

金沢大学 建設工学科 正員 松井三郎
 北電産業株式会社 正員 徳川正弘
 金沢大学 大学院 学生員 高島正信

1. はじめに

我々は、ここ数年来、環境変異原物質の検出方法として、枯草菌のRec⁺(NIG 17)とRec⁻(NIG 45)を用いる液体(S-9)Rec-assayを実施してきた。しかし、我々が目標とする種々種々な物質が微量に混在している水環境中の変異原性を検出するためには、より再現性に優れ、より感度が高く、更に、できる限り多くの物質の変異原性の検出が可能な方法が必要とされる。そこで、今回は、従来の液体(S-9)Rec-assayにPreincubationの手法を導入して更に改良を加えた。また、この液体(S-9)Rec-assay Preincubation法を市販染料について適用した結果、変異原性について有意な結果が得られたのでここに報告する。

2. 実験方法

1). 直接変異原物質の検出(液体Rec-assay Preincubation法) L字管に、検定物質溶液0.6ml、対数増殖期にある枯草菌溶液(濁度0.01になる様にNutrient brothで希釈)0.4mlを注入し、Preincubation(37℃、1hour)する。その後、さらに5mlのN.B.を加え、引き続き振とう培養(37℃、71rpm)する。検定物質を含まないControlの濁度が100に達した時点で、検定物質を段階的に変えて注入したすべてのL字管の濁度を測定し、それぞれの濁度のControlの濁度に対する生存率を算出する。

2). 間接変異原物質の検出(液体S-9 Rec-assay Preincubation法) 上述1)のPreincubation時において、薬物代謝酵素系S-9mix 0.1mlを注入し、以下1)と同様の操作を行う。

なお、検定物質が水に溶解できるものはN.B.で、水に不溶のものはN.B.-DMSO(9:1)溶液に溶解して使用した。

3. 変異原性の評価方法

得られた実験データはProbit理論¹⁾を適用後、Rec⁺、Rec⁻の50%致死濃度比R50($C50_{Rec^+}/C50_{Rec^-}$)を算出し、この値の大小によって変異原性の有無を検討する。なお、本研究では、変異原性を有しないKanamycin(KM)のR50が1.3であることを考慮して、 $R50 \leq 1.3$ ならば変異原性がなく、 $R50 > 1.3$ ならば変異原性有りと判断する。

4. 実験結果および考察

1). Preincubation法の導入: 数種の代表的変異原物質について液体(S-9)Rec-assay Preincubation法を適用した結果、まず、間接変異原物質については、Benzo(a)pyrene(BP)、Acetylaminofluorene(AAF)、Dimethylnitrosamine(DMN)の変異原性が明確に検出できた。たとえば、従来の液体S-9 Rec-assayで検定不可能であったAAFは、Preincubation法の導入により、Rec⁺、Rec⁻の50%致死濃度がそれぞれ決定され、 $R50 = 4.7$ と強い変異原性を示

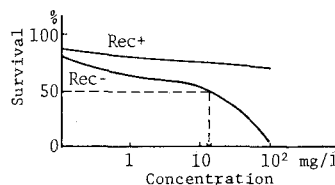


図-1 AAFの液体S-9Rec-assay

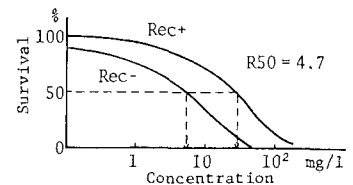


図-2 AAFの液体S-9Rec-assay Preincubation

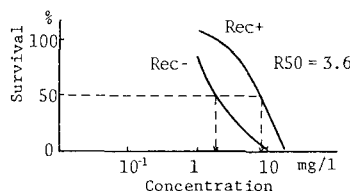


図-3 MNNGの液体Rec-assay

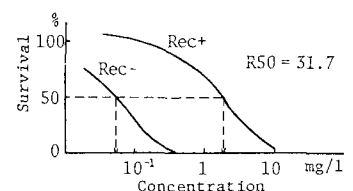


図-4 MNNGの液体Rec-assay Preincubation

している(図-1、図-2)。次に、直接変異原物質であるN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)は、液体Rec-assayではR50 = 36であるが、Preincubationを行うとR50 = 31.7となり、更に、増殖阻害濃度レベルも低濃度側へシフトしている(図-3、図-4)。

実験結果のまとめを表-1に示す。表より、R50がより大きくなり、増殖阻害濃度レベルも従来の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{4}$ となり、感度の上昇が認められる。また、Preincubationを行うことで初めて変異原性検出可能になった物質もあり、環境変異原検出能力が拡大したと言える。

2)、染料の変異原性：本研究では、サンプルとして市販染料282種を入手した。まず、一次スクリーニングとしてStreak Rec-assay²⁾を行った。次に、この結果を考慮して選出した35種の染料サンプルについて、液体(S-9)Rec-assay・Preincubation法を実施し、それらの変異原性を検討した。R50が算出できたのはそのうち15種であり、実験結果をR50によってランク付けし、表-2に示す。表より、R50が算出できた全ての染料サンプルは、直接試験・間接試験のいずれかのR50が13を超え、変異原性を示していることがわかる。更に、増殖阻害濃度レベルは代表的変異原物質MNNG、Mitomycin C (MMC) (表-1参照)に比べてかなり高いが、R50が10.0を超える非常に大きな値を示すものが数種存在し、注目される。一方、化学構造別に見ると、アゾ染料が大多数を占めていることがわかる。また、アゾ染料は代謝活性化されて、変異原性が上昇する傾向が見られる。

5. おわりに

本研究では、変異原物質検出の方法として、従来の実験手法にPreincubationの操作を導入した液体(S-9)Rec-assay・Preincubation法を実施した。この結果、従来法に比べ検出感度が上昇し、変異原物質の検出可能範囲が広がった。また、この方法により市販染料の変異原性を検討した結果、かなり多くの染料が変異原性を有することがわかった。今後は、種々の物質に本法も適用し、更に、実験手法および評価方法の改良を試みるつもりである。

<謝辞> 本研究を進めるにあたり、終始援助いただいた金沢大学癌研究所吉川寛教授、飯田克平助教に感謝の意を表します。また、共に研究して下さいた福井県庁竹内一介君にも感謝します。

<参考文献> 1)、佐久間昭：生物検定法、東京大学出版会、1964 2)、田島弥太郎、賀田恒夫、近藤宗平、外村晶雄：環境変異原実験法、議談社サイエンスフィック、1980

表-1 液体(S-9)Rec-assayと液体(S-9)Rec-assay・Preincubation法の実験結果の比較

Compound	液体(S-9)Rec-assay				液体(S-9)Rec-assay・Preincubation		
	S-9 mix	C50Rec+ (mg/l)	C50Rec- (mg/l)	R50	C50Rec+ (mg/l)	C50Rec- (mg/l)	R50
B P	+	2.5×10^{-1}	1.3×10^{-1}	1.9	2.4×10^{-1}	1.1×10^{-1}	2.2
AAF	+	検定できず			2.7×10	5.8	4.7
DMN	+	1.4×10^4 (ppm)	1.5×10^4 (ppm)	0.9	7.2×10^3 (ppm)	4.9×10^3 (ppm)	1.5
MNNG	+	検定できず			4.2	5.3	0.8
MMC	-	3.6×10^{-3}	5.8×10^{-4}	6.2	2.0×10^{-3}	3.2×10^{-4}	6.3
MNNG	-	8.3	2.3	3.6	1.9	6.0×10^{-2}	31.7
K M	-	3.4×10^{-2}	2.7×10^{-2}	1.3	1.6×10^{-2}	1.2×10^{-2}	1.3

表-2 染料サンプルのR50によるランク付け

R50 ランク	Samp. No.	S-9 Mix	Pre- inc.	C50Rec+ (mg/l)	R50	種 属	化学構造
~1.3	43	+	+	3.1×10^{-1}	0.7	塩基性染料	Oxazine
	38	-	+	4.4	1.1	"	Monoazo
	52	+	+	3.2×10^{-1}	1.2	"	Oxazine
1.3 ~2.0	46	-	-	2.8×10	1.4	"	Monoazo
	55	-	+	4.2	1.5	"	Monoazo
	91	-	+	1.0×10	1.6	酸性染料	Anthraquinone
	36	-	-	5.4	1.6	分散染料	Monoazo
	228	-	+	4.0×10	1.8	直接染料	Disazo
	54	-	+	1.9	1.9	分散染料	Monoazo
	91	+	+	9.6×10	1.9	酸性染料	Anthraquinone
	43	-	+	1.4×10^{-1}	1.9	塩基性染料	Oxazine
	46	+	+	4.1×10	2.0	"	Monoazo
2.0 ~4.0	271	+	+	4.8×10	2.3	"	Azo
	271	-	-	1.0×10	2.3	"	Azo
	55	+	+	7.6×10	2.7	"	Monoazo
	250	-	-	1.7	2.7	媒染染料	Monoazo
	52	-	-	2.1×10^{-1}	2.8	塩基性染料	Oxazine
	38	+	+	1.1×10	3.0	"	Monoazo
	65	+	+	4.8×10^2	3.6	酸性染料	"
	54	+	+	1.4	3.9	塩基性染料	Monoazo
4.0 ~10.0	22	+	+	3.9×10^2	5.8	分散染料	Monoazo
	28	-	+	6.5	9.4	"	Azobenzene
10.0~	227	-	+	4.6×10^2	10.7	直接染料	Disazo
	22	-	-	8.7×10^2	15.6	分散染料	Monoazo
	65	-	-	2.4×10^3	18.4	酸性染料	"
	36	+	+	4.3×10	21.3	分散染料	Monoazo
	28	+	+	2.1×10	31.5	"	Azobenzene
	228	+	+	2.9×10^2	51.0	直接染料	Disazo
	250	+	+	8.9×10	300	媒染染料	Monoazo