

枯草菌 rec-assay による DNA と非 DNA 損傷性物質 の複合効果に関する研究

Analysis of the complex effect of DNA damaging and non-DNA
damaging substances by the *Bacillus subtilis* liquid rec-assay

- 代表研究者 京都大学工学部附属環境微量汚染制御実験施設教授 松井 三郎
Prof., Lab. for Control of Environmental Micropollutants
Saburo MATSUI
- 協同研究者 大阪大学医学部遺伝学教室教授 吉川 寛
Prof., Medical School, Dept. of Genetics
Hiroshi YOSHIKAWA
- 京都大学工学部附属環境微量汚染制御実験施設助手 山田 春美
Res. Assoc., Lab. for Control of Environmental Micropollutants
Harumi YAMADA

The *Bacillus subtilis*/microsome rec-assay method can give information on both DNA-damaging toxicity and non-DNA-damaging toxicity. When this method was used to test the complex effect of a heavy metal Cr^{+6} and another heavy metal HgCl_2 , there was no complex effect such as synergistic nor additional toxicity in respect to DNA-damaging, although Cr^{+6} indicated strong DNA-damaging and HgCl_2 indicated non-DNA-damaging toxicity. This result shows the independence rule of DNA-damaging and non-DNA-damaging toxicity with the two substances. When the method was used to test the complex effect of two DNA-damaging substances such as Mitomycin-C and Cr^{+6} , the additional effect was observed. This study consisted of theoretical and experimental approaches. In the experiments, formaldehyde as a DNA-damaging substance and propionaldehyde as a non-DNA-damaging substance were used to support the theoretical approach. Analysis of DNA-toxicity for the results of the *Bacillus subtilis*/microsome rec-assay employs the probit theory and the target theory. The probit theory gives information on positive or negative and strength of DNA-damaging of a test substance. The target theory gives not only the similar information as those of the probit theory but also the number of hits which indicate a mechanism of DNA damage caused by a test substance.

The target and hit equation of rec+ for formaldehyde can be given in the following way, taking the number of hit to be two.

$$S^+ = F_t^+(X_f) = \{\exp(-k_1 X_f)\} (1 + k_1 X_f) \quad (1)$$

where X_f is concentration of formaldehyde, and k_1 is the hit conversion coefficient of formaldehyde ($= 0.6106 \times 10^{-1}$). The target and hit equation of rec+ for propionaldehyde can be given in the following way, taking the number of hit to be one.

$$S^+ = F_p^+(X_p) = \exp(-k_2 X_p) \quad (2)$$

where X_p is concentration of propionaldehyde, and k_2 is the hit conversion coefficient of propionaldehyde ($= 0.8365 \times 10^{-3}$).

The target and hit equation of rec- for formaldehyde can be given in the following way, taking the number of hit to be one.

$$S^- = F_f^-(X_f) = \exp(-k_3 X_f) \quad (3)$$

where X_f is concentration of formaldehyde, and k_3 is the hit conversion coefficient of formaldehyde ($= 0.4868 \times 10^{-1}$). The target and hit equation of rec- for propionaldehyde can be given in the following way, taking the number of hit to be one.

$$S^- = F_p^-(X_p) = \exp(-k_4 X_p) \quad (4)$$

where X_p is concentration of propionaldehyde, and k_4 is the hit conversion coefficient of propionaldehyde ($=0.1040 \times 10^{-2}$).

If the toxicity of formaldehyde is independent from the toxicity of propionaldehyde, the combined effect of toxicity for rec+ and rec- can be given respectively in the following equation (5) derived from Eq. (1) and (2), and equation (6) derived from Eq. (3) and (4).

$$S^+ = F_f^+(X_f) \cdot F_p^+(X_p) \quad (5)$$

$$S^- = F_f^-(X_f) \cdot F_p^-(X_p) \quad (6)$$

Experimental results well coincided with values obtained from the above two theoretical equations, which assured the independence rule of toxicity of DNA-damaging and non-DNA-damaging.

The influence of non-DNA-damaging toxicity on the evaluation of DNA-damaging toxicity was theoretically analyzed. If the concentration of non-DNA-damaging substance is greater than that of DNA-damaging substance, there is an influence of non-DNA-damaging toxicity on the DNA-damaging toxicity by making the DNA-damaging toxicity. This finding is very important to test environmental samples on DNA-damaging toxicity by the *Bacillus subtilis*/microsome rec-assay method. Those samples contained many substances with different concentrations. If the preparation of test samples for the rec-assay is improper, the result may lead false judgement.

研究目的

枯草菌 rec-assay は *Bacillus subtilis* の組替え修復遺伝子 recE 欠損株 (rec-) と野性株 (rec+) を用いて、発癌物質、重金属、染料物質、有機ハロゲン物質、アルデヒド類など広い範囲の DNA 損傷性物質を検出する方法である。この方法は、rec- 株と rec+ 株の試験物質や試料に対する致死感受性差を検出し DNA 損傷性を評価することを原理としている。したがって rec- と rec+ の試験物質濃度対生存率曲線の関係を解析することで、DNA 損傷性と非 DNA 損傷性の毒性が同時に評価できることになる。そこで、DNA 損傷性物質と非 DNA 損傷性物質を組み合わせた場合、それらの複合効果がどのように表せるかを研究することが本研究の目的である。

研究経過

既に行った研究で、DNA 損傷性のある 6 価クロムと DNA 損傷性のない塩化第二水銀を組み合わせた実験では、複合効果 (相乗あるいは相加効果) は見られず。非 DNA 損傷性の枯草菌細胞毒性 (生存率) と DNA 損傷性の枯草菌細胞毒性 (生存率) は独立した機構であることが確かめられた。またともに代表的 DNA 損傷性のマイトマイシン C と 6 価クロムを組み合わせた実験では、DNA 損傷性において相加効果が認められた (生存率曲線の試験物質濃度に対応する平行移動)。

しかしこれらの結果は、予備的検討に終わっていた。そこで本研究では、DNA 損傷性のある Formaldehyde と DNA 損傷性のない Propionaldehyde を組み合わせた場合の複合効果を、実験と理論より解明することにした。Formaldehyde は、発癌性の強い疑いがもたれている物質であり、特に室内空気汚染との関係で規制がなされている。最近水環境では、水道水のオゾン消毒が塩素消毒と比較して関心がもたれ、オゾン処理によって Formaldehyde が生成されることが分かって研究が必要となっている物質である。一方、同様に Propionaldehyde もオゾン処理により生成するが DNA 損傷性は認められず、また発癌性についても報告がない物質である。

研究成果

1) 複合効果の実験

実験群 F0 (Formaldehyde 単独投与), F1 (Formaldehyde+Propionaldehyde の 300 ppm 添加), F2 (Formaldehyde+Propionaldehyde の 900 ppm 添加) F3 (Formaldehyde+Propionaldehyde の 1800 ppm 添加), P (Propionaldehyde 単独投与) を準備した。その結果が表 1 (各実験におけるプロビット理論および標的論による解析結果) である。プロビット理論は DNA 損傷性の有無と強さが判定できる。標的論により DNA 損傷性の有無、強さに加えて試験物

表 1. 各実験におけるプロビット理論及び標的論による解析結果.

実験	Hits		RS (%)	S-probit	URS (%/mg/l)	Rec-gram	DNA 損傷性
	Rec ⁺	Rec ⁻					
F ₀	2	1	27.53	0.538	5.00	1.40	+
F ₁	1	1	33.55	1.088	6.29	3.32	+
F ₂	2	2	26.31	0.532	3.80	1.29	+
F ₃	1	4	10.95	0.062	1.42	1.27 × 10 ⁻¹	-
P	1	1	7.96	0.148	2.37 × 10 ⁻²	1.54 × 10 ⁻¹	-

* F₀: Formaldehyde 単独の実験
 F₁: Propionaldehyde 300 ppm 添加時の実験
 F₂: Propionaldehyde 900 ppm 添加時の実験
 F₃: Propionaldehyde 1800 ppm 添加時の実験
 P: Propionaldehyde 単独の実験

質の DNA 損傷機構が何ヒット性か解析できて、ヒット数の小さいもの (1~2 ヒット) は DNA 損傷性の強い物質に多く、ヒット数の大きいもの (4~5 ヒット) は DNA 損傷性に加えて他の細胞組織毒性をもつ傾向が認められている。実験結果に基づいて Formaldehyde の濃度差の要因 (A) と Propionaldehyde の濃度差の要因 (B) について二元配置法を用いて分散分析を行った。rec⁺では有意水準 5% でどの曲線にも有意差がないと判断でき、rec⁻では有意水準 5%, 1% とともに有意差があった。しかし rec⁻でどの曲線間に有意差があるか調べたところ、F₀ と F₁, F₀ と F₂ について 1% 有意水準で有意性がないことが分かった。したがって、Propionaldehyde 単独投与群をコントロールとした場合の Formaldehyde の生存率曲線は、rec⁺ と rec⁻ とともに Propionaldehyde を投与していない実験群 F₀ の生存率曲線とほぼ一致していると判断できる。このことから Propionaldehyde の致死効果は Formaldehyde の致死効果とは独立して起きていることが確かめられた。

2) 実験値と理論値の比較

標的論を利用して理論値を求め、実験結果と照合する。Formaldehyde を投与した時の rec⁺ 生存率曲線は、2 ヒットであるので、次式になる。

$$S^+ = F_1^+(X_f) = \{ \exp(-k_1 X_f) \} (1 + k_1 X_f) \quad (1)$$

ただし、X_f: Formaldehyde 濃度、k₁: Formaldehyde (rec⁺) のヒット換算係数 (= 0.6106 ×

表 2. Propionaldehyde 単独に作用させた場合の生存率.

	(ppm)		
	300	900	1800
Rec ⁺	0.778	0.471	0.222
Rec ⁻	0.732	0.392	0.154

10⁻¹)。Propionaldehyde を投与した時の rec⁺ 生存率曲線は、1 ヒットであるので、次式になる。

$$S^+ = F_p^+(X_p) = \exp(-k_2 X_p) \quad (2)$$

ただし、X_p: Propionaldehyde 濃度、k₂: Propionaldehyde (rec⁺) のヒット換算係数 (= 0.8365 × 10⁻³)。同様にして Formaldehyde を投与した時の rec⁻ 生存率曲線は、1 ヒットであるので、次式になる。

$$S^- = F_f^-(X_f) = \exp(-k_3 X_f) \quad (3)$$

ただし、k₃: Formaldehyde (rec⁻) のヒット換算係数 (= 0.4868 × 10⁻¹)。Propionaldehyde を投与した時の rec⁻ 生存率曲線は、1 ヒットであるので、次式になる。

$$S^- = F_p^-(X_p) = \exp(-k_4 X_p) \quad (4)$$

ただし、k₄: Propionaldehyde (rec⁻) のヒット換算係数 (= 0.1040 × 10⁻¹)。Propionaldehyde 単独に作用させた時の理論生存率をもとめるには、式 (2) (4) に Propionaldehyde の濃度を代入して生存率を求めると表 2 (Propionaldehyde 単独に作用させた場合の生存率) になる。そして Formaldehyde による致死ヒットと Propionaldehyde

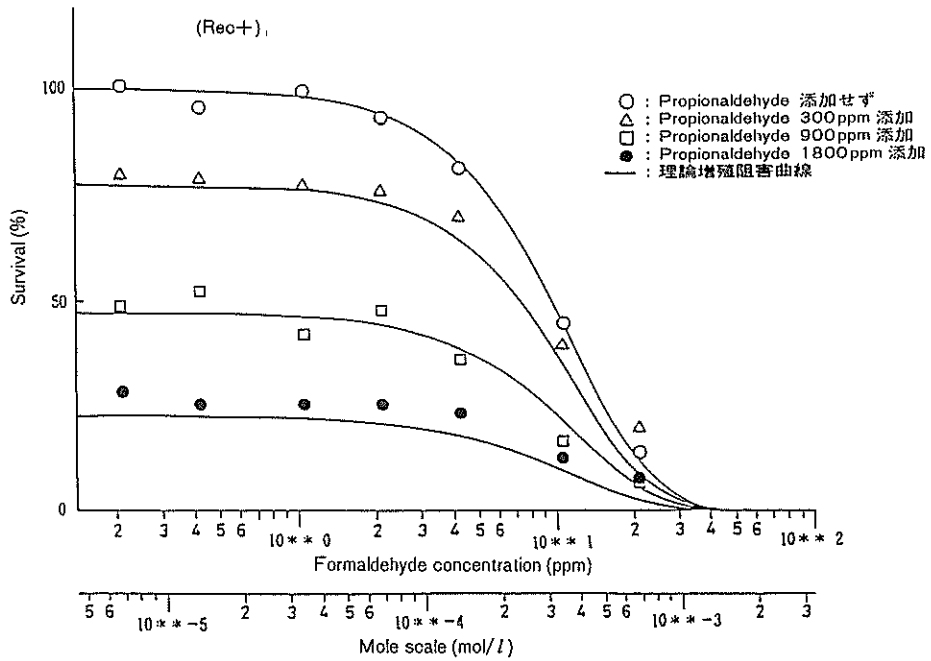


図1. Propionaldehyde 添加時の Formaldehyde 理論曲線と実験値の比較 (Rec⁺).

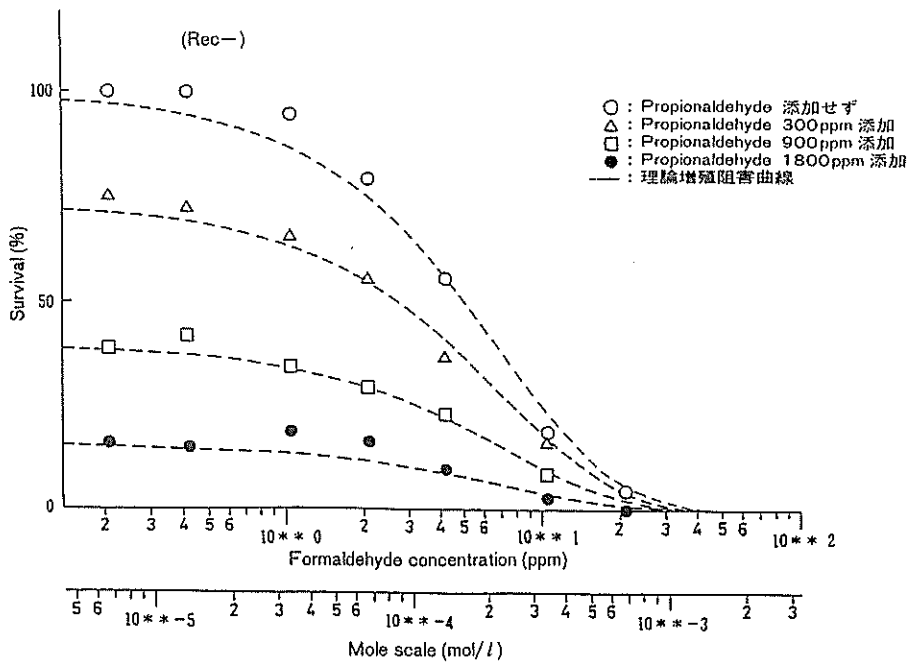


図2. Propionaldehyde 添加時の Formaldehyde 理論曲線と実験値の比較 (Rec⁻).

による致死ヒットが独立的な事象で起こる確率と考えると、Formaldehyde と Propionaldehyde の組合せ混合液中での rec+ 生存率 S^+ は、式 (1) と (2) を組み合わせて、

$$S^+ = F_1^+(X_f) \cdot F_p^+(X_p) \quad (5)$$

と表せる。rec- も同様に生存率 S^- は、式 (3) と (4) を組み合わせて

$$S^- = F_1^-(X_f) \cdot F_p^-(X_p) \quad (6)$$

となる。この式 (5) と (6) に表 2 の値を代入して計算すると理論生存曲線が描ける。図 1 に rec+ の Formaldehyde と Propionaldehyde の組合せ理論生存率曲線と実験値、図 2 に rec- の同様の理論生存率曲線と実験値を示した。理論値と実験値の良好な一致が見られた。図 1 と図 2 を見比べると、生存率曲線がこの Propionaldehyde 添加濃度を増すにつれ全体として、縦軸方向に圧縮され横軸の移動が見られないので、Propionaldehyde の致死効果と Formaldehyde の致死効果が独立したものであると証明できる。この証明は重要であると考えられる。

3) 理論的考察

DNA 損傷性物質による毒性と非 DNA 損傷性

物質による毒性が複合し、非 DNA 損傷性の毒性が強くて DNA 損傷性の毒性を見掛け上弱くする現象について検討を加えた。まず考え方として 2 種類の物質の混合比率を変えて、標的論を利用して、(1) 生存率曲線のに与える影響を検討した。次に (2) DNA 損傷性の別の評価指標である RS (修復可能生存率) に与える影響を検討した。

(1) 生存率曲線に与える影響: Formaldehyde の濃度 X_f と Propionaldehyde 濃度 X_p の関係を次式のように設定する。

$$X_p = aX_f \quad (7)$$

ただし a : 混合比 (定数)。rec+ 生存率 S^+ は、式 (5), (7) を組み合わせて次式となり、

$$S^+ = F_1^+(X_f) \cdot F_p^+(aX_f) \quad (8)$$

さらに式 (1) と (2) から、

$$\begin{aligned} S^+ &= \exp(-k_2 a X_f) \{ \exp(-k_1 X_f) \} \\ &\quad \times (1 + k_1 X_f) \\ &= \exp\{-(k_1 + k_2 a) X_f\} (1 + k_1 X_f) \quad (9) \end{aligned}$$

rec- も同様に生存率 S^- は、式 (6) と (7) を組み合わせて、

$$S^- = F_1^-(X_f) \cdot F_p^-(aX_f) \quad (10)$$

$$S^- = \exp\{-(k_3 + k_4 a) X_f\} \quad (11)$$

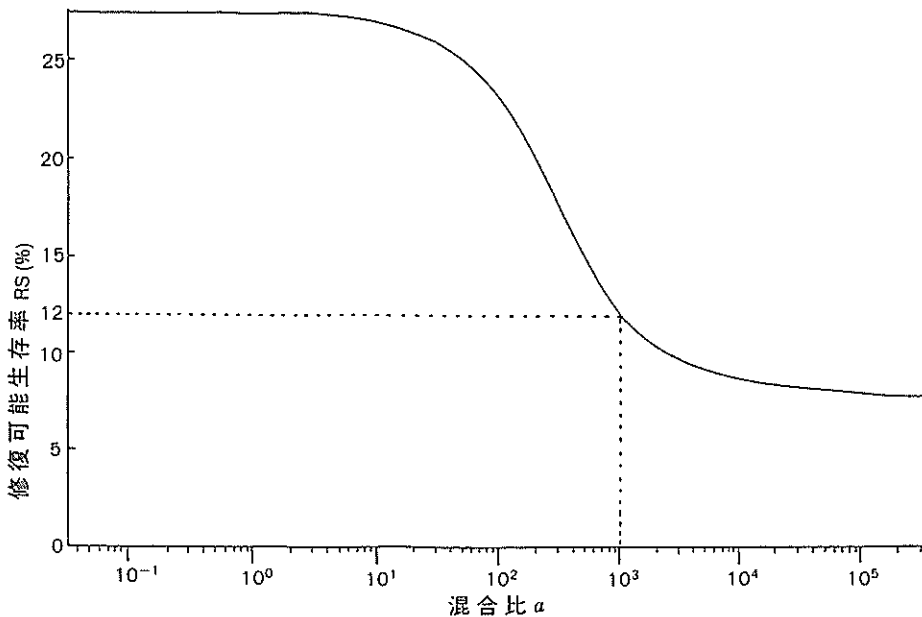


図 3. Formaldehyde X_f と Propionaldehyde X_p の混合割合 a を変化させた時の RS と a の関係。

となる。これらの理論式から混合比 a を変えて生存率曲線を描くと、混合比 a の値が大きいくほど $\text{rec}+$ 生存率曲線と $\text{rec}-$ の生存率曲線の差が小さくなって、非 DNA 損傷性物質による毒性が DNA 損傷性物質による毒性を隠してしまうことが分かった。このことは、多数の毒性物質が共存するような環境試料を取り扱う時に十分な注意が必要であることを示している。

(2) RS (修復可能生存率) に与える影響: RS (修復可能生存率) は、標的論モデルにおいて $\text{rec}-$ に平均致死ヒットを生じさせる試料濃度で、 $\text{rec}+$ と $\text{rec}-$ 生存率曲線の生存率差を意味する。もし $\text{rec}-$ 生存率曲線が 1 ヒットモデルであれば、 $\text{rec}-$ の生存率が 36.79% の時の濃度が平均致死濃度で、その濃度における $\text{rec}+$ と $\text{rec}-$ 生存率曲線の生存率差が、RS (修復可能生存率) となる。RS (修復可能生存率) は次のように求められる。

式 (10) の両辺の対数を取って、

$$\ln S^- = -(k_3 + k_4 a) X_f \quad (12)$$

$$X_f = -\ln S^- / (k_3 + k_4 a) \quad (13)$$

式 (13) と (9) に代入して、

$$S^+ = \exp \{ (k_1 + k_2 a) \ln S^- / (k_3 + k_4 a) \} \\ \times \{ 1 - k_1 \ln S^- / (k_3 + k_4 a) \} \quad (14)$$

$$RS = S^+ - S^- \\ = \exp \{ (k_1 + k_2 a) \ln S^- / (k_3 + k_4 a) \} \\ \times \{ 1 - k_1 \ln S^- / (k_3 + k_4 a) \} - S^- \quad (15)$$

ただし $S^- = 0.3679$ である。図 3 に Formaldehyde の濃度 X_f と Propionaldehyde 濃度 X_p の混合割合 a を変化させた時の RS と a の関係を表す。混合比 a が約 1000 倍で DNA 損傷性が陽性判定より陰性判定になることを示している。最も Propionaldehyde 濃度が Formaldehyde の濃度 1000 倍でそのような判定になるが、50% 致死濃度で比較すると Propionaldehyde 濃度は Form-

aldehyde 濃度の約 100 倍である。そのため実験結果に誤った判断が入ることが避けられている。しかし、Propionaldehyde と比較してより強い非 DNA 損傷性が混合される場合、十分な注意が必要である。

今後の課題と発展

正確な実験データを獲得することに大変時間と労力がかかり、予定していた実験内容をすべて遂行できなかった。しかし、DNA 損傷性物質と非 DNA 損傷性物質を組み合わせた場合、それらの複合効果が基本的に標的論でうまく表せることが出来た。標的論に基づく理論と実験により、DNA 損傷性物質と非 DNA 損傷性物質を組み合わせた毒性は、それぞれが互に独立であることが証明できた。このことは環境汚染を考える場合大変重要な意味をもっている。また枯草菌 rec -assay による環境試料中の DNA 損傷性物質を検出評価する場合、共存する物質の影響が出る可能性を理論と実験により証明した。多数の毒性物質が共存する環境試料の取扱について今後、試料中の物質の分離濃縮を含めて検討研究が必要である。今後の予定として DNA 損傷性物質同士の組合せを含めた理論と実験を行い、また組合せ物質数を増加させた場合について、理論的考察を発展させる。

発表論文

- 1) "The *Bacillus subtilis*/Microsome Rec-Assay for the Detection of DNA-damaging Substances in Waters of Night Soil Treatment Plant". *Toxicity Assessment*, 3, 173-193 (1988).
- 2) "The *Bacillus subtilis*/Microsome Rec-Assay for the Detection of DNA-damaging Substances Which May Occur in Chlorinated and Ozonated Waters". *Water Sci. Tech.*, 21, Brighton, 875-887 (1989).
- 3) 液体 Rec-assay に基づく環境変異原の自動測定評価装置の開発, 学術月報, 41, No. 5 (1988).