

II-438 Rec-assay 液体法における水環境中の DNA 損傷性物質の複合効果

京都大学工学部 松井三郎 金沢大学工学部 山本良子
日水コン ○ 高波正志

1. はじめに

筆者らは, Rec-assay 液体法を用いて水環境中の DNA 損傷性物質の存在を総合的にとらえることを提案し, その検出系の開発を行ってきた。実際の水環境は DNA 損傷性のある物質とない物質が種々の割合で混在した状態にあるため, 環境水の DNA 損傷性を評価する場合にはこれらの物質の複合効果について検討することが重要である。本研究では, DNA 損傷性ありと判定されたの Formaldehyde (FA) と DNA 損傷性なしと判定された Propionaldehyde (PA) を組み合わせた場合の効果について検討を行うとともに, 両者の存在割合が DNA 損傷性を評価する際に与える影響について考察を行った。

2. 実験方法

Rec-assay 液体法では, 枯草菌野生株 (Rec⁺) と組み換え修復機能欠損株 (Rec⁻) の致死感受性差を利用して, DNA 損傷性の評価を行う。本研究では, F₀, F₁, F₂, F₃, P₀ の 5 種類の実験を行った。実験 F₀, P₀ は FA および PA 単独投与の実験である。実験 F₁ ~ F₃ は PA をそれぞれ 300, 900, 1800 mg/l 添加して, FA の濃度を变化させて行った実験である。実験 F₁ ~ F₃ では薬物を加えない control の他に, PA のみを投与した擬似 control に対する生存率の計算も行った。

3. 実験結果

図-1 は, 実験 F₁ における対数増殖期の L 字管濁度の経時変化を示したものである。本法では濁度は生菌数に比例しているので, control の濁度が 100 に達した時の他の L 字管の濁度により生存率を求める。図より, 各実験において PA を投与した菌および FA と PA の両者を投与した菌の増殖速度は control の増殖速度に等しいことがわかる。F₂, F₃ でも同様であった。これは, FA と PA は両者とも Preincubation 時に菌に対して作用し本培養の Lag time を延長させるが, 増殖速度には影響しないことを示している。図-2 は実験 P₀, F₀ の増殖阻害曲線を, 図-3 は実験 F₁, F₂ における擬似 control に対する増殖阻害曲線を示している。実験 F₃ では PA が高濃度であったため増殖阻害曲線を描くことができなかった。F₀ ~ F₂ の曲線の一致性を分散分析によって調べた結果, F₀ の曲線に対し F₁ の曲線も F₂ の曲線も危険率 5% で優位な差は認められなかった。この結果より, FA の効果は PA の効果とは独立に作用していると推

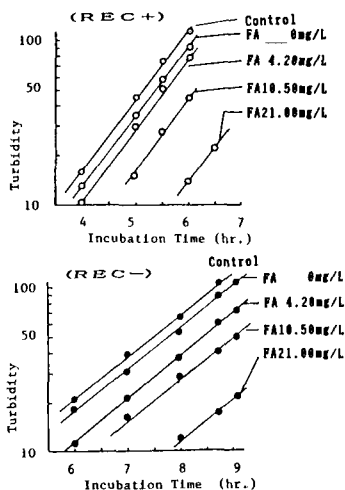
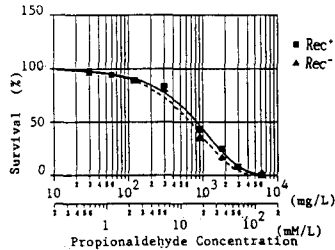
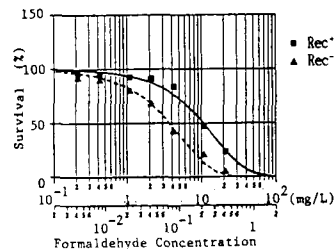


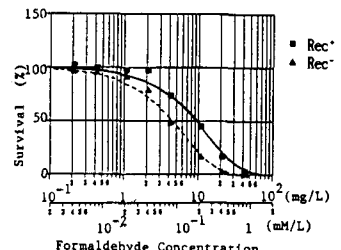
図-1 L字管濁度の経時変化
-実験 F₁ (PA 300 mg/L 添加)-



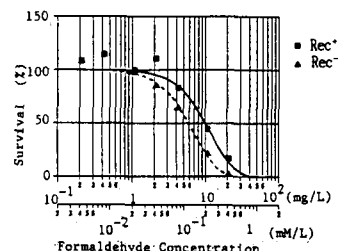
(a) 実験 P₀ (PA 単独)



(b) 実験 F₀ (FA 単独)



(a) 実験 F₁ (PA 300 mg/L 添加)



(b) 実験 F₂ (PA 900 mg/L 添加)

図-2 増殖阻害曲線

図-3

疑似control (PAのみ添加) に対する生存率から求めた増殖阻害曲線

察される。図-4に実験 $F_0 \sim F_3$ におけるcontrol に対する増殖阻害曲線の変化を示す。PAの濃度が増加するに従ってFAによる増殖阻害曲線は頭落ちしていることがわかる。筆者は、水銀とMMC 及び Cr^{6+} との組合せでも類似の現象を報告している。これを標的論を用いて解析する。実験 F_0 , P_0 の増殖阻害曲線は標的論により次式で表すことができる。

$$FA; Rec^+: S = \{ \exp(-k_1 x_f) \} \cdot (1 + k_1 x_f) \quad (1) \quad Rec^-: S = \exp(-k_2 x_f) \quad (2)$$

$$PA; Rec^+: S = \exp(k_3 x_p) \quad (3) \quad Rec^-: S = \exp(-k_4 x_p) \quad (4)$$

x_f : FA Conc. x_p : PA Conc. k_1, k_2, k_3, k_4 : constants

FAとPAの作用が独立して起こっていると仮定すると、両者が作用した時の生存率は次式のように表される。

$$Rec^+: S = \{ \exp(-k_1 x_f) \} \cdot (1 + k_1 x_f) \cdot \exp(-k_3 x_p) \quad (5)$$

$$Rec^-: S = \exp(-k_2 x_f) \cdot \exp(-k_4 x_p) \quad (6)$$

(1)~(6)式を用いた理論曲線を図-4に描いてある。理論曲線は実験値と良く一致している。以上より、FAとPAの致死作用は菌に対して独立して起こっており、両者の相互作用はないものと考えられる。

4. 考察

実際の環境水の場合は最高濃縮率のサンプルを順次希釈するため、各濃縮率に対して一定の割合で種々の物質が混合されている。FAとPAの混合比をaとすると、その増殖阻害曲線は次式のように表される。

$$Rec^+: S = \{ \exp(-k_1 a x_f) \} \cdot (1 + k_1 a x_f) \quad Rec^-: S = \exp(-k_3 a x_f)$$

図-5はこのようにして描かれた増殖阻害曲線の例を示している。PAの割合が大きい程 Rec^+ Rec^- の増殖阻害曲線の差が縮まることがわかる。この増殖阻害曲線の差を表すRS値に与える混合比の影響を図-6に示す。RS値は12以上でDNA損傷性ありと判定されるので、混合比1000程度でFAが含まれているにもかかわらずDNA損傷性なしと判定されてしまう。実際の環境水を考えた場合、PAがFAに対し1000倍の濃度で共存することはまれであるが、他の毒性の強い物質が共存しそれが独立に作用する場合DNA損傷性が隠れてしまう可能性もあるので注意する必要がある。

5. まとめ

DNA損傷性のある物質とない物質を組み合わせた場合の複合効果に対する本検出系の特性が明らかになった。環境水の場合、DNA損傷性ありと判定された場合はDNA損傷性物質が存在すると判断できるが、DNA損傷性なしと判定されてもDNA損傷性物質が全く含まれないと断定せず、50%致死通水量などを考慮して評価することが重要であろう。いくつかの濃縮方法を併用することも一法と思われる。また、このように二物質の効果を分離することができることは、本検出系の特徴とも言えるので、今後DNA損傷性物質同志の組合せや3~4物質の組合せについても検討する必要がある。

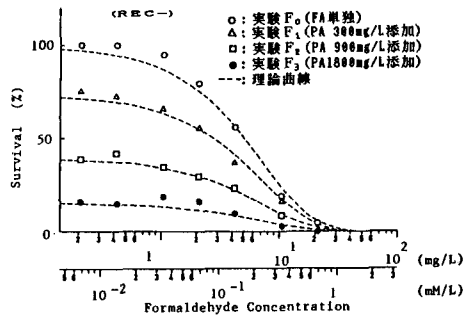
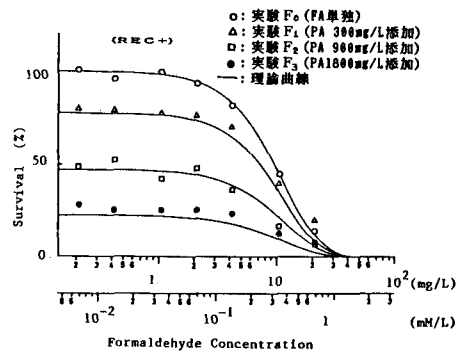


図-4 Controlに対する生存率から求めた増殖阻害曲線の変化

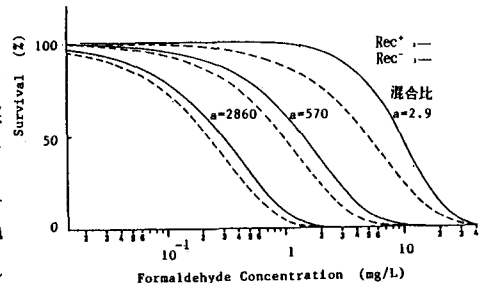


図-5 FormaldehydeとPropionaldehydeを一定比率で混合した場合の増殖阻害曲線

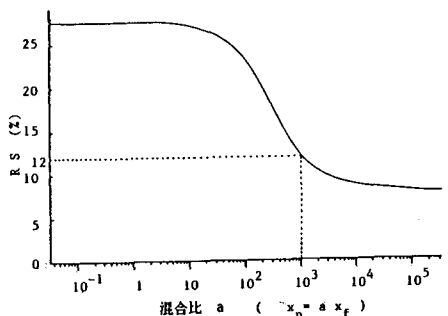


図-6 修復可能生存率RSに与える混合比率aの影響