

# 姉妹染色分体交換, 染色体異常および SOS 反応誘導能を指標にした 3-クロロ-4-(ジクロロメチル)-5-ヒドロキシ-2(5H)-フラノン (MX) の変異原性

大江 武, 伊藤 久恵, 川淵 美香, 十河 美容, 本田 和美

Mutagenicity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone [MX] in the cultured mammalian cell and the microbial system

Takeshi Ohe, Hisae Ito, Mika Kawabuti,  
Miyoko Sogo and Kazumi Honda

## I. 緒 言

水道原水の塩素処理によって, 多くの複雑多岐にわたる変異原性, 発癌性を有する有機塩素化合物が生成する<sup>1)~3)</sup>。また, 河川水および湖沼水等にも多くの変異原物質の存在することが明らかにされてきている<sup>4)~6)</sup>。地球的規模から見た場合, 人が日常的に利用し得る地表水は, 地球水資源の2.159%であり, そのうち淡水湖および河川水は, わずか0.0091%にしか過ぎない<sup>7)</sup>。このような状況からも, 河川水および湖沼などの公共水域の水質保全是はかるとともに, 人が日常的に利用する水道水の安全性確保が強く望まれる。

水道原水や水道水源となる都市河川水の塩素処理によって, 変異原活性が増強することや, 汚染の影響を強く受けている都市河川水では, 変異原活性の増強が著しいことも知られている<sup>8,9)</sup>。水道原水の塩素処理によって生成する, あるいは水道水中に存在する微量有機化学物質としては, クロロホルムなどのトリハロメタンをはじめとして多環芳香族炭化水素類, フタル酸エステル, 農薬など多くの定量, 同定が行われてきているが, いずれも総変異原活性に占める寄与率としては, 微々たるものであった。1984年 Holmbom *et al*<sup>10)</sup> によってパルプ工場排水

に存在することが報告された MX は, *Salmonella typhimurium* TA 100株で極めて強い活性を示す塩基置換型の直接変異原物質である。MX はフミン質の塩素処理によって生成すること, 従って塩素処理を施した水道水中にも含まれることが明らかとなった<sup>11,12)</sup>。また, その強い変異原活性から, 水道水の総変異原活性の20-50%寄与していることが報告され<sup>12,13)</sup>, 注目されてきている。

発癌性あるいは遺伝毒性を予測する方法として多くの変異原性試験が実施されてきているが, 変異原性試験の新たな問題点として「非変異・癌原性物質」や「変異・非癌原性物質」の存在も明らかにされてきており, 発癌性および遺伝毒性の評価は, 複数の試験方法に基づいてされなければならない。

本文では, Ames 試験で強力な変異原活性を有することが知られている MX の培養細胞を用いた姉妹染色分体交換 (SCE) および染色体異常ならびに *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002 を用いた umu 試験での SOS 反応誘導能を指標にした変異原性の結果を報告する。

## II. 実験方法

### 1. 被験物質

3-クロロ-4-(ジクロロメチル)-5-ヒドロキシ-2(5H)-フラノン [MX] (Ultrafine Chemical Co., USA) は, ジメチルスルホキシドに溶解して実験に供した。MX の構造式を Fig. 1 に示す。陽性対照物質としてアドリアマイシン (ADM, ドキソルビ

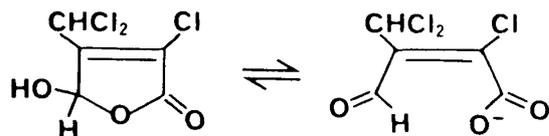


Fig. 1. Structure of MX, showing transition between ring and chain tautomeric forms<sup>13)</sup>

シン塩酸塩、協和醸酵)を用いた。

## 2. 培養細胞および菌株

チャイニーズハムスター肺繊維芽細胞由来のCHL細胞(JCRB細胞バンクより供与を受けた)を用いた。細胞は10%の牛血清(Gibco)を含むMEM培地(日水製薬)で、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養し、4日ごとに継代を行った。染色体のモード数は25本で倍化速度は約15時間である。

umu試験で用いる *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002 は大阪府立公衆衛生研究所小田美光氏より供与を受けた。

## 3. 姉妹染色分体交換(SCE)試験

直径60mmのシャーレ(培養液4ml)当り10<sup>5</sup>個の細胞を播種し、培養2日目に種々の濃度の被験物質を、5-ブromo-2'-デオキシウリジン(5μg/ml、終濃度)とともに添加して、24時間処理した。細胞採取2時間前にコルセミド(0.2μg/ml、終濃度)を加え、処理した。トリプシン処理して細胞を回収し、75mM KClで低張処理後、冷却した酢酸—メタノール(1:3)液で細胞を固定した。適当な濃度の細胞浮遊液とし、スライドガラス上に滴下、乾燥後ヘキスト33258による蛍光染色ならびに2%ギムザ液で15分間染色して染色体標本作製した。

顕微鏡下(1,000倍)で1用量につき25個の分裂中期細胞を観察し、SCE頻度を計数した。また、1用量につき、1,000個以上の細胞を観察し、全細胞中の分裂中期細胞の割合(分裂指数, Mitotic Index)を求め、細胞毒性の指標とした。細胞毒性のため、分裂中期細胞が得られなかった場合には、表中にはtoxicと記入した。

## 4. 染色体異常試験

直径60mmのシャーレ(培養液4ml)当り10<sup>5</sup>個の細胞を播種し、培養2日目に種々の濃度の被験物質を添加して、24時間処理した。細胞採取2時間前にコルセミド(0.2μg/ml、終濃度)を加え、処理した。以下、SCE試験と同様に適当な濃度の細胞浮遊液を調整し、スライドガラス上に滴下、乾燥後2%ギムザ液で15分間染色して染色体標本作製した。

顕微鏡下(1,000倍)で1用量につき100個の分裂中期細胞を観察し、構造異常および染色体数の異常を持った細胞を計数した。染色体異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会によって編集されたアトラス<sup>14)</sup>に準じて行った。また、SCEと同様の方法で分裂指数を求めた。

## 5. umu試験

*Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002 を使用して、Oda *et al*<sup>15, 16)</sup>の方法に準拠して行った。すなわち、LB培地(トリプトン1%、酵母エキス0.5%、食塩0.5%にアンピシリン25μg/mlの割合で加えたもの)にて一夜培養した菌液をTGA培地(トリプトン1%、食塩0.5%、グルコース0.2%にアンピシリン20μg/mlの割合で加えたもの)で50倍に希釈し、さらに37°Cで培養した。菌濃度が、0.25-0.30(A<sub>600</sub>)に達したとき、この菌液2.9mlおよび被験物質を溶解した試料0.1mlを試験管に加えて、さらに2時間培養した。この菌液0.2mlを菌体内に産生されたβ-ガラクトシダーゼ活性の測定に、残りを菌の濁度(A<sub>600</sub>)測定に用いた。β-ガラクトシダーゼ活性はMillerの方法<sup>17)</sup>により測定し、次式により活性値を測定した。

$$\begin{aligned} & \beta\text{-ガラクトシダーゼ活性値 (unit)} \\ & = 1000 (A_{420} - 1.75 \cdot A_{550}) / t \cdot v \cdot A_{600} \\ & t = \text{反応時間 (分)} \\ & v = 0.1 \text{ (菌液希釈率)} \end{aligned}$$

## III. 結 果

### 1. CHL細胞でのMXのSCE誘発

CHL細胞を用いた直接法によるMX 0.25~20μg/mlの濃度範囲でのSCE誘発能の観察結果をTable 1に示す。0.25~5μg/mlの分裂指数の低下が見られない濃度範囲でchemical-free controlとの間に有意差があること(p<0.01)、また濃度依存性のSCE誘発能が認められた。10μg/mlの濃度では分裂指数の著しい低下は認められなかったものの、SCEの観察は不能であった。20μg/mlの濃度では、分裂中期の染色体は全く認められなかった。0.05μg/mlの濃度でSCEの平均値は21.00と最高値を示し、陽性物質として実施したアドリアマイシン0.05μg/mlの濃度でのSCEの平均値と近似しており、MXのSCE誘発能の強さは、アドリアマイシンの約100分の1であるといえる。

### 2. CHL細胞でのMXの染色体異常誘発

CHL細胞にMXを、1.25~20μg/mlの濃度範囲で、24時間作用させた場合の染色体構造異常頻度な

**Table 1.** Sister chromatid exchanges induced by MX in CHL cells

Chemical dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mitotic index (%)	SCE		
		Mean $\pm$ SD	Range	
MX	0.25	5.2	11.38 $\pm$ 3.30 <sup>1)</sup>	7-20
	0.5	4.4	11.68 $\pm$ 4.29 <sup>1)</sup>	4-25
	1.0	5.2	11.90 $\pm$ 3.25 <sup>1)</sup>	7-26
	2.0	6.4	14.16 $\pm$ 4.80 <sup>1)</sup>	9-26
	5.0	3.0	21.00 $\pm$ 4.90 <sup>1)</sup>	15-27
	10.0	1.7	toxic	
	20.0	0	toxic	
ADM	0.025	2.8	13.64 $\pm$ 2.91 <sup>1)</sup>	9-19
	0.05	2.5	22.48 $\pm$ 4.30 <sup>1)</sup>	16-31
	0.1	2.2	24.20 $\pm$ 3.45 <sup>1)</sup>	18-30
chemical-free control	5.5		7.42 $\pm$ 2.13	3-12

<sup>1)</sup> Significantly different from control,  $p < 0.01$

らびに異常細胞出現頻度(%)の観察結果をTable 2に示す。1.25~10  $\mu\text{g/ml}$ の分裂指数の低下がみられない濃度範囲で、ctg(染色分体ギャップ), ctb(染色分体切断), cte(染色分体交換)など染色分体型の異常が認められ、異常細胞出現頻度もゆるやかな濃度依存性の誘発が観察された。しかし、その最大値は、10  $\mu\text{g/ml}$ で5.5%であり、陽性対照物質のアドリアマイシンで染色分体ギャップ、切断および交換型構造異常の著明な増加がみられることと比較しても、MXの染色体異常誘発能は極めて弱いことが伺われた。

化学物質の染色体異常試験の定量的評価を行うことによって、相対的な強さの比較が実施されている。

その判定基準としては、構造異常の細胞出現頻度が10%以上の物質についてのみ行われることになっており、本実験で実施したMXの染色体異常試験の結果は疑陽性であった。

### 3. umu試験でのMXのSOS反応誘導能

Fig. 2に示すようにMXは、0.05~0.42  $\mu\text{g/ml}$ の低い濃度範囲で、SOS反応誘導の指標である $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇を認め、それ以上の濃度では活性は低下した。

## IV. 考 察

フミン質の塩素処理に伴って生成するMXは *Salmonella typhimurium* TA 100株を用いたAmes

**Table 2.** Chromosome aberration induced by MX in CHL cells

Chemical dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mitotic index (%)	ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	total	aberrant cells (%)
MX	1.25	4.2	1	0	0	0	0	1	0.5
	2.5	3.9	3	1	0	0	0	4	2.0
	5.0	4.2	5	1	1	0	0	7	3.5
	10.0	2.4	3	4	4	0	0	11	5.5
	20.0	0			toxic				
ADM	0.025	5.3	8	10	21	0	0	39	28
	0.05	2.7	37	38	127	0	0	202	73
	0.1	3.0	28	102	266	0	0	396	92
chemical-free control	7.1	0	0	0	0	0	0	0	0

ctg; chromatid gap, ctg; chromatid break, cte; chromatid exchange, csg; chromosome gap, csb; chromosome break, cse; chromosome exchange

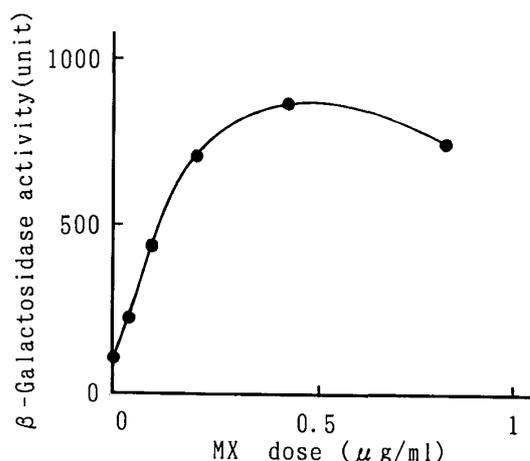


Fig. 2. Dose-response relationship between SOS-inducing activity and dose of MX

試験で、1 nmol 当り約13,000 revertants を示す極めて活性の強い直接変異原物質である<sup>10)</sup>。水道水の総変異原活性の20-50%寄与しているとの報告もみられる<sup>12, 13)</sup>。

Kinae *et al*<sup>18)</sup> による日本での10都市の水道水中MX濃度を測定した結果から、大阪の水道水にはリットル当り最大 33 ng 含まれているなど大都市の水道水には、地方都市に比較して多く含まれていることも明らかにされてきた。

今回、我々はMXを *in vitro* での哺乳動物細胞の系と微生物の系での変異原性を比較検討した。その結果、CHL細胞でSCE誘発能のあることを認めたが、染色体異常誘発能は疑陽性と判断した。*Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002を用いるumu試験では、0.05~0.42 μg/mlの濃度でSOS反応誘導能のあることを認め、微生物の系と哺乳動物細胞の系での変異原活性との間には大きな差があることが明らかとなった。SCEおよび染色体異常誘発能に関しては、Brungborg *et al*<sup>19)</sup> は、V79細胞でSCE誘発能があることを、Meier *et al*<sup>13)</sup> は、CHO細胞で染色体異常誘発能のあることを報告している。

MXの発癌性試験の結果は、現段階では明らかにされていないが、*in vitro* での微生物と哺乳動物細胞でのこれまでに報告されている結果から判断すると、微生物の系で観察されている極めて強い変異原活性は、哺乳動物細胞の系では認められていない。

*in vivo* での実験結果でも、Meier *et al*<sup>13)</sup> は、Swiss-Webster系マウスへのLD<sub>50</sub> (128 mg/kg)の70%の経口投与でも、マウス骨髄で小核の誘発が認められなかったことを、Brungborg *et al*<sup>19)</sup> は、

Wister系ラットへの経口投与で、小腸、大腸、胃、肝、腎、肺、骨髄、膀胱、睪丸などいずれの組織にも、アルカリ溶出法でのDNA損傷は認められなかったことを報告している。

最近、Ames法で陰性の非変異・癌原物質が問題となってきている。その作用を主として発癌プロモーター作用によるものとの考えがなされ、種々の検出法も検索されている。

Furihata *et al*<sup>20)</sup> は、MXの経口投与後のラット胃幽門腺部粘膜で、アルカリ溶出法でのDNA1本鎖切断の誘導能を指標としたイニシエーター作用のみならず、オルニチン脱炭酸酵素および複製DNA合成誘導を指標としたプロモーター作用が認められたことを報告している。

MXの発癌性の有無はいずれ明らかにされるであろうが、MXの変異原性を様々な試験法から総合的に評価していくことは、我々の身の回りに存在する化学物質の変異原性と発癌性あるいは遺伝毒性とのgapを考察する上で、重要な課題を提供してくれるものと思われる。

## V. 要 約

フミン質の塩素処理に伴って生成し、*Salmonella typhimurium* TA 100株を用いたAmes試験で、極めて強力な直接変異原物質であることが知られているMXの変異原性を、CHL細胞を用いたSCEおよび染色体異常試験ならびに*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002を試験菌株に使用したumu試験により検討した。その結果、SCE試験では、0.25~5 μg/mlの濃度範囲で濃度依存性の誘発能を示したが、染色体異常試験では疑陽性であった。

一方、umu試験では、0.05~0.42 μg/mlの低い濃度範囲で良好な濃度依存性のSOS反応誘導能を示した。以上の結果より、MXの哺乳動物細胞を用いる系では、微生物の系でみられるほどの強い変異原活性は認められなかった。

## 参 考 文 献

- 1) G. R. Douglas, E. R. Nestmann and G. Lebel *Environ. Health Perspec.*, **69**, 81 (1986)
- 2) F. Fielding and H. Horth, *Wat. Supply*, **4** 103 (1985)
- 3) J. R. Meier, *Mutat. Res.*, **196**, 211 (1988)
- 4) S. Maruoka and S. Yamanaka, *Mutat. Res.*, **79**, 381 (1980)

- 5) S. Onodera, *J. Chromatogr.*, **557**, 413 (1991)
- 6) 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野 仁, 変異原性試験, **1**, 18 (1992)
- 7) 合田健編, 水質環境科学, 丸善株式会社 (1985)
- 8) 富田基郎, 真鍋 仁, 浜田 昭, 水質汚濁研究, **3**, 187 (1980)
- 9) T. Ohe, H. Ito and M. Kawabuti, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**, 293 (1993)
- 10) B. Holmbom, R. H. Voss, R. D. Mortimer and A. Wang, *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 333 (1984)
- 11) J. Hemming, B. Holmbom, M. Reunanen and L. Kronberg, *Chemosphere*, **15**, 549 (1986)
- 12) L. Kronberg, B. Holmbom, M. Reunanen and L. Tikkanen, *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 1097 (1988)
- 13) J. R. Meier, W. F. Blazak and R. B. Knohl, *Environ. Mol. Mutagen.*, **10**, 411 (1987)
- 14) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, 化学物質による染色体異常アトラス (1988)
- 15) Y. Oda, S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa, *Mutat. Res.*, **147**, 219 (1985)
- 16) 石館基編, 毒性試験講座12変異原性, 遺伝毒性, 地人書館 (1992)
- 17) J. H. Miller, *Experiments in molecular genetics*, cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, new York (1972)
- 18) N. Kinai, C. Sugiyama, M. Y. Nasuda, K. Goto, K. Tokumoto, M. Furugori and K. Shimoi, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 333 (1992)
- 19) G. Brunborg, J. A. Holme, E. J. Soderlund, J. K. Hongslo, T. Vartiainen, S. Lotjonen and G. Bechner, *Mutat. Res.*, **260**, 55 (1991)
- 20) C. Furihata, M. Yamashita, N. Kinai and T. Matsushima, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 341 (1992)