

除草剤 CNP の嫌気性微生物分解における変異原性の変動

岐阜大学工学部土木工学科 正会員 松下 拓
岐阜大学工学部土木工学科 佐久間智
岐阜大学工学部土木工学科 正会員 松井佳彦

1. はじめに

農薬などに代表される開放系化学物質の微生物分解については多くの研究がなされており、いくつかの物質については分解代謝物が同定されたり、代謝経路が推定されたりしている。しかし、全ての代謝物が同定されているわけでもなく、全ての代謝物の毒性が調べられているというわけでもない。すなわち、化学物質が環境中に放出され微生物分解を受けたときに、どのように毒性が変化するのは殆どわかっていないと言える。そこで本研究では対象物質として除草剤 CNP を選び、これを嫌氣的に微生物分解させて培地全体の変異原性を調べることで、代謝物を含んだ包括的な評価を行うことを目的とする。

2. 実験方法

2.1 変異原性試験

変異原性試験は Ames らの方法⁽¹⁾に従い、プレインキュベーション法により、S9mix の存在下・非存在下の両方で行った。試験菌株は、通常用いられる *Salmonella typhimurium* の TA98, TA100 株以外に、Watanabe らが樹立したニトロ還元酵素⁽²⁾やアセチル転移酵素⁽³⁾の活性を著しく高めた試験菌株である YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 株を用いた。なお、YG1021 株と YG1026 株はニトロアレン類に、YG1024 株と YG1029 株は芳香族アミンに高感受性を示す。

2.2 CNP の嫌気性微生物分解

CNP 嫌気性分解菌は、岐阜大学西側の水田の表層から 15cm 下の土壌中の微生物を後述の培地により嫌気的条件下で培養することにより得た。10L ガラス容器に培地 (K_2HPO_4 : 350, KH_2PO_4 : 270, NH_4Cl : 530, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 100, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 75, $Na_2S \cdot 9H_2O$: 500, $NaHCO_3$: 1200, Yeast Extract: 30, CNP: 0.25 [mg/L]) を入れ、CNP 嫌気性分解菌懸濁液 10mL を添加した。培養に先立ち窒素ガスを培地中に 10 分間通気することにより嫌気状態とし、容器の口を密封し、20℃ で静置培養した。0, 3, 7, 14 日目に採水し、CNP と CNP-amino の濃度を n-ヘキサン 10mL で抽出し、HPLC (波長 205nm, 254nm) にて測定した。また、変異原性試験用として、試料 20L を n-ヘキサン 2L で抽出し、無水流酸ナトリウムにて脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて室温にて減圧濃縮した。得られた残渣を 6mL の DMSO に再溶解させ、変異原性試験に供した。

3. 結果と考察

3.1 CNP と CNP-amino の変異原性

原体の Ames 試験結果を図 2 に示す。CNP-amino とは CNP の嫌気条件下における代表的な代謝物のひとつである。試料投与時の復帰コロニー数が、自然復帰コロニー数の 2 倍を超える場合を変異原性陽性と判断す

キーワード: 変異原性, Ames 試験, 嫌気性分解, CNP, 代謝物

連絡先: 〒501-1193 岐阜市柳戸 1-1 岐阜大学工学部土木工学科, tel.058-293-2444, fax 058-230-1891

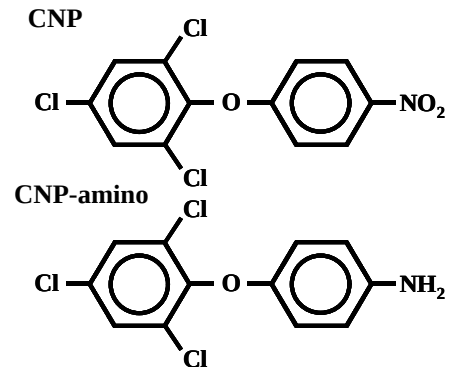


図 1. CNP と CNP-amino の構造

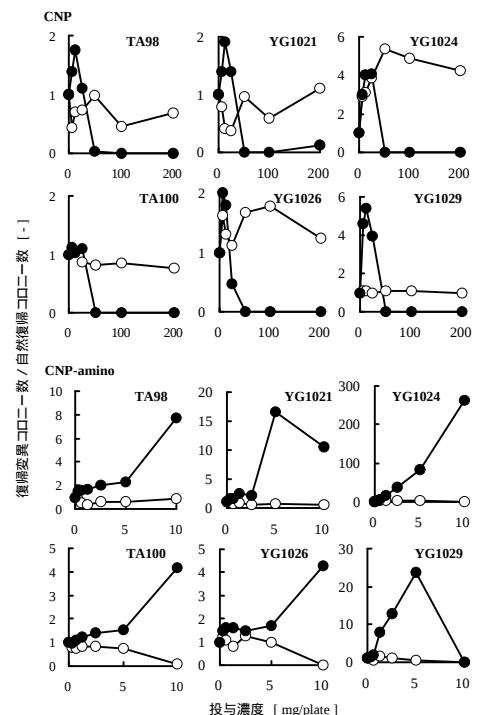


図 2. CNP, CNP-amino の Ames 試験結果
(○ : -S9mix, ● : +S9mix)

ると、CNP は TA98 , TA100 , YG1021 , YG1026 株では S9mix の有無に関わらず変異原性は認められなかったが、YG1024 株では± S9mix で、YG1029 株では+S9mix で変異原性が認められた。CNP がニトロ基を有するにも関わらず、ニトロアレーン高感受株に対し変異原性陰性で芳香族アミン高感受株に対し陽性となったのは、CNP が *S.typhimurium* 内にて高められたニトロ還元酵素とは別種のニトロ還元酵素で還元され、その後に高められたアセチル転移酵素にて代謝されるためであり、このアセチル転移が変異原性発現の律速となっているのではと推測している。一方、CNP-amino は、全ての菌株の+S9mix 条件下で変異原性が認められ、特に芳香族アミン類に感受性の高い YG1024 株で変異原性が著しく認められた。

3.2 嫌気性分解に伴うCNPの分解とCNP-aminoの生成

嫌気性分解に伴う CNP および CNP-amino 濃度の経時変化を図 3 に示す。添加した 237 µg/L の CNP は 14 日間の培養でほぼ 100% 分解され、これに伴い CNP-amino が 34 µg/L 生成された。生成された CNP-amino は、添加 CNP の 16% (モル基準) と計算され、残りの 84% は他の生成物へと代謝されたと考えられた。

3.3 嫌気性分解に伴う変異原性の変動

微生物分解試料の Ames 試験結果を経時的に図 4 に示す。ここでは例として YG1024+S9mix に対する結果を示した。グラフの横軸は 1 プレートあたりの試料の投与量(濃縮前の量に換算)を表している。どの時間においても、変異原性強度(復帰コロニー数/自然復帰コロニー数)が用量依存性を示した。投与量 0~167mL において、同様の変異原強度の用量依存性が他の菌株に対しても見られたため、投与量 167mL における変異原性強度をもって、その試料の変異原性を表すものとした。嫌気性分解に伴う変異原性の変化を図 5 に示す。グラフの縦軸は、上で定義した変異原性を表している。CNP の分解に伴い、+S9mix 条件下にて芳香族アミン類に感受性の高い 2 つの菌株である YG1024 株と YG1029 株に対して変異原性の著しい増加が、TA98 株で緩やかな増加が観察された。ここで、含まれる物質が変異原性に線形に寄与していると考え、これらの増加は主に CNP-amino であると推定された。また、CNP-amino 以外の変異原性を有する代謝物の存在の可能性も伺えた。なお、TA98 株のニトロアレーン類感受性を高めた YG1021 株で変異原性の増加が見られなかった原因は現段階では不明である。

4. おわりに

本研究では、CNP を嫌気的に微生物分解させ、経時的に培地の変異原性を調べることにより、代謝物を含んだ包括的な毒性の変動を評価した。その結果、CNP の分解に伴い、特に S9mix 存在下において TA98 , YG1024 , YG1029 株の変異原性が増加することがわかった。変異原性には CNP-amino が大きく寄与すると考えられ、さらには CNP-amino 以外の変異原性を有する代謝物の存在の可能性も考えられた。

謝辞

本研究を行うに当たり適切な助言を頂いた摂南大学薬学部 中室克彦先生に深謝する。また、*S.typhimurium* を分与頂いた摂南大学薬学部 奥野智史先生に深謝する。

参考文献

- (1) Ames, B.N. *et al.*, *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983 (2) Watanabe, M. *et al.*, *Mutation Res.*, **216**, 211-220, 1989 (3) Watanabe, M. *et al.*, *Mutation Res.*, **234**, 337-348, 1990

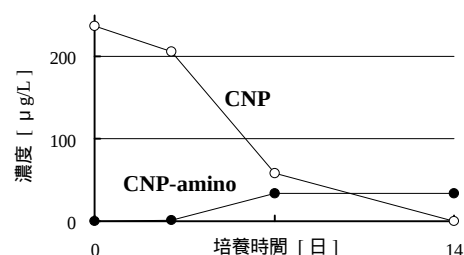


図 3. 培養に伴う CNP ,CNP-amino濃度の変化

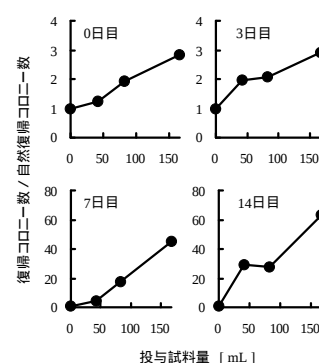


図 4 .各培養時間におけるYG1024株+S9mix に対するAmes試験結果

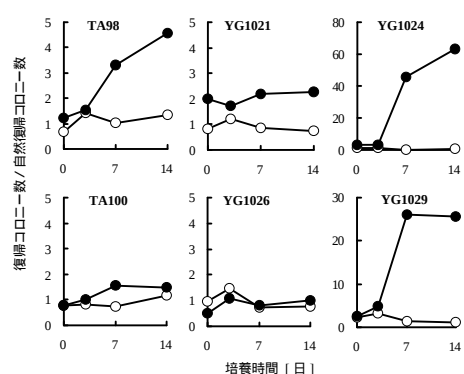


図 5 .嫌気性分解に伴う変異原性の変動 (○ :-S9mix , ● :+S9mix)