

II-544

*umu*テストによる臭素酸イオンの遺伝毒性に関する研究

京都大学 正員 小野 芳朗

京都大学 毛利 紫乃

京都大学 正員 宗宮 功

1. はじめに

浄水過程において、塩素処理中に生成する有機塩素化合物の発癌性が問題となっている状況下で、代替法としてオゾン処理の適用が普及する傾向にある。ところが最近、上水のオゾン処理の副生成物中に臭素酸イオンの存在が確認された。臭素酸カリウムは動物実験によってラット腎に発癌性であることが報告され¹⁾、国際癌研究機関によって“人に対し発癌の可能性が高い”と判定を受けている物質である。このため、飲料水中での臭素酸イオン濃度の規制が各国で検討されており、臭素酸イオンの生成を抑制、あるいは除去する方法についても数多くの研究が行われはじめています。本研究では、環境中の変異原性物質の短期スクリーニング法のひとつである*umu*テストを適用して臭素酸イオンの遺伝毒性を評価することを試みた。

2. 試験方法

*umu*テストは小田、中村らによって開発されたバクテリアアッセイであり、DNA損傷の修復機能のひとつであるSOS反応に伴う*umuC*遺伝子の発現を、*lacZ*マーカーによって β -galactosidase活性として定量するものである²⁾。使用菌株は*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002とした。試験方法は、LB培地中で16時間前培養した菌株をTGA培地で30倍に希釈し、37℃、145rpmでOD₆₀₀が0.25~0.3に達するまで振盪培養する。これに被検化学物質を所定量投与し、37℃、145rpmで一定時間振盪培養する。代謝活性による影響をみる場合にはラット肝ホモジネート画分S9に酵素を加えて調整したS9mixを、被検化学物質投与時に添加する。この系を以下+S9mix、添加しない系を-S9mixとする。反応後、菌懸濁液をZ緩衝液で10倍希釈し、細胞膜破砕のためにSDS、クロロホルムを加えて強撹拌する。ただちに基質である2-ニトロフェール- β -ガラクトピリノイドを加え、15分間、37℃で酵素反応をおこなわせ、 β -galactosidase活性を測定する。

今回、臭素酸イオンの存在形態として市販薬品の臭素酸カリウムを使用した。被検物質との反応時間は標準的に採用されている2時間より延長して経時的に測定し、さらに反応中の臭素酸イオン濃度をヨウ素滴定法によって測定した。

3. 結果

臭素酸イオンを投与した試験株の、*umuC*遺伝子発現量相当の β -galactosidase活性の経時変化の測定結果を図-1, 2に示す。ここで縦軸には、溶媒(蒸留水)対照の活性を差し引いて補正した値をプロットしてある。

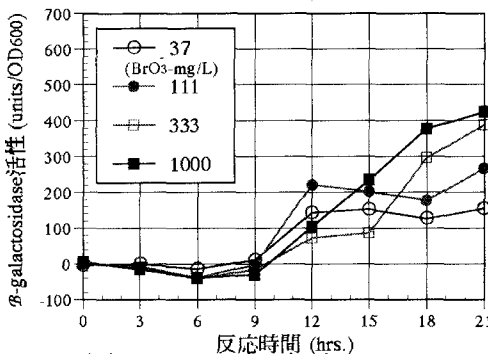


図-1 -S9mix系における
 β -galactosidase活性経時変化

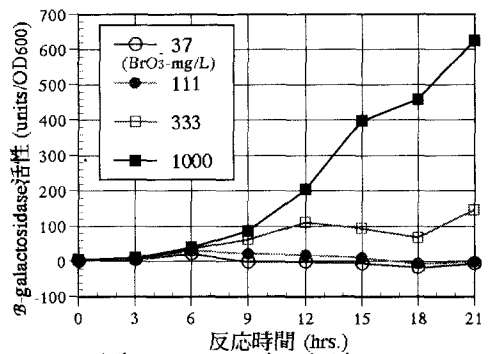


図-2 +S9mix系における
 β -galactosidase活性経時変化

図-1より、-S9mix系では30~1000 (BrO_3^- -mg/L) の全濃度において反応12時間から β -galactosidase 活性が発現、その後上昇し、18~21時間で濃度と活性値の間に用量-作用関係が現れた。一方、図-2の+S9mix系の結果では、100 (BrO_3^- -mg/L) 以下の低濃度では *umu C* 遺伝子はほとんど誘発されず、300で若干の誘発、1000の投与で高い活性値を示すことがわかった。すなわち、ラット肝ミクロソームを調整したS9mixにより300以下の濃度では *umu C* 遺伝子誘発は抑制されており、1000の高濃度になると抑制しきれずに *umu C* 遺伝子の誘発が起こったと考えられる。

次に、この活性の経時変化と並行してヨウ素滴定法によって測定した臭素酸イオンの挙動を図-3に示す。これより、臭素酸イオンは21時間でS9mixによって約160 (BrO_3^- -mg/L)、S9中のタンパク質当りに換算すると約0.43 (BrO_3^- -mg/S9protein-mg) 減少したことがわかる。

そこで遺伝毒性に対してS9mixが抑制効果をもつことが推定されたため、添加するS9mixの量を変化させて試験を行い、抑制能力を調べた結果を図-4に示す。*umu* テストにおける標準添加量の1倍、2倍とS9mixを添加することによって活性が低下し、3倍で溶媒対照の活性値に近づいた。この添加量で遺伝毒性が抑制されたとすると、その抑制能はS9中のタンパク質当たりで約0.88 (BrO_3^- -mg/S9protein-mg) と概算された。以上の実験によって、臭素酸イオンはラット肝ミクロソームによって分解され、さらにその遺伝毒性は抑制されることが確認された。

4. 結語

本研究では、変異原性物質の短期スクリーニング法のひとつである *umu* テストを用いて臭素酸イオンの遺伝毒性を評価した。その結果、臭素酸イオンは短時間では遺伝毒性を示さず、10~20時間の長時間反応の後、*umu C* 遺伝子を誘発することが確認された。しかしながら肝ミクロソーム酵素群による代謝活性がある場合、この遺伝毒性は低減され、臭素酸イオンの量が単位プロテイン当たり約0.88 (mg) 以下である場合消失することがわかった。また、肝ミクロソーム酵素群には臭素酸イオンを0.43 (BrO_3^- -mg/S9protein-mg) 程度分解する能力があることが示された。

【参考文献】1) Kurokawa, Y. et. al. "Toxicity and Carcinogenicity of Potassium Bromate—A New Renal Carcinogen" *Environmental Health Perspectives*, **87**, (1990), 2) Oda, Y., Nakamura, S. et. al. "Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens" *Mutation Research*, **147**, (1985)

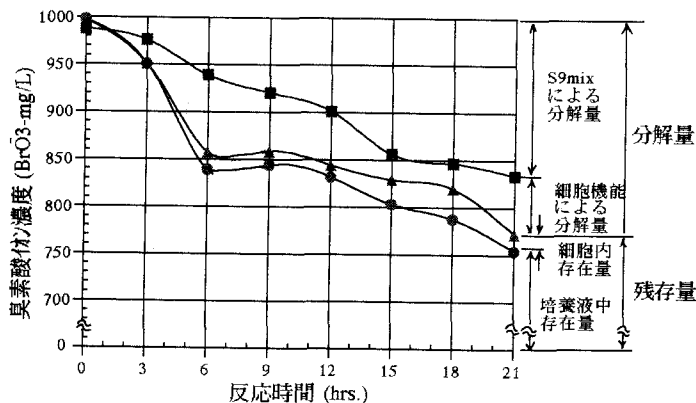


図-3 臭素酸イオン濃度経時変化

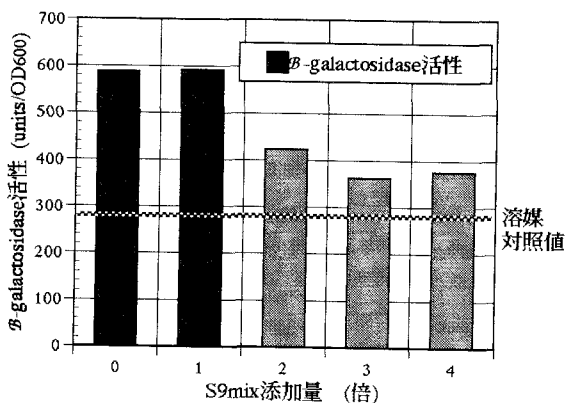


図-4 遺伝毒性に対するS9mixの効果