インピンジャーを用いた揮発性化合物の 変異原性簡易測定法について

後藤 純雄¹⁾, 大久保 忠利²⁾, 渡辺 悦夫²⁾, 遠藤 治¹⁾
望月 宏明¹⁾, 溝口 次夫¹⁾, 峯木 茂³⁾
田辺 潔⁴⁾, 松下 秀鶴⁵⁾

¹⁾国立公衆衛生院 地域環境衛生学部 (〒108 東京都港区白金台4-6-1)

²⁾東京水産大学 食品生産学科 (〒108 東京都港区港南 4-5-7)

³⁾東京理科大学 理工学部 (〒278 千葉県野田市山崎 2641)

⁴⁾国立環境研究所 化学環境部 (〒305 茨城県つくば市小野川16-2)

⁵⁾静岡県立大学 生活健康科学研究科 (〒422 静岡県静岡市谷田52-1)

[平成6年6月27日受理]

Mutagenicity Detection Method for Volatile Compounds Using Plural Impinging Exposure System

Sumio GOTO¹⁾, Tadamichi OHKUBO²⁾, Etsuo WATANABE²⁾, Osamu ENDO¹⁾
Hiroaki MOCHIZUKI¹⁾, Tsuguo MIZOGUCHI¹⁾, Shigeru MINEKI³⁾
Kiyoshi TANABE⁴⁾ and Hidetsuru MATSUSHITA⁵⁾

¹⁾National Institute of Public Health (4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108)

²⁾Tokyo University of Fisheries (4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108)

³⁾Science University of Tokyo (2641, Yamazaki, Noda, Chiba 278)

⁴⁾National Institute for Environmental Studies (16-2, Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305)

⁵⁾University of Shizuoka (52-1, Yada, Shizuoka, Shizuoka 422)

[Received June, 27, 1994]

Summary

As a part of study to evaluation of mutagenicity of air pollutants, a mutagenicity detection method for volatile compounds was examined. The umu test procedure employing *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 strain was used in this exposure test system. The trapping bacterial solution in three impinging tubes were exposed to typical volatile mutagens.

The mutagenicities of propylene imine and benzonitrile were clearly recognized with the assay system. It was also found that the mutagenicity of hydrophobic compounds, such as benzonitrile, could be estimated according to this plural impinging method.

Keywords: mutagenicity, volatile compounds, impinging method, umu-test

1. はじめに

環境空気は多種多様な化学物質で汚染されており、これらの物質は粒子状またはガス状で存在している。粒子状物質についてはその変異原性測定法が比較的多く検討されており、また、その採取法や変異原性測定法、モニタリングのための規格化等も手掛けられている。一方、ガス状物質の変異原性測定についての研究は、Ames法に用いるプレートに菌を塗布して被験ガスに曝露する方法^{1,2)}、枯草菌の孢子に被験ガスを曝露する方法^{3,4)}、菌液に被験ガスを導入する方法^{5,6,7)}など若干行われているものの、未だ定性的手法にとどまっており、一般空気への適用が困難な状況にある。そこで、今回はガス状癌・変異原物質に関する研究の一環として、測定に要する時間が数時間と短く、DNA損傷性検出法の一つであるumu試験法^{8,9)}を取り上げ、ガス状物質の変異原性簡易測定法を作成すべく、その基礎的検討を行った。

2. 実験方法

2.1 試薬

菌株の培養には、Bacto-Tryptone (Difco Labo. 製)、NaCl (国産化学製)、Glucose (国産化学製) 及び Ampicillin (東洋醸造製) で調製したTGA培地を用いた。

Z緩衝液は、特級 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、特級 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、特級 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (いずれも国産化学製)、特級KCl (和光純薬工業製) 及び β -Mercaptoethanol (東京化成工業製) で調製して用いた。

β -galactosidase活性の測定には、その基質として o -Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG: 東京化成工業製) を用いた。

S9mixは、Amesらの方法¹⁰⁾にしたがって、PCB (KC-500) で酵素誘導したSprague-Dawley系雄ラット肝から分画したS9と補酵素類であるCofactor-I (オリエント酵母製) を用いて調製した。

揮発性被験試料には、Benzotrichloride, Propylene imine 及びN-Nitrosodiethylamine (いずれも東京化成工業製) の特級品を用いた。

2.2 umu試験

試験菌株には *Salmonella typhimurium* TA1535 に $\text{umuC}^+ \text{-lacZ}^-$ 融合遺伝子をもつプラスミド pSK1002 を導入した菌株 TA1535/pSK1002⁸⁾ を用いた。umu試験は小田らの方法^{8,9)} に順じ、Fig. 1 に示す方法で実施した。即ち、TA1535/pSK1002株を10時間、70rpmで振盪培養し、これを遠心分離して上澄み液を新しいTGA培地と交換し、600nmにおける吸光度が約0.1になるように希釈した菌液を試験に用いた。被験物質と希釈菌液とを2時間反応させた後、生菌数補正のための吸光度測定

(600nm) と SOS 反応により生成した β -galactosidase活性の測定を行った。

β -galactosidase活性は、上記反応溶液 (0.2ml) にZ緩衝液 (2 ml)、ONPG 溶液 (0.2ml) を順次加え、これを37℃で20～30分間反応させた後、分解生成した o -Nitrophenolの吸光度 (420nm) をCary219型分光光度計 (Varian 製) を用いて測定した。

2.3 ガス曝露 (バブリング) 装置

菌に被験物質を曝露するためFig. 2に示す装置を作成した。即ち、容量10mlのインピンジャー3本を直列に連結したものに2個のフィルターホルダー及びミニポンプ (MP-15CF, 柴田科学機械工業製) を接続した。このフィルターホルダーには被験ガス中の粒子状物質 (ミスト) を除去するための石英繊維フィルター (25mm ϕ , Pallflex 2500QAT-UP) をセットした。各インピンジャーの中には前述の菌液3ml (代謝活性化の必要な場合は、菌液1.5mlとS9mix 1.5mlの混合液) を予め分注しておき、被験ガスは流速約50ml/minで30分間導入した。なお、今回用いたTA1535/pSK1002株は紫外線感受性であるため、曝露装置全体を黒いビニール袋で覆って遮光し、試験を行った。

3. 結果及び考察

3.1 試験条件の検討

S9mixを添加しなくても変異原性を示す揮発性物質であるPropylene imineを用いて、菌体内のSOS反応による β -galactosidaseの生成条件など試験条件に関する検討を行った。

Fig. 2に示したガス曝露 (バブリング) 装置の先端に、更に1本のインピンジャーを取り付け、マイクロシリンジ (Hamilton 製) を用いてこのインピンジャー底にPropylene imineを0.8 μ l分注した。装置に取り付けてあるミニポンプを吸引流速約50ml/minで稼働して、Propylene imineを室温で気化させ、3本のインピンジャー内の菌液に順次導入し30分間曝露した。曝露後のインピンジャー (菌液) を37℃の恒温槽に入れて2時間及び4時間振盪培養した。恒温槽に入れなかったものも比較のため実施し、培養時間は0とした。なお、測定誤差を少なくするため、4時間、2時間、0時間培養の順で2時間間隔で測定を行った。

2度の試験から得られた結果をTable 1に示す。この表から、バブリング終了後すぐに測定した場合 (0時間振盪培養) では、空気のみを流した菌液 (コントロール) とPropylene imineを曝露した菌液の変異原性に殆ど差が認められなかった。しかし、2時間あるいは4時間振盪培養した場合、両者にその差がはっきり認められるようになり、Propylene imineを曝露した菌液については

Fig. 1 Procedure of the impinging method.

Fig. 2 Gas-exposure device to bacterial solution.

Table 1 Effects of incubation time after the gas exposure on the mutagenic activity of propylene imine

Test no.	Incubation Time (hr)	Enzymatic activity ($\times 10^{-2}$ units/ml)	
		Air(control)	Propylene imine($0.8 \mu\text{l}$)
1	0	1.32	1.03
	2	3.54	6.33
	4	4.57	11.47
2	0	2.61	2.35
	2	7.00	12.76
	4	8.70	18.18

2時間よりも4時間振盪培養のほうが高い変異原活性を与えることが認められた。これらの結果から、菌の増殖期間が変異原活性に大きな影響を与えており、パブリック終了後には2時間から4時間の振盪培養が必要であること、被験ガスを含まない空気を同時間同流量導入した菌液をコントロールとして常に用いる必要があることなどが判った。

3. 2 Propylene imine, N-Nitrosodiethylamine 及び Benzotrichloride の変異原性測定結果

3.1 で得られた試験法を Propylene imine, N-Nitrosodiethylamine 及び Benzotrichloride の変異原性測定に適用した。なお、各被験試料はそれぞれ 1, 0.5, 0.25, 0.1 及び $0 \mu\text{l}$ と変化させてインピンジャー底に塗布して試験し、曝露後の振盪培養は2時間とした。なお、Propylene imine, N-Nitrosodiethylamine 及び Benzotrichloride の $1 \mu\text{l}$ はそれぞれ 20°C で 810, 940 及び $1380 \mu\text{g}$ である。

Fig. 3 には、3.1 の手法の検討に用いた沸点 66.5°C で揮発性物質の Propylene imine の試験結果を示してある。この図から、Propylene imine の変異原性は 1 本目のインピンジャーで検出され、 $1 \mu\text{l}$ でコントロールの2倍以上の約 0.05 (units/ml) の β -galactosidase 活性を与え、

Fig. 3 Dose-response curves of propylene imine for TA1535/pSK1002 using the impinging method.

Test were done under the dark
Exposure time : 30min., Flow rate : 50ml/min.

Incubation time after the exposure : 2hr
□ : impinger A, △ : impinger B, ○ : impinger C

良好な dose-response 曲線を示すことが認められた。2 本目以降のインピンジャーの菌液からは β -galactosidase 活性の上昇は殆ど認められず、むしろ若干低下する傾向が認められた。これらの結果から、Propylene imine は水に易溶なためインピンジャー 1 本でその変異原性測定が可能であることが判った。

Fig. 4 には、沸点が175~177℃で、S9mix を添加し代謝活性化してはじめて変異原性を示す N-Nitrosodiethylamine の試験結果を示してある。この図から、1 本目のインピンジャーに β -galactosidase 活性の上昇が認められたが、N-Nitrosodiethylamine の添加量を 0.5 μ l および 1 μ l と増加してもその活性の大きな上昇は認められなかった。この N-Nitrosodiethylamine の変異原性測定については、インピンジャー内に S9mix を直接加えていたため、バブリングによる S9mix の酵素の失活⁷⁾が起っていたことなどの影響を受けたものと考えられ、S9mix 添加方法なども含めた詳細な検討を行う予定である。

Fig. 5 には、沸点が220.8℃の Benzotrichloride の試験結果を示してある。この図から Benzotrichloride は、Propylene imine の場合と異なり、1 本目のインピンジャーだけでなく、2 本目以降のインピンジャーにも β -galactosidase 活性の上昇が認められた。この差異は、Propylene imine が比較的水溶性であるのに対し、Benzotrichloride が疎水性であることによるものと考えられた。

両者の変異原性を 1 本目のインピンジャーのみの β -galactosidase 活性で比較することは困難なため、次に Benzotrichloride の変異原性の近似値の求め方について検討した。Benzotrichloride の菌液に対する溶解度がそれぞれのインピンジャーについて一定であると仮定すると、Benzotrichloride の溶解量はインピンジャーの順に等比級数的に減少することになり、全体の溶解量は無限等比級数式(1)を用いて概算することが出来る。

$$a + ar + ar^2 + ar^3 + \dots = a/1 - r \quad (r < 1) \quad \text{式(1)}$$

Benzotrichloride の試験結果をこの式に代入して得られた見かけの β -galactosidase 活性の dose-response 曲線を Fig. 5 に破線で示してある。これらの結果から、Benzotrichloride の変異原性は Propylene imine のそれよりもかなり高いことが示唆された。

以上の検討結果から、本手法で揮発性物質の変異原性を測定するためには、 β -galactosidase 活性の減少率 (r) を求める必要があることが判った。また、そのためには最低 2 本のインピンジャーが必要となるが、実際には出来るだけ多くのインピンジャーを用い、正確な r を求めた方が良い結果を与えるものと考えられる。今回の試験では比較的殺菌性の低い物質を用いたが、化学物質の中

Fig. 4 Dose-response curves of N-nitrosodiethylamine for TA1535/pSK1002 using the impinging method. Test conditions were the same as those in Fig. 3
□ : impinger A, △ : impinger B, ○ : impinger C

Fig. 5 Dose-response curves and apparent curve of benzotrichloride for TA1535/pSK1002 using the impinging method. Test conditions were the same as those in Fig. 3
□ : impinger A, × : impinger B, ○ : impinger C, △ : apparent total value

には強い殺菌性を持つものや、環境試料のように色々な性質を持つ物質の混合物もあり、殺菌性物質トラップ→変異原性物質トラップまたは、変異原性物質トラップ→殺菌性物質トラップなどのように複数のインピンジャーを用いる利点もあると考えられる。従って、これらの手法を環境空気にも適用しよう、今後更に検討を重ね改良していく予定である。

要 旨

ガス状癌・変異原性物質に関する研究の一環として、ガス曝露（バブリング）法による揮発性物質の変異原性簡易測定法を検討した。この検討には、*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002によるumu試験法を用いた。作成した方法を用いてPropylene imine, N-Nitrosodiethylamine 及びBenzotrichlorideの変異原性を測定した結果、Propylene imine 及びBenzotrichlorideに明らかな変異原性が認められた。また、複数のインピンジャーを用いれば水溶性変異原物質ばかりでなく疎水性の変異原物質についてもその変異原性の測定が可能であることが示唆された。

引用文献

- 1) Bridges, B. A.: On the detection of volatile liquid mutagens with bacteria; experiments with dichlorvos and epichlorhydrin. *Mutat. Res.*, **54**, 367-371 (1978)
- 2) 後藤純雄, 松下秀鶴, 植松 勉, 西村哲治: ガス曝露試験法による有機ハロゲン系化合物の変異原性, 第55回日本産業衛生学会講演集, 296-297 (1982)
- 3) Tanooka, H.: Application of *Bacillus subtilis* spores in the detection of gas mutagens; a case of ethylene oxide. *Mutat. Res.*, **64**, 433-435 (1979)
- 4) Sasaki, Y., Endo, R., and Koido, Y.: Direct mutagens in the gaseous component of automobile exhaust detected with *Bacillus subtilis* spores. *Mutat. Res.*, **79**, 181-184 (1980)
- 5) Ong, T., Stewart, J., and Whong, W-Z.: A simple in situ mutagenicity test system for detection of mutagenic air pollutants. *Mutat. Res.*, **139**, 177-181 (1984)
- 6) 清水英佑, 鈴木勇司, 林 和夫: Bubblingによる揮発性物質の変異原性テスト, 日本環境変異原学会第13回大会講演要旨集, p.125 (1984)
- 7) 清水英佑: 揮発性および気体状化学物質の変異原性テストの開発に関する研究, 昭和61年度科学研究費補助金研究成果報告書, pp.1-43 (1987)
- 8) 小田美光, 中村清一, 沖岩四郎, 中田篤男, 品川日出夫: umu-lac融合遺伝子を利用した環境変異原の短期検索法について, 環境変異原研究, **6**, 87-92 (1984)
- 9) Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., and Shinagawa, H.: Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, **147**, 219-229 (1985)
- 10) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364 (1975)