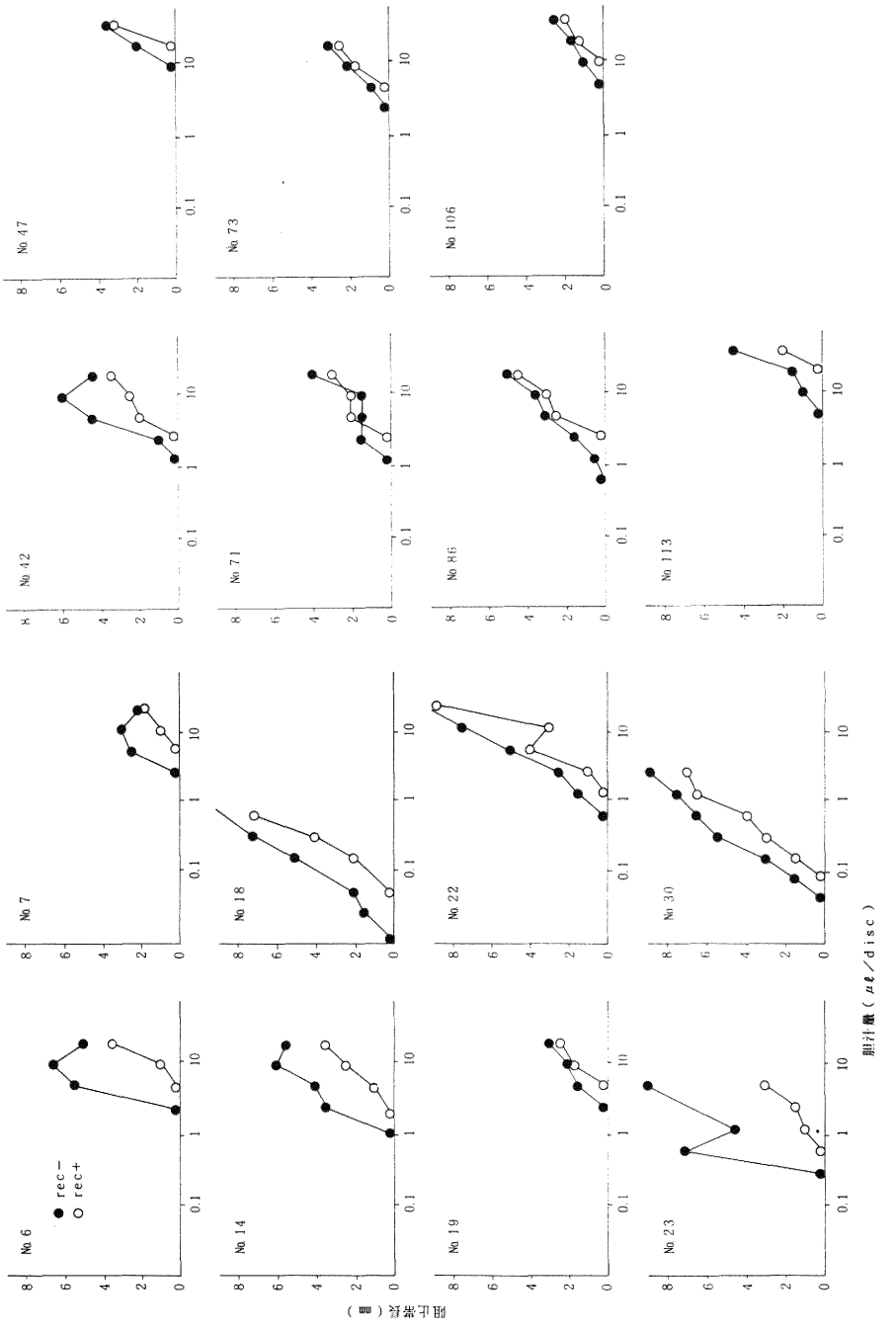

図 2　各胆汁の rec assay における胆汁量と阻止帯長の関係
図中の No. は胆汁番号を示す．

表 4　変異原性陽性胆汁の阻止帯長差

No.	胆汁量 (μl/disc)	阻止帯長(mm) rec⁻	阻止帯長(mm) rec⁺	差
6	10	6.5	1.0	5.5
	5	5.5	0.0	5.5
7	10	3.0	1.0	2.0
	5	2.5	0.0	2.5
14	5	4.0	1.0	4.0
	2.5	3.5	0.0	3.5
18	0.156	5.0	2.0	3.0
	0.078	2.0	0.0	2.0
	0.039	1.5	0.0	1.5
19	10	1.5	1.5	0.0
	5	1.25	0.0	1.25
22	2.5	2.5	1.0	1.5
	1.25	1.5	0.0	1.5
23	5	9.0	3.0	6.0
	1.25	4.25	1.0	3.25
	0.625	7.0	0.0	7.0
30	0.156	3.0	1.5	1.5
	0.078	1.5	0.0	1.5
42	5.0	4.5	2.0	2.5
	2.5	1.0	0.0	1.0
47	40	3.5	3.5	0.0
	20	2.0	0.0	2.0
73	10	2.0	1.75	0.25
	5	0.75	0.0	0.75
86	5.0	2.0	1.5	0.5
	2.5	1.5	0.0	1.5
106	40.0	2.5	2.0	0.5
	20.0	1.5	1.5	0.0
	10.0	1.0	0.0	1.0
113	40	4.5	2.0	2.5
	20	1.5	0.0	1.5
	10	1.0	0.0	1.0

表 5　良性疾患の男女別 rec assay 結果

	変異原性あり	変異原性なし	合計
男	4 (14.8%) *	23 (85.2%)	27 (100%)
女	0 (0%)	45 (100%)	45 (100%)
計	4 (5.6%)	68 (94.4%)	72 (100%)

* $p<0.05$

表 6　良性，悪性，疾患別 rec assay 結果

	変異原性あり	変異原性なし	合計
良性疾患	4 (5.6%)	68 (94.4%)	72 (100%)
悪性疾患	11 (20.8%)**	42 (79.2%)	53 (100%)
計	15 (12.0%)	110 (88.0%)	125 (100%)

** $p<0.01$

代4例（28.6％）50代3例（7.7％）60代3例（7.5％）70代3例（12.5％）であった．30代，40代の若い人では，それ以上の年令に比べ，変異原性を示す胆汁が多い，しかしこれを，良性疾患に限ってみると両群に差はなく，胆汁自体の加令による変異原性の変化というより，疾病内容の違いによる差かもしれない．男女別の rec assay の結果では，全体では男女間の胆汁の変異原性に差は認められなかった．しかしこれを，良性疾患に限ってみると（**表 5**），良性疾患で変異原性を示したのは男性では27例中4例だったが女性例で変異原性を示すものはなく，男性例で変異原性を多く示した．疾患別 rec assay の結果をみると（**表 6**），良性疾患のみ（良性疾患の多重例も含む）の胆汁は，72例で，その内4例（5.6％）に変異原性を認めた．悪性疾患（悪性疾患の多重例，良性疾患合併例を含む）の胆汁は，53例でその内10例（18.9％）に変異原性を認めた．これより悪性疾患の胆汁は，良性疾患の胆汁より優位に変異原性を示すことがわかった．

良性疾患の疾患別 rec assay の結果では先に示したように男女間では男性例の方に変異原性が多く見られ差を認めたが，各疾患別の変異原性に差はみられなかった．胆嚢癌の危険因子と考えられている胆石例も変異原性を示したのは53例中3例（5.7％）で変異原性を多く示すことはなかった．ただ一例ではあったが高率に胆嚢癌を合併するとされる先天性胆管拡張症でも胆汁の変異原性を認めなかった．膵胆管合流異常の胆道内容物の変異原性を調べた Kato[5] らの結果でも経時的に変異原性に差が見られたと報告されている．

悪性疾患の疾患別 rec assay の結果では悪性疾患多重例は，各々の疾患を1として数えたが，それによると変異原性を示したものは，胆嚢癌では10例中4例（40%）胆管癌は6例中0，大腸癌は7例中2例（28.6％），膵臓癌は3例中0，肝臓癌は4例中1例（23%），胃癌は20例中2例（10%），食道癌は1例中0，肺癌は1例中1例，子宮癌は1例中1例で，計53例中11例（18.9％）であった．胆汁に最も曝されている臓器の胆嚢癌では10例中4例に変異原性がみられ，胆汁酸の関与がその発癌に数えられる大腸癌では7例中2例に変異原性がみられた．

胆嚢癌例に注目してみると，胆嚢癌例は全部で10例あったが，この内変異原性を示したものが4例（40%），殺菌性を示したもの1例（10%），どちらも示さなかったもの5例（50%）だった．女性例では7例中3例に変異原性を認めたが男性例は3例中1例に変異原性を認めた．

胆嚢癌例とその他胆嚢良性疾患の変異原性を比べてみると胆嚢癌例では40%に変異原性を認めたのにたいし胆嚢良性疾患では5.6%に変異原性を認めたのみだった．このことより胆嚢癌例は胆嚢良性疾患に比べ優位に変異原性を示すことがわった（表 7）．

MIC 比の値が 1.0 を示した胆汁は，No.15，No.17，No.26，No.52，No.54，No.55，No.61，No.63，No.89，No.100，No.102 の11例であった．これら胆汁の描くドーズレスポンスカーブは胆汁量の減少に従ってその形成する阻止帯長も小さくなりほぼ左下がりの直線となった．rec－菌によるグラフと rec＋菌によるグラフは重なり両菌による阻止帯長に差を認めなかった．MIC 比の値が 0.5 であった No.4，No.59 においては rec－菌によるグラフと rec＋菌によるグラフが途中で交叉を示した．これらの事より MIC 比が 1.0，0.5 を示した胆汁は DNA 障害以外の他の機序による殺菌性をもつものと思われた．このように殺菌性を示した胆汁は，上記のように全部で13例であり，これらを疾患別に分けてみると悪性疾患 7 例，良性疾患 6 例で悪性疾患例の胆汁で殺菌性が多くみられた．

共変異原性試験

既知の変異原性物質として MMC を用い MMC と種々濃度の胆汁を合わせた試験液で rec assay を行なった．その結果形成された阻止帯長と MMC 単独で形成された阻止帯長の比をだした．表 8 にその結果を示す．左に各々の胆汁において，種々の濃度胆汁と MMC を合わせた試験液による rec assay の中で最大の阻止帯を形成した時の阻止帯長を示した．その右に最大阻止帯形成時の胆汁濃度を μl/disc で示した．なお胆汁のみで阻止帯を形成する胆汁は，MMC と胆汁を合わせた時に阻止帯長の増強が見られてもその原因が胆汁自体の持つ変異原性又は殺菌性が単に加算されたものなのか，あるいは胆汁のもつ MMC の作用を増強させる働きによるものなのか判定が困難なため試験胆汁からはずした．胆汁単独では阻止帯形成のみられない胆汁のみで実験を行なった．

表 8 の MMC の欄には MMC 単独使用時の阻止帯長を示す．Ratio の欄には MMC に胆汁添加して得られた中の最大阻止帯長を MMC 単独使用時に得られた阻止帯長で割った値を示した．適性胆汁（MMC と合わせて rec assay を行なった時に最大の阻止帯を作る濃度の各胆汁）添加時の阻止帯長が MMC 単独時の阻止帯長より大きくその比が 1.0 より大きかったものは30例中22例（73.3%）に見られ，その比は 1.1～2.0 で平

表 7　胆嚢疾患の良性，悪性別 rec assay 結果

	変異原性あり	変異原性なし	合計
良性疾患	4（5.6%）	68（94.4%）	72（100%）
胆嚢癌	4（40.0%）**	6（60.0%）	10（100%）
計	8（9.8%）	74（90.2%）	82（100%）

** $p<0.01$

表 8　ヒト胆汁の共変異原性試験結果

No	阻止帯長（mm）			
	MMC＋胆汁	（胆汁量）	MMC	Ratio
1	4.0	（5　）	2.0	2.0
2	5.5	（0.625）	4.0	1.4
3	5.0	（10　）	3.0	1.7
5	6.0	（10　）	5.0	1.2
8	5.5	（0.625）	3.5	1.6
9	4.5	（20　）	3.0	1.5
10	4.5	（2.5　）	4.5	1.0
11	5.5	（0.625）	4.0	1.4
12	5.5	（5　）	4.0	1.4
13	4.0	（1.25　）	2.5	1.6
16	4.5	（0.625）	3.0	1.5
20	4.0	（0.625）	2.5	1.6
21	5.0	（10　）	2.5	2.0
24	4.5	（5　）	2.5	1.8
25	4.0	（1.25　）	2.0	2.0
29	4.5	（5　）	4.0	1.1
34	3.5	（5　）	3.5	1.0
35	4.0	（20　）	4.0	1.0
36	4.5	（20　）	4.5	1.0
37	4.75	（20　）	4.25	1.1
38	4.75	（5　）	4.25	1.1
39	5.25	（5　）	3.5	1.5
40	3.0	（20　）	3.0	1.0
41	3.5	（1.25　）	4.5	0.8
43	3.0	（5　）	3.0	1.0
44	5.0	（20　）	3.5	1.4
45	5.25	（5　）	4.0	1.3
46	4.0	（20　）	3.0	1.3
48	4.5	（20　）	4.5	1.0
49	3	（5　）	2	1.5

MMC：マイトマイシンC

均1.5であった．その比が1.0と胆汁添加時と MMC 単独時の値に変化の見られなかったものは7例（23.3％）であった．逆に胆汁添加時にその阻止帯長が MMC 単独時より小さくなったものが1例見られた．各々胆汁において最大阻止帯長を示す適性胆汁濃度はまちまちであり，そこには添加胆汁量とその阻止帯長の間に量－反応関係はみられなかった．最大阻止帯を形成する適性濃度は，原液胆汁が8例（26.7％），1/2 希釈胆汁3例（10％），1/4 希釈胆汁10例（33.3％），1/8 希釈胆汁1例（3.3％），1/16 希釈胆汁3例（10％），1/32 希釈胆汁5例（16.7％）であった．1/4 希釈液で最大阻止帯を形成する胆汁が最も多かった．

次に MMC 液の方を倍倍希釈して MMC の 0.0032 μg/disc 液，0.0016 μg/disc 液，0.0008 μg/disc 液，0.0004 μg/disc 液，0.0002 μg/disc 液，0.0001 μg/disc 液を作成した．各々の胆汁 20 μl に作成した各濃度の MMC 液を加えた液で rec assay を行なった．コントロールとして並行して MMC 単独で各濃度の rec assay を行なった．その結果を図 3 に示す．横軸に MMC の濃度を μg/disc（20 μl）で示す．縦軸には形成された阻

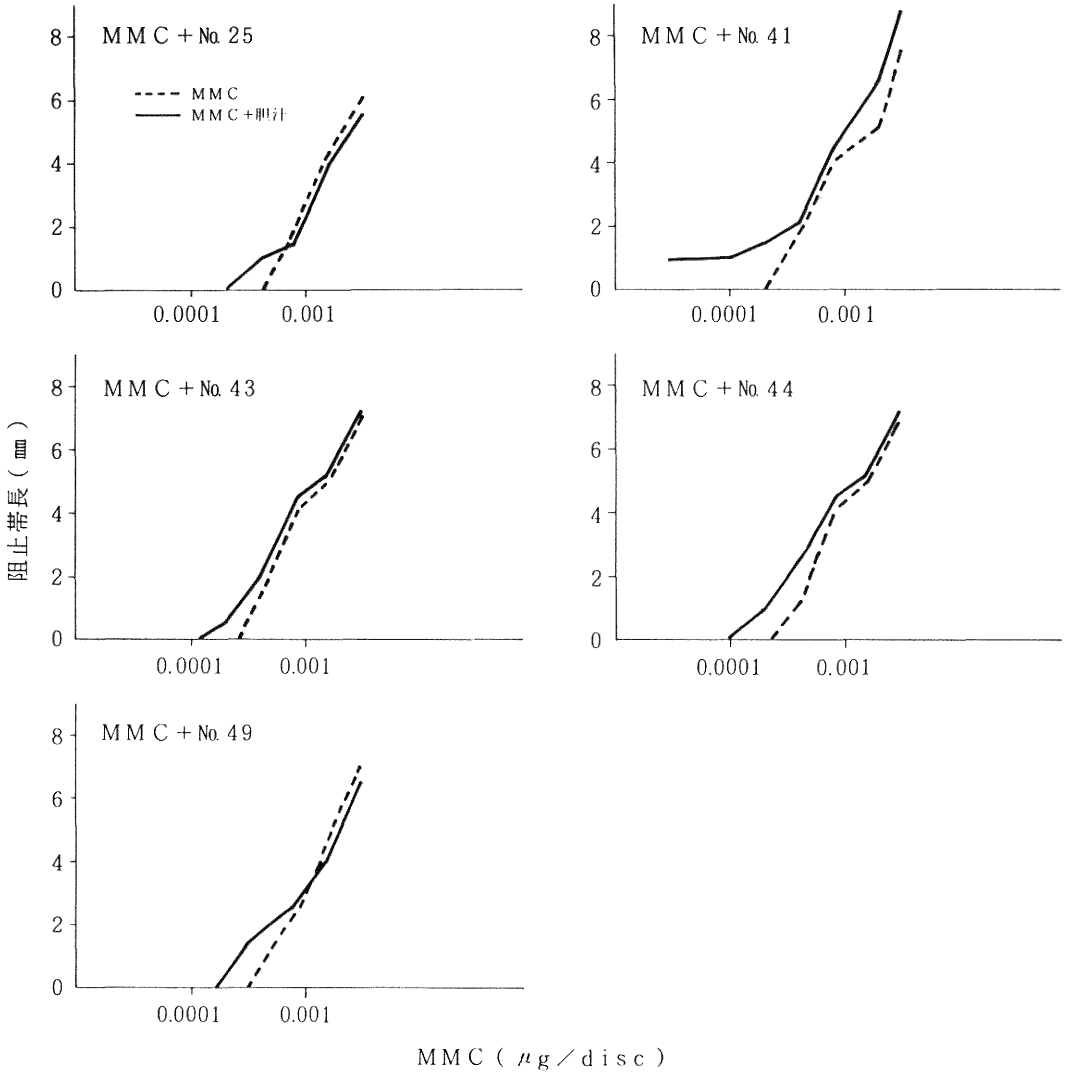

図 3　マイトマイシン C に胆汁を添加したときの阻止帯長の変化
図中の No. は胆汁番号を示す．

止帯長の長さを mm で示す．点線で描いたグラフは MMC 単独で行なった結果を示し，太い線で描いたグラフは MMC と胆汁を合わせた液で行なった結果を示す．実験は，原液胆汁，1/2 希釈胆汁，1/4 希釈胆汁，1/8 希釈胆汁，1/16 希釈胆汁を用いて行ない5本のグラフを描いた．この結果 No.25，No.41，No.43，No.44，No.49 の胆汁で**図 3** に描いたようなグラフが得られた．これら5例は共に原液胆汁使用時に得られたもので，グラフは MMC に胆汁を合わせた時 MMC 単独時に比し左下方が広がっている．これは，MMC 単独液では阻止帯を形成しない低濃度の MMC 液（0.0004 μg/disc）において胆汁添加時には阻止帯を形成したことを示している．これより胆汁には有効量以下の変異原物質の効果を発現させる働きのあることも考えられた．なおグラフはすべて rec－菌によるものであるが rec＋菌で同様実験を行なった結果では，MMC 単独液使用時に比べて胆汁添加時にはグラフはわずかに左に移動するかまたは全く移動をみなかった．

胆汁のもつ界面活性作用で MMC が培養寒天内をより広がって阻止帯長が大きくなる可能性もあるが，**図 3** のグラフに示すように MMC 濃度が低いと阻止帯長を広げる作用が大きくなることは，界面活性作用では説明できないと思われる．

考　　察

新潟県において各種疾患で外科的に摘出した胆嚢内胆汁を採取し，その変異原性を spore rec assay 法を用いて検討した．各種胆汁酸を用いての変異原性試験は，特に大腸癌との関連において今まで多くの人になされてきた．しかし胆汁そのものを用いての変異原性試験は多くない．1982年 Van Kreiji ら[9]は，ライン川のコイ科の淡水魚（bream）の胆汁を用いて Ames test を行ない，川の水の 10^4 以上の強い変異原性を認めた．1990年 Spigelman ら[10]は，十二指腸癌のハイリスクとされる familial adenomatouse polyposis の患者で十二指腸チューブより胆汁を採取しその変異原性を Ames test で調べた．しかし結果はマイナスであった．ヒト胆汁を分析した例は他に1989年 Kato ら[5]の高頻度に胆道癌を合併する先天性胆管拡張症患者の胆道胆汁の分析がある．spore rec assay 法を行ないその結果12例中6例（50％）が陽性であった．しかし胆石症や胆嚢癌等の疾患についての胆汁分析は今のところないため今回本研究を実施した．

この度の胆汁 rec assay の結果は試験胆汁113例の内，MIC 比が2以上を示しグラフで量－反応関係を認めた胆汁が14例あった．これから113例中14例（12.4％）を変異原性ありと判定した．変異原性の強さを，MIC 比の値でみると，4.0が2例，2.0が12例であった．MIC 比4.0と最も強い変異原性を示したのは，No.18 胃癌＋胆石と，No.113 胆嚢癌であった．MIC 比2.0を示したのは，No.6 子宮癌，No.7 直腸癌＋肝臓転移，No.14 胆石，No.19 胆嚢ポリープ，No.22 胆嚢癌，No.23 胆石，No.30 胃癌＋胆石，No.42 胆嚢癌＋肺癌，No.47 直腸癌＋胆石，No.71 胃癌＋肝血管腫，No.73 胆石，No.86 肝臓癌，No.106 胆嚢癌であった．この値を既成の発癌物質の MIC 比の値と比べてみると MMC 27，AF2 32，MNNG 30，DAPA 21，Aflatoxin B1 133 となっており，これに比べると今回の試験胆汁の変異原性は，あってもごく弱いものと考えられた．阻止帯長差より各胆汁の変異原性の強さをみると，4 mm 以上の差を示したのは，No.6，No.14，No.23，の3例であった．2 mm 以上 4 mm 未満の差を示したのは，No.7，No.18，No.42，No.47，No.113 の5例であった．阻止帯長差を，Horikawa ら[11]の行なった他の変異原物質と比べると，Aflatoxin B1 10 mm，2-AA 14 mm，MMC 8 mm，4-Nitropyrene 9 mm[11]と胆汁の変異原性は，弱いと思われた．

疾患別に変異原性をみると，良性疾患のみの胆汁は，72例中4例（5.6％）に変異原性を認めた．悪性疾患胆汁は，良性疾患の胆汁より優位に変異原性のあることがわかった．悪性疾患例で変異原性が高い説明として（1）抗癌剤等の変異原性化学物質の使用（2）悪性疾患の結果，胆汁中に変異原性物質の出現（3）変異原性を有する胆汁が悪性腫瘍を発生させる，の場合が考えられる．ここで抗癌剤の使用は術前の使用の有無を確認しており否定できるが，(2)，(3) の原因か結果については，現在のところ不明である．

次に胆汁の共変異原性について検討を行なった．その結果は変異原性物質 MMC を胆汁に添加した時に，約70％の試験胆汁で MMC による阻止帯長を大きくする作用のあることがわかった．なお，共変異原性については悪性疾患と良性疾患の区別はない．全例ではなかったが，幾つかの胆汁では有効量以下の MMC で阻止帯を形成させた．Silverman ら[2]の実験でも，Ames test を用いての結果，二次胆汁酸のリトコール酸が有効量以下の 2-AA の変異原性を発現させたと報告しており，今回の結果と一致するものである．さらに Watanabe ら[12]が同じ胆汁を用いて，リンパ球でその変異原性を

調べた結果では，胆汁自体が染色体異常を起こすことはなかったが，MMC の染色体異常発現の効果を強める作用のあることがわかった．

今回の実験は，原液濃度で阻止帯を形成する胆汁についてのみ変異原性試験を行ないその 12.4％に変異原性を認めた．共変異原性については各々の胆汁でその適性濃度で認めた．ここで適性濃度というのは10例（33.3％）で 1/4 希釈胆汁，8例（26.7％）では胆嚢内の原液濃度であった．胆汁は肝細胞より分泌されるが，その量は一日 1000～2000 ml にも達するといわれる．その85％は水分でありその分泌も連続的に起こるのではなく絶食時にはその分泌は減少し，その他食事の種類や水分摂取量等によってもその量は大いに左右されるという．これら胆汁はその後胆嚢内において5～10倍に濃縮される．今回実験に使用した胆汁は全例外科的切除胆嚢内より得たもので患者の日常生活中の胆汁濃度とは異なったと思われる．しかし，実際に体内においてはどの程度の濃度の胆汁が胆嚢粘膜に触れる機会が最も多いのかは大変重要な事と思われるが非常に難しい問題である．いずれにしても今回の実験の結果，まず第一に胆汁自体に変異原性があり，第二に，胆汁には共変異現性もあることが判明した．以上の結果から胆嚢の発癌については胆汁のかかる作用を視野に入れて今後の研究を行なう必要かあると思われる．

結　　語

今後の研究の方向としては，まず rec assay でみられた変異原性を別の方法を用いて再確認する必要があろう．従来 Ames test では試料中にヒスチジンやトリプトファンがあると検索できなかったが，最近ブルーコットン等で前処理することにより，これら物質を除去し変異原性物質を含む成分のみ抽出することができるようになった[13]．そこで Ames test 等による再確認が必要である．

次に rec assay で変異原性及び共変異原性を惹起する物質の同定が必要である．特に今回胆道癌多発地域の新潟で得た胆汁と少発症地域で得た胆汁に変異原性に差があるのか，その変異原物質の同定など今後の研究で明らかにすべきである．

参 考 文 献

1) **Yamamoto, M., Endoh, K., Toyama, S., Sakai, H., Shibuya, N., Takagi, S., Magara, J. and Fujiguchi, K.**: Biliary tract cancer in Japan: A study from the point of view of environmental epidemiology. Acta Med. Biol., **34**: 65～76, 1986.

2) **Silverman, S.J. and Andrews, A.W.**: Co-mutagenic activity in the salmonella-mammalian-microzome mutagenicity test. Brief communication. J. Nat. Cancer Inst., **59**: 1557～1559, 1977.

3) **Watabe, J. and Bernstein, H.**: The mutagenicity of bile acids using fluctuation test. Mutat. Res., **158**: 45～51, 1985.

4) **Venett, S. and Bosworth, D.**: Lack of mutagenic activity of bile acids in bacterial fluctuation tests. Mutat. Res., **190**: 191～196, 1987.

5) **Kato, T., Matsuda, K., Kayabe, H., Enomoto, S., Hebiguchi, T., Koyama, K., Hashiya, N. and Takizawa, Y.**: Pathology of anomalous junction of the pancreaticobiliary ductal system: Mutagenicity of the contents of the biliary tract and nuclear atypia of the biliary epithelium. Keio J. Med., **38**: 167～176, 1989.

6) **Hirano, K., Hagiwara, T., Ohta, Y., Matsumoto, H. and Kada, T.**: Rec-assay with spore of Bacillus subtilis with and without metabolic activation Mutat. Res., **97**: 339～347, 1982.

7) **賀田恒夫**: 微生物による変異原試験における枯草菌"Rec-assay"の見直し（その1）．トキシコロージーフォーラム，**8**: 462～467, 1985.

8) **賀田恒夫**: 微生物による変異原試験における枯草菌"Rec-assay"の見直し（その2）．トキシコロジーフォーラム，**8**: 558～564, 1985.

9) **Kreiji, C.F., Burg, A.C. and Sloff, W.**: Accumulation of mutagenic activity in bile fluid of river Rhine fish. Mutagens in our environment, New York, 287～296, 1982.

10) **Spigelman, A.K., Crofton-Sleigh, C., Venitt, S. and Phillips, R.K.S.**: Mutagenicity of bile and duodenal adenomas in familial adenomatous polyposis. Br. J. Surg., **77**: 878～881, 1990.

11) **Horikawa, K., Sera, N., Tokiwa, H. and Kada, T.**: Results of the rec-assay of nitropyrenes in the Bacillus subtilis test system. Mutat. Res., **174**: 89～92, 1986.

12) **Watanabe, M., Takagi, S., Magara, J., Mono, H., Tsunoda, M., Nakadaira, H., Endoh, K., Yamamoto, M., Kato, K. and Akai, S.**:

Cytogenetic analysis of human bile for mutagenicity and co-mutagenicity. Tohoku J. Exp. Med., **163**: 255～261, 1991.

13) **Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H. and Arimoto, S.**: Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper phthalocyanine. Mutat. Res., **119**: 233～238, 1983.

(平成4年1月4日受付)