

新殺貝剤 2,5-dichloro-4-bromophenol(B-2) の安全性の検討

Maria Mihoko Yamamoto, 春日 徳彦

近年環境汚染物質、食品添加物などの発癌性が厳しく評価されるようになってきた。強い発癌性を有する物質は、短期間の動物投与で比較的容易にその発癌性を証明することができる。しかし発癌性が弱い物質では、場合によると何代にもわたる投与が必要であり、発癌性の有無の証明は時間的、経済的に極めて困難である。そのため、細菌の特殊な変異株を用い、被検物質が DNA に損傷を与えるかどうか¹⁾、あるいは突然変異誘発能を有するかどうか²⁾によって、その物質の発癌性をスクリーニングする方法が注目されるようになった。DNA 損傷能あるいは変異原性と発癌性との直接的な関連については議論のあるところだが、少なくともこのような方法でスクリーニングされた物質は DNA に対する親和性が強いので、ほとんどの発癌物質はこの中に含まれると考えてよい。その観点からみれば、細菌を用いる方法は時間的、経済的に有用なスクリーニングの手段である。

山梨県で日本住血吸虫の中間宿主、ミヤイリガイの殺貝剤として用いられてきたユリミン (3, 5-dibromo-4-hydroxy-4'-nitroazobenzene) が製造中止となるため、それに代る薬剤の開発が急がれていた。実験室内のスクリーニングテストで比較的高い殺貝効果を示した薬剤、および既に殺貝効果の高いことは報告されているが実用化されていない薬剤について、野外実験が実施された。同時にラット、マウスに対する急性毒性、魚毒性、経済性および使用形態なども比較検討された。その結果からユリミンに代る殺貝剤として、B-2 がもっとも実用化可能な薬剤であると結論された³⁾。

殺貝剤は常時ではないにしても、一時的にかなり多量に撒布されるものであるから、その土壌および作物残留性、また安全性についての検討は厳密になされなければならない。前者については既に報告されている⁴⁾ので、本報では細菌を用い、Rec-assay によって B-2 の安全性を検討した。

材料と方法

Rec-assay *E. coli* K-12 AB 1157 およびその *recA* 変異株である AB 2463⁵⁾ を用いた。これらの株は群馬大学微生物学教室を通じて分与を受けた。*recA* は *ligase* の産生遺伝子であるので、これを欠く AB 2463 は Recombination ができない。また DNA の損傷を修復できないので、UV 照射など DNA に損傷を与え

る要因に非常に高い感受性を示す。つまり正常な菌ならば修復可能な DNA の損傷も、この株では致死的な結果となる。したがって DNA に損傷を与える薬剤を、AB 2463 および AB 1157 に対する増殖阻止濃度、あるいは殺菌濃度の差によって選び出すことができる。通常の Rec-assay では AB 1157 と AB 2463 をそれぞれ平板に塗抹し、その上に検査しようとする薬剤をしませた濾紙の disc を置く。培養後生じた増殖阻止円の直径を比較し、同濃度で AB 2463 の阻止円が大きければ、その薬剤は DNA に損傷を与えていると考える。しかし一般に薬剤の効果は液体培地中の方が強いので、本報では薬剤を加えた Penassay broth 中での菌の増殖を、37°C で振盪培養しながら 630 nm の吸光度を測定することによって Rec-assay をおこなった。

突然変異誘発能 1.25~20.0 $\mu\text{g/ml}$ の B-2 とナリジキシン酸 25 $\mu\text{g/ml}$ を加えたハートインフュージョン寒天培地を用いた。十分に増殖した菌液から遠心によって集菌し、菌密度が10倍になるように Penassay broth に浮遊し、その 0.1 ml を寒天平板に塗抹した。同時に菌数計算もおこなった。37°C で 2 日培養し、生じたナリジキシン酸耐性の集落を数えた。突然変異率は 2 枚の平板の平均から求めた。

殺菌作用 B-2 を加えた Penassay broth または生理的食塩水に菌を接種し、37°C で振盪培養しながら、30 分ごとに 0.1 ml ずつをとった。生理的食塩水で適当に希釈し、その 0.1 ml を普通寒天平板に塗抹して菌数計算をした。

B-2 は日本化学工業株式会社より供与をうけた。

結 果

液体培地中で Rec-assay をおこなった場合、DNA に損傷を与える薬剤ではどのような結果が得られるかを、パンフラン S を例として図 1 に示した。

AB 1157 は 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではかなりの増殖がみられ、完全に増殖が抑制されるのは 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度である。一方 AB 2463 は 0.01 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも増殖が抑制される。AB 1157 が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で抑制されるのと同程度に AB 2463 が抑制される濃度は 0.01~0.001 $\mu\text{g/ml}$ の間で、ほぼ 0.005~0.003 $\mu\text{g/ml}$ とみてよい。この結果から AB 2463 は AB 1157 より、約 20~30 倍パンフラン S に対して感受性が高いことがわかる。

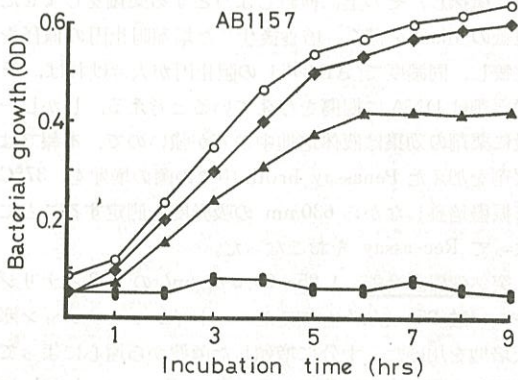
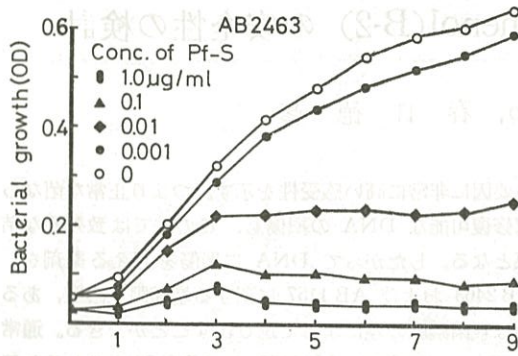


図 1

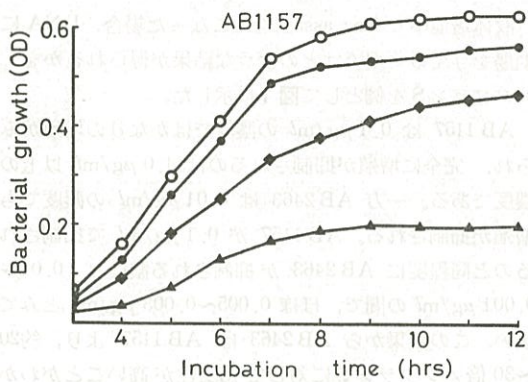
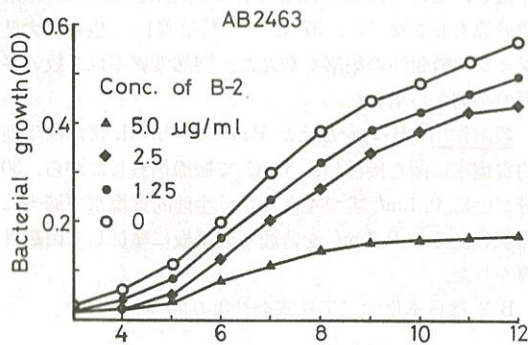


図 2

B-2 のナトリウム塩を用いて同様の実験をおこなった (図 2)。図には示さなかったが、 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度では AB 1157, AB 2463 とともに完全に増殖が抑制された。 $5 \mu\text{g/ml}$ 以下では増殖がみられたが、B-2 の各濃度での増殖抑制の程度は両菌株で差がなかった。ナトリウム塩でない B-2 でもまったく同じ結果が得られた。

この結果からは B-2 は DNA に損傷を与えない薬剤であり、突然変異原性もないと考えられるが、確認のため実験をおこなった。図 3 は寒天平板中に加えた B-2 が菌のナリジキシン酸耐性への突然変異率に影響を与えるかどうかをみた結果である。 $20 \mu\text{g/ml}$ の B-2 は、寒天平板上でも菌の増殖を完全に抑制するので、耐性変異株は得られなかった。 $1.25 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の B-2 濃度での変異率は B-2 を加えない対照平板での変異率とほぼ同じであった。

最後に Penassay broth 中での B-2 の殺菌作用をみた (図 4)。 $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で B-2 は強い殺菌力を示し、両菌株とも 30 分以内に菌数が急激に低下した。 $10 \mu\text{g/ml}$ では AB 1157 には殺菌作用はみられなかったが、AB 2463 に対しては $50 \mu\text{g/ml}$ とほぼ同様の殺菌力を示した。AB 2463 では $5 \mu\text{g/ml}$ でも約 50% の菌数の低下がみられた。

0.85% NaCl 溶液中では、B-2 の殺菌力は Penassay broth 中よりやや強かったが、全体の傾向はまったく同様であった。

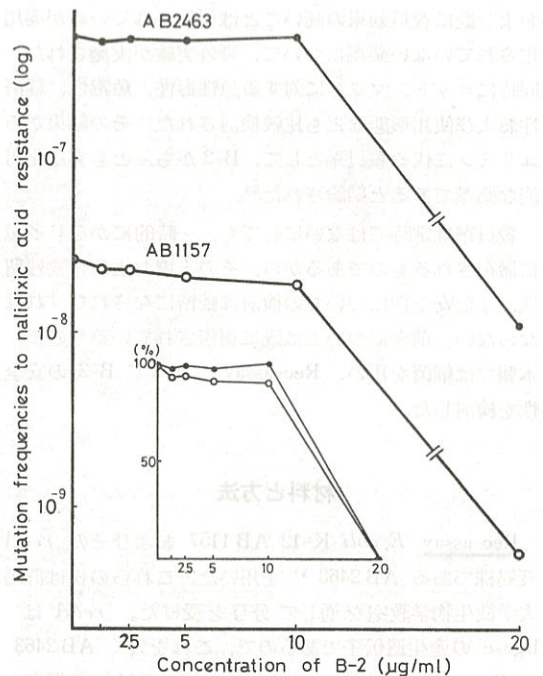


図 3

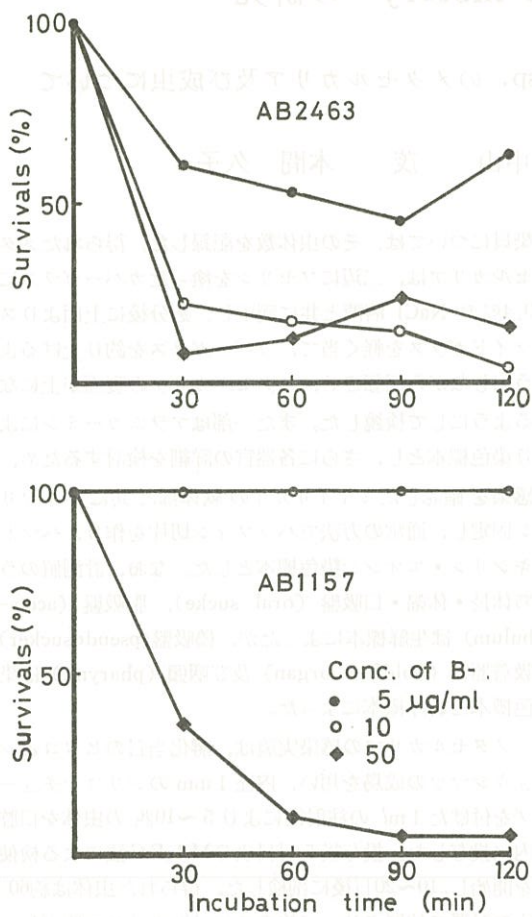


図 4

考 察

梶原ら³⁾によれば、5 g/m²の散布量でおこなった野外試験での B-2 の殺菌効果はニコロサマイド、ユリミンにつき、有効成分量に換算して LD₅₀ を比較するとユリミン、ニコロサマイドについて高いという。B-2 の毒性をみると、マウスの急性経口毒性は LD₅₀ が 1,900 mg/kg でニコロサマイドの 2,000 mg/kg とほぼ同じだが、ユリミンの 168 mg/kg よりははるかに低い。コイとヒメダカに対する魚毒性をユリミンと比較すると、ユリミンの 48 TLm はそれぞれ 0.16, 0.20 ppm であるのに対し、B-2 のそれは 1.31, 0.58 ppm であって B-2 の方が低い。いうまでもないが、この魚毒性が低いことは殺菌剤として非常に重要な条件である。

B-2 の水中での消長試験では、薬剤投下後 2 時間で投下量の 60% が消失したが⁴⁾、土壌中では初濃度 50 ppm の半減期は 19 日、100 ppm の半減期は約 1 ヶ月であるという⁶⁾。このことは散布量、散布回数に留意すれば、殺菌効果を十分に期待できる B-2 濃度を土壌中に保つのは容易であることを意味する。

作物への移行は、4 回散布区で収穫された玄米で 0.005 ppm 以下であった⁴⁾。この数値は現在規制されている玄米中の有機塩素系農薬、BHC, DDT の 0.2 ppm を下回っていて、食品の安全性という観点からは一応評価できるものである。

以上を要約すると、B-2 は殺菌力でややユリミンに劣るが、散布方法を考慮すれば十分な殺菌効果を期待でき、毒性はユリミンより低い薬剤である。

さらに B-2 は Rec-assay によって DNA に損傷を与えず、またナリジキシン酸耐性への突然変異率にも影響を与えないことが明らかとなった。今回の実験で AB 1157 と AB 2463 で異なる結果が得られたのは、図 4 の殺菌作用のみであった。すなわち AB 1157 は 10 µg/ml の濃度では殺菌されないが、AB 2463 は 10 µg/ml で 50 µg/ml と同程度に殺菌され、5 µg/ml でも約 50% の菌数の低下が認められた。B-2 の殺菌作用に対して AB 2463 が AB 1157 より 5~7 倍感受性が高い理由は、B-2 が細菌のどこに作用して殺菌するかが不明である現在、説明は困難である。しかし両菌株のちがいは ligase の産生遺伝子、*recA* だけであるから、原因をそこに求めなければならない。AB 2463 は leaky mutant であって、ligase 産生能が完全に欠失しているのではない。もし B-2 に ligase 活性を低下させる作用があるとすれば、十分な ligase 産生能をもつ AB 1157 が生存可能な B-2 濃度でも、AB 2463 には致死的に作用する可能性はあるであろう。

文 献

- 1) Kada, T. : Japan. J. Genetics, 48, 301 (1973)
- 2) Kondo, S. and M. Ichikawa-Ryo : *ibid.*, 48, 291 (1973)
- 3) 梶原徳昭ら : 山梨衛研年報, 19, 49 (1975)
- 4) 久保田寿々代ら : 同上, 19, 54 (1975)
- 5) Howard-Flanders, P. and L. Theriot : Genetics, 53, 1137 (1966)
- 6) 日本化学工業 K K 研究部 データ集 (1975)