
微生物モデルシステムによる有害物質の生態毒理学的研究

Ecotoxicological study of toxicants using a microbial model system

- 代表研究者 岡山大学農業生物研究所助教授 青山 勲
Assoc. Prof., Div. of Water Quality, Inst. for Agricultural
and Biological Sci., Univ. of Okayama
Isao AOYAMA
- 協同研究者 岡山大学農業生物研究所教授 八木 正一
Prof., Div. of Water Quality, Inst. for Agricultural
and Biological Sci., Univ. of Okayama
Masakazu YAGI
- 岡山大学農業生物研究所博士課程 岡村 秀雄
Graduate Student, Div. of Water Quality, Inst. for Agricultural
and Biological Sci., Univ. of Okayama
Hideo OKAMURA

A toxicity testing method of chemicals using microorganisms (Algae—*Chlorella ellipsoidia*, and Yeast—*Saccharomyces cerevisiae*) was investigated. Phytoplankton is an important microorganisms as a primary producer which holds a position of the base of food chains as to an ecological niche, while yeast is the simplest eucaryote. Especially, recent studies on yeast have remarkably progressed and biological information from various aspects have been obtained. In addition to this, yeast is very easy in handling. In these points, both microorganisms are considered to be useful test organisms for a toxicity testing.

In this paper, a quantitative relationship between dose and effect, interaction of chemicals and the repair of cell growth damaged by toxicants were investigated. Toxicity indexes used here are a relative growth rate, cell density, concentration of ATP and Chl-a in cells and a lag time.

EC 50 values of Cu, Cd and Cr (VI) for the growth rate calculated from the change in dry weight of *Chlorella ellipsoidia* were 44, 80, 170 $\mu\text{eq/l}$, respectively.

Next, the culture conditions for yeast was studied. Yeast cells cultured at hyperconcentrations of a substrate suffer from the inhibition of the cell growth. The experimental results showed that 1-5% of glucose concentration was suitable for the toxicity testing. Magnesium promoted the cell growth, while Cobalt inhibited it. Both metals reacted antagonistically with each other. Cell growth of yeast damaged by Co toxicity was repaired by addition of Mg to the culture medium or also by the transfer of the cells to a fresh medium without Co. The extent of the repair was found to be dependent on the concentration of Co and Mg in the medium and an exposure time to Co. A variance analysis, a method by Stratton and an Isobologram method were used for the evaluation of the pattern of interaction between two different chemicals. According to these methods, Cd and Cr affect synergistically on the growth inhibition.

When microorganisms are used as a test organisms for toxicity testing, a relative growth rate is often used as a toxicity index. However, a mechanism of toxic reaction on organisms is considered to be different due to species of heavy metals or chemicals. Therefore it will be needed to be enough investigated which indexes of toxicity should be selected from the viewpoints of a mechanism of reaction, sensitivity of toxicity and an ecotoxicology.

研究目的

微量有害物質による環境汚染は、今日地球の規

模にまで拡大しつつあり、人間を含む生命体の存
亡にかかわる問題となる危険性をはらんでいる。

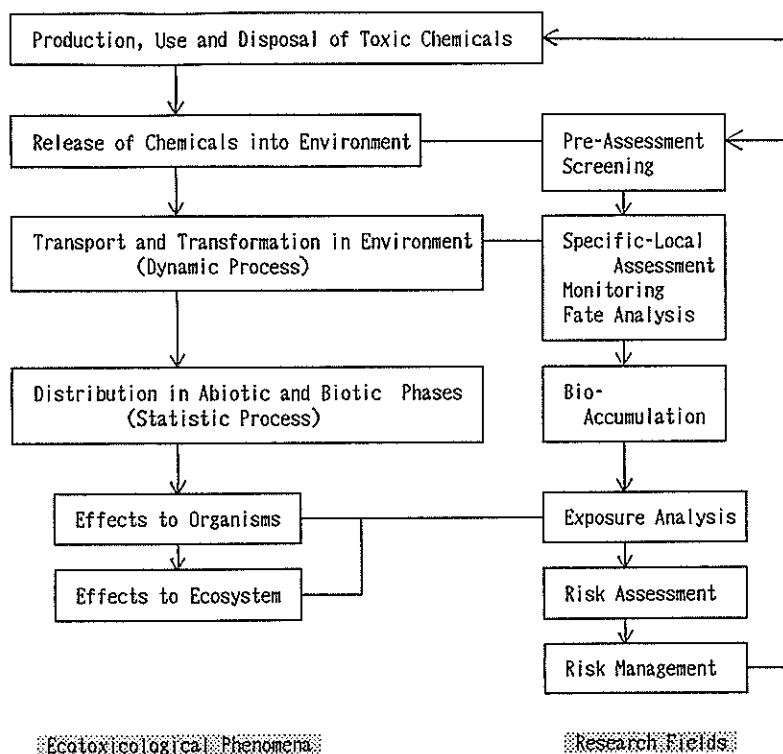


Fig. 1. Toxicity evaluation system.

化学物質は、①毒性が強く、微量の汚染が問題になる。②遺伝毒性、催奇性など修復不能な慢性的毒性を伴うことが多い。③難分解性である。④物質の種類が非常に多く、今後とも新たな物質が生成される。⑤合成過程で不純物として混入し、発生の予知が困難である。それゆえ、⑥すべての物質について毒性を評価し、環境内運命を追跡することは事実上不可能である。などの特徴を有しており、化学物質による生態系汚染は従来のそれとは異質な、環境管理上困難な問題を有している。このような状況を背景に Ecotoxicology なる新しい境界領域の学問が生まれてきた。これは有害物質の環境における挙動と、微生物から生物群集までを含む生態系に及ぼす毒性作用との二つの分野からなる。生態系への影響を評価するための一つの方法として毒性試験を行なう場合、古くから魚類、甲殻類、無脊椎動物などが供試生物として、広く用いられてきた。本研究では植物プランクト

ン、酵母などの微生物を用いて、重金属や農薬などの有害物質の毒性作用に関する研究を行なう。Rec-assay 法や Ames 試験と呼ばれる環境変異原性試験は人間の健康を対象としているのに対し、本研究は生態系に対する有害物質の毒性作用を評価するために行なうもので、上述の微生物はモデル生物として、生態学的、生理学的立場からも重要な位置を占めている。また、これらの微生物は、世代時間が短いことから、水圏環境における毒物のモニタリングや、毒性のスクリーニングという観点からも重要である。生態毒理学的な研究はまだ萌芽的な段階にあり、その研究方法論や、成果の解釈、実際の環境汚染問題への適用方法などに関して極めて未成熟な段階にある。それゆえ、本研究は環境汚染の制御、管理に役立つ微生物を用いた毒性試験法の確立をはかりながら、重金属間あるいは農薬と重金属など2種類以上の物質の微生物の増殖や生理活性度に及ぼす相互

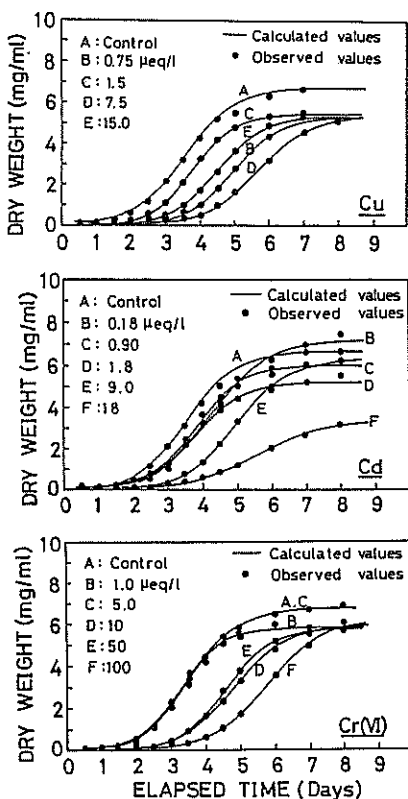


Fig. 2. Growth curve of *Chlorella ellipsoidia* Gerneck in the medium containing Cu, Cd or Cr(VI).

作用の機構や毒性の強度を定量的に明らかにすることを目的とする。さらに上述の研究成果をもとに微量環境汚染物質のモニタリングや、水環境の管理と制御に資することを目的とする。

研究経過

環境に放出された有害化学物質の生態毒理学的研究は、Fig. 1 に示すように、化学物質の発生-放出-過程-影響という一連の連続した領域の問題を包含し、Risk Assessment, Risk Management へと進展する。この流れの中において本研究は生物濃縮と暴露解析の分野に位置づけられる。本研究では単細胞藻類と酵母を毒性試験のモデル生物とし、毒性の指標としては、生長速度、最大増殖量、などの微生物の生育に関する指標と、クロロフィルや ATP 含有量等微生物の生理活性度に関する指標で毒性の強度を評価しようとするもので

ある。また、酵母の毒性試験にあつては、基質の分解速度やエタノール生成能についても、その毒性指標としての可能性について検討する。

毒性作用については次の三つの視点から解析する。(1) 用量-反応関係—この関係は、反応のメカニズムを考えたり、ある用量でどのくらいの反応が起きるかを知らるために利用される。後者は化学物質のリスクアセスメントを行なう上に重要な概念である。(2) 毒性作用からの回復能—化学物質による毒性作用には急性作用と慢性作用（遺伝作用を含む）とがある。ここでは主として急性毒性を受けた微生物がどのような環境条件のもとで、どのような回復をするか検討する。(3) 化学物質の相互作用—実際の環境において、化学物質が単独に存在することはなく、共存して生物に作用する。ここでは 2~3 の方法によって 2 種類の化学物質の相互作用が、拮抗、相乗、相加のどのパターンになるかを検討する。有害化学物質を生態毒理学的な視点から捉えるとき、上述の三つの視点はとりわけ重要な問題であると考えられる。本稿ではこれらの問題についての研究成果の概要を述べることにする。

実験方法および材料

1. 供試生物

藻類: *Chlorella ellipsoidia*, Gerneck

酵母: *Saccharomyces cerevisiae*

2. 微生物の培養

対数生育期にあるそれぞれの微生物を一定量分取し、化学物質が所定の濃度となるように調節されたフラスコに移し、藻類にあつては 5% 炭酸ガスを含む通気培養もしくは振とう培養を、酵母は振とう培養を、前者は 25°C で、後者は 30°C で行なった。一定時間間隔で微生物懸濁液を分取し、細胞密度、細胞数、ATP およびクロロフィル含有量などを分析した。

研究成果

1. 藻類に及ぼす有害物質の毒性

1.1 生長特性に及ぼす影響

供試生物として *Chlorella ellipsoidia* Gerneck を用いた。重金属 Cu, Cd, Cr(VI) に対する生長特性を Fig. 2 に示す。ここで示した藻の乾物量

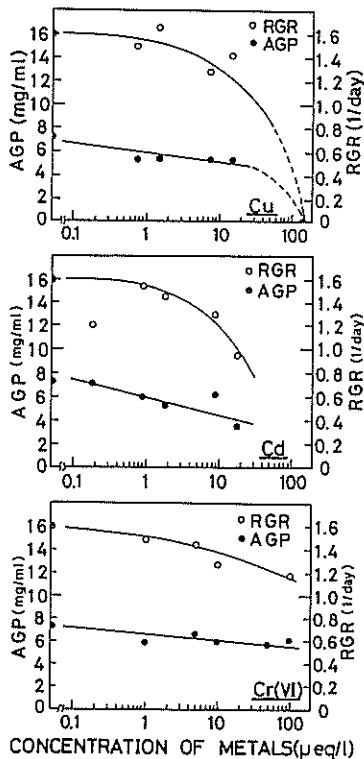


Fig. 3. The effect of Cu, Cd or Cr(VI) on RGR and AGP.

(Y) は波長 660 nm で測定した吸光度 (X) を次式に代入して、換算によって求められた。

$$Y = 7.57X^{1.282} \quad (1)$$

一般に微生物のバッチ培養の場合には、その生長曲線は (2) 式に示すロジスティック曲線に従う²⁾。

$$M_t = K / (1 + A \cdot e^{-\mu t}) \quad (2)$$

ここで M_t は時刻 t における乾物重 (mg-D.W./ml), K は最大増殖量 (mg-D.W./ml), A は常数, μ は相対生長速度 (RGR) (1/day) である。これらのパラメータ値は Gauss-Newton 法によって求めた。データに若干のばらつきが認められるが、培地中の金属濃度に依存して、藻の初期生長過程の誘導期の延長、生長速度や AGP (Algal Growth Potential) の減少が起こる。培地中金属濃度と AGP, RGR との関係を示す Fig. 3 に示す。実験に用いた重金属の濃度範囲では、金属濃度を対数にとると、AGP は直接的に減少し、RGR はある濃度

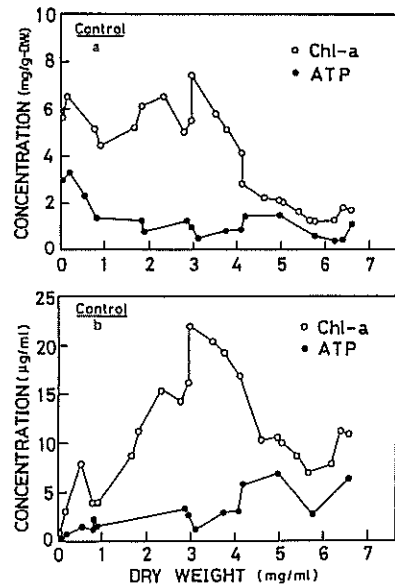


Fig. 4. Relation between dry weight and the concentration of Chl-a or ATP in algal cells (a) and in algal suspension (b) for control algae.

以上になると急速に減じた。これらの金属に対する藻類の生長速度定数に及ぼす反応は低濃度域での感受性は低く、金属種によって異なるが、閾値が存在するようである。

1.2 生理活性度に及ぼす影響

個々の藻細胞に対する化学物質の影響を細胞の生理活性度の点から、クロロフィル-a と ATP 含量で評価することを試みた。これらの指標は藻の生長相によってその含有量が変化するとと思われる。そこでコントロールに対するこれらの含有量の変化を分析した。この結果を Fig. 4 に示す。この図では横軸に藻の生長過程の時間軸の代わりに培地 1 ml 当たりの乾物重を取り、縦軸には藻の乾物重当たりおよび単位培地当たりの Chl-a と ATP 量を取った。藻が 3 mg-D.W./ml ぐらいに増殖するまでは単位重当たりの Chl-a は約 6 mg/g-D.W. でほぼ一定であるが、それ以上には藻密度が高くなると急速に減少した。ATP は 1 mg-D.W./ml までは減じるがそれ以上 5 mg-D.W./ml ぐらいまではほぼ一定であった。これにみられるようにコントロール細胞では対数生長

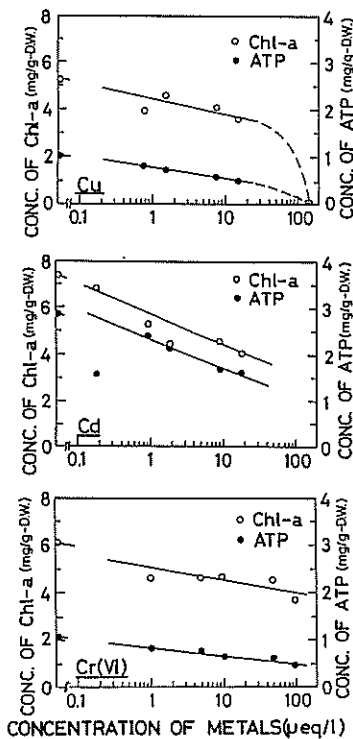


Fig. 5. The effect of Cu, Cd and Cr(VI) on the concentration of Chl-a and ATP in algal cells.

期にあっては、Chl-a や ATP 濃度はほぼ一定であるとみなせるので、これらは毒性評価の指標として有効であると考えられる。ATP が毒性評価の指標として有効であるとする報告例がある^{3),4)}。Fig. 5 に金属濃度と対数生相における藻中の Chl-a, ATP 濃度との関係を示す。重金属の対数濃度の増加とともに ATP, Chl-a 濃度は直接的に減少し、その勾配は同じであった。Cu と Cr の傾きはほぼ同じであったが、Cd の勾配は最も大きかった。この傾きは化学物質の濃度変化に対する指標の感受性を表している。

上述の試験結果から、コントロールに対する阻害率を算出した。例えば ATP 含有量の阻害率は次式で表される。

$$\text{阻害率 (\%)} = (1 - \text{ATP}(\text{tox}) / \text{ATP}(\text{C})) \times 100 \quad (3)$$

ここでは ATP (tox) は有害物質を添加したときの ATP 値で、ATP (C) はコントロールの ATP

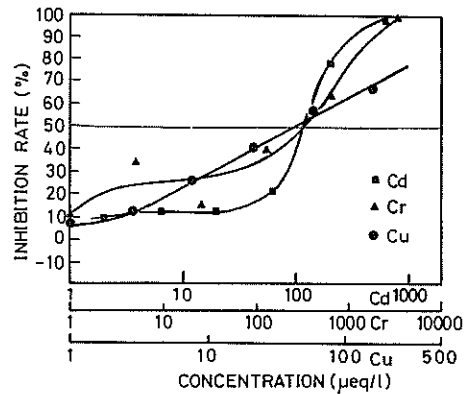


Fig. 6. Relationship between the concentration of heavy metals and the inhibition rate.

値である。こうして求められた阻害率を縦軸に、重金属濃度の対数値を横軸にプロットして、阻害率-濃度曲線から、阻害率が50%になるときの濃度 (EC_{50} 値) を求めた。Fig. 6 に生長速度係数 μ の阻害率-濃度曲線を例として示す。この EC_{50} 値は毒性の指標によって当然異なってくるものである。各種指標に対して求めた EC_{50} 値を Table 1 に示す。この表で μ -DW, μ -Chl-a, μ -ATP は、乾物重 (DW), Chl-a, ATP が藻の現存量を表すと考えて、それぞれの値の変化から求めた生長速度係数を表している。lag time は誘導期の長さ、Chl-a, ATP はそれぞれ、実験開始後の3日目、6日目の含有量から算出した EC_{50} 値を表している。これら三つの重金属の強さを化学当量で比較すると、指標によらず $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Cr(VI)}$ の順序となった。この毒性の強さの順序は一般水生生物に対する毒性の順序にも一致するものであった⁵⁾。同じ金属に対する EC_{50} 値の違いが、指標の毒性に対する感度を表すと考えると、ATP の変化量から求めた生長速度定数が一般的には感度が高いといえる。しかし、毒性試験としての測定の容易さ、データの観測誤差を考えると乾物量を濁度や細胞数で測定するのが簡便で、誤差も少ないと思われる。

2. 供試生物としての酵母の特性と有害物質の毒性

2.1 毒性試験の供試生物としての酵母の生理

Table 1. Values of EC_{50}

Chemicals		Index							
		μ -DW	μ -Chl	μ -ATP	Lag time	3rd day		6th day	
						Chl	ATP	Chl	ATP
Cu	($\mu\text{eq/l}$)	44	11	3	28	150	150	80	110
Cd	($\mu\text{eq/l}$)	80	65	100	100	400	350	200	130
Cr	($\mu\text{eq/l}$)	270	—	250	500	—	—	1000	1000
PCP	(mg/l)	—	<5	<5	5	7	6	30	55

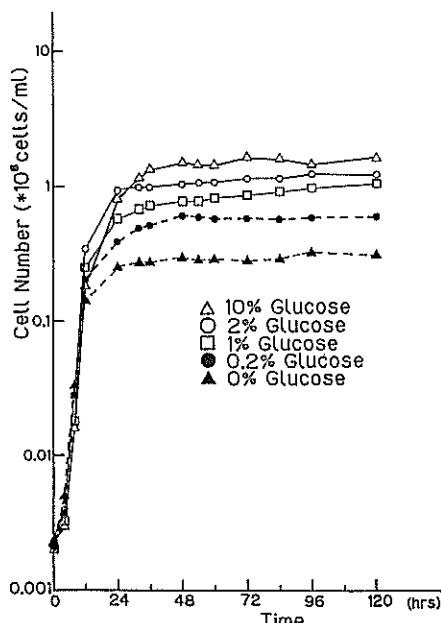


Fig. 7. Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* presented in cell number.

学的指標

毒性試験の供試材料として、バクテリア、藻類、ミジンコ、魚類、甲殻動物等が良く用いられている。酵母は藻類に比べ培養の取扱いが容易であり、またバクテリアより高等生物に近く、人に至るまでの真核生物のモデルとして位置づけられている。しかし、毒性試験の供試生物としての酵母についての研究例はまだ少ない。本章では毒性評価の指標となる酵母の生長特性、ATP濃度などについての特性について述べる。基質にはグルコースを用い、培地中の濃度を0~10%に変化させた時の酵母の生長速度係数、ATP濃度を分析

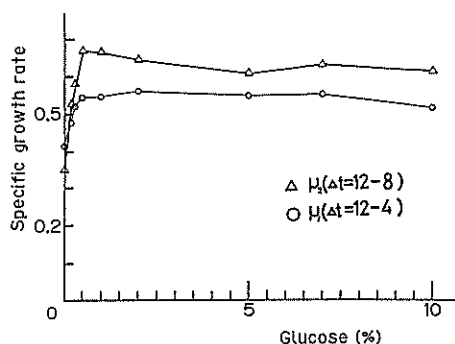


Fig. 8. Dependence of relative growth rate on glucose concentration.

し、適切な培養実験条件を決定した。

Fig. 7は培地中のグルコース濃度を変えた時の酵母の生長曲線である。生長曲線では培養開始12時間以後にグルコース濃度によって現存量の差が目立ち始めた。グルコース濃度0%でも生長がみられたのは、培地中にペプトンが含まれるためである。培養開始直後の4時間の間に生長の遅れがみられたので、それ以後の4~12時間、8~12時間のそれぞれの期間中の酵母の生長速度係数 μ (1/h)を求めた。これをFig. 8に示す。一般に生長速度と基質濃度との関係が、代表的なモデルとして次式のMonodモデルで表されるように、

$$\mu = \mu_m \cdot S / (K + S) \quad (4)$$

基質濃度が一定以上になると、生長速度は飽和する。Fig. 8から、グルコース濃度が1%以上になると μ の値はほとんど一定で安定している。このことは生長速度定数を毒性の試験の指標に用いる場合、基質濃度を必要以上に高くする必要のない

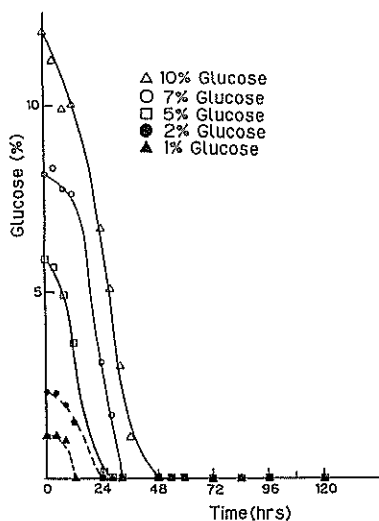


Fig. 9. Time change of glucose concentration in the medium.

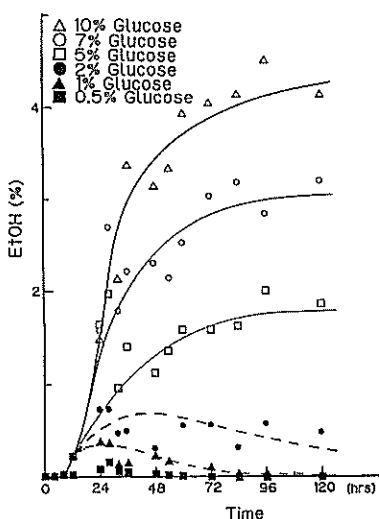


Fig. 10. Time change of ethanol concentration produced in the medium.

いことを示している。Fig. 9, 10 は培地中のグルコースおよびエタノール濃度の経時変化を表している。酵母の増殖とともにグルコース濃度は急激に減少し、12~48 時間第にはエタノールが炭素源として消費されだした。Fig. 11 は酵母細胞 1 個当たりの ATP 含有量を示している。培養開始直後の 4 時間に急激に ATP 濃度が高まり、12~

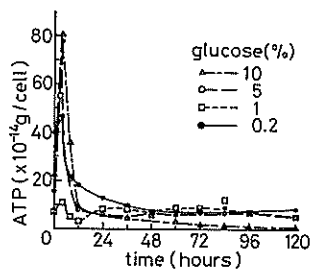


Fig. 11. Time change in ATP concentration per a yeast cell.

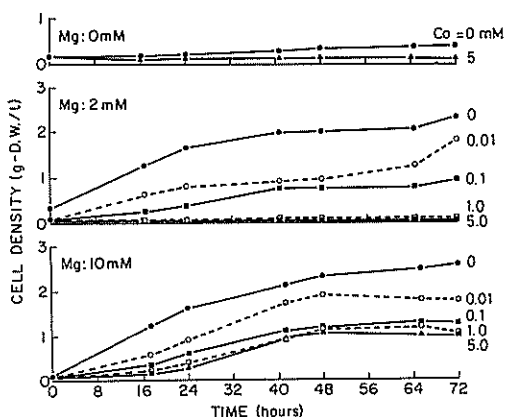


Fig. 12. Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* grown in medium I under aerobic condition.

24 時間以後はほぼ安定した濃度になった。これらの結果から、酵母を毒性試験の材料として用い、生長速度係数を指標に用いる場合には初めの 12 時間以内の最大生長速度定数を、またグルコース消費速度、エタノール生成速度あるいは ATP 含有量を指標に用いる場合は、12~24 時間間のデータから算出するのが望ましいと思われる。

3. 酵母の生長特性に及ぼす重金属の相互作用

3.1 マグネシウム-コバルトの相互作用

酵母の生長にとって有害な役割を果たす Co と、生長促進効果をもたらす Mg とを、それぞれ 0~5 mM, および 0~10 mM の範囲で、合計 15 通りの組合せの培地を作成し、これに酵母を接種し、細胞密度の時間的变化を測定した。また、Co

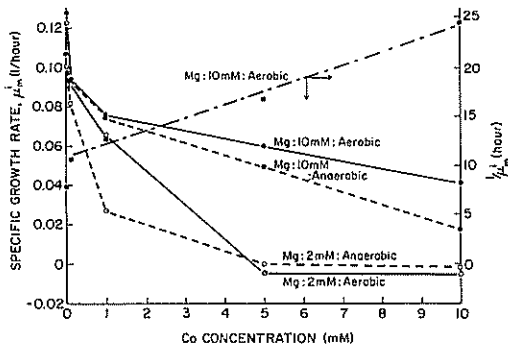


Fig. 13. Relationship between the specific growth rate and Co concentration in medium I.

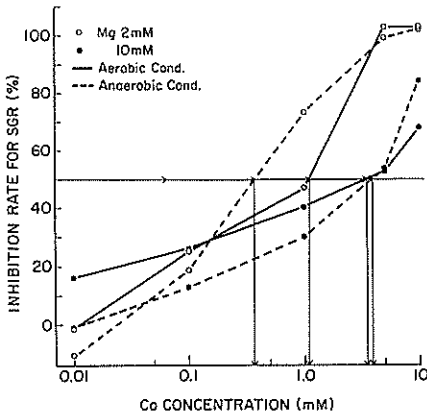


Fig. 14. Relationship between the inhibition rate for the specific growth rate and Co concentration.

を含む培地で培養した酵母懸濁液に Mg の添加時期を変えて、その後の酵母の生長回復の様子を追跡した。

Fig. 12 は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の生長曲線である。Mg を含まない培地中では酵母の生長は認められなかった。培地中の Mg 濃度の増加とともに細胞の生長が促進された。一方、Co 濃度の増加とともに細胞生長の阻害が大きくなり、Mg と Co は酵母の生長にとって明確な拮抗作用を示した。結果を解析するために、初期段階の細胞の生長は指数関数に従うとの仮定から、次式から相対生長速度係数 (μ) を求めた。

$$\mu = (\ln M_1 - \ln M_0) / T \quad (5)$$

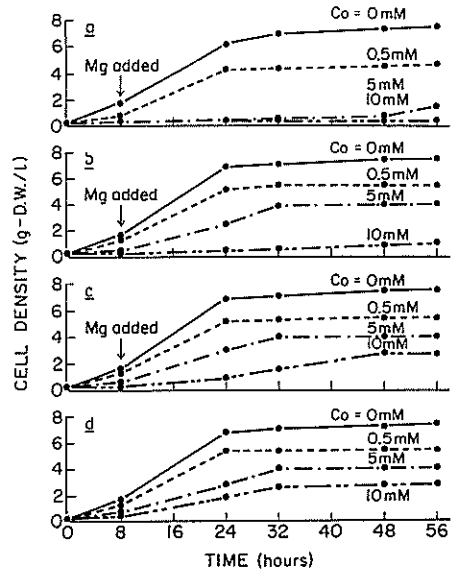


Fig. 15. Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* grown in medium II. Initial Mg concentration; a: 0 mM, b: 2 mM, c: 5 mM, d: 10 mM. Final Mg concentration is 10 mM.

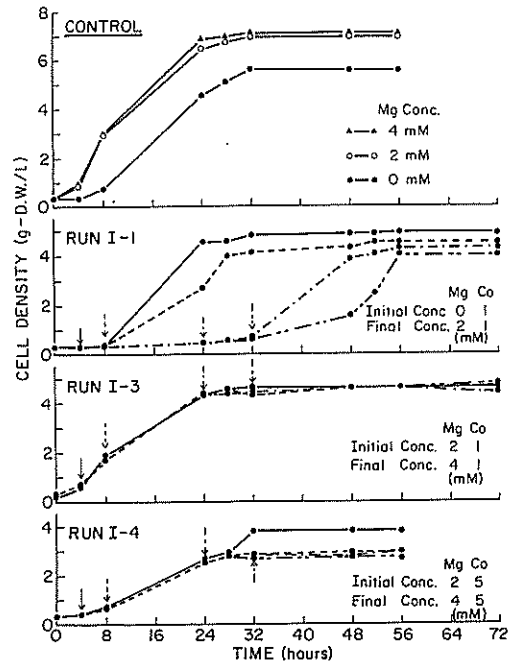


Fig. 16. Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae*. Arrows mean the time when Mg was added.

Table 2. Values of EC_{50} from inhibition rate
(a) EC_{50} from cell density after 24/48 hr.

Exp. cond.	Time			
	Mg concentration			
	2 mM		10 mM	
	24	48	24	48
Aerobic	0.11 (0.12)	0.20 (0.22)	0.22 (0.22)	1.25 (1.11)
Anaerobic	0.22 (0.23)	0.14 (0.12)	0.72 (0.59)	0.51 (0.50)

(b) EC_{50} from specific growth rate.

Exp. cond.	Mg concentration	
	2 mM	10 mM
Aerobic	1.11 (1.35)	3.50 (3.50)
Anaerobic	0.37 (0.38)	3.90 (4.0)

The values in parentheses are those calculated from the Probit Regression Line.

Table 3. Percentage repair of cell density at equilibrium from different criteria (%)

Exp. RUN	Initial conc. (mM)		Final Mg concentration (mM)								
	Mg	Co	2			5			10		
			A	B	C	A	B	C	A	B	C
II-1-1	Trace	0	96.5	100.0	100.0	97.2	100.7	100.7	100.0	100.0	100.0
1-2		0.5	102.2	95.9	69.7	94.3	92.4	67.1	86.1	86.1	62.6
1-3		5	21.2	21.1	7.5	96.5	96.5	52.1	99.5	99.5	53.7
1-4		10	92.5	10.5	3.8	31.1	10.5	3.8	11.3	11.3	4.1
II-2-1	2	0	(7.72)	103.6	103.6	100.0	103.6	103.6	100.0	100.0	100.0
2-2		0.5	(5.08)	93.9	68.2	101.9	99.8	72.5	101.7	101.7	72.8
2-3		5	(2.48)	61.7	33.3	96.5	96.5	52.1	100.0	100.0	54.0
2-4		10	(0.31)	11.3	4.1	38.7	15.7	5.7	40.7	40.7	14.8
II-3-1	5	0				(7.72)	103.6	103.6	100.0	100.0	100.0
3-2		0.5				(5.40)	99.8	72.5	100.0	100.0	72.6
3-3		5				(4.02)	100.0	54.0	100.0	100.0	54.0
3-4		10				(0.91)	33.7	12.2	100.7	100.7	36.5
II-4-1	10	0							(7.45)	100	100
4-2		0.5							(5.41)	100	72.0
4-3		5							(4.02)	100	54.0
4-4		10							(2.70)	100	36.2

Values in parentheses are cell densities used as control for each experimental group (g-D.W./L).

A: Percentage repair for the cell density corresponding to the same Co concentration of the same column,

B: Percentage repair for the cell density corresponding to the same Co concentration of the Exp. II-4,

C: Percentage repair for the cell density of RUN II-4-1.

Fig. 13 は μ の Co 濃度依存性を示すものである。一般に μ は生長阻害物質濃度 (C) の関数で表され、Novak は線形関数、指数関数、双曲線関数の三つの関数型を提案している⁶⁾。Fig. 13 からは Co の酵母の生長阻害に関しては (6) 式で与えられる双曲線的関数になると思われる。

$$\mu_m' = \mu_m K / (K + C) \quad (6)$$

Mg 濃度が 10 mM の時、 $\mu_m = 0.092/h$ 、 $K = 8.12$ mM の値が、相関係数 $r = 0.99$ で得られた。生長速度定数に対する阻害率と培地中の Co 濃度との関係を Fig. 14 に示す。Fig. 14 および培養開始 24、48 時間後の酵母細胞密度からコントロールに対する阻害率を算出し EC_{50} (50%阻害率) 値を求めた。これを Table 2 に示す。細胞密度から求めた EC_{50} 値の方が生長速度定数から求めたものよりも低かった。このことは毒性の指標として前者は後者よりも感度が高いことを示している。

Fig. 15 培養開始8時間後に Mg を添加し, Mg 添加量による酵母の生長の回復を, Fig. 16 は Mg の添加時期を 4, 8, 24, 32 時間と変化させ, Mg が添加されるまでの Co に対する暴露時間による回復の程度の差異を検討したものである。Table 3 は Fig. 15 に示した実験結果を基に, 三つの異なる実験条件を基準として, 平衡時における細胞密度の回復の百分率を示している。Fig. 17 は Mg が添加されるまでの時間と阻害率および生長速度定数との関係を示している。これらの関係から, Mg の添加は Co によって起こった生長

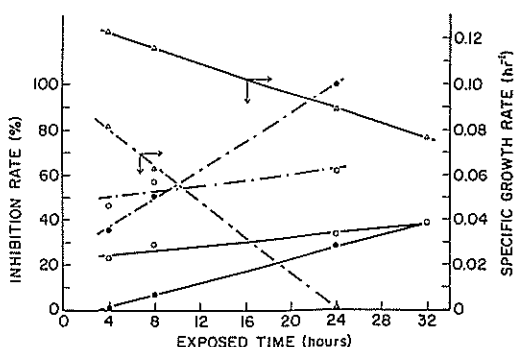


Fig. 17. Relationship between exposed time, and rates of inhibition and specific growth. — Initial concentration: Co=1 mM, Mg=0 mM; Final Mg conc.=2 mM. - - - Initial concentration: Co=5 mM, Mg=2 mM; Final Mg conc.=4 mM. \triangle Specific growth rate, \bullet Inhibition rate for specific growth rate, \circ Inhibition rate for cell density at equilibrium.

阻害の回復をもたらせ, その回復の程度は培地中の Co と Mg 両方の化学量に依存する。また, 実験を行なった Co と Mg の濃度の範囲内では, Mg が添加されるまでの時間に比例して生長速度は減少し, 阻害率は増加した。

上述の実験は Co を含む培地で, 酵母の生長過程で Mg を添加することによって, 生長の回復を調べたものである。次に Co によって生長阻害を受けた酵母細胞を Co を含まない正常な培地に移植した場合の生長回復の様子を検討した。Fig. 18 は Co を暴露中の酵母の生長曲線である。図中矢印で示された培養開始 24, 48, 96 時間後の酵母懸濁液を採取し, 細胞数が 10^6 cells/ml となるように新しい培地に移した。新鮮培地への再接種後の生長曲線を Fig. 19 に示す。グルコースは分解されてエタノールと炭酸ガスが生成する。グルコース濃度を X , エタノール濃度を y で表すと次式が得られる。

$$dX/dt = -k_1 X, \quad dy/dt = k_2 X \quad (7)$$

$$y = k_2/k_1 \cdot X_0(1 - e^{-k_1 t}) \quad (8)$$

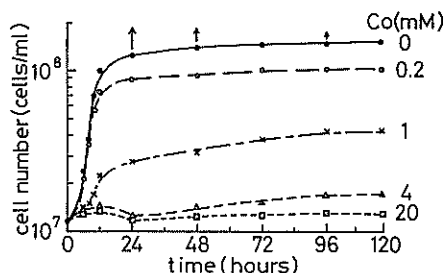


Fig. 18. Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* cultured in the medium containing Co.

Table 4. Degradation constant of glucose (k_1)

Co conc. (mM)	0	0.2	1	4	10
k_1	0.0834	0.0786	0.0365	0.0198	0.0068

Table 5. Effect of concentration and exposure time on lag time prolonged (hours)

Exposure time (hr)	Co concentration (mM)				
	0	0.2	1	4	20
24	0	0	6	12	18
48	0	0	6	18	24
96	0	0	12	18	18

化学量論的には $k_2/k_1=2.0$ となる。Co の暴露実験 (Fig. 18) において、細胞数と同時にエタノールの生成量を分析した。その結果から (8) 式を用いてグルコース分解速度 k_1 を求めた。それを Table 4 に示す。グルコース分解速度と酵母細胞の生長速度とは表裏一体をなすもので Co 濃度の増加とともにグルコース分解速度も減少した。Fig. 19 にみられるように、再接種後の酵母の回復をみると、Co 濃度が 0.2 mM 以上になると Co の濃度と暴露時間によって誘導期が長くなることがわかる。しかし 48 時間以上の暴露になると、その影響はみられなかった。コントロール

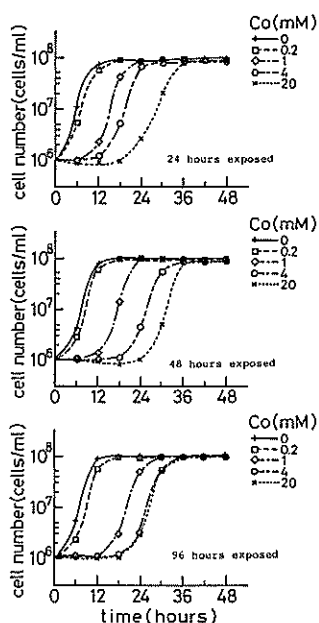


Fig. 19. Repair of cell growth after exposure to Co.

Table 6. Analysis of variance for specific growth rate

	S	f	$S=S/f$	F_0	$F(a)$
Cd	SA	5	SA = 0.206573	$F_{A0} = 37.4904$	$F_{5, 36} (0.01) = 3.57$
Cr	SB	5	SB = 0.3476	$F_{B0} = 63.0849$	$F_{5, 36} (0.01) = 3.57$
交互	SAxB	25	SAxB = 0.0115944	$F_{A0 \times B0} = 9.02438$	$F_{25, 36} (0.01) = 2.34$
残差	SE	36	SE = 1.28478 E-03 SE' = 5.51003 E-03		
計	Sr	71			

については再接種後遅滞なく生長が始まった。Co 濃度と暴露時間および誘導期の長さを Table 5 に示す。

以上の結果から Co による生長阻害の毒性作用は遺伝子に影響を与える不可逆的なものではなく、回復可能な損傷であることが明らかになった。

3.2 カドミウム-クロムの相互作用

Cd, Cr(VI) はともに有害な物質として生物に作用する。本節では培地中の Cd 濃度を 0~100 $\mu\text{eq/l}$, Cr(VI) を 0~1000 $\mu\text{eq/l}$ の範囲内で、それぞれ 6 段階の濃度の組合せのもとでの両金属の相互作用様式を二元配置による分散分析法と Stratton の方法⁷⁾および等効果線法⁸⁾によって解析することを試みた。

上に述べたのと同様な方法で生長速度定数およびその阻害率を求めた。この用量-反応曲線を Fig. 20 に示す。この図から Cd の EC_{50} 値は 11.5 $\mu\text{eq/l}$ (0.65 mg/l), Cr の EC_{50} 値は 530 $\mu\text{eq/l}$

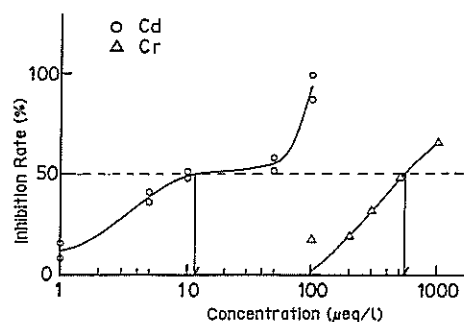


Fig. 20. Relationship between the concentration of heavy metals and the inhibition rate calculated from relative growth rate.

Table 7. Interaction of Cd and Cr on the basis of inhibition rate (%) calculated from specific growth rate by the method of Stratton

Cr $\mu\text{eq/l}$	Cd $\mu\text{eq/l}$					
	0	1	5	10	50	100
0	0.0	11.8	38.7	49.5	55.2	93.7
100	17.8	27.5	49.6	58.5	63.2	94.8
200	19.8	11.4	42.3	53.4	57.5	92.9
300	32.2	29.3	50.8	59.5	64.1	94.9
500	49.1	24.7	72.7	75.9	70.5	100.0
1000	66.7	40.2	58.4	65.8	69.6	95.7
		52.2	89.3	100.0	100.0	100.0
		73.1	100.0	100.0	100.0	100.0
		70.6	79.6	83.2	85.1	97.9
		87.4	100.0	100.0	100.0	100.0

(Upper part is expected value; lower part is observed value.)

Table 8. Interaction of Cd and Cr on the basis of inhibition rate (%) calculated from specific growth rate by the method of Stratton

Cr $\mu\text{eq/l}$	Cd $\mu\text{eq/l}$					
	0	1	5	10	50	100
0						
100		ANT	ANT	ADD	ADD	ADD
200		ANT	SYN	SYN	ADD	ADD
300		SYN	SYN	SYN	SYN	SYN
500		SYN	SYN	SYN	SYN	SYN
1000		SYN	SYN	SYN	SYN	SYN

(SYN: synergistic, ANT: antagonistic, ADD: additive.)

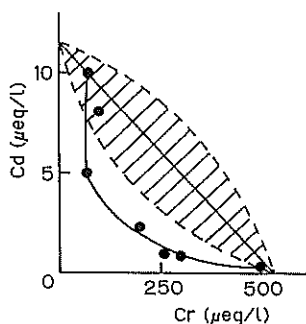


Fig. 21. Isobologram of the interaction of Cd and Cr for the inhibition rate calculated from relative growth rate.

(0.59 mg/l)であった。この図から Cr には酵母の生長阻害に対して閾値の存在することが予想され

る。Table 6 は Cd と Cr の相互作用を生長速度定数を指標として、二元配置による分散分析の結果を表している。実験の繰返しは 2 回である。表に示されているように、 $F_{A0 \times B0} > F_{\alpha}^{(0.01)}$ で、99% の信頼限界のもとに Cd と Cr の生長阻害に対して統計的に有意な相互作用が認められた。生長速度阻害率や誘導期の時間の延長についても分散分析を行なったところ同様な結果が得られた。

相互作用には相加的作用、相乗的作用、拮抗的作用の三つの様式がある。Stratton の方法は上述の三つの様式を次のような考え方で区別しようとするものである。ある毒性指標について、それを阻害率で表したとき化学物質 A の a 濃度処理で $P_a\%$ 、もう一方の化学物質 B の b 濃度処理で

$P_b\%$ の阻害率が得られた時、この両化学物質の混合処理による阻害率の予測値を $P_E\%$ とすると、 P_E は

$$P_E(\%) = P_a + P_b(100 - P_a)/100 \quad (9)$$

で表される。実測値を $P_c\%$ とすれば、 $P_c = P_E$ の時は相加的作用、 $P_c < P_E$ の時は相乗的作用、 $P_c > P_E$ の時は拮抗的作用と判断する考え方である。Table 7 に生長速度定数より算出した阻害率と (9) 式に基づく予測阻害率を示す。この結果から、それぞれの濃度の組合せによる相互作用の様式を Table 8 に示す。Cr の濃度が低く、Cd 濃度だけが高くなると相加的作用、両方ともに高濃度になると相乗的作用を示す結果となった。この方法による相互作用様式の判断は非常に簡単であるが、各物質に対する用量-反応曲線の形を全く無視しているところに問題がある⁹⁾。Fig. 21 は生長速度定数の 50% 阻害率の等効果線図を示す。図中斜線で囲まれた部分は相加的作用、これより上部が拮抗的作用、下部が相乗的作用を示す。この図からは Cr の低濃度域で相乗的作用を示し、Stratton による方法とほぼ同様な結果が得られた。

4. 結論と今後の課題

本研究は植物プランクトン (*Chlorella ellipsoidia*) と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を供試生物とする化学物質の毒性試験法に関するものである。藻類は生態学地位に関して、食物連鎖の最下位に位置する重要な微生物であり、一方、酵母は最も簡単な真核生物であるという点で、共に毒性試験の供試材料として有用であると考え。特に最近の酵母の研究の進展はめざましく、さまざまな生物学的情報が明らかにされ、その上、培養が容易であることから毒性試験の供試材料として適切なモデル微生物であると考え。

本稿では重金属を対象として、主として微生物の生長特性に与える有害物質の用量-反応関係を定量的に解析しようとした。毒性の評価の指標として、生長速度定数、細胞密度、細胞中の ATP、Chl-a、濃度、誘導期の時間などを用いた。毒性作用については、(1) 用量-反応関係、(2) 毒性の相互作用、(3) 毒性作用からの回復能、の 3 点から

研究した。*Chlorella ellipsoidia* の乾物重から求めた生長速度定数に対する Cu, Cd, Cr の EC_{50} 値はそれぞれ 44, 80, 270 $\mu\text{eq/l}$ であった。 EC_{50} 値は毒性の指標によって異なるものである。酵母を供試材料にするときの培養条件について検討した。高濃度の基質で酵母を培養すると、基質の過剰障害が起こる。1-5% のグルコース濃度が適切であった。Mg は酵母の生長を促進し、Co は阻害するという明らかな拮抗作用がみられた。Co による生長阻害を受けた酵母は培地への Mg 添加によって、また、Co を含まない新しい培地へ移植することによっても生長が回復した。この回復の程度は Co と Mg の濃度や、Co による暴露時間に依存することが分かった。2 種の化学物質の相互作用の様式を判断するのに分散分析、Stratton の方法および等効果線法が用いられた。それらの方法によると、全般的には Cd と Cr は酵母の生長阻害に相乗作用を示した。

生物を毒性試験の供試材料として用いるとき、一般的には生長速度定数を評価指標とするが、金属種あるいは一般化学物質種によって生物に及ぼす毒性作用機構も異なると推量されるので、どのような生物学的現象を毒性の指標としてとりあげるのが適切であるかは、作用機構と感受性、および生態毒理学的な視点からの評価基準を加味して検討することが必要である。

参考文献

- 1) 青山勲: 毒性物質の評価モデル. 水質汚濁研究, 9 (10) (1986) 印刷中.
- 2) Aoyama, I. and Okamura, H.: Toxicity Evaluation of Heavy Metals in Phytoplankton. 433-444, in Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems (ed. D. Liu & B. J. Dutka) Marcell Dekker, Inc. (1984).
- 3) Pridmore, R. D. and Hewitt, J. E.: ATP as a Short Term Bioassay Response Parameter for Nitrogen Deficiency in Algae. *Water Research*, 17(9), 1189-1192 (1983).
- 4) Din, Z. B. and Brooks, J. M.: Use of Adenylate Energy Charge as a Physiological Indicator in Toxicity Experiments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 1-8 (1986).
- 5) 板沢靖男, 小山次朗: 生産科学シリーズ水生生物と重金属 (2) カドミウム, サイエントリスト社, p. 192 (1982).

- 6) Novak, M., Stehaino, P., Moreno, M. and Goma, G.: Alcoholic Fermentation: On the Inhibitory Effect of Ethanol. *Biotech. Bioeng.*, **23**, 201-211 (1981).
- 7) Stratton, G. W., and Corke, C. T.: Toxicity of the Insecticide Permethrin and Some Degradation Products towards Algae and Cyanobacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**, 297-303 (1983).
- 8) Morse, P. M.: Some Comments on the Assessment of Joint Action in Herbicide Mixtures. *Weed Science*, **26**(1), 58-71 (1978).