

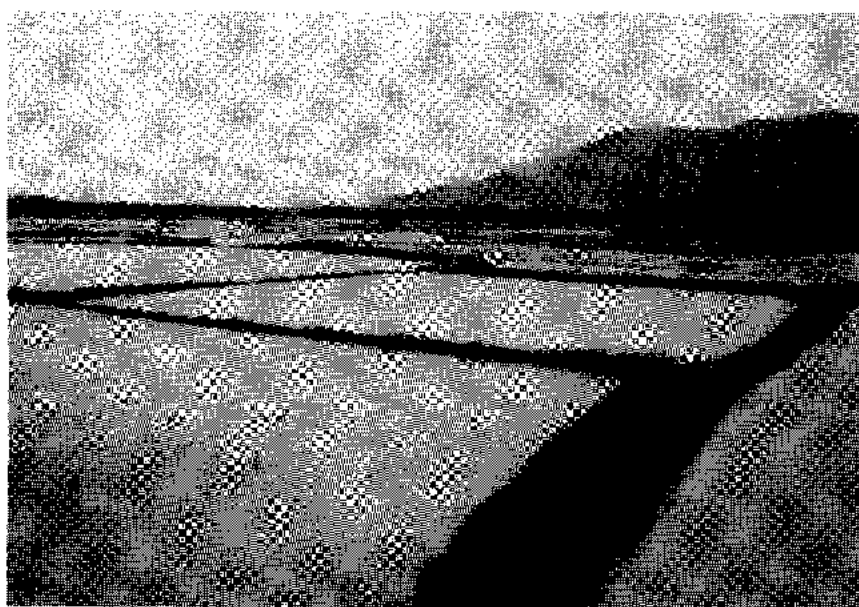
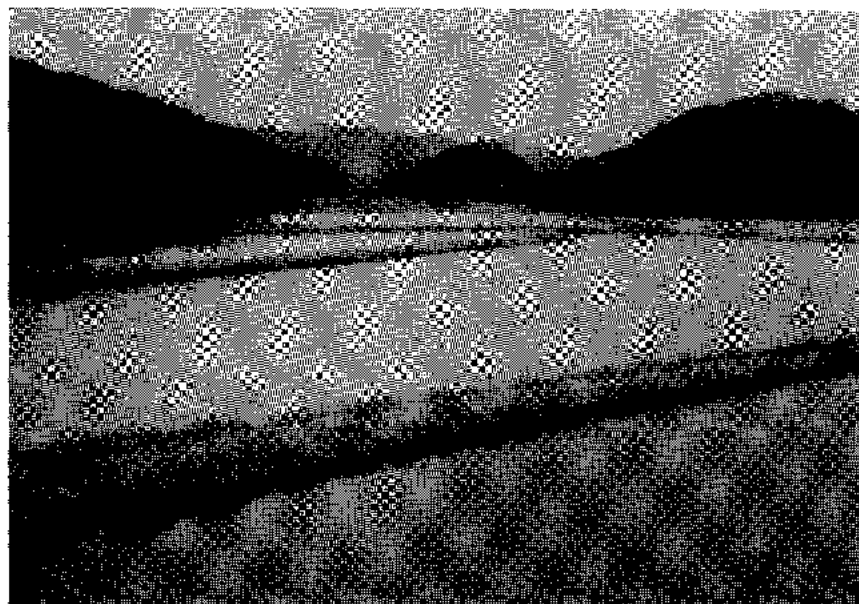


図 8 西表島竹富町美原地区の水田

オアッセイ試験法（発光 umu）の検討、2）発光 umu 試験及び代表的な遺伝毒性試験法である Ames 試験の二法を用いて TNT などの検出物質及び山田緑地土壌抽出液の遺伝毒性の有無、及び強度の調査を行い、山田緑地におけるカエルの生殖細胞を変異させる物質の存在（または、過去に存在した）を検討することとした。

（2）TNT 毒性の文献調査

山田緑地の環境から検出された物質の中で、最も特徴のある物質は TNT である。TNT 以外にも前述した有機塩素系物質やベンゾ(a)ピレン（B(a)P）など多数の物質が検出されているが、それらは一般環境からも通常検出される物質であり、また山田緑地での検出濃度も一般環境と比較して際だって高濃度ではない。一方、TNT は爆薬というその用途から、日本での検出例は山田緑地を除いて報告されていない。さらに、TNT の毒性は比較的高く、発ガン性（US EPA では、人に発ガンの可能性がある C に分類。IARC（国際ガン研究機関）では、動物実験においてのみ発ガンの証拠がある Group3 に分類）も指摘されている。

そこで、平成 12 年度は TNT に焦点を当て、TNT とその代謝物の遺伝毒性の調査を行った。文献調査の結果を表 1 及び 2 に示すが、遺伝毒性があるという報告と無いという報告が共にあり、結論が出ていない状況である。そこで、独自に発光 umu 試験及び Ames 試験を実施して TNT の遺伝毒性を調査した。

（3）発光 umu 試験による遺伝毒性調査

文献調査では、TNT 及びその代謝物の遺伝毒性に関しては、完全に結論が出ていない状況である。そこで、発光 umu 試験を用いて TNT の遺伝毒性を調査した。umu 試験は、損傷を受けた DNA を修復する時の SOS 応答を遺伝毒性物質の検索に応用した試験法であり、Ames 試験とほぼ同様の結果が得られることが知られている。我々は、通常の umu 試験法を一部改良し、遺伝毒性に対応して蛍光を発生する菌株を用いた発光 umu 試験法を採用して、既検出物質及び環境試料抽出液の遺伝毒性を調べた。試験法の詳細を参考 1 に示す。

〔結果〕

1）既検出物質の試験結果

TNT 及び B(a)P を対象に、薬物代謝酵素(S9 mix)存在・非存在下における遺伝毒性の有無及びその強さを試験した。その結果、S9 mix 存在下では TNT 及び B(a)P 共に遺伝毒性を有することが確認された。また、TNT の毒性強度は、B(a)P の約 1/20 であった。S9 mix が存在しない条件、即ち代謝されていない場合は、TNT だけが遺伝毒性を示した。しかし、その強度は、陽性対照とした 1,6-ジニトロピレンの 1/11,000 であった。

2）土壌試料抽出液の試験結果

実際の環境試料として、山田緑地では最も高濃度の TNT が検出された地点の土壌（3 試料）、カエル調査の対照地 2 地域（2 試料）、及び高濃度の化学物質染地域である洞海湾の底質（1 試料）を対象に umu 試験を行った。試料は参考 2 に示す前処理を行い、Fr. 1（無極性）、Fr. 2（中極性）、Fr. 3（高極性）に分画し、それぞれを S9 mix 処理・未処理の条件で試験した。その結果を図 1 に示す。薬物代謝酵素 S9 mix を添加しない場合は、全試料の全分画において遺伝毒性が検出されなかった。一方、S9 mix 処理を行った場合は、全ての試料で遺伝毒性が検出された。しかし、検出された毒性の強度は、試料及び分画により異なり、洞海湾＞山田緑地＝対照地 1＞対照地 2 の順であった。以上から、umu 試験の結果からは、

表1 TNT 及びその代謝物の変異原性(Ames 試験)

物質名	Mutagenicity				単位	Ref
	Ames TA98		Ames TA100			
	-S9	+S9	-S9	+S9		
TNT	409	260	No	No	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
	5400	380	6600	2000	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
	4350	報告なし	16200	報告なし	復帰数/mg	Padda et al (2000)
	0.5-10	No	No	No	ug/ml overlay	Won et al (1976)
4-Hydroxyamino-2,6-diNT	587	報告なし	4330	報告なし	復帰数/mg	Padda et al (2000)
2-Hydroxyamino-4,6-diNT	1320	報告なし	10200	報告なし	復帰数/mg	Padda et al (2000)
2,4-Dihydroxyamino-6NT	17400	報告なし	127000	報告なし	復帰数/mg	Padda et al (2000)
2-Amino-4,6-diNT	270	No	402	513	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
	500	125	2300	1233	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
	No	No	No	No		Won et al (1976)
4-Amino-2,6-diNT	No	No	218	No	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
	1000	275	500	200	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
	No	No	No	No		Won et al (1976)
2,4-Diamino-6NT	No	No	No	No	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
	0	報告なし	0	報告なし	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
2,6-Diamino-4NT	325	報告なし	750	報告なし	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
4,4',6,6'-TetraN-2,2'-azoxyT	No	No	No	No	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
2,2',6,6'-TetraN-4,4'-azoxyT	No	No	1460	1769	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)

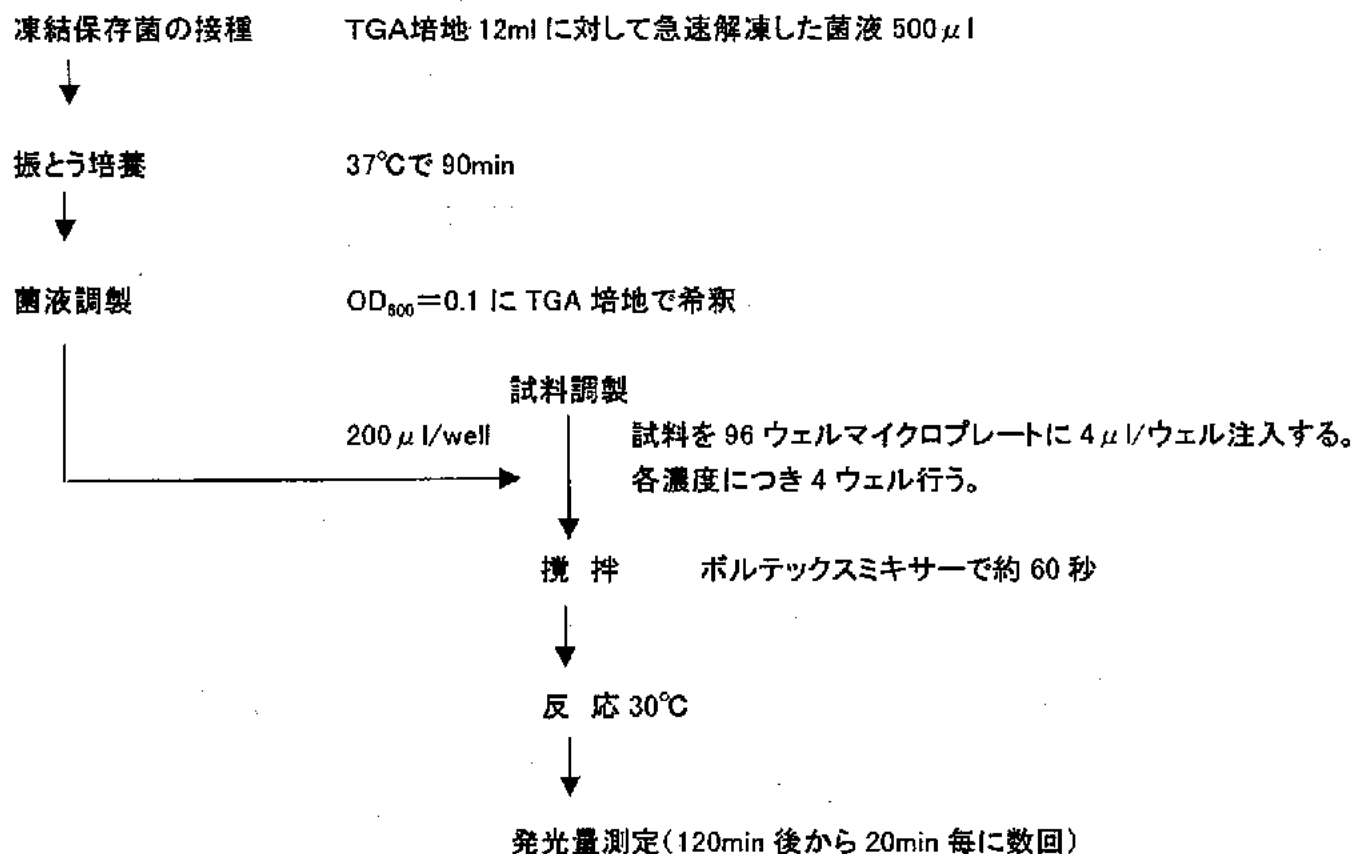
表2 TNT 及びその代謝物の変異原性(Mutatox)

物質名	Mutagenicity	
	Mutatox	
	-S9	+S9
TNT	0.25-0.50	No
4-Hydroxyamino-2,6-diNT	報告なし	報告なし
2-Hydroxyamino-4,6-diNT	報告なし	報告なし
2,4-Dihydroxyamino-6NT	報告なし	報告なし
2-Amino-4,6-diNT	3.9-15.6	1-3.9
4-Amino-2,6-diNT	2-15.6	0.5-7.8
2,4-Diamino-6NT	7.8-31.6	15.6-62.5
2,6-Diamino-4NT	報告なし	報告なし
4,4',6,6'-TetraN-2,2'-azoxyT	良好な結果得られず	良好な結果得られず
2,2',6,6'-TetraN-4,4'-azoxyT	良好な結果得られず	良好な結果得られず

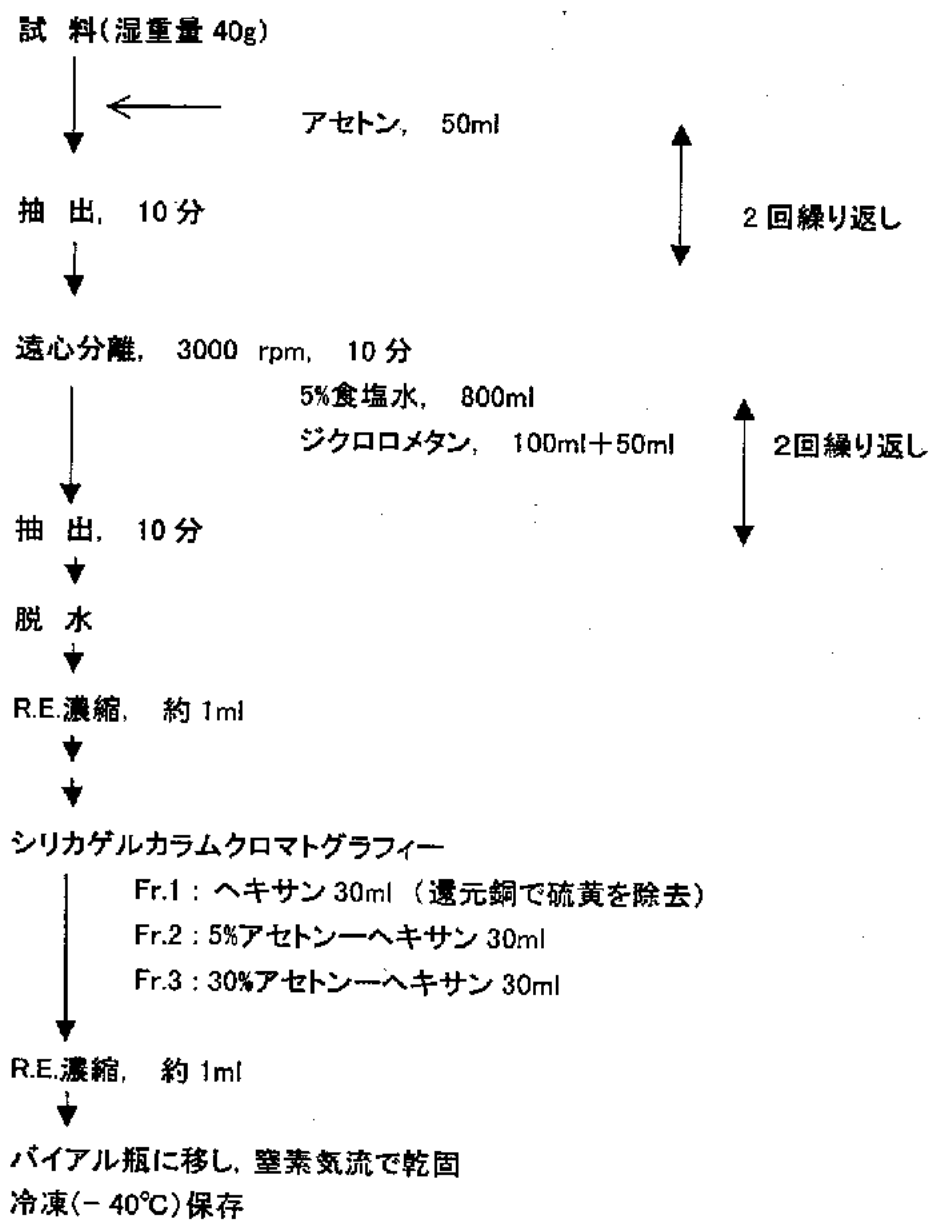
単位: ug Ref: Honeycutt et al (1996)

試料調製 : 前処理で冷凍保存した試料を DMSO 0.4ml に溶解し、さらに DMSO で 2 倍率希釈操作を行い、6 段階濃度試料を調製する。

使用菌液 : サルモネラ菌 TL210 株。遺伝毒性物質に暴露されると発光する様に形質転換された菌。発光量を測定することで遺伝毒性の有無を調べる。

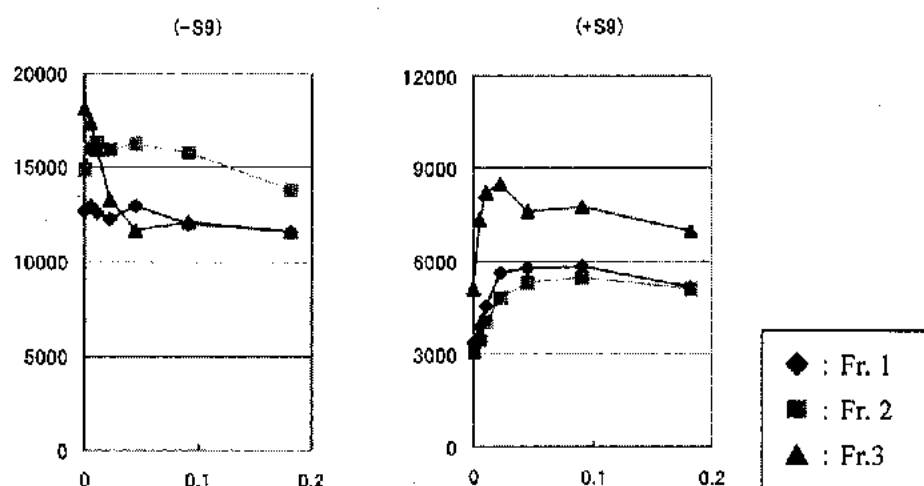


参考 1 umu 試験のフローチャート

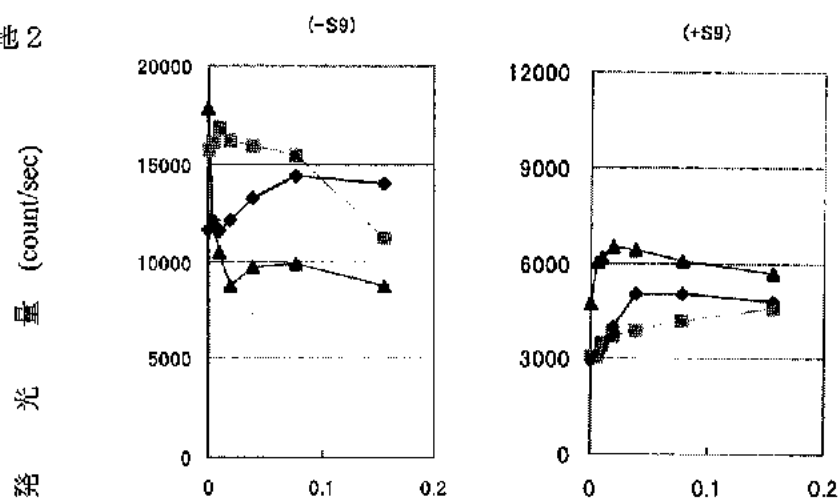


参考2 umu 試験用試料の前処理フローチャート

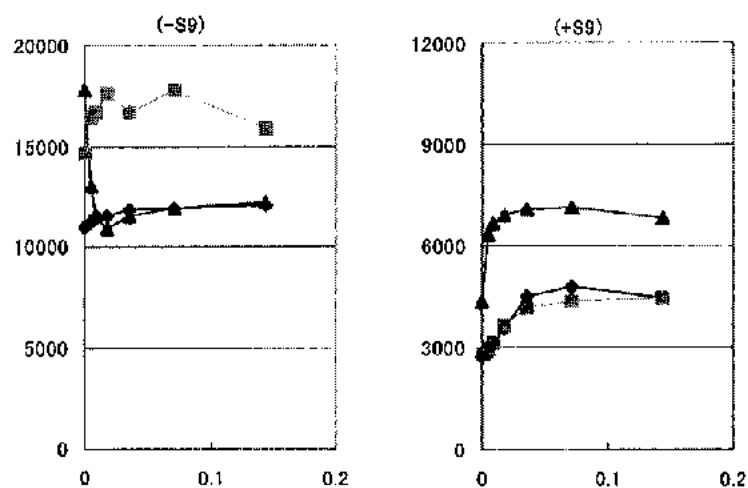
山田緑地 1



山田緑地 2



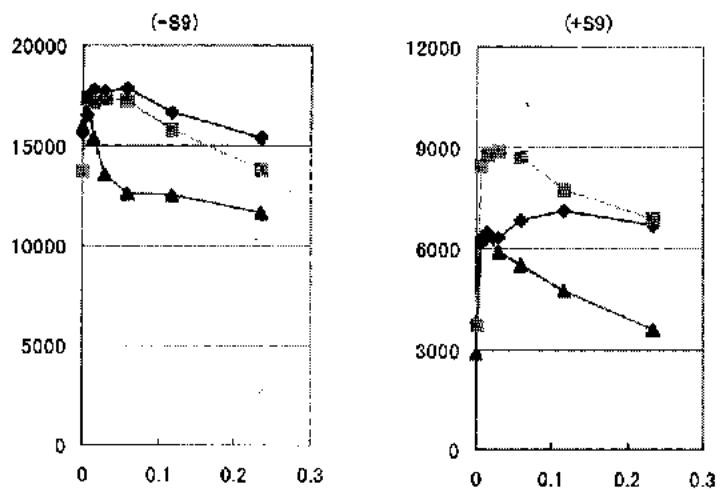
山田緑地 3



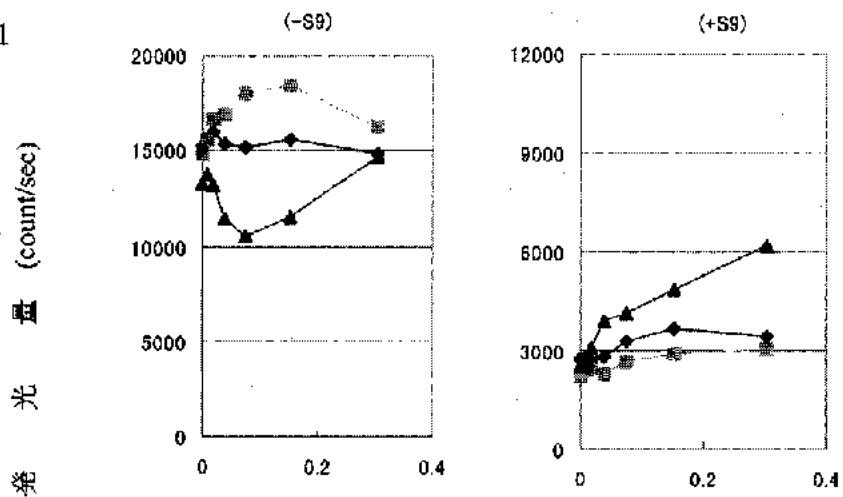
Dose (g dry/well)

図 1 - 1 環境試料の遺伝毒性

洞海湾



对照地 1



对照地 2

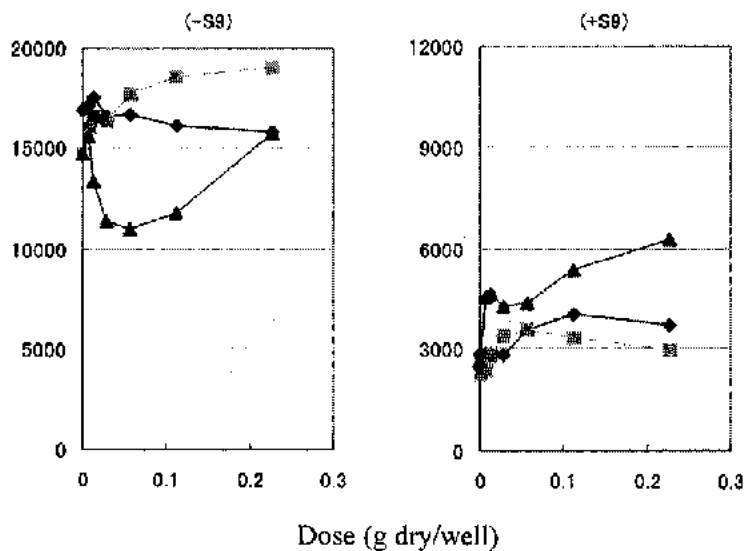


図 1 - 2 環境試料の遺伝毒性

山田緑地の土壌の遺伝毒性が特に高いという結果は得られなかった。

(4) Ames 試験による TNT 及びその代謝物の遺伝毒性

前述したように TNT 及びその代謝物の遺伝毒性の有無に関しては、文献データでは結論が得られなかったものの、発光 umu 試験結果からは遺伝毒性があることが示唆された。そこで、化学物質の遺伝毒性試験として最も信頼され、また公定法でも採用されている Ames 試験により遺伝毒性の最終確認を行った。試験は、(財)化学物質評価研究機構に依頼し、「有害性の調査の基準」(労働省告示第77号、労働省告示第67号)及び「微生物を用いる変異原性試験の具体的手法及び試験結果の評価方法について」に準拠して行った。

試験結果を表3に示すが、TNT 及び代謝物(2種)のすべてに遺伝毒性(突然変異誘発能)があることが確認された。また、試験した3物質の中で遺伝毒性が最も高かったのは、S9 mix 無添加時の TNT であった。

表3 TNT 及びその代謝物(2種)の Ames 試験結果

物質名	S9 mix	TA100	TA1535	WP2	TA98	TA1537	比活性 Revertants/mg
				<i>uvrA</i>			
TNT	添加	+	-	+	+	+	2,370(TA100)
	無添加	+	-	+	+	+	6,957(TA100)
2-Amino-4,6-diNT	添加	+	+	+	+	+	1,853(TA100)
	無添加	+	+	+	+	+	1,591(TA100)
4-Amino-2,6-diNT	添加	+	-	-	+	-	757(TA100)
	無添加	+	-	-	+	-	496(TA100)

S9mix：ラット肝臓の薬物代謝酵素溶液、試験物質の代謝に使用

TA100, TA1535：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌変異株、塩基対置換型の変異原物質に反応

WP2 *uvrA*：トリプトファン要求性の~~大腸菌~~変異株、塩基対置換型の変異原物質に反応

TA98, TA1537：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌変異株、フレームシフト型の変異原物質に反応

[考察]

平成12年度の調査において得られた結果は、次の2点である。

- ①Ames 試験及び発光 umu 試験の結果から、TNT 及びその代謝物2種(2-Amino-4,6-dinitrotoluene 及び 4-Amino-2,6-dinitrotoluene)に遺伝毒性があることが確認された。
- ②山田緑地の土壌中からは、特に高い遺伝毒性は検出されなかった。

今後は、①については、引き続き発光 umu 試験を用いて TNT 以外の検出物質の遺伝毒性を調査する。さらに、実際のカエルや卵に TNT を暴露してどのような影響が出るのかを検討する。②では、今回試験した試料が山田緑地の一部を代表しているにすぎないため、さらに試料数を増やして、山田緑地全体の遺伝毒性を評価する。

なお、遺伝毒性としては、現在検討している遺伝子の障害「ポイントミューテーション」の他に、生殖細胞の染色体そのものに障害を与える「染色体障害」がある。今後は、「過剰肢ガエルの染色体調査」、白