

蛍光増白剤の影響 (II)

— 大腸菌による感受性試験およびサルモネラ菌
による突然変異誘起性試験 —

渡 邊 貢 次

(養護教育教室)

Influences of fluorescent whitening agents (II)

— Sensitivity test in *Escherichia coli* mutants and
mutagenicity test in *Salmonella typhimurium* mutants —

KOJI WATANABE

(Department of Health Education)

ABSTRACT

Following the previous paper, influences of fluorescent whitening agents (FWAs) on bacteria were examined. An experimental study was described with following results.

(1) A paper disc spot method was performed on sensitivity test. Though *Escherichia coli* Try⁻ hcr⁺, if anything, presented sensitive compared with *E. coli* Try⁻ hcr⁻ to coumarin (COU) and methylumbelliferone (MUM) containing paper discs (0.01–1.4 mg/disc), the significant correlations between two mutant strains and sensitivity to FWAs was not recognized. Sensitivity was hardly detected under diaminostilbene disulfonic acid (DDA).

No appearance of revertant colonies (Try⁻ → Try⁺) in *E. coli* on minimal medium plates was considered, at least, FWAs used in this test were not mutagens of the type of base change mutation.

(2) Mutagenicity test without S-9 Mix showed that DDA and MUM presented weak positive histidine reverse mutation (His⁻ → His⁺) in *Salmonella typhimurium* TA 98, and only DDA presented positive in *S. typhimurium* TA 100. And according to active reversion induced in *S. typhimurium* TA 98 under COU conditions seemed that COU was probably a chemical substance of a frameshift mutagen.

序 論

近年環境中に存在する多種多様の化学物質¹⁾についてその突然変異原性・突然変異誘起性の検索が進み, そのリストは膨大なものとなっている。たとえば, 食品添加剤, 医薬品,

農薬などといった日常生活とかかわりの深い物質の中にも変異作用を現わす物質が多く認められている。と同時に変異原物質の発癌作用や催奇作用あるいは遺伝毒性との相関性もかなり強調されている²⁻⁵⁾。従って人体との1回の接触量がたとえ微量のものでも頻繁な接触には重要視されねばならず、その毒性について十分な認識を持つ必要がある。生態的環境を変質し、たとえば生体濃縮で、食物連鎖を通して、あるいは直接生体内へと作用し、生物界、人間界へ最終的に跳ね返ってくるからである。

筆者は合成洗剤中に添加される蛍光増白剤の原体およびその誘導体が細菌に及ぼす影響について調べているが、第1報⁶⁾にひき続き、今回は *Escherichia coli* 2株に与える致死感受性試験と *Salmonella typhimurium* 2株に与える突然変異誘起性試験を行い、知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 使用菌株

薬剤に対する致死感受性試験には紫外線によるDNA損傷の修復能力差のある菌株、すなわち能力を有す *E. coli* RIMD 0509109 *hcr*⁺ (ATCC 23231 *Try*⁻ *UVr* *Xr*)—以下 *E. coli* *Try*⁻ *hcr*⁺ と記す—、能力を欠く *E. coli* RIMD 0509115 *hcr*⁻ (ATCC 23233 *Try*⁻ *UVs* *Xr*)—以下 *E. coli* *Try*⁻ *hcr*⁻ と記す—を用いた。この両菌株については、*Try*⁻→*Try*⁺への復帰変異の多くは塩基交換型⁷⁾である。

薬剤による突然変異誘起性試験には Ames らが開発し、化学物質の突然変異原性を迅速にかつ感度よく点検できる菌株として非常に利用度が高い *S. typhimurium* TA 98および *S. typhimurium* TA100を使用した。TA98はフレームシフト型の変異物質により、TA100は塩基置換型の変異物質にそれぞれ復帰 (*His*⁻→*His*⁺) されやすい性質^{7,8)}を持っている。

2. 使用薬剤

本実験に使用した蛍光増白剤の原体、誘導体は前報と同じ物質のうち、4, 4'-ジアミノスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸 (DDA, 和光純薬)、クマリン (COU, 片山化学) 4-メチルウンベリフェロン (MUM, 片山化学) の3体である。DDAは Vogel-Bonner 最小培地E (Table 1(b))で溶解し、COUとMUMはジメチルスルホキシド (DMSO)で溶解し、各試験濃度に調整したものを薬剤試料溶液とした。

3. 培養および試験方法

(1) 致死感受性試験

薬剤に対する感受性は濾紙ディスク法⁹⁾に依った。2%グルコース含有 Vogel-Bonner 最小寒天培地 (Table 1(a)) および感性ディスク用培地 (変法 Müller-Hinton 培地, ニッスイ) のプレート上にニュートリエントブロスで前培養 (37°C, 18-22時間) した *E. coli* *Try*⁻ *hcr*⁺, *E. coli* *Try*⁻ *hcr*⁻ 菌液を0.05ml塗株し、その上に濃度20, 10, 4, 2, 1, 0.2mg/mlの蛍光増白剤溶液をそれぞれ0.05, 0.06, 0.07mlずつ含有させた円形濾紙ディスク (東洋, 径8mm, 厚1.5mm) をスポットする。37°C, 20時間培養後出現した発育阻止円径の長さを読み取る。

(2) 突然変異誘起性試験

試験方法は Ames ら¹⁰⁾の方法を改良した矢作⁸⁾の方法に概ね基づいたが、ニュートリエ

蛍光増白剤の影響(II)

Table 1. Composition of medium

(a) For sensitivity test < agar plate >		(b) For mutagenicity test < agar plate >	
Vogel-Bonner minimal medium, modified		Vogel-Bonner minimal medium E	
(NH ₄) SO ₄	1 g	NaNH ₄ HPO ₄ · 4H ₂ O	3.5 g
KH ₂ PO ₄	10 g	K ₂ HPO ₄	10 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
Sodium citrate · 2H ₂ O	0.5 g	Citric acid · H ₂ O	2 g
Glucose	20 g	Glucose	20 g
Nutrient broth (below)	20 ml	Agar (Difco)	15 g
Agar (Difco)	15 g	H ₂ O	1000 ml
H ₂ O	1000 ml	pH	7.0
pH	7.0	< soft agar >	
< preculture >		Agar (Difco)	0.7 g
Nutrient broth (Difco)	0.8 g	NaCl	0.6 g
H ₂ O	100 ml	H ₂ O	100 ml
		0.5 mM L-Histidine-0.5 mM Biotin	10 ml
		< preculture >	
		Nutrient broth (Difco)	0.8 g
		NaCl	0.5 g
		H ₂ O	100 ml

ントブロスでの前培養(37℃, 18-22時間)は静置培養であり, S-9ミックス代謝活性化は併用していない。薬剤の添加量は, 30ml寒天プレート・2mlソフトアガー当り0.1mlであり, その含有濃度は, 2000, 1000, 200, 100, 20, 10, 2, 1, 0.2μg/0.1mlである。また接種菌量は0.1ml(約10⁸ cells/ml)ある。なお溶媒であるDMSOは変異原性に影響を与えない。

結果および考察

環境変異原検索の手段として細菌や細胞による第一次スクリーニング試験が広く活用されている7-9, 11, 12)。本実験は非常に利用度の高い2種4菌種を用いて行われた。

まず, 濾紙ディスクに4, 4'-ジアミノスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸(DDA), クマリン(COU), 4-メチルウンベリフェロン(MUM), を接種し, 大腸菌*Escherichia coli* RIMD 0509109 hcr⁺ (ATCC 23231 Try⁻ UVr Xr)と*E. coli* RIMD 0509115 hcr⁻ (ATCC 23233 Try⁻ UVs Xr) に対して感受性試験を行った結果, 両菌株がそれぞれ示した発育阻止円径の長さ(mm)をTable 2. に示す。薬種別ではMUMに対して阻止円が大きく, 次いでCOUとなり, DDAにはほとんど感受性を示さなかった(*E. coli* Try⁻ hcr⁺, 1.4mg/discを除く)。COUまたはMUM存在下では栄養条件の良い感性ディスク用培地の方に阻止円がやや大きく形成されたが, 薬剤に対する感受性は両菌株間に差はなく, *E. coli* Try⁻ hcr⁺の方が*E. coli* Try⁻ hcr⁻より僅かに感受性が強く現われた。しかし両菌株の遺伝的性質の違いと薬剤効力との間に有意な相関を認める程ではなかった。

Table 2. Sensitivity in *Escherichia coli* mutants by paper disc spot method

Concentration of agents (mg/ml)	Content (ml/disc)	DDA				COU				MUM			
		<i>E. coli</i> Try ⁻				hcr ⁺		hcr ⁻		hcr ⁺		hcr ⁻	
		hcr ⁺	hcr ⁻	hcr ⁺	hcr ⁻	hcr ⁺	hcr ⁻	hcr ⁺	hcr ⁻	hcr ⁺	hcr ⁻	hcr ⁺	hcr ⁻
.2	.05	8*	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9
	.06					9	8			11	8	8	
	.07					9	9			9	10	9	
1	.05					8	8			8	8	9	
	.06					9	9			10	9	9	
	.07					10	9			10	10	10	
2	.05					9	8			10	10	10	
	.06					9	9			10	10	9	
	.07					10	10			8	9	11	10
4	.05					10	8			11	11	10	10
	.06					10	10			12	14	11	13
	.07					8	10			12	13	11	11
10	.05					9	10			13	18	13	16
	.06					10	10	8	11	16	21	12	16
	.07					9	12	10	12	15	19	13	16
20	.05					11	14	12	14	17	20	17	16
	.06		8			14	17	12	15	18	24	18	18
	.07	8	9	8	8	14	18	14	18	18	21	17	20

*millimeter; the data are the diameter of inhibition ring on minimal agar plates and nutrient disc agar plates (italic).

更に最小寒天培地上での被検菌の復帰変異 (Try⁻→Try⁺) を観察したが、出現コロニー数は極めて少なく (0-3個/プレート)、変異誘起性を示さなかったことから、使用薬剤が塩基交換型の突然変異原物質ではないと判断されたが、勿論このことは後述の実験結果と合せて吟味されねばならない。

本実験は自然採光下室内で行われたが、*E. coli* hcr変異株、蛍光増白剤ともに紫外線と関連ある性質を有しており、今後これらの検討が進められることにより一層興味のある結果が得られると期待される。

次いで、サルモネラ (ネズミチフス) 菌を用いて突然変異誘起性試験を行った。DDA, COU, MUMによる *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100の復帰変異コロニー (His⁻→His⁺) 数をそれぞれ Figure 1, Figure 2, Figure 3に示す。自然復帰は、TA 98で12-35個/プレート (平均25個)、TA 100で129-211個/プレート (平均181個) であった。

DDAはTA 98, TA 100に対して復帰変異を誘起 (陽性) せしめたが、その程度は弱くより高濃度域の試験が必要である。MUMはTA 98に対して弱陽性、TA 100に対して陰性を示したが、培養状態をみると変異原性よりも致死作用が強く影響していた。COUはTA 100に対して陰性であったが、TA 98に対しては突然変異誘起性を示した。このことはCOUがフォームシフト型の変異原物質である可能性を示唆している。また高濃度域で

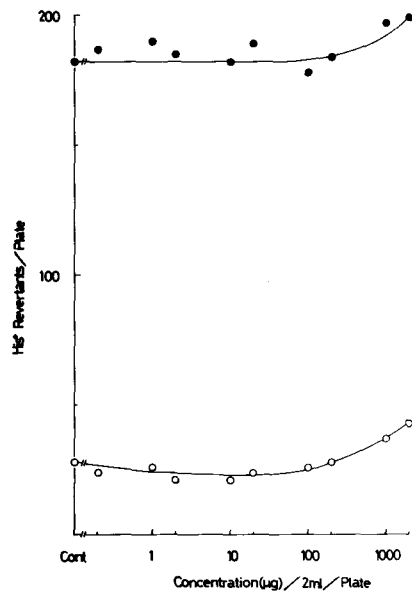


Fig.1. Mutagenicity of DDA in *Salmonella typhimurium* mutants. The average of the number of histidine revertants ($his^- \rightarrow his^+$) per plate is figured as *S. typhimurium* TA 98 (○) and TA 100 (●), respectively. And control indicates spontaneous revertant colonies.

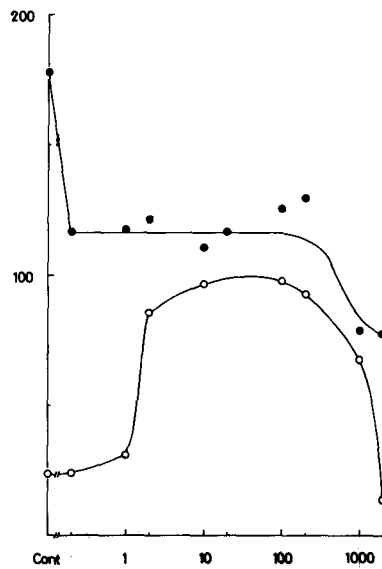


Fig.2. Mutagenicity of COU in *Salmonella typhimurium* mutants. Figured the same as fig.1.

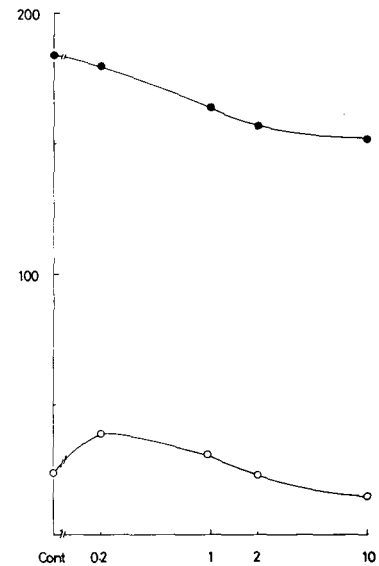


Fig.3. Mutagenicity of MUM in *Salmonella typhimurium* mutants. Figured the same as fig.1.

はMUMと同様致死作用が強かった。

S. typhimurium TA 98およびTA 100はそれぞれ *S. typhimurium* TA 1538, TA 1535にR因子を組み込んだ高感度改良株¹³⁾であるが, S-9 ミックス代謝活性化を付加¹⁰⁾することでより一層明確に変異原物質を把握できる。従って本実験(S-9 ミックス併用せず)で陰性となった結果についてもS-9 ミックス併用による再検討は必要である。また今回利用しなかったその他の *S. typhimurium* TA系菌株, たとえばTA 1535, TA 1536, TA 1537, TA 1538などを被検材料とした広範なスクリーニングによる検討も必要と考える。

結 論

前報に引き続き, 蛍光増白剤の原体, 誘導体の3体4, 4'-ジアミノスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸(DDA), クマリン(COU), 4-メチルウンベリフェロン(MUM)による細菌に及ぼす影響を検討した結果, 次のような結論を得た。

- 1) 薬剤感受性汚紙ディスク法(0.01-1.4mg/disc)を行った。被検菌はDDAについて全く感受性を示さず, COUまたはMUM条件下で, DNA損傷修復能力を有す *E. coli* Try⁻ hcr⁺の方が修復能力を欠く *E. coli* Try⁻ hcr⁻よりやや感受性を示したが, 菌株と薬効との間に強い相関関係は認められなかった。

また, Try⁻→Try⁺への復帰変異が観察されなかったことは, 3薬剤の塩基交換型の変異原性については陰性と判断された。

- 2) *S. typhimurium* TA 98と *S. typhimurium* TA 100に対するHis⁻→His⁺への突然変異誘起性試験(S-9 ミックス併用せず)の結果, COU条件下でTA 98に陽性を示した。これはCOUがフレームシフト型の突然変異誘起作用を有す変異原物質である可能性を指摘している。

しかしこれらの物質の性質についてより一層明確にするためには, S-9 ミックス併用による代謝活性化試験, 更にはその他の *S. typhimurium* TA系菌株による広範な検討も必要である。

本実験の遂行にあたり, *Escherichia coli* RIMD 0509109とRIMD 0509115の2菌株については大阪大学微生物病研究所菌株保存室より分譲いただき, また *Salmonella typhimurium* TA 98とTA100の2菌株については同研究所化学療法部門大学院生泉谷氏より快く分譲いただきかつ有益な御助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

(昭和54年8月30日受理)

参 考 文 献

- 1) Maugh. T.H.II. : Chemicals, How many are there ?, Science, 199, 162, 1978
- 2) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. : Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test, Assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 5135-5139, 1975
- 3) McCann, J., Ames, B.N. : Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test, Assay of 300 chemicals, Discussion, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 950-954, 1976
- 4) 河内卓 : 環境発癌物質の存在の理法とその考え方, 蛋白質核酸酵素, 23, 422-428, 1978
- 5) 長尾美奈子 : 突然変異原物質と癌原物質, 蛋白質核酸酵素, 23, 435-447, 1978
- 6) Watanabe, K. : Influences of fluorescent whitening agents, Bull. Aichi Univ. Education, 27, 87-

蛍光増白剤の影響(Ⅱ)

95, 1978

- 7) 賀田恒夫：微生物を用いた試験法，公害と対策，12, 379-383, 1976
- 8) 矢作多貴江：環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について，蛋白質核酸酵素，20, 1178-1189, 1975
- 9) 岩源繁雄：遺伝毒性とその試験，講談社，38-39, 1977
- 10) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D. : Carcinogens are mutagens, A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285, 1973
- 11) 田島彌太郎，吉田俊秀，賀田恒夫(編)：化学物質の突然変異検出法，講談社，31-117, 1973
- 12) 太田敏博(訳)：変異原性試験法ガイドライン，変異原と毒性，フジ・テクノシステム，7, 90-100, 1979
- 13) McCann, J., Spingarn, N.E., Kobori, J., Ames, B.N. : Detection of carcinogens as mutagens, Bacterial tester strains with R factor plasmids, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 979-983, 1975