東京都立産業技術研究所研究報告　第２号（1999）

論文

エイムス試験法によるγ線遺伝子損傷の定量

細田永子*

Estimation of　irradiation induced genetic damage by Ames test

Eiko　HOSODA

Abstracts　Mutation by ^{60}Co γ irradiation was studied in five different histidine-requiring auxotrophs of *Salmonella typhimurium*. The strains TA98(sensitive to frameshift) and TA100 (sensitive to base-pair substitution) were irradiated (10-84Gy and 45-317Gy, respectively) and revertants were counted. TA98 exhibited radiation-induced revertants, 2.8 fold of spontaneous revertants, although no significant increase was detected in TA100. Then, three other frameshift-sensitive strains TA1537, TA1538 and TA94 were irradiated in a dose of 61-167Gy. Only in TA94, revertants increased 3.5 fold. Since spontaneous revertants are known to be independent of cell density, a decrease of bacterial number by γ irradiation was confirmed not to affect the induced revertants by dilution test. Thus the standard Ames Salmonella assay identified γ irradiation as a mutagenetic agent.

The mutagenicity of dinitropyrene, a mutagen widely existing in food, and dismutagenicity of boiling water insoluble fraction of *Hizikia fusiforme*, edible marine alga, were tested on γ induced revertant formation in TA98 and TA94. Dinitropyrene synergistically increased γ induced revertants and Hizikia insoluble fraction reduced the synergistic effect of dinitropyrene dependently on the concentration.

Keywords : ^{60}Co γ irradiation, mutagenicity, Ames test, *Salmonella typhimurium*, TA98, TA94, frameshift-sensitive strain, dinitropyrene, *Hizikia fusiforme*, dismutagenicity

１．はじめに

人体が放射線に被曝すると遺伝子に大小さまざまな損傷が生じるが，微小な損傷の場合であっても，発癌をはじめ晩発効果の原因となることが明らかになっている。この遺伝子微小損傷の生成を低減することは放射線防護にとってきわめて重要である。

エイムス試験は，サルモネラ菌のヒスチジン要求性突然変異体を用いて，非要求性の復帰突然変異体の生成によって遺伝子変異原性を検出定量するものである。これによる試験結果はヒトをはじめとする高等生物の他の試験法での結果と高い相関を示すので，遺伝子変異原性物質の一次スクリーニング法として重視されている。

エイムス試験法は変異原性試験であり，試験菌の生死には影響しない濃度における変異原性を調べることを前提としているが，放射線遺伝子損傷を検出定量し，損傷を低減する物質を検索するための，簡便で短期的な一次的試験法として利用することを目的とした。 放射線(X, γ線)の遺伝子変異はエイムス試験法によっては検出されないと，一般論として認められている[1)]。この点について，まず，最も標準的な試験菌 TA98と TA100を用いて確認を行い，その結果を新たな３試験菌株によって追試した。

また，我々の生活に身近な食用海藻の熱水不溶性成分(いわゆる食物繊維成分)の抗変異原作用がエイムス試験法によって明らかにされたことから，変異原物質ジニトロピレン(DNP)の共存下で，放射線損傷に対する効果を調べたので報告する。

２．方　　法

2.1　菌株と菌調整

変異原性の試験菌として用いたサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* のヒスチジン要求性株は TA98, TA1537, TA1538, TA94(フレームシフト型変異検出菌, フレームシフト型と略記), TA100(塩基対置換型変異検出菌)である。ただし TA94は架橋型変異検出菌でもある。

*放射線応用技術グループ

菌の凍結保存，培養，エイムス試験の方法はすべてAmesの方法[2)3)]によった。

菌の培養，試験は37℃，暗所で行った。

菌の増殖を調べるため，凍結保存菌をニュートリエントブロス(ＮＢ)液中で浸とう培養し，１時間毎にバクテリア計算盤(ノイバイエル・萱垣)によって，培養液１ml当たりの菌数を求めた。増殖曲線で増殖相が対数期から静止期に移行する時期(培養開始後 TA98・TA1537では19時間，TA100・TA1538・TA94では18時間)の菌を実験に用いた。

2.2　γ線の照射

γ線感受性を調べるため，NB 液で浸とう培養した菌をスピッツ試験管に分取し，コバルト－60(^{60}Co）185 TBqを23－365Gy（TA98，TA100)，あるいは185TBqを63－217Gy(TA94，TA1537，TA1538)を，室温で30分間照射した。照射した試料はNB寒天培地に播種し，１－２日後にコロニー数を数えた。

試験菌をNB液中で照射してからNB寒天培地上に播種した場合と，NB寒天上に播種してから照射した場合とで，コロニー形成率に有意の差がみられなかったので，実験ではNB液中で照射を行った。また特記した以外は，プレイト３枚の平均値を求めた。

γ線誘発復帰突然変異の生成を調べる場合は，TA98では129.5TBqで10－84Gyを，TA100では185TBqで45－317Gyを，TA1537，TA1538，TA94では185TBqで61－147Gyを，それぞれ30分間照射した。　照射した試料の0.1mlを採り，トップアガー2.0ml（ヒスチジン0.5 mM，ビオチン0.5mM，NaCl0.5%を含む）とよく混和した後，ミニマム寒天培地(MA）上に播種した。プレートは48時間後にコロニーを数えて変異体数とした。

自然発生復帰変異体数の場合は，菌数をNB液で６段階（１－0.01）に希釈して後，それぞれ0.1mlを採り，以下，同様に処理した。

DNP，ヒジキ成分を使用する場合は，菌0.1mlをトップアガーと混ぜてMA上に播き，約30分間静置してから照射を行った。プレイト２枚の平均コロニー数を復帰変異体数とした。

2.3　DNPの調整

DNPはDMSO溶液（１μg/ml）を保存液として，使用直前にその３ ngをトップアガーに混入して，プレイト当たり３ ngとした。

2.4　ヒジキ成分の調整

食用海藻は熱水不溶性成分の抗遺伝子変異原性の最も高かったヒジキを材料とした。熱水不溶性成分（成分と略記）の抽出分画法は既報[4)]による。ヒジキ成分は乾燥状態で保存し，実験時にプレイト当たりの量をトップアガーと混和して使用した。

３．結果と考察

3.1　γ線誘発復帰変異体の検出定量

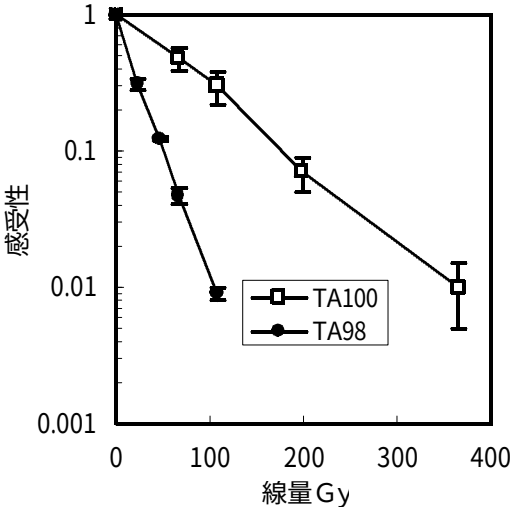


図１　TA98とTA100のγ線感受性

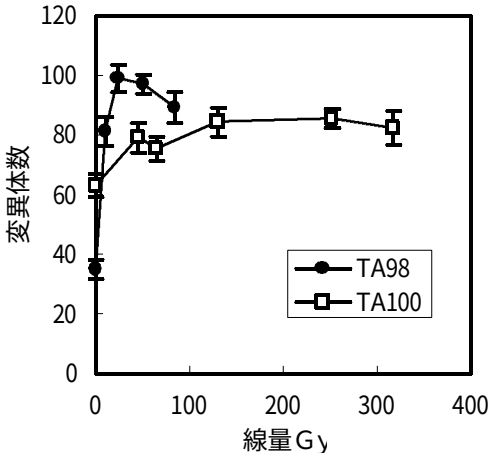


図２ TA98とTA100のγ線誘発復帰変異体数

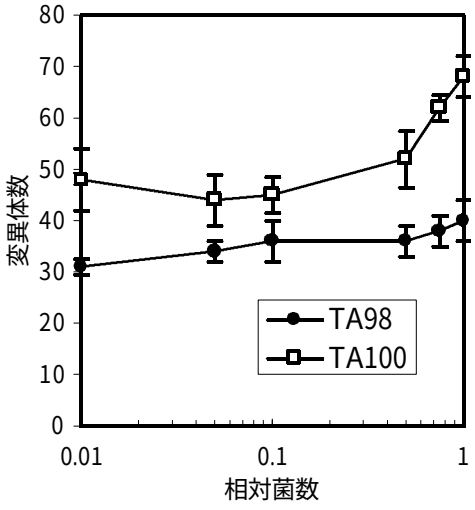


図３ 播種菌数による自然発生変異体の出現数

コロニー形成能を指標とした TA98と TA100のγ線感受性を図１に示す。γ線感受性は直線性を示し，LD_1が TA98では100Gy，TA100では350Gy であった。遺伝子変異原性を調べるため，LD_1線量以下の線量を照射した。図２にγ線照射後の復帰変異体数を示す。TA98では線量域10－84Gy で，非照射バックグラウンド（自然発生変異体）の最大で2.8倍の復帰変異体が生じている。TA100では照射による増加はほとんど見られない。

エイムス試験法の原理では，自然発生変異体数が播種菌数に比例しないことが知られている。γ線照射では菌数そのものが減少するので(図１)，菌数を0.75－0.01に希釈して播種した場合の自然発生変異体数を調べた(図３)。TA98の場合，γ線誘発変異体が出現した84Gy 以下(すなわち LD_1以上)の線量域で自然発生変異体数が有意の増減を示さないので，図２の結果はそのままγ線によるものとみることができる。TA100では相対菌数0.1－0.05域での減少が平均値で24となることを考慮すると，図２では実際には約1.7倍の復帰変異体が生じているといえるが，誤差の範囲であるとみなした。

TA98がフレームシフト型であることに着目して，さらに別のフレームシフト型菌 TA1537，TA1538，TA94で追試を行った。３試験菌ともにγ線感受性はほぼ直線性を示し(図４)。線量域61－147Gy(LD_{1-8}以上)で復帰変異体数を調べたところ，TA94でのみ増加がみられた(図５)。菌数の希釈に伴う自然発生変異体数の変化を調べた結果（図６)は，61－147Gy の線量域では３試験菌ともに有意の増減を示さず，図５の結果はそのままγ線誘発変異体とみることができることを示す。TA94の変異体出現は自然発生の3.5倍である。

3.2　DNPとヒジキ成分の共存効果

TA98にヒジキ成分０，10mg の存在下でγ線を照射して復帰変異体数をしらべたところ，ヒジキ成分の効果はみられなかった。そこで，微量ながら食品中に広く存在する変異原性物質であり食用海藻成分の抗変異原効果が特に顕著であった DNP [4] が TA100よりも TA98に強い抗変異原性を示す物質なので，TA98によるγ線誘発変異体生成への影響と，この実験系でのヒジキ成分の効果を調べた。

TA98に DNP ３ ng とヒジキ成分の存在下でγ線照射した(図７)。非照射では，DNP による変異体数は475から，242，190と低下し，ヒジキ成分の抗変異原性を示している。DNP 存在下の変異体数は照射によって相乗的な増加が見られ，24Gy 照射時で比較すると，増加数は約50である。ヒジキ成分０，５，10ng の存在下で DNP による変異体増加率はそれぞれ1.8，1.3，0.9と計算され，DNP の相乗効果が低減され，成分10mg では相乗効果は全くみられないことがわかる。

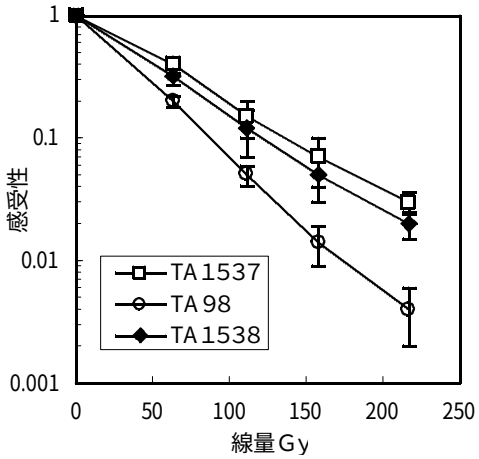


図４ TA1537、TA1538、TA94のγ線感受性

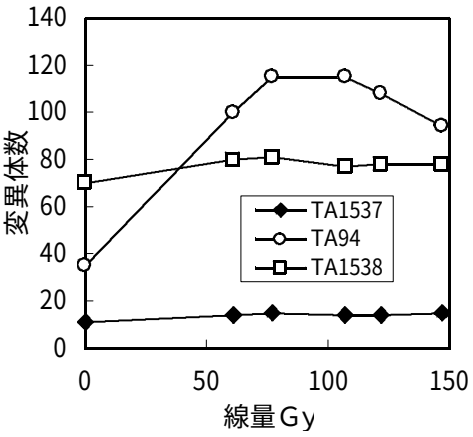


図５ TA1537、TA1538、TA94のγ線誘発復帰変異体数

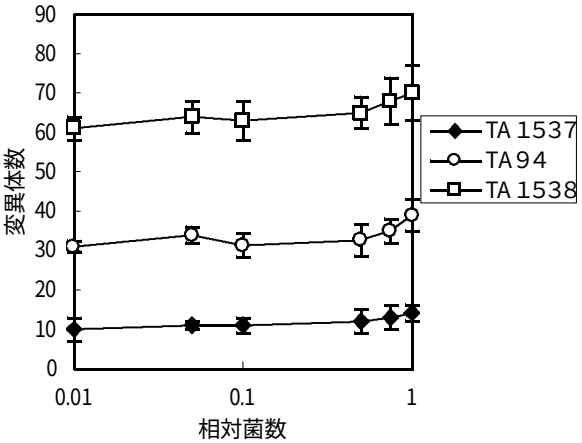


図６ 播種菌数による自然発生変異体の出現数

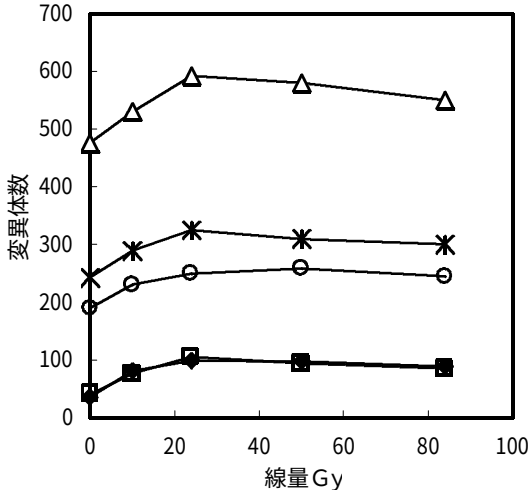
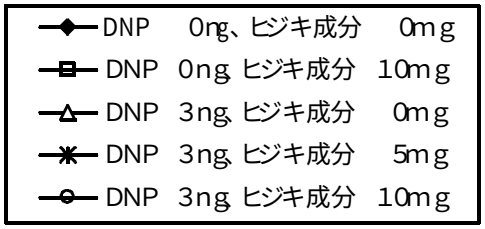


図７ TA９８のγ線誘発変異へのDNPとヒジキ成分の効果



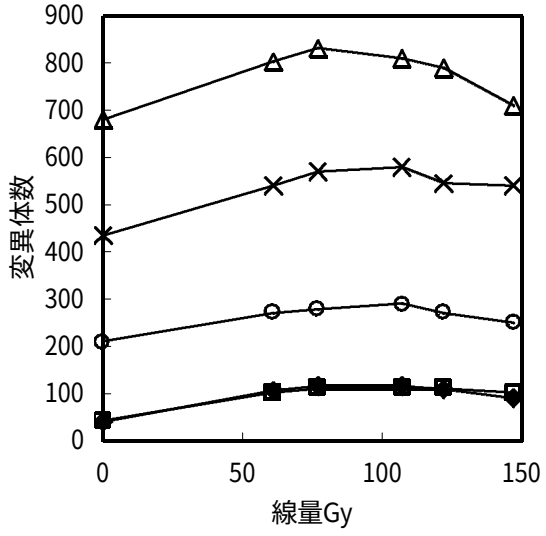


図８ TA９４のγ線誘発変異へのDNPとヒジキ成分の効果

凡例は図７に同じ

TA94に対する DNP の効果を調べたところ，強い変異原性を確認したので TA98の結果を追試した(図８)。TA94でもγ線誘発変異体に対してヒジキ成分の効果はみられなかった。非照射では DNP による変異体数は680からヒジキ成分の濃度に依存して低下した。77Gy 照射では DNP による増加数は152である。ヒジキ成分０，５，10 ng の存在下で DNP による増加率は2.0，1.8，1.3であり，DNP の相乗効果は低減されるが TA98の場合ほど顕著ではなかった。

４．ま　と　め

エイムス試験法によって TA98と TA94において，γ線照射を変異原として遺伝子損傷の検出定量が可能であることがわかった。γ線による復帰変異体の出現率は自然発生の約３倍であり，高くはなかった。 両試験菌は共にフレームシフト型変異検出菌であるが，これらにおけるγ線誘発変異の出現の機構については検討中である。TA98と TA94で，DNP はγ線照射の変異原作用を増幅する作用があることがわかった。DNP 共存による変異体数増加は約２倍であった。ヒジキの食物繊維成分の抗変異原効果は主として吸着によることが判明しているが，この増幅作用を低減させる効果があった。

エイムス試験は，一般的には試験菌を死なせることのない濃度での変異原性を検出することを目的としている。γ線照射を変異原とした場合は，生残菌の変異を検出している。この実験でも，γ線誘発変異の検出された照射域は LD_{10}から LD_{30}線量に当たる。ここに報告した結果は，高等生物の培養細胞での低線量照射の実験系において追試する意味があると考える。

参考文献

１）武部啓：がんはなぜできるか，31-35，裳華房(1995)．

２）N．B．Ames et al.: Proc．Natl．Acad.，USA，70，2281-2285（1973)．

３）変異原性試験 Q ＆ A －厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく，30-35，サイエンティスト社(1995)．

４）大川いずみ他：食品衛生学雑誌，34(2)593-596(1993)．

（原稿受付　平成11年８月11日）