

II-172 *Bacillus subtilis* の Rec-assay 法による重金属の環境変異原性検出と複合効果の判定および標的論からの考察

金沢大学 建設工学科 正員 ○ 松井三郎
富山県 土木部 正員 青木喜隆

1. はじめに 水質の安全性の評価は、従来の生物個体に注目した急性あるいは慢性毒性などの現世代を対象とした問題のとうらえ方だけでなく、環境変異原性という次世代以後への影響も含めて考える必要がある。環境変異原とは、我々の身の廻りに存在して生物に突然変異をもたらす物質であり、また遺伝子 DNA に作用して遺伝に悪影響を及ぼす恐れのある物質で、発ガン性との関係も疑われるものである。環境変異原物質を検出するために賀田の考案した Rec-assay 法を基礎にして、我々は Rec-assay 液体培地法を開発し、これまで水質汚濁防止法で有害物質として規制を受けている重金属について変異原性を調べた。さらに、工業废水や都市下水は多数の化学物質を含んでいるので、環境変異原性の複合効果についても調べた。本研究では、これまでの結果を整理するとともに、DNA 損傷機構を放射線の分野で用いられている標的論に基づいて検討し考察した。

2. 実験原理および方法 生物に突然変異を誘起する物質は当然 DNA と反応作用するはずである。生物の DNA に損傷が生じると、突然変異生成と共にその程度によっては細胞致死の原因となる。一般に DNA に生じた損傷は細胞の有する修復機構によって大部分が補修される。ところが最近の研究でこのような修復能力を遺伝的に欠損した微生物が多数分離されるようになった。これらの修復機構欠損株は修復能力のある野生株に比べて変異原物質に暴露すると著しく死にやすい。これら2株の化学物質に対する致死感受性の差を調べることで変異原性の有無を評価するのが Rec-assay 法である。実験に使用する微生物は枯草菌 (*Bacillus subtilis*) で、修復機構欠損株として NIG 45 (Rec⁻)、野生株として NIG 17 (Rec⁺) を用いた。実験は L 字管 (モー管) に nutrient broth を 5.0 ml、検査物質溶液を 0.6 ml、前培養した枯草菌液 0.4 ml 注入振とう培養箱 (37℃, 71 rpm)。そして検査物質が含まれていないコントロールの濃度が 100 に達すると、すべての L 字管の濃度を測定し対数方眼紙に増殖阻害曲線を描く。

3. 単一物質の DNA 損傷性 DNA 損傷性の典型物質として制ガン剤のマイトマイシン C (MMC)、DNA 損傷性がないが強力な抗生物質のカナマイシン (KM) の増殖阻害曲線をあげる (図-1, 2)。MMC は DNA 損傷性があるので Rec⁺と Rec⁻の増殖阻害濃度に著しい差が現れており Rec⁺と Rec⁻の 50%増殖阻害濃度比は 1.0 より大きい値となる。それに対して KM は DNA 損傷性はなく蛋白質合成を特異的に阻害して細胞増殖を阻止するので Rec⁺と Rec⁻の間には、ほとんど差が現れず、50%阻害濃度比は 1.0 に近い値となる。これらの典型図を基本にして重金属の実験結果を検討する。図-3 は、6価クロムの増殖阻害曲線であるが、Rec⁺と Rec⁻の間には著しい差があらわれており、MMC のパターンと似ている。6価クロムの強い変異原性がわかる。他の重金属で、Hg や Cd の場合 Rec⁺と Rec⁻の間にはほとんど阻害濃度差はなく、KM のパターンと似ている。また Cr³⁺, Cu, Pb, As, Zn の重金属類も KM のパターンと同じで DNA 損傷性はないと考えられる (表-1)。表-1 の結果から Mn は DNA 損傷性の疑いがある。

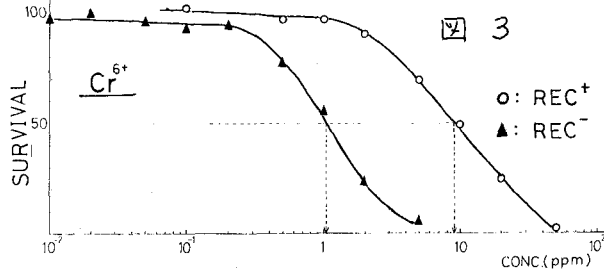
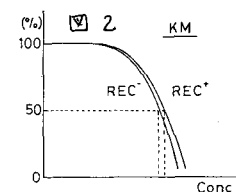
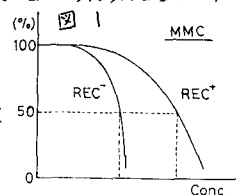


表1. 阻害濃度比

化学物質	$R = \frac{C_{50 \text{ Rec}^+}}{C_{50 \text{ Rec}^-}}$
MMC	8.3
KM	1.2
Cr ⁶⁺	8.6
Cr ³⁺	1.0
Hg	0.9
Cd	1.0
Pb	0.8
As	1.0
Cu	0.9
Zn	0.7
Mn	1.9
F	1.1

4. DNA損傷性の複合効果

6価クロムをベースに

して、DNA損傷性物質であるMMC、DNA損傷性のないHgを加えて、DNA損傷性の強さによつた変化が現われるか調べる。6価クロムにMMCを加えた時の増殖阻害曲線を図-4に示す。この場合MMCの効果が Rec^{+} より Rec^{-} に大きく現われる。すなわちあるMMCの濃度を高くしても Rec^{+} の50%阻害濃度はほとんど変化していないが、 Rec^{-} のそれは低濃度域にシフトしている。しかもそのシフト幅は同じである。この複合効果は、相乗的なものではなく相加的なものである。図-5は6価クロムに水銀を加えた時の結果である。この場合水銀を加えることにより Rec^{+} と Rec^{-} は同程度の影響を受け、増殖阻害曲線がともに低濃度域へシフトしている。このことから水銀の毒性が6価クロムのDNA損傷性とは独立して作用していると判断される。なお6価クロムに水銀を加えた場合、水銀と同様の結果を得た。

5. 標的論によるDNA損傷機構の検討

突然変異を誘起する要因としてよく知られているものに放射線があるが、放射線によるDNA損傷機構と理論的に推定する方法として標的論がある。標的論は化学物質などの作用源にも適用できる。標的論の基本仮定は、[1] 細胞は内部に標的を持て、あり、標的はヒット(損傷)を受けると死ぬ、[2] 細胞に作用源を作用させたとき、標的に平均λ個のヒットが生じ、[3] ヒットはall or noneの型で中間の型は存在せず、しかも互に独立に生成され小いとする。以上の仮定が成立すると、ある標的に実際λ個のヒットが生じる確率は $P(\lambda) = e^{-\lambda} \cdot \frac{\lambda^{\lambda}}{\lambda!}$ で表わされる。ここで細胞の生存率がヒット数λのどのような関数になるかは、細胞内の標的の数と標的の性質を仮定すれば決まる。(1) 1ヒット性1標的、細胞は1標的しかもたず、それは1ヒットで不活性化される。この場合生存率 $S = e^{-\lambda}$ 。(2) 1ヒット性多量標的、細胞はm個の標的を持ち、各々の標的は1ヒットで不活性化されるがm標的すべてが不活性化されて初めて細胞は死ぬ。 $S = 1 - (1 - e^{-\lambda})^m$ 。(3) 多重ヒット性1標的、細胞はn個以上のヒットで不活性化される標的を1個もたず。

$S = \sum_{x=0}^{n-1} e^{-\lambda} \frac{\lambda^x}{x!}$ (4) 多重ヒット性多量標的、細胞はnヒット性の標的をm個もつ。
 $S = 1 - (1 - \sum_{x=0}^{n-1} e^{-\lambda} \frac{\lambda^x}{x!})^m$ 。そこでDNA損傷性が認められる6価クロムとMMCのDNA損傷機構を標的論に基づいて検討すると、 Rec^{+} 、 Rec^{-} ともそれぞれ1ヒット性1標的の理論線と近似できることがわかった。このことから、6価クロムやMMCの作用により、標的と考えられるDNA(枯草菌は1本のDNA糸を持つ)に1個の損傷で細胞が致死に到ると考えられる(図-6)。1ヒット1標的の場合、平均致死濃度(mean lethal concentration)は、 $S = e^{-1} = 0.37$ から37%生存率濃度 C_{37} となる。したがって50%阻害濃度 C_{50} を比較指標とするよりも C_{37} を使用する方が理論根拠が明確になることがわかる。6価クロムの平均致死濃度比 $R_{37} = \frac{C_{37}^{Rec^{+}}}{C_{37}^{Rec^{-}}} = \frac{2.7 \times 10^{-6} (M)}{2.7 \times 10^{-5} (M)} = 10$ 、MMCの $R_{37} = \frac{C_{37}^{Rec^{+}}}{C_{37}^{Rec^{-}}} = \frac{1.7 \times 10^{-6} M}{1.8 \times 10^{-9} M} = 9.4$ となった。

6. 謝辞 本研究を進めるにあたって終始援助いただいた金沢大学がん研究所吉川寛教授、村上清史助教授に感謝します。またこの研究をともに進め卒業していった紀正彦君にも感謝します。

