

化学物質の微生物分解に伴う変異原性の変動

岐阜大学工学部

谷脇 祥太郎

同上 正会員 松下 拓

同上 正会員 松井 佳彦

1. はじめに

近年、非常に多種多様の化学物質によって流域環境が汚染され、問題となっている。環境中の化学物質について、原体濃度や原体の毒性に関してはすでに先駆的な研究が存在する。また、それらの微生物分解による代謝物についても多くの研究があり、環境中での濃度の変化や代謝物の推定がなされている。しかし、本研究が目的としている化学物質の微生物代謝試料の直接的なバイオアッセイによる総括的な安全性の評価は、ほとんど行われていない。そこで本研究では、殺虫剤 MEP を対象物質とし、微生物分解により MEP を含む試料の毒性がどのように変化するかを調べ、代謝物等を含む系全体の安全性の評価を試みた。

2. 実験方法

2. 1 変異原性試験

本研究では変異原性試験として Ames 試験を用い、+S9mix の条件下で試験を行った。Ames 試験では、通常用いられる *Salmonella typhimurium* の TA98 株（フレームシフト型変異原検出株）と TA100 株（塩基対置換型変異原検出株）の 2 種と、それ以外に、ニトロ還元酵素や *O*-アセチル転移酵素生産性を高めた YG1021、YG1024、YG1041、YG1026、YG1029、YG1042 株の 6 種の計 8 株を使用した。Ames 試験に用いるすべての試料は、ジメチルスルホキシドに溶解させ用いた。なお、本研究では復帰変異コロニー数を自然復帰変異コロニー数で除した値（以下 SR 比と略記）が 2 を超える場合を変異原性ありと判断した。

2. 2 微生物分解実験

岐阜大学周辺の田畑の土壌から採取したサンプルに含まれる微生物を液体培地（ KH_2PO_4 1g/L, NH_4NO_3 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, KCl 0.2g/L）により培養し、MEP の好気性微生物分解実験を行った。MEP 5mg/L を添加した培地 500mL に土壌試料 20g を添加し、20℃で 1 週間恒温振盪培養したところ MEP の完全な分解が見られた。そこで、同様の培地 10L に上記の培養液を 200mL 添加し、20℃で恒温振盪培養した。MEP 濃度は試料 10mL をジクロロメタン 10mL で抽出後、ジクロロメタン相を揮発させ、その残渣をアセトニトリル 5mL に再溶解し、高速液体クロマトグラフィーにて波長 267nm で測定した。Ames 試験には、試料 2L をジクロロメタン 200mL で抽出後、ジクロロメタン相を揮発させ、ジメチルスルホキシド 10mL に再溶解したものをサンプルとして用いた。

3. 結果と考察

3. 1 MEP 原体の Ames 試験結果

TA98 系では、図.1 (A) に示すように TA98 株、YG1021 株、YG1024 株において変異原性はなく、YG1041 株において変異原性ありと評価された。TA100 系では、図.1 (B) に示すように TA100 株において変異原性なしと評価され、YG1026 株、YG1029 株、YG1042 株において変異原性ありと評価された。MEP は塩基対置換型の変異を誘発すると考えられ、特に YG1042 株で強い変異原性が認められた。

3. 2 MEP の微生物分解実験結果

MEP の微生物分解の結果を図.2 に示す。添加した MEP は速やかに分解され、培養 1 日目で 50%、培養 2 日目でほぼ 100% 分解された。培養 3 日目以降は、試料中に MEP は検出されなかった。

3. 3 MEP の微生物分解に伴う変異原性の変動

MEP の微生物分解に伴う変異原性の変動を変異原生の強くでた YG1041、YG1026、YG1029、YG1042 株に関して図.3 に示す。縦軸の SR_{100} とは各サンプルの変異原性の強さを表す指標であり、以下の手順より計算した値である。まず、各サンプルを公比 2 の 3 段階の添加量 (25,50,100 μ L。但し、YG1042 株のみ 6.25,12.5,25 μ L) で Ames 試験を行い用量-反応関係を切片 1 の直線で近似した。次に、この直線を用い投与量 100 μ L (元試料では 20mL に相当) での SR 比を算出し、 SR_{100} とした。

YG1041 株については図.3 (A) に示すように SR_{100} 値の緩やかな減少がみられ、2 日目で SR_{100} は 70%以下になったが、3 日目以降に大きな減少はなかった。

YG1026 株、YG1029 株については図.3 (B)、(C) に示すように、1 日目で SR_{100} は 50%となるが、2 日目以降は大きな減少がなかった。YG1042 株については図.3

(D) に示すように、1 日目で 60%、2 日目で 90%の減少はあったが、2 日目以降も変異原性がなくなることはなかった。図.2 で示したように MEP 原体は 2 日目以降に検出されていないことより 2 日目以降の変異原性は何らかの代謝物によって誘発された可能性が考えられる。なお、これら 4 株以外の菌株では、分解実験を通して変異原性は検出されなかった。

4. おわりに

本研究では殺虫剤 MEP を微生物分解させ、代謝物を含む系全体に対して Ames 試験を行い、変異原性の変動を調べた。その結果、YG1041、YG1026、YG1029、YG1042 株で変異原性が検出され、その変

異原性は MEP の分解に伴い減少したが、変異原性がなくなることはなかった。これらのことより、微生物分解により MEP より弱いものの変異原性を有する代謝物が生成された可能性があると考えられた。

謝辞

S.typhimurium YG 株をご分与頂いた国立医薬品食品衛生研究所の能美健彦先生に深謝する。

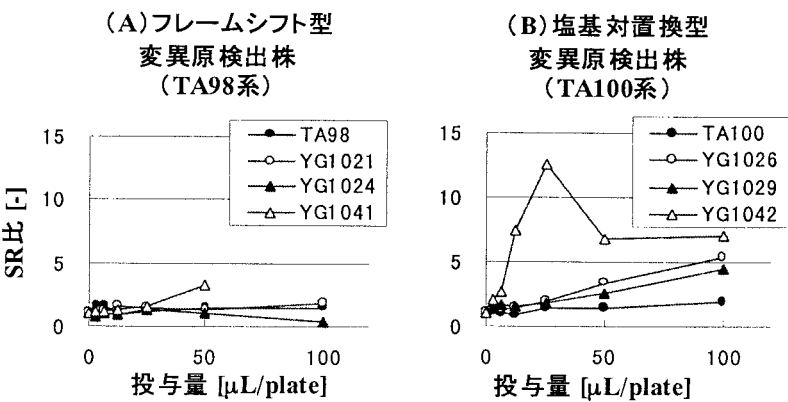


図. 1 MEPのAmes試験結果

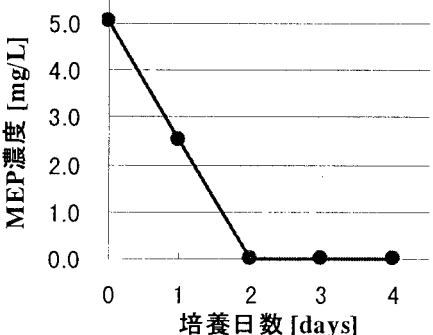


図. 2 MEPの微生物分解実験結果

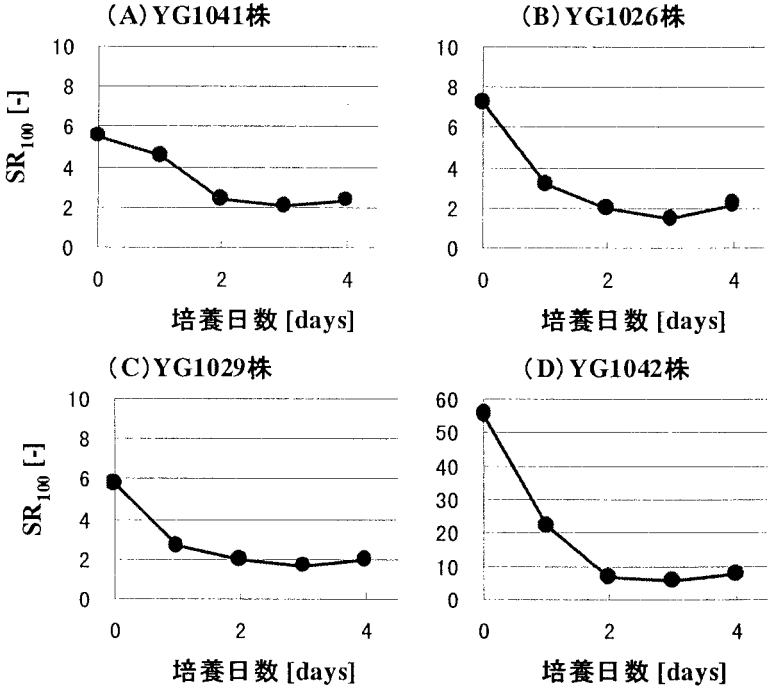


図. 3 微生物分解過程での変異原性の変動