

II-480

残雪表層物質のAmes microsome assay

東北学院大学大学院 学生員 ○和泉 紀幸、山田 知広
 東北学院大学工学部 正会員 石橋 良信
 東北大学医学部 小松 正子

1. はじめに

Ames法に代表される遺伝子突然変異原性試験は、大気や水系における種々の物質の毒性評価手法として多用されており、最近多くの知見が蓄積されつつある。しかしながら、“雪”に関しては調査報告が見あらず、突然変異原性の有無も確認されていない。今回、雪、とくに残雪表層物質の突然変異原性試験を行い、若干の知見を得たので報告する。

2. 実験手法

試料は初夏に車の影響のないと思われる山形県月山から採取し、 -80°C のディープフリーザーに凍結保存しながら試験毎に一部を解凍して実験に供した。試験方法は代謝活性化を与えるAmes microsome assayと代謝活性化を与えないAmes法に準拠して行った。¹⁾ Ames法はサルモネラ菌(*Salmonella typhimurium*)の変異菌株を用いた、発がんの有無のスクリーニング手法である。試験にかける前処理として、試料を濃縮、再抽出する必要があるが、本実験では、玉川の採用している超音波抽出法を用いた。具体的には、融解後の試水の適量をフィルター(ガラス紙 $0.45\mu\text{m}$)に通水し、その残渣を一昼夜室内で乾燥した。残渣はトルエン:エタノール(3:1, v/v)溶液で20分間超音波抽出し、ろ過した。ろ液はバキュームで減圧濃縮後、ジメチルスルホキシド(DMSO) 3 mlに溶解し、 -20°C で保存した。変異原性試験は保存試料を段階的に希釈し、その $100\mu\text{l}$ を実験に供した。

供試菌株 TA100はDNAの塩基対が交換されて復帰する変異(塩基対交換型)、TA98は塩基対が余計に加わったり、脱落して復帰する変異(フレームシフト型)を検出する。S9mixはラットの肝臓から抽出される代謝活性酵素であり、+S9mixは試料へのこの酵素の添加を表示し、結果は間接変異原性の有無を判定する。一方、-S9mixは無添加であり、直接変異原性の如何を示す。変異原性の有無はコントロールの2倍以上復帰コロニーが計測された際に変異原性ありと判定される。また、変異原性の強さはAF-2換算値、ベンゾピレン(BaP)換算値でも表せる。¹⁾

3. 実験結果

変異原性試験を行った結果の代表例を図-1~4に掲げる。図はそれぞれ供試残渣量に対する自然復帰変異コロニー数を示している。

図-1は、TA100、-S9mixの条件での結果を示す。コントロールの自然復帰変異コロニー数 157個に対して試料SS14.3mg/100 μl 以上で2倍以上の316個を越える。したがって、変異原性は陽性であり、かつ塩基対交換型、直接変異原性物質の存在を示す。

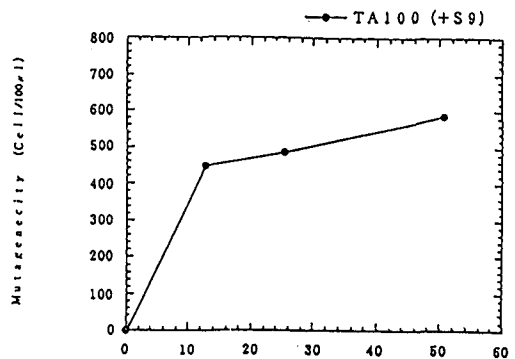


図4-1 供試残渣量 (mg/100 μl)

また、SS 113.7 mg/100ul の際のAF-2換算では103.0ngのF-2が作用したときの変異原の強さに相当する。

図-2は、TA100、+S9_{mix} の条件下である。コントロールの自然復帰変異コロニ数249個に対し、SS 113.7mg/100ul以上で598個を越え、陽性、塩基対交換型間接変異原性物質の存在を示す。

BaP換算値は、SS 113.7 mg/100ulのとき2.89 μ gのベンゾピレンが作用したときの強さに相当する。

TA98-S9_{mix}の実験結果を図-3に示す。コントロールの自然復帰変異コロニ数150個に対して試料SS33.3mg/100ul以上で2倍以上の306個を越える。従って、変異原性は陽性でありかつフレームシフト型、直接変異原性物質の存在を示す。

また、SS 136.7 mg/100ulのとき3.15ngのAF-2が作用したときの強さに相当する。

図-4は、TA98,+S9_{mix} の条件下での実験である。コントロールの自然復帰変異コロニ数150個に対し、SS33.3mg/100ul以上で308個を越え、フレームシフト型、間接変異原性物質の存在を示す。BaP換算値はSS136.7mg/100ulのとき13.8 μ gのベンゾピレンが作用したときの強さに相当する。

なお、新雪（学内より採取）にの變異原性は認められなかった。

また、今後の課題として最少しきい値の検出も必要である。

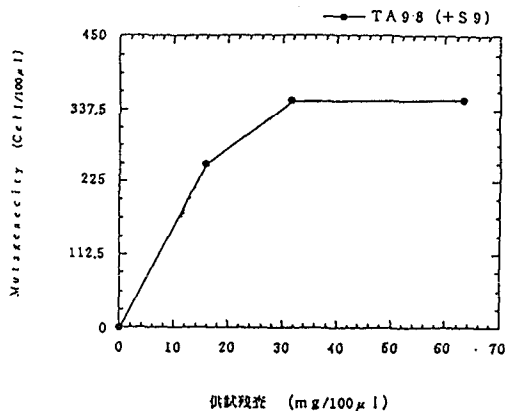


図4-2

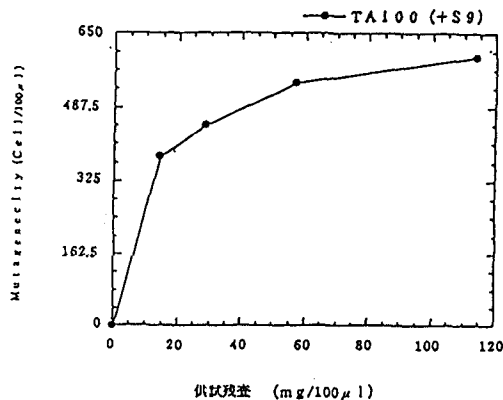


図4-3

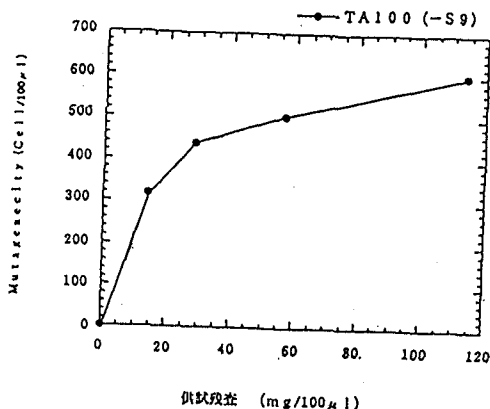


図4-4

4. おわりに

残雪表層物質を試料にAmes microsome assayを試み、菌株の違い、S9_{mix}の組合せから塩基対交換型、フレームシフト型、かつ直接、間接変異原性物質の存在が認められた。今後突然変異原性を発現される物質の特定、また同試料を対象にがん抑制遺伝子P53等を用いた毒性試験での再現性を図る予定である。本実験の遂行にあたり、仙台市衛生研究所玉川勝美博士、東北大学薬学部出川雅邦博士から教示を受けた。また、実験には卒研生宇津井善幸君、山田知広君の協力を得た、記して感謝する。