ノート

[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
 衛生 化学 学
 42 (5) 429—432 (1996)

—Notes—

尿中の変異原性物質の抽出法について
 —Sep-Pak tC₁₈ とブルーレーヨンを用いた抽出法の比較—

遠藤 治,^a 関谷幸江,^b 小谷野道子,^a 関 幸雄,^b 後藤純雄,^a 松下秀鶴^c
 国立公衆衛生院,^a 北里大学,^b 静岡県立大学^c

A Comparison of Extraction Methods for Mutagens in Urine
 —Sep-Pak tC₁₈ and Blue Rayon—

OSAMU ENDO,^a YUKIE SEKIYA,^b MICHIKO KOYANO,^a YUKIO SEKI,^b
 SUMIO GOTO^a and HIDETSURU MATSUSHITA^c

National Institute of Public Health,^a 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108,
 Japan, Kitasato University,^b 1-15-1, Kitasato, Sagami-hara 228, Japan
 and University of Shizuoka,^c 52-1, Yada,
 Shizuoka 422, Japan

(Received April 18, 1996)

A comparison of two extraction methods (Sep-Pak and blue rayon) of mutagens in the urine was demonstrated using the salmonella mutagenicity test. Most of the urine extracts with Sep-Pak tC₁₈ were more mutagenic than those with blue rayon. It was suggested that the Sep-Pak extraction method was useful for the evaluation of human exposure to carcinogens/mutagens in daily life based on the mutagenic activity of the urine.

Key words — urine mutagen; extraction method; Sep-Pak cartridge; blue rayon

はじめに

生活環境における発がん関連物質の曝露実態を把握・評価するための方法作成に関連して、これまでに尿の変異原性を指標として発がん関連物質への曝露を評価する手法を中心に検討を行い、ブルーレーヨン抽出→S9 mixによる代謝活性化→YG 1024菌株による変異原性試験を組合わせた方法を用いて、喫煙や食事などの影響を明らかにしてきた。^{1,2)}しかし、ブルーレーヨンは主に環数の多い芳香族化合物を吸着するため、低沸点有機ハロゲン化合物など比較的分子量の物質には対応できない欠点が懸念された。そこで本研究では、ブルーレーヨンをういた手法の欠点を補うべく、Sep-Pak tC₁₈ カートリッジを用いる方法を取り上げ、比較検討を行った。

実験方法

1. 尿試料の調製

1-1. 尿の採取——尿は健康な男性被験者7名(喫煙者2名、非喫煙者5名)から半日—1日尿として得た。毎回全量を採取し、褐色ポリびんに集めた。蓄尿中はできるだけ冷暗所に保管し、集めた尿は抽出操作に供するまで冷蔵庫内(3°C)に保存した。

1-2. Sep-Pak tC₁₈ カートリッジによる抽出——Sep-Pak tC₁₈ Plus カートリッジは、Waters Associates 社製のもの(ベッド容量約1 ml, 充填剤量: 400 mg)を用いた。使用直前に残留農薬試験用メタノール(和光純薬工業社製)及び脱イオン蒸留水(各30 ml)を通してコンディショニングを行った。なお、コンディショニング後脱イオン蒸留水200 mlを用いて行ったブランク試験では変異原性は認

められなかった。

尿は室温に戻した後、ガラスろ過器(タイプG4)を通して不溶物を除去した。この尿(原則として200 ml)を2個連結したSep-Pak tC₁₈ Plusカートリッジに約2 ml/分の流速で通過させた。脱イオン蒸留水(50 ml)で余分な尿を流出させた後、メタノール(50 ml)を用いて吸着した物質を溶出させた。溶出液をロータリーエバポレーターを用いて約1 mlになるまで減圧濃縮した後、これを試料バイアルに移し、窒素ガスを吹き付けて溶媒を揮散させた。密栓後、調製した尿試料を変異原性試験に供するまで-80°Cで冷凍保存した。

1-3. ブルーレーヨンによる抽出——尿は室温に戻した後、常法¹⁾に従いブルーレーヨン(フナコシ製, 0.4 g×2回)による抽出を行った。抽出濃縮して調製した尿試料はSep-Pak tC₁₈法と同様に密栓した後、変異原性試験に供するまで-80°Cで冷凍保存した。

2. 変異原性試験 試験菌株は *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 及び YG 1024 株を用い、Ames 法³⁾の変法であるYahagiらのpreincubation 法⁴⁾で行った。試験はいずれもS9 mixの添加及び無添加の両条件下で実施した。なお、尿試料はジメチルスルホキシド(ルミナゾール, 同仁化学研究所製)に溶解して使用した。

代謝活性化酵素系S9 mix³⁾は、PCB(KC 500)で酵素誘導したSprague-Dawley系雄ラット肝S9と補酵素類(Cofactor-I, オリエンタル酵母製)で調製して用いた。なお、S9 mix中のS9含量は10%とした。

結果及び考察

1. Sep-Pak tC₁₈ カートリッジによる抽出物の変異原性

Fig. 1は、喫煙者の尿からSep-Pak tC₁₈ カートリッジを用いて抽出した試料の変異原性試験結果の1例を示したものである。Fig. 1から、この試料はTA 98 (+S9) 及び YG 1024 (+S9, -S9) ではコロニー数が溶媒対照の2倍以上になり明瞭な変異原性を示すこと、またTA 98 (-S9) 及び TA 100 (+S9) に対してはこの濃度範囲では溶媒対照の2倍以上には達しないものの試料濃度の増加に伴ってコロニー数が増加する傾向にあることが判る。

Table Iは、Sep-Pak tC₁₈ カートリッジを用いた変異原抽出法の再現性及びに抽出効率を検討した結果をまとめたものである。なお、試料No. 1—3は

Fig. 1. Dose-Response of Sep-Pak Extracts from a Smoker's Urine

○, TA100-S9; △, TA98-S9; □, YG1024-S9; ●, TA100+S9; ▲, TA98+S9; ■, YG1024+S9. Assay was performed with 2 plates per each dose. Each plot in the figure indicates the mean value of the 2 plates, and the variations were less than 10%.

50 mlの尿を、No. 4は200 mlの尿を抽出に供し、No. 2と3は同じ実験日に、その他は日を変えて抽出を行った。変異原性試験はすべての試料を同じ日にYG 1024を用い、S9 mix添加条件下で実施した。Table Iから、尿量にかかわらず変異原を抽出できること、2段連結した1段目のカートリッジで全体の90%近くを抽出できること、その再現性も変動係数にして約5%と、比較的良好であることがわかった。なお、抽出中に尿量が50 mlまでは順調に2段連結したカートリッジを通過するが、次第に通過速度が減少すること、また、200 mlを越えると通過が困難になることが認められた。

これらの結果から、尿量200 ml程度まではSep-Pak tC₁₈ カートリッジを用いて尿中変異原を抽出することが可能であることが明らかとなった。

2. Sep-Pak tC₁₈ カートリッジとブルーレーヨンによる抽出効率の比較

Table IIは、低沸点有機ハロゲン化合物のうち、食品の調味料として使用されるエキス中から検出され、⁵⁾ 変異原性を示す⁶⁾ ことが報告されている2,3-dichloro-1-propanol (DCP, 98%)を添加した尿に

TABLE I. Extraction Ratio of Mutagens with Sep-Pak tC₁₈

Sample	Mutagenicity ^{a)}		Extraction ratio (%) ^{b)}
	1st	2nd	
No. 1	54.9	13.1	80.7
No. 2	40.9	4.1	90.9
No. 3	46.1	5.3	89.7
No. 4	43.1	6.2	87.4
Mean	46.2	7.1	87.2
S. D.	6.1	4.0	4.53
C. V.	13.2	56.3	5.19

C.V., coefficients of variation. a) CG1024 (+S9), net revertants/ml, urine using each 50 ml for No. 1-3, and 200 ml for No. 4 of a urine sample from a male volunteer. The urine was passed over two Sep-Pak cartridges in series. "1st" and "2nd" mean the order of the cartridges. b) $\frac{1st}{1st+2nd} \times 100$.

ついて両抽出方法による尿試料の変異原性を比較した結果を示したものである。Table II から、尿そのものにはいずれの抽出法を用いても変異原性は検出されないこと、DCP を添加した尿は、ブルーレーヨンによる抽出物ではほとんど変異原性が認められないのに対し、Sep-Pak tC₁₈ による抽出物ではかなり強い変異原性が認められることがわかった。なお、純品の変異原性から推測される回収率は必ずしも良好ではなく、その原因も不明だが、DCP の標準品に

TABLE II. Mutagenicity of Urine Added with DCP

DCP ^{a)}	Extraction	Mutagenicity ^{b)}		
		Exp. 1	Exp. 2	Mean
-	Blue rayon	0	0	0
+	Blue rayon	10	12	11
-	Sep-Pak	0	0	0
+	Sep-Pak (1st)	560	590	575
+	Sep-Pak (2nd)	84	12	48

Two individual experiments (Exp. 1 and Exp. 2) were performed with different original urine. a) 2,3-Dichloro-1-propanol, adding 10 μ l/ml, urine. b) TA100 (+S9), net revertants/ml, urine.

窒素ガスを2時間連続して吹き付けても10%程度しか減少しないことを確認しているので、試料調製(濃縮)段階で失われた可能性は低いものと思われる。

Fig. 2 は、喫煙者2名及び非喫煙者5名の尿を用いて、Sep-Pak tC₁₈ 並びにブルーレーヨンの両方法による同一尿の YG 1024 に対する変異原性を比較した結果を示したものである。Fig. 2 から、S9 mix 添加条件下では喫煙者の尿はいずれの抽出法でも変異原性が認められるものの、Sep-Pak tC₁₈ 抽出物の方がブルーレーヨン抽出物より高い活性を示すこと、非喫煙者の尿では Sep-Pak tC₁₈ 抽出物で5例中1例が陽性となったが、ブルーレーヨン抽出物では5例とも陰性であることがわかった。一方、S9 mix

Fig. 2. Comparison of Mutagenic Activity of Urine Extracts between Sep-Pak tC₁₈ and Blue Rayon

A and B, smoker; C-G, non-smoker. Mutagenicity assays were performed at 3 doses with 2 plates per dose for each sample. Variations of 2 plates were less than 10%. Mutagenic activity was calculated from the dose-response using the method of least squares. The blue rayon extracts showed negative responses for YG1024-S9. ■, Sep-Pak tC₁₈; □, blue rayon.

無添加条件下においては、Sep-Pak tC_{18} 抽出物で喫煙者の1例を除いて6例が陽性となったが、ブルーレーヨン抽出物ではいずれも陰性であることがわかった。

なお、この実験に先立って行った予備実験において、ブルーレーヨンで処理した後に Sep-Pak tC_{18} で抽出した試料には変異原性が認められたが、反対に Sep-Pak tC_{18} 処理後、ブルーレーヨン抽出した試料にはほとんど変異原性が認められなかった。

一般に喫煙者尿は S9 mix 添加条件下で、YG 1024 などフレームシフト型の菌株に対して強い変異原性を示し、その主たる変異原性物質としてヘテロサイクリックアミンをはじめとする芳香族アミンなどの存在が報告されている。^{7,8)} Fig. 1 の結果も同様に YG 1024 (+S9) で最も強い変異原性が認められたことから、Sep-Pak tC_{18} 抽出物の主要変異原は芳香族アミンである可能性が高い。しかしながら S9 mix 無添加条件下や塩基対置換型の菌株である TA 100 など弱いながらも変異原性の上昇が認められており、芳香族アミン以外の変異原の存在も決して無視できないことが示唆された。

今回の協力者に対しては食事制限を行わず、採尿中の行動についても簡単なアンケートを実施したの

みで詳細な内容が不明なことから、非喫煙者尿の Sep-Pak tC_{18} 抽出物に現れた変異原性物質の由来については必ずしも明らかではない。非喫煙者のうち最も強い変異原性を示した協力者 C では1日の尿量が他の協力者の半分以下で極端に少ないことから、試料尿自体が濃縮されていたことも一因と考えられる。また2番目に強い変異原性を示した協力者 G では採尿した前日から実験室で有機ハロゲン系の溶剤を長時間(2日間で延べ20時間)使用していたことが明らかとなっており、その影響も否定できないものと思われる。

以上のように、Sep-Pak tC_{18} は、ブルーレーヨンで捕えられない含酸素有機ハロゲン化合物も含めて、かなり効率良く抽出できることが強く示唆された。しかしながら曝露評価手法への応用にあたっては不明な点もあり、今後、Sep-Pak カートリッジ充填剤の比較を行うとともに、ブルーレーヨンとの併用などについても検討する必要があると考えられる。

謝辞 本研究の一部は厚生科学研究費(がん克服戦略研究事業)によって行われたもので、関係各位に深謝いたします。

引用文献

- 1) 遠藤 治, 田辺 潔, 後藤純雄, 松下秀鶴, 衛生化学, **39**, 554 (1993).
- 2) 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, 環境変異原研究, **16**, 177 (1994).
- 3) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 4) T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, M. Okada, *Mutat. Res.*, **48**, 121 (1977).
- 5) J. Velisek, J. Davidek, J. Hajslova, V. Kubelka, G. Janicek, B. Monkova, *Z. Lebensumw. Unters. Forsch.*, **167**, 241 (1978).
- 6) 大久保忠利, 林 哲仁, 渡辺悦生, 遠藤英明, 後藤純雄, 遠藤 治, 溝口次夫, 森 康明, 日本水産学会誌, **61**, 596 (1995).
- 7) T.H. Connor, V.M.S. Ramanujam, J.B. Ward, Jr., M.S. Legator, *Mutat. Res.*, **113**, 161 (1983).
- 8) P. Einisto, T. Nohmi, M. Watanabe, M. Ishidate, Jr., *Mutat. Res.*, **245**, 87 (1990).