

(4) 染色体異常試験による除草剤 CNP の好気性微生物分解の安全評価実験

Evaluating Safety of Aerobic Biodegradation of Herbicide CNP Using Chromosomal Aberration Test

松下 拓*・中道 広隆**・伊藤 禎彦**・住友 恒**

Taku MATSUSHITA*, Hiroataka NAKAMICHI**, Sadahiko ITOH**, and Hisashi SUMITOMO**

ABSTRACT: Safety of herbicide CNP during aerobic biological treatment was evaluated. Batch biodegradation experiments with bacteria which was accumulated from Lake Biwa water were carried out. It was found that these bacteria decomposed CNP releasing all chlorine atoms of CNP in the culture medium within 96 hours of cultivation. A by-product of CNP, $C_6H_2Cl_3-O-C_6H_5$, was found by mass spectrum analysis with gas chromatograph. Chromosomal aberration test using Chinese hamster lung (CHL) cell was carried out to evaluate mutagenic activity of aerobic biological treated water including CNP. It was found that the contribution of CNP to activity inducing aberrations of biological treated water decreased. On the other hand, the contribution of the by-products of CNP was increased. As a result, activity inducing aberrations of treated water did not reach the control test level.

KEYWORDS: CNP, biodegradation, mutagenicity, chromosomal aberration test

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水田用除草剤 CNP (クロロニトルフェン、図 1) については、胆のうガン死亡率との間に地域的な相関関係が認められると結論されてから^{1)~4)}、CNP 代替農薬の使用へと移行している⁵⁾。しかしなお、CNP 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。CNP は現行の浄水処理では除去されず、オゾン処理でも分解されにくいといった事実が指摘されている⁶⁾。従って、CNP を含む原水がオゾン活性炭処理を擁する浄水場に流入した場合、各処理過程では変化を受けず、ほぼ全量が活性炭層に吸着され蓄積されることが考えられる。

CNP はサルモネラ菌を用いた変異原性試験において変異原性が認められており^{7)~9)}、さらには CNP と胆のうガンとの因果関係を疫学的に示した報告^{1)~4)}も出されている。しかし、CNP の微生物による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^{10),11)}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。

本研究は、浄水処理工程における生物活性炭層などで CNP が微生物による代謝を受ける場合に考慮すべき分解生成物の安全性を評価することを目的とし、特に CNP の好気性微生物分解における染色体異常誘発性変化の過程について基礎的な検討を行ったものである。

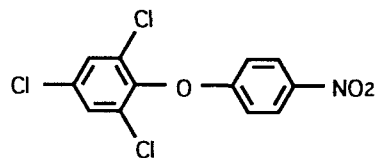


図 1. CNP の構造図

* 名古屋大学大学院工学研究科地圏環境工学専攻 (Department of Geotechnical and Environmental Engineering, Nagoya University)

** 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻 (Department of Environmental Engineering, Kyoto University)

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5cmのアクリル製カラムに、CNPを0.15mg/Lとなるように添加した琵琶湖表流水を1m/dayで40日間連続的に通水することによりCNPを分解可能な菌群を蓄積させた。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 (いずれもナカライテスク製 特級), HEPES 50mM (ナカライテスク製 グッドバッファー), CNP 15mg/L (和光純薬工業製 残留農薬試験用) を添加した蒸留水に上記の分解菌群を加え、水酸化ナトリウムを用いてpHを7.0に設定した。これを25℃、バッチ式にて恒温振盪培養し、一定時間毎に採水した。

2. 2 試料の調製と測定法

CNPの微生物分解による分解生成物を調べるため、一定時間ごとに試料100mLを図2に示した抽出法によりジエチルエーテル(和光純薬工業製 残留農薬試験用)で抽出した。酸性フラクションは上水試験方法に従いメチル化を行った¹²⁾。得られたジエチルエーテル抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水したのち温浴により濃縮し、ガスクロマトグラフ質量分析計(ガスクロマトグラフ: Hewlett Packard 製, 5890 SERIES II、質量分析計: 日本電子製, JMS-AX505)を用いて測定した。ガスクロマトグラフ質量分析計測定にはキャピラリーカラム(Hewlett Packard 製, HP-5 cross-linked 5% phenyl methyl silicone column, カラム長さ30m)を用いた。カラム温度は、初期温度50℃で1分間保持し、30℃/分で170℃まで上昇させ(4分間)、10℃/分で270℃まで上昇させる(10分間)2段階昇温を行った。イオン源温度、注入口温度はどちらも250℃とした。イオン化電圧は70eVとし、試料の注入方法はスプリットレスで注入量は1μLとした。

CNP濃度については、別途に試料1mLをn-ヘキサン3mLで抽出し、上記と同様の条件でガスクロマトグラフ質量分析計により測定した。測定はSIMで行い、測定質量数は317とした。

染色体異常試験用として一定時間ごとに試料100mLを採取し、同様の抽出法により抽出した。得られたジエチルエーテル抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水したのち温浴により揮発させることにより濃縮を行った。残渣を0.5mLの除菌エタノールに再溶解させ、そのうち0.2mLを染色体異常試験に供した。

また、pHはHORIBA製 pH METER F-22を、UVはShimadzu製 DOUBLE-BEAM SPECTROPHOTOMETER UV-140-02を用いて測定した。塩素イオン濃度はチオシアン酸水銀を用いた方法¹³⁾で測定した。

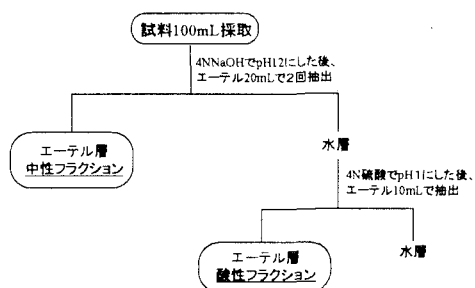


図2. エーテルによる抽出法のフロー

2. 3 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¹⁴⁾、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(FIBCO) 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0.2mL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。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¹⁵⁾。試料添加後37℃で24時間培養した後、染色体標本作製した。

染色体標本は光学顕微鏡を用い1000倍で検鏡するとともに、顕微鏡画像を直接テレビカメラより入力し、住友らの方法により画像解析を行った(ニコンLUZEX2D使用)¹⁶⁾。この画像解析法は交換型異常染色体を高い識別率で識別できるため、交換型異常を検出し定量化した。発ガン物質の多くが交換型異常を多く誘発する傾向があるとされている

ため^{17,18)}、これを検出・定量し、安全性評価を行うものである。原則として染色体像は任意の50細胞を入力し画像解析を行った。CHL細胞は25本の染色体をもつため、1標本に対し1250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50細胞中の交換型異常検出数により表した。

3. 実験結果および考察

3. 1 CNPの好気性微生物

分解に関する実験

CNP濃度の経時的变化を図3に示す。なお、図3～6は分解実験を10回行いその変動を標準偏差とともに表したものである。添加した15mg/LのCNPは培養開始とともに分解が始まり、12時間の培養で6.46mg/Lまで低下した。その後96時間では0.92mg/Lと94%分解された。図3をみると、CNP濃度は1次反応的に減少したことがわかる。

pHの経時的变化を図4に示す。すべての実験を通してpH変化は6.5～7.1の範囲内で、培養時間を通してpHは殆ど変動しなかったといえる。菌体濃度の指標として測定したOD580値の変化を図5に示す。実験開始時のOD580値は0.012であり、6時間の培養では全く変化しなかった。12時間～24時間にOD580値は急増し、その値は0.532となった。その後、96時間まではほぼ一定の値をとった。

CNPの側鎖である塩素の培地中での濃度変化を表したものが図6である。6時間の培養でCNPは33%分解されたが、その間には塩素イオンは放出されなかった。本研究で用いた微生物によるCNPの分解は脱塩素以外から始まるものと考えられる。培養12時間で初めて放出塩素イオンが検出されその値は0.32mg/Lであった。その後培養に伴い塩素イオン濃度は増加し、96時間の培養では4.79mg/Lの塩素イオンが放出された。

添加した15mg/LのCNPは0.92mg/Lまで分解されたが、分解されたCNPから全ての塩素原子が遊離されるとすると、 $\frac{15.00 - 0.92}{318.5} \times 3 \times 35.5 = 4.71$ となり、4.71mg/Lの塩素イオンが放出されるはずである。実測された塩素イオン濃度は

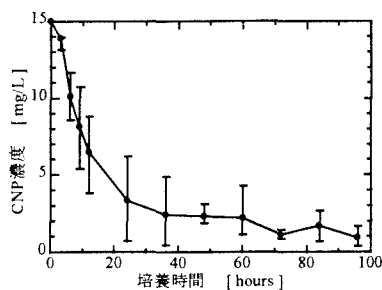


図3. CNP濃度の経時的变化

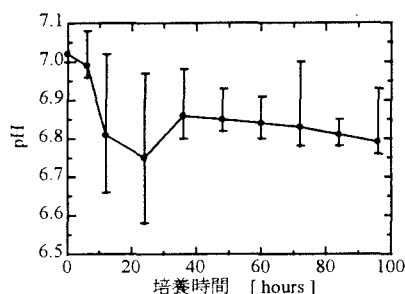


図4. pHの経時的变化

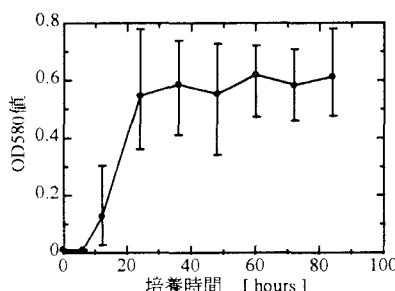


図5. OD580値の経時的变化

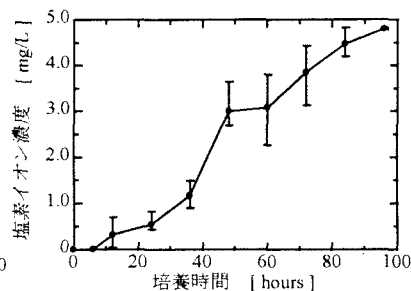


図6. CNP分解に伴う塩素イオンの遊離

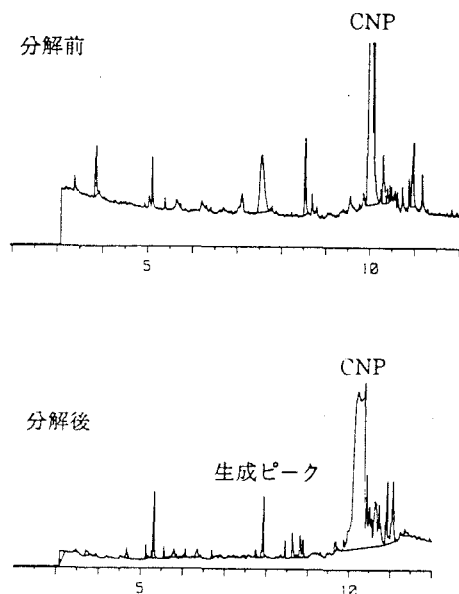


図7. CNP分解前後のクロマトグラムの比較

4.79mg/Lであったので、96時間の培養で最終的にCNP 原体中の全ての塩素原子が遊離されたと判断できる。

3. 2 CNP 微生物分解時の代謝物に関する実験

微生物分解前後の試料の中性フラクションを測定したガスクロマトグラムを図7に示す。縦軸は分解前後ともほぼ同じスケールである。分解前試料には見られない明らかなピークが分解後（96時間後）試料の保持時間 7.9 分に見いだされた。この物質の相対濃度の経時変化を図8に示す。なお、相対濃度とは、10 μ g/L の CNP のクロマトグラム上での面積値を1としたときの面積比である。この物質は培養36～96時間の間で生成量が増大したが、その量は添加 CNP に対して最大値でも200分の1程度と極めて微量であった。この物質のマススペクトルを図9に示す。マススペクトルから、この物質をCNPの脱ニトロ体であるC₆H₂Cl₃-O-C₆H₅と推定した。推定構造図を図10に示す。

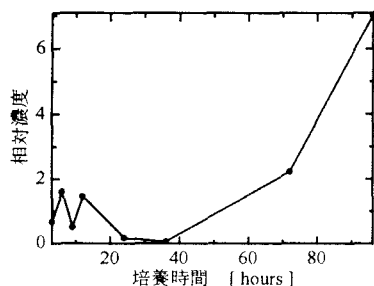


図8. 未知物質の相対濃度変化

酸性フラクションを測定したガスクロマトグラフ質量分析計のガスクロマトグラム上には微生物分解前後で顕著な差は見いだせなかった。

本実験では、2.1の考察においてその存在が示唆された脱塩素体を確認することができなかった。塩素の水酸基置換により化合物の親水性が増し、ジエチルエーテルで抽出ができなくなったものと思われる¹⁹⁾。また、嫌気性条件下での代謝生成物であり毒性の高いCNPアミノ体^{10),11)}は、本実験で行った好気性条件下では生成されなかった。

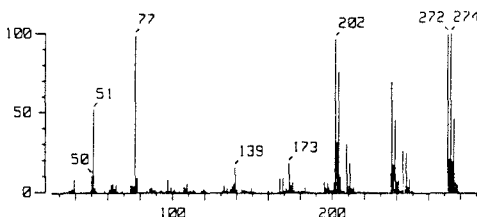


図9. 未知物質のマススペクトル

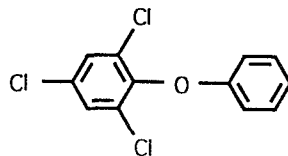


図10. 生成物の推定構造図

3. 3 微生物分解による染色体異常誘発性の変化

CNP 原体の染色体異常誘発性を示したものが図11である。横軸は培養ビン中でのCNPの濃度を示しており、縦軸は任意の50細胞中の交換型異常染色体検出数を表している。CNP投与量が20mg/Lを越える試料ではCNPの細胞毒性のため細胞が生育できず、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投与量が20mg/LまではCHL細胞への投与濃度に対して明らかな濃度依存性が認められた。

CNPを微生物分解させたときの染色体異常誘発性の変化を示したのが図12である。酸性フラクションでは、全培養時間を通して任意の50細胞中の交換型異常染色体検出数は、エタノールのみを与えたコントロール試験と等しい3～5個であった。酸性フラクションは染色体異常を誘発しないものと判断した。

中性フラクションでは、CNP添加直後試料の交換型異常染色体検出数は50細胞中22個であった。24時間の培養で16個に減少した。その後も徐々に減少し、96時間の培養で10個となった。CNPは96時間の培養により94%分解され0.92mg/Lとなった。

測定された交換型異常誘発性を、CNP原体によるもの、それ以外によるもの、およびコントロール値に分けて表したのが図13である。CNP原体由来の交換型異常誘発性はCNP濃度から計算した。培養開始時の交換型異常誘発はす

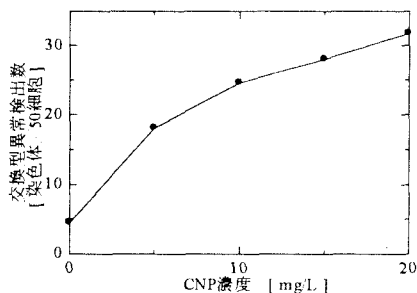


図11. CNP原体の染色体異常誘発性

べてCNP原体によるものである。培養に伴いCNP原体による交換型異常誘発への寄与は減少し、96時間でコントロール値を除いた検出数への寄与は20%と考えられる。一方、微生物分解によるCNP代謝物由来と考えられる交換型異常は培養12時間後からわずかながら誘発され、その寄与はコントロール値を除いた交換型異常誘発性の6%であった。この寄与率は24～54時間ではほぼ一定の65%であった。その後増加して実験を終了時した96時間後で80%となり、交換型異常はその大部分が代謝物に起因されるものであると評価できる。

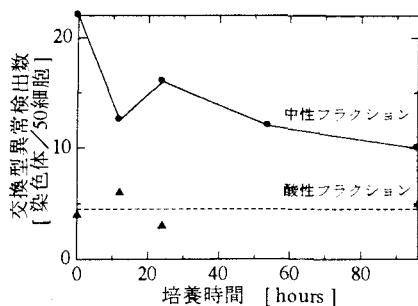


図12. 染色体異常誘発性の経時的変化

3.2で示したように、培養12～96時間の試料のジエチルエーテル抽出物では、CNP以外の有機物は初期添加CNP量に比べ1/100～1/200程度しか検出できなかった。ところが、図12からわかるように分解後の試料の染色体異常誘発性は分解前と比べ減少したもののコントロール値よりも大きく、染色体異常が誘発される結果となった。このことは、CNPは消失したものの、染色体異常誘発性を有する代謝物が存在することを表していると考えられる。また、ガスクロマトグラフ質量分析計での分析では検出できない化合物の有毒性を測定できており、染色体異常試験のようなバイオアッセイを行って安全評価を行う必要があると指摘できる。

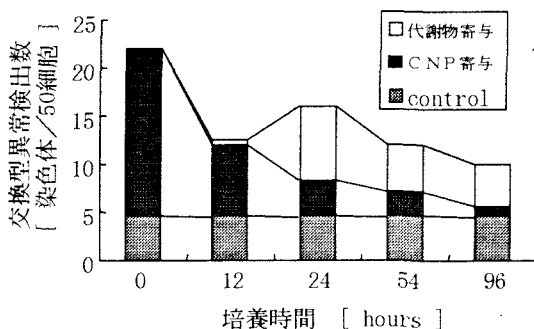


図13. 代謝物の染色体異常誘発性への寄与の評価

4. おわりに

本研究により得られた知見を以下にまとめる。

- ・CNPは好氣的に微生物分解が進み、最終的にCNP原体中の塩素原子がほとんど全て遊離したと評価された。
- ・CNPの代謝物としてCNPの脱ニトロ体である $C_6H_2Cl_3-O-C_6H_5$ を得たが、その生成量は添加CNPの1/200程度であった。
- ・96時間のCNPの微生物分解で、中性フラクションの交換型異常検出数は分解前の22個/50細胞から10個/50細胞まで減少した。微生物分解で変異原性は低減されるが、コントロール値まで低下したわけではなかった。96時間後では、代謝物が変異原性誘発に占める割合は80%と評価できた。また、酸性フラクションは交換型異常を誘発しなかった。

以上よりCNPなどの変異原性物質の処理を考える際、分解生成物が変異原性を有する可能性があるため、原体濃度のみによって処理の安全性を評価する方法では不十分であることがわかった。評価の際には、染色体異常試験などに代表されるバイオアッセイを行うことが不可欠であることを指摘した。

謝辞

本研究を行うに当たり適切な助言を頂いた名古屋大学大学院工学研究科 松岡 譲教授に深謝する。ガスクロマトグラフ質量分析計の使用にあたり、京都大学大学院工学研究科高度環境分析システム管理委員会 長尾正悟技官・河村正純技官には多大なご協力を頂いたことを深謝する。また、実験にご協力頂いた京都大学大学院工学研究科 岡部泰隆君・植田洋行君に深謝する。

参考文献

- 1) 宮下衛：モツゴの稚魚による農薬・重金属の毒性試験，日本公衆衛生学雑誌，Vol.35，No.6，pp.293-299，1988
- 2) 山本正治・遠藤和男・高木修子・中平浩人・角田正史・真野裕・渋谷範夫・足立泰儀：胆嚢癌発生の多因子説，日本医事新報，No.3531，pp.23-26，1992
- 3) 山本正治：新潟平野部に多発する胆嚢癌の成因研究－複合要因説におけるジフェニルエーテル系除草剤の役割，医学のあゆみ，Vol.166，No.13，pp.839-840，1993
- 4) Yamamoto M., Endoh K., Magara J., Watanabe M., Takagi S., Sakai H., Sibuya N. and Fujiguchi K. : Ecological Correlation between the Use of Agricultural Chemicals and Biliary Tract Cancers in Japan. Acta Medica et Biologica. Vol.35, No.2, pp.63-68, 1987
- 5) 中川順一・西村哲治・高木博夫・高橋清・島垣純・沖恒二・梶正一・寺嶋勝彦・木村繁夫：CNP の代替農薬の分析方法，第 47 回全国水道研究発表会，pp.186-487，1996
- 6) 奥村為男：水中農薬の塩素およびオゾンによる分解について，水環境学会誌，Vol.15，No.1，pp.62-69，1992
- 7) Miyauchi M. and Uematsu T. : Effect of Biphenyl Ether Herbicides on the Formation of Mutagenic Intermediates from Procarcinogens by Rainbow Trout, Bulletin of environmental contamination and toxicology, Vol.39, No.2, pp.175-181, 1987
- 8) 厚生省生活衛生局水道環境部研究委員会：公共用水域における開放形使用化学物質の動態及び安全性等に関する研究，平成元年度環境保全研究成果集，pp.9-1－9-22，1990
- 9) 厚生省生活衛生局水道環境部研究委員会：公共用水域における開放形使用化学物質の動態及び安全性等に関する研究，平成2年度環境保全研究成果集，pp.9-1－9-19，1991
- 10) Draper W.M. and Casida J.E. : Diphenyl Ether Herbicides and Related Compounds: Structure-Activity Relationship as Bacterial Mutagens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol.31, No.6, pp.1201-1207, 1983
- 11) 渡辺美智江，吉岡忠夫，沢口智美，宮内真幸，植松孝悦：CNP 類の毒性研究，第 10 回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム講演要旨集，pp.29-30，1983
- 12) 厚生省監修：上水試験方法 1985 年版，日本水道協会，1985
- 13) Iwasaki I., Utsumi S., Hagino K. and Ozawa T. : A New Spectrophotometric Method for the Determination of Small Amounts of Chlorine Using the Mercuric Thiocyanate Method, Bulletin of the Chemical Society of Japan, Vol.29, pp.860-864, 1956
- 14) 牧野佐二郎他：放射線・化学物質と染色体異常，医学書院，1982
- 15) 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，pp.219-226，1993
- 16) 住友恒・伊藤禎彦：画像解析を導入した染色体異常試験法の開発，衛生工学研究論文集，Vol.26，pp.107-115，1990
- 17) 石館基：環境変異原性物質検出法の現状とその評価，水質汚濁研究，Vol.4，No.3，pp.127-136，1981
- 18) 石館基：染色体異常試験データ集，エル・アイ・シー，1987
- 19) 鍛塚昭三：土壌環境中における除草剤の分解，農薬科学，Vol.3，No.3，pp.107-122，1976