

岐阜大学大学院工学研究科

○松井 佑介

岐阜大学工学部

松下 拓

同上

松井 佳彦

同上

井上 隆信

1. 序論

現在までに多くの農薬が使われており、それらの一部は田畑の土壌に残留している。また、一部は河川等に流出し、湖沼の底泥等に蓄積していると指摘されている。これらの残留、蓄積した農薬は微生物分解により形態が変化し、毒性を持つ代謝物へと変換される可能性がある。たとえば、わが国で大量に使用された除草剤 CNP が特に嫌気性微生物分解を受けることによって、CNP-amino へと変換され、その CNP-amino が変異原性の増加に大きく寄与していることが報告されている¹⁾。しかし、飲料水源として取水されるまでの経路を考えると、嫌気下で生成された代謝物が直接ヒトに曝露される可能性は低く、河川等の好気下を通過した後に暴露される場合がほとんどである。したがって嫌気下で増加した変異原性が好気下におかれた場合にどうなるかを検討する必要がある。そこで本研究では CNP を対象とし、嫌気・好気条件の変化を伴う微生物分解過程における毒性の変動を検討する。

2. 実験方法

本研究ではまず前培養によって分解微生物を獲得した。この微生物を用いて CNP 嫌気性微生物分解実験を行い、CNP が消失した後に好気条件に転換した。このような嫌気・好気条件の変化を伴う微生物分解過程において、経時的にサンプリングを行い、変異原性を Ames 試験により評価した。

2.1 前培養

CNP を嫌気的に分解可能な微生物を獲得するために、岐阜大学周辺の畑の表層から 10~15cm 下の土壌を、CNP を添加した液体培地に加えた。これに窒素ガス曝気を行い、容器を密封することで嫌気状態として 20℃ で静置培養することにより CNP を嫌気的に分解可能な微生物を得た。次に CNP の代謝物を好気的に分解可能な微生物を獲得するために、嫌気性的前培養分解試料を遠心分離し土壌と微生物を沈殿させた。遠心分離で得られた上澄み液には、CNP の嫌気性微生物分解代謝物が存在すると考えられる。そこで、ここに岐阜大学周辺の畑の表層土壌を加え、ニュートリエント・ブローズ培地を添加して 20℃ で好気的に振盪培養することにより CNP の代謝物を好気的に分解可能な微生物を得た。

2.2 CNP 分解実験

前培養で得られた CNP の嫌気性分解微生物を、新しい液体培地に CNP と共に添加し、上述の条件にて嫌気的に培養した。嫌気性微生物分解により CNP の消失が確認された培養 5 日目に嫌気性微生物分解後の液体培地を 3 分し、以下の条件分けを行った。

- (1) 嫌気性微生物分解後の試料をオートクレーブにより 121℃、20 分間滅菌したものにニュートリエント・ブローズ培地を加え、あらかじめ獲得しておいた CNP 微生物分解代謝物を好気的に分解可能な微生物を添加し、この試料を好気的に振盪培養した。
- (2) 嫌気性微生物分解後の試料をオートクレーブにより 121℃、20 分間滅菌したものを好気的に振盪した。
- (3) 嫌気性の培養をそのまま継続した。

これらの 3 条件で培養を行い、それぞれについて経時的に CNP と CNP-amino の濃度を測定するとともに、

Ames 試験によって試料の変異原性を評価した。

2.3 試料の抽出法

試料 3L を遠心分離 (4000×g, 5 分) し、微生物を沈殿させた。沈殿した微生物に吸着した物質を回収するために沈殿にアセトニトリル 30mL を加えボルテックス攪拌し、アセトニトリル相をメンブレンフィルター (0.2μm, PTFE) で濾過した。その濾液を遠心分離の上澄み液に添加し、PS2 カートリッジ (Waters 製) を用いて固相抽出し、脱水した後、ジメチルスルホキシド 6mL で溶出した。

2.4 Ames 試験

本研究では *Salmonella typhimurium* を用いた Ames 試験によって変異原性を評価した。使用菌株は O-アセチル転移酵素を高生産する、フレームシフト型変異原検出菌株である YG1024 株²⁾とし、+S9mix 条件下で試験を行った。本研究でこの菌株を用いるのは、既往の研究で CNP の嫌気性微生物分解過程でこの株に対する変異原性が増加するということが報告されているためである¹⁾。

3. 結果と考察

3.1 CNP, CNP-amino 濃度の変化

CNP, CNP-amino の濃度変化を図 1 に示す。CNP は 5 日間の嫌気性培養により約 90% 分解され、代謝物として CNP-amino が生成された。嫌気では培養 6 日目まで CNP-amino が増加し、その後やや減少した。好気条件に転換した系では、微生物を添加しない場合、培養 6 日目以降ほぼ濃度変化は無く、微生物を添加した場合には速やかに培養 15 日目にはほぼ消失した。

3.2 変異原性の変動

図 2 は分解に伴う変異原性の変化を示す。変異原性強度とは、分解前に CNP 5μg を含む試料が誘発する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である。既応の研究と同様に分解前には変異原性はほとんど誘発されなかったが、嫌気性微生物分解に伴い増加した。その後の嫌気培養では変異原性の大きな減少は見られなかった。

一方、好気条件に転換した場合では、微生物を添加しない場合、嫌気培養を継続したものと同様に大きな減少は見られなかった。しかし、微生物を添加した場合、CNP-amino 濃度の減少に伴い変異原性も減少した。

条件分けした培養 5 日目に対する 15 日目の変異原性強度の比は、嫌気や微生物を添加していない場合はほぼ 100% であるのに対し、微生物を添加した場合は 10% まで減少した。このことから、いったん増加した変異原性には溶存酸素状態は大きく影響を与えず、好気性の微生物によってのみ減少することがわかった。

3.3 CNP, CNP-amino の変異原性への寄与

変異原性誘発の要因を調べるため、各分解試料に含まれる CNP, CNP-amino が誘発する変異原性を計算した。まず、あらかじめ調べておいた CNP, CNP-amino 原体の Ames 試験の用量-反応関係を直線近似した。得

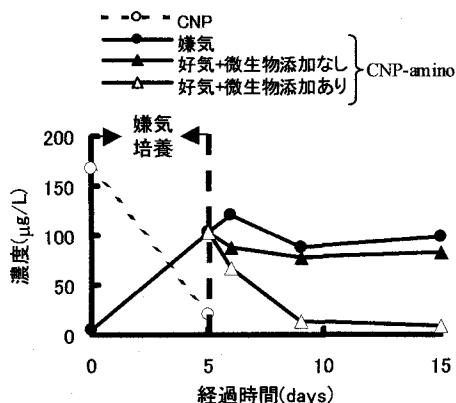


図1. CNP, CNP-amino濃度の変化

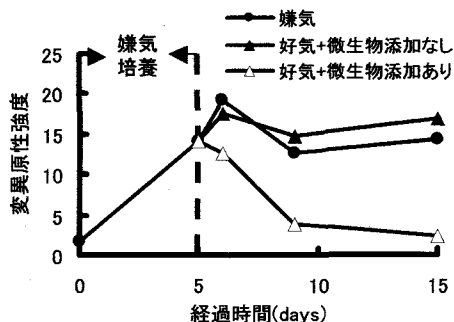


図2. 変異原性の変動

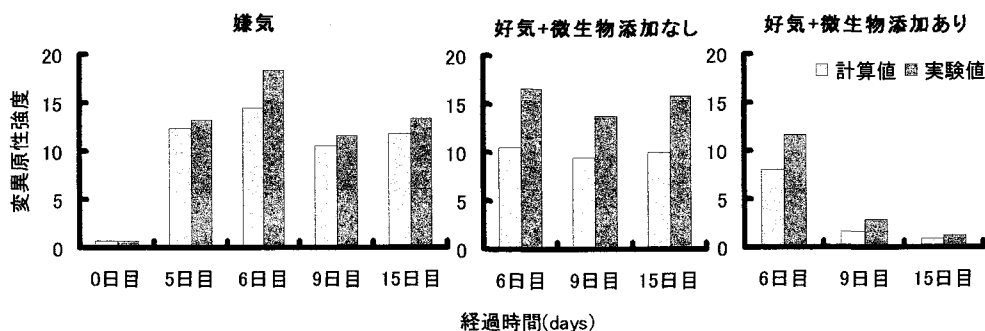


図3. CNP, CNP-aminoの変異原性への寄与

られた近似直線を用い、各試料に含まれる CNP, CNP-amino 量から、CNP, CNP-amino の誘発する変異原性強度を算出した。このようにして算出された CNP, CNP-amino が誘発する変異原性強度の総和を計算値とし、実験で得られた変異原性強度と図3にて比較した。なお、培養5日目以降はCNPがほとんど分解されており、計算値はCNP-aminoのみに依存していた。

培養6日目の試料では、いずれの試料も実験値が計算値を上回った。これは試料に含まれる CNP, CNP-amino だけでは説明できないことを意味する。すなわち、CNP-amino 以外に変異原性を誘発する未知代謝物が生成されたと考えられる。嫌気分解を継続すると、培養6日目では21%あった未知代謝物の寄与が減少し、培養9、15日目には10%程度になった。すなわち、嫌気分解を継続することにより、変異原性を誘発する未知代謝物は、変異原性を誘発しない代謝物へと変換されることが示唆された。

それに対し、好気に転換して微生物を添加しない場合では未知代謝物の寄与がほとんど変化しなかった。この条件では微生物が存在しないため、加水分解等の化学的な分解のみ行われる。このような化学的な分解によって未知代謝物の変異原性が変化することはないとわかった。

一方、微生物を添加した場合には培養9日目から15日目で未知代謝物の寄与が減少しており、44%から27%になった。このことから好気性微生物分解によって未知代謝物が変異原性を誘発しない代謝物へと変換されたと考えられた。

4. 結論

本研究により得られた知見を以下にまとめる。

- (1) CNP の嫌気性微生物分解で増加した変異原性は、好気に転換して微生物を加えると減少したが、添加しない場合と嫌気培養を継続する場合での顕著な減少は見られなかった。
- (2) 嫌気下でも好気下でも、誘発された変異原性には CNP-amino が大きく寄与していた。
- (3) CNP の微生物分解過程において、CNP-amino 以外にも変異原性を誘発する代謝物が存在することが示唆された。

以上のことから、CNP 等の化学物質の環境中での安全性を評価するときには、対象物質のみではなく、その代謝物にも目を向ける必要がある。また、置かれている環境や条件によっても毒性は異なった変動をするため、条件等について幅広く検討していく必要があると提言できる。

参考文献

- 1) Matsushita *et al.*, *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.516, Issue 1-2, pp.71-79, 2002.
- 2) Watanabe *et al.*, *Mutation Research*, Vol.234, pp.337-348, 1990.