

染色体異常試験による除草剤 CNP の生物分解の安全性評価

名古屋大学大学院工学研究科 正会員 松下 拓
京都大学工学部 正会員 伊藤 禎彦

1. はじめに

1993 年に水道水質基準が改正され、その基準の中に多くの農薬が追加された。その中の一つである CNP（クロロニトルフェン）は、北陸や、京阪神の水がめである琵琶湖を擁する滋賀県において広く使用されている除草剤である。CNP は現行の上水処理工程では除去が困難であり、浄水場流入水に CNP が含まれていると、ほぼそのままの濃度でわれわれの飲料水として供給されるおそれがある。そこで、筆者は CNP を処理できる新たな工程として生物処理を考え、実験を行ってきた。その結果、CNP を好氣的に分解可能な菌群を琵琶湖水中から分離することに成功した。本研究はこれらの CNP 分解菌群を用いて行った。

CNP と胆のうガンとの因果関係を疫学的に示した報告が出されたが、CNP の変異原性やガン原性を動物細胞や細菌を用いて直接的に調べた報告はほとんどない。また、農薬などの毒性物質の処理を考える場合、処理時に生ずる副生成物の安全性に対しても注意を払う必要がある。しかし CNP の分解副生成物の毒性評価に関しては、嫌気性分解で生ずるとされている CNP アミノ体に関する報告以外はなされておらず、好気性生成物に関してはほとんど知られていない。本研究では、CNP 分解副生成物を含めての好気性生物分解処理全体を考え、変異原性試験を行うことにより安全性を評価することを目的としている。

毒性物質の変異原性試験に関しては Ames 法等による先駆的な研究が多くなされているが、本研究では変異原性試験として、哺乳動物の培養細胞を用いた染色体異常試験を行った。細胞はチャイニーズ・ハムスター肺細胞（CHL）を使用した。

2. 実験方法

2. 1 CNP の好気性生物分解

砂利を層厚が 80cm になるように充填した内径 5 cm のアクリル製カラムに、CNP を添加した琵琶湖表流水を 40 日間連続的に通水することにより CNP 分解菌群を捕集した。本研究はこれらの菌群を用いて行った。

KH_2PO_4 1g/L, NH_4NO_3 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, グルコース 1g/L, HEPES 50mM, CNP 10mg/L を添加した蒸留水中に上記の分解菌群を加え、25℃でバッチ式恒温振盪培養を行い、一定時間毎に 100mL ずつサンプリングを行った。抽出は 10mL のジエチルエーテルにより 3 回行い、得られたジエチルエーテル抽出液を蒸留水で洗浄後、ロータリーエバポレータにより揮発させた。残渣をエタノールに再溶解させ、染色体異常試験の供与試料とした。

2. 2 染色体異常試験

①染色体数が少なく大きいため染色体異常が観察しやすい。②増殖が迅速である。③感受性が高く染色体異常が起こりやすい。といった理由から、本研究における染色体異常試験は、新生チャイニーズ・ハムスター雌の肺細胞（細胞名 CHL/IU, 大日本製薬）を用いて行った。Eagle MEM (Minimum Essential Medium) 9.4g/L, ウシ胎児血清(GIBCO) 10%, グルタミン 0.3g/L, NaHCO_3 2.2g/L を蒸留水に添加した培養液中で CHL 細胞を培養した。培養は底面積 40cm² の培養ビンを用い、培養液量 19mL, 37℃の閉鎖系で行った。

上記条件で行った継代培養 1 日目の CHL 細胞に試料 0.19mL を添加した。したがって、試料中の物質は培養液中で 100 倍に希釈されている。また、エタノールは培養液中濃度が 1 % までは染色体異常試験に影響を及ぼさないことが知られている。試料添加後 37℃で 24 時間培養した後、染色体標本を作成した。

染色体標本は光学顕微鏡を用い1000倍で検鏡した。原則として染色体は任意の100細胞を観察した。CHL細胞は25本の染色体を持つため、1試料に対し2500本の染色体を解析対象としたことになる。試料の染色体異常誘発性の強度を、100細胞中の染色体異常検出数により表した。

3. 実験結果

3. 1 CNP 原体の染色体異常誘発性

CNP 原体をエタノールに溶解させたものを細胞に投与した時の染色体異常誘発性を示したものが右図である。横軸は培養ビン中での CNP の濃度を示しており、縦軸は任意100細胞中の染色体異常検出数を表している。CNP 濃度が0 mg/L の場合の染色体異常検出数は、エタノールのみを投与したコントロールテストを6回行い、その平均値により表した。CNP 添加量が20mg/L を越える試料では細胞分裂頻度が極端に落ち、染色体異常試験に使用できる染色体標本を得ることができなかった。

CNP の添加濃度が高くなるに伴い、染色体異常誘発頻度も高くなり、0～20mg/L の範囲での CNP 投与では両者の間に直線関係が見られた。

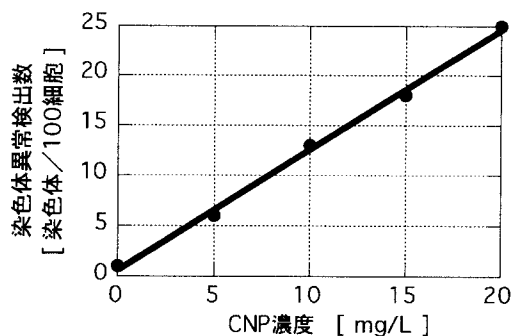


図1 CNP原体の染色体異常誘発頻度

3. 2 CNP 分解に伴う染色体異常誘発性の変化

CNP 分解菌群による CNP の分解の様子を右図に示す。添加した 10mg/L の CNP は培養 24 時間で 82% 分解、培養 72 時間で 94% 分解された。現在、培養各時間毎の染色体異常誘発頻度を調査中である。

4. おわりに

今後、CNP 分解時の代謝物を調べ、染色体異常誘発頻度との関係を考察していく。これらにより、CNP の生物分解の安全性評価を試みる予定である。

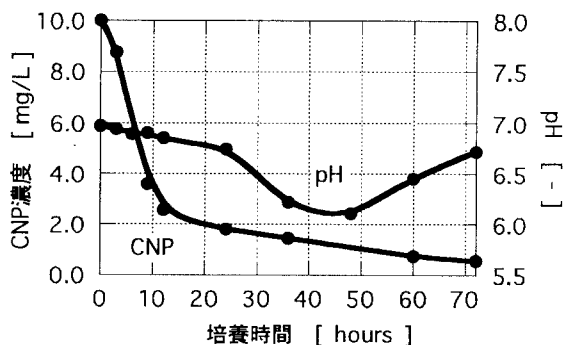


図2 CNP生物分解状況

謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、実験設備を使用させて頂いた、京都大学工学部 住友恒教授に深謝する。また、本研究の実験にご協力頂いた京都大学工学部 岡部泰隆君・中道宏隆君・植田洋行君に深謝する。

参考文献

- 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：化学物質による染色体異常アトラス，朝倉書店，1988
 伊藤禎彦・村上仁士：塩素処理水の染色体異常誘発性に対する加水分解の影響，環境工学研究論文集，vol.30，pp219-226，1993
 上西琴子：染色体異常試験における変異原性の定量に関する研究，京都大学特別研究，1990