

II-390

塩素処理生成物のumu-testによる環境変異原性に関する研究

京都大学 正会員 小野芳朗
京都大学 正会員 宗宮 功
京都大学 河村正純

1. はじめに

環境中の突然変異原物質の検索は、in vitroでは細菌、酵母、動物細胞を用いた方法が開発されている。本研究では、化学物質の膜透過性が優れているサリチン菌を用いたumu-testを、発癌性が問題視されている水中有機物の塩素処理により生成すると予想される有機塩素化合物に対して適用したので、その変異原性強度に関して報告するとともに、umu-testによる判定結果の既存試験による判定との比較を行なった。

2. 原理及び実験方法

細胞のDNAが化学物質等により損傷されることで、修復のためのSOS反応がおこる。umu-testはSOS反応の中で突然変異の生成に直接関与しているumu遺伝子を利用する。品川等はumu遺伝子を持ったプラスミドpSK1002を、*Salmonella typhimurium* TA1535株へ導入し、その遺伝子の転写、翻訳で生成されるタンパクの持つ β -galactosidase活性を測定することにより、化学物質の変異原性の強さを決める方法を開発した¹⁾²⁾³⁾。変異原性の強さは、Miller⁴⁾の方法により β -galactosidase活性の大きさによって表し、次式によって示される。

$$\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性 (units/OD}_{600}\text{unit)} = \frac{1000(OD_{420} - 1.75OD_{550})}{t \times OD_{600}}$$

ここで、

OD₄₂₀ : 420nmでの2-ニトロフェーノールの吸光度(濾片による散乱を含む)
OD₅₅₀ : 550nmでの吸光度(濾片による散乱) t : 発酵時間(min)
OD₆₀₀ : 600nmでの吸光度(菌体濃度相当) v : 希釈倍率(=1.0)

本研究では品川等の方法の中で、菌体の前培養時間を3時間とし、溶媒の影響はエタノール、DMSOについてはほぼないことを確認してきた⁵⁾。本法に従えば、前培養時間後約8時間で変異原性の判定が可能である。さらに変異原強度は、試水中の単位菌体当りの化学物質の量で示すことを妥当とした⁵⁾。また本研究における変異原性の判定方法は、ある化学物質の検体量における反応2時間後の酵素活性量Aから、溶媒コントロールにおける同2時間後の酵素活性量Bを差し引いたうえで、溶媒コントロールの酵素活性量Bで除し、それが2以上を強陽性++、1から2を陽性+、0.5から1を疑陽性±、0.5以下を陰性-と判定することとした⁶⁾。

3. 結果

表1に塩素処理で生成が予想される化学物質19種⁷⁾を選定し、各々の変異原性の判定結果及び同じ物質のAmes testで報告されている結果を示した。なお、試験毎に代表的な強変異原性物質であるAF2の変異原強度を測定し、試験供試株が酵素活性を持つことを確認した。表中の数値は化学物質の反応2時間の酵素活性量Aであり、(A-B)/Bによる判定結果を、++、+、±、-で示した。

表より、S9_{mix}(肝ミカドによる化学物質の代謝活性化)で陽性を示した物質は、m-ジクロロベンゼン((A-B)/B=1.6)、ジクロロ酢酸(1.50)、トリクロ酢酸(1.18)、抱水クロール(1.30)であった。また、S9_{mix}で強陽性を示したものは、m-ジクロロベンゼン(2.06)、1,2,4-トリクロロベンゼン(7.00)、陽性がフェニール(1.30)であった。1,2,4-トリクロロベンゼン、フェニールはS9_{mix}+では細胞が死滅して測定できなかった。表1中に示した単位菌体当りの投与量は、陽性を示しえた最小投与量である。変異原性陽性を示した物質の中でジクロロ酢酸、トリクロ酢酸、抱水クロールは比較的低い濃度の58.5 $\mu\text{g/ml/OD}_{600}$ で陽性を示した。

表1中に文献で示されている各物質のAmes testによる結果を示したが、呈示したデータについてはumu-

testの結果にほぼ一致している。表1 塩素処理生成物のumu-test結果ならびに他の方法の結果との比較
また既報⁶⁾によりオゾン処理生成物とされる化学物質に関してumu-testとAmes test, Rec-assay 法との結果を比較し、ほぼ同等の判定結果を得ている。これらより本研究におけるumu-testの判定法を通した変異原性強度の評価が、塩素、オゾン処理生成物に関し、比較的短い判定時間で適用が可能であることがわかった。

4. おわりに

変異原性試験法であるサルモネラ菌を用いたumu-testで、塩素処理による反応生成物と考えられる化学物質の変異原性の強さを単位菌体当りの投与量に対し検討した。その結果、細胞内での代謝物の変異原としてm-クロルベンゼン、ジクロル酢酸、トリクロル酢酸、抱水クロラル、さらに直接変異原としてm-ジクロルベンゼン、1,2,4-トリクロルベンゼン、プロモホルムが検出された。また、

化学物質名	DOSE(μ g/ml) /00 ₆₀₀	umu-test						Ames Test
		S 9 無*	A-B B	** 黴	S 9 有*	A-B B	** 黴	
1. クロルベンゼン	442.5	77.1	0.45	-	96.4	0.67	±	± ¹⁰⁾
2. m-ジクロルベンゼン	442.5	353.8	2.06	++	229.7	1.60	+	
3. p-ジクロルベンゼン	442.5	2.9	0.02	-	22.3	0.16	-	- ⁹⁾
4. 1,2,4-トリクロルベンゼン	442.5	1204	7.00	++	-	-	Ki	
5. テトラクロルエチレン	442.5	18.0	0.10	-	18.7	0.13	-	- ¹⁰⁾
6. ジクロルメタン	442.5	0	0	-	68.5	0.48	-	
7. 1,1,1-トリクロルエタン	476.2	93.7	0.76	±	25.2	0.21	-	- ⁸⁾
8. 1,1,2-トリクロルエタン	476.2	10.0	0.08	-	0	0	-	
9. 1,2-ジクロルプロパン	476.2	0	0	-	9.0	0.07	-	
10. 1,4-ジクロルブタン	476.2	0	0	-	0	0	-	
11. プロモホルム	476.2	159.7	1.30	+	-	-	Ki	+ ⁸⁾
12. トリクロルエチレン	476.2	44.5	0.36	-	7.6	0.06	-	- ⁸⁾
13. 1,2-ジクロルエタン	393.7	0	0	-	19.3	0.18	-	
14. 四塩化炭素	393.7	62.0	0.46	-	31.3	0.30	-	
15. クロホルム	393.7	29.1	0.22	-	0	0	-	
16. クロル酢酸	485.4	9.8	0.08	-	39.0	0.34	-	- ¹⁰⁾
17. ジクロル酢酸	58.5	61.1	0.47	-	172.2	1.50	+	
18. トリクロル酢酸	58.5	93.3	0.72	±	136.4	1.18	+	
19. 抱水クロラル	58.5	104.7	0.81	±	149.9	1.30	+	

*) 数値は β -ガラクトシダーゼ活性 (units/00₆₀₀unit) : A-B
**) umu-test; - : (A-B)/B < 0.5
± : 0.5 ≤ (A-B)/B < 1.0, + : 1.0 ≤ (A-B)/B < 2.0
++ : 2.0 ≤ (A-B)/B, Ki : 死亡

既報のオゾン処理生成物に対する判定と併せ、本研究のumu-testによる判定法がAmes test 等の結果にほぼ一致することがわかった。

本研究を行なうにあたり、菌株の供与、試験法への助言などをいただいた大阪府公衆衛生研究所の小田美光先生に深甚の謝意を表します。

参考文献

- 1) 小田他、環境変異原研究6、1984
- 2) 品川他、トキシコロジーフォーラム vol 8(5)、1985
- 3) Oda et al., Mutation Res., 147, 1985
- 4) Miller, Experiments in molecular genetics, 1972
- 5) 小野、河村、宗宮、水質汚濁学会講演集、1988
- 6) 宗宮、小野、河村、第39回水道協会年講、1988
- 7) 宗宮他、工業用水、344、1987
- 8) 富田他、水質汚濁研究 3(4)、1980
- 9) 石館、染色体異常試験データ集、1983
- 10) 田島他、環境変異原実験法、1982