

原著論文

簡易生物評価法の開発と問題点 - 8-ヒドロキシグアニン試験について -

世良暢之, 志水信宏, 塚谷裕子, 田中義人^{*1}, 北森成治, 内海英雄^{*2}

活性酸素による酸化的損傷や酸化ストレスを評価するのに最も適した指標の1つに, グアニン塩基の修飾産物である8-ヒドロキシグアニン(8-hydroxyguanine, 8-OH-Gua)がある。この8-OH-Guaは従来から HPLC-ECD 法で高感度に測定されてきたが, 機器が高価なことに加え, 複雑な前処理が必要であることから, その代替法が求められていた。そこで8-OH-Gua に対するモノクローナル抗体に着目した ELISA 法を開発した。この ELISA 法を用いて255化学物質について検討したところ, 21化学物質(8.2%)が8-OH-Gua 生成能を示し, HPLC 法と同等の検出能を示した。また, 最近では多くの食品成分が抗酸化剤としてがんの予防に効果があることが示唆されていることから, 高等植物に含まれているフラボノイド類について検討したところ, ルテオリンが化学物質による8-OH-Gua 生成能を抑制することが明らかとなった。これらの結果から, 8-OH-Gua に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法は従来からの HPLC-ECD 法とほぼ同等の8-OH-Gua 検出能を有しており, かつ簡便で安価なバイオアッセイであると考えられた。

〔キーワード: 化学物質, 活性酸素, 8-ヒドロキシグアニン, ELISA 法〕

1. はじめに

エームス試験は化学物質の発がん性を予測するために世界中で使用されている試験系の1つである。しかしエームス試験で探索された変異原物質はあくまでも発がん候補物質であって必ずしも発がん性があるとは限らないこと, エームス試験では検出できない発がん物質(非変異発がん物質, non-genotoxic carcinogen)などの新しい問題がでてきた。これらのことから, 培養細胞, 動物個体を用いた新しい試験法(代表的なものとして染色体異常, 小核形成などがある)が次々に開発されてきた。最近, その1つとして活性酸素生成系を介した遺伝子損傷が着目されるようになってきた(図1)。

8-ヒドロキシグアニン(8-hydroxyguanine, 7,8-dihydro-8-oxoguanine, 8-OH-Gua)は, 細胞内の DNA (deoxyribonucleic acid, ヌクレオチドの巨大な重合体である核酸のこと)複製反応における複製エラーを反映する酸化的損傷を持つ塩基の1つである。この8-OH-Guaは, 電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ(high performance liquid chromatograph equipped with

electrochemical detector, HPLC-ECD)により高感度に検出できる。しかしこの8-OH-GuaはDNAの抽出過程あるいは酵素分解中に, 空気との接触, 光の作用, 微量作用などにより, アーティファクトとして生じ, 細胞DNA中の8-OH-Guaの微妙な変化を測定するには注意を要することが指摘されている¹⁾。現在, このHPLC-ECDに替わる検出法が求められている。

これらの状況を踏まえ, 本報告は8-OH-Guaのモノクローナル抗体を用いた競合的酵素免疫測定法

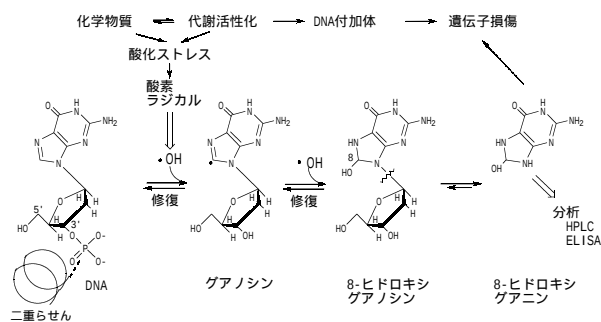


図1 化学物質による8-ヒドロキシグアニンの生成機構

福岡県保健環境研究所(〒818-0135 太宰府市大字向佐野39)

^{*1} 現: 福岡県環境部環境政策課(〒812-8577 福岡市博多区東公園7-7)

^{*2} 九州大学大学院薬学研究院機能分子解析学(〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

(competitive enzyme-linked immunosorbent assay , ELISA) の開発を行うことを目的とした . この ELISA 法を用いて種々の化学物質による DNA 中の 8-OH-Gua の生成を調べるとともに , DNA 損傷を抑制する物質 (食品成分など) の検索に適用できるかどうかについて検討した .

2 . 材料及び方法

2 . 1 化学物質

化学物質は , 生体影響 (急性 , 慢性毒性 , 変異原性 , 発がん性 , 内分泌攪乱 , 水生生物毒性 , 生殖毒性 , 生体への刺激性及び神経毒性など) , 環境暴露 (生産量 , 使用量及び暴露量など) の観点から重要と思われる 255 化学物質を選択した . これらの化学物質は , 農薬 65 種類 (殺虫剤 , 除草剤 , 燐剤等) , 多環性芳香族炭化水素 104 種類 , 脂肪族炭化水素 60 種類 , 重金属 13 種類 , 無機物 3 種類 , 植物エストロゲン 10 種類に分類され , すべて和光純薬工業 (株) から購入した . これらの化学物質はジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide , DMSO) あるいは蒸留水に溶解させ , 被検試料とした .

また , DNA 損傷を抑制する食品成分としてルテオリン , モリン及びミリセチンなど高等植物に普遍的に含まれているフラボノイドを選択した .

2 . 2 8-OH-Gua 試験

ラット初代肝臓細胞は Sprague-Dawley ラット (8 - 12 週齢) からコラゲナーゼ処理で分散させて調製し (2.0×10^6 cells) , 96 穴マイクロタイタープレートに 5×10^5 cells ずつ播種して 20 時間前培養した後 , 化学物質を添加してさらに 24 時間暴露し , HPLC-ECD 法及び ELISA 法により 8-OH-Gua を測定した .

HPLC-ECD 法による 8-OH-Gua の測定は従来法で測定した²⁾ . 肝臓細胞中の DNA は凍結融解で細胞破碎 , 遠心分離で核分画を採取し , proteinase K 処理 , イソプロパノール抽出 , nuclease P1 処理 , alkaline phosphatase 処理後 , ミリボア (Ultra free C3GV) で精製した . HPLC は , LC-10AD (Shimadzu , 1ml/min) , UV 検出器 UV-8020 (Shimadzu , 290nm) , 電気化学検出器 Coulochem II (ESA , E2 ; 300mV , R2 ; 50nA) , オートインジェクター AS-8010 (Tosoh) , カラムオープン TX-48 (Toho , 25) , レコーダー LR-4220 (Yokogawa) で構成した . 移動相は 8 % メタノール-10mM リン酸緩衝液を用いた .

また 8-OH-Gua に対する特異性が高い抗 8-OH-Gua モノクローナル抗体を用いた ELISA 法は以下のようにして測定した . まず 8-OH-Gua をマイクロプレートに固相化し , これに調整した試料 DNA (化学物質を暴露した

ラット初代肝臓細胞から抽出精製した DNA で 8-OH-Gua を含む) と抗 8-OH-Gua モノクローナル抗体を同時に加え競合反応を行う . 試料中の 8-OH-Gua が多いとそれに結合する抗体が多くなり , 固相化 8-OH-Gua と結合するモノクローナル抗体量が減少する . 反応後 , 洗浄して試料中の 8-OH-Gua と結合したモノクローナル抗体を除去し , 固相化 8-OH-Gua と結合したモノクローナル抗体のみを残す . 次に酵素標識抗体 (POD 標識抗 IgG マウス抗体) と反応させ , 発色剤 (O-フェニレンジアミン) で呈色し , 吸光度 (492-610nm) を測定する . 最後に , 別途作成した標準曲線から 8-OH-Gua 生成量を読みとる . 試料中の 8-OH-Gua 量が多いほど , 吸光度は低くなる .

2 . 3 エームス試験

エームス試験はプレインキュベーション法で実施し , ラット肝臓 S9mix (オリエンタル酵母工業 (株)) による代謝活性化法を併せて実施した . 試験菌株は S. Typhimurium YG3003 株で , 8-ヒドロキシグアニン修復酵素欠損株であり , 酸化型変異原に高感受性である³⁾ .

3 . 結果及び考察

3 . 1 8-OH-Gua 測定における HPLC-ECD 法と ELISA 法の比較

抗 8-OH-Gua モノクローナル抗体を用いた ELISA 法が HPLC-ECD 法の代替法としてどの程度有効かを検討した . 活性酸素生成能を有する代表的な 21 化学物質を用いて HPLC-ECD 法及び ELISA 法の両方法で 8-OH-Gua を測定したところ , 2 種類の試験法は非常に良く相関することが明らかとなった (図 2) . 8-OH-Gua 標準液 (デオキシグアニン 10^6 に対して 8-OH-Gua をそれぞれ 0.1 , 0.5 , 2.5 , 12.5 , 62.5nM 添加したもの) を用いて , ELISA 法と HPLC-ECD 法の感度比較を行った . ELISA 法では 2.5 , 12.5 , 62.5nM の測定が可能であったが ,

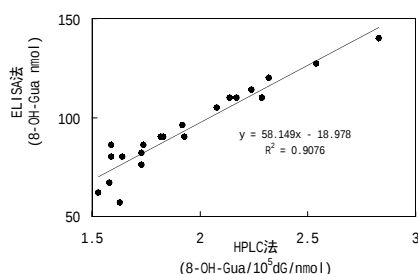
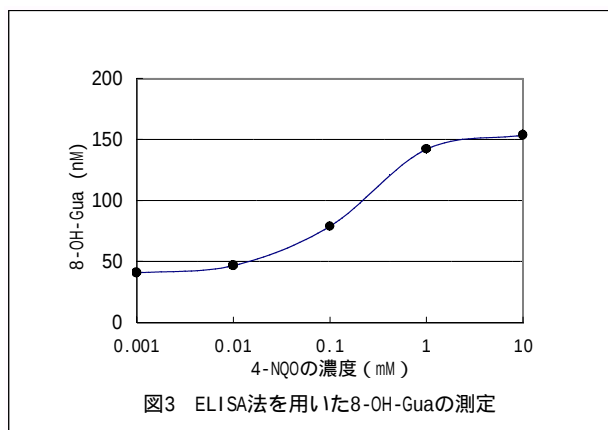


図2 HPLC法とELISA法の相関について

HPLC-ECD 法ではさらに低濃度の 0.1 , 0.5 でも測定が可能であり , HPLC-ECD 法の方が高感度であった .

しかし、HPLC-ECD 法では複雑な前処理（細胞からの DNA の抽出、精製）と高価な機器が必要であると同時に、その操作に熟練を要する。一方、ELISA 法では特異性が高い抗8-OH-Gua モノクローナル抗体を用いているため複雑な前処理、機器を必要とせず、共存物質の多い生体内（*in vivo*）での酸化的 DNA 損傷に対する修復を忠実にみるためには優れた分析法であると考えられた。

細胞を用いた簡易生物評価法が定量性を得るためには、投与する化学物質の量を段階的に増やしたときに現れる毒性反応の大きさと間に一定の関係が無くてはならない。しかし細胞を用いる毒性試験においては、培養液、細胞密度及び細胞株など変動要因が多い。このことから、4-ニトロキノリン-N-オキサイドを標準物質として、ELISA 法を用いた8-OH-Gua の用量-反応曲線（dose-response curves）を求めたところ、図3に示すようなシグモイド型の曲線が得られた。4-ニトロキノリン-N-オキサイドでは0.01mM 以上の濃度で8-OH-Gua 生成能が認められたことからこの濃度が8-OH-Gua 生成能を発現する必要最小限の閾値であり、それ以下の量では無作用であると考えられる。閾値以上では8-OH-Gua 生成能を現わし、投与量の増加に伴って強くなり、さらに用量を増して10mM 以上を投与すると100%細胞死に至った。このことから、ELISA 法を用いた場合、4-ニトロキノリン-N-オキサイドによる8-OH-Gua 生成は、0.01mM - 1 mM の幅広い濃度範囲で測定可能であり、化学分析に比較して適用範囲がかなり広いことが示唆された。



3.2 ELISA法による255化学物質の8-OH-Gua生成能測定及びエームス試験による変異原性との比較

ELISA 法を用いて255化学物質について検討したところ、表1に示すような21化学物質に8-OH-Gua 生成能が認められた（8.2%）。HPLC-ECD を用いた場合にはこれらの化学物質に加え、亜ヒ酸ナトリウム、塩化ニッケル（ NiCl_2 ）に8-OH-Gua 生成能が見られた（9.0%）。この2化学物質の8-OH-Gua 生成能は ELISA 法では検出限界以下で

あった。

21化学物質の8-OH-Gua 生成能は、57-140nM であった。最も強い8-OH-Gua 生成能を示した化学物質は4-ニトロキノリン-N-オキサイドであった。21化学物質のう

表1 S. Typhimurium YG3003株での突然変異誘発能とラット初代肝細胞を用いた8-OH-Gua生成量の比較

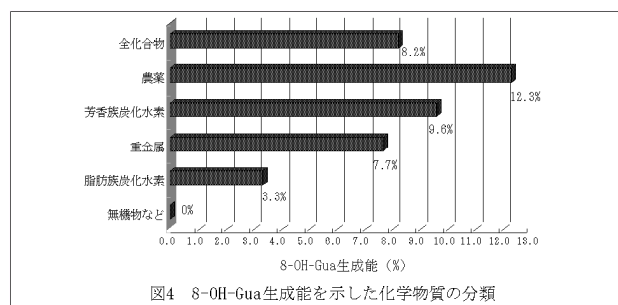
化学物質名	YG3003変異誘発能		8-OH-Gua生成能 (nM)
	代謝活性化	非代謝活性化	
Aflatoxin B1	-	-	+ (96)
2-Aminoanthracene	+	-	+ (62)
2-Aminoanthraquinone	+	-	+ (57)
3-Nitrofluoranthene	-*	-	+ (90)
1-Nitropyrene	-*	-	+ (110)
4-Nitroquinoline-N-oxide	-	+	+ (140)
Cumene	-	-	+ (86)
Dibenzyl ether	-*	+	+ (90)
Diethylbenzene, mixture	-	+	+ (110)
Formaldehyde	-	-	+ (110)
MEP	-	-	+ (76)
Methoxychlor	-	-	+ (67)
Paraquat	-	-*	+ (127)
Pentachlorophenol	-*	-	+ (105)
Potassium dichromate	-	+	+ (80)
Simetryne	-*	-	+ (90)
Thiobencarb	-	-*	+ (86)
TPN	-*	-	+ (82)
1,2,4-Trichlorobenzene	+	-	+ (120)
2,4,5-Trichlorophenol	-	-	+ (114)
Triphenyltin (IV) chloride	+	-	+ (80)

-*：化学物質による細胞毒性が強いため、測定不可

ち8化学物質（2-アミノアントラセン、2-アミノアントラキノン、4-ニトロキノリン-N-オキサイド、ジベンジルエーテル、ジメチルベンゼン混合物、重クロム酸カリウム、1,2,4-トリクロロベンゼン及び塩化トリフェニルスズ）は、S.Typhimurium YG3003株を用いたエームス試験で変異原性を示した。しかしながら、その他の13化学物質（61.8%）はエームス試験では検出できなかった。このことは8-OH-Gua 修復酵素欠損株であり、酸化型変異原に高感受性である S.Typhimurium YG3003株を用いたエームス試験では、8-OH-Gua 生成能を有する化学物質を全て検出することができないことを示している。即ち、化学物質によるラット初代肝臓細胞を用いた8-OH-Gua 生成能とネズミチフス菌を用いた変異原性との間に定量的な関連は認められなかった。

8-OH-Gua 生成能を示した21化学物質を構造的に分類すると、芳香族炭化水素が104化学物質中10化学物質（9.6%）（芳香族ニトロ化合物が3化学物質、芳香族アミンが2化学物質、その他が5化学物質）、農薬が65化学物質中8化学物質（12.3%）、脂肪族炭化水素が60化学物質中2化学物質（3.3%）、重金属が13化学物質中1化学物質（7.7%）であった（図4）。多環性芳香族炭化水

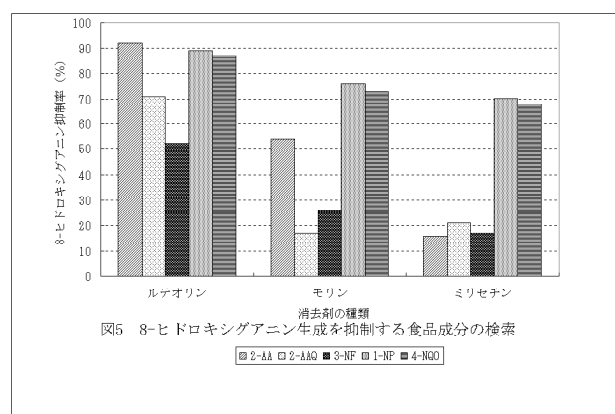
素と農薬の8-OH-Gua 生成能が高い傾向にあるが、これはフリーラジカルと呼ばれる不対電子を持っており、多くの分子から電子1個を奪いその分子の酸化を引起す物質群が構造的にこれらに分類されるものが多かったことからきていると考えられる。これらの化学物質のうちメトキシクロル、ペンタクロロフェノール、1,2,4-トリクロロベンゼン、2,4,5-トリクロロフェノール及び塩化トリフェニルスズなどのような塩素化合物は動物個体に対して肝臓障害を引き起こすことが知られている。しかしながらこれらの塩素化合物は強い細胞毒性を有するためエームス試験では変異原性の測定が難しいことが指摘されていた⁴⁾。ラット初代肝臓細胞を用いた ELISA 法において8-OH-Gua 生成能が測定されたことから（化学物質 1 mM で67-10nM）、これらの塩素化合物は細胞内DNA に対して塩基部分の酸化反応と側鎖の切断反応を引き起こし、毒性発現の引き金となっていることが示唆される。



3.3 ELISA法による8-OH-Gua測定の応用例

最近、国や地域による発がんリスクの差は食事習慣の影響が強いことが多くの疫学的調査から明らかにされてきた。しかし科学的根拠は明確であるとは言い難く、食品中に存在する抗発がん物質や抗変異原物質の摂取量の差によるのではないかとされている⁵⁾。例えば、クロロフィルは物理的に複合体を形成することにより発がん物質を吸着、除去することが知られており、アスコルビン酸やα-トコフェロールはニトロ化、ニトロソ化剤である亜硝酸を還元分解することにより、発がん物質の生成を抑制することが知られている。特に最近注目を集めているのはDNA への活性酸素による攻撃により生じるDNA 修飾産物である8-OH-Gua を指標に、活性酸素そのものを消去するポリフェノールなどの食品成分に関する研究である。そこで、抗酸化物質でありかつ8-OH-Gua 生成を抑制する食品成分の検索を ELISA 法を用いて試みた。8-OH-Gua を生成する化学物質の中から、代表的な芳香族炭化水素として、2-アミノアントラセン（2-AA）、2-アミノアントラキノン（2-AAQ）、3-ニトロフルオランテン（3-NF）、1-ニトロピレン（1-NP）及び

4-ニトロキノリン-N-オキシド（4-NQO）を選んだ。抗酸化効果を有する食品成分としてルテオリン、モリンおよびミリセチンの3種類を選んだ。その結果、最終濃度50mM で、ルテオリンは2-AA、1-NP 及び4-NQO による8-OH-Gua の生成を約87 - 92%抑制したが、2-AAQ に対しては約70%、3-NF に対しては約50%の抑制を示したにとどまった。また、モリン、ミリセチンは1-NP、4-NQO に対しては約68 - 76%の抑制効果を示したが、その他の化学物質による8-OH-Gua の生成にはほとんど抑制効果を示さなかった（図5）。



4. まとめ

“ Chemical Abstracts ” によると1999年現在で、1600万種の化学物質と400万件の生体成分の情報が登録されており、その登録数は約10年で倍増している。これらに加え、トリハロメタン等の消毒副生成物、ダイオキシン類等の燃焼副生成物などの非意図的生成物などを含めると、その種類や量は我々の把握できる範囲をはるかに凌駕している。一方で、実際に用いられている化学物質は“ 化学物質の審査及び製造等の既製に関する法律 ” から推定すると約6 - 10万種と予想されている。市場に提供するには様々な毒性試験を行うことを義務として課されているが、現行の動物実験を用いた毒性試験は多額の費用と長い年月を要する。より短期間により安価で毒性発現の機構の解析が可能な系として細胞を用いた毒性試験法への代替が議論されている。

このような状況下で、個体と代謝活性が基本的に一致している細胞培養系の毒性試験への採用は意義があるものとして認められつつある。特に肝臓は多くの薬物を代謝、解毒するので、薬物の毒性や安全性を調べるために、利用されている。なかでも初代肝臓細胞は化学物質の代謝活性化に必要なミクロソーム酵素の活性を有していることから、化学物質自体は毒性が無くてもその代謝産物が毒性を示すような場合には非常に有用である。これら

のことを踏まえ、今回調整が比較的容易なラット初代肝臓細胞を用い、8-OH-Gua を指標とした簡易生物評価法（バイオアッセイ、bioassay、生物材料を用いて生物応答変化を測定し、化学物質の生物への有害作用量を評価する）を確立することとした。また生物試験を専門としない技術職員であっても容易かつ正確に測定・評価できるような簡易生物評価法とするため、簡便・簡略化し、迅速かつ定量的に試験結果が得られる方法として、ELISA 法を採用した。この ELISA 法を用いた8-OH-Gua 試験は、255種類の化学物質についての検討を行った結果、経済的、時間的理由及び多くの化学物質を試験することができるという観点からすると、優れた予備スクリーニングであり、多くの成果が蓄積されつつある。

通常、活性酸素はウイルス、細菌感染症から身を守る働きなど有用な役割を担っている一方で、生体内でのバランスが崩れ過剰生産されると生体膜、酵素や遺伝子などを傷つけ、糖尿病、動脈硬化及びがんなどの重要な原因と考えられている。特にがん予防の重要な戦略の1つとして野菜や果物などの食品中の抗酸化剤をうまく摂取することがあげられている。しかし活性酸素は不安定で捕らえ難く、その検出のためには ESR (Electron spin resonance, 核磁気共鳴装置) などのごく限られた手段に頼らざるを得なかった。今回開発した ELISA 法による8-OH-Gua 試験の応用例として、8-OH-Gua の生成抑制能を指標に天然抗酸化物質をスクリーニングすることにより、ルテオリンなどのフラボノイド類が有効であることが示唆されるデータが得られた。今後、がん予防薬、老化抑制薬などが見いだされることが期待される。

5. 今後の問題点

8-OH-Gua は時間の経過と共に減少することが報告されているが、これは8-OH-Gua をはじめとする DNA 損傷を基質にする作用の異なる2つの修復酵素（8-OH-Gua グリコシラーゼ、8-OH-Gua エンドヌクレアーゼ）が存在するためである。この8-OH-Gua 修復酵素活性が誘導されたかどうかを調べるのが忠実に細胞内での酸化ストレスの状態を見ていると考えられる。哺乳動物細胞からは8-OH-Gua 修復酵素の完全精製までには至っていないが、今後の展望としてこれらの測定系の開発が望まれる。

IARC (the International Agency for Research on Cancer, 国際癌研究機関) は最も一般的に用いられている4種類の *in vitro* 変異原性試験（エームス試験, Chinese hamster ovary cell を用いた染色体異常試験, 姉妹染色分体交換及びマウスリンパ腫細胞 (L5178Y) を用いた突然変異

試験) と *in vivo* 発がん性試験の一致率を検討し、いずれの変異原性試験を組合わせて用いても発がん物質の検出には限界があることを指摘している⁹⁾。これは *in vitro* 及び *in vivo* での代謝・解毒機構の相違、生体内での薬物動態（吸収・分布・排泄など）の相違及び種差（感受性、臓器特異性及び性差など）などの要因に起因すると考えられる^{7,8,9,10)}。今後は臓器標的性を考慮に入れた *in vitro* 及び *in vivo* の試験系に加え、化学物質のヒトへの危険度をより正確に評価する方法としてとして、ヒト肝臓由来の培養細胞系として広く使用されている HepG2 などを用いて8-OH-Gua の検出が可能かどうかなどについて検討していく必要がある。

謝辞

本研究は、環境省未来創造型基礎研究推進制度プロジェクト“化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発に関する研究”(平成9-12年度、研究代表者 内海英雄教授)により実施した。

文献

- 1) Claycamp, H.G. : Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays, *Carcinogenesis*, 13, 1289-1292, 1992.
- 2) Kasai, H. and Nishimura, S. Formation of deoxyguanosine of the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents: *Nucleic Acids Res.*, 12, 2137-2145, 1984.
- 3) Suzuki, M., Matui, K., Yamada, M., Kasai, H., Sofuni, T. and Nohmi, T. ; Construction of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in 8-hydroxyguanine DNA glycosylase and their sensitivities to oxidative mutagens, *Mutation Res.*, 393, 233-246, 1997.
- 4) Floyd, R. A., Watson, J. J., Wong, P. K., Altmiller, D. H. and Rickard, R. C. : Hydroxy freeradical adduct of deoxyguanosine: Sensitive detection and mechanism of formation: *Free Rad. Res. Comm.*, 1 : 163-172, 1986.
- 5) 大澤俊彦：抗がん機能の評価，フードケミカル，62-68，1996。
- 6) 黒木登志夫，松島泰次郎：化学物質のヒトに対する発がん性の評価，IARC モノグラフ，7-17，1985。
- 7) 常盤寛，世良暢之：肺癌の分子生物学，大気中発癌物質の DNA 付加体解析，呼吸，15(3)，306-313，1996。
- 8) 世良暢之：ニトロアレーンの構造・変異活性相関およびヒト暴露の実態，環境変異原研究，20，97-105，1998。
- 9) Tokiwa, H., Sera, N., Nakanishi, Y. and Sagai,

M. : 8-Hydroxyguanosine formed in human lung tissues and the association with diesel exhaust particles, *Free Rad. Biol.Med.*, 27(11/12), 1251-1258, 1999.

10) Tokiwa, H., Nakanishi, Y., Sera, N., Hara, N.

and Inuzuka S. : Analysis of environmental carcinogens associated with the incidence of lung cancer, *Toxicology Letters*, 99, 33-41, 1998.

Usage and limitation of ELISA for the quantitative measurement of 8-hydroxyguanine

Nobuyuki SERA¹, Nobuhiro SHIMIZU¹, Hiroko TSUKATANI¹,
Yoshito TANAKA², Shigeji KITAMORI¹ and Hideo UTSUMI³

¹*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

²*Environmental Policies Division, Environment Department, Fukuoka Prefectural Government,
7-7 Higashikouen, Hakata-ku, Fukuoka 812-8577, Japan*

³*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University,
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan*

Millions of chemicals have been synthesized and thousands of them have been detected in our surrounding environment. This has caused great concern about human health. Some chemicals are well known to generate reactive oxygen species such as superoxide anion radicals, hydrogen peroxide, hydrogen radicals and singlet oxygen, and these have been well correlated with the incidence of cancer in animal models. 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) is one of the most popular markers for the evaluation of oxidative damage and oxidative stress. ELISA for 8-OH-Gua by a monoclonal antibody correlates well with 8-OH-Gua determined by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector. The ELISA method, in contrast with the HPLC-ECD method, does not require either the complicated processes for DNA extraction and hydrolysis, nor expensive equipment. In this study, therefore, we determined the 8-OH-Gua level induced by 255 chemicals using fresh rat hepatocytes in an *in vitro* reaction. Among 255 chemicals tested, 21 chemicals (8.2%) produced 8-OH-Gua. In particular, 3-nitrofluoranthene, 1-nitropyrene, aflatoxin B1, cumene, formaldehyde, fenitrothion, methoxychlor, pentachlorophenol, simetryne, thiobencarb, chlorothalonil and 2,4,5-trichlorophenol produced 8-OH-Gua in fresh rat hepatocyte DNA, while they showed no mutagenicity for *S. Typhimurium* YG3003 which is sensitive to reactive oxygen. Since it has been found that many dietary antioxidants potentially inhibit the formation of DNA damaging products, we searched for natural antioxidants in plants with the ELISA method. As a result, rutin was found to play an important role in protecting oxidative DNA damage due to chemicals. We conclude, therefore, that the ELISA method is useful not only for quantitative evaluation of the toxicity of various chemicals, but also for detecting antioxidants in plants.

[Key words; chemicals, reactive oxygen, 8-hydroxyguanine, ELISA]