

総括研究報告書

化学物質の光毒性に係る評価方法に関する研究

主任研究者 小野 宏 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所 所長

研究要旨

本研究では、光(紫外線)照射による化学物質の毒性の増強、とくに変異原性の増強の事実を確認し、その発現機序を解明するとともに、これを効率的に検出する試験法を開発することを目的とする。現在までに、培養細胞を用いた試験系を用いて、光遺伝毒性を示す物質として多環芳香族炭化水素類などの一般化学物質が多数含まれ、低濃度においても光照射下で毒性作用を発揮することを明らかにしてきた。そこで、このような現象がどの範囲の化学物質に及ぶのか、またどのような条件で実際の生体に影響を発現するかを、その発現機序の解明を含めて検討する必要がある。そのためには、光毒性物質の光吸収や光源の分光放射特性を調べる必要がある。光(紫外線)による毒性増強の機序として、まず光化学反応によるフリーラジカルの発生、関与が想定されるので、化学物質と光(紫外線)照射の同時処理の条件での活性酸素の発生に関する検討を行う。実際の生体に対してこの現象がどの程度健康影響を有するかを評価するために、各種の生物モデル(細菌、ショウジョウバエ、水生生物、培養細胞、実験動物などの利用)を用いて、光(紫外線)照射の化学物質の毒性への影響についても調査する。

分担研究者

田中 憲穂 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所細胞毒性学研究室 室長
渋谷 徹 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所遺伝学研究室 室長
大原 直樹 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所薬理化学研究室 室長
原 巧 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所遺伝学研究室 上級研究員
長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科
薬品代謝化学教室 生物有機化学 教授
林 真 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 部長

A. 研究目的

オゾン層の破壊が進み、紫外線の地表への到達量が増えている一方で、紫外線と環境中の化学物質との相互作用が危惧されている。化学物質の中には、紫外線(主に UV-A、UV-B)照射によって活性化もしくは分解され、極めて強い毒性を示す物質があることがわかってきた。この原因として、遺伝的な傷害が大きな要因となっている可能性が示唆されており、光を触媒とする化学物質の作用によって発がんやアレルギー性疾患が増加する事と密接に関連してくる重要な事象である。しかしながら現在までのところ、培養細胞を用いる試験系で認めら

れたこれらの現象の本格的評価はなされていない。また、それぞれの化学物質がいかなる機構によって毒性を発現するのか明確にされていない部分が多い。これらの問題を明らかにするため本研究では、

a. 主に既知の光毒性物質を用いて、化学物質の構造とその活性相関を検討した上で、

b. 光毒性発現の様式とその条件について調べ、各種の *in vitro* の試験系を用いてそれぞれの化学物質の毒性作用を評価する。その上で、これらの化学物質を検出する簡便な実験系を確立する。

c. 皮膚細胞での紫外線特異的突然変異や小核誘発をマーカーとして、実験動物を用いて実際の生体への影響を解明し、この現象の発現機構を明らかにすると同時に、最適な評価系を作出する。これらの結果より、光発がんを含むヒトの健康への影響を評価する基礎データをうる。

本研究は、これまでの研究により光毒性が示唆されている各種の原料化学物質、多環芳香族炭化水素をはじめとする各種の生活関連化学物質等を用い、*in vitro* および *in vivo* の各種毒性試験法による光(紫外線)存在下での生体影響を調べる。メカニズムに関しては、活性酸素研究の専門家と協力して研究を進め、光増感現象による化学物質の毒性発現の実態と影響についての評価を行う。

B. 研究方法および研究結果

1) 化学物質の毒性の光増感現象の検査法とその評価に関する調査研究

最近問題となっている光照射による化学物質の毒性修飾の検査法に関する国際的動向の調査のため、OECD 試験法ガイドライン計画第 11 回各国代表者会議、および動物実験代替法世界会議の各会議に参加し、この方面の情報を確実に得ることに努めた。毒性試験法は、科学の進歩に基づいて、また、動物愛護運動への対応の必要もあって、改良・開発が盛んに試みられており、動物を用いる毒性試験の代替法として *in vitro* 試験法の開発

が進められている。*In vitro* 試験法が毒性試験代替法として採用されるまでには、厳しい論理に基づいた有用性確認が必要であり、光毒性検査法についても、有用性確認試験が重ねられ、有用性の検討が行われている。そのため相当の時日の経過があったが、2000 年 2 月にいたり、ようやく *in vitro* 光毒性試験法のガイドラインの提案が OECD になされた状況となっている。(小野)

2) 光源の分光放射特性による光遺伝毒性発現の差異

本年度は、試験に用いる光源の種類とその光遺伝毒性発現に及ぼす影響を検討した。一般に、光源の種類が異なると、同一の被験物質でも光毒性・光遺伝毒性の発現が異なることが知られている。そのため、不適切な光源や照射条件の設定によって、誤った結果が得られる可能性も考えられる。そこで、EU/COLIPA の *in vitro* 光細胞毒性試験のバリデーションに用いられたメタルハライドランプと、*in vitro* 光遺伝毒性試験の分野でよく用いられているキセノンアークランプを用いて、モデル物質の光遺伝毒性発現を比較した。光遺伝毒性の評価には、チャイニーズハムスターCHL/IU 細胞を用い、評価系には染色体異常試験および *in vitro* 小核試験を用いた。

まず、光照射のみによる染色体異常の誘発を比較したところ、メタルハライドランプでは、 $5.0 \sim 7.0 \text{ J/cm}^2$ でわずかに認められたのに対し、キセノンアークランプでは、 0.6 J/cm^2 以上で強い染色体構造異常誘発性が認められ、光源によって大きく異なることが示された。光遺伝毒性試験の照射条件は、光照射による影響が軽微な線量範囲で、最大の照射線量を用いることが望ましい。今回の結果から、照射の条件は光源ごとに個別に設定する必要があることが示唆された。

次に、それぞれの光源に適切と判断された照射条件を用いて、ベンツ[a]ピレンおよび 8-メトキシソラレンの光遺伝毒性試験を行った。その結果、8-メ

トキシソラレンでは、メタルハライドランプが、キセノンアークランプより、約 10 倍感度が高いことが示された。また、ベンツ[a]ピレンでは、メタルハライドランプを用いた実験では陽性の結果を得たのに対し、キセノンアークランプでは陰性の結果を得た。以上のように、光源の種類によって、モデル物質の光遺伝毒性検出感度に差があることが示された。(田中)

3) 哺乳動物を用いる変異原性試験に対する光照射の影響に関する研究

紫外線照射によって変異原性が発現または増強される化学物質の検出法として、皮膚を標的とした in vivo 試験系の開発が重要なものの一つとして挙げられる。Nishikawa らは、ラットの背部皮膚を用いて、経皮投与された変異原性物質によって誘発された表皮細胞の小核を検出する試験系を開発した。本年度は、ラット背部皮膚を用いた、表皮細胞の小核を検出する試験系を光遺伝毒性試験に応用するための基礎的な実験を行った。

また、遺伝的に多くの系統が確立しておりまた遺伝子改変動物も作出されているマウスでの小核試験系の確立を目指した。今回は、C57BL/6 マウスの皮膚小核の背景データを得る目的で、無処理マウスの背部より採取した表皮細胞の小核について観察した。

8 匹のマウスについて、1 匹あたり 1000 個の細胞を観察した結果、各動物の小核を有した細胞は 1 個または 0 個であり、陰性対照群において小核出現頻度は高くないことがわかった。Nishikawa らは、ICR マウスを用いた小核試験において、変異原性物質 (Mitomycin C および Methyl methanesulfonate) 投与によって明瞭な小核の増加を認めている(私信)。(渋谷)

4) 微生物を用いる光遺伝毒性試験の確立

光照射によって変異原性が発現または増強される化学物質の検出法について、突然変異誘発

性の検出に広く用いられている検定菌を用いた Ames 試験の応用を試みてきた。本年度は、Ames 試験で用いられている *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537、TA102 および *E. coli* WP2uvrA、WP2uvrA/pKM101 および WP2/pKM101 の 8 種類の検定菌を用いた。

まず、それぞれの菌株により突然変異誘発に関する特性が異なること、UV に対する感受性が異なることを考慮して、まずそれぞれの菌株に適した照射線量を検討することが必要と考えられた。また、照射線量の違いにより菌株の生存率が大きく変わることと、さらに陽性物質の持つ抗菌作用なども考慮に入れて、照射線量を 1 線量のみでなく、複数設定し、いくつかの条件で比較検討することが望ましいと考えられた。

光照射による変異原性の発現または増強については、8-Methoxypsoralen (8-MOP)、Chlorpromazine (CPZ) および Methylene blue (MB) の 3 種類の物質について、それぞれの感受性についての比較検討を行った。その結果、8-MOP は、活性酸素生成物質が検出できる TA102 および WP2/pKM101 においてのみ陽性となることが明らかとなった。CPZ は、TA98 と TA1537 で特に強い陽性を示すことから、光照射によって主にフレームシフト型の突然変異が誘発されていることが示唆された。MB は、光照射により遺伝毒性を示すが、8-MOP や CPZ に比べるとその誘発作用は弱かった。

以上の結果から、微生物を用いる光遺伝毒性試験を実施する場合には、まずそれぞれの菌株に適した照射線量を検討すること、また照射線量は複数設定することが推奨される。なお、用いた 8 種類すべての菌株において、8-MOP、CPZ および MB いずれかの物質を陽性対照物質として光遺伝毒性試験に用いることが可能となった。(渋谷)

5) モルモットにおける急性皮膚刺激性試験 (適用経路の検討)

昨年度、モルモットにおける急性皮膚光刺激性試験方法としての有用性が示唆された、角質層の剥離層を除去して検体を2度に分けて適用するという方法を用いて、幾つかの被験物質について急性皮膚光刺激性を検討した。その結果、適用方法の改良により若干感度を上げることが出来たが、さらに経皮吸収促進剤も考慮に入れ、より適した溶媒の選択方法を検討する必要があると考えられた。そのため、経皮吸収促進剤を含めた媒体についての追加試験を実施した。

被験物質としては、既知の光毒性物質である、8-メトキシソラレン、ニュートラルレッド、ローズベンガル、塩酸クロロプロマジン、テトラサイクリン、ピロキシカン、オフロキサシンを用いた。これらに、媒体として蒸留水、エタノール、ジメチルスルホキシドを組み合わせて投与し、光刺激性を比較した。また、経皮吸収促進剤 SLS の併用、ジメチルスルホキシドやカルボキシメチルセルロースナトリウムを媒体とした皮内投与についても検討した。

その結果、塗布の媒体としては、エタノール、DMSO、蒸留水の順で優れていることが明らかになったが、化学物質によっては、その限りでないことが示された。また、SLS 併用によって、光刺激性の増強が認められた。皮内投与については、化学物質によっては非照射でも刺激性が増強し、不適切な場合があることが示された。(大原)

6) ショウジョウバエを用いる光遺伝毒性試験の研究

本年度は、in vivo の変異原性試験の中では検出感度が高く、比較的簡便な系であるショウジョウバエ翅毛スポットテストを、光遺伝毒性試験として確立することを目的とした。昨年度は、UVA を含むサンライトシュミレーター(SOL500, Dr Hönle)を用いて、照射条件等の基礎的な検討を行った。今年度は、光遺伝毒性物質として知られる8-メトキシソラレン(8-MOP)を用いて、実験方法の確立を目指した。実験にはキイロショウジョウバエの多翅毛系

統の雌と、炎毛系統の雄を交配して得られた F1 個体を用いた。産卵後約72時間の3齢幼虫を培地から分離し、8-MOP 懸濁液の入ったプラスチックシャーレに移して、サンライトシュミレーターの照射を行った。照射後の幼虫はインスタント培地に移して飼育を続け、羽化した成虫の翅を顕微鏡で観察した。幼虫期に染色体組換えや遺伝子突然変異等の遺伝的損傷が生じると、成虫の翅に異常な翅毛(翅に生えている微毛)の集まりである、翅毛スポットが生じる。翅毛スポットには、多翅毛または炎毛の小シングルスロットおよび大シングルスロットと、多翅毛と炎毛のスポットが隣接したふたごスポットがある。サンライトシュミレーター非照射の場合は、8-MOP 20 $\mu\text{g/mL}$ 処理では各種の翅毛スポットの頻度は増加しなかったが、UVA の照射強度 1 mW/cm^2 で5時間の照射(18 J/cm^2)を行った場合は、8-MOP の用量に依存したスポット頻度の増加が認められ、20 $\mu\text{g/mL}$ では全種類のスポットの合計(全スポット)で約 16 倍の増加を示した。誘発されたスポットのうち 77%が大シングルスロット、20%がふたごスポットであり、小シングルスロットは 3%に過ぎなかった。この結果は、誘発されたスポットが主に染色体組換えによって生じたことを示唆している。(原)

7) 一重項酸素による皮膚障害

ヒトの皮膚表面には多くの細菌が棲息し、皮膚細菌叢を形成している。皮膚の主常在菌である *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) は、脂腺の中に棲息し、にきびの発生に深く関与しているとともに、代謝産物としてコプロポルフィリンとプロトポルフィリンのポルフィリン類を皮膚表面に排出することが知られている。*P.acnes* 由来のポルフィリンは、活性酸素の発生源としてはこれまで捉えられていなかった。しかし、このコプロポルフィリン溶液を一重項酸素発生測定試料とし、この溶液に紫外部のレーザー光を照射したところ、一重項酸素由来の 1268nmにおける発光が検出され、その発光強度は、光増感剤として良く用いられているリボフラビン

やローズベンガルより極めて多く、ヘマトポルフィリンと同等量であることから、一重項酸素発生能が極めて高い光増感剤が実際に皮膚表面に存在していると言える。皮表脂質のほとんどは皮脂腺由来の脂質であり、その構成はトリグリセライドとその分解物である脂肪酸等が 60%、ワックスエステルが 25%そしてスクワレンが 10%である。これらの構成脂肪酸と一重項酸素の反応速度定数を求め、比較を行った結果、スクワレンは極めて一重項酸素と反応しやすいことが明らかにした。

さらに、慢性障害と関係が深い過酸化脂質は、紫外線照射後や日光露光部、また老化によっても増加することが報告されているが、筆者らの実験では、過酸化脂質は紫外線照射のみでは生成せず、コプロポルフィリン存在下、発生する一重項酸素によって速やかに生成することがわかった。紫外線による脂質の過酸化反応は一重項酸素を介する反応だけではないが、これまでに報告されている皮膚表面のスクワレンペルオキシドの量と筆者らの実験で生成したスクワレンペルオキシドの量がほぼ等しいことや、実際皮膚表面ではスクワレンのような脂質と *P.acnes* 由来のコプロポルフィリンが共存していることを考えると、紫外線による皮表脂質の過酸化反応には一重項酸素の寄与が大きいと予想される。

また、コラーゲンは肌の弾力性や柔軟性に関与している真皮の重要な構成成分である。しかし、コラーゲンは生体内での代謝回転が遅いため、様々な化学修飾を受けやすい。そのため加齢と共に形成される架橋が老化現象の一因ではないかとも言われており、メイラード反応生成物の蓄積等と共に老化の指標として取り上げられている。その架橋の種類についてはピリノリジン等の非還元性架橋やメイラード反応生成物類似の蛍光特性を持つ物質等の存在が報告されているが、著者らの実験では一重項酸素がこれらの架橋とは異なる架橋を速やかに形成することがわかった。すなわち、紫外線を照射しただけではコラーゲンに架橋は形成されない

が、光増感剤存在下紫外線を照射すると光増感剤の濃度に依存して、つまり発生している一重項酸素の量に依存して速やかに架橋が形成されることがわかった。紫外線は一重項酸素以外にもスーパーオキシドなどの活性酸素を発生しうることが知られており、それらの活性酸素もコラーゲンの架橋形成に関与している可能性があると考えられる。そこで一重項酸素以外の活性酸素の関与について検討したところ、スーパーオキシドの消去酵素である SOD やヒドロキシラジカルの除去剤であるマンニトールを加えても架橋形成は阻害されなかった。従って、この架橋形成には一重項酸素以外の活性酸素種であるスーパーオキシドやヒドロキシラジカルは関与していないといえる。スーパーオキシドやヒドロキシラジカルはタンパクの断片化を引き起こすことがこれまでに報告されているが、一重項酸素はこれらとは異なり架橋形成を起こすという興味深い結果であった。(長野)

8) 光照射による皮膚細胞突然変異の検出

紫外線特異的変異である CC から TT への変化を、ヒト癌抑制遺伝子 p53 およびミトコンドリア遺伝子を指標として検出するための変異アレル特異的 PCR 法の確立を行った。

p53 遺伝子の変異のホットスポットであるコドン 247-8 部位に CC から TT の変異を持つ DNA (色素性乾皮症(XP)患者の皮膚癌組織由来)を陽性対照とし、この変異に特異的なプライマーをデザインし、変異配列が特異的に増幅される PCR の条件検討を行った。条件検討の後、in vitro で紫外線(UVB)を照射した正常および XP 由来繊維芽細胞、UVB 照射をしたボランティアなどから得られた皮膚のバイオプシーサンプルを用いて、p53 コドン 247-8CC→TT 変異の検出を試みた。

変異を持つ DNA サンプルを一定濃度で含むサンプルを用いた条件検討の結果、p53 遺伝子に対しては 10^{-4} から 10^{-5} レベルの検出感度を得ることができた。

次に、ヒトミトコンドリア遺伝子上に紫外線特異的な CC→TT 変異を持つサンプルは入手できないため、まずヒトミトコンドリア tRNA^{Leu} と NADH dehydrogenase-1 遺伝子を含む断片 (bp 2932-4161) をベクター上にクローニングし、bp 3351-2 の CC 配列を標的として部位特異的変異導入法により TT へと変異させ、陽性対照サンプルを作製した。これを用い、この変異に特異的なプライマーによるアレル特異的 PCR の反応条件の検討を行った。変異を持つ DNA サンプルを一定濃度で含むサンプルを用いた条件検討の結果、ミトコンドリア遺伝子に対しては 10^{-6} から 10^{-7} レベルの検出感度を得ることができた。

これらの方法を用いて、培養ヒト皮膚細胞およびヒト皮膚組織を材料として解析を行った結果、p53 遺伝子上には変異は検出できなかったが、ミトコンドリア上の変異を 10^{-6} レベルで検出することができた。実際にヒト皮膚細胞のミトコンドリア DNA 変異のスクリーニングを行ったところ、紫外線暴露を反映した陽性結果が得られたことから、ミトコンドリア DNA 上の紫外線特異的変異の検出は、生体の紫外線暴露の指標として皮膚癌発生のリスク評価に応用できると期待できる。(林)

C. 考察

小野は、光毒性試験と光遺伝毒性試験の現状と標準化に関する国際的な動きに関して調査研究を行った。これまでは、光毒性検査法についての有用性確認試験が重ねられ、有用性の検討が行われている状況であった。そのため相当の時日の経過があったが、2000 年 2 月にいたり、ようやく *in vitro* 光毒性試験法のガイドラインの提案が OECD になされた状況となっている。現在では、提案に対するコメントが各国に求められており、我が国でも専門家による討議が行われている段階である。

田中は、光毒性、光遺伝毒性試験の試験条件と

して重要な光源の種類について比較検討し、光源の種類が異なると、光照射による光遺伝毒性発現に差があることを示した。このことから、光遺伝毒性試験を実施するにあたっては、光源の種類ごとに、適切な光照射条件を設定する必要があることが示された。また、実際にモデル物質を用いた光遺伝毒性試験を実施し、光源の種類によって、試験の結果に大きな差が出ることを明らかにした。現状では、各試験者が独自の光源と照射条件を用いて試験が行われていることから、試験結果の妥当性の確認や試験結果の比較のためには、再現性の高い陽性対照物質を実験系に加え、生物学的反応性を明らかにする必要があると考えられた。

渋谷は、*in vivo* 光遺伝毒性試験の確立を目的とし、げっ歯類皮膚細胞を用いた *in vivo* 小核試験の系を確立した。また、p53 ノックアウトマウス、*pun* マウスを *in vivo* 光遺伝毒性試験に導入するための準備を行った。また、*in vitro* 変異原性試験として広く用いられているエームス試験を用いて、光遺伝毒性物質を検出する系の検討を行った。エームス試験については、簡便で高感度な *in vitro* 変異原性試験系であることから、光遺伝毒性試験への応用が待たれていたが、多くの試験菌株が紫外線感受性のため、照射条件の設定が難しかったことや、適切な陽性対照物質が見出されていなかったことなどから限定された使用に留まっていた。今回、主要菌株の照射条件と陽性対照物質の設定が終了したことから、実際のスクリーニング試験への応用が期待される。

大原は、モルモットを用いた *in vivo* 光刺激性試験の試験方法の検討を行った。皮膚塗布による *in vivo* 毒性試験の場合、被験物質の皮膚吸収性が試験条件によって異なる場合があり、結果のばらつきの原因となることが知られている。光刺激性試験では、皮膚塗布が主要な投与経路となることから、適切な方法で塗布を行うことが重要である。被験物質を溶解または懸濁する媒体の種類は、

経皮吸収性に影響を及ぼす主要な原因である。そこで、モルモットを用いた光刺激性試験で複数の媒体を比較し、塗布の媒体としては、エタノール、DMSO、蒸留水の順で優れていることが明らかになったが、化学物質によっては、その限りでないことが示された。また、経皮吸収促進剤である SLS 併用によって、光刺激性の増強が認められた。皮内投与については、化学物質によっては非照射でも刺激性が増強し、不適切な場合があることが示された。

原は、ショウジョウバエ翅毛スポットテストを、光遺伝毒性試験として確立することを目的とし、モデル物質を用いた試験により、効率よく光遺伝毒性を検出できることを明らかにした。ショウジョウバエ翅毛スポットテストは、in vivo の変異原性試験の中では検出感度が高く、比較的簡便な系であるため、in vivo のスクリーニング試験として期待される。また、ショウジョウバエは、高等動物では最も遺伝的性状が解明されており、特定変異原に対する高感受性株も多数作製されているため、翅毛スポットテスト等の変異原性試験と組み合わせて、光遺伝毒性物質の変異のメカニズムの解明にも役立つものと考えられる。

長野は、これまで独自に確立した高感度一重項酸素検出系を用い、ヒト皮膚常在菌に由来する光増感剤が、光照射による一重項酸素生成しうること、その作用が非常に強力であることを示した。また、皮膚に存在する光増感剤が光照射によって、過酸化脂質の生成重要な役割を果たしていることを示した。また、一重項酸素のコラーゲンに対する作用が、他の活性酸素種とは異なり架橋作用であることを示した。これらの作用は、皮膚の障害、老化に密接に関連したものであり、これまでの紫外線による皮膚障害の概念に、新たな局面を開くものであると考えられる。

林は、分子生物学的手法を用いて、p53 遺伝子

およびミトコンドリア DNA の紫外線特異的な DNA 傷害を検出する系の開発を行い、特にミトコンドリア DNA 傷害が紫外線暴露による DNA 傷害の検出系として有効であることを明らかにした。実際のバイオシーサンプルにおいて、紫外線暴露部位での変異が多かったことから、紫外線への暴露量を反映する指標としてリスク評価に役立つものと期待される。

D.研究発表

1. 論文発表

1. Gocke, E., Mueller, L., Guzzie, P.J., Brendler-Schwaab, S., Bulera, S., Chignell, C.F., Henderson, L.M., Jacobs, A., Murli, H., Snyder, R.D., Tanaka, N., Consideration on photochemical genotoxicity: Report of the international workshop of genotoxicity test procedure working group, *Env. Mol. Mutagenesis*, vol 35, 173-184, 2000 (in press)
2. Kawasaki K., Suzuki T., Ichihashi M., Reguer G., Yamasaki H., CC to TT mutation in the mitochondrial DNA of normal skin: Relationship to ultra-violet exposure., *Mutation Res.*, 2000 (in press)
3. Umezawa, N., Tanaka, K., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Nagano, T., Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 38, 2899-2901 (1999).

2. 学会発表

1. 川上久美子、原 巧、須井 哉、中川ゆづき、田中憲穂、澁谷 徹:微生物を用いる光遺伝毒性

試験の確立、第 28 回日本環境変異原学会

2. 中川ゆづき, 田中憲穂, ラット皮膚小核試験による光遺伝毒性物質の検出, 第28回日本環境変異原学会, 1999
3. 小原有弘, 鈴木孝昌, 平野紀子, 大澤浩一, 大和田智彦, 本間正充, 林 真, o-Amino-azotoluene により誘発される突然変異のスペクトル, 第 28 回環境変異原学会, 1999

分担研究報告書

1. 化学物質の光毒性検査法と評価法に関する調査研究

分担研究者 小 野 宏 食品薬品安全センター秦野研究所所長

研究要旨

最近問題となっている光照射による化学物質の毒性修飾の検査法に関する国際的動向の調査のため、(1)OECD 試験法ガイドライン計画第 11 回各国代表者会議 (11th National Co-ordinators Meeting ; パリ), および(2) 動物実験代替法世界会議 (3rd World Congress on Alternatives; ボローニャ)の各会議に参加し、この方面の情報を確実に得ることに努めた。毒性試験法は、科学の進歩に基づいて、また、動物愛護運動への対応の必要もあって、改良・開発が盛んに試みられており、動物を用いる毒性試験の代替法として in vitro 試験法の開発が進められている。In vitro 試験法が毒性試験代替法として採用されるまでには、厳しい論理に基づいた有用性確認 (Validation) が必要であり、光毒性検査法についても、有用性確認試験が重ねられ、有用性の検討が行われている。そのため相当の時日の経過があったが、2000 年 2 月にいたり、ようやく in vitro 光毒性試験法のガイドラインの提案が OECD になされた状況となっている。

1. OECD 試験法ガイドライン計画第 11 回各国代表者会議

経済協力開発機構 (OECD) の化学物質試験法ガイドライン計画第 11 回各国代表者会議 (11th National Co-ordinators Meeting of the Test Guidelines Programme; 12th NCM)は、1999 年 4 月 21-22 日の 2 日間にわたって パリ市 OECD 本部で開かれた。会議で検討された主要な事項は次の通りであった:

1) 内分泌攪乱物質問題 OECD 内分泌攪乱物質試験評価法検討班(Endocrine

Disrupter Testing and Assessment Task Force; EDTA)の作業状況報告。

2) 試験法ガイドラインの改定・新設 生殖発生毒性試験(TG 414,TG 416)等 4 件。

3) 急性毒性試験 1981 年版の急性毒性試験 法(TG 401)は使用しないようにするという方針が専門家会議では確認された。

4) 皮膚・眼毒性試験 主として、経皮吸収の in vitro 試験法の選択について。

5) 発癌物質試験 トランスフォーメーション試験の Detailed Review Paper(DRP) はフランスが中心となって作成する。

6) 試験法ガイドライン事業の作業促進 試

験法ガイドラインの新設、改定等の効率的な作業が可能となるよう討議された。

光毒性試験法に関しては、皮膚毒性の関連で取り上げられたが、ガイドライン案文が提出されたところであると報告があったにとどまった。この後、事項に述べる「代替法世界会議」における協議を経て、再度提案されたガイドライン案が2000年2月に回覧された。

培養 BALB/3T3 細胞を用い、neutral red uptake(NRU) を指標とする細胞毒性試験に光照射を加えて行う *in vitro* 光毒性試験(3T3 NRU PT)は、欧州連合 (EU) において1992年から予備確認試験 (Prevalidation)、1994年から有用性確認の本試験が行われた。この有用性確認試験にあたっては、光毒性に関する *in vivo* 動物実験データがむしろ貧弱であったため、臨床データを基準として進められ、被験物質も臨床的に光毒性の知られているものが多く選定された。(これは、後日、化学物質の標準的試験法としての有用性を反映しない恐れがあるとの批判を招く結果となったが、その問題に対しては、その後紫外外部吸収のある化学物質についての調査が行われて、補充された。)有用性確認の結果は良好で、結果の再現性は良く、光毒性の基準データとの一致性も良好であった。

2. 第3回動物実験代替世界会議

表記国際会議 (Third World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences) は、1999年8月29日－9月2日、ボローニャで開かれた。

各種の *in vitro* 試験法の試みの中で、光毒性試験の開発に関する研究発表があった。

Agapakis-Causse (L'Oreal, フランス) は、*in vitro* の光遺伝毒性試験について報告し、培養細胞を用いた Comet assay (Single cell gel electrophoresis) , P53 activation, Ames test 等々試験法の開発の進んでいることを紹介した。

また、Zerler ら (Collagenex Pharmaceuticals, USA) は、われわれも試みている 3T3 NRU PT を用いて、Tetracyclin 誘導体の光毒性を予備検査した。結果は臨床の知見と合致する好ましいものであり、この方法の有用性を支持するものであった。

本会議の最初に Horst Spielmann (ZEBET, ドイツ) は *in vitro* 光毒性試験 3T3 NRUPT の確立について注目すべき講演を行った。“Would Sisyphus meet the challenges of validation from test development to global regulatory acceptance ?” と題して、この試験の有用性確認 (Validation) 試験の反復の経過について述べ、Validation の考え方の変遷とそれにつれての新規試験法の採用までの過程を、アルベール・カミュの取り上げた「シシュフォスの神話」(いわば、賽の河原の石積み of 説話)になぞらえて、要求を満たしきれず、再三反復を余儀なくされた実態を報告した。しかし、Spielmann は、それを「不条理」(または「馬鹿馬鹿しいこと」と捉えることに止まらず、こうしたことがすべて Validation のあるべき姿であると結論した。

この会議の会期中に、光毒性試験法のガイドライン化についての関係者間の協議が行われ、近く OECD への提案が予定されることになった。

分担研究報告書

2. 光源の分光放射特性による光遺伝毒性発現の差異

分担研究者 田中 憲穂 食品薬品安全センター 秦野研究所 細胞毒性学研究室室長

研究要旨

近年、光毒性、光遺伝毒性に対する注目が高まり、*in vitro* および *in vivo* の安全性試験法のガイドライン化も、複数の試験系で進捗しつつある。これらの試験法のバリデーションにおいて、試験条件の検討に用いられた光源の種類がそれぞれ異なっている。一般に、光源の種類が異なると、同一の被験物質でも光毒性・光遺伝毒性の発現が異なることが知られている。そのため、異なる光源を用いた試験によって不適切な結果が得られる可能性もあり、被験物質の吸収波長とそれに合った適切な光源を組み合わせることが重要である。そこで、EU/COLIPA の *in vitro* 光細胞毒性試験のバリデーションに用いられたメタルハライドランプ (SOL500) と、*in vitro* 光遺伝毒性試験の分野でよく用いられているキセノンアークランプを用いて、モデル物質による光遺伝毒性の発現を比較した。その結果、光源の種類により、光照射のみによる光遺伝毒性誘発と、モデル物質の光遺伝毒性検出感度に差があることが示された。このことから、光遺伝毒性試験を実施するにあたっては、適切な光源を選択し、光源ごとに試験条件を設定する必要があることが示された。

A. 研究目的

近年、光毒性、光遺伝毒性に対する注目が高まり、*in vitro* および *in vivo* の安全性試験法の評価試験が、複数のワーキンググループで行われた。一部は、すでに OECD のガイドライン案として提出されている。これらのワーキンググループでは、試験条件の検討に用いられた光源種が異なっているが(表 1)、一般に、光源種、すなわち光の波長組成が異なると、同一の被験物質でも光毒性・光遺伝毒性の発現が異なることが知られている¹⁾。そのため、異なる光源を用いた試験によって、不適切な結果が得られる可能性も考えられる。光毒性

を検討する場合には、太陽光を基準にして、それに類似の光源を用いることが望ましいと考えられる。

そこで、2種類のソーラーシミュレータ、すなわち EU/COLIPA の *in vitro* 光細胞毒性試験のバリデーションに用いられたメタルハライドランプと、*in vitro* 光遺伝毒性試験によく用いられているキセノンアークランプを用いて、モデル物質による光遺伝毒性発現を比較した。

表 1 光毒性関連の試験で用いられた光源の種類

試験	光源	
モルモットを用いた急性光刺激性試験 ²⁾	ブラックライト	OECD ガイドライン案
BALB 3T3 細胞を用いた in vitro 光毒性試験 ³⁾	メタルハライドランプ	OECD ガイドライン案 (EU/COLIPA)
培養細胞を用いた in vitro 光染色体異常試験 ⁴⁾	キセノンアークランプ	IWGTP 報告書

B. 研究方法

光源には、メタルハライドランプ (SOL500, Dr K Hönle 製) と、キセノンロングアークランプ (Suntest CPS, Atlas 製) を用いた。これらの光源の分光放射照度は、スペクトララジオメータ (USR-30/D, ウシオ製) を用いて測定した。また、バイオアッセイは行わなかったが、ブラックライト (FL20S BLB, 東芝製) の分光放射照度も測定した。

試験には、チャイニーズハムスター CHL/IU 細胞を用いた in vitro 小核試験および染色体異常試験を用いた。試験時の紫外線強度は、ハンディ紫外線計 (UVR-3036/S, トプコン製)

を用いて測定した。

モデル光遺伝毒性物質として、ベンツ[a]ピレン (和光純薬工業) および、8-メトキシソラレン (東京化成) を用いた。

C. 研究結果

1) 光源の分光放射照度分布

各光源の分光放射照度と、標準光源 (C.I.E D65, JIS Z 8716) の分光放射照度を図 1 に示した。D65 は、色温度 6500 ケルビン時の理論的な昼光の分光分布を、世界 3 箇所の実測値に基づいて求めたものである。

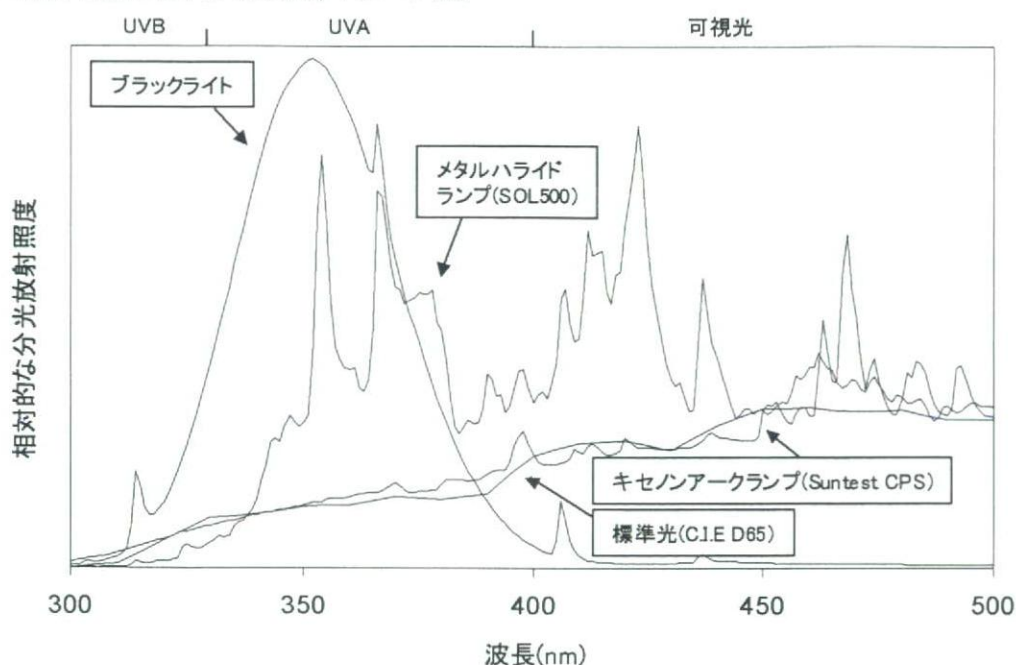


図1. 各光源の分光放射照度分布

分光放射照度分布の結果、自然太陽光に最も近かったものは、キセノンアークランプであり、極めて高い相似性を示した。

一方、メタルハライドランプは、自然太陽光と比べて、UVA 領域が強く、UVB 領域が弱い傾向が見られた。ブラックライトは、自然太陽光とは大きく異なる分光放射照度分布を示した。これらの結果から、自然太陽光下での実用条件を最も忠実に再現できるのは、キセノンアークランプであることが示された。

2) キセノンアークランプの照射条件検討

培養細胞を用いた in vitro 光遺伝毒性試験を行うにあたり、キセノンアークランプの適切な照射条件を検討した。光細胞毒性・光遺伝毒性試験の照射条件は、光照射のみによる毒性、遺伝毒性が試験の結果に大きく影響しない範囲で、最大の線量を用いることが望ましい。そこで、キセノンアークランプの光照射のみによる染色体異常誘発性の検討を行い、我々がこれまで用いてきたメタルハライドランプの結果と比較した(図2)。

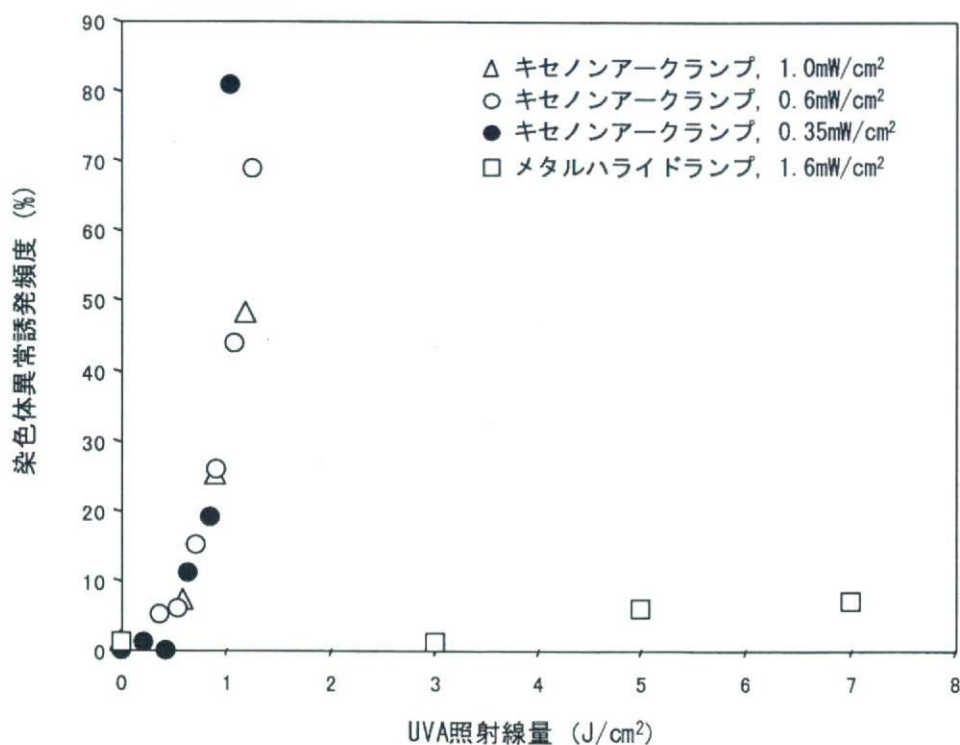


図2 光照射のみによる染色体構造異常誘発性

メタルハライドランプ(□)では、3.0J/cm²では光照射による染色体構造異常誘発性は認められず、5.0~7.0J/cm²でわずかに認められる。一方、キセノンアークランプ(△)では、0.6J/cm²以上で強い染色体構造異常誘発性

が認められた。メタルハライドランプとキセノンアークランプは、UVA/UVB比が大きく異なり、キセノンアークランプではUVB量が少ないことが、分光放射分布の測定で明らかになっている。紫外光は、波長が短いほど生物影響が大

きいことが知られていることから、今回の結果も、光源の分光放射特性の差異、特に UVB 量に起因するものと考えられた。

キセノンアークランプで $1.0\text{mW}/\text{cm}^2$ の放射照度を用いるとすると、 $0.4\text{J}/\text{cm}^2$ の照射線量に要する時間は約 6.7 分間と非常に短く、被験物質との接触時間が不十分であると考えられた。そこで、分光放射照度を 0.6、 $0.35\text{mW}/\text{cm}^2$ (○, ●) と引き下げて同じ実験を行ったところ、分光放射照度 (mW/cm^2 , 単位時間あたりの強度) にかかわらず、照射線量 (J/cm^2 , 照射期間を通じてのエネルギー量 = 分光放射照度 × 照射秒数/1000) に依存し

て染色体構造異常が誘発されることが示唆された。このため、 $0.35\text{mW}/\text{cm}^2$ にて 19 分間、すなわち $0.4\text{J}/\text{cm}^2$ の照射線量を以降の実験に用いることにした。

3) モデル光遺伝毒性物質の光遺伝毒性試験

8-メトキシソラレンおよびベンツ[a]ピレンの光遺伝毒性試験結果を図3に示した。8-メトキシソラレンには染色体異常試験、ベンツ[a]ピレンには *in vitro* 小核試験を用いた。

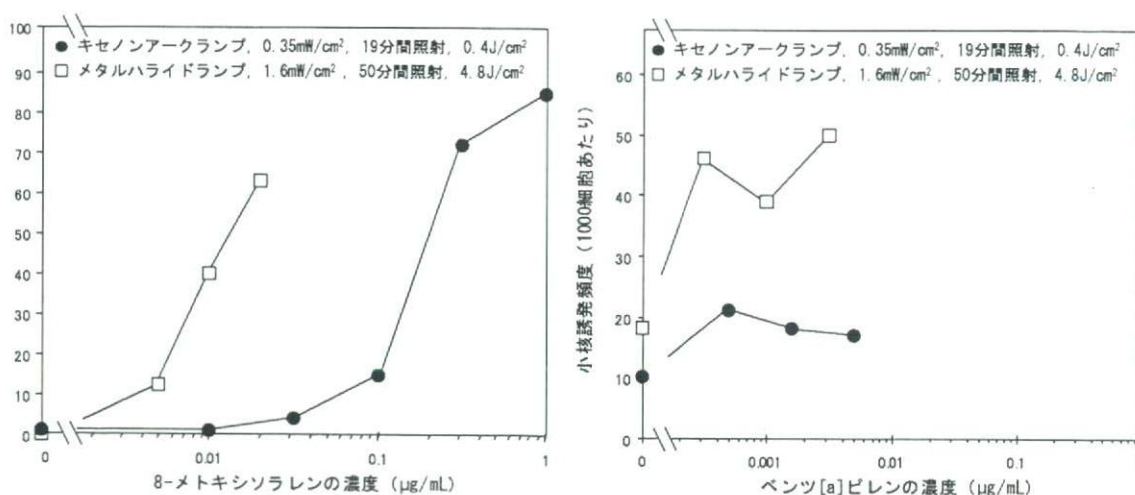


図3 8-メトキシソラレンおよびベンツ[a]ピレンの *in vitro* 光遺伝毒性試験

図3に示したように、モデル光遺伝毒性物質の検出力は、メタルハライドランプの方が高いことが示された。光遺伝毒性物質の吸収波長は UVA および UVB 領域にあることが知られているが、キセノンアークランプの UVA 照射線量は、メタルハライドランプの約 1/12 ($0.4\text{J}/\text{cm}^2$: $4.8\text{J}/\text{cm}^2$) であったのに対し、UVB 照射線量は約 1/4 ($0.076\text{J}/\text{cm}^2$: $0.27\text{J}/\text{cm}^2$) でしかなかったことから、主として UVA 照射線量の差が検出力の差の原因と考えら

れた。

D. 考察

以上の結果から、光源の種類により、分光放射照度分布には差があり、照射のみによる光遺伝毒性誘発にも差があることが示された。このことから、光遺伝毒性試験を実施するにあたっては、光源の種類ごとに、適切な光照射条件を設定する必要があることが示された。

また、光源の種類により光遺伝毒性物質の検出力には差があることが示された。従って、光源の種類が異なる場合、他の試験条件が同一であっても、結果に差が出る可能性があることが示された。このことから、異なる光源を用いた試験結果を比較する場合や、追試等を行う場合は、再現性の高い陽性対照物質を実験系に加える必要があると考えられた。

E. 結論

光源の種類により、分光放射照度分布には差があり、照射のみによる光遺伝毒性誘発にも差があることが示された。

また、光源の種類により光遺伝毒性物質の検出力には差があることが示された。従って、光源の種類が異なる場合、他の試験条件が同一であっても、結果に差が出る可能性があることが示された。

F. 引用文献

- 1) Chételat, A., Dresch, J.H., Gocke, E., Photomutagenesis test development: II. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in chromosomal aberration assays using CHO cells., Mutation Research, vol.292, 251-258, 1993
- 2) OECD guideline for testing of chemicals, draft proposal for a new guideline, Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test, (February 1995)
- 3) Spielmann, H., Liebsch, M., Pape, W.J., Balls, M., Dupuis, J., Klecak, G., Lovell, W.W., Maurer, T., De Silva, O., Steiling,

W., EEC/COLIPA in vitro photoirritancy program: results of the first stage of validation., Curr. Probl. Dermatol., vol 23, 256-464, 1995

- 4) Gocke, E., Mueller, L., Guzzie, P.J., Brendler-Schwaab, S., Bulera, S., Chignell, C.F., Henderson, L.M., Jacobs, A., Murli, H., Snyder, R.D., Tanaka, N., Consideration on photochemical genotoxicity: Report of the international workshop of genotoxicity test procedure working group, Env. Mol. Mutagenesis, vol 35, 173-184, 2000 (in press)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gocke, E., Mueller, L., Guzzie, P.J., Brendler-Schwaab, S., Bulera, S., Chignell, C.F., Henderson, L.M., Jacobs, A., Murli, H., Snyder, R.D., Tanaka, N., Consideration on photochemical genotoxicity: Report of the international workshop of genotoxicity test procedure working group, Env. Mol. Mutagenesis, vol 35, 173-184, 2000 (in press)

2. 学会発表

1. 中川ゆづき, 田中憲穂, ラット皮膚小核試験による光遺伝毒性物質の検出, 第28回日本環境変異原学会, 1999

分担研究報告書

3. 哺乳動物を用いる変異原性試験に対する光照射の影響に関する研究

分担研究者 渋谷 徹 食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝学研究室室長

研究要旨

すでに、ラットの背部皮膚を用いた、表皮細胞の小核を検出する試験系が開発されている。本研究では、それを基に遺伝的に多くの系統が確立しておりまた遺伝子改変動物も作出されているマウスでの小核試験系の確立を目指した。今回は、C57BL/6 マウスの皮膚小核の背景データを得る目的で、無処理マウスの背部より採取した表皮細胞の小核について観察した。さらに、光遺伝毒性発現における DNA 修復の関与を検討するために、今後 p53 ノックアウトマウスを使用する予定であり、マウス個体ごとの p53 の遺伝子分析を目的とした PCR 法について、その方法を確立することが出来た。さらに、マウスの毛色の変化を観察することによって遺伝子内組換えを検出出来る Pun マウスについて光遺伝毒性試験への適用についての検討を開始した。

A. 研究目的

紫外線照射によって変異原性が発現または増強される化学物質の検出法として、皮膚を標的とした *in vivo* 試験系の開発が重要なものの一つとして挙げられる。Nishikawa らは、ラットの背部皮膚を用いて、経皮投与された変異原性物質によって誘発された表皮細胞の小核を検出する試験系を開発した¹⁾。

本研究では、ゲノムに関する情報が多く、遺伝子改変動物も作出されているマウスを用いることとした。今回は、C57BL/6 マウスの皮膚の背景データを得る目的で、無処理雄マウスの背部より採取した表皮細胞の小核を観察した。

また、今後、光遺伝毒性試験において、DNA 修復過程の関与を検討するために、p53 ノックアウトマウス²⁾ (C57BL/6 マウスを背景と

している)を京都大学放生研の丹羽先生から入手した。これらは p53 遺伝子欠損ホモ型に固定出来ないので、毎世代ヘテロ個体同士を交配し、個体毎に PCR 法によって遺伝子分析をする必要があるが、今回その方法を確立することが出来た。

さらに、マウスの毛色のスポットを観察することによって遺伝子内組換えを検出出来る Pun マウス³⁾ (C57BL/6 マウスを背景としている)を、同じく京都大学放生研から入手して日本エスエルシーで SPF 化を進めており、その光遺伝毒性試験への適用についての検討を開始した。

B. 研究方法

1) 皮膚小核試験

6～7週齢の雄 C57BL/6 マウスを用いて実

施した。麻酔下マウスの背部被毛を剃り、放血した後、約3cm四方の皮膚剃毛部を採取した。採取した皮膚は、幅 1~2mm程度の短冊状に細切し、冷蔵庫内で約15時間トリプシン処理し、表皮を剥離した。剥離した表皮は、10%子牛血清添加イーグル MEM 培地(GIBCO)内で攪拌し、得られた表皮細胞分散液を濾過、遠心し細胞を分離した。細胞は、75mM KClを用いて低張処理を行い、カルノア液で固定した。細胞懸濁液を適量スライドガラスに滴下して小核標本とした。標本は、アクリジンオレンジ染色をし、蛍光顕微鏡を用いて 400 倍で観察した。

観察には、個々の核および細胞質全体が明確に認識でき、主核が壊れていない表皮細胞(細胞質が赤色)を選び、8 匹の動物(1回の試料採取では 4 匹について実施)について、各 1000 個の細胞を観察した。小核の判定条件は、直径が主核の 1/2 以下、主核から完全に分離もしくは接触しているもので輪郭が識別可能かつ主核と同色調を呈するものとし、1細胞に複数の小核が見られた場合にも1個の小核として、小核を有する細胞数を求めた。

2) p53 遺伝子解析

p53 ノックアウトマウスの尾の先端を約2cm切り、DNA 抽出を行うまで凍結保存した。凍結保存した尾より、フェノール・クロロホルム抽出およびクロロホルム・イソアミルアルコール抽出を用いて、ゲノム DNA の抽出を行った。抽出したゲノム DNA を用いて PCR 反応を行った。正常 p53 遺伝子を検出するために、p53 遺伝子のエクソン 2 の上流である非翻訳領域にプライマー1を、エクソン 4 領域内にプライマー2を設定してPCR反応を行った。また、neo遺伝子を検出するために、プライマー2 および neo

遺伝子領域内に設定したプライマー3 を用いて PCR 反応を行った。反応はともに、94℃ 1分、65℃ 1分 30 秒、72℃ 3分 20 秒を 35 サイクル行った。それぞれの PCR 産物は 1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行った。用いた PCR プライマーの塩基配列を以下に示す。

- 1: (5' -AAT TGA CAA GTT ATG CAT
CCA TAC AGT ACA-3')
- 2: (5' -ACT CCT CAA CAT CCT GGG
GCA GCA ACA GAT-3')
- 3: (5' -GAA CCT GCG TGC AAT CCA
TCT TGT TCA ATG-3')

C. 研究結果

1) 皮膚小核試験

今回観察した 8 匹の結果を表1. に示した。小核出現頻度は、細胞 1000 個あたり、0あるいは1個と低い値であり、個体間のばらつきは認められなかった。それらの平均値は、0.5 個であった。また、動物番号 1~4 と 5~8 とは、動物誕生日および試料採取日は異なっていたが、それらによる差は認められなかった。

表1. マウス陰性対照群の小核の出現頻度

動物番号	1	2	3	4	5	6	7	8
小 核 数 /1000 細胞	1	1	0	0	0	1	0	1

2) p53 遺伝子解析

PCR反応の条件を検討した結果、94℃ 1分、65℃ 1分 30 秒、72℃ 3分 20 秒で行えば、p53 遺伝子および neo 遺伝子を検出する場合ともに、PCR 反応が最適に行われることが明らかとなった。また、その条件を用い、日本エスエルシーで出生し、納入された雄雌 23 匹のマ

ウスについて、p53 遺伝子および *neo* 遺伝子の検出によって遺伝子型を解析した。その結果、雄 10 匹、雌 4 匹については、正常 p53 遺伝子のみをもち(+/+), 雄 4 匹、雌 4 匹については、正常 p53 遺伝子および *neo* 遺伝子をもち(+/-)、雄 1 匹については *neo* 遺伝子のみをもつ(-/-)ことが明らかとなった。

D. 考察

1) マウス皮膚小核試験

8匹のマウスについて、1匹あたり1000個の細胞を観察した結果、各動物の小核を有した細胞は1個または0個であり、陰性対照群において小核出現頻度は高くないことがわかった。Nishikawa ら(1999) は、ICR マウスを用いた小核試験において、変異原性物質 (Mitomycin C および Methyl methane-sulfonate) 投与によって明瞭な小核の増加を認めている(私信)。

今後、本研究で用いた C57BL/6 マウスでも、これらの変異原性物質によって小核の誘発が期待され、データの集積が課題とされる。さらに、紫外線照射による小核の誘発または増強などについても、検討を実施する。具体的には、光毒性を有する 8-Methoxypsoralen や Chlorpromazine などを用いて、UVA 照射による影響の有無を調べるほか、化学物質の暴露経路による差についても検討を試みる予定である。また、今回は 6~7 週齢の動物を用いたが、感度を高めるために、代謝回転がより早く、被毛が生える以前の若齢動物を用いる方法についても検討を進めたい。

2) p53 遺伝子の解析

p53 遺伝子の解析については、PCR 法によって、その遺伝子型が容易に識別できる様に

なった。今後は、光遺伝毒性試験において、小核形成に至る過程において、p53 遺伝子の関与を調べ、DNA 修復過程の関与、ひいては小核形成のメカニズムの解析を実施する予定である。

また、遺伝子内組換えを毛色スポットで容易に検出 pun マウスを用いて、光照射による遺伝子内組換え頻度の測定も行う予定である。

E. 結論

以上の結果から、マウスを用いた皮膚小核試験が実施可能であることが確かめられ、今後、光遺伝毒性試験の確立に向けて検討を重ねることおよび p53 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、その発現メカニズムを追求することが可能になった。また、将来 pun マウスを用いて遺伝子内組換え頻度についても検討することを予定している。

F. 引用文献

- 1) Nishikawa, T., Haresaku, M., Adachi, K., Masuda, M., and Hayashi, M. Study of rat skin in vivo micronucleus test : data generated by mitomycin C and methyl methanesulfonate, *Mutat. Res.*, 444, 159-166, 1999.
- 2) Kemp, C. J. and Balmain, A. et al., Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors, *Cell*, 74: 813-822, 1993
- 3) Schiestl, R. H., Aubrecht, J., Khogali, and Carls, N. Carcinogens induce reversion of the mouse pink-eyed unstable mutation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94,

4576-4581, 1981

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

分担研究報告書

4. 微生物を用いる光遺伝毒性試験の確立

分担研究者 渋谷 徹 食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝学研究室室長

研究要旨

Ames 試験で用いられている *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537、TA102 および *E. coli* WP2uvrA、WP2uvrA/pKM101 および WP2/pKM101 の 8 種類の検定菌を用いて、光照射による変異原性の発現または増強について 8-Methoxypsoralen、Chlorpromazine および Methylene blue の 3 種類の物質について、それぞれの感受性についての比較検討を行った。また、それぞれの検定菌について、至適な光照射量についても検討し、それらの結果から、それぞれの検定菌における最適実験条件を決定した。

A. 研究目的

昨年度に引き続き、光照射によって変異原性が発現または増強される化学物質の検出について、Ames 試験で用いられている *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537、TA102 および *E. coli* WP2uvrA、WP2uvrA/pKM101 および WP2/pKM101 の 8 種類の検定菌について、8-Methoxypsoralen、Chlorpromazine および Methylene blue の 3 種類の陽性物質を用いて、それらの感受性について比較検討を行った。

さらに、検定菌の遺伝的特性によって異なることが予想される至適光照射量についても検討し、それらの結果から、8種類の検定菌における最適実験条件の決定を行った。

B. 研究方法

検定菌株は *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537、TA102 および *E.*

coli WP2uvrA、WP2uvrA/pKM101 および WP2/pKM101 を用いた。対照物質としては、8-Methoxypsoralen (8-MOP: 和光純薬工業)、Chlorpromazine (CPZ : Sigma Chemical)、Methylene blue (MB: 和光純薬工業)を用いた。

操作は、昨年度と同様に行った。すなわち、小シャーレ中に、0.1M PO_4 buffer で洗菌した菌液と各調製液を入れて混合し、サンライトシミュレータ SOL500 を用いて照射を行った後、照射液 0.1ml を最少グルコース寒天平板上に流し固めた。同時に生菌数も測定した。なお、紫外線強度計(UVA メーター)は Topcon UVR-3036/S 型を用いた。なお、昨年使用した Dr.Honle の $1\text{J}/\text{cm}^2$ を Topcon $1.6\sim 1.7\text{J}/\text{cm}^2$ に換算して表示した。