

環境汚染の遺伝毒性(変異原性)計測法としての *in vitro* バイオアッセイ*

後藤 純雄**・中島 大介**・江副 優香**

キーワード ①変異原性試験 ② Ames 法 ③ *umu* テスト ④環境試料 ⑤検出感度

要 旨

環境中に微量ずつ混在している有害物質の存在実態や曝露実態および生体影響を正確に把握し対策を講ずるための試験法のうち、未知の有害物質や複合汚染物をトータルとして測定し得る方法の一つに変異原性試験法がある。現在、空気、土壌、河川水などの環境汚染を変異原性の面からモニターしようとする試みがなされ、検出感度、測定精度、再現性、試験系の安全性、経済性などの観点から Ames 法が取り上げられつつある。この Ames 法およびその変法(プレインキュベーション法、マイクロサスペンション法など)を概説し、さらに迅速手法としての遺伝子損傷試験の一つである *umu* テストの最近の動向について概説した。

1. はじめに

環境中へ放出される化学物質の種類や量は、大量生産、大量消費の時代を反映して、近年急速に増加している。これらの中には発がん性物質や変異原性物質などのように生体に様々な影響を及ぼす有害物質が含まれており、環境中では微量ずつ混在していると考えられる。これらの有害物質の存在実態や曝露実態および生体影響を正確に把握し対策を講ずることは、環境汚染防止の面ばかりでなくわれわれの健康を維持するうえでも極めて重要である。一方、現在われわれの死因のトップを占めている“がん”の対策研究が急速に進行し、発がんに至る細胞内の様々な変化過程が明らかになりつつある。とくに、発がんの初期過程では遺伝子損傷や遺伝子変異が深く係わることも知られている。生物の突然変異は、古くからは品種改良などに利用されてきたが、最近ではこの突然変異を引き起こし遺伝子損傷や遺伝子変異に係わる物

質(変異原性物質)の検出などにも利用されるようになってきている。また、化学物質の発がん性の有無の確認も重要となっており、その試験には実験動物(哺乳類)が用いられているが、多量の試料と多数の動物やこれに関連する多額な費用と時間を要するため、莫大な数にのぼる化学物質の発がん性検索には限りがある。このような状況下で、とくに微生物を用いる変異原性物質の検出法(変異原性試験法)が開発され、発がん性や遺伝毒性の予測の一次スクリーニング法として、薬事法、化審法、安衛法、OECD ガイドラインなどに広く採用されるようになってきている。

変異原性試験法は、上記のように短期試験法であると同時に被験試料量が少なくすむ特徴がある。また、特定の物質を測定対象とする化学分析法とは異なるバイオアッセイの一種であり、未知の有害物質や複合汚染物をトータルとして測定できる特徴もある。現在、この点を利用して、空気、

* Evaluation of genotoxicity (mutagenicity) of environmental pollution by *in vitro* bioassay.

**Sumio GOTO, Daisuke NAKAJIMA, Yuka EZOE National Institute for Environmental Studies, Research Center for Material Cycles and Waste Management ((独)国立環境研究所 循環型社会形成推進・廃棄物研究センター)

表1 変異原性と発がん性の陽性率の比較(1975, J. McCann *et al.*)³⁾

物質群	発がん性	変異原性	発がん性&変異原性
芳香族アミン	25/44	31/44	23/44
ハロゲン化アルキル	20/24	19/24	17/24
多環芳香族炭化水素	27/38	29/38	26/38
エステル, エポキシイド, カルバメート他	18/28	16/28	13/28
芳香族およびヘテロサイクリックのニトロ化合物	28/34	31/34	28/34
芳香族および脂肪族類	5/20	1/20	1/20
ニトロソアミン他	21/24	21/24	20/24
マイコトキシン	9/14	8/14	8/14
ヘテロサイクリック類	4/11	1/11	1/11
含窒素化合物類	9/13	9/13	7/13
アゾおよびジアゾ化合物	11/17	15/17	11/17
タバコ煙濃縮物	1/1	1/1	1/1
計	178/268	182/268	156/268

土壌, 河川水などの環境汚染を変異原性の面からモニターしようとする試みがある。今回はこの試験法を中心に概説する。

2. 微生物を用いる変異原性試験(Ames法)

各種変異原性試験法の中で, 突然変異の検出が簡易であり世界的にもっとも広く用いられている試験法は, カリフォルニア大学の B. N. Ames 博士が開発した Ames 法¹⁾であろう。サルモネラ菌 (*S. typhimurium* TA100, TA98 など) や大腸菌 (*E. coli* WP 2 *uvrA*/pKM101²⁾ など) を用い, 最小グルコース寒天平板培地上に出現した変異コロニーを数え, 化学物質による DNA の塩基対置換型変異やフレームシフト型変異を短期間(3~4日)で検出する方法である。また, この方法では哺乳動物(主にラット雄)の肝臓の酵素成分(S9)を加えて試験する系も含まれているため, 生体内で酵素の作用(代謝活性化)により変化した化学物質の変異原性も検出し得る系となっている。表1には, 初期に Ames らが発表した約300種類の化学物質の変異原性試験結果³⁾を物質群ごとに分けて示してある。表1から判るように, この試験では被験物質に代表的な発がん物質178種を含めていることもあり, 変異原性と発がん性の高い相関性(90%)が得られている。この方法が開発されてからこれまでに変異原性の検索された物質は莫大な数に昇っているため, 変異原性と発がん性とを検討した場合の相関性は少し低い値となってきた

が, この Ames 法はバクテリア変異原性試験法の代表的手法として定着しており, IARC(International Agency for Research on Cancer)⁴⁾や NTP(National Toxicology Program)⁵⁾などの化学物質評価の試験手法の一つに用いられている。

一方, 試験菌株の開発も盛んに行われており, 安定で使いやすい菌株や特定の物質群に対して検出を高くした菌株も出現している。国立医薬品食品研究所の能美博士らにより開発された *S. typhimurium* YG1024系株⁶⁾は, 代謝活性化酵素の産生能を高めるプラスミドを菌体内に組み込んであり, ニトロアレーン系やアミノアレーン系の化合物の変異原性検出に有力な菌株となっている。さらに, ターゲット遺伝子変異が定まった菌株も開発され, DNA 上の4つの塩基(A, G, C, T)の並び方の変化を知ることができるようなシリーズ(*S. typhimurium* TA7001~TA7006, *E. coli* WP3101P~WP3106P)^{7,8)}が開発されている。これらをセットで使用するにより変異原性物質の作用タイプが区別される。他方, ヒトの発がんに関係した遺伝子やその塩基変異タイプが知られつつあり, その塩基変異タイプと環境汚染物質の変異作用タイプとの関係から, 精度の高い環境発がんのリスク評価ができる可能性がある。

3. Ames法およびその変法による環境汚染物質の変異原性測定

これまで環境汚染の実態把握には, 主に個別の

物質の有害性データや化学分析による環境濃度が用いられてきた。しかし、実際には一般環境には多種類の有害化学物質が微量ずつ混在しているため、既存の化学分析法のみで汚染の実態を把握することは不可能に近い。また、汚染有害物質全体のもたらす健康影響については、ほとんど評価し得ない状況にある。一方、初期の変異原性試験による環境試料の測定では変異原性/発がん性物質を検索して同定することが主要なテーマであったため、多少の検出能の変動は問題がなかった。し

かし、環境モニタリングの場合では試料数が多くなり、検出能の変動の少ない試験法が必要となっており、このためいくつかの改良がなされてきている。すなわち、変異原性モニタリング手法には以下のような条件が要求される。1)環境試料の大量採取が困難であるため検出感度が高いこと、2)測定データを比較評価するための精度や再現性が高いこと、3)使用する試験系の安全性や経済性に優れること、などが要求される。これらの点を改良しつつ、空気、土壌、河川水などの環境汚染を変異原性の面からモニター⁹⁾しようとする試みがなされている。その一例として、1980年に東京で連続採取された大気浮遊粉じんの変異原性をプレインキュベーション法で測定した結果(採取月毎にまとめたもの)を図1に示してある。現在もこの傾向はあまり変わってないが、冬期に高く、夏期に低い値を示すことが判る。

現在、検出感度が比較的高く、各種試験条件や基礎的評価データの整った Ames 法^{1,10)}が上記の条件を、現在最も満足し得る変異原性試験法として挙げられる。この Ames 法(プレート法; plate incorporation assay)は諸外国で広く用いられているが、わが国ではその変法であるプレインキュベーション法¹¹⁾が主に用いられている。プレインキュベーション法は、国立がんセンター研究所の杉村博士らが開発した方法で、バクテリア懸濁液と被験物質溶液を試験管内で混合し、37°Cで20分

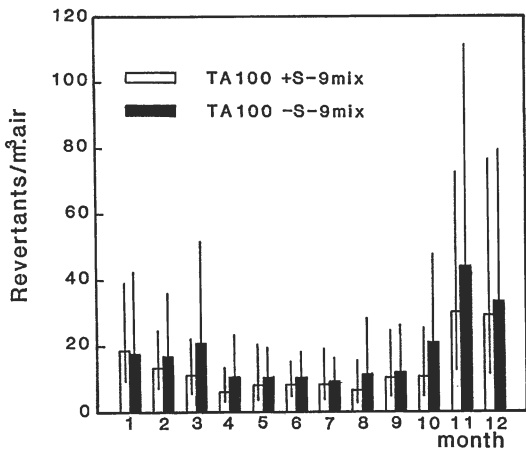


図1 1980年に連日採取された大気浮遊粉じんの変異原比活性(幾何平均値)

採取場所：東京都港区白金台 国立公衆衛生院6F屋上
試験方法：プレインキュベーション法

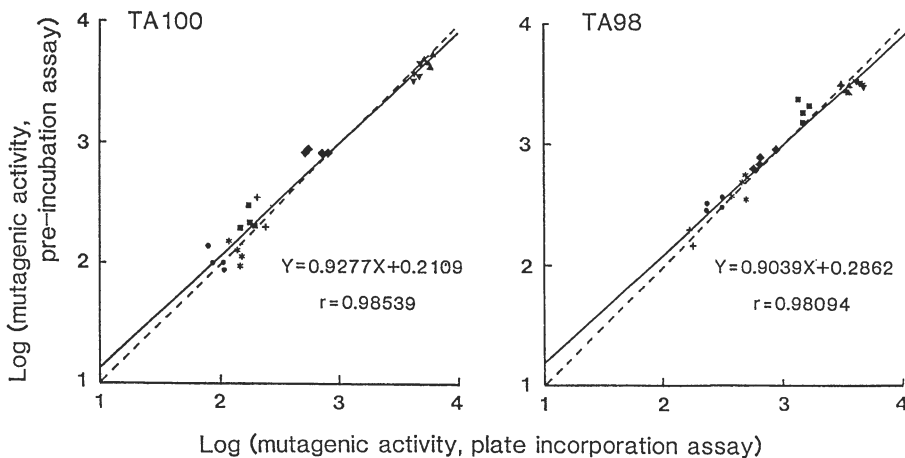


図2 プレインキュベーション法とプレート法による変異原性検出能の比較¹²⁾

*, ● 大気浮遊粉じん抽出物, ▲, ▼ デイゼル粒子抽出物, ◆ Benzo[a]pyrene, ■ Nitropyrene, + コールタール

間(または30℃で30分間)振盪反応させてからプレート上に広げる方法で、ニトロソアミン類やアルデヒド類の変異原性の検出に優れている。また、**図2**¹²⁾に示してあるように、空気浮遊粉じん試料やディーゼル排出ガス試料などの場合にはプレート法と同等の検出感度となることも知られており、どちらの試験を使用しても大きな問題はないとされている。さらにその改良がKadoらによってなされ、プレインキュベーション時の菌濃度を約10倍にして反応時間を長くすることにより約10倍高感度化するマイクロサスペンション法¹³⁾が開発されている。この方法やプレインキュベーション法とYG菌株との併用により、喫煙者の尿試料の変異原性測定^{13,14)}などが可能となっている。また、多検体の環境試料の変異原性の試験結果を評価するため共通環境汚染試料を試験ごとに測定し(内部標準試料)比較評価^{15,16)}するなどの改良がなされてきている。このような標準化に関する調査的研究が実施され試験研究機関間の変動レベルやその補正方法に関する検討もなされている¹⁷⁾。

空気、土壌、河川水の変異原性測定用としては現在、空気試料はハイボリュームエアサンプラーにより約1日採取(1000m³程度)した浮遊粉じんの溶媒抽出物、土壌試料は60メッシュ以下の土砂15gの溶媒抽出物、河川水試料はブルーレーヨン(3gまたは5g)により一日吸着捕集したものの抽出物があり、それぞれをAmes法に供している⁹⁾。

4. 遺伝子損傷試験(*umu*テスト)およびその環境汚染物質への適用

umu テスト^{18,19)}は、バクテリアを用いるDNA損傷性検出法の一つであり、菌体内で産生された酵素活性を測定し、DNA損傷性を調べる方法である。前述のAmes法のようなDNA塩基が変化した後(突然変異)の状態を検出する試験法とは若干異なっている。大阪大学の品川らにより開発された方法で、大腸菌のSOS反応に参与する*umu*遺伝子から*umu-lac*融合遺伝子を持つプラズミド(pSK1002)を構築し、これを膜透過性の優れたAmes菌株(*S. typhimurium* TA1535)に導入した株(TA1535/pSK1002)を使用するもので、菌体内に産生されたβ-ガラクトシダーゼの活性測定からDNA損傷性を見積もる機構となっており、原理的には大腸菌を用いるSOSクロモテテスト²⁰⁾と同様のものである。環境汚染物質への適用例はそれほど多くはないが、試験が数時間で済むなど迅速手法としての利点がある。さらに、Ames法のようなコロニー計数の必要が無い液体の吸光度を測定する方法であるため、試験系の縮小による高感度化が容易である。実際、系の縮小化およびそれに対応する酵素活性測定法の選択により、高感度化の検討がなされている。初期の*umu*テストでのβ-ガラクトシダーゼの活性測定には、菌株の膜の破壊操作の後に酵素基質に*o*-ニトロ-β-ガラクトピラノシドを用いて、酵素反応生成物の*o*-ニトロフェノールの吸光度を測定していたが、この

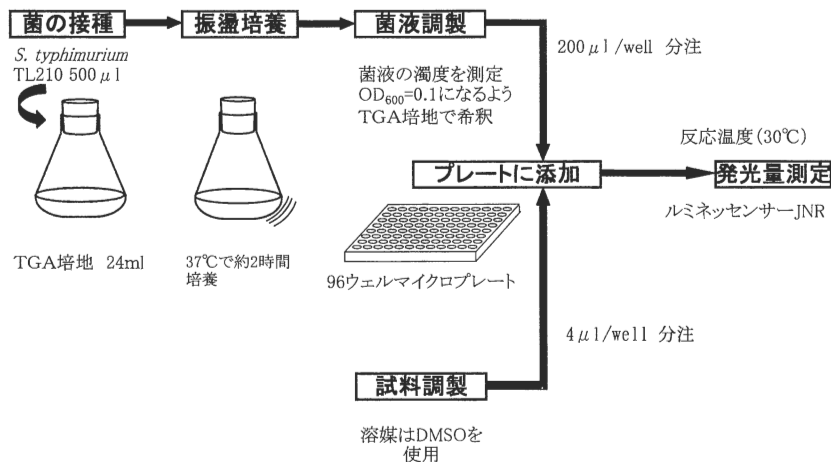


図3 発光*umu*テスト フローチャート

方法を縮小して高感度化する場合の基質には4-メチルウンベリフェリル- β -ガラクトピラノシドを用い、酵素反応生成物である4-メチルウンベリフェロンの蛍光を高感度で測定する方法²¹⁾も開発され、そのための無蛍光培地や菌株(TA1535/pSK1002GA)も作成されている²²⁾。また、さらに縮小化するための化学発光測定系の研究もなされ、その場合の基質ラクトース、化学発光に要する試薬類(グルコースオキシダーゼ、ルミノール、フェリシアン化カリウムなど)が必要となっており煩雑な方法である²²⁾。これに対して最近、発光に要する成分を菌体内で産生する新たな菌株が開発されている。すなわち、TA1535/pSK1002株のpSK1002プラスミドに発光細菌の遺伝子 *luxA-E* を組み込み、形質転換したサルモネラ菌 TL210株²³⁾であるが、S-9を加えた代謝活性化系では光(フォトン)のクエンチングの問題が残されている。試験菌株そのものが化学物質のDNA損傷作用により発光するため、試薬類がほとんど必要のない簡易化手法としての利点が備わっており今後の展開が期待される。一方、*umu* テストは前述のように液体法であるため自動化も容易である。フローインジェクション法を利用した方法²²⁾も検討されているが、菌液と試料溶液との反応条件のコントロールや安定した濃度の菌の送液方法が煩雑である。このため、現在96ウェルマイクロプレートを使用した簡易自動化試験法²⁴⁾が検討され、発光細菌 TL210株を用いた底質試料²⁵⁾やアンダーセンサンプラーで粒径別に採取した微量空気試料²⁶⁾への適用例がある。この方法では96ウェルマイクロプレートを用いる各種バイオアッセイ等で用いられているデータ解析プログラムがそのまま応用でき、dose-response 図が試験の終了直後に得られるなど、省力化の面でも期待できる。この手法の安定性や再現性などについての検討は今後の課題となるが、検出感度についてはマイクロサスペンション法と同等の印象である。

5. 環境研究への今後の展望

環境モニタリング用の変異原性試験では再現性が重要となる。とくに、環境試料では汚染実態把握のための試料数が多くなるため、一つの試験群でも数回に分けて試験し複数の試験機関で分けて

測定することなど、試験菌株の特性の維持は当然であるが、これに加えて検出感度レベルの維持が必要である。また、長期間にわたる試験については、変異原性試験用環境試料の安定な保存法も重要であるが、これらについては十分な検討がなされていない状況にある。国内や国際関連機関での検討では、試験機関間の変異原性検出の変動幅が大きい場合、標準物質(standard reference material)を利用してその変動を少なくするなどの検討がなされているが、これも十分とは言えない状況にある。今後の環境試料のモニタリングには、上記の難点の解決が重要となるが、未知の物質の測定も可能な当該変異原性試験法や特定の化合物に対応し得る高感度化学分析法などを併用した多面的な測定による汚染状況解析、ばく露要因解析、汚染源対策などが重要な課題となっていくであろう。

—引用文献—

- 1) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test, *Mutation Research*, **31**, 347-364 (1975)
- 2) 石沢実: 大腸菌 WP 2 株の改良, 変異原と毒性, **8**, 29-36 (1979)
- 3) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N., Detecting of carcinogens as mutagens in the *Salmonella/microsome* test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135-5139 (1975)
- 4) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7, Lyon, France (1987)
- 5) Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, W., Tainer, B. and Zeiger, E., *Salmonella* Mutagenicity test: II. Results from the testing of 270 chemicals, *Environmental Mutagenesis*, **8**, Suppl. 7, 1-119 (1986)
- 6) Watanabe, M., Ishidate, M. and Nohmi, T., A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes- construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella-typhimurium* strains TA98 and TA100, *Mutation Research*, **216**, 211-220 (1989)
- 7) Gee, P., Maron, D. M. and Ames, B. N., Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 11606-11610 (1994)
- 8) 太田敏博, 赤沼三恵, 石原啓美, 北陽子, 鳥村万紀, 川口泰史, 時下進一, 志賀靖弘, 山形秀夫, 大腸菌 WP2 *uvrA* 株を用いた突然変異スペクトル解析系の開発, 環境変異原研究, **20**, 75-82 (1998)
- 9) 後藤純雄, 遠藤治, 松本寛, 酒井茂克, 芥川智子, 麻野間正晴, 平山晃久, 渡辺徹志, 世良暢之, 塚谷裕子, 多田敦子, 若林敬二, 大気浮遊粒子, 河川水および土砂の変異原性モニタリング, 環境変異原研究, **22**, 45-54

- (2000).
- 10) Maron, D. M. and Ames, B.N., Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**, 173-215 (1983)
 - 11) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M., Mutagenicities of N-nitrosoamines on *Salmonella*, *Mutation Research*, **48**, 121-130 (1977)
 - 12) Goto, S., Endo, O. and Matsushita, H., Results of a comparative study on the *Salmonella* pre-incubation and plate incorporation assays using test samples from the IPCS collaborative study, *Mutation Research*, **276**, 93-100 (1992)
 - 13) Kado, N. Y., Langley, D. and Eisenstadt, E., A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine, *Mutation Research*, **121**, 25-32 (1983)
 - 14) 遠藤 治, 大久保忠利, 西村義隆, 田辺 潔, 後藤純雄, 石井忠浩, 溝口次夫, 非喫煙者の尿中変異原性の経時変化, *Environ. Mut. Res. Commun.*, **16**, 177-188 (1994)
 - 15) Matsushita, H., Endo, O., Goto, S., Shimizu, H., Matsumoto, H., Tamakawa, K., Endo, T. and Sakabe, Y., Collaborative study using the preincubation *Salmonella typhimurium* mutation assay for airborne particulate matter in Japan. A trial to minimize interlaboratory variation, *Mutation Research*, **271**, 1-12 (1992)
 - 16) 遠藤 治, 後藤純雄, 松本 寛, 麻野間正晴, 渡辺徹志, 世良暢之, 若林敬二, 都市大気浮遊粒子から抽出された共通試料の変異原性-5機関・3年間の共同研究から-, *環境化学*, **11**, 567-574 (2001)
 - 17) Claxton, L. D., Creason, J., Leroux, B., Agurell, E., Bagley, S., Bryant, D. W., Courtois, Y. A., Douglas, G., Clare, C. B., Goto, S., Quillardet, P., Jagannath, D. R., Kataoka, K., Mohn, G., Nielsen, P. A., Ong, T., Pederson, T. C., Shimizu, H., Nylund, L., Tokiwa, H., Vink, G. J., Wang, Y. and Warshawsky, D., Results of the IPCS collaborative study on complex mixtures, *Mutation Research*, **276**, 23-32 (1992)
 - 18) 小田義光, 中村清一, 沖岩四郎, 中田篤男, 品川日出男, umu-lac 融合遺伝子を用いた環境変異原の短期検索法 (umu-テスト) について, *環境変異原研究*, **6**, 87-92 (1984)
 - 19) Oda Y, Nakamura S, Oki I, Kato T, Shinagawa H, Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Research*, **147** 219-229 (1985)
 - 20) Quillardet, P., Huisman, O., D'ari, R. and Hofnung, M., SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5971-5975 (1982)
 - 21) 後藤純雄, 加藤幸彦, 遠藤 治, 山内恒幸, 松下秀鶴, 蛍光検出法を用いる umu 試験法の高感度化-マイクロ umu 試験-, *大気汚染学会誌*, **23**, 123-127 (1988)
 - 22) 松下秀鶴, 後藤純雄, 田辺 潔, 遠藤 治, 環境中の変異原物質の高感度簡易検出法の開発に関する研究, 昭和62年環境保全成果集, **18**, 1-7 (1987)
 - 23) 今枝孝夫, 平井正名, 発光遺伝子群, lux A-E を利用した umu テストの簡便・迅速・高感度化, 第24回日本環境変異原学会大会要旨集, p79 (1995)
 - 24) McDaniels, A. E., Reyes, A. L., Wymer, L. J., Rankin, C. C. and Stelma, G. N. Jr., Comparison of the *Salmonella* (Ames) test, umu tests, and the SOS chromotests for detecting genotoxins, *Environmental and molecular Mutagenesis*, **16**, 204-215 (1990)
 - 25) 棚田京子, 後藤純雄, 門上希和夫, 平井正名, 今枝孝夫, 鈴木 學, 発光 umu 試験法の開発と底質および土壌への適用, *環境化学*, **11**, 841-848 (2001)
 - 26) Nakajima, D., Ezo, Y., Goto, S., Sugita, K., Endo, O., Mineki, S. and Ishii, T., Modification of umu test using bioluminescent bacteria and application to suspended particulate matter, *Proceedings of International Workshop on Environmental Problems in East Asia*, 221-226 (2002)