短 報

170 種の合成染料の遺伝毒性
 一大腸菌の SOS 反応を利用した
 変異原性試験 (umu 試験) の結果—

Results of umu Test for 170
 Chemical Dyes

Key words : dye; mutagen; SOS response; umu-test

合成染料は、その組成・構造などから変異原性あるいは発癌性を持つ可能性のあるものが多いと考えられる。事実、いくつかの染料および染料関連物質でエームス試験による変異原性が指摘されている¹⁻³⁾。しかし、現在、生産・使用されている合成染料の種類の多さに比べると変異原性・発癌性についての研究が行われた染料はそのうちのごく一部にすぎない。今回、我々は比較的良好に使用されている市販の 170 染料について umu 試験を行い染料の DNA 損傷性を調べた。

方 法

試料：繊維の染色に用いられている 170 種類の市販の合成染料を使用した。そのうち酸性染料、直接染料、分散染料、1 : 2 型の金属錯塩染料は A 社製を、反応性染料は B 社製をまた 1 : 1 型の金属錯塩染料は C 社製を用いた。染料は蒸留水に溶解して 10 mg/ml の濃度とし、これを試験系での終濃度が 400, 40, 4, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ になるよう希釈して用いた。

umu 試験： *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002 を試験菌として標準法⁴⁾を一部改変して実施した。すなわち、LB 培地（トリプトン 1%，酵母エキス 0.5%，食塩 0.5%）で 37°C、一夜培養した試験菌液を TGA 培地（トリプトン 1%，食塩 0.5%，グルコース 0.2% の溶液にアンピシリンを 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように加えたもの）に 1/50 量植菌し、37°C で OD₆₀₀ が 0.2~0.3 になるまで振とう培養した。この菌液 2 ml を試料 0.1 ml、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.3 ml を入れた試験管に分注し 37°C で 2 時間培養した。S9 による代謝活性化を行う場合には、リン酸緩衝液のかわりに 30 μl の S9 を含んだ S9 Mix 0.3 ml を加えて 2 時間培養した。培養後に試験菌液を遠沈（KUBOTA KS-4000, 3,000 rpm, 5 分）して集菌し、これを生理食塩水で 1 回洗った後、2.5 ml の生理食塩水に懸濁した。この菌液の一部で β -ガラクトシダーゼ活性を、残り

Table 1. Summary of the results obtained by umu test for 170 chemical dyes.

	No. of samples	No. of SOS-inducing dyes ¹⁾ S9(-)	S9(+)	(Total)
Acid dyes	51	3	1	(4)
Metal complex acid dyes (1:1)	11	2	0	(2)
Metal complex acid dyes (1:2)	13	8	0	(8)
Direct dyes	34	0	0	(0)
Disperse dyes	22	4	0	(4)
Reactive dyes	39	0	1	(1)
	170	17	2	(19)

1) : When β -galactosidase activity was more than 1.5-fold that of control, the dye was considered to be SOS-inducible.

菌量 (OD₆₀₀) を測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性の測定は Miller の方法⁵⁾ に準じて行った。実験は全て二連で行いその平均値を実験値とした。また、実験値がコントロール値の 1.5 倍を超えるものを SOS 反応誘導物質 (+) とし、測定点を増して再試験を行うと共に、量・反応関係を調べた。S9 および補酵素類はオリエンタル酵母社製を用い、S9 Mix の調製は矢作の方法⁶⁾ によった。

結果および考察

試験した染料は Table 1 に示した通り、酸性染料 51, 1 : 1 型の金属錯塩染料 11, 1 : 2 型の金属錯塩染料 13, 直接染料 34, 分散染料 22, 反応性染料 39 の計 170 染料である。このうち、酸性染料である Acid Blue 40, Red 138, Violet FBW, Black 109 の 4 染料は試験菌の増殖を強く抑制した。umu 試験により β -ガラクトシダーゼ活性値がコントロールの 1.5 倍以上の活性を示した染料は 19 染料であった (Table 1)。すなわち、S9 による代謝活性化を行わなかった場合、酸性染料は 3, 1 : 1 型の金属錯塩染料は 2, 1 : 2 型の金属錯塩染料は 8, 分散染料は 4 の計 17 染料が、また、S9 による代謝活性化を行った場合のみ SOS 反応の誘導性を示した染料は、酸性染料 1, 反応性染料 1 の計 2 染料であった。しかし、これらの染料による SOS 反応の誘導は全体的に弱く、 β -ガラクトシダーゼ活性値の一番高かった染料でもコントロールの 3.5 倍であった。これらの染料のうち 14 染料には明らかな量・反応関係が認められたが 5 染料の量・反応関係は不明確であった (Table 2)。

染料の種類別では 1 : 2 型の金属錯塩染料が他の染料に比べ高い比率で SOS 反応誘導性を示した。これら陽性反応を示した 1 : 2 型の金属錯塩染料は全てアゾ系染料であり、一般的にはクロム 1 原子にアゾ系酸性染料 2 分子が配位結合した構造をしている。しかし、今回試験した染料で化学構造が明らかにされている染料はなかった。一方、1 : 1 型の金属錯塩染料では 11 染料のうち 9 染料の化学構造が公表されており、それらは全てクロム 1 原子にアゾ系酸性染料 1 分子が配位結合したもので

Table 2. SOS-inducing activity of 19 chemical dyes in umu test.

Color Index Name	β -galactosidase unit ¹⁾		Dose-Response Relationship ²⁾
	experimental/control	S9(+)	
control (distilled water)	91 ± 6 ³⁾	184 ± 13 ³⁾	
AF-2 (8.02 μg/ml)	558 ± 73 ³⁾		
2-Aminanthracene (2 μg/ml)		935 ± 166 ³⁾	
Acid Yellow 73		186/110	+
Acid Black 26	148/ 94		+
Acid Black 50	155/ 97		+
Acid Brown 2	286/ 94		+
Acid Green 12 (metal complex 1:1)	331/ 96		+
Acid Black 52 (")	144/ 96		
Acid Red 317 (metal complex 1:2)	180/ 96		
Acid Orange 121 (")	217/ 96		+
Acid Brown 19 (")	223/ 96		+
Acid Brown 254 (")	224/ 96		+
Acid Blue 234 (")	175/ 96		+
Acid Black 197 (")	216/ 96		
Acid Black 155 (")	224/ 96		+
Acid Green 76 (")	186/ 96		+
Disperse Red 73	290/ 81		+
Disperse Red 143	183/ 81		+
Disperse Red 157	286/ 81		+
Disperse Violet 52	148/ 86		
Reactive Blue 147		141/ 86	

1) * Values are the means of duplicate obtained by the dose of 400 μg/ml.

2) * indicates the dyes which showed dose-response relationship.

3) * mean ± S.D.

あったが^{7,8)}, これらは SOS 反応誘導性は示さなかった。1:1型と1:2型の金属錯塩染料の SOS 反応誘導性の違いが化学構造に起因するのがあるいは他の原因によるものかはさらに検討が必要である。しかし、これらの合成染料は一般の化学試薬と異なり各製造所で独自に染料製品の基準が定められており、染料純度よりも染色性に重点を置いた製品の標準化が行われている。したがって、その純度には問題があり染料の反応中間体の混入あるいは染色助剤の添加の可能性も大きく、SOS 反応誘導性は染料分子以外の物質による可能性も否定できない。

今回、実験に用いた染料は原則的に水溶性の染料であるが、酸性染料5, 分散染料1, 1:1型の金属錯塩染料1, 1:2型の金属錯塩染料3の計10染料は高濃度(10 mg/ml)では沈澱を生じた。このうち Disperse Red 73, Acid Orange 121, Acid Red 317 の3染料は比較的高い SOS 反応誘導性を示した (Table 2)。また、培養中に濁りを生ずる染料があり (酸性染料4, 直接染料4, 1:2型の金属錯塩染料1), このような染料では β -ガラクトシダーゼ活性の測定が不正確になった。このうち1:1型の金属錯塩染料である Acid Brown 294 は比較的高い SOS 反応誘導性を示した。したがって、弱

い SOS 反応誘導性を持つ染料、溶解度が低い染料あるいは沈澱を生じ試験菌体との分離の困難な染料については試験方法の改良等さらに検討を行う必要がある。

S9 による代謝活性化を行った場合にのみ SOS 反応誘導性を示した染料は Acid Yellow 72, Reactive Blue 147 の2染料であった。これは本実験で用いたラットの代謝活性化系ではアゾ基の開裂が十分ではなかったのではないかと考えられ⁹⁾, ハムスター S9 の使用, フラビンモノヌクレオチドの添加あるいは亜二チオン酸ナトリウムによる還元などの方法も検討してみる必要があるものと思われる。

文 献

- 1) Cerniglia CE, Zhuo Z, Manning BW, et al. Mutagenic activation of the benzidinebased dye direct black 38 by human intestinal microflora. *Mutat Res* 1986; 175: 11-16.
- 2) IARC Monograph. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man; some aromatic azo compounds. IARC Lyon 1975; 8.
- 3) Prival MJ, Mitchell VD. Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster S9. *Mutat Res* 1982; 97: 103-106.
- 4) Oda Y, Nakamura S, Oki I, et al. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 1985; 147: 219-229.
- 5) Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972: 352-355.
- 6) 矢作多貴江. 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について. 蛋白質 核酸 酵素 1975; 20: 1178-1189.
- 7) 有機合成化学協会編. 新版染料便覧. 東京: 丸善, 1970.
- 8) The Society of Dyers and Colourists. Colour Index, 3rd ed. vol. 4. Bradford: The Society of Dyers and Colourists, 1971.

小坂 博, 中村清一, 杉本寛治

大阪府立公衆衛生研究所

Hiroshi KOSAKA, Sei-ichi NAKAMURA

and Kanji SUGIMOTO

Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69

Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka, 537 Japan

昭和62年11月24日受付

通信先: 小坂あて, Reprint requests to H. Kosaka