

II-70

枯草菌のRec-assay による水質環境変異原物質の検出と評価 その1

—S-9Mixの導入とSporeによるRec-assayの改良—

金沢大学 建設工学科 正員 松井三郎

金沢大学 大学院 学生員 徳川正弘

金沢大学 大学院 学生員 小出芳久

1. はじめに

現在、水環境の安全性については、生体および生態系が受ける急性および慢性毒性を評価対象とする段階から、遺伝毒性すなわち環境変異原性をも含めて評価する段階に来ていると考えられる。そこで、本研究では、水環境の安全性評価の尺度としての変異原性を枯草菌(*Bacillus subtilis*)を用いて検出する手法およびその評価方法を確立することを目的に、実験ならびに考察を行った。

2. 実験原理および方法

1). 直接変異原物質の検出(液体Rec-assay) 本研究では、変異原物質の検出のために開発された枯草菌の野生株NIG17(Rec⁻)と組み換え修復能欠損株NIG45(Rec⁺)を利用するRec-assay¹⁾を液体法で実施する。この様に、微生物を用いる場合、変異原物質は、枯草菌のDNAに直接作用して変異原性を示す直接変異原物質と、動物細胞の活性化酵素等により活性化されて始めてDNAと反応する間接変異原物質に大別することができる。このうち、直接変異原物質を検出するためには、L字管にNutrient broth 5.0ml、検定物質溶液0.6ml、対数増殖期にある枯草菌溶液(濁度0.01になる様に希釈)0.4mlを注入し、振とう培養(37°C, 71rpm)する。検定物質を含まないControlの濁度が100に達した時点で、検定物質濃度を段階的に変えて注入したすべてのL字管の濁度を測定し、それぞれの濁度のControlの濁度に対する生存率を算出する。

2). 間接変異原物質の検出(液体S-9Rec-assay) 間接変異原物質を検出するためには、1)の液体Rec-assayに薬物代謝酵素系S-9Mixを導入して実験する必要がある。そこで、この場合は、L字管にNutrient broth 4.9ml、S-9 Mix 0.1ml、検定物質溶液0.6ml、枯草菌溶液0.4mlを注入し、以下1)と同様の操作を行う。

なお、水に不溶性の検定物質はdimethylsulfoxide(DMSO)に溶解して利用する。DMSOは10⁻³mg/mlの濃度まで増殖阻害はなく、また、直接および間接変異原性のないことが液体(S-9)Rec-assayによって確かめられている。

3). 枯草菌胞子による変異原物質の検出(Spore液体Rec-assay) 上述の液体Rec-assayでは対数増殖期にある枯草菌を用いたのであるが、この代わりに枯草菌胞子(Spore)溶液を利用することによって、実験時間を大幅に短縮することが可能である。本研究では、L字管内にNutrient broth 4.9ml、検定物質溶液0.6ml、胞子溶液(5×10⁷mg/mlの溶液を80°Cで15分間水浴したモノ)0.1mlを注入して実験を行った。この結果、実験時間は約1/3になった。

3. 実験結果および考察

1). 液体Rec-assay によるもの 横軸に検定物質濃度の対数を、縦軸に生存率をとって増殖阻害曲線を描き、図上でRec⁺とRec⁻の50%致死濃度の比を算出し(R50=C50Rec⁺/C50Rec⁻)、この値の大小によって変異原性の有無を検討するわけである。Fig.1は、代表的な直接変異原物質N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)の増殖阻害曲線を、Fig.2は、変異原性を有しないKanamycin(KM)の増殖阻害曲線を示している。この様子Sigmoid curveから算出されるR50の値には、かなりの誤差が存在するものと思われる。この点を改良する目的で、実験結果にProbit理

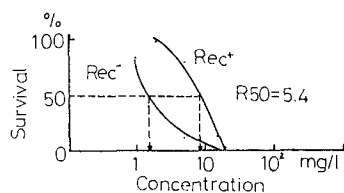


Fig.1 MNNGの液体Rec-assay

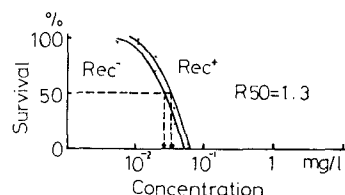


Fig.2 KMの液体Rec-assay

するわけである。Fig.1は、代表的な直接変異原物質N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)の増殖阻害曲線を、Fig.2は、変異原性を有しないKanamycin(KM)の増殖阻害曲線を示している。この様子Sigmoid curveから算出されるR50の値には、かなりの誤差が存在するものと思われる。この点を改良する目的で、実験結果にProbit理

論を適用し、R50の値を算出した。この結果、Table 1、Table 2に示した様な重金属および染料の直接変異原性の有無を統計的に評価することが可能となった。

2). 液体S-9 Rec-assayによるもの 代表的な間接変異原物質であるBenzo(a)pyrene(BP)について、液体Rec-assayを実施した結果、10mg/ml以下の濃度までは、Rec⁺、Rec⁻共に菌の増殖阻害は認められなかった。しかし、これに液体S-9 Rec-assayを適用すると、Rec⁺とRec⁻との間で増殖阻害曲線が異なり、BPは間接変異原性も有するのがわかる(Fig.3)。一方、同様の実験をMNNGについて実施すると、S-9 Mixによって、MNNGは明らかに不活性化されているのが認められる(Fig.1, Fig.4)。

以上より、液体Rec-assayにS-9 Mixを導入して、水環境中の変異原物質を検出する場合には、S-9 Mixによって活性化が促進される場合と、逆に、不活性化してしまう場合があると考えられる。前者の場合は、環境変異原検出能力の拡大を意味していることになり、後者の場合には、実際に、環境変異原に曝露される人体の積極的防衛を考案するモデルを提供していることになると考えられる。

3). Spore 液体Rec-assayによるもの MNNGについて液体Rec-assayとSpore 液体Rec-assayを比較すると、後者の方が、Rec⁻における増殖阻害濃度レベルが低濃度域へ移動し、R50の値も大きくなるという結果が得られた(Fig.1, Fig.5)。また、KMについても、増殖阻害濃度レベルの低下が認められた(Fig.2, Fig.6)。

この様に、Spore 液体Rec-assayにより、実験時間の短縮のみならず、低濃度域で変異原物質が検出でき、R50の値も大きくなるという成果が得られた。これは、環境変異原検出の上で、非常に重要な結果である。

4. おわりに

本研究では、変異原物質検出のための方法として液体Rec-assayを実施した。この結果、変異原性を有すると言われている物質の多くが、この方法で検出可能であることがわかった。また、実験結果にProbit理論を適用することにより、統計的に、変異原性の有無を検討することが可能となった。更に、液体Rec-assayにSporeを用いることによって、実験時間の短縮、感度の上昇という変異原検出上有意義な結果が得られた。

今後は、種々の物質について本法を適用し、更に、実験手法および評価方法の改良を試みるつもりである。
 <謝辞> 本研究を進めるにあたり、終始援助いただいた金沢大学癌研究所吉川寛教授、村上清史助教授、飯田克平助教授、および小笠原直毅助手に感謝の意を表します。また、共に研究して下さった山本良子さんおよび卒業していった島崎俊昭君にも感謝します。

<参考文献>

- 1). 田島弥太郎、賀田恒夫、近藤宗平、外村晶縮：環境変異原実験法、講談社サイエンティフィック、1980
- 2). 佐久間昭：生物検定法、東京大学出版会、1964

Table 1. Probit理論から求めた重金属のR50

Compound	R50
MMC	4.24
K ₂ Cr ₂ O ₇	13.84
KMnO ₄	2.58
Cd(NO ₃) ₂	1.42

Table 2. Probit理論から求めた染料のR50

Compound	R50
Methyl violet	1.78
Acridine orange	6.39
Acridine yellow	5.18

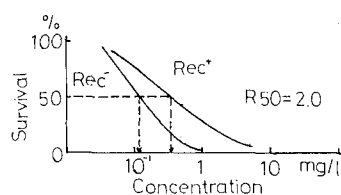


Fig. 3 BPの液体S-9 Rec-assay

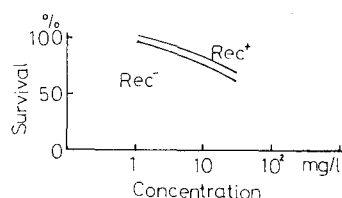


Fig. 4 MNNGの液体S-9 Rec-assay

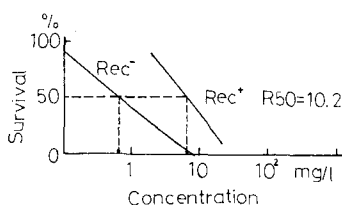


Fig. 5 MNNGのSpore液体Rec-assay

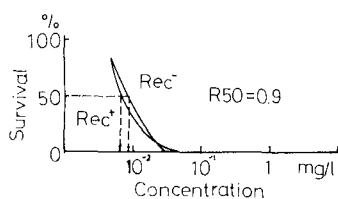


Fig. 6 KMのSpore液体Rec-assay