

金沢大学工学部 正 員 松井 三郎

金沢大学大学院 学生員 ○帽子山明彦

金沢大学大学院 学生員 青木 孝隆

1. はじめに

水質汚染防止のためには現在、BOD、COD等の一般有機指標と有害物質という指標が使われているにすぎない。工場排水や都市下水中には放流水域の生態系に急性あるいは慢性毒性を与えるものばかりでなく、遺伝的影響を及ぼす水質汚濁物質が含まれている可能性がある。そこでこのような環境変異原を探索し、排水を放流するに当たって遺伝的影響という側面から安全性を評価する方法の開発が必要となってくる。最近、琵琶湖や霞ヶ浦などの内陸水系で排出された工場排水や都市下水の混入した水を下流で再度上水道として利用する割合が高くなっており、このようなことがこの研究の必要性を高めている。

本研究では国立遺伝研究所の賀田博士が開発した枯草菌を利用したRec-assay法⁽¹⁾を基礎として工場排水や都市下水中に低濃度に存在する潜在的環境変異原を検出する方法を開発する目的で基礎的な実験を行なったのでここに報告する。

2. 実験の原理⁽¹⁾⁽²⁾

生物体のDNAに生じた傷は突然変異生成とともに、場合によっては細胞致死の原因となるが、多くの場合細胞の修復能力によって補修されることが知られている。ところが最近、微生物でこのような修復能力を遺伝的に欠損した株が多数分離されている。これらの修復能力欠損株はDNA損傷を修復できないので修復能力を有する野生株に比べてDNA損傷誘発物質（環境変異原）に暴露すると著しく死にやすい。そこで野生株と修復能力欠損株との致死感受性の差をみることによってDNA損傷の有無を調べることができる。この致死感受性法は突然変異活性を直接検出するものではないが、それよりもはるかに高い感度で各種の変異原によるDNA損傷の有無をチェックすることができる。

一般にDNA損傷の修復機構は除去修復と組み換え修復の二つの型に分けて考えることができる。除去修復はDNAの傷を酵素的に切り出し、部分的なDNA合成を行なって正常なDNAに復元するものである。一方、DNA損傷の多くは一次的あるいは二次的に組み換え修復されることが知られている。そして組み換え修復は除去修復よりも広い範囲の変異原の検出に有効であることが調べられた⁽³⁾。そこで本研究では、野生株として枯草菌のNIG 17 (*arg⁻, thy⁻*)、修復能力欠損株としてNIG 45 (*arg⁻, thy⁻, rec⁻*)を使った。ここで*arg⁻*はアルギニン要求性、*thy⁻*はトリプトファン要求性、*rec⁻*は組み換え修復能力欠損を意味している。

3. 実験方法

賀田博士の開発したRec-assay法⁽¹⁾に基づいて、新しく液体培養による実験を行なった。この方法では工場排水や都市下水中に含まれる低濃度の潜在的環境変異原の検出が可能になり、賀田博士の固型培地によるRec-assay法の1/10～1/100程度の濃度でも適用できる。

図1に示すL字管に無菌的にnutrient broth（肉エキス10g，酵母抽出物10g，NaCl 5gを蒸留水1000 mlに溶解して、pH7に調整したもの）を8 ml注入し、これに前培養した枯草菌NIG 17またはNIG 45（それぞれ適当に希釈して）を1 ml加え、さらに被検物質溶液を1 ml注入して振とう培養する（水温30℃，振とう速度80 rpm）。そして時間経過とともにその濁度（菌数に比例する）をクレット光電光度計で測定して、対数グラフ用紙に増殖曲線を書く。

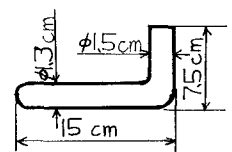


FIG.1 L字管

4. 実験結果および考察(図2参照)

被検直物質は突然変異原の(1)マイトマイシンCと環境汚染物質として問題となる(2)6価クロム、(3)水銀、(4)カドミウムと、また実際の排水として(5)石油化学工業排水を共同処理するA処理場排水の5種類である。

(1)マイトマイシンC(MC) この実験は $0, 10^4, 5 \times 10^4, 10^5, 5 \times 10^5, 10^6, 5 \times 10^6$ ppmの7段階のMCの濃度で行なった。NIG 17の増殖曲線を見ると 5×10^5 ppmでcontrol(0 ppm)と比べて影響が表われているのがわかる。 5×10^6 ppmでは増殖不能となった。一方、NIG 45の方では 5×10^5 ppmで影響が表われ、 5×10^6 ppmで増殖不能となった。つまり、controlに比べて増殖に影響を及ぼすMCの濃度はNIG 17では 5×10^5 ppmであるが、NIG 45では 5×10^4 ppmであり、それらの濃度に10倍の開きがあり、明らかに環境変異原性がみられる。

(2)6価クロム(Cr^{6+}) $0, 10^1, 5 \times 10^1, 1, 5, 10, 5 \times 10$ ppmの7段階の濃度で行なった。増殖影響濃度はNIG 17で10 ppm、NIG 45で1 ppmである。また増殖不能濃度はNIG 17、NIG 45でそれぞれ50 ppm以上、5 ppmである。したがって Cr^{6+} には強いDNA障害性があり、環境変異原であることがわかる。なお、 Cr^{3+} についても実験を行なつてみたが環境変異原性はみられなかった。

(3)水銀(Hg), (4)カドミウム(Cd) Hg, Cd とも増殖影響濃度、増殖不能濃度はともにNIG 17、NIG 45としては差が見られなかった。したがって Hg, Cd は環境変異原性というよりも蛋白質合成阻害等の毒性物質だと推定される。(カドミウムの図は省略)

(5)A処理場排水 この実験は排水を濃縮すると増殖のための付加基質と化学反応を起し、実験が困難となるため、排水を濃縮せずに基質を直接、排水に加えてろ過滅菌したものを培地として使用した。この濃度の排水ではNIG 17、NIG 45はともに増殖に影響はみられなかった。しかし、この排水を濃縮した場合の環境変異原を含む可能性は否定されていない。また、この排水には多くの難分解性有機物が含まれており、これらは代謝活性化⁽¹⁾という特殊な処理を行わないと環境変異原性を示さないこともあり、この排水に環境変異原が含まれていないとは断定はできない。

5. おわりに

本実験により、6価クロムには環境変異原性がみられたが、水銀、カドミウムは環境変異原性については明らかにみられなかった。またA処理場排水の実験では環境変異原の存在について明確な判断はできなかった。

この実験手法は無機物に対しては有効であるが、有機物に対しては改善の余地があり、今後、この改善とともに環境変異原の強さを定量的に表わす方法を開発し、変異原含有排水放流の安全性評価方法をも研究したい。

《参考文献》(1)田島琢太郎他、化学物質の突然変異性の検出法、講談社、1973。(2)賀田恒夫、環境変異原の検出法の進歩とその問題、公害と対策、Vol. 12, No. 4, 1976。(3)賀田恒夫、Potential carcinogens 検出に関する最近の知見、医学のあけみ、85巻、8号、1973。

