

原著論文

新しい試験菌株を用いたエームス試験の有用性について - 255化学物質についての検討 -

世良暢之・塚谷裕子・志水信弘・田中義人^{*1}・北森成治・内海英雄^{*2}

多種多様で有害な化学物質の人への曝露量の解明及び低減を目的とするがん予防対策では、高価で長期間を要する動物実験の代用法として簡便で安価なスクリーニングアッセイの開発が求められている。何千もの有害な化学物質に人が曝露されているなかで、広範囲な化学物質の変異原性を系統的に検討している例は少ない。そこで255化学物質に対して、従来から用いられている TA98, TA100株に加え、新しく開発された YG1041, YG1042, YG3003及び YG7108株を併用したエームス試験を実施し、その有用性を検討した。またラット及びヒト肝臓 S9を用いた代謝活性化系による試験の検討、環境試料への応用が可能かどうかについても検討した。その結果、83化学物質(32.5%)に変異原性が確認され、環境試料である河川水のブルーレーヨン抽出物に対しても変異原性を測定することができた。また、代謝活性化を受けてはじめて変異原性を示す10種類の間接型変異原に対して、ラット及びヒト肝臓 S9を用いた変異原性は、ほぼ同様の傾向を示した。これらの結果から、新しい試験菌株を用いたエームス試験は全体の約3割の化学物質に変異原性を検出できるにとどまったものの、実施可能な簡便で安価なバイオアッセイであると考えられた。

〔キーワード：エームス試験，変異原性，*S. Typhimurium* YG1041, YG1042〕

1 はじめに

エームス試験は、化学物質の発がん性を予測するため、1975年カリフォルニア大学のエームス教授（細菌学）によって開発されたものである¹⁾。この試験は、ネズミチフス菌（*Salmonella Typhimurium*, *S. Typhimurium*）の突然変異誘発能を利用して様々な化学物質の変異原性を検出する簡便な試験法である。当初、この試験において変異原性を示した化学物質は、急性、慢性毒性などの毒性和高い相関が得られた²⁾。しかしながら何千もの化学物質についてその開発段階にエームス試験が導入されたことから、強い変異原性を示す化学物質は供給されなくなってきた。1993年から国立医薬品食品衛生研究所の能美健美博士らは弱い変異原性でも検出できるエームス試験用の新しい高感受性の試験菌株を開発してきた³⁻⁵⁾。

ここでは新しい高感受性株の中から4菌株（YG1041, YG1042, YG3003及び YG7108）を選び、生体影響、環境影響の観点から重要と思われる255化学物質について変異原性を検討すると同時に、環境試料への応用が可能かどうかについて検討を行った。また、エームス試験の

代謝活性化過程において使用されるラット肝臓 S9mix とヒト肝臓 S9mix の有用性についても併せて検討を行ったので、報告する。

2 材料及び方法

2・1 試料

化学物質は、生体影響（変異原性、発がん性、内分泌攪乱、水生生物毒性、生殖毒性、生体への刺激性及び神経毒性など）、環境影響の観点から重要と思われる255化学物質を選択した。これらの化学物質は、農薬（殺虫剤、除草剤、燻煙剤等）、多環性芳香族炭化水素類、アリル炭化水素、重金属、無機化合物等などに分類され、すべて和光純薬工業(株)から購入した。これらの試料をジメチルスルホキシド(DMSO)あるいは蒸留水に溶解させ、被検試料とした。また、河川水試料はブルーレーヨン（採取地点1カ所につき3g）を24時間河川水中に懸垂し、蒸留水で洗った後、メタノール-濃アンモニア(50:1, 160ml/g ブルーレーヨン)混合液で超音波抽出した。得られた抽出液を減圧濃縮してDMSOに溶解させ、0.45

福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野39）

*1 現：福岡県環境部環境政策課（〒812-8577 福岡市博多区東公園7-7）

*2 九州大学大学院薬学研究院機能分子解析学（〒813-8582 福岡市東区馬出3-1-1）

μ m フィルターで濾過した。

2・2 試験方法

エームス試験はプレインキュベーション法で実施し、ラット肝臓 S9mix(オリエンタル酵母工業(株))またはヒト肝臓 S9mix(フナコシ(株))による代謝活性化法を併せて実施した¹⁾。試験菌株は *S. Typhimurium* TA98, TA100, YG1041, YG1042, YG3003 及び YG7108 株である。YG1041 及び YG1042 株は、ニトロ還元酵素及び *O*-アセチル転移酵素高産生性株であり、多環性芳香族炭化水素のニトロ誘導体またはアミノ誘導体に高感受性である³⁾。YG3003 株は、8-ヒドロキシグアニン修復酵素欠損株であり、酸化型変異原に高感受性である⁴⁾。YG7108 株は、*O*⁶-メチルグアニンメチル転移酵素欠損株であり、アルキル化剤に高感受性である⁵⁾。

3 結果及び考察

YG1041, YG1042 株は、エームス試験の標準株である TA98, TA100 株にニトロ還元酵素及び *O*-アセチル転移酵素に関与する遺伝子を導入した菌株である。従って YG 株は TA 株より高感受性であることが期待される。ここでは、まず両菌株の比較、高感受性株の有用性について検討した。さらに *S. Typhimurium* を用いたエームス試験でラット肝臓 S9 による代謝活性化が必要な化学物質について、ヒト由来肝臓 S9 の有用性についても併せて検討した。

3・1 TA株とYG株による変異原性の比較

代表的な10変異原物質に対する YG 株の変異原性はそれぞれ対応する TA 株での変異原性を1.0として比較した(表1)。YG 株は、2-ニトロフルオレン、2-ニトロナフタレンを始めとした多環性芳香族炭化水素のニトロ誘導体に対しては TA 株と比べて23.5-1746倍と高い変異原性を示した。一方、Glu-P-1, Trp-P-2のようなヘテ

ロサイクリックアミンやベンツピレンのような多環性芳香族炭化水素に対してはほとんど変異原性に差が認められなかった(0.2-8.4倍)。これらのことから YG1041, YG1042 株を用いたエームス試験は、TA98, TA100 株を用いた場合よりも数倍-数千倍高感度に測定できることが示唆された。

3・2 YG株による255化学物質の変異原性

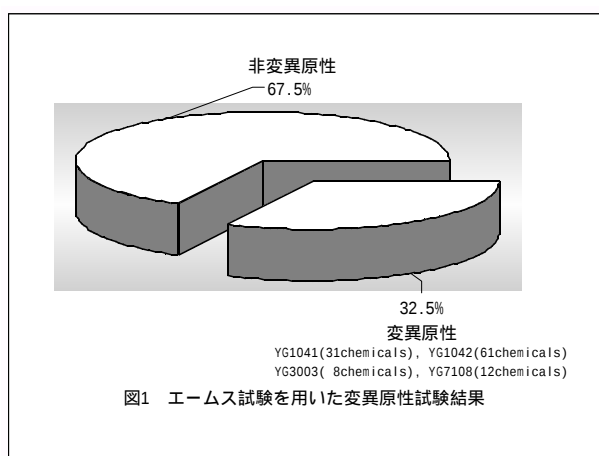
YG1041, YG1042 株を用いたエームス試験を生体影響及び環境影響の観点から重要と思われる255化学物質について実施した。強い変異原性を示した上位10化学物質を表2に示した。YG1041, YG1042 株のいずれの場合も代謝活性化を必要とする系(+S9)において高い変異原性を示したのは、MeIQx, Trp-P-2, PhIP などのヘテロサイクリックアミン、あるいはアフラトキシン B1, 3-メチルコランスレン, 2-アミノアントラセン, ベンツピレンなどの多環性芳香族炭化水素であった。一方、代謝活性化を必要としない系(-S9)において高い変異原性を示したのは、1,8-及び1,6-ジニトロピレン, 3-ニトロフルオランテン, 1-ニトロピレンなどの多環性芳香族炭化水素のニトロ誘導体であった。特に石油製品の不完全燃焼生成物中に含まれる1,8-及び1,6-ジニトロピレンは YG1041 株(-S9)において、4550000, 2450000 revertants/nmol (rev./nmol) と非常に高い変異原性を示した⁶⁾。また、YG1041, YG1042 株を含めた YG4 株を用いたエームス試験において変異原性を示したのは、255化学物質中83化学物質(32.5%)で、残りの172化学物質(67.5%)は変異原性を示さなかった(図1)。4株のうち活性酸素に感受性な YG3003 株、アルキル化剤に高感受性な YG7108 株は、それぞれ255化学物質中8, 12化学物質に対して変異原性を示すにとどまり、他の2株に比べると限定された化学物質にのみ変異原性を示した。

表1 *S. Typhimurium* TA98, TA100 株と YG1041, 1042 株における感受性の相違

化学物質名	S9 mix	変異原性 (revertants / nmol)			
		TA98株	YG1041株	TA100株	YG1042株
2-Nitrofluorene	-	30 (1.0)	52,383 (1,746.1)	-	-
1-Nitropyrene	-	453 (1.0)	161,461 (356.4)	-	-
1,8-Dinitropyrene	-	213,343 (1.0)	8,436,283 (39.5)	-	-
Glu-P-1	+	19,711 (1.0)	166,529 (8.4)	-	-
Trp-P-2	+	10,493 (1.0)	9,148 (0.9)	-	-
2-Nitronaphthalene	-	-	-	4 (1.0)	260 (65.0)
2,4-Dinitrotoluene	-	-	-	134 (1.0)	3,151 (23.5)
4-Nitroquinoline <i>N</i> -oxide	-	-	-	1,002 (1.0)	1,192 (1.2)
2-Aminoanthracene	+	-	-	84 (1.0)	3,927 (46.8)
Benzo[a]pyrene	+	-	-	85 (1.0)	18 (0.2)

表2 S. Typhimurium YG1041株，1042株で強い変異原性を示した上位10化学物質

菌 株	化学物質名	変異原性		化学物質名	変異原性	
		(revertants/ nmol, +S9)			(revertants/ nmol, -S9)	
YG	1 MeIQx	357,000	1	1,8-Dinitropyrene	4,550,000	
1041	2 Trp-P-2	312,000	2	1,6-Dinitropyrene	2,450,000	
	3 Aflatoxin B1	294,000	3	3-Nitrofluoranthene	112,000	
	4 PhIP	120,000	4	NIP	16,800	
	5 3-Methylcholanthrene	43,400	5	2-Nitrofluorene	6,720	
	6 2-Aminoanthracene	21,400	6	MEP	4,700	
	7 Pyrene	19,800	7	Benzo[b]fluoranthene	4,630	
	8 1,2-Benzanthracene	4,750	8	2,4-Dinitroaniline	3,640	
	9 NIP	4,380	9	N-Phenyl-1-naphthylamine	3,360	
	10 Benzo[a]pyrene	3,500	10	Captans	3,220	
YG	1 Aflatoxin B1	408,000	1	1,8-Dinitropyrene	2,240,000	
1042	2 MeIQx	116,000	2	1,6-Dinitropyrene	1,870,000	
	3 PhIP	82,700	3	1-Nitropyrene	203,000	
	4 Trp-P-2	58,800	4	NIP	56,000	
	5 3-Methylcholanthrene	47,040	5	4-Nitroquinoline-N-oxide	51,100	
	6 NIP	33,600	6	Malathion	34,000	
	7 2-Aminoanthracene	26,600	7	MEP	20,500	
	8 Benzo[a]pyrene	17,500	8	Maneb	18,300	
	9 MEP	16,100	9	Aniline	17,200	
	10 Benzo[e]pyrene	15,700	10	N,N-Dimethylformamide	15,600	



3.3 ヒト由来肝臓S9を用いた変異原性

通常エームス試験における代謝活性化は、PCBなどをマウス腹腔内投与してチトクローム P450系酵素を誘導した肝臓 S9を用いて実施する。ここでは、エームス

試験の代謝活性化を補完する方法として、ヒト由来の肝臓 S9を用いて比較検討した。その結果、ベンツピレン、3-メチルコランスレン、ピレンなどの多環性芳香族炭化水素、MeIQx、Trp-P-2などのヘテロサイクリックアミンにおいては、ヒト由来の肝臓 S9を用いると変異原性は多少低くなるものの測定可能なことが示唆された（表3）。またアフラトキシン B1、PhIPのようにヒト由来肝臓 S9によって変異原性が低くなる化学物質、2-アミノアントラセンのように逆に変異原性が高くなる化学物質も認められた。

今回のエームス試験において、ラットとヒトの肝臓 S9を用いた変異原性には相違があることが明らかとなり、変異原物質のヒトへのリスク評価という観点から考えた場合、用いる代謝活性化系について考慮していく必要があると思われた。

さらに高感受性株である YG1041株を用いたエームス試験を環境試料（河川水試料）に適用した。試料は、同

表3 ラットまたはヒト由来の肝臓 S9mix を用いた
エームス試験の比較

化学物質名	変異原性 (revertants/nmol)			
	YG1041株		YG1042株	
	ラット	ヒト	ラット	ヒト
Aflatoxin B1	294,000	8,150	408,000	10,400
2-Aminoanthracene	21,400	48,500	26,600	56,200
1,2-Benzanthracene	4,750	250	1,990	120
Benzo[a]pyrene	3,500	1,420	17,500	3,850
MeIQx	357,000	113,000	116,000	86,400
3-Methylcholanthrene	43,400	17,600	47,000	19,700
NIP	4,380	170	33,600	220
PhIP	120,000	8,630	82,700	6,380
Pyrene	19,700	17,400	4,280	3,750
Trp-P-2	312,000	24,500	58,800	3,840

一河川の3カ所において採取した(採取地点1と2の間に処理水が放流されている)。YG1041株においては代謝活性化を必要としない系(-S9)においてはいずれの採取地点でも変異原性が認められたことから、処理水以外の汚染源によるものと考えられた。代謝活性化を必要とする系(+S9)においては処理水放流の下流においてのみ変異原性が認められた。このことは、処理水中に代謝活性化を受けて変異原性を示す変異原物質が存在することを示唆している。同時にSS、BOD及びCODなどについても測定したが明らかな相関は認められなかった(図2)。このことから、高感受性株であるYG1041株を用いたエームス試験は代謝活性化法を併用することにより環境試料の変異原性測定に利用可能なことが示唆された⁷⁾。

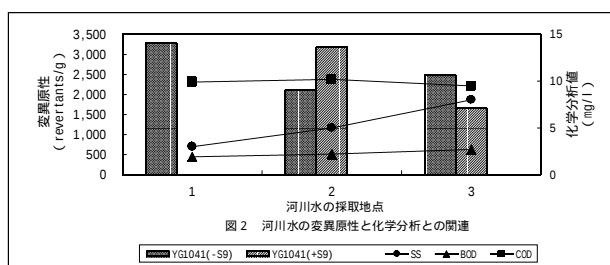


図2 河川水の変異原性と化学分析との関連

4 まとめ

新しい試験菌株(YG株)を用いたエームス試験は、従来から用いられている試験菌株(TA株)よりも多くの化学物質の変異原性を検出することが可能である。また、YG株を用いたエームス試験は河川水などの環境試料の変異原性測定にも応用可能であった。さらに、代謝

活性化法として従来から用いられているラット肝臓 S9 mixに加えてヒト肝臓 S9mixを用いたエームス試験を併用することにより、化学物質の変異原性を両酵素による相違を検討することが出来る。

謝辞

本研究は、環境省未来創造型基礎研究推進制度プロジェクト「化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発に関する研究」(平成9-12年度、研究代表者 内海英雄教授)により実施した。

文献

- 1) Ames, B.N., McCann and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31, 347-363, 1975.
- 2) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella/microsome* test ; assay of 300 chemicals, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72(12), 5135-5139, 1975.
- 3) Hagiwara, Y., Watanabe, M., Oda, Y., Sofuni, T. and Nohmi, T. : Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity, *Mutation Res.*, 261, 171-180, 1993.
- 4) Suzuki, M., Matui, K., Yamada, M., Kasai, H., Sofuni, T. and Nohmi, T. : Construction of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in 8-hydroxyguanine DNA glycosylase and their sensitivities to oxidative mutagens and nitro compounds, *Mutation Res.*, 393, 233-246, 1997.
- 5) Yamada, M., Sedgwick, B., Sofuni, T. and Nohmi, T. : Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O⁶-methylguanine, *J. Bacteriology*, 177(6), 1511-1519, 1995.
- 6) Tokiwa, H., Sera, N., Kai, M., Horikawa, K. and Ohnishi, Y. : The role of nitroarenes in the mutagenicity of airborne particles indoors and outdoors, *Genetic Toxicology of Complex Mixtures*, 165-172, 1990.
- 7) 後藤純雄, 遠藤 治, 松本 寛, 酒井茂克, 茶川智子, 麻野間正晴, 平山晃久, 渡辺徹志, 世良暢之, 塚谷裕子, 多田敦子, 若林敬二: 大気浮遊粒子, 河川水および土砂の変異原性モニタリング, 環境変異原研究, 22(2), 45-5, 2000.

Sensitive Ames test using *Salmonella* Typhimurium YG1041, YG1042, YG3003 and YG7108
for the detection of mutagenic chemicals

Nobuyuki SERA¹, Hiroko TSUKATANI¹, Nobuhiro SHIMIZU¹,
Yoshito TANAKA², Shigeji KITAMORI¹ and Hideo UTSUMI³

¹*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

²*Environmental Policies Division, Environment Department, Fukuoka Prefectural Government,
7-7 Higashikouen, Hakata-ku, Fukuoka 812-8577, Japan*

³*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University,
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan*

Nearly 90% of carcinogens have been proved to be mutagenic by Ames test using *Salmonella* Typhimurium TA98 or TA100. However, a recent analysis showed that the correlation between mutagenicity and carcinogenicity was lower than that derived from earlier analyses, and some carcinogens were not mutagenic for both *S. Typhimurium* TA98 and TA100. In order to detect the weak mutagens, therefore, we need new strains of *S. Typhimurium* that are more sensitive than TA98 and TA100 for detecting mutagenicity. We used new strains YG1041, YG1042, YG3003 and YG7108 in Ames test, and found that the new strains detected mutagenicity in 83 of 255 chemicals (32.5%) while TA98 and TA100 succeeded in 21 chemicals (8.2%), indicating the higher sensitivity of the new strains. Further, we found that the new strains could efficiently detect the mutagenicity of environmental chemicals such as condensates of river water. Many promutagens remain inactive until enzymatic transformation to electrophilic species binding to DNA, and Cytochrome P450 in rat liver S9 fraction plays an important role in activating promutagens to ultimate mutagens in Ames test. Rat and human liver S9 fraction behave differently as an enzyme source for metabolic activation, and we found that human liver S9 fraction may provide new information about the genotoxicity of chemicals.

[Key words; Ames test , Mutagenicity , *S. Typhimurium* YG1041 , YG1042]