

II-454 化学物質のumuテストによるDNA損傷と修復機能の評価

京都大学 正会員 小野芳朗

京都大学 正会員 宗宮 功

1. はじめに 化学物質による変異原性を検索する方法は、その突然変異機構がDNA損傷にともなうことから、SOS修復機構を利用したrec

A遺伝子や、これに誘導されて開裂するumuC遺伝子を利用する方法が開発されている。本研究で適用したumuテストは、遺伝子突然変異を誘導するumuC遺伝子の誘発量と菌体の増殖量を測定することにより、化学物質の遺伝毒性を評価する方法である。通常、化学物質と試験菌株との反応時間を2時間として、陽性反応が明確にでない場合には、この時間を長くすることとされて

いる¹⁾。このことは化学物質の特性により、DNAとの反応に差異があることを示唆しており、遺伝毒性を一定の反応時間のみで評価しきれないことを表すものと考えられる。ここでは経時的なumuC遺伝子の誘発量や菌体増殖の変化を知ることにより、化学物質によるDNA損傷に伴う修復時間、修復遺伝子の量、及び誘発速度を遺伝毒性指標として評価することを試みた。

2. 試験菌株及び実験方法 ①試験菌株 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002株 (大阪府立公衆衛生研究所 小田博士の提供) ②対象化学物質 クロロホルム、m-ジクロロベンゼン、ブロホルム、ホルムアルデヒド、ク

リチサル ③LB培地で一昼夜培養した前培養液を、100ml三角フラスコに分注し、TGA培地で50倍に希釈後、化学物質を適当な数段階の濃度に調整して投与した。これを37℃、150rpmで振とう培養し、経時的に採水した。サンプルの吸光度OD₆₀₀ (菌体濃度相当)、β-galactosidase活性 (umuC遺伝子誘発量)、dehydrogenase活性 (基質分解活性) を測定した。化学物質の反応はラット肝ミクロソーム (ブクロ-MP450) S9mix添

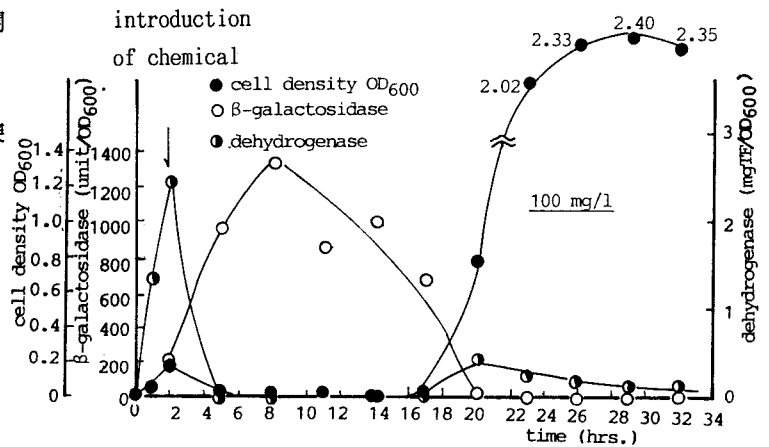


図-1 m-ジクロロベンゼンによる誘導

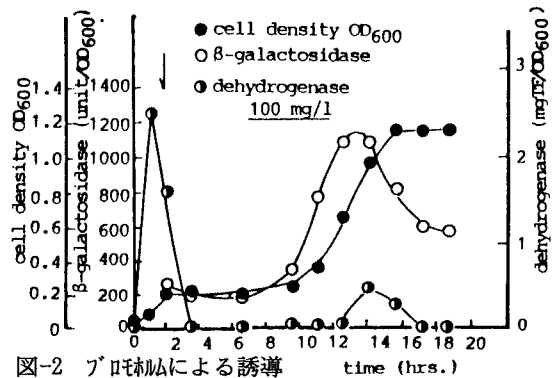


図-2 ブロホルムによる誘導

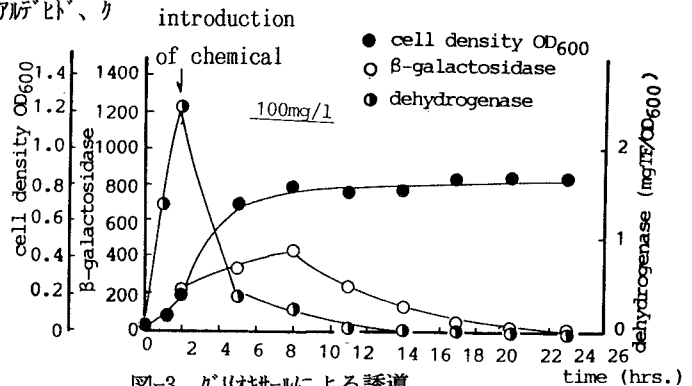


図-3 グリオキサルによる誘導

加系と無添加系の2種の状態を実施した。

3. 修復反応の経時変化 図-1, 2, 3に反応の経時変化の例をm-ジクロロベンゼン、ブロホルム、グリサールの各々100mg/lについて示した。①m-ジクロロベンゼンの投入とともに細胞は増殖を一時停止し、その間umuCが誘発されDNAの修復がなされている。18時間後、修復の終了にしたがいdehydrogenaseにより基質の分解が始まり、細胞増殖が再開する。復活後の細胞は通常の試験菌株に比して高濃度まで増殖し得た。②ブロホルムは投入後若干の遅滞時間の後、umuCの誘導と細胞の再増殖がほとんど並行して行われている。③グリサールは遅滞時間がほとんどなく、修復とともに増殖が開始された。

このように化学物質の投入は細胞のDNAに損傷を与え、その増殖を阻害するが、化学物質の種類が再増殖までの遅滞時間、修復遺伝子の誘導速度、量およびその発現期間、さらには再増殖後の増殖量に影響を及ぼすことが示された。このことは物質の細胞膜透過、拡散、DNAの損傷部位、及びその速度に化学物質固有のものが存在することを示唆している。

4. 考察 図-4にm-ジクロロベンゼン、ブロホルム、グリサールに関してumuC遺伝子(β -galactosidase)の誘発速度を各物質の投与濃度毎にS9mix有無両系につき示した。umuC誘発速度はdose responseを示しうることがわかり、化学物質の濃度評価を修復遺伝子の誘発速度で評価することが可能であることがわかった。このdose responseはumuCの最大誘発量および再増殖までの遅滞時間の長さでも得られた。

このような結果より、ある修復遺伝子の誘発速度を持つに至る化学物質の投与分子数を表した。図-5には速度が 0.05hr^{-1} , 0.20hr^{-1} の場合を示したが、ブロホルムやm-ジクロロベンゼンが比較的遺伝毒性の強いことがわかる。同様の結果が再増殖までの遅滞時間についても確認し得た。

5. おわりに 化学物質のDNA損傷に伴うSOS修復反応において、反応のある時間断面のみで遺伝毒性を評価するのみならず、その時間ダイナミクスを検討することにより、化学物質による生体への影響、即ち細胞の再増殖特性、修復遺伝子の誘発速度、量を評価し得た。これらから細胞への透過やDNA損傷に化学物質固有のものがあることが示唆され、このような指標を用いることにより化学物質の遺伝毒性の定量評価が可能となると考える。

参考 1) Oda et al. Mut. Res. 147 (1985) 219-229

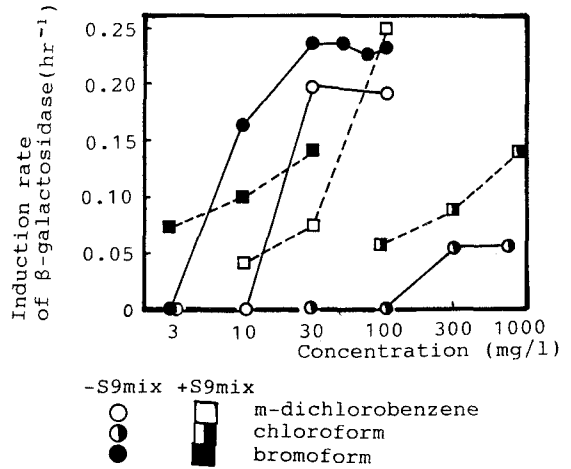


図-4 umuCの誘発速度

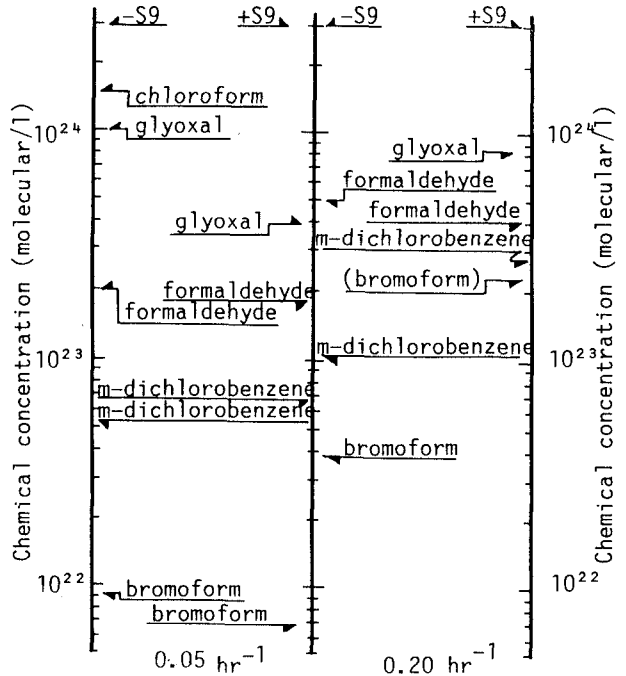


図-5 誘発速度を示す化学物質濃度