

岐阜大学工学部 ○ 松下 拓
 同上 佐久間智
 摂南大学薬学部 中室克彦
 岐阜大学工学部 松井佳彦

1. はじめに

農薬に代表される開放形化学物質が環境中に放出されるとさまざまな代謝を受ける。微生物による代謝は最も影響の強いものの一つであり、化学物質の環境中（土壌・水中など）での微生物代謝に関する研究は数多くある。一方、化学物質やその代表的な微生物代謝物の毒性を調べた研究も多く存在するが、実際に化学物質を微生物に分解させ、その分解過程において毒性がどのように変化するかを調べた研究はほとんど見られない。そこで本研究では、除草剤 CNP をモデル物質として微生物分解実験を行い、その分解過程での経時的な毒性の変動を Ames 試験により調べ、さらには代謝物の変異原性への寄与について検討を加えることを目的とする。

2. 実験方法

岐阜大学西側の水田の表面から 15cm 下の土壌から採取した CNP 分解菌群を用い、嫌気条件下にて CNP を分解させた。経時的に試料を n-ヘキサンで抽出した後 n-ヘキサン相を揮発させ、得られた残渣を DMSO に再溶解させ、変異原性試験に供した。変異原性試験として Ames 法を取り上げ、プレインキュベーション法により代謝活性ありなし（±S9mix）の両方を行った。使用菌株は、通常用いられる *Salmonella typhimurium* の TA98, TA100 株の他に、ニトロ還元酵素やアセチル転移酵素の活性を高めた変異株である YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 株を用いた。

3. 実験結果及び考察

3. 1 CNP の嫌気性微生物分解

CNP の分解に伴い、CNP-amino の生成が認められた。CNP と CNP-amino 濃度の経時的变化を図 1 に示す。添加した 238 μ g/L の CNP (●) は 14 日ではほぼ完全に分解された。また、CNP-amino (○) は培養 3~7 日に生成され、14 日目においてその濃度は 34 μ g/L となった。このことから、添加した CNP の 16% (モル基準) が CNP-amino に変換されたが、84%はそれ以外の代謝物へと変換されたと判断できる。なお、微生物を添加せずに行った実験では、CNP 濃度はほとんど変化しなかった (Δ)。

3. 2 嫌気性微生物分解に伴う変異原性の変動

あらかじめ各試料 (0, 3, 7, 14 日目の試料) について 0~167mL/plate の投与量の範囲で Ames 試験を行い、得られた用量-反応関係を直線近似した。得られた近似直線から計算した投与量 167mL/plate の変異原性強度 (復帰変異数/自然復帰変異数) をその試料の変異原性の強さと考え、この値をもって変異原性の変動を調べた。TA98, YG1024, YG1029 株の S9mix 存在下において、

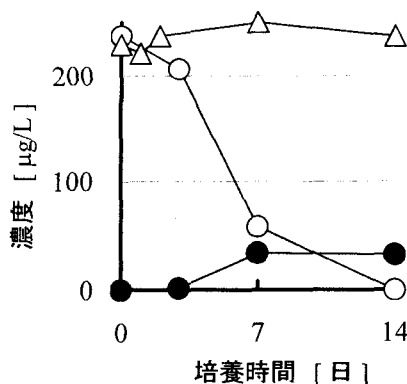


図1. 嫌気性微生物分解におけるCNPとCNP-aminoの濃度変化(○:CNP, ●:CNP-amino, Δ:control)

微生物分解に伴い変異原強度が増加した。その他の菌株の S9mix 存在下、ならびに全ての菌株の S9mix 非存在下では変異原性は検出されなかった。

3. 3 変異原性への代謝物の寄与

あらかじめ調べた CNP と CNP-amino の Ames 試験結果を用いて、TA98, YG1024, YG1029 株の S9mix 存在下での変異原性への CNP, CNP-amino の寄与を推定した。各培養時間に対してそれぞれ 2 つの変異原強度が表されている。左が試料中に含まれる CNP, CNP-amino 濃度から計算された変異原性強度であり、右が実験で得られた値である。ただし、ここでは個々の物質がそれぞれ変異原性に線形に寄与するものと考え、複数の物質による相乗効果は考慮していない。

TA98 株への変異原性については、培養 3 日目までは、計算値と実験値はほぼ同じ値であるが、培養 7 日目以降は実験値が計算値を大きく上回った。このことは、CNP と CNP-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、CNP-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 7 日目で 47%、培養 14 日目で 67%と推定された。

YG1024 株への変異原性は、培養 3～7 日目にかけて著しく増加したが、この変異原性は CNP と CNP-amino のみで説明でき、特に CNP-amino が大きく寄与していることがわかった。

YG1029 株への変異原性は、YG1024 株同様に培養 3～7 日目にかけて著しく増加した。これらの変異原性には、CNP-amino の寄与が大きい、それ以外にも変異原性を有する代謝物の存在が示唆された。これらの代謝物の変異原性強度に占める割合は、7 日、14 日目共に 30%と推定された。

4. おわりに

本研究では CNP の嫌気性微生物分解試料全体を変異原性試験にかけ、その試料のもつ変異原性を包括的に評価することを試みた。その結果、S9mix 存在下において TA98, YG1024, YG1029 株に対する変異原性が増加することがわかった。また、TA98, YG1029 株に対する変異原性には、CNP-amino 以外の未知代謝物が寄与していることがわかった。これらから、総括指標としてのバイオアッセイの重要性が示された。

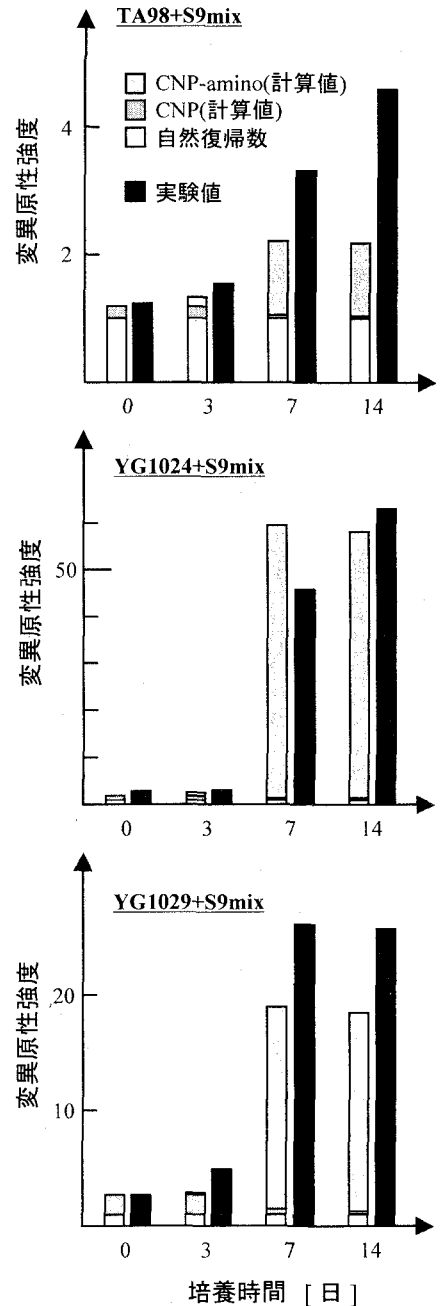


図2. 変異原性に対するCNPとCNP-aminoの寄与