

MEP の嫌気性微生物分解に伴う変異原性の変動

岐阜大学工学部		池場 和範
同上	正会員	松下 拓
同上	正会員	松井 佳彦
同上	正会員	井上 隆信

1.はじめに

農薬は日常的に使用される化学物質であり、中には発癌性といった遺伝毒性をもつものもあり、毒性について総合的に評価することが重要である。農薬は環境中に散布され、微生物により分解されることによりいろいろな形に変化し、逆に毒性が強くなることも考えられる。しかし農薬個々の研究はされているが、微生物分解による代謝試料の直接的なバイオアッセイによる総括的な毒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 をケーススタディとして微生物分解過程における毒性の変動を検討する。本研究では毒性の指標として変異原性を取り上げ Ames 試験により評価し、さらに分解により生成された代謝物がどの程度変異原性に寄与しているかも検討する。

2.実験方法

2.1 Ames 試験

本研究では *Salmonella typhimurium* を用いた Ames 試験により変異原性を評価した。本研究では、TA100 株を親株として *O*-アセチル転移酵素生産性を高めた YG1029 株と *O*-アセチル転移酵素生産性とニトロ還元酵素生産性を高めた YG1042 株を使用し、+S9mix 条件下で試験を行った。ここで YG1029, YG1042 株を使用するのは、それらの菌株に対する間接変異原性が MEP の微生物分解過程で上がることが報告されているからである¹⁾。

2.2 MEP の嫌気性微生物分解実験

岐阜大学周辺の水田より採取した MEP 分解微生物を用い MEP を嫌氣的に微生物分解させた。嫌気性微生物分解実験は無機塩等を添加した液体培地を用い MEP を 5mg/L になるよう添加して行った。その後、窒素ガス曝気により系を嫌気状態に保ち、暗所で 37℃にて静置培養した。これらを経時的にサンプリングし、Ames 試験用サンプルの抽出を行った。1 回のサンプリング量は 1L とし、ジクロロメタン 100mL で抽出を行った。得られたジクロロメタン相を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターにより揮発させ、その残渣を DMSO5mL に再溶解させた。

3.実験結果と考察

3.1 嫌気性分解に伴う MEP, MEP-amino の濃度変化

図 1 に嫌気性微生物分解に伴う MEP と MEP-amino 濃度の変化を示す。嫌気性微生物分解により、6 日目には MEP はほぼ分解され、それに伴い MEP-amino が生成された。MEP-amino は添加した MEP に対し 15.7% (モル基準) 生成した。

3.2 MEP, MEP-amino の変異原性

図 2 に MEP と MEP-amino 原体の Ames 試験結果を示す。縦軸の変異原性強度とは His⁺復帰コロニー数を自然復帰コロニー数で除した値である。MEP に比べ MEP-amino の方が高い変異原性を示した。

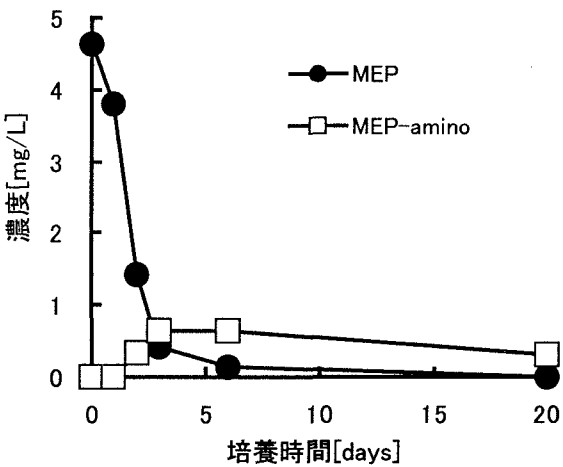


図1.嫌気性微生物分解に伴う MEP, MEP-amino濃度変化

3.3 嫌気性微生物分解に伴う変異原性の変動

本研究では各試料の変異原性を MI_{100} で表した。 MI_{100} とは、分解前に $100\mu\text{g}$ の MEP を含んでいた試料量 (20mL に相当) あたりの変異原性強度であり、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。図 3 に MI_{100} の経時変化を示す。YG1029 では培養開始時には MI_{100} は小さかったが、培養と共に徐々に増加した。また、YG1042 では MI_{100} は培養開始時から高い値を示しており 3 日目までに大きく低下し、その後緩やかに増加した。20 日間の培養ではどちらも 6 日目に比べて低下した。

3.4 MEP, MEP-amino の変異原性への寄与

観察された変異原性に対する MEP と MEP-amino の変異原性への寄与を以下のように検討した。MEP, MEP-amino 原体の Ames 試験結果を直線近似し、この近似式を用いて、各試料に含まれる MEP と MEP-amino が誘発する変異原性をそれぞれ計算した。

図 4 に YG1029 株での計算値と実測値の比較を示す。培養初期は実験値と計算値が同程度であるが 2 日目以降は実験値が計算値を上回っている。これより試料中に含まれる MEP-amino 以外の未知代謝物が変異原性に寄与していると推測できる。同様の結果が YG1042 株に対しても得られた。また、変異原性には MEP-amino が大きく寄与しており、YG1029 では最大 68%、YG1042 で 57% を占めた (自然復帰コロニーを除く)。一方、未知代謝物においても YG1029 で最大 42%、YG1042 で 64% となり無視し得ない寄与であった。また、この未知代謝物は、YG1029, YG1042 株に感受性があることから塩基対置換型のアミノアレン類ではないかと推測された。

4. おわりに

本研究から得られた結果を以下にまとめる。

- ① 変異原性には MEP-amino の寄与が最も大きく、最大で 68% (YG1029)、57% (YG1042) であった。
- ② 培養 3 日目以降、MEP-amino 以外の代謝物が変異原性に寄与していると考えられた。
- ③ この未知代謝物の寄与は最大で 42% (YG1029)、64% (YG1042) であった。
- ④ 未知代謝物は YG1029, YG1042 株に感受性があることよりアミノアレン類の間接変異原であると推測された。

以上から、微生物分解により生成される代謝物も視野に入れたバイオアッセイ等の総括的な評価法が重要であると提言できる。

参考文献

- 1) Matsushita *et al.*, Changes in mutagenicity during biodegradation of fenitrothion, *Chemosphere*, in press.

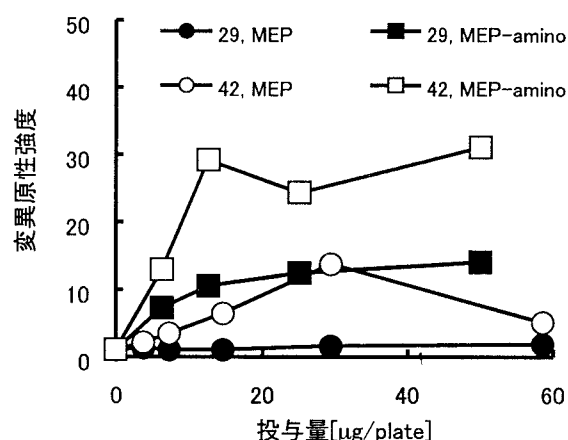


図2. MEP, MEP-aminoのAmes試験結果

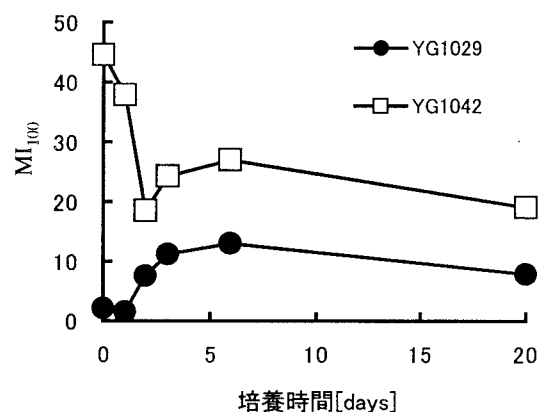


図3.嫌気性微生物分解における変異原性の変動

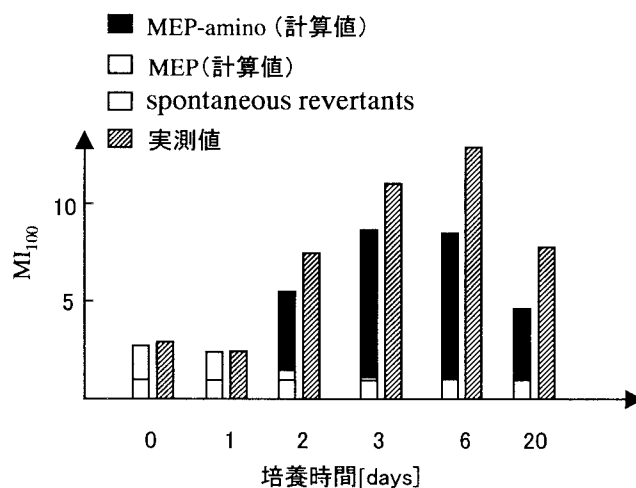


図4.計算値と実測値の比較
(YG1029+S9mix)