Keyword phrases

anionic surfactant; determination of sodium alkylsulfate as 3, 5-dinitrobenzoate derivatives; separation by

high-performance liquid chromatography; sodium alkylsulfate in river water and detergent.

スクアレンの酸素吸収とその 20-メチルコラントレン及び 3,4-ベンゾピレンの変異原性に及ぼす効果

今枝 一男, 大沢 敬子, 横田 貴史*[®]

(1981 年 8 月 5 日受理)

ステロイドの前駆物質であるスクアレンに発がん性物質としてよく知られた 20-メチルコラントレン (MC),あるいは 3,4-ベンゾピレン {B(a)P} を添加し経時的に紫外線照射下の酸素吸収量の測定を行った。又,酸素吸収実験に供した試料を経時的にサンプリングし,発がん性物質の第一次スクリーニング法としては用いられるエームスアッセイを行い両実験結果につきその相関関係を検討した。

その結果スクアレンに添加した MC, B(a)P の変異原性の消失はスクアレンと発がん性物質と酸素の共存下に起こり,更に酸素吸収量が大きいものほど顕著であることが分かった。

1 緒 言

スクアレンは性ホルモン, コレステロールなどステロイドの前駆物質として周知の物質である。

Sobel らはスクアレンに 20-メチルコラントレン (MC) を添加しラットの背中に塗布して皮膚がんを発生させる実験において,添加後短期間のものを塗布するとがんは生ずるが長期間大気中に放置したものの塗布では発がんさせないと報告している¹⁾。又,スクアレン中で 3,4-ベンゾピレン {B(a)P} の分解が速やかに起こり,その際トコフェロールの存在で分解が著しく遅延すると報告している²⁾。

著者らは物質の大気中における安定性などについて酸素吸収測定法を用いて報告を行ってきた^{3)~5)}。今回は発がん性消失の原因探究手段として酸素分析を結びつけ実験を行った。すなわち,スクアレンに MC, B(a)P を添加時の酸素吸収量の測定結果を発がん性と近似の変異原性の動向と対比し,両者の相関について検討した。変異原性検出の手段としては発がん性物質の第一次スクリーニング法としては用いられているエームスアッセイを用いた^{6)~13)}。その結果二,三の知見を得たので報告する。

2 試料, 試薬及び装置

2.1 試料及び試薬

試料はスクアレン (海洋牧場及び東京化成工業), スクアラン (半井化学薬品), 発がん性物質として MC (Sigma 社), B(a)P, 酸化防止剤として DL- α -トコフェロール (以上半井化学薬品), 酸化促進剤としてナフテン酸鉄 (III) 5% (日本化学産業) を用いた。試薬はジメチルスルホキシド (DMSO), リン酸二水素ナトリウム, リン酸水素二ナトリウム (以上和光純薬工業), β -ニコチンアミドアデニンジスクレオチドリン酸 (還元型, ナトリウム塩) (β -NADPH, オリエンタル社), D-グルコース-6-ホスフェート (Sigma 社), L-ヒスチジン塩酸塩 (日本理化学薬品), ポリ塩化ビフェニル (Cl 48%) (PCB, 東京化成工業), フェノバルビタールナトリウム塩 (PB-Na 塩, 三晃薬品), Bacto-Agar, Nutrient-Broth (以上 Difco Lab.) などを用いた。スクアレン, スクアラン, ナフテン酸鉄, Nutrient-Broth, PCB, β -NADPH 以外はいずれも特級品を用いた。

2.2 装 置

酸素直接定量装置は三田村理研製のものを用い, 試料 1 mg 前後で測定できる電量法による。分析所要時間は 15 分であり, 精度は $\pm 0.30\%$ 以内である。

酸素吸収測定はワールブルグ検圧計を改良し製作した誘導期測定計⁵⁾を用いた。

* 星薬科大学: 東京都品川区荏原 2-4-41

3 実験方法

3.1 酸素吸収測定

内径 20 mm, 内容量 13.18 ml のガラス製セル中に試料 1 g を精密に量りとり石英板でふたをする。次いでセルとガラス製吸収管をテフロン管で接続する。これを 10 W 殺菌灯 (最大波長 254 nm) 下 15 cm の距離に試料が位置するように生体温度 37°C に温度設定した恒温槽中に浸す。導入口より酸素を送りセル内を酸素に置換した後紫外線照射する。試料の酸素吸収に伴い恒温槽の水が吸収管内に浸入するので、この浸入の長さを経時的に測定し酸素吸収量に換算する。ヨウ素滴定法により紫外線量を測定した結果、室温 25°C, 蛍光灯下 1.7 m に放置したものと本実験条件下のものと比較すると、120 倍の差が認められた。なお、本実験の試料、試薬、器具及び装置などはすべて無菌処置を施し、操作も無菌的に行った。

3.2 エームスアッセイ

エームスアッセイは矢作の方法に準じて行った¹⁴⁾。試料は酸素吸収実験に供したものを一定時間ごとにサンプリングして使用し、菌株はサルモネラ系の TA 100 を用いた。又、矢作は試料 100 μ l で行っているが、スクアレン中に添加した発がん性物質は菌懸濁液に直接には溶解しにくいので、DMSO を溶媒として加え、試料 75 μ l, DMSO 50 μ l 全量 125 μ l とした。又、ミキサーで約 10 秒間振とう混合することとした。

MC, B(a)P は酵素により代謝されて初めて変異原性をもった発がん性物質となる。微生物ではこの代謝酵素を欠くものが多いためエームスアッセイでは別途これを加える必要がある。本実験では PCB 及び PB-Na 塩により酵素誘導を行ったラット肝臓ホモジネート 9000 g 遠心分離上清を混じて調製した S-9 mix 液を加えた (+S-9)。対照には S-9 mix 液の代わりにナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えた (-S-9)。エームスアッセイの結果は、内径 9 cm のシャーレの reversion assay 用の培地上に生えたヒスチジン非要求性 (His⁺) に復帰変異したコロニー数を変異原性の指標として、1

検体につき +S-9, -S-9 とともに各々二つの培地上に生えたコロニー数で示した。

4 結果及び考察

4.1 スクアレンの酸素吸収及び変異原性の有無

スクアレン、スクアランを試料として酸素吸収を行い、すべての実験のコントロールとして変異原性の有無を検討した。

酸素吸収量の測定は、スクアレン、スクアラン各々 1.000 g を試料として 48 時間にわたり 1 時間ごとの経時的な測定を行った。スクアレンは酸素吸収量は極めて大きく、二重結合 6 個を有する不安定な物質である。一方スクアランはスクアレンに水素を飽和添加した安定な化合物であり、酸素吸収はほとんどなかった。

エームスアッセイはスクアレンについては 0, 12 時間目、24 時間目、36 時間目、48 時間目、スクアランは 0, 48 時間目のものを吸収セル中よりサンプリングして行った結果を Table 1 に示す。これよりスクアレン、スクアランは紫外線照射前後ともに TA 100 を用いてエームスアッセイを行った限りでは変異原性をもたないことが分かった。

4.2 MC, B(a)P 添加時の酸素分析及び変異原性の動向

MC を 0.1 % スクアレンあるいはスクアランに添加しその 1 g を試料として、紫外線照射した際の 48 時間にわたる酸素吸収測定の結果を Fig. 1 の (1) に、又、12 時間ごと又は 24 時間ごとにサンプリングしたものにつき酸素直接定量を行った結果を Fig. 1 の (2) に示す。又、エームスアッセイを行った結果を Table 2 に示す。更に、B(a)P を 0.01 % スクアレンあるいはスクアランに添加して同様の実験を行った結果を Fig. 2 の (1), (2) 及び Table 3 に示す。

酸素吸収量はスクアレンのみのものに比べ紫外線照射 48 時間目の時点で、MC 添加では 0.75 倍、B(a)P 添加では 0.50 倍に酸素吸収が抑えられた。スクアランに MC あるいは B(a)P を添加したものでは酸素吸収はほとんどなかった。

Table 1 Effect of irradiated squalene and squalane on His⁺ revertant colonies in Ames assay

Sample		Time (h)				
		0	12	24	36	48
Squalene	+S-9	218, 160	194, 171	125, 43	164, 69	224, 108
	-S-9	171, 154	128, 118	—, —	43, —	70, 50
Squalane	+S-9	230, 194	—	—	—	206, 160
	-S-9	116, 38	—	—	—	21, 7

Table 2 Effect of squalene and squalane in which 0.1 % MC is added under UV irradiation on His⁺ revertant colonies in Ames assay

Sample		Time (h)				
		0	12	24	36	48
Squalene+MC	+S-9	922, 830	632, 486	470, 284	283, 243	145, 107
	-S-9	322, —	322, 22	191, —	110, —	16, 11
Squalane+MC	+S-9	962, 950	—	838, 834	—	984, 844
	-S-9	230, 225	—	—, —	—	—, —

Table 3 Effect of squalene and squalane in which 0.01 % B(a)P is added under UV irradiation on His⁺ revertant colonies in Ames assay

Sample		Time (h)				
		0	12	24	36	48
Squalene+B(a)P	+S-9	924, 844	364, 324	285, 210	236, 152	231, 197
	-S-9	271, 236	314, 212	198, 130	84, 10	113, 57
Squalane+B(a)P	+S-9	936, 770	—	754, 516	—	850, 656
	-S-9	283, 202	—	306, 274	—	234, 229

Fig. 1 Oxygen uptake and oxygen analysis of squalene and squalane in which 0.1 % MC is added under UV irradiation

(1) Oxygen uptake; (2) Oxygen analysis; A : Squalene; B : Squalene+MC; C : Squalane+MC

Fig. 2 Oxygen uptake and oxygen analysis of squalene and squalane in which 0.01 % B(a)P is added under UV irradiation

(1) Oxygen uptake; (2) Oxygen analysis; A : Squalene; B : Squalene+B(a)P; C : Squalane+B(a)P

酸素直接定量の結果は、酸素吸収実験の結果と非常に密接な相関が認められた。

エームスアッセイの結果は、スクアレンに添加したものでは MC, B(a)P とともに紫外線照射時間の増加に従い変異原性は速やかに減少した。スクアランに添加したものでは変異原性の減少はほとんどみられなかった。

MC, B(a)P の添加濃度は、エームスアッセイの実験を至適濃度で行うため種々の濃度で検討を行った結果、MC は 0.1 %, B(a)P は 0.01 % と決め、以後すべてこの添加濃度で行った。

4.3 酸化促進及び抑制下における変異原性の動向

スクアレンに MC を 0.1 % 添加したものに更に酸化促進剤としてナフテン酸鉄を 0.1 % 添加したもの、あるいは酸化抑制剤としてトコフェロールを 0.1 % 添加した場合の酸素吸収測定の結果を Fig. 3 に示す。又その際のエームスアッセイの結果を Table 4 に示す。更に、スクアレンに B(a)P 0.01 % 添加したものに同様にナフテン酸鉄あるいはトコフェロール添加した場合の結果を Fig. 4, Table 5 に示す。

Fig. 3, 4 で明らかなように、ナフテン酸鉄を添加した場合の酸素吸収は促進され、又 Table 4, 5 に示した

Table 4 Effect of squalene in which 0.1 % MC and 0.1 % tocopherol or naphthex Fe are added under UV irradiation on His⁺ revertant colonies in Ames assay

Sample		Time (h)				
		0	12	24	36	48
Squalene + MC + Naphthex Fe	+S-9	918, 884	550, 442	292, 220	254, 157	174, 63
	-S-9	440, 318	282, —	227, —	293, —	52, 10
Squalene + MC	+S-9	922, 830	632, 486	470, 284	283, 243	145, 107
	-S-9	322, —	322, 22	191, —	110, —	16, 11
Squalene + MC + Tocopherol	+S-9	868, 627	522, —	787, 722	622, 492	418, 366
	-S-9	356, 248	—, —	388, 254	392, 358	339, 136

Table 5 Effect of squalene in which 0.1 % B(a)P and 0.1 % tocopherol or naphthex Fe are added under UV irradiation on His⁺ revertant colonies in Ames assay

Sample		Time (h)				
		0	12	24	36	48
Squalene + B(a)P + Naphthex Fe	+S-9	452, 404	381, —	301, 184	—	164, 65
	-S-9	291, 148	25, 3	73, 20	—	24, —
Squalene + B(a)P	+S-9	924, 844	364, 324	285, 210	236, 152	231, 197
	-S-9	271, 236	314, 212	198, 130	84, 10	113, 57
Squalene + B(a)P + Tocopherol	+S-9	618, 446	—	—	442, 380	334, 223
	-S-9	123, 65	—	—	155, 103	310, 245

Fig. 3 Oxygen uptake of squalene in which 0.1 % MC and 0.1 % tocopherol or naphthex Fe are added under UV irradiation

A : Squalene; B : Squalene + MC + Naphthex Fe; C : Squalene + MC; D : Squalene + MC + Tocopherol

Fig. 4 Oxygen uptake of squalene in which 0.01 % B(a)P and 0.1 % tocopherol or naphthex Fe are added under UV irradiation

A : Squalene; B : Squalene + B(a)P + Naphthex Fe; C : Squalene + B(a)P; D : Squalene + B(a)P + Tocopherol

ように, MC, B(a)P いずれの場合も変異原性は速やかに消失した. トコフェロール添加では酸素吸収は著しく抑制され, 変異原性の消失は大幅に遅延された.

4.4 MC, B(a)P の酸素吸収及び, これを未照射スクアレンに添加したときの変異原性の動向

MC, B(a)P 20 mg を吸収セルの底に広げるようにひょう取して酸素吸収測定を行ったところ, MC, B(a)P ともに酸素吸収はほとんどなかった. これを経時的にサンプリングして, MC は 0.1 %, B(a)P は 0.01 % の割合に未照射のスクアレンに添加したものにつきエームスアッセイを行ったところ, 変異原性の消失は認められなかった.

4.5 スクアレン紫外線照射後 MC, B(a)P 添加したときの変異原性の動向

紫外線照射したスクアレンに MC, B(a)P を各々 0.1 %, 0.01 % 添加したものにつきエームスアッセイを行ったところ, 変異原性に変化は認められなかった.

この実験は, スクアレン中に添加された発がん性物質の DMSO を溶媒とする菌懸濁液水層中への転層率が, スクアレンの質的变化で減少するための変異原性消失ではないことを明らかにするために行ったものである.

4.6 窒素置換下における変異原性の動向

スクアレンに MC, B(a)P をそれぞれ 0.1 %, 0.01 % 添加したものを試料として, 吸収セル内を窒素置換し紫外線照射したものにつきエームスアッセイを行ったところ, 変異原性の消失は認められなかった.

以上より酸素が変異原性の消失に重要な関係があると考えられる. 紫外線照射下で酸素と反応したスクアレ

ンと発がん性物質の反応については、酸素吸収の初期{(8~10)時間目}に-S-9でのコロニー数の増加する現象が認められた。このことは代謝の過程と類似の酸化反応が起こっていることを示す結果とみられる。MC, B(a)P 自体は4・4で述べたように酸素と直接反応しにくいことから、スクアレンがこれらの酸化を促進させる作用を有することが考えられる。以上の結果について、MC, B(a)Pの構造変化やスクアレン及び酸素との反応などについての理論的考察は、今後更に検討してゆくつもりである。

5 結 言

スクアレンに MC, B(a)P を添加し、その酸素吸収測定と発がん性の関係は、酸素吸収量が大きいほど変異原性の消失は顕著であった。

本研究にあたり、スクアレンを提供して下さいました海洋牧場(株)会長金子利朗氏、羽根秀行氏に深謝いたします。又、実験に協力された小川房子、北村典子、西川昭彦、堀真由美、矢崎恵子の諸氏に深謝します。

(1980年10月、日本分析化学会第29年会、1981年4月、日本薬学会第101年会において一部発表)

文 献

- 1) H. Sobel, J. Marmorston : *Cancer Res*, **16**, 500 (1956).
- 2) H. Sobel, J. Marmorston : *Nature*, **174**, 553 (1954).
- 3) 今枝一男, 大沢敬子, 吉村吉博 : 分化, **27**, 223 (1978).
- 4) 今枝一男, 大沢敬子, 吉村吉博 : 分化, **28**, 173 (1979).
- 5) 今枝一男, 大沢敬子, 吉村吉博 : 分化, **29**, 426 (1980).
- 6) B. N. Ames, E. G. Gurney, J. A. Miller, H. Bartsch : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 3128 (1972).
- 7) B. N. Ames, W. E. Durston, E. Yamasaki, F. D. Lee : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2281 (1973).
- 8) B. N. Ames : "Principles and Methods for Their Detection", Edited by A. Hollaender, Vol. 1, 267 (1971), (Plenum Press, New York).
- 9) B. N. Ames, F. D. Lee, W. E. Durston : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 782 (1973).
- 10) W. E. Durston, B. N. Ames : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 738 (1974).
- 11) L. D. Kier, E. Yamasaki, B. N. Ames : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4159 (1974).
- 12) J. McCann, N. E. Spingarn, J. Kobori, B. N. Ames : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 979 (1975).
- 13) B. N. Ames, H. O. Kammen, E. Yamasaki : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 2423 (1975).
- 14) 矢作多貴江 : 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178 (1975).

☆

Oxygen uptake of squalene and its effect on the mutagenicity of 20-methylcholanthrene and 3,4-benzo(a)pyrene. Kazuo IMAEDA, Keiko OHSAWA, and Takashi YOKOTA (Hoshi College of Pharmacy, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo)

The present investigation was undertaken to study the effect of squalene on mutagenicity of carcinogens by examining the relation between the oxygen uptake of squalene containing 20-methylcholanthrene (MC) or 3,4-benzo(a)pyrene {B(a)P} under ultraviolet irradiation and the results of Ames assay. MC and B(a)P were added to squalene at concentrations of 0.1% and 0.01%, respectively, and the mixtures were used as test samples. The oxygen uptake of a test sample was determined in an absorption cell under an oxygen atmosphere at 37°C by 10-W UV light irradiation from a distance of 15cm. Ames assay and direct determination of oxygen were carried out on the other test samples. As a result, squalene itself was found to be unstable for absorption of oxygen with ease and to have no mutagenicity. However, the mutagenicity of MC or B(a)P added to squalene diminished as time passed for absorption of oxygen by squalene. The rate of disappearance of the mutagenicity became faster by the addition of a pro-oxidant and slower by an antioxidant.

(Received Aug. 5, 1981)

Keyword phrases

oxygen uptake of squalene containing a carcinogen; mutagenic diminishment by Ames assay; relationship between oxygen determination and mutagenicity test.