

氏名(本籍)	たかぎ　　ゆき　　ひこ 高木敬彦 (東京都)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第292号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	<b>Micro forward-mutation</b> 法の高感度化に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 金内長司 (副査) 教授 田淵清 (副査) 教授 赤堀文昭 (副査) 教授 村田元秀

### 論文内容の要旨

近年、肺癌の発症増加などに関連して大気中の汚染物質が注目され、中でも大気中の変異原物質は発癌性と相関し、遺伝毒性にも関与しているため、特に重要視されている。

一方、人の生活の大部分(80~90%)は室内で行われていることから、人の変異原物質への曝露実態を正確に把握するためには室内空気の変異原性について調査することが必要である。しかし、室内空気浮遊粒子の変異原性に関する報告はこれまで極めて少ない。その主な原因は、現在一般に使用されているAmes法などの微生物を用いた変異原性試験法の検出感度が低く、微量にしか採取することができない室内空気試料の計測には不十分なためである。したがって、少量の試料でも精度よく計測しうる高感度変異原性試験法の開発、普及が必要とされている。

最近、SkopecckらはAmes法と同等の感度をもつforward mutation法を確立した。さらに、Lewtasらはこの方法を約10倍高感度化したmicro forward-mutation法を開発し、室内空気24時間(約100 m<sup>3</sup>)サンプリング試料の変異原性測定に有効であると報告している。しかし、室内汚染は喫煙、暖房、外気の流入などによって影響され、その汚染状態は時間帯により大きく変化していると考えられる。したがって、室内空気の変異原物質による汚染実態を正確に把握するためには、経時変動も調べることができる高感度試験法の開発が必要である。

本研究では、Lewtasらのmicro forward-mutation法を改良して、相対的に約10倍高感度化したultramicro forward-mutation法を開発した。本法は20 l/minの流量で2時間(2.4 m<sup>3</sup>)採取した各種室内空気の微量試料の変異原性を測定しうることを明らかにした。

本研究の概要は次のとおりである。

#### 1. Micro forward-mutation 法の高感度化

現在、微生物を用いる変異原性試験法のうちで最も感度が高いとされているmicro forward-mutation法(Lewtas法)を基本としてその高感度化について検討した。

本研究では試験菌株としてLewtas法の*Salmonella* sp.(1) serovar typhimurium TM677株を選択、使用した。本菌株は前進突然変異による8-アザグアニン抵抗性の獲得をgenetic markerとして塩基置換

型、フレームシフト型、欠失型などあらゆる変異型を同時検出できる。そのため本菌株は被験試料が少なくてもすむ利点を有している。

本研究ではまず、変異原物質の9-アミノアクリジン被験試料として用い、Lewtas法の操作のうちで最も主要な部分である反応液（被験試料と菌液の混合液）の容量を1/10（10  $\mu$ l）、1/100（1  $\mu$ l）と少量化して、Lewtas法の検出限界を求めた。1/10量では原法（100  $\mu$ l）の場合より突然変異率の著しい低下がみられ、1/100量ではほとんど変異原性は検出されなかった。この測定値の低下は、Lewtas法で用いられている市販のバイアルの容量（4 ml）が反応液の容量に比べて相対的に大きいため、1時間の反応時間中に反応液の水分が蒸発したこと、混合が円滑に行われなかったことなどが主な原因と考えられた。

そこで、バイアルの容量をLewtas法の約1/40の100  $\mu$ l（長さ10mm、内径5mm）に縮小したガラス製容器（マイクロバイアル）を作製し、反応液量10  $\mu$ lで上記と同様の試験を行ったところ、Lewtas法（100  $\mu$ l）とほぼ同等の突然変異率とdose-response関係が認められた。したがって、このマイクロバイアルを使用することによってLewtas法の1/10（Skopeck法の1/100）の反応溶液量で変異原性の測定が可能であった。

また、次の諸点についても改良を行った。

(1) 抽出濃縮後の試料（抽出物）の溶解と溶液調整にベンゼン—エタノールの代りにジクロロメタンを使用した。ベンゼン—エタノールで溶液調整を行うと、エタノールの残留による菌への悪影響が懸念される。しかし、ジクロロメタンはベンゼン—エタノールとほぼ同等に抽出物を溶解し、ベンゼン—エタノールよりも揮発性が高いため、残留の危険性が少なく、また、溶液調整および溶媒交換の際に時間を短縮できる利点がある。

(2) マイクロバイアルの底部の中心を盛り上げ、また、これを斜めに設置して反応液を底部側壁部に集中させることによって回転混合の効率を上げた。

(3) マイクロバイアルの蓋を長さ20mm、直径5mmのテフロン製の栓に代えて気密性をよくするとともにその操作を簡便にした。

(4) 反応時間を2時間に延長し、試料と菌との反応を十分に行った。

(5) 反応後の液の希釈調整には主にPBSを用い、ピペット操作の誤差を少なくした。

以上のようにLewtas法をさらに高感度化した本法をultramicro forward-mutation法と呼称した。

## 2. Ultramicro forward-mutation法の検出感度

既知の代表的な癌・変異原物質であるベンゾ（a）ピレン（BaP）（S9mix添加系）および4-ニトロキノリン—1-オキシド（4NQO）（S9mix無添加系）を用いて、本法とLewtas法の検出感度を比較した。その結果、突然変異率がコントロール（自然突然変異率）の2倍となるバイアル当たりの必要量は、BaPについては本法で約0.02  $\mu$ g、Lewtas法で約0.2  $\mu$ g、4NQOについてそれぞれ約0.1 ng、約1.0 ngとなり、本法はLewtas法より両物質のいずれについても約10倍高感度であった。また、バイアル当りのBaP量あるいは4NQO量と突然変異率との間には両方法において良好なdose-response関係が認められた。

次に、実際の試料として、相模原市の麻布中学校舎屋上(A)、米国のワシントン郊外(B)および麻布中学校舎4階談話室（有喫煙）(C)でそれぞれ採取された空気浮遊粒子の抽出物を用い、本法とLewtas法（A試料についてはAmes法も併用した）の検出感度を比較した結果、両方法において、B試料のS9mix

無添加系で変異原性を検出できなかったことを除いて、A, B, Cの3試料とも S9 mix添加の有無にかかわらず変異原性を示し、バイアル当りの試料量と突然変異率との間に dose-response 関係が認められた。また、コントロールの2倍の突然変異率を得るのに必要な試料量は、いずれの試料についても本法は Lewtas 法の約1/10, A試料の場合、Ames 法の約1/100であった(表1)。

表1. 大気浮遊粒子(A)の溶媒抽出物の変異原性

	溶媒抽出物量( $\mu\text{g}$ )*			
	Ultramicro forward-mutation 法	Micro forward- mutation 法(Lewtas 法)	Ames 法 (preincubation)	
	TM677	TM677	TA100	TA98
+ S9mix	3	31	205	169
- S9mix	2	18	160	103

\* : コントロールの2倍の突然変異率を得るのに必要な溶媒抽出物量

これらの結果から、本法は Lewtas 法の約10倍、Ames 法の約100倍高感度であることが認められた。

### 3. Ultramicro forward-mutation 法の再現性

BaP および 4 NQO の各試料を5等分して本法の再現性を調べたところ、平均突然変異率はそれぞれ  $2.40 \pm 0.41 (\times 10^{-4})/\mu\text{g}$ ,  $9.45 \pm 1.03 (\times 10^{-4})/\text{ng}$  で、その変動係数はそれぞれ13.1%, 10.5%と比較的良好であった。また、変異コロニー数および総生菌数の測定値の変動係数は、5~6%と良好であった。

次に、相模原市の麻布大学校舎屋上大気浮遊粒子試料(採取日を異にするDおよびE)をそれぞれ5等分して本法(D試料), Lewtas 法(E試料)で変異原性(突然変異率)を測定しその再現性を調べた結果、S9 mix 添加系では、本法  $1.22 \pm 0.17 (\times 10^{-4})/\mu\text{g}$  (D試料), Lewtas 法  $10.2 \pm 1.2 (\times 10^{-4})/\mu\text{g}$  (E試料)で、変動係数はそれぞれ13.9%, 11.8%であった。また、S9 mix 無添加系では本法  $5.67 \pm 0.70 (\times 10^{-4})/\mu\text{g}$  (D試料), Lewtas 法  $15.9 \pm 1.8 (\times 10^{-4})/\mu\text{g}$  (E試料)で、変動係数は、それぞれ12.3%, 11.3%であった。したがって、本法は Lewtas 法とほぼ同様の再現性を示すことが認められた。

### 4. 短時間採取試料への ultramicro forward-mutation 法の適用

Ultramicro forward-mutation 法の感度が Lewtas 法の10倍であるという事実は、Lewtas 法では室内空気浮遊粒子の変異原性測定には  $20\text{l}/\text{min}$  の流量で24時間(約  $30\text{m}^3$ ) 採取した試料が必要であったのに対して、本法では約2時間 ( $3\text{m}^3$ ) の採取で変異原性測定が可能であることを示唆している。そこで、実際に国立公衆衛生院談話室(有喫煙)で  $47\text{mm}$   $\phi$  の石英繊維フィルターを用い  $20\text{l}/\text{min}$  の流量で2時間(2.4  $\text{m}^3$ , 午前9~11時) 採取した試料について本法を適用した。その結果、試料量と突然変異率との間に良好な dose-response 関係が認められ、多量採取が困難な室内空気の変異原性測定に充分適用できることが明らかになった。

この結果をもとに、香港の一般家庭 A, B, C の居間の空気試料(2時間, 1~4日間)に本法を適用した結果、その平均突然変異率はそれぞれ S9 mix 添加系で  $10.82 \pm 10.39$ ,  $8.72$ ,  $5.62 \pm 3.83 (\times 10^{-4})/\text{m}^3$ ,

S9mix 無添加系で $5.11 \pm 5.61$ ,  $4.60$ ,  $23.64 \pm 5.22 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ であった。また、川崎市の1家庭Dの台所、居間、食堂（それぞれ7試料）書斎（3試料）およびその戸外（4試料）の空気試料に本法を適用した結果、その平均突然変異率はS9mix 添加系でそれぞれ $7.84 \pm 4.35$ ,  $8.34 \pm 5.77$ ,  $4.86 \pm 2.90$ ,  $11.61 \pm 3.13$ ,  $2.24 \pm 0.71 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ で、書斎で高い傾向が認められた。S9mix 無添加系での値もほぼ同様であったが、食堂と戸外の値が、 $9.47 \pm 6.73$ ,  $9.37 \pm 4.63 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ と高値を示した。

次に昭和62年12月国立公衆衛生院談話室およびその戸外において 20 l/min の流量で2時間（2.4  $\text{m}^3$ ）毎にそれぞれ連続して12回（24時間）の採取を行い、変異原物質の経時変動を調べた。その結果、戸外試料の平均突然変異率はS9mix 添加系で $20.26 \pm 18.55 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ 、S9mix 無添加系では $30.62 \pm 19.52 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ を示した。また、室内試料についてはS9mix 添加系では戸外試料とほぼ同様であったが、S9mix 無添加系では8～18時で戸外より高く、特に10時、18時の突然変異率はそれぞれ $212.57$ ,  $140.20 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ と高い値を示し、これは入室人数および喫煙本数に大きく関連していた。

#### 5. 喫煙による室内汚染と空気清浄器の効果

室内汚染に対する喫煙および空気清浄器の影響について検討した。国立公衆衛生院の換気のない1室（67  $\text{m}^3$ ）においてタバコ10本を国際喫煙モード（1パフ：35 $\text{mL}$ 、2秒間、すいから長：30 $\text{mm}$ ）で機械喫煙させた喫煙時に20 l/min の流量で2時間（2.4  $\text{m}^3$ ）採取した場合の室内空気の突然変異率はS9mix 無添加系平均 $689.20 \pm 70.80 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ 、添加系平均 $182.00 \pm 1.10 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ で、無添加系で約4倍高く、また、これらの値はそれぞれ機械喫煙前（blank）値の58.9倍、15.6倍であった。したがって、喫煙は微生物を用いた変異原性評価によっても室内汚染にかなり大きな影響を及ぼすことが示唆された。

次に、空気清浄器の効果を調べるため、上記と同様の方法で1時間（1.2  $\text{m}^3$ ）毎に喫煙前（blank）、喫煙時および喫煙後（空気清浄器を使用）の室内空気の突然変異率をS9mix 無添加系のみで調べたところ、喫煙前（blank）は $43.27 \pm 28.06 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ であったのに対し、10本喫煙時は $884.52 \pm 74.72 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ と約20倍高くなり、喫煙後空気清浄器を使用すると、毎時60～80%の割合で突然変異率が減少し、喫煙3時間後にはblank 値を下回った。これに対し、別に行った空気清浄器未使用の実験では毎時ほぼ50%の割合で減少したものの、3時間後でもblank 値の6倍の突然変異率を示した。これにより喫煙に対する空気清浄器の効果が示唆された。

#### 6. 個人曝露試料の変異原性

昭和62年12月（冬期）、昭和63年8月（夏期）に首都圏在住（東京都、相模原市）の喫煙者（2人）および非喫煙者（2～3人）に個人サンプラーを携帯させ（就寝時はベットと同じ高さにサンプラーを置いた）、1.5～2.0 l/min の流量で24時間の空気試料を採取し、その変異原性を測定した。その結果、冬期における変異原物質への曝露量はS9mix 添加系 $1.4 \sim 33.9 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ 、無添加系 $6.7 \sim 105.7 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ 、夏期についてはS9mix 添加系 $1.4 \sim 14 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ 、無添加系 $0.5 \sim 35.6 (\times 10^{-4})$ / $\text{m}^3$ であった。喫煙者の曝露量は、平均突然変異率で非喫煙者の4～5倍（S9mix 添加系）、6～19倍（S9mix 無添加系）と多かった。また、冬期と夏期の曝露量を非喫煙者で比較した場合、冬期は夏期の約1.9倍（S9mix 添加系）、約7.6倍（S9mix 無添加系）高値であった。

また、昭和63年12月に東京都在住の喫煙者（3人）、非喫煙者（4人）に個人サンプラーを携帯させ、1日毎に7日間採取し、S9mix 無添加系で調べた。その結果、喫煙者の7日間の平均突然変異率（ $48.4 \sim 81.1$

$\times 10^{-4}/\text{m}^3$ ) は、非喫煙者のそれ ( $5.84\sim 11.2\times 10^{-4}/\text{m}^3$ ) の約 8 倍高率であった。また、同一被験者でも採取日によりその曝露量は最高で約 40 倍異なり、かなり変動することが認められた。

## 7. 結 論

Micro forward-mutation 法を改良して高感度化した Ultramicro forward-mutation 法を開発し、微量室内空気試料の変異原性を調べ、以下の結果を得た。

1) Ultramicro forward-mutation 法は、Lewtas 法の約 1/10, Ames 法や Skopeck 法の約 1/100 の試料量で変異原性の測定が可能であり、また、その再現性も変動係数が 10% 台と良好であった。

2) 本法は 2 時間採取の微量室内空気浮遊粒子 ( $2.4 \text{ m}^3$ ) の変異原性の測定が可能であり、一般家庭試料に適用した結果、居間や書斎で高い値が得られた。

3) 室内および隣接する戸外からの空気試料について変異原性の経時変動を調べた結果、室内は S9mix 添加系で戸外とほぼ同様であったのに対し、S9mix 無添加系では戸外よりかなり高く、ヒトの活動時間と密接な関係があることが認められた。

4) 喫煙による室内汚染と空気清浄器の効果を微生物を用いる変異原性の測定によって検討した結果、喫煙は室内の変異原物質濃度に大きな影響を及ぼすことや空気清浄器は変異原物質の除去に有効であることを認めた。

5) 個人曝露試料の変異原性を測定した結果、喫煙者は非喫煙者よりも、また冬期には夏期よりも高い曝露量であることを立証した。また、曝露量は採取日により大きく変動することを認めた。

人は長時間、室内で生活しており、室内汚染は健康と大きな係わり合いをもち、室内空気浮遊粒子の変異原性調査は今後ますます重要な課題になると考えられる。本研究において開発された Ultramicro forward-mutation 法は室内空気浮遊粒子のような微量にしか採取することができない試料の変異原性の評価が可能であり、環境衛生学上有用であると考えられる。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、肺がんの発症の増加などに関連して大気中の変異原物質が重要視されている。人はその生活の大部分を室内で行っていることから、人の変異原物質への曝露実態を正確に把握するためには室内空気中の変異原物質について調査することが必要である。しかし、現在一般に使用されている Ames 法などの微生物を用いる変異原性試験法は検出感度が低く、室内空気浮遊粒子のように微量にしか採取できない試料の計測には不十分である。したがって、室内空気浮遊粒子の変異原性に関する報告はこれまで極めて少なく、その汚染実態はほとんど不明である。

著者は、微生物を用いる変異原性試験法のうちで、現在最も感度が高いとされているものの、未だ一般にはほとんど使用されていない micro forward-mutation 法 (Lewtas 法) を種々改良し、さらに約 10 倍の高感度を示す ultramicro forward-mutation 法を開発した。本方法を用いることによって、室内空気試料のような微量試料の変異原性を十分に測定しうることを明らかにした。

本研究の概要は次のとおりである。

### 1. Micro forward-mutation 法 (Lewtas 法) の高感度化

現在、Ames 法などの微生物を用いる変異原性試験法は、2～5 株の菌株を用いて塩基置換型、フレーム

シフト型などの変異型を検出している。本研究では、Lewtas 法と同様に、ほとんどすべての変異型を1菌株で同時に検出できる *Salmonella* sp.(1) serovar typhimurium TM677 株を用いた。

Lewtas 法の変異原性試験法の操作のうち最も主要な部分の1つである被験試料と菌液の混合液(反応液)の少量化(マイクロ化)を試み、反応バイアル容量および反応液をそれぞれLewtas法の約1/40(100 $\mu$ l), 1/10(10 $\mu$ l)にマイクロ化した。この場合、特注で作製した縮小バイアル(マイクロバイアル)はその底部の中心を盛り上げ、斜めに設置して反応液を底部側壁部に集中させることによって回転混合(反応)の効率を上げるとともに、バイアルの蓋をスクリーキャップから特注のテフロン製の栓に代え、気密性をよくすることによって反応液の水分の蒸発を少なくし、反応時間を2時間に延長することを可能にした。また、試料調整の溶媒として揮発性の高いジクロロメタンを採用して溶媒残留の危険性を少なくし、また、反応液の希釈調整には主にPBSを用い、ピペット操作の誤差を少なくするなどの改良も加えた。

以上のように、著者はLewtas法を基本にして様々な改良を加え、特に反応液量(試料量)を1/10にマイクロ化した試験法を開発し、変異原物質4-ニトロキノリン-1-オキサイド(4NQO)、ベンゾ(a)ピレン(BaP)などを被験試料として試験を行ったところ、Lewtas法の1/10の試料量でLewtas法と同等の突然変異率とdose-response関係が得られることを認め、本法をultramicro forward-mutation法と呼称した。

## 2. Ultramicro forward-mutation法の検出感度

既知の代表的ながん・変異原物質であるBaP(S9mix添加系)および4NQO(S9mix無添加系)を用いて、本法とLewtas法の検出感度を比較した結果、突然変異率がコントロール(自然突然変異率)の2倍となるバイアル当たりの必要量では、本法は両物質についてLewtas法の約1/10であり、約10倍高感度であった。また、バイアル当りのBaP量あるいは4NQO量と突然変異率との間には両方法において良好なdose-response関係が認められた。

次に、実際の試料として、麻布大学校舎屋上、米国のワシントン郊外および麻布大学校舎4階談話室(有喫煙)の空気浮遊粒子試料について検討した結果、本法とLewtas法はともに3試料についてS9mix添加の有無にかかわらず変異原性を示し、バイアル当たりの試料量と突然変異率との間にdose-response関係が認められた。また、コントロールの2倍の突然変異率を得るのに必要な試料量は、上記3試料のいずれについても本法はLewtas法の約1/10であり、麻布大学校舎屋上の空気試料の場合、Ames法の約1/100であった。

## 3. Ultramicro forward-mutation法の再現性

BaPおよび4NQOについて本法の再現性を調べたところ、平均突然変異率測定値の変動係数はそれぞれ13.1%、10.5%であり、比較的良好であった。また、変異コロニー数および総生菌数の測定値の変動係数は5~6%と良好であった。

麻布大学校舎屋上の大気浮遊粒子試料について本法およびLewtas法で変異原性を測定し、その再現性を調べた結果、突然変異率測定値の変動係数はS9mix添加系でそれぞれ13.9%、11.8%であり、S9mix無添加系ではそれぞれ12.3%、11.3%であった。したがって、本法はLewtas法とほぼ同様の再現性を示すことが明らかにされた。

## 4. 短時間採取試料へのultramicro forward-mutation法の適用

国立公衆衛生院談話室（有喫煙）で47mmφの石英繊維フィルターを用い20 l/minの流量で2時間（2.4 m<sup>3</sup>）採取した試料について本法を適用した結果、試料量と突然変異率との間に良好な dose-response 関係が認められ、多量採取が困難な室内空気試料の変異原性測定に十分適用できることを明らかにした。

次に、香港、川崎市の一般家庭4軒の室内空気試料に本法を適用した結果、その突然変異率は書斎、食堂で高値を示した。また、国立公衆衛生院談話室およびその戸外において20 l/minの流量で2時間（2.4 m<sup>3</sup>）毎の採取を連続して24時間（12回）行い、変異原性の経時変動を調べた結果、談話室試料の変異原性はS9 mix 無添加系では8～18時で戸外よりも高く、特に10時および18時に高い値を示した。これは入室人数および喫煙本数によく相関していた。

#### 5. 喫煙による室内汚染と空気清浄器の効果

換気のない1室（67 m<sup>3</sup>）においてタバコ10本を国際喫煙モードで機械喫煙させた場合の室内空気の突然変異率は、機械喫煙前値（blank）の58.9倍（S9mix 無添加系）、15.6倍（S9mix 添加系）であった。したがって、喫煙は微生物を用いる変異原性評価によっても室内汚染にかなり大きな影響を及ぼすことを確認した。

次に、喫煙後空気清浄器を使用し、1時間（1.2 m<sup>3</sup>）毎に採取した試料についてS9mix 無添加系で調べた結果、突然変異率は毎時60～80%の割合で減少し、喫煙3時間後にはblank値を下回った。これに対し、空気清浄器未使用の場合は、毎時ほぼ50%の割合で減少したものの、3時間後でもblank値の6倍の突然変異率を示した。これらの成績は喫煙に対する空気清浄器の効果を初めて数値によって示したものであった。

#### 6. 個人曝露試料の変異原性

喫煙者（5人）および非喫煙者（7人）に個人サンプラーを携帯させ、1.5～2.0 l/minの流量で24時間（2.16～2.88 m<sup>3</sup>）採取した微量試料について、その変異原性を測定した結果、喫煙者の曝露量は、平均突然変異率で非喫煙者の4～5倍（S9mix 添加系）、6～19倍（S9mix 無添加系）と多く、また冬期と夏期の曝露量を非喫煙者について比較した場合、冬期は夏期の約1.9倍（S9mix 添加系）、約7.6倍（S9mix 無添加系）高値であった。

また、同一被験者でも採取日よりその曝露量は最高で約40倍異なり、かなり変動することが認められた。

以上のように、著者は微生物を用いる変異原性試験法のうちで現在最も高感度とされている micro forward-mutation 法（Lewtas 法）に改良を加え、約10倍高感度な ultramicro forward-mutation 法を開発し、室内空気浮遊粒子のような微量試料の変異原性の評価に十分適用できることを明らかにした。この業績は環境中のがん・変異原物質による汚染状況の把握および当該物質による人への曝露実態の調査がますます重要な課題となっている現在、環境衛生学および獣医公衆衛生学上寄与するところが大きく、獣医学博士の学位を授与するに値するものと評価する。