

アミノ糖の突然変異原性に関する研究

三 好 康 之

近年、AF-2などの発がん性の発表と食品添加物リストよりの削除措置により、消費者の関心は「食品添加物の安全性」に集約されてきている感がある。厚生省でもこれに答えるために、生活関連物質の安全性に関する様々な試験を行って公表している。¹⁾

ところで、化学発がん物質の検索には長い年月と膨大な費用を要する動物実験を行う必要があるが、多くの化学発がん物質は突然変異誘起作用を持つというのが通説である。このため第一次スクリーニングとして、容易にかつ経済的に行われる微生物を用いて突然変異誘起性を検出する方法の有用性が注目され、実施されてきている。

これには、Amesらにより分離開発された、*Salmonella typhimurium* TA 98株を用い、薬物代謝酵素を作用させる場合とさせない場合とで復帰変異を比較するいわゆる Ames Test²⁾、および塩基交換型変異原とframeshift型変異原の両方に対して著しく高い感受性を有する *Bacillus subtilis* M45 (Rec⁻) 株とその遺伝的組み換えに対し野性株である *Bacillus subtilis* H17 (Rec⁺) 株の変異原耐性を比較するいわゆる Rec-assay³⁾ 等の方法がある。

今回は、微生物を使用して突然変異原性を検索する両方法を利用して、合成アミノ多糖類特に Amino-dextran·HCl (M.W.=10,000) とその構成アミノ単糖の変異原性について実験した。

実験方法

試薬はすべて市販特級品、純水は蒸留脱イオン水 (D.I.W.) を使用した。

実験 1 *Salmonella typhimurium* TA98 株による復帰変異試験⁴⁾

(1) 復帰変異試験には TA98 株を使用した。

(2) 培地組成

○ 前培養プロス培地

Nutrient broth (Difco)	8 g / D.I.W
NaCl	5 g / 1000ml

以上を混合し、高圧蒸気滅菌 (120°C 20分) し冷蔵庫に保存した。

○ Vogel-Bonner の最小培地 (10倍濃度原液用)

MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g	/ D.I.W. 1000ml
Citric acid	20 g	
K ₂ HPO ₄	100 g	
NaNH ₄ HPO ₄ · 4H ₂ O	35 g	

MgSO₄ · 7H₂Oを除くすべての塩を溶かした後に、これを添加して、白色沈殿の析出を防いだ。ついで、高圧蒸気滅菌し、冷蔵庫に保存した。

○最小グルコース・アガー培地

Vogel-Bonnerの最小培地(10倍濃度原液)	100ml / D.I.W. 100ml
Glucose	20 g / D.I.W. 100ml
Agar(Difco)	15 g / D.I.W. 700ml

それぞれ別々の容器に入れ、高圧蒸気滅菌後混合し、乾熱滅菌済のシャーレに30mlずつ分注し、固化した。

○ソフトアガー

NaCl	6 g / D.I.W.
Agar(Difco)	7~10 g / 1000mlml

40mlずつ、三角フラスコに分注し、高圧蒸気滅菌後冷蔵庫に保存した。なお冬期は寒天量を7g、夏期は10gとした。

ソフトアガーは使用時に、高圧蒸気滅菌し、その10分の1量すなわち4mlの0.05mM L-ヒスチジン-0.05mM D-ビオチン液を混合し、45°Cに保温した。

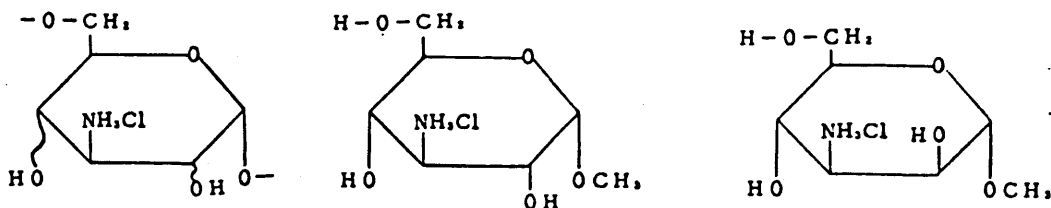
(3)供試試料

Amino-dextran·HCl 116(AD 116) (水溶性) Amino-dextran·HCl 244(AD 244) (水 DMSOに難溶性) Amino-dextran·HCl 245(AD 245) (水溶性)

いずれも、分子量約10,000の塩基性多糖類で、ニトロ基の還元の際し、AD 116はLiAlH₄を、AD244, AD245は液体アンモニア-金属リチウムを用いた。

Methyl 3-amino-3-deoxy-α-D-glucopyranoside·HCl(M3AG)

Methyl 3-amino-3-deoxy-α-D-mannopyranoside·HCl(M3AM)



Amino-dextran·HCl (AD116, AD244, AD245) Methyl 3-amino-3-deoxy-α-D-glucopyranoside·HCl(M3AG) Methyl 3-amino-3-deoxy-α-D-mannopyranoside·HCl(M3AM)

図1 アミノ糖類の化学構造式

いずれも Amino-dextran·HCl 構成アミノ糖⁵⁾で、Baerの方法⁶⁾に従って合成した。これらの構造式を図1に示す。

(4)菌の前培養

TA98株の-80°C保存株から前培養ブロス培地に接種し、37°C15時間振盪培養した。

(5)菌株の保存

菌懸濁液0.8 mlと滅菌済Dimethyl sulfoxide (DMSO)の0.07 mlをスクリュウ栓つきの小試験管に入れ、ドライアイス-アセトンで凍結後-80°Cで保存した。

(6)薬物代謝活性化酵素 S9-分画の調整

体重約150 gの5週令の雄のウィスター系ラットに75 mgのPCB (カネクロール)を0.3 mlのコーンオイルに溶解し、腹腔内に1回投与した。投与5日目は水のみを与え、ラットを断頭屠殺し、肝臓をとり出した。肝臓を冷150 mM KCl溶液で洗い秤量した。これを細切し、肝臓重量(8 g)の3倍の冷KCl溶液を加えテフロンホモジナイザーで磨砕した。このホモジネートを滅菌済遠心管に入れ、9000×gで10分間遠心分離し、上澄を滅菌済の小試験管に3 mlずつ分注し、直ちにドライアイス-アセトンで凍結後-80°Cで保存した。

(7)薬物代謝活性化酵素 (S9-Mix) の調整

S9-分画	9000×g 上澄		3ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O		0.4M	0.2 ml
特級KCl		1.65M	0.2 ml
グルコース-6-リン酸	(オリエンタル酵母)	1M	0.05 ml
グルコース-6-リン酸脱水素酵素	(")	100単位	0.05 ml
NADPH	(")		36.24 mg
リン酸緩衝液	(pH7.4)	0.25M	4 ml
D.I.W.			2.5 ml

以上のうち、肝ホモジネートS9-分画を除いた全ての試薬を混合し、ミリポアフィルターを通して除菌し、ついでS9-分画を加え、よく混合した。

(8)実験操作

(I) S9-Mixを作用させる場合

陽性対照薬剤 Acetylaminofluorene(AAF)を予め高圧蒸気滅菌したDMSOに溶解し、50 μg/100 μlの薬液を作り、この0.1 mlを滅菌済試験管にとり、S9-Mix 調整液0.5 mlと前培養しておいたTA98 懸濁液0.1 mlを加えよく混合し、37°C20分間振盪させながらプレインキュベーションした。その後ソフトアガー2.5 mlを加え、よく混合し、

最小グルコース-アガー培地上に移し、拡げた。これを37°C、48時間培養し、復帰変異コロニー数を計数した。結果は2連の有効数値の平均で示し、陽性対照とした。

試料試験では、(3)に示した試料をAAFの代りに1000 μ gを計量し0.1mlのDMSOに溶かして、同様に操作した。

(II) S9-Mixを作用させない場合

陽性対照薬剤として4-Nitro-quinoline-N-oxide (4NQO) の0.2 μ g/100 μ l溶液を用いた。操作はS9-Mixの代りに滅菌済の100mMリン酸緩衝液を用いた以外は、(I)同様に行った。

実験2 *Bacillus subtilis* によるRec-assay³⁾

(1)枯草菌の組み換え修復欠損株 M45 (Rec⁻)とその野性株であるH17 (Rec⁺) の2種を用いた。

(2)培地組成

○液体培地

粉末酵母エキス (日水製薬)	10 g	/ D.I.W.
粉末牛肉エキス (極東製薬)	10 g	/ 1000ml
特級NaCl	5 g	/ (pH7.0)

以上を混合し、高圧蒸気滅菌して冷蔵庫に保存した。

○固体培地

上記液体培地に1.5%のアガーを加え、高圧蒸気滅菌後、乾熱滅菌済のシャーレに50mlずつ分注した。固化後、シャーレを裏返しにして、37°Cで2日間放置し、表面を乾燥して使用した。

(3)供試試料

実験1の(3)に使用したものを使用した。

(4)菌株の培養

液体培地約10mlを高圧滅菌し、それぞれの菌株の孢子を少量接種して、37°C、16時間振盪培養した。

(5)菌株の保存

37°Cで斜面培養し、充分孢子が出来てから、冷蔵庫に保存した。

(6)実験操作

滅菌したDMSOに4NQOを溶解し、100 μ lあたり、200 μ g、20 μ g、2 μ gの薬液を作った。この0.02mlを滅菌済の直径12mmの円型ろ紙にしみ込ませた。

従って、それぞれのろ紙は4NQOを40 μ g、4 μ g、0.4 μ g含む。

次に、液体培地に前培養した2種の菌をシャーレの固型培地上にそれぞれ streak した。その後、陽性対照の 4NQO または供試試料 ($1000\mu\text{g}/\text{disk}$) をしみ込ませたる紙を滅菌ピペットで置いた (図2)。シャーレを 4°C の冷蔵庫に24時間放置後、 37°C で18時間倒置培養し、 Rec^- 株と Rec^+ 株の生育阻止帯の長さを測定し、両者の差を求めた。

(図3)

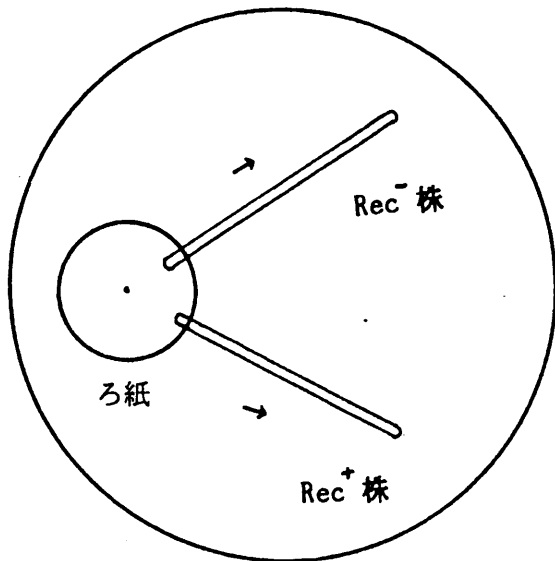


図2 streakの方法およびろ紙の位置

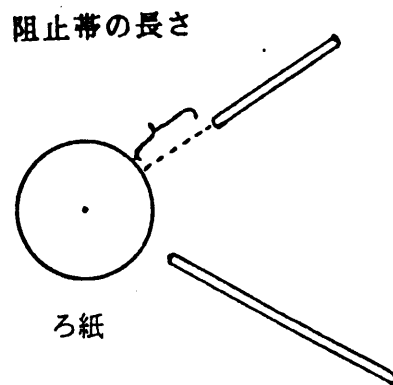


図3 阻止帯の測定

実験結果および考察

1. *Salmonella typhimurium* TA98 株を用いて行った復帰変異原性試験の結果を表1に示した。
2. *Bacillus subtilis* H17 (Rec^+) 株および *Bacillus subtilis* M45 (Rec^-) 株を用いたDNA損傷試験の結果を表2に示した。

一般に、Ames Testでは、TA98株を使用した場合に一平板に20~30の倍以上の His^+ コロニーがみられた場合に変異ありと判定されている。またRec-assayでは Rec^+ 株と Rec^- 株の生育の差を $D(\text{mm})$ とすると、 $D \geq 4$ 、 $4 > D \geq 2$ 、 $D < 2$ の時それぞれ順に陽性(+), 疑陽性(±), 陰性(-)と判定されている。今回行った両試験とも、アミノ糖濃度を $1000\mu\text{g}/\text{plate}$ (または $/\text{disk}$) と大量に用いたためではあるが、変異原性ありと判定された。特にS9-Mixを用いて、Amino-dextranを代謝活性化した場合は、S9-Mixを使用しない時に比べてより強い変異原性を示した。しかし、Amino-dextranを構成するアミノ単糖の変異原性は全然認められなかった。

また、Rec-assayでも、Amino-dextran 116と同245は同様に阻止帯を認めた。し

かし、Amimo-dextran 244 はDMSOに溶解しにくかったために、阻止帯が認められなかったものと考えられる。なお、この場合も、Amino-dextran 構成単糖の阻止帯は認められなかった。

以上を総合して考察すれば、Dextranより、過ヨウ素酸酸化、ニトロメタン再閉環、LiAlH₄（または液体アンモニア-金属リチウム）によるニトロ基の還元によって得られた Amino-dextran (116,245) は高濃度で、ラット肝S9-Mixにより代謝活性化されて変異原性を有するといえるであろう。

Table 1 The Result of Mutation Test
Mutagenicity assays were carried out using Ames' strain of *Salmonella* TA98 and histidine reversions were measured.

Compound Tested	Concentration of Compound (ug / plate)	Mean Number of His Revertants Found per Plate	
		With S9-Mix	Without S9-Mix
Control			
DMSO	-	9	9
AAF	50	178	
4NQO	0.2		108
sample			
AD116	1000	241	33
AD244	1000	270	63
AD245	1000	317	139
M3AG	1000	16	1
M3AM	1000	40	3

DMSO; Dimethyl sulfoxide AAF; Acetylaminofluorene

4NQO; 4-Nitro-quinoline-N-oxide

AD ; Amino-dextran·HCl (aminopolysaccharide)

M3AG; Methyl 3-amino-3-deoxy- α -D-glucopyranoside · HCl

M3AM; Methyl 3-amino-3-deoxy- α -D-mannopyranoside · HCl

Table 2 The Result of Repair Test

Rec-assays were carried out using kada's strain of Bacillus H17 (Rec⁺) or M45(Rec⁻) and the length of inhibited zone was measured.

Compound Tested	Concentration of Compound (μg / plate)	Mean Length of Inhibited Zone (mm)		The Difference Between Rec ⁺ and Rec ⁻ (mm)
		Rec ⁺	Rec ⁻	
Control				
DMSO	-	0	0	0
4NQO	0.4	0	13.0	13.0
4NQO	4	9.7	26.7	17.0
4NQO	40	20.5	36.5	16.0
Sample				
AD116	1000	0	9.5	9.5
AD244	1000	0	0	0
AD245	1000	0	7.3	7.3
M3AG	1000	0	0.5	0.5
M3AM	1000	0	0	0

DMSO; Dimethyl sulfoxide AAF;Acetylaminofluorene

4NQO; 4-Nitro-quinoline-N-oxide

AD ; Amino-dextran·HCl (aminopolysaccharide)

M3AG; Methyl 3-amino-3-deoxy-α-D-glucopyranoside · HCl

M3AM; Methyl 3-amino-3-deoxy-α-D-mannopyranoside · HCl

要 約

1. Amino-dextran およびその構成アミノ単糖のうち、多量に存在するアミノ単糖について、Ames Test および Rec-assay を行った。

2. 水溶性 Amino-dextran 116 (構成糖 3 位のニトロ基を LiAlH₄ で還元), 同 244 (同ニトロ基を液体アンモニア-金属リチウム系で還元し, 水に難溶画分), 同245(244と同様に処理し, 水溶性画分) を用いて実験した結果, 高濃度 (1000μg / plate) で, ラ

ット肝臓 S9-Mix により代謝活性化されて変異原性を示した。

3. Amino-dextran を構成するアミノ単糖では、Amino-dextran 同様の操作を行ったが、変異原性は認められなかった。

謝辞

この研究を行うにあたり、貴重な菌株を供与いただきました国立遺伝学研究所 賀田恒夫博士、ご助言をいただきました九州大学農学部 大村浩久教授、桑野栄一博士、宮崎大学農学部、水光正仁博士ならびに菌株および酵素の超低温保存に協力いただきました広島県衛生研究所、岸本敬之博士に深く感謝致します。

なお、この研究は食物栄養研究の一環として、昭和56年入学食品管理コース 川口代利子（呉電算センター）、湯浅尚子（宮崎県庁）57年入学藤井順子（日立製作所中国支店）、舟橋佳代（湧永製薬）、58年入学竹本明美（やまひろ）、新谷緑（新庄味噌醸造）、同栄養士コース藤井繁子（広島文教女子大学淳風寮）が取り組んだものの一部である。

参考文献

- 1) 厚生省がん研究報告書 (1973+)
- 2) B.N.Ames, J.McCann and E.Yamasaki; Mutation Res., 48 29 (1977)
- 3) T.Kada, K.Tutikawa, and Y.Sadaie; ibid. 16 165(1972)
- 4) 矢作多貴江; 蛋白質・核酸・酵素, 20 1178 (1975)
- 5) K.maekawa, Y.miyoshi and K.Tsuru; Agr.Biol.Chem., 40 1951 (1976)
- 6) H.H.Baer; Chem.Ber., 93 2865 (1960)

昭和61年9月3日受理