

## サッカリンナトリウムのヒト由来株化細胞における突然変異原性について

鈴木英子\*

### Mutagenicity of Sodium Saccharin in a Human Clonal Cell Line

HIDEKO SUZUKI\*

**Keywords:** サッカリンナトリウム Saccharin Sodium, ウアバイン Ouabain, 突然変異原性 mutagenicity

#### 緒言

人工甘味料サッカリンの突然変異性に関しては、バクテリア、酵母、キイロシヨウジョウバエ、植物細胞、哺乳動物の培養細胞や、ゲッ菌類の生体細胞等において、試験が行われ、数多くの報告があるが、結果はまちまちで統一の見解を得るまでには至っていない<sup>1,2)</sup>。

一方、サッカリンのラットを用いた発癌性試験において、サッカリン5%含有した飼料を与えた群に膀胱腫瘍が発生することが報告されている<sup>3)</sup>。当毒性部での発癌性試験においても、サッカリンナトリウムを処理した雄ラットに膀胱腫瘍が認められた<sup>4)</sup>。

今回、我々は、ヒト胎児由来株化細胞、RSa<sup>5)</sup>を用いて、サッカリンナトリウムの突然変異原性試験を行った結果、RSa細胞に高率に突然変異が生じることを明らかにしたので報告する。

#### 実験材料および方法

**細胞および培養** ヒト胎児由来株化細胞、RSa<sup>5)</sup>を用いた。細胞は、牛胎児血清 (GIBCO) 10%および抗生物質としてペニシリン (100  $\mu$ /ml) とストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml) を含む、Eagles' minimum essential medium (MEM と略、GIBCO) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。突然変異原性の測定の場合は、培養液中の血清濃度を15%にした。

**試料** サッカリンナトリウム (大東化学工業株式会社)、ouabain (Sigma) を用いた。サッカリンナトリウムは、使用直前に MEM で調製した。ウアバインは、PBS に溶解した後、血清の入った培養液にて調製した。紫外線 (UV) 照射を陽性対照とした。

**突然変異原性試験** 6 × 10<sup>5</sup>個の RSa 細胞を10ml の正

常培地の入った培養瓶 (45cm<sup>2</sup>) に播種した。24時間培養後、培地を除いて、サッカリンナトリウムを所定の濃度に添加し、37°C 炭酸ガス培養器中で22時間処理した。UV 照射は、通常の殺菌灯 (15W) をセットした暗箱を用いて行った。変異原処理後、正常培養液中で48時間培養した後、0.25%トリプシンを用いて細胞を培養面より剥離して、生存率と突然変異原性の測定のため、再播種した。生存率の検出のためには、1 × 10<sup>3</sup>個の細胞を10ml の正常培地の入った10cm径シャーレに播種した。14日間培養した後、0.2% (W/V) メチレンブルーを含んだ30%メタノール溶液で固定、染色し、コロニーを数えた。この場合、1群3枚のシャーレを用いた。突然変異細胞検出のためには、5 × 10<sup>4</sup>個の細胞を10ml の10<sup>-7</sup>Mウアバイン含有培地の入った10cm径シャーレに再播種し、選択培養を行った。7日後に培養液を交換し、14日後にコロニーを固定、染色し、ウアバイン耐性細胞のコロニー数を数えた。この場合、1群6枚のシャーレを用いた。生存率および突然変異率は次式により求めた。

$$\text{生存率} = \frac{\text{正常培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}$$

$$\text{突然変異率} = \frac{\text{選択培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}} \div \text{生存率}$$

#### 結果および考察

Table 1 に示すようにサッカリンナトリウムを処理した RSa 細胞の生存率は、サッカリンナトリウムの量の増加にともなって低下したが、突然変異率は、無処理群に比べ有意に増加し、サッカリンナトリウムの量の増加

\*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Mntagenicity of Sodinm Saccharin in RSA cells

Treatment	Survivors <sup>a</sup>	Resistants <sup>b</sup>	Mutation freq. <sup>c</sup>
0	145 ± 7	2.7 ± 0.3	3.7
Sodium Saccharin (mg/ml)			
15.0	134 ± 4	6.0 ± 1.7	9.0
17.5	115 ± 11	8.7 ± 0.3	15.1
20.0	108 ± 1	11.0 ± 2.9	20.4
UV (J/m <sup>2</sup> )			
5	100 ± 8	5.3 ± 0.3	10.6

<sup>a</sup>Number of surviving colonies per dish ( $2 \times 10^3$  cells), mean ± S.E.

<sup>b</sup>Number of ouabain resistant colonies per dish ( $5 \times 10^4$  cells), mean ± S.E.

<sup>c</sup>Mutation frequencies per  $10^4$  surviving cells.

にともなって増加した。サッカリンナトリウム20mg/mlの処理では、突然変異頻度は、無処理群の約6倍に増加した。

陽性対照として用いたUV (5 J/m<sup>2</sup>)を照射したRSA細胞での突然変異率は、10.6であった。この場合の生存率とほとんど同じ生存率を示すサッカリンナトリウムの量 (20mg/ml)を処理した場合の突然変異率と比較すると、サッカリンナトリウム処理群は、20.4で、UV処理群の約2倍の突然変異を誘発した。以上の結果は、サッカリンナトリウムはUVより強い突然変異原物質であることを示唆する。

これまで、サッカリンの *in vitro* での変異原性試験に

関する報告は、数多くあるが、その多くは陰性の結果である<sup>2,6)</sup>。一方、Batzingerらは、サッカリンを経口投与したマウスから尿をとり、サルモネラテストを行った結果、変異原性が認められたことを報告した<sup>7)</sup>。

又、越智と外村<sup>8)</sup>により、ヒトリンパ球培養細胞のサッカリンナトリウム低濃度処理で不定期DNA合成が観察されている。これはDNA障害を受けたことを示すものである。

今回、ヒト胎児由来化細胞、RSA, を用いサッカリンナトリウムの変異原性試験を行った結果、陽性の結果を得たことは、サッカリンナトリウムがDNAに損傷を与えていることを示唆する。よってさらにサッカリンナトリウムのDNAへの作用を検討する必要がある。

#### 文 献

- 1) Kramers, P.G.N.: *Mutation Res.*, 32, 81-92, 1975.
- 2) Ashby, J.: *Fd Chemical. Toxicol.*, 23(4/5), 507-519, 1985.
- 3) Bungard, G.: *Dtsch. Apoth.*, 25, 738-753, 1973.
- 4) 藤井 孝, 井口重孝, 田山邦昭, 平賀興吾: 第43回日本癌学会総会記事, 46, 1984.
- 5) Suzuki, H., Suzuki, N., Sasaki, M. and Hiraga, K.: *Mutation Res.*, 156, 123-127, 1985.
- 6) Eckhardt, K., King, M. T., Gocke, E. and Wild, D.: *Toxicology Letters.*, 7, 51-60, 1980.
- 7) Batzinger, R.P., Ou, S.Y.L. and Bueding, E.: *Science.*, 198, 944-946, 1977.
- 8) 越智尚子, 外村 晶: 日本環境変異原研究会第5回研究発表会要旨集, 32, 1976.

## Light Scattering (光散乱) 法による溶血検査 (Ⅲ) 無機水銀 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) のヒトならびにウサギの溶血に対する差異

市川 久次\*, 小林 博義\*

### Hemolysis Test by Light Scattering Method (III) Difference of Hemolysis in Human and Rabbit by Inorganic Mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ )

HISATSUGU ICHIKAWA\* and HIROYOSHI KOBAYASHI\*

**Keywords** : 溶血検査 hemolysis test, 光散乱法 light scattering method, ヒト human, ウサギ rabbit

我々はこれまでヒトならびにウサギの血液を用いて、より簡便で、使用血液が少なく、さらに即時的かつ直接的に溶血を測定できる light scattering (光散乱) 法による溶血試験法についての基礎的検討を行い、十分実用に耐え得るものを確立した<sup>1,2)</sup>。この間得られた結果を検討したところ、PBS (リン酸緩衝液加生理食塩液, pH7.4) 中における 1% Hct 赤血球液の経時的安定性においてヒトとウサギの間に著しい差があり、また無機水銀 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) に対する溶血感受性にほぼ10倍の差があった。

そこで今回、ヒトとウサギの新鮮血液より調製した赤血球液について、それらの経時的安定性における差異を明らかにする目的で無機水銀 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) を添加し、経時的安定性に差が認められた日における溶血の状況を形態学的に検討したところ若干の知見を得たので報告する。

#### 実験材料ならびに方法

##### 1. 赤血球の調製法

健康な成人男子およびウサギ (北山ラベス KK 生産の SPF, KBL: JW 系, 雄) より得た新鮮な静脈血 (ヘパリン加) を冷却下に遠心 (2000rpm, 10min) し赤血球を分離する。遠心分離により得た赤血球を 2~3 倍のヒト、ウサギそれぞれ用の PBS (PBS (ヒト)<sup>1)</sup>, PBS-rbt (ウサギ)<sup>2,3)</sup> にて 3 回洗浄した後、PBS, PBS-rbt を用いて 1% ヘマトクリット (Hct) 赤血球液を調製し、4℃で保存し、使用時に PBS, PBS-rbt で 0.03% Hct に希釈して実験に供した。

##### 2. 溶血の測定方法ならびに 50% 溶血時間 ( $t_{1/2}$ ) の求め方

市川ら<sup>1)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、実験方法 1 で得た 1% Hct 赤血球液 90  $\mu\text{l}$ , 無機水銀 ( $\text{HgCl}_2$  を PBS, PBS-rbt に溶解) を最終濃度ヒト 0.4ppm, ウサギ 0.04ppm をテフロン栓付吸光度測定用キュベットにとり、さらに PBS, PBS-rbt を加えて全量 3.0ml とし、37℃で incubate しながら経時的に分光光度計 (Cary17) を用いて 700nm における吸光度を経時的に測定し、溶血曲線を得る。グラフ上にて吸光度の最高値と最低値より 50% 溶血値を求め、その点における経過時間を求め 50% 溶血時間 ( $t_{1/2}$ , min) とする。

##### 3. 形態学的検討

実験方法 2 で示した方法により溶血を検討した被検赤血球液について、ヒトにおいては 0, 120min, ウサギにおいては 0, 180min (採血後 0 日において、それぞれ確実に 0.4ppm (ヒト), 0.04ppm (ウサギ) の無機水銀 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) により溶血が完了する時間) の反応時間における被検赤血球の一部少量を取り、検鏡し写真撮影 (ツァイス社製, フォトマイクロスコープ (Ⅲ) 使用) を行った。

##### 4. 試薬

溶血毒として用いた無機水銀 ( $\text{Hg}^{2+}$ , 塩化第二水銀) は和光純薬製 (試薬特級 Lot No. PJ1110) を使用し、抗凝固剤としてはヘパリンナトリウムを使用した。その他の試薬はすべて JIS 試薬特級を使用した。

\*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

## 実験結果

## 1. 1% Hct 赤血球保存液の経時的安定性

ヒトならびにウサギより得た1% Hct 赤血球液の4℃における経時的安定性を採血後0日目においてほぼ同一の $t_{1/2}$ を示す濃度(ヒト赤血球の場合0.4ppm, 62min; ウサギ赤血球の場合0.04ppm, 73min)の無機水銀( $Hg^{2+}$ )を用いて検討を加えたところ、Table 1, 2に示した如く、ヒトにおいては採血後4日目までは安定であるのに対し、ウサギにおいては採血後1日目ですでに有意なる( $p < 0.001$ )  $t_{1/2}$ の延長が認められ、2日目ではさらに延長された、この結果を赤血球膜の溶血抵抗性という観点よりみればウサギにおいてはむしろ溶血しにくくなった、すなわち無機水銀による溶血に対し強くなったと言える結果が得られた。

## 2. 形態学的検討結果

ヒトならびにウサギの1% Hct 赤血球液の無機水銀( $Hg^{2+}$ )を用いた場合の経時的安定性( $t_{1/2}$ に対する)の差異についてより詳しく検討する目的で、採血後0日目、2日目の赤血球液を用いて、無機水銀0.4ppm(ヒト)0.04ppm(ウサギ)を添加反応させ、ヒトにおいては0, 120min, ウサギにおいては0, 180minにおける被検反応液の一部少量をとり検鏡写真撮影した結果をFig. 1, 2に示した。すなわち、採血後0日目においては無機水銀添加前(0min)と溶血終了時(ヒト120min, ウサギ180min)において、ヒトとウサギの間に著しい差異はなく、双方共溶血終了時においては完全に赤血球膜が微細破片となり破片の痕跡がとらえられたにすぎなかった。しかしながら採血後2日目において、ヒトの場合には採血後0日目とほとんど変わらないのに対し、ウサギの180minにおいてはcrenationを起し、赤血球膜が微細破片とならず、萎縮固化して行くのが認められた。

## 考 察

light scattering (光散乱)法を用いて、ヒトとウサギの赤血球液の経時的安定性について、採血後0日目においてほぼ同様な $t_{1/2}$ を与える無機水銀( $Hg^{2+}$ )の濃度(ヒト:0.4ppm,  $t_{1/2}$ 62min, ウサギ:0.04ppm,  $t_{1/2}$ 73min)を添加し、経時的に $t_{1/2}$ の変化を検討したところ、ヒトの場合は採血後4日目まではほぼ不変であったのに対し、ウサギの場合は採血後1日目ですでに有意に $t_{1/2}$ が延長しており、採血後2日目ではさらに延長していた。通常agingにより赤血球膜が弱くなり安定性がより小さくなるとすれば、 $t_{1/2}$ は短縮して行くことが容易に推察できる。事実ヒトの場合は採血後5日目より有意なる $t_{1/2}$ の短縮がみられ、さらに時間の経過と共に

Table 1. Effect of Days Elapsed on Times for 50% Hemolysis ( $t_{1/2}$ ) by 0.4ppm  $Hg^{2+}$  in 0.03% Hematocrits (Human red blood cells)

Day after Collection	50% Hemolysis Time ( $t_{1/2}$ , min)	
	D1	D2
0	55.5±0.50 <sup>1)</sup> (3) <sup>2)</sup>	67.57±0.60(3)
1	59.95±3.66(4)	67.17±0.76(3)
2	56.10±2.77(5)	67.50±0.50(3)
3	52.66±1.61*(5)	65.33±0.76*(3)
4	53.57±2.69(3)	64.83±3.25(3)
5	51.17±1.89*(3)	63.43±3.86(3)
6	47.67±0.29*(3)	64.33±0.29*(3)
7	44.33±0.76*(3)	61.00±0.87*(3)
10	43.07±0.60*(3)	58.43±0.51*(3)

1) mean ± SD

2) No. of determinations

\* significantly different from 0 day's value at  $p < 0.05$  Hemolysis was observed slightly in control samples.

Table 2. Effect of Days Elapsed on Times for 50% Hemolysis ( $t_{1/2}$ ) by 0.04 ppm  $Hg^{2+}$  in 0.03% Hematocrits (Rabbit red blood cells)

Day after Collection	50% Hemolysis Time ( $t_{1/2}$ , min)
0	72.6±14.71 <sup>1)</sup> (13) <sup>2)</sup>
1	141.5±24.13(8)***
2	177.6±83.95(5)***

1) mean ± SD

2) No. of determinations

significantly different from 0 day's value  
\*\*\*  $p < 0.001$

にさらに短縮されていくのが認められた。すなわち、赤血球膜の不安定性が増したということが推察された。しかしながら、ウサギの場合は逆に現象としては溶血抵抗性が増したと解釈されるような結果が得られ、agingによりヒトは異なった変化が赤血球膜に生じ、無機水銀( $Hg^{2+}$ )が添加された時、赤血球膜が破壊され残存数が減少するというのではなく吸光度を減少させるような変化(多分体積の減少)が生じたものと推定された。そこでこの変化を明らかにする目的で、ヒトとウサギの赤

血球液（採血後0日目と2日目）に無機水銀を添加し反応させ、反応0minを対照として、また比較するために採血後0日目において確実に溶血が完了している時間（ヒト, 120min, 0.4ppm  $\text{Hg}^{2+}$ ; ウサギ, 180min, 0.04ppm  $\text{Hg}^{2+}$ ）経過後の被検赤血球液の一部少量をとり検鏡し写真撮影をしたところ, Fig. 1に示した如く, 採血0日目においてはヒト, ウサギにおいて, それぞれ120min, 180min後には赤血球膜の微細破片の痕跡しか検出できなかったが, 採血後2日目においては, ヒトにおいては採血後0日目とほとんど変わらなかったのに対し, ウサギにおいては（前述の如く,  $t_{1/2}$ の延長が起こっており）ほぼ $t_{1/2}$ に近い反応時間180min（採血後0日目においては溶血が完了している）において赤血球のcrenationが起こっていることが認められた。このことよりウサギの赤血球のagingによる変化はヒトと異なり, 結果として無機水銀（ $\text{Hg}^{2+}$ ）と反応しcrenationを起こすような変化が推定された。この詳細については,

さらに電子顕微鏡による検索により明らかにされるものと考ええる。

#### 結 論

無機水銀（ $\text{Hg}^{2+}$ ）添加によるヒトならびにウサギの赤血球に対する作用を, 赤血球液の経時的安定性という面より検討したところ, とくに形態学的にヒトにおいてはagingにより著しい変化はなかったが, ウサギにおいてはagingにより結果として無機水銀（ $\text{Hg}^{2+}$ ）と反応し, 赤血球がcrenationを起こすような変化を生じたことが明らかとなった。

#### 文 献

- 1) 市川久次, 小林博義: 東京衛研年報, 36, 335-339, 1985.
- 2) 市川久次, 小林博義: 東京衛研年報, 37, 391-394, 1986.
- 3) Barnes, G. and Frieden, E: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115, 680, 1983.

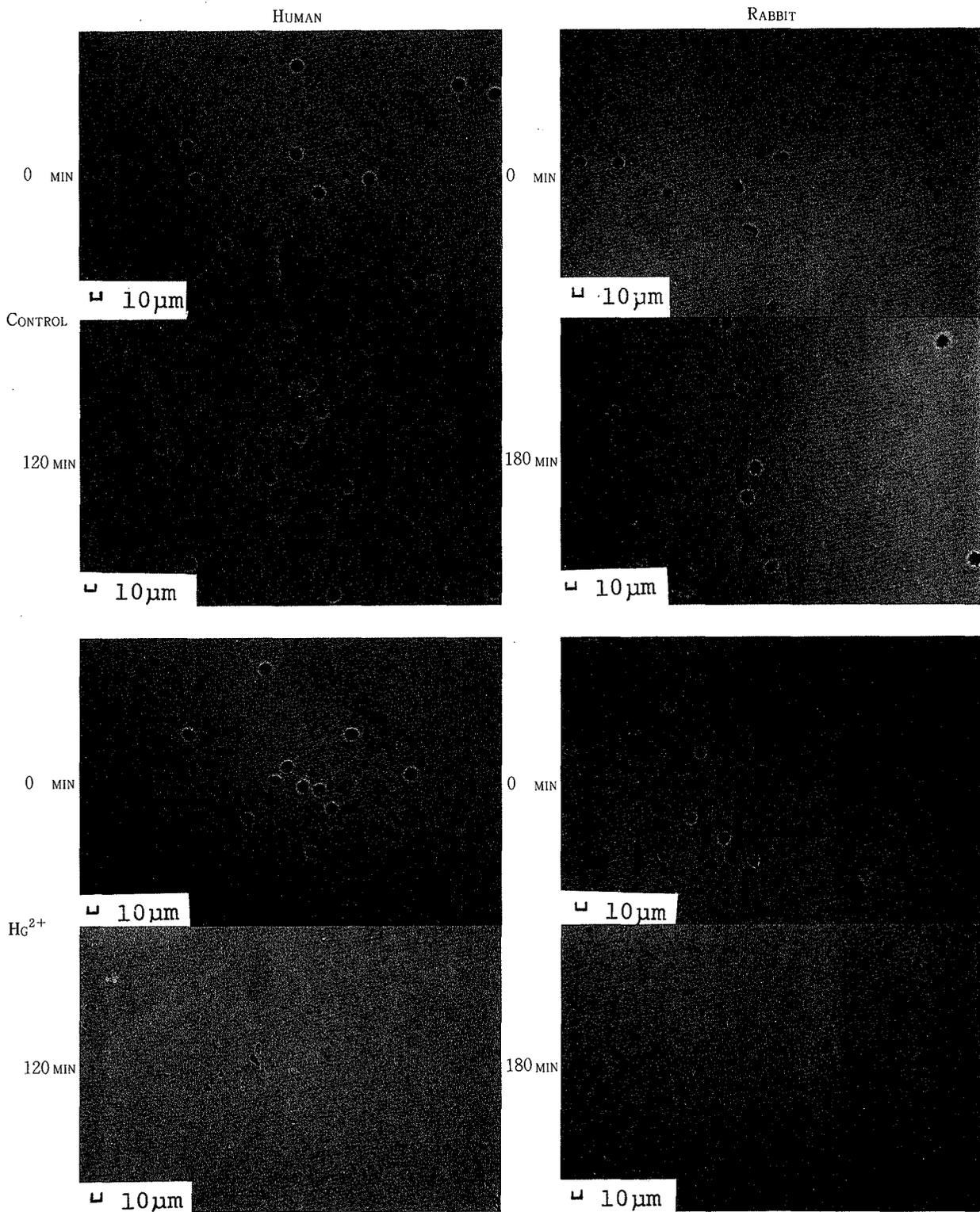


Fig. 1. MICROSCOPICAL OBSERVATION OF HEMOLYSIS OF HUMAN AND RABBIT RED BLOOD CELLS BY Hg<sup>2+</sup>.  
 (0 DAY AFTER BLOOD COLLECTION)  
 Hg<sup>2+</sup> CONCENTRATION: HUMAN 0.4 PPM, RABBIT 0.04 PPM

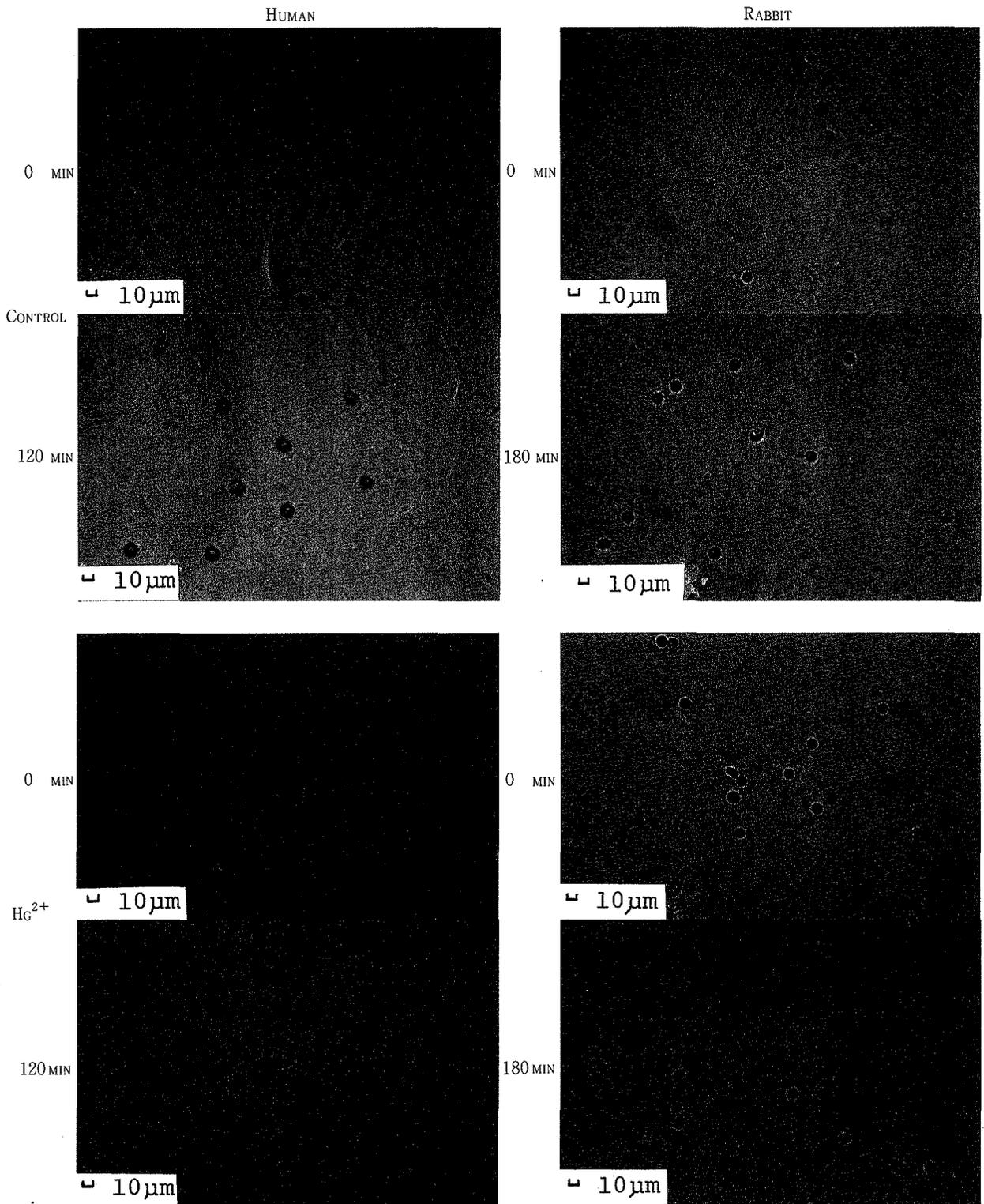


FIG. 2. MICROSCOPICAL OBSERVATION OF HEMOLYSIS OF HUMAN AND RABBIT RED BLOOD CELLS BY Hg<sup>2+</sup>  
 (2 DAYS AFTER BLOOD COLLECTION)  
 Hg<sup>2+</sup> CONCENTRATION: HUMAN 0.4 PPM, RABBIT 0.04 PPM