

京都大学大学院 学生員 滝上英孝

京都大学大学院 学生員 仙波範明

京都大学工学部 正会員 松井三郎

1. はじめに

環境水のような、多種多様な化学物質が溶解していると考えられる試料の毒性試験の結果については、これまでに総合的な毒性評価がなされてきた。ところが、溶解物質の同定を始めとし、どのような物質が試験結果に影響を及ぼしているかは定かでないのが現状である。本研究では、環境水の毒性効果解明の第一歩として、代表的な微量汚染物質である有機塩素化合物を取り上げ、それらの複合系試料を枯草菌Rec-assay液体法に供し、試料のDNA損傷性をその複合効果に着目して検討する試みを行った。

2. 実験方法

選択した有機塩素化合物は、Chloroform、Trichloroethylene (TCE)、Tetrachloroethylene (PCE) でこれら3物質は単独で試験を行った結果、DNA損傷性物質であると判明している。これらを用いて複合系試料を調製しRec-assayの試料とした。組み合わせは以下の7通りである。なお、以下の「混合比」とはモル濃度比を表す。

Chloroform+Trichloroethylene, 混合比 1:2, 1:1, 2:1

Chloroform+Tetrachloroethylene, 混合比 1:2, 1:1, 2:1

Chloroform+Trichloroethylene+Tetrachloroethylene, 混合比 1:1:1

Rec-assayでは代謝活性酵素系(S-9mix)を添加せず今回は直接試験のみを行い、試験結果の解析にはProbit理論を用いた。

3. 試験結果及び考察

図1はChloroformとPCEを混合比2:1に、図2は1:1に調製した試料の試験結果(枯草菌の増殖阻害曲線)である。横軸は、2物質のモル濃度で表している。図1と図2を比較すると、Rec+菌(枯草菌の野生株)については、PCEの割合を増すことによって曲線は濃度の低い方へ移動するものの、Rec-菌(組換え修復機構欠損株)については移動は顕著ではない。DNA損傷性という観点からみれば、図1で両菌株間の開きが大きく、強いDNA損傷性を示していたものが、図2ではPCEの添加によってRec+への細胞毒性が強まり、DNA損傷性が「マスキング」された状態で評価されていると解釈できる。DNA損傷性物質であるPCEの割合を増したにも関わらず、その毒性はRec+にのみ選択的に細胞毒性として現れているためと考えられる。

ChloroformとTCEの組み合わせにおいても、混合比の変化に伴いRec+とRec-は連動せず、お互い独立に移動した。その結果、DNA損傷性評価指標であるS-Probit値などに規則性はみられなかった。

これまで、DNA損傷性以外の毒性についてはRec+、Rec-ともに同じ影響を受け、DNA損傷性によってのみ生存率に差が生じると考えられてきたが、今回の実験結果は従来の考え方に検討の余地を与えたことになる。環境水など複合系試料のDNA損傷性評価にあたっては、Rec+、

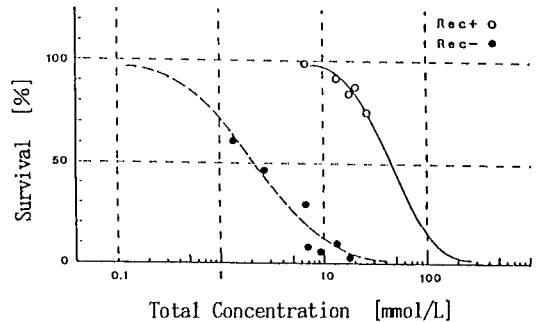


図1 CF+PCE, 混合比2:1の増殖阻害曲線

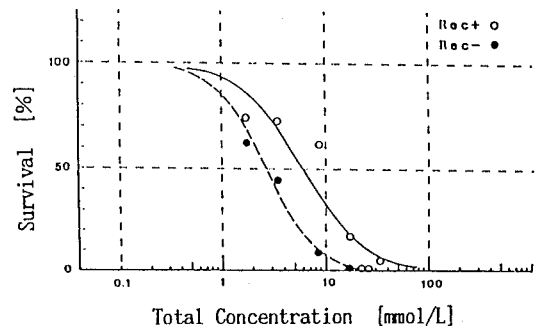


図2 CF+PCE, 混合比1:1の増殖阻害曲線

Rec-の増殖阻害曲線の開きのみならず、Rec+の曲線の位置など細胞毒性に対する考慮も必要である。

次に、Rec+とRec-の致死特性がそれぞれどのように表されるかを考察するために、以下のような解析を行った。

①まず、複合系試料の試験結果が相加効果であるかどうかを確かめてみた。相加効果とは、複数の物質が枯草菌にそれぞれ独立に致死作用を及ぼす場合で、複合効果のうち最も基本的なものである。解析は、単一物質に対する枯草菌の増殖阻害曲線を掛け合わせるにより、複合系試料の理論増殖阻害曲線を求め、実験値との比較を行った。しかし、理論曲線に適合する場合はみられなかった。

②これまでは試料濃度をモル濃度和、つまり分子数の和で表していたが、物質の毒性は各々異なるため、単に分子数の和で表現せずに、物質の毒性効果の違いを加味して表現することを考えた。毒性効果の指標として LC_{50} (半数致死濃度)を選び、複合系試料換算濃度を定義した。すなわち、試料中の物質をA、BとするとRec+に対しては次式のようにかける。

$$C(TOTAL) = C(A) + \frac{LC_{50}Rec+(A)}{LC_{50}Rec+(B)} C(B) \quad (1)$$

$C(TOTAL)$: 複合系試料換算濃度 (mol/L)

$C(A)$: 換算基準となる物質Aの濃度 (mol/L)

$C(B)$: 物質Bの濃度 (mol/L)

$LC_{50}Rec+(A)$: 物質Aに対するRec+の LC_{50} 値 (mol/L)

$LC_{50}Rec+(B)$: 物質Bに対するRec+の LC_{50} 値 (mol/L)

(1)式をみるとわかるように、B濃度をA濃度に換算する際には換算係数として、 $LC_{50}Rec+$ で示される致死効果比を用いた。(1)式はAとBの致死効果が $LC_{50}Rec+$ について一致するように、換算した式といえる。また、A、B単一の場合の濃度換算後の $LC_{50}Rec+$ の値を基準値とする。このような濃度変換を用いて、複合系試料の実験結果を解析した。

図3に、Rec+について(1)式を用いて複合系試料濃度をChloroform濃度に換算し、増殖阻害曲線を描いたときの LC_{50} 値を示す。図中の縦軸の133.2[mM]という値はChloroformの LC_{50} 値(基準値)である。ChloroformとTCEの組み合わせでは各混合比とも基準値に近い値を示している。このことは2物質が LC_{50} の値の比で独立に菌に作用していることを意味する。他の複合系試料については、概して LC_{50} の値が基準値を上回っており、 LC_{50} の比ではたらく相加効果よりも致死効果が弱いものと考えられる。同様に、Rec-についても図4に解析結果を示す。この場合、3物質混合試料を除いて LC_{50} の値は基準値の値を下回っており、 LC_{50} の比ではたらく相加効果よりも致死効果が強いものと考えられる。

このように、Rec+、Rec-の致死特性は LC_{50} を用いて濃度換算を行ったことでかなり明確に表すことができた。

4. まとめ

複合系試料の試験では、混合比の変化につれての毒性の推移が把握でき、DNA損傷性の「マスキング」など環境水の解析に有用な情報が得られた。今回は LC_{50} を用いて複合効果の説明を試みたが、今後さらに物質数を増やして実験を行うとともに、それら物質の物性値を説明変数として考えたり、物質と細胞やDNAとの反応機構を考慮することも必要であろう。なお、物性値として水-オクタノール分配係数を挙げ、複合効果の解析を試みたが、これは講演時に報告する。

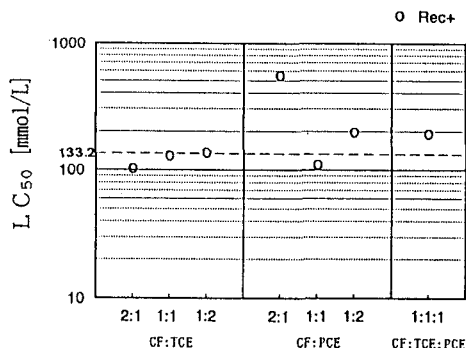


図3 LC_{50} を考慮した解析(Rec+)

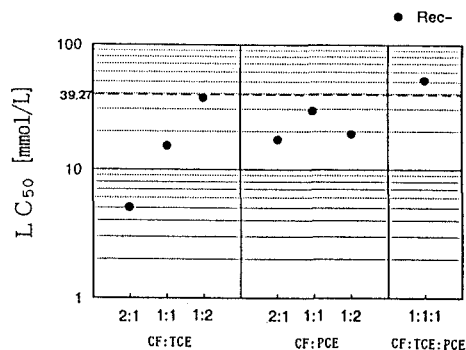


図4 LC_{50} を考慮した解析(Rec-)