

金沢大学 大学院 学生員 和田直隆

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 高島正信

1. はじめに 我々はこれまで枯草菌を用いた変異原物質の検出系の開発・改良をテーマに研究を進めてきた。そこで今回は、トリハロメタン(THM)に代表される有機塩素化合物数種類を検定試料として選定し、その変異原性を検討した。有機塩素化合物は、上水・下排水処理の工程にある塩素処理の結果相当量生成することが報告されており、さらに農業や工場排水由来による地下水汚染の原因物質として問題となっている。

2. 実験方法 本法は、枯草菌の野生株H17(Rec⁺)と組み換え修復機構欠損株M45(Rec⁻)を用いるRec-assayを液体系で実施し、これにPreincubationの手法を導入したものである。

1). 液体(S-9)Rec-assay・Stationary法 L字管に検定試料0.6ml、100mMNa-リン酸緩衝液0.1ml(これは直接変異原性試験の場合であり、間接変異原性試験の場合には薬物代謝酵素系S-9mix 0.1mlを用いる。)、対数増殖期にある枯草菌若液(Tris-HCl緩衝液で濁度0.2に希釈)0.3mlを注入し、振とうせずにPreincubation(37℃, 1hr)する。その後、NB5.0mlを加え、振とう培養する。検定試料を含まないcontrolの濁度が100になった時点で、検定試料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、生存率を算出する。

2). 低沸点検定試料用の液体(S-9)Rec-assay・Stationary法 検定試料の沸点が低い場合、培養時に試料成分が揮散して、菌との接触が十分に行われないことが考えられる。そこで今回、Preincubation終了時までを小容量(2ml)のバイアルチューブを用いた密封系で実験する方法を考察した。バイアルチューブを用いる以外は前述1)と同様の操作を行う。

3. 変異原性の評価方法

1). プロビット理論を応用したプロビット間面積S-probitとRec-gram 検定物質に変異原性がある場合、Rec⁺とRec⁻の増殖阻害曲線には差が生じる。増殖阻害曲線図において、Rec⁺とRec⁻の曲線によって囲まれる面積は、変異原物質の暴露による致死感受性差を示すものであると考えられる。そこでプロビット値Yを利用して、この面積Sに対応するプロビット間面積S-probitを求める。ただし実際には、死亡率100%や0%などの不正確な情報を除外する意味で、死亡率15.9%から84.1%の範囲(正規分布における1σの範囲)で計算を行う(図-1参照)。さらに各検定試料相互の増殖阻害濃度レベルの相異を考

慮するためにS-probitをRec⁻の50%致死濃度で除し、これをRec-gramとして変異原性強度を一律に表現する。プロビット値Yが式(1)で表わされる場合、S-probitおよびRec-gramは次のようになる。

$$\left. \begin{aligned} \text{Rec}^+ \quad Y &= \alpha_1 + \beta_1 \log X \\ \text{Rec}^- \quad Y &= \alpha_2 + \beta_2 \log X \end{aligned} \right\} (1)$$

$$S\text{-probit} = \int_4^6 \left\{ \left(\frac{\alpha_2}{\beta_2} - \frac{\alpha_1}{\beta_1} \right) + \left(\frac{1}{\beta_1} - \frac{1}{\beta_2} \right) Y \right\} dY \quad (2)$$

$$\text{Rec-gram} = \frac{S\text{-probit}}{C50\text{Rec}^-} \quad (3)$$

ここで、X: 検定試料濃度、 $\alpha_1, \beta_1, \alpha_2, \beta_2$: Rec⁺およびRec⁻の正規分布の母数を示すパラメータ、6: 15.9%死亡率に対応するプロビット値、4: 84.1%死亡率に対応するプロビット値

2). 確率論を応用した修復可能生存率RSと単位修復可能生存率URS 同一検定試料濃度におけるRec⁺とRec⁻

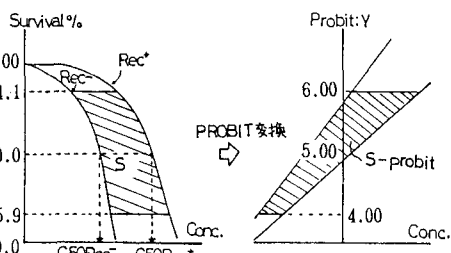


図-1 増殖阻害曲線間面積SとProbit間面積S-probitとの関係

の生存率差によって変異原性を評価するものである。まず Rec^+ 、 Rec^- の実験結果に標的論を適用し、それぞれに適合するヒットモデル式を最小二乗法によって求める。 Rec^- 平均致死ヒットを与える濃度での Rec^+ と Rec^- の生存率差を算出し、この値を修復可能生存率RSと定義する。なお標的論の各ヒットモデル式は次式で示される。ただし、 S :生存率、 λ :ヒット数($\lambda = kx$)

$$1 \text{ ヒットモデル } S = \exp(-\lambda)$$

ここで k :ヒット換算係数

$$n \text{ ヒットモデル } S = \exp(-\lambda) \sum_{i=0}^{\infty} \frac{\lambda^i}{i!}$$

x :検定試料濃度

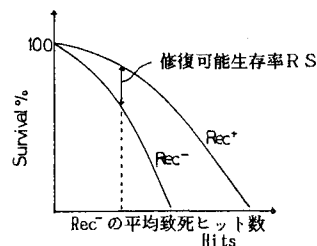


図-2 標的論による修復可能生存率RS

表-1 変異原性の判定基準域

	-S-9 Mix		+S-9 Mix	
	RS (%)	S-probit	RS (%)	S-probit
陽性 (+)	30.0以上	0.600 以上	30.0以上	0.600 以上
疑陽性 (+?)	18.1~29.9	0.301 ~0.599	9.6~29.9	0.101 ~0.599
陰性 (-)	0.0~18.0	0.0 ~0.300	0.0~9.5	0.0 ~0.100
逆転 (r)	0.0以下	0.0 以下	0.0以下	0.0 以下

3). 変異原性の判定基準域 変異原性を判定する

ために、陽性対照物質として、MMC、MNNG、B[a]P、AAF、DMNの5種を、陰性対照物質としてKM、DMSOの2種を採用し、これらの物質の変異原性試験による結果から表-1に示す変異原性の判定基準域を設定した。変異原性指標としてはRSとS-probitを用いたが、両指標によって判定が異なる場合には、危険側に判定することとする。

表-2 液体 (S-9) Rec-assay・Stationary法を適用した有機塩素化合物の実験結果

Compound	S-9 mix	S-probit	RS (%)	変異原性
chloroform	- +	-0.149 0.794	-7.2 25.3	r +
dichlorobromomethane	- +	0.030 0.356	15.6 22.0	- +?
bromoform	- +	-0.250 0.687	8.7 44.5	- +
carbon-tetrachloride	- +	0.535 -0.213	34.9 -11.4	+ r
1,1,2,2-tetrachloroethane	- +	-1.087 -0.888	-36.0 -21.9	r r
1,3-dichloropropane	- +	0.197 0.575	-0.9 14.5	- +?
trichloro-ethylene	- +	-0.060 0.180	-3.3 -0.9	r +?
tetrachloro-ethylene	- +	0.463 0.274	24.5 11.6	+? +?
1,3-dichloropropene	- +	-0.651 0.970	-30.9 39.6	r +
1,2-dichlorobenzene	- +	0.397 -0.130	-1.1 -36.5	+? r
1,2,4-trichlorobenzene	- +	-0.092 1.634	-22.3 52.1	r +

4. 実験結果および考察 本研究では、水環境中の有機塩素化合物に関する報告の中から検出頻度および検出量、化学構造、沸点等を考慮し、17種を選出した。実験結果を表-2に示す。なおchloroform、carbon tetrachloride、Trichloroethyleneについては、低沸点検定試料用の液体 (S-9) Rec-assay・Stationary法による実験結果を示した。表-2より直接変異原性陽性の物質が1種、間接変異原性陽性の物質が4種検出された。これらの物質についてRec-gramおよびURSを算出すると、代表的変異原物質であるAAFやDMNと同程度の値を示した。また今回変異原性が検出された物質のうちchloroform、carbon tetrachlorideについては、Ames test では変異原性が検出されていない。このように水環境中に存在する有機塩素化合物に変異原性が認められたことは非常に大きな問題である。

5. 水道水・浄水場処理プロセス水サンプル中の全有機ハロゲン化合物 (Tox) と検水サンプルの変異原性指標 (CSO Rec, S-probit, RS) の相関性

水道水・浄水場処理プロセス水サンプルの変異原性解析結果における各種変異原性指標 (四参照) と同サンプル中のToxの関係を調べたところ、前年度の都市下水、同活性汚泥処理水サンプルと同様に顕著な相関性は認められなかった (図-3参照)。この理由として、今回の有機塩素化合物の実験結果からもわかるように、すべての有機塩素化合物が変異原性を示すわけではなく、さらに変異原性を示す物質でもその強度に差があることが考えられる。またサンプル中に含まれる有機塩素化合物以外の変異原物質の影響も考えられる。

最後に、本研究を進めるにあたり、Tox測定並びに御指導頂いた国立公衆衛生院貞柄泰基先生、相沢貴子先生、さらに終始御指導頂いた金沢大学環境研究所吉川寛教授、小笠原直毅助手に感謝致します。お共に研究して下さい。有機ハロゲン化合物に感謝します。

<参考文献> 松井、小出、高島、橋本; 第38回年次学術講演会講演要集第2部 (II-421, 422), 土木学会

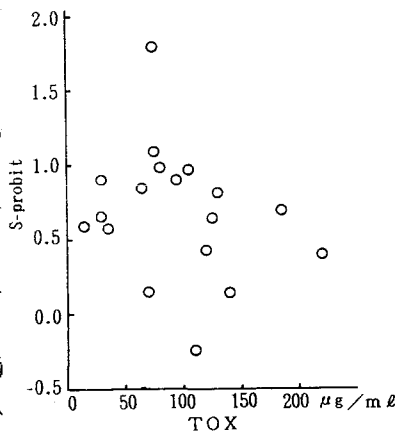


図-3 TOXとS-probitの関係