

氏名(本籍)	えん どう 遠 藤	おさむ 治 (神奈川県)
学位の種類	獣医学博士	
学位記番号	甲第 49 号	
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項該当	
学位論文題名	環境汚染物質の変異原性評価に関する基礎的研究	
論文審査委員	(主査) 教授 村 田 元 秀	
	(副査) 教授 尾 形 学	
	教授 赤 堀 文 昭	

論 文 内 容 の 要 旨

本研究の目的

近年、大気汚染物質、医薬品、農薬および食品添加物などが、動物体や人体と接触する機会が多くなり、これに伴い動物やヒトの遺伝子損傷を含む慢性毒性を明らかにする必要性が生じてきた。とくに、多くの化学的発癌物質の代謝物に突然変異誘発性と発癌性との間に強い相関性のあることが知られるようになり、環境中に存在する化学物質の動物やヒトに与える危険性の認識のもとに、環境中の変異原性物質が追究されてきた。しかしながら、今日、環境汚染物質の変異原性に関する研究は数多くの環境汚染物質中のごく一部に過ぎず、その理由として、環境汚染物質の変異原性の評価において、以下のような基本的な問題点が解決されていないことによる。すなわち、

- ① 共存物質との相互作用：変異原性環境汚染物質は他の環境中汚染物質により、どのような影響を受けているか。
 - ② 環境空気中のガスあるいは蒸気状物質の変異原性評価法。
 - ③ 変異原性物質検出のための高感度試験法の確立。
 - ④ その他
- などである。

そこで、本研究では、上記問題を解決するため、環境汚染物質の変異原性評価に関する必要かつ基礎的研究として、

1. 芳香族ニトロ化合物の変異原性に及ぼす環境中共存物質の影響
2. ガス状汚染物質の変異原性試験方法の開発
3. 変異原性試験方法の高感度化に関する研究

を行った。

1. 芳香族ニトロ化合物の変異原性におよぼす環境中共存物質の影響

芳香族ニトロ化合物は医薬品、染料、爆薬等の製造に使用されており、また、化石燃料等の不完全燃焼によって発生するばかりでなく、多環芳香族炭化水素 (PAH) と二酸化窒素との大気反応によっても生成するため、その環境分布は極めて広い。一方、環境中には、芳香族ニトロ化合物のほかにおびただしい種類の汚染物質が存在している。これらの共存汚染物質中には芳香族ニトロ化合物と同様に変異原性を示すもの、

あるいはそれ自体では変異原性物質ではないものの芳香族ニトロ化合物の変異原性に影響をおよぼす物質の存在が考えられる。したがって、環境汚染物質のうち、変異原性物質として最も重要な芳香族ニトロ化合物を取り上げ、その変異原性におよぼす共存物質の影響を調べることは、芳香族ニトロ化合物および他の変異原性環境汚染物質の変異原性をさらに詳細かつ正確に評価する上で極めて意義深いと考える。

本研究では、1, 6-Dinitropyrene (DNP) や、1, 3, 6, 8-Tetranitrocarbazole などの芳香族ニトロ化合物を対象に、これらの変異原性に対する共存汚染物質 (PAH, ディーゼル排出タール) の影響を *Salmonella typhimurium* TA98 を用いて調べた。その結果、

① 強力な癌 (変異) 原性物質である DNP の direct-acting mutagen 活性は各種 PAH の共存により低下した。各種 PAH のうち変異原性抑制作用は Benzo(e)pyrene において最も強く認められ、次いで Benzo(a)pyrene (5 環 PAH), Benz(a)anthracene, Chrysene, Pyrene, Fluoranthene (4 環 PAH), Anthracene, Phenanthrene, Acenaphthene (3 環 PAH) の順に弱くなった。一方、DNP の promutagen 活性は各種 PAH の共存により増強された。この各種 PAH における変異原性増強作用の強さは direct-acting mutagen 活性抑制作用の順序と同様であった。

このように縮合環数の多い PAH ほど DNP の変異原性に大きな影響をおよぼした。DNP は電子受容体であり、PAH は一般に電子供与体で、縮合環数の多い PAH ほど電子供与性が強く電子受容体と電荷移動錯体を形成し易いことなどから、電荷移動錯体の形成が変異原性に影響をおよぼすものと推察された。

② 1-Nitropyrene 及び DNP の変異原性におよぼすディーゼル排出タール状物質 (含 PAH) の影響について検討した。その結果、ディーゼル排出タール状物質も、1-Nitropyrene 及び DNP の direct-acting mutagen 活性を抑制し、また、promutagen 活性を増加させることが確認された。さらに、これら共存物質の影響は各種 PAH が含まれる中性画分で強く、酸性画分がこれに次ぎ、塩基性画分による影響は殆ど認められなかった。この事から 1-Nitropyrene や DNP の変異原性に影響をおよぼすディーゼル排出成分は主に PAH 類によるものと推測された。

③ 比較的変異原性の弱い 2, 4, 6-Trinitrochlorobenzene は Pyrene の共存によりその direct-acting mutagen としての活性を著しく増加させることを明らかにした。また、強い direct-acting mutagen 活性を有する 1, 3, 6, 8-Tetranitrocarbazole は Pyrene あるいは Benzo(a)pyrene の共存によりその変異原性が著しく抑制された。なお、上記物質の混合溶液の吸収スペクトルに電荷移動錯体形成による新しい吸収帯の出現が認められ、電荷移動錯体形成が変異原性に影響をおよぼすことを確認した。

以上の成績より、環境中の共存物質である PAH 類は芳香族ニトロ化合物の変異原性に対し、大きな影響を与えることを明らかにした。その原因として、電子受容体の芳香族ニトロ化合物と電子供与体の PAH 類による電荷移動錯体の形成が強く示唆された。

2. ガス状汚染物質の変異原性試験方法の開発

揮発性又はガス状物質の変異原性試験方法は、液体又は可溶性物質に対する試験方法に比べて著しく立ち遅れており、適切な試験方法は未だ確立されていない。一方、環境空気中の汚染物質はフィルターを通過することによって、フィルター上に捕集される粒子状汚染物質と、フィルターを通過してしまうガス・蒸気状汚染物質とに大別されるが、粒子状汚染物質の変異原性は Ames 法等により比較的詳細な検討がなされているものの、ガス・蒸気状汚染物質の変異原性は、前述のように適切な試験方法が確立されていないため、殆ど明

らかにされていない。

そこで本研究では、ディーゼル車の増加に伴いその生体影響が懸念されているディーゼル排出物中のガス・蒸気状物質をとりあげ、その変異原性試験方法の開発を試みた。その結果、一連のガラス製チャンバー内に設置したプレートに一定の流速でディーゼル排出物中のガス・蒸気物質を数時間連続暴露することにより、その変異原性を検出する方法を開発することに成功した。

この方法を用いて、ディーゼル排出物中のガス・蒸気状物質の変異原性を調べ、Ames法 (pre-incubation法) による粒子状物質の変異原性との比較を行った結果、ディーゼル排出物中のガス・蒸気状物質の *Salmonella typhimurium* TA100 (-S9) に対する変異原性は、粒子状物質のそれよりも、少なくとも30倍強いことが明らかとなった。

「たばこ」副流煙は室内汚染の主要な因子の一つとみなされ、嫌煙権との関連において社会的にも強い関心が寄せられている。そこで、本研究により得られた変異原性試験方法を「たばこ」副流煙に適用し、そのガス・蒸気状物質の変異原性を調べるとともに、従来からよく調べられている粒子状物質 (いわゆる、タール状物質) の変異原性と比較検討した。その結果、TA100株に対するガス・蒸気状物質の活性はタール状物質とはほぼ同程度であるが、*Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101株に対してはガス・蒸気状物質の方が+S9条件下で約10倍高いことを認めた。

以上の成績から、環境空気中の汚染物質のうち、これまでほとんど検討されていなかったディーゼル排出物中および「たばこ」副流煙中のガス・蒸気状物質はその変異原性の強さにおいて粒子状物質のそれと同等かそれ以上であることを明らかにした。このことにより、今後環境空気中のガス・蒸気状物質についてはさらにその実態を究明しなければならない重要性を示唆した。

3. 変異原性試験方法の高感度化に関する研究

umu試験法は、試験菌体のDNA傷害に基づくSOS反応により誘起された β -galactosidaseの活性から、被験化学物質の変異原性を求める方法で、従来のAmes法に較べて操作が簡単で、短時間に結果が得られ、かつ経済的であるため、環境汚染物質の変異原性の検出やモニタリングに有効な方法として注目を浴びている。しかしながら、現在のumu試験法では β -galactosidase活性を吸光光度法 (Miller法) によって測定しているため、環境汚染物質のような着色試料の測定や、その検出感度にはいくつかの問題点が残されていた。

そこで本研究では上記問題を解決すべく、手法の改良を行った。その結果、

① 従来の比色対照溶液 (水等) の代わりに、酵素活性を行わない試料溶液を用いると、着色試料の変異原性も測定可能となり、測定精度も向上することを認めた。

② 従来法では菌株を一夜培養した後、その一部を数時間再培養したものを試験に用いているが、一夜培養液を希釈したものを試験に用いても良好な成績が得られることを見出し、これにより試験時間の短縮が可能となった。

③ 菌濃度と検出感度の検討を行い、従来法より低濃度の菌液を使用することにより、高い検出感度が得られることを見出した。

④ 環境中の主要な発癌関連物質であるPAHと芳香族ニトロ化合物について①~③の改良umu試験を行い、そのDNA傷害性強度とAmes法による変異原性強度とを比較したところ、両強度間には良好な相関

が認められた。

⑤ 蛍光光度法を用いる β -galactosidase 活性測定法の検討を行った結果、基質に 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside を使用すると、従来の吸光光度法による感度より少なくとも50倍感度が向上することを認めた。

以上の成績から、Ames 法より優れた試験方法となることが期待されている umu 試験法について、環境汚染物質の変異原性検索において Ames 法より劣るとされていたいくつかの欠点を改善、改良することができた。

結 論

芳香族ニトロ化合物の変異原性は PAH 類や環境汚染物質の一つであるディーゼル排出タール状物質の存在により direct-acting mutagen 活性や promutagen 活性に大きく影響されることを明らかにした。

このことにより、今後、環境汚染物質の変異原性試験においては共存汚染物質との相互作用による変異原性をも追求する必要のあることを指摘した。

また、ガス状汚染物質の変異原性はガラス製のチャンバー内に設置した一連のプレート上に一定の流速で被験物質を暴露することにより検出する方法を確立した。

さらに、従来 Ames 法が変異原性試験として多く用いられているが、umu 法を一部改良することにより、umu 法は Ames 法に比べて時間の短縮および高感度の検出が可能となり、umu 法を応用することにより変異原性試験の方法が一層精度の高いものとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

化学物質による突然変異作用が大きな問題となったのは、サリドマイドによるアザラシ症の発生によってであり、この後、各分野において研究が行われた結果、医薬品だけでなく、農薬、食品添加物、さらには工業活動に伴って、水や空气中に放出される各種排出物等のなかからも、突然変異作用を有する物質の存在が報告されるに至った。また、発癌性と変異原性とは同一の現象ではないが、Ames らによって、その相関関係が調べられた結果、約80%の発癌物質が変異原性を示すことが明らかにされてきている。このような結果から、変異原性を指標とする短期検出法が発癌性テストの第一次スクリーニングとして用いられるようになってきた。

ところで、環境汚染物質の変異原性の研究は、環境中に数多く存在するこれら物質のごく一部にとどまっているのが現状であり、その理由としては、環境中に存在する変異原性物質は単独ではなく他の物質と共存しているため、これら共存物質との相互作用が解明されていないこと。また、大気中に存在する環境汚染物質は、粒子状としてだけでなく、ガス状あるいは蒸気状物質として存在している場合が多いが、これらについての試験方法が確立されていないため、その変異原性を評価するには至っていないこと。さらには、数多く存在する環境汚染物質から変異原性を検出するためのより迅速で高感度な手法開発の必要性などが上げられる。

そこで、著者は、環境汚染物質の変異原性を評価するために必要な基礎的研究として、第1章では環境汚染物質のうち、芳香族ニトロ化合物をとりあげ、多環芳香族炭化水素との共存下における変異原性について検討した。第2章においては、問題とされながら、試験方法が確立されていないため殆ど検討されていなか

った、ガス・蒸気状物質に対する変異原性試験方法について検討し、ディーゼル排ガス等について試験を行った。第3章では、化学物質のDNA傷害を短時間で検出する方法として提案されている「umu試験法」をとりあげ、その改良を行った。

本研究の概要は、次のとおりである。

1. 芳香族ニトロ化合物の変異原性におよぼす多環芳香族炭化水素の影響

① 1978年 Pitts らによって多環芳香族炭化水素がNO₂と大気中で反応して芳香族ニトロ化合物を生成し、これら生成物が変異原性を示すことが報告されてから、芳香族ニトロ化合物の検索が盛んとなったが、これらの物質は、環境中で多環芳香族炭化水素 (PAH) と共存していることが多い。しかしながら、その共存による変異原性への影響は解明されていないのが現状である。

そこで、芳香族ニトロ化合物のうち、1, 6-Dinitropyrene (DNP) をとりあげ、その変異原性におよぼすPAHの影響をAmes法を用いて検討した。

その結果、単独では強い直接変異原性を示すDNPは、各種PAHの共存によってその変異原性が低下することが判った。また、その低下の程度は、PAHの構造と関係があり、5環式PAH (Benzo(e)pyrene, Benzo(a)pyrene) で最も著しく、4環式PAH (Benz (a)anthracene, Chrysene, Pyrene, Fluoranthene)、3環式PAH (Anthracene, Phenanthrene, Acenaphthene) の順に弱くなることが確かめられた。一方、DNPは単独では殆ど間接変異原性を示さないが、PAHと共存することによって、その変異原性は増強され、その順序は3環式から4環式さらには5環式と環数の増加に伴って増強の程度が強くなることが判った。

② ついで、PAHを含んでいる環境試料として、ディーゼル排出タール状物質と、これの分画物を用いて、DNPおよび環境存在量が多い1-Nitropyrene(NP)の変異原性に対する影響を検討した。

その結果、ディーゼル排出タール状物質は、DNPおよびNPの直接変異原性を低下させ、間接変異原性を増加させることが判った。また、その程度はディーゼル排出タール状物質の添加量に比例的であった。

ついで、ディーゼル排出タール状物質の分画物との関係を調べたところ、DNPおよびNPの変異原性に対し、最も大きな影響を与えたのは、PAHを多く含んでいる中性画分であり、酸性画分がこれに次ぎ、塩基性画分の影響は殆ど認められなかった。

③ 芳香族ニトロ化合物は電子受容性であり、PAHは一般に電子供与性であるため、両者の間に電荷移動錯体が形成されることは、一部の物質については確認されており、DNPについても同様の現象が起り、その結果、変異原性に影響をおよぼしているのではないかと考え、検討を加えたが、DNPの各種溶媒に対する溶解度が小さく錯体の生成の確認はできなかった。

そこで、芳香族ニトロ化合物からTrinitrochlorobenzene(TNCB)を、PAHからPyreneを選んで検討を行った。TNCBは弱い直接変異原性を示す物質であるが、これに、それ自体では直接変異原性を示さないPyreneを添加すると、強い変異原性を示した。このことが、電荷移動錯体の形成によるためかどうかを調べるため、TNCBとPyreneを用いて、それぞれの吸収スペクトルを調べたところ430nm付近では、TNCB単独では吸収は殆ど認められず、またPyrene単独では弱い吸収を認めた。そこで、Pyreneの濃度を一定にして、TNCBの濃度を順次増加させたところ、TNCBの濃度の増加にともなって、430nm付近に、電荷移動錯体によるものと考えられる新しい吸収帯の出現を認め、その強度は、TNCBの添加量の増加に伴って

増加することが認められた。

2. ガス状汚染物質の変異原性試験方法の開発

ガス状・蒸気状物質の変異原性の研究は、液体または可溶性物質に対する研究に比較して著しく遅れており、その実態は殆ど明らかにされていない。

そこで、ガラスチャンバー内に設置したプレートに一定量のガス・蒸気を接触させることとし、試験条件の検討を行った結果、ディーゼル排ガス中のガス・蒸気状物質は、1.0 l/minの流速で8時間暴露すればよいことが判った。

ついで、ディーゼル排ガスを粒子状物質とガス・蒸気状物質に分別して、それぞれの変異原性について検討した結果、両者とも直接変異原性を示すことが判った。また、変異原性強度を比較した結果から、ガス・蒸気状物質のそれは、粒子状物質の変異原性強度の30倍以上高いことが判った。

さらに、これらの試験方法を「たばこ」副流煙に適用した結果、*E. Coli* WP2uvrA/pKM101株を用いた間接変異原性において、ガス・蒸気状物質の変異原性は、粒子状物質に比較して10倍高い結果が得られた。

3. 変異原性試験方法の高度化に関する研究

最近、被験物質によるDNA傷害を修復する際誘導される酵素活性を測定して、被験物質の変異原性を求める方法が提案されている。umu試験法もその一つであり、DNA傷害に基づくSOS反応を β -galactosidaseを測定することによって知ろうとするものであり、Ames法に比較して、操作が簡単で、短時間に結果が得られ、かつ経済的であることから注目されている方法である。

しかしながら、この方法には、幾つかの問題点があることが判ったので、次のような改良を行った。即ち、対照溶液を従来の水から、酵素活性を停止させる以外は試料液と同一操作により調整したものを対象とした。また、菌株を培養後、その一部を再培養して試験に用いたものを、再培養操作を省略した。さらには、菌濃度と検出感度の再検討を行い、菌濃度を変更した。

この結果、着色試料の測定も可能となった他、試験時間の短縮、検出感度の向上等が認められたので、芳香族ニトロ化合物やPAHについて、改良法について試験を実施し、Ames法と比較したところ、極めて高い相関関係 ($r=0.954$) が認められた。

また、この試験法は、 β -galactosidase活性を吸光度法で求めているため、その検出感度にも問題があったが、これを蛍光光度法に変更する試験を行った結果、その感度は、40~300倍程度良くなることが判った。

以上のように本研究は、環境汚染物質の変異原性を評価するに当たって、共存物質による影響を考慮する必要があることを明らかにし、特に芳香族ニトロ化合物と多環芳香族炭化水素の共存下においては、電荷移動錯体の生成が変異原性に影響を与えることを明らかにした。また、従来、殆ど検討されていないガス・蒸気状物質の試験方法を、ディーゼル排ガスを対象として確立するとともに、大気中の変異原性物質を検索するに当たっては、ガス・蒸気状物質にも注目する必要があることを示した。さらに、変異原性試験法として、umu試験法の改良を試み、一定の成果を得た。本研究の成果は獣医公衆衛生学および毒性学の進展に寄与するところ大であり、獣医学博士の学位を授与するに値するものと認める。