

突然変異原性物質の検索

富田 健二郎

A Search for Mutagenic Agents

KENJIROH TOMITA

日本で“がん”による死亡率が1位になったのは昭和56年である¹⁾。“がん”は一般的には悪性腫瘍をさしていて癌腫と肉腫を含んでおり、狭義には癌腫のことで、多細胞生物の病気の一つである。みかけ上無統制的な細胞成長(異常増殖)をし、その生体自身の細胞に比べて明らかに異常な状態(宿主からの独立性)で、生体内を伝播(侵入)することを特徴としている。癌腫は組織発生および分化の程度により、腺癌、扁平上皮癌、未分化癌などに分けられ、また臓器別でヒトに多いのは胃、子宮、乳、肺、肝臓、膵臓、食道、直腸などにみられる“がん”である²⁾³⁾。臓器別の癌発生頻度は人種によってかなり異なるが、それは単に遺伝学的差異だけでなく生活環境食生活、栄養状態、習慣などに影響されている可能性が強い。癌腫の化学療法およびそれと関連して癌組織の代謝、免疫などについては、ヒトの“がん”に対する治療という面から基礎医学、実践医学の立場で研究がさかんに進められており、成書も多数出版されている。現時点において完全な治療法は確立されておらず“死の病”とされてはいるが、職業性癌はその原因除去が可能になればなくなるであろうし⁴⁾、21世紀に入れば治療法も確立するであろうとされている。

発癌機構についての研究も進められており、発癌遺伝子の構造に関してまだ詳細な点まで判明はしていないが、膀胱癌など一部の“がん”については、遺伝子DNA中の塩基の組み合わせ

がたった1個異なったため癌細胞になるのであろうと言われており⁵⁾、生体内に存在する染色体遺伝子の構造が重要な役割をもっていることになる。では一体何が染色体遺伝子に異常をおこし、“がん”の原因になっているのであろうか。広畑⁶⁾によると「喫煙と肺癌」「放射線と白血病」の関係は1950年代から追求されているし、イギリスの煙突掃除人の“がん”がすす、タールに起因しているなど、環境の中に存在する種々の物質が“がん”と関係あることが次々に明らかにされ、最近ではディーゼル機関排出ガスの変異原性、発癌性が問題となっている⁷⁾。例えば菌類の生産するアフラトキシンが食物から取り込まれ発癌に関係している事実、職業性のもとして化学関係の仕事に従事しベンジジン、イペリットガス、塩化ビニールなどの化学物質にさらされて発癌したものや、クロラムフェニコール、ジエチルスチルベストロール、フェナセチンなどの医療用薬品が経口、注入などにより使用され、それが“がん”に関係している可能性、産業・家庭廃棄物の一種であるすす、タール、タール性油などから肺、皮膚、膀胱などへの発癌など私達の住んでいる環境中に発癌性物質が存在していることが明らかにされて来ている⁸⁾。

以上のように発癌物質は多数存在しているが、“がん”が発生する臓器は数多くあり、人体のどの臓器に発生するかは世界の国々によって異なっている。アメリカでは肺癌、中国では食

道癌、東南アジアで肝臓癌、そして日本では胃癌が多い⁸⁾というように“がん”の原因の大部分は環境に存在する発癌物質に起因していると考えられ、私達のまわりの化学物質が影響していることは間違いないようである。

現在の環境における化学物質についてみると、1979年の黒木の論文⁹⁾で400万種を超えており、この数は1週間に6,000種の割合でふえ続けているとのことなので、現在では500万種を越え、このうち日常私達が接する化学物質は推定で63,000種(日常50,000, 殺虫剤1,500, 薬品4,000, 薬品添加剤2,000, 食品添加物5,500)も存在しているし、山田¹⁰⁾は40,000種の合成化学物質にさらされており、加えて年々1,000種以上の新合成物質が出現しているとしている。これだけ多くの化学物質にとりまかれている私達は、発癌物質と常に接している可能性がある。しかしどの物質が危険な発癌性を有しており、どの物質が安全であるかということの判定するのは、上記のように数のうえからも容易ではない。まして個々の化学物質に関してだけでなく、その物質が熱、光などで変化したものや2種、3種の化学物質による相乗作用についてまで発癌性をみきわめようとするれば、大変な労力と時間を必要とすることは言うまでもない。

このように無数の化学物質のうち皮膚、呼吸器などが化学物質にさらされて“がん”が発生することもあるが、私達にもっとも関係が深いのは「食べもの」から直接体内に取り入れられる化学物質ということになる。私達は生きてゆくために食物を必要とするが、この構成物質も突き詰めればすべて化学物質であり、成分そのまま、または加水分解等によって低分子物質にして身体内に取り込んでいる。食物は自然界に存在する動物、植物、微生物などをヒトの知恵を駆使し、試行錯誤によって取捨選択を行なって、私達の食べ物となっている。現代社会における食品は自然の状態のものだけでなく、工場廃棄物、農薬、肥料などから、天然には存在していない物質を含有した食品や食品材料の存在も考えられる。また加工・貯蔵の段階で加工処理・保存の目的で化学物質、食品添加物の利用、

混入が行なわれ、摂取する食物中に危険な化学物質が存在している可能性があるし、化学物質相互の相乗作用の危険性も考慮する必要がある。また最近の発表では井戸水の中に発癌の可能性のあるトリクロロエチレン、テトラクロロエチレンが存在していることがわかり、ヒトにとっては食物とともに大切な「水」に含まれる化学物質も問題になっており、自然界に多量に存在する水、特に飲料水にも気を付けなければならないようになって来ている。

多数の化学物質に身体内外がさらされている私達はすべて“がん”になる可能性があるのだろうか。予測では1990年には“がん”による死亡が高くなる(特に60才台において50%を越す)可能性を示唆している¹¹⁾。そして安全な化学物質、危険な化学物質の判定も種々な方法で行なわれている¹²⁾。食品添加物、医薬品などの場合は急性毒性、慢性毒性、催奇形性、変異原性、発癌性などの各試験が行なわれて、安全性が確認され一般に使用されるようになってきている。しかし現在許可になっている化学物質の安全性確認が充分でなかったために、許可後の再試験によって、それらの化学物質の突然変異原性、発癌性が確認されて使用禁止になることもある。前述したように“がん”と化学物質の関係は1950年代からその研究が増えはじめ、特に近年は環境中に存在する数多くの化学物質の中から、発癌性あるいは遺伝毒性を疑わせるものを早急を選別する必要にせまられ、種々の方法が提案されている。

発癌物質を短期間にスクリーニングする方法として開発された生体外(in vitro)試験の数は多く、その方法の多くは微生物、昆虫あるいは培養細胞を用いて、化学物質の引きおこすDNA損傷、染色体異常あるいは突然変異原性を指標としている⁹⁾。その中でも微生物を変異原試験に適用して化学物質の変異原性をみるAmes試験法を中心として、Rec-assayなど1970年代に入って微生物を利用した試験が注目を集め¹³⁾¹⁴⁾、現在では短期検索法の中心となっており、関連の論文も次々に発表されている¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。

微生物を用いる実験において現在よく利用さ

れているのは Ames 試験であるが、これはサルモネラ菌の突然変異原性をみる方法で、1971年よりカリフォルニア大学の Ames 氏らによって提唱され¹⁷⁾、操作が簡単で短期間に多数の化学物質を取り扱えるので、ここ数年の間に急速な発展を遂げて来ている。この方法を用いて、多くの既知発癌物質の突然変異原性を調べた結果は、85~90%近く発癌物質が突然変異原性を示すことが証明されている¹⁸⁾。同様になるべく簡単に変異原性を選別するために開発された Rec-assay 法は、枯草菌を用いて、その DNA 修復能により判定する方法である¹⁸⁾。

これら微生物を用いた変異原性試験は食品衛生調査会の「毒物・食品添加物の遺伝的安全性評価の暫定基準」において、第一次スクリーニングに「微生物を用いる諸試験」をあげている。もちろん発癌性の判定を行なうためには第二次スクリーニング(①哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常、②ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死カイクを用いる物定座位の二試験)を行ない、最後に哺乳動物を用いる生体内 (in vivo) 試験、(①代謝活性化、宿主経由法、②生体内染色体異常、③優性致死法、④特定座位法、⑤生体内運命)の各試験を行なって最終判定を行なう。以上の試験によって食品添加物の遺伝的安全性評価の基準設定が1974年に出されている。このうち一次スクリーニングにおいて重要な働きをしているのが、DNA修復能および突然変異原性の試験である。また厚生省・食品化学課では変異原試験法として

- ①微生物による DNA 修復試験 (Rec-assay)
- ②微生物を用いる突然変異試験 (Ames 試験)
- ③培養細胞を用いる染色体異常試験
- ④マウスを用いる小核試験
- ⑤マウスまたはラットを用いる優性致死試験の 5 項目をあげており、石館¹⁹⁾は「②③の試験を行ない①試験を参考資料とし、②③どちらかで陽性の場合④あるいは⑤の試験を行ない、最終的評価、判定をすることになろう」としている。

以上述べて来たように「がん」と化学物質の関係をより明確にする必要があり、発癌の可能性のある化学物質すなわち突然変異原物質の検索は大切な試験の一つである。この検索の第一

段階は Rec-assay および Ames 試験であり、この実験技術を宮崎大学農学部生物化学研究室において学んだ。生物化学研究室では「もやし」の突然変異原物質の検索を行なっているので、その概要を述べてみたい。

実験方法²⁰⁾

試料調整

生物化学研究室で行なっている「もやし」からの突然変異原性試験用試料の抽出法の概略を図 1 に示す。なお表 1 は抽出された各画分の溶液の種類および考えられる性質である。

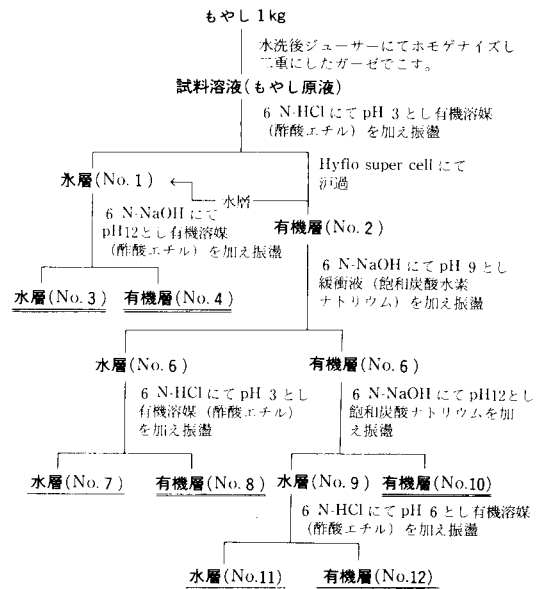


図 1 変異原性物質の抽出法 (もやしからの場合)

表 1 抽出画分の考えられる物質

試料番号	溶媒層	考えられる物質群
N o . 3	水 層	糖など極性の強い中性物質・両性物質
N o . 4	有機層	塩基性物質
N o . 8	有機層	有機酸などの酸性物質
N o . 10	有機層	中性物質
N o . 12	有機層	フェノールなどの酸性物質

図1に従って“もやし”から抽出を行ない、得られた各画分の変異原試験を行ない、変異原の認められる画分はさらに薄層クロマトグラフィー、透析などの操作でより純粋な分画・精製を行なって試料とし、突然変異原活性があるかどうかを以下の試験法により調べる。

変異原活性試験法

1. 復帰変異試験 (Ames 試験法の変法)¹⁷⁾¹⁸⁾²¹⁾

Ames らによって提唱された突然変異試験法である Ames のプレート法の改良法であるブレインキュベーション法を用いた。すなわち、*Salmonella typhimurium* TA100 株を用いて突然変異原性物質 (試料) と薬物代謝酵素を作用させ、この菌のヒスチジン要求株 (His⁻) がヒスチジン非要求株 (His⁺) となる復帰変異を起こさせ、プレート上のコロニー数を比較して判定を行なう。薬物代謝活性化酵素系 (S-9Mix) を作用させずに試験を行ない、同様に判定する方法もある。以下の器具、操作はすべて滅菌した状態のもとで行なう。

1) 菌株

Salmonella typhimurium TA100 株 (-80°C 超低温槽に保存) この菌はヒスチジン要求性の株 (His⁻) で base pair change 型 (塩基置換) だけでなく、frame shift 型 (核酸のヌクレオチド解読と相当するタンパク質のアミノ酸配列の正常な関係に変化がおきる) の突然変異誘起物質によっても突然変異がおきる。

2) 培地

- (1) 前培養プロス培地
- (2) Vogel-Bonner の最少培地
- (3) 最少グルコース・アガー培地
- (4) ソフトアガー

3) 菌株の培養

ヒスチジン要求性 (His⁻) 株、*S. typhimurium* TA100 株の保存株を前培養プロス培地に接種し、37°C、15時間振盪培養する。

4) 菌株の保存

前培養用プロス培地で培養した菌の懸濁液 0.8ml にジメチルスルホキシド (DMSO) 0.07ml を加え、栓付の小試験ビンに入れドライアイス・アセトン (-80°C) で凍結後、超低温槽に保

存する。

5) 薬物代謝活性化酵素系 (S-9Mix) の調整

(1) 肝ホモジネートの S-9 分画

5週令の雄ウィスター系ラットを用い、体重 1 kg あたり 500mg のポリ塩化ビフェニール (PCB) を投与し、注射後 5 日目に断頭屠殺し、肝臓をとりだし、冷 150mM KCl 溶液で洗い、秤量後、3 倍量の冷 150mM KCl 溶液を加え、ホモジナイズ後 9000 × g (10,500r.p.m.) で 10 分間遠心分離し、上澄みを 3 ml ずつ小試験管にとり、ドライアイス・アセトンで凍結後、超低温槽に保存する。

(2) リン酸塩緩衝液 (pH7.4)

(3) 薬物代謝酵素系 (S-9Mix)

肝ホモジネート S-9 分画、グルコース・6・リン酸、グルコース・6・リン酸脱水素酵素、NADPH、リン酸カルシウムその他の試薬を加え、混合した溶液をミリポアフィルターを通して滅菌し、使用する。

6) 操作

(1) S-9Mix を作用させる場合

各種濃度の試料溶液をつくり、試料に含まれる酵素等の活性因子を失活させた後、試験管に 0.1ml とり、S-9Mix を 0.5ml、菌懸濁液 0.1ml を加えよく混合して 37°C、20 分間振盪し、ブレインキュベーションする。その後ソフトアガー 2.5 ml を加え、よく混合させながらシャーレ中のグルコース・アガー培地に移し広げる。これを 37°C、48 時間倒置培養して復帰変異コロニー数を数える。なお陽性対照は、A A F (2-Acetyl amino fluorone) の 50 μg / DMSO 100 μl を使用する。

(2) S-9Mix を作用させない場合

S-9Mix のかわりに pH7.4 の 100mM リン酸塩緩衝液を加え、その後は(1)と同様に操作する。陽性対照は 4NQO (4-Nitroquinoline-N-oxide) の 0.02 μg / 100 μl を用いる。

2. DNA 修復試験法 (Rec-assay 法)

突然変異は染色体を構成する遺伝情報の変更であり、その出発点として DNA 損傷の生成がある。物理的・化学的な諸要因で生じた DNA の損傷の大部分は細胞の DNA 修復機能によつ

て修復される。DNA修復機能を欠いた変異株はDNA傷害を誘発する化学物質によってその生育が強く阻害されて、正常なDNA修復能を有する野生株よりも高い感受性を示す。これを利用して種々の変異原物質に対して広範囲の感受性スペクトルを示す。枯草菌 *Bacillus subtilis* M-45 (Rec⁻) 株を利用し、この株と遺伝的組み換えに関して野生株である、*Bacillus subtilis* H-17 (Rec⁺) 株とを対にして使用し、両者の変異原に対する感受性の差を比較する Rec-assay 法によった。今回は変異原物質を含む試料について、4°Cの冷所(冷蔵庫)で菌の増殖をおさえ、試料を十分にプレート上に拡散させ、37°Cで培養する低温インキュベーション法を用いた。無菌状態で操作することは1.の Ames 法と同様である。

1) 菌株

Bacillus subtilis M-45 (Rec⁻) 組み換え修復欠損株

Bacillus subtilis H-17 (Rec⁺) 野生株

2) 培地

(1)液体培地

(2)固体培地

3) 菌株の培養

液体培地にそれぞれの菌を接種し、37°C、16時間振盪培養を行なった。

4) 菌株の保存

固体斜面培地をつくり、菌を接種し、十分孢子を形成するまで(37°C、72時間以上)培養し、4°Cの冷蔵庫に保存する。

5) 操作

乾熱滅菌(100°C、30分間)した直径が12mm円形濾紙に0.02mlの試料溶液をしみ込ませ、ホットプレート上で乾燥させる。シャーレの固体培地に培地表面を傷つけないように、二種の菌を streak し、よくしみ込んだあと前記濾紙を図2のように置く。このシャーレを4°Cの冷蔵庫中に24時間放置し、菌の増殖をさせない状態で試料を十分に拡散接触させた後、37°C、18時間倒置培養を行ない、Rec⁻株 Rec⁺株に対する阻止帯の長さ(測定法は図3に示す)を測定し、修復能を比較検討する。

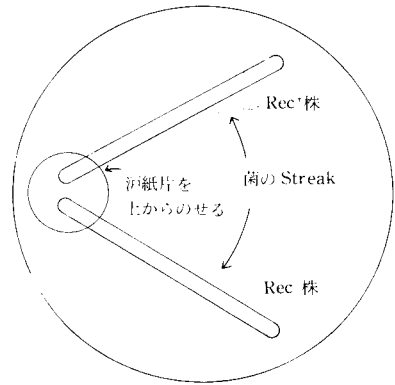


図2 菌のstreak法および濾紙の位置

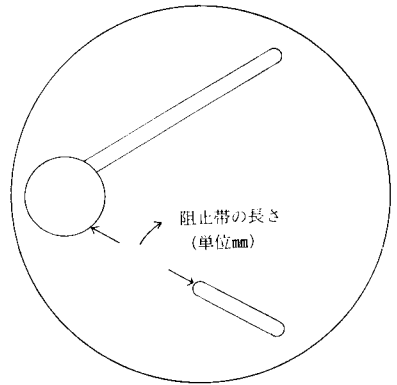


図3 阻止帯の長さの測定法

以上の二方法による試験で化学物質(試料)のDNA修復機能、突然変異原性を調べることにより、化学物質の第一スクリーニングが容易にできることがわかった。もやし画分においてはNo.3, No.8の両者にわずかに変異原性が確認されているが、これらの画分の物質の検討は現在続行中である²⁰⁾。

現在この二方法に加えてその他種々の方法を取り入れ、化学物質、特に私達の生活に密着している食品²²⁾²³⁾、食品成分の変化した物質²⁴⁾²⁵⁾食品添加物²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾、環境存在物質や産業廃棄物⁷⁾³⁰⁾³¹⁾などの化学物質の突然変異原、発癌性などの検索が行なわれており、環境に存在する化学物質の微生物によるDNA修復能、突然変異原性が指摘されることもあるが、あくまで一次

スクリーニングであり、発癌性を断定するのではなく、可能性を示唆する一つの資料である。今後この微生物を利用した変異原性の検索法を利用して、私達のまわりに存在する化学物質、特に食品関係の突然変異原性の検索を行なっていきたい。

終わりにあたり、突然変異原性物質の検索法の技術修得にあたり、親切に御指導下さいました宮崎大学農学部・生物化学研究室、教授・中津誠一郎先生、助教授・中村豊彦先生、助手・水光正仁先生に深謝いたします。また一緒に実験を行なっていただきました、宮崎大学農学部学生・甲斐寿君に成謝いたします。

参考文献

- 1) 日本栄養士会資料 栄養日本, Vol.25(2) p.38, 1983
- 2) 山田常雄・前川文夫・池上不二夫他編 生物学辞典, p.209, 218, 885, 岩波書店, 1977
- 3) 増田芳雄・中村運, 他共訳 生理・生化学用語辞典, p.46, 化学同人, 1982
- 4) 岩波書店編集部編 これからどうなる, 日本, 世界, 21世紀, p.40, 256, 530, 岩波書店, 1983
- 5) 黒木登志夫 Newton, Vol.3(7) p.7, 1983
- 6) 廣畑富雄 蛋白質・核酸・酵素, Vol.23(6), p.7, 1978
- 7) 大西克成・木内武美 トキシコロジーフォーラム, Vol.6(4) p.25, 1983
- 8) 河内卓 蛋白質・核酸・酵素, Vol.23(6) p.16, 1978
- 9) 黒木登志夫 変異原と毒性, 第6集, p.70, 1979
- 10) 山田正篤 変異原と毒性, 第4集, p.56, 1978
- 11) 平山雄 トキシコロジーフォーラム, Vol.6(1), p.68, 1983
- 12) 山崎洋 トキシコロジーフォーラム, Vol.6(2), p.82, 1983
- 13) 平野光一 遺伝毒性および関連領域の動向と解説, 第2集, p.54, 1978
- 14) 吉川邦衛 変異原と毒性, 第6集, p.35, 1979
- 15) 賀田恒夫 変異原と毒性, 第6集, p.98, 1979
- 16) サイエンスフォーラム資料 トキシコロジーフォーラム, Vol.6(2) p.198, 1983
- 17) B.N.Ames, F. D. Lee, W. E. Dorston; Pros. Nat. Acad. Sci. USA, Vol.70 p.782, 1973
- 18) 田島彌太郎・近藤宗平他編 環境変異原実験法, p.47, 講談社, 1980
- 19) 石館基 食品衛生研究, Vol.30(6), p.41, 1980
- 20) 大村一枝 農業化学科卒業論文, 1983
- 21) 矢作多貴江 蛋白質・核酸・酵素, Vol.20, (13), p.16, 1975
- 22) 長尾美奈子 変異原と毒性, Vol.4, (5), p.20, 1981
- 23) 賀田恒夫 変異原と毒性, Vol.4(5), p.45, 1981
- 24) 遠藤英也 変異原と毒性, 第4集, p.27, 1978
- 25) 並木満夫・大澤俊彦 変異原と毒性, Vol.4(5), p.32, 1981
- 26) 石館基・吉川邦衛・祖父尼俊夫 変異原と毒性, 第12集, p.82, 1980
- 27) 石館基・吉川邦衛・祖父尼俊夫 変異原と毒性, Vol.4(6), p.80, 1981
- 28) 石館基・吉川邦衛・祖父尼俊夫 変異原と毒性, Vol.5(6), p.579, 1982
- 29) 上野清一・小山田則孝・久保田かほる他 日本食品工業学会誌, Vol.30(3), p.172, 1983
- 30) 嵯峨井勝 変異原と毒性, Vol.5(3), p.233, 1982
- 31) 与那覇政憲 変異原と毒性, Vol.5(3), p.253, 1982