

殺虫剤 MEP の嫌気性微生物分解過程で増加する変異原性への代謝物の寄与

岐阜大学工学部土木工学科

正会員

松下 拓

正会員

松井佳彦

池場和範

正会員

井上隆信

1. はじめに

農薬などの化学物質が環境中に放出されるとさまざまな分解を受け、中でも微生物分解の寄与は大きいと考えられている。環境中での微生物分解により生成される代謝物が推定されている農薬は多数存在し、また、主な代謝物の毒性が既に調べられているものもある。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わけでもない。従って、これらの既知の代謝物とその毒性の情報を合わせただけでは、ある農薬が環境中に放出された際の毒性の変動を議論することはできない。そこで本研究では農薬を液体培地中で微生物分解させ、分解過程で経時的に採取した培地全体の毒性をバイオアッセイにより評価し、親農薬・代謝物を含む包括的な毒性を評価することを目的とする。また、主な代謝物の毒性への寄与も併せて議論する。なお、本研究では対象として殺虫剤 MEP の嫌気性微生物分解を取り上げ、毒性として変異原性を Ames 試験により評価する。

2. 実験方法

2.1 Ames 試験と使用菌株

変異原性は Ames らの方法に従い、プレインキュベーション法により評価した。Ames 試験に用いる *Salmonella* 菌株は、既に筆者らにより MEP の嫌気性微生物分解過程で変異原性の増加が確認された⁽¹⁾ *S. typhimurium* YG1029 株と YG1042 株とし、S9mix 存在下で試験を行った。なお、YG1029 株はアミノアレン類に、YG1042 株はニトロアレン類とアミノアレン類に高感受性を示す。

2.2 MEP の嫌気性微生物分解

MEP の嫌気性微生物分解菌は、岐阜大学西側のネギ畑の表層から 15cm 下の土壤中の微生物群を液体培地中で嫌氣的に前培養することにより獲得した。これらの菌群を MEP を含む新たな液体培地に継代培養することにより、MEP の嫌気性微生物分解実験を行った。系の嫌気状態は培養容器に窒素ガスを通気することにより保持した。また、分解実験は 20 暗所にて行った。経時的に試料 1L を 100mL のジクロロメタンにて抽出し、ジクロロメタン相を無水硫酸ナトリウムで脱水後に、ロータリーエバポレータにて揮発させた。得られた残渣を DMSO に再溶解し、MEP とその代謝物の定量と、Ames 試験に供した。

3. 実験結果

3.1 MEP の分解と代謝物の生成

図 1 に嫌気性微生物分解に伴う MEP と、その分解生成物として確認された MEP-amino の濃度変化を示す。4.6mg/L の MEP は 20 日間の培養でほぼ完全に分解され、培養 2 日目から代謝物として MEP-amino が生成された。MEP-amino は 3 日目に 0.6mg/L となり、その後減少した。生成された MEP-amino は、添加 MEP の 16%（モル基準）と計算された。

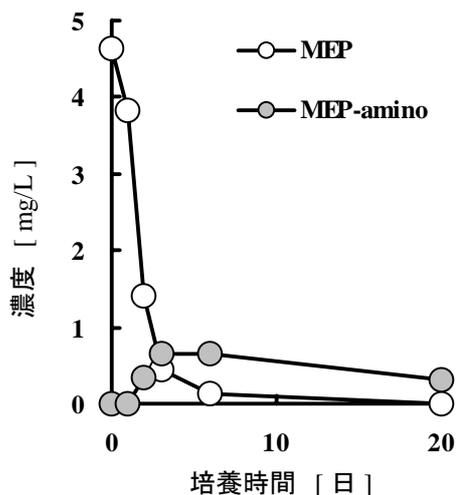


図1. 培養に伴うMEP, MEP-amino濃度変化

キーワード： 変異原性, Ames 試験, 嫌気性微生物分解, MEP, 代謝物

連絡先： 〒501-1193 岐阜市柳戸 1-1, tel: 058-293-2444, fax: 058-239-0163, e-mail: taku_m@cc.gifu-u.ac.jp

3.2 分解に伴う変異原性の変動

図2に分解に伴う変異原性の変動を示す。本研究では、試料の誘発する変異原性を MI_{100} で評価した。 MI_{100} とは、分解前に $100\mu\text{g}$ の MEP を含む試料量（本研究では 20mL に相当）あたりの変異原性強度（ his^+ 変異数 / 自然復帰変異数）であり、各試料の Ames 試験結果を最小二乗法にて直線近似して求めた値である。

YG1029 株では、培養前には変異原性は誘発されなかったが、培養 2 日目から変異原性が増加した。培養 6 日目に最大となり、その後減少した。YG1042 株では MEP に由来する変異原性のため、分解前から高い変異原性が誘発されたが、培養とともに減少し、2 日目に最小となった。その後、変異原性は増加し 6 日目に最大となった後、再び減少した。

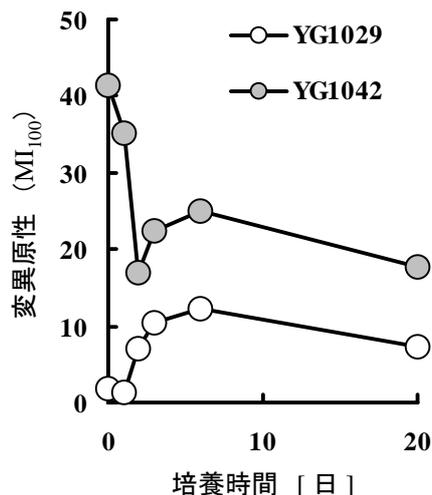


図2. 培養に伴う変異原性の変動

3.3 MEP と MEP-amino の変異原性への寄与

予め調べた MEP と MEP-amino の Ames 試験結果を用いて、各試料が含む MEP と MEP-amino が誘発する変異原性を計算し、増加した変異原性への MEP と MEP-amino の寄与を推定した。

一例として図3に YG1029 株での推定結果を示す。各培養時間に 2 つの MI_{100} が示されている。左が、上で述べた方法により計算した MEP と MEP-amino 由来の変異原性を積み重ねたものであり、右が実際の試料が誘発した変異原性である。

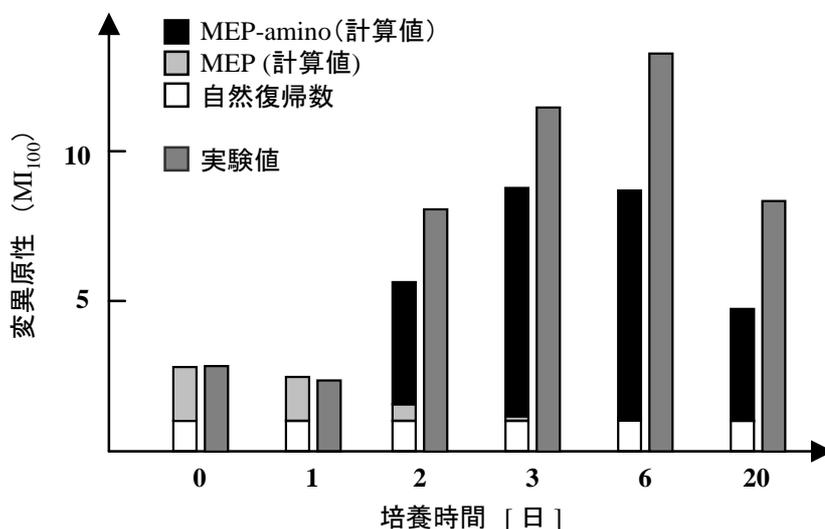


図3. 変異原性へのMEPとMEP-aminoの寄与(YG1029株)

図より、増加した変異原性には MEP-amino が大きく寄与している

ことが分かる。MEP-amino の寄与は培養 3 日目に最大となり、実際の試料が誘発した変異原性の 73% を占めた。同様に YG1042 株に対しても MEP-amino の寄与は大きく、培養 3 日目に最大 61% を占めた。

また、培養 1 日目までは計算値と実測値がほぼ等しい値となったが、2 日目以降に実験値が計算値を上回った。このことは、MEP と MEP-amino 濃度からは説明できない変異原性を有する物質が試料中に存在することを表している。すなわち、MEP-amino 以外に強い変異原性を有する未知代謝物が存在していると判断できる。このような未知代謝物の変異原性に対する寄与は、培養 20 日目で最大となり、49% を占めると計算された。YG1042 株に対しても同様の未知代謝物の寄与があり、培養 20 日目で最大 61% と計算された。

4. おわりに

本研究では、MEP を嫌気的に微生物分解させ、経時的に系全体の変異原性を調べ、以下の知見を得た。

1. 嫌気性微生物分解過程で MEP は分解されたにも関わらず、分解後試料は変異原性を誘発した。
2. 増加した変異原性には、MEP-amino が大きく寄与した。
3. それ以外にも、未知代謝物が変異原性に寄与していた。

参考文献

(1) Matsushita *et al.*, Change in mutagenicity during biodegradation of fenitrothion, *Chemosphere*, **47**, 9-14, 2002.