

学位申請論文

Micro forward-mutation法の高感度化に関する研究

(要 旨)

高 木 敬 彦

1990

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 m³）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（2.4m³）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 μ l)、1/100(1 μ 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 μ 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(4ml)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 μ 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 μ lで上記と同様の試験を行ったところ、Lewtas法(100 μ 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-エタノールの代わ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-オキサイド(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 μ g、Lewtas法で約0.2 μ g、4NQOについてそれぞれ約0.1ng、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、相模原市の麻布大学校舎屋上(A)、米国のワシントン郊外(B)および麻布大学校舎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S9mix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(μg)*			
	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4NQO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、

S9mix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、S9mix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 l/minの流量で24時間(約30m³)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(3m³)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(2.4m³、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S9mix添加系で 10.82 ± 10.39 、 8.72 、 $5.62 \pm 3.83 (\times 10^{-4}) / \text{m}^3$ 、S9mix無添加系で 5.11 ± 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 ± 4.35 、 8.34 ± 5.77 、 4.86 ± 2.90 、 11.61 ± 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 ± 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(2.4m³)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±18.55(×10⁻⁴)/m³、S9mix無添加系では30.62±19.52(×10⁻⁴)/m³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(×10⁻⁴)/m³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

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(67m³)においてタバコ10本を国際喫煙モード(1パフ:35ml、2秒間、すいがら長:30mm)で機械喫煙させた喫煙時に20 l/minの流量で2時間(2.4m³)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±70.80(×10⁻⁴)/m³、添加系平均182.00±1.10(×10⁻⁴)/m³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(1.2m³)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±28.06(×10⁻⁴)/m³であったのに対し、10本喫煙時は884.52±74.72(×10⁻⁴)/m³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1.4～33.9($\times 10^{-4}$)/m³、無添加系6.7～105.7($\times 10^{-4}$)/m³、夏期についてはS9mix添加系で1.4～14($\times 10^{-4}$)/m³、無添加系0.5～35.6($\times 10^{-4}$)/m³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(48.4～81.1 $\times 10^{-4}$ /m³)は、非喫煙者のそれ(5.84～11.2 $\times 10^{-4}$ /m³)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Skopect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(2.4m³)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。