

II-71

枯草菌の Rec-assay による水質環境変異原物質の検出と評価 その2

—下水試料の分離・濃縮とクロリネーションの結果について—

金沢大学 建設工学科 正員 松井三郎
金沢大学 大学院 学生員 ○徳川正弘
金沢大学 大学院 学生員 小出芳久

1. はじめに

水環境中の変異原物質を検出するために、発癌物質検索の一次スクリーニングに用いられる微生物系を使用することは有効な方法である。¹⁾ 今回、下水中の溶存物質の変異原性を検討する上で、下水の濃縮および下水中の溶存成分の分離を行ない、効率的な変異原物質の検出を計ることを目的に、枯草菌 (*Bacillus Subtilis*) の Rec-assay を実施した。その結果を若干の検討を加え報告する。

2. 実験方法

1) 溶媒抽出法による分離・濃縮 下水 (A 処理場最初沈殿池越流水) を 3000 r.p.m.、5 分間遠心し、その上澄み液を試料水とした。試料水 200 ml に対して 15 g の乾燥 (650°C) 硫酸ナトリウムを入れて溶解させ、別の試料水 1800 ml と混合し、分液ロートに注入後、60 秒間振とうする。次に、ジクロルメタン (CH_2Cl_2) 60 ml を試料水 2000 ml と混合し、90 秒間振とうする。室温 (20°C) で 1 晩静置させ、分離した CH_2Cl_2 層をとり出し、ロータリーエバポレーターにより揮発濃縮する。得られた残渣を DMSO-水 (1:1) 溶液で溶解し、液体 Rec-assay に供するまで -20°C で貯蔵する。分離した水層は、酸性抽出では濃塩酸で pH 2.0 に、塩基性抽出では水酸化ナトリウムで pH 12.0 に調整し、以下、これを試料水として同様の手順で濃縮を行なう。

2) ゲルクロマトグラフィ分析による分離・濃縮²⁾ 下水を 3000 r.p.m.、5 分間遠心して得た上澄み液をロータリーエバポレーターにより 200 倍に濃縮し、その試料水および同塩素処理水を 0.45 μ メンブレンフィルターで濾過したものを換水としてゲルクロマトグラフィ分析を実施した。溶存有機物の成分分画にはセファディクス G-75 を用い、濃縮試料 10 ml、押し出し速度約 60 ml/h₀ として、各フラクションの T₀C、紫外部吸光度 (E_{220} , E_{260}) を測定し、ゲルクロマトグラムを作成する。得られたゲルクロマトグラムから画群を決定し、凍結乾燥により各画群を 10 倍に濃縮する。

3) 液体および液体 S-9 Rec-assay 法について 下水中には、枯草菌 DNA に直接作用して変異原性を示す直接変異原物質と動物細胞の活性化酵素により活性化されて始めて DNA と反応する間接変異原物質が混在している。そのため、従来の液体 Rec-assay 法と薬物代謝酵素 S-9 Mix を添加した液体 S-9 Rec-assay 法を組み合わせる必要がある。

3. 実験結果および考察

溶媒抽出法により下水を濃縮し、その試料を Rec-assay にかけた結果を Table 1 に示す。Table 1 より、抽出時の pH の違いにより生存率に差が生じていることが分かる。これは、急性・慢性毒性および遺伝毒性 (変異原性) を有する溶存物質が pH の違いにより分離されたことを意味している。下水をロータリーエバポレーターによって直接濃縮した場合と比較して、中性および酸性抽出の濃縮試料において生存率が低下していることは、中性および酸性において、急性・慢性毒性および遺伝毒性を有する溶存物質が有効に濃縮されたものと思われる。また、S-9 Mix の添加により、酸性抽出試料では活性化され、中性抽出試料では不活性化されていることが分かる。このことは、直接および間接変異原物質が混在していて有意な変異原性を必ずしも示さなかった試料に関して、濃縮法を直接濃縮から溶媒抽出濃縮に変更することと、その変異原性を検出できるようになったことを意味している。

次に、ゲルクロマトグラム (Fig. 1, 2) から得られた各画群の 10 倍濃縮試料を Rec-assay にかけた結果を Table

2に示す。塩素処理前後の試料の Table 1 A処理場最初沈殿池越流水の溶媒抽出法によるRec-assay実験結果

画群Ⅰ~Ⅲの Rec-assay は、S-9 Mixの有無に係らず変異原性を示していない。これに対して、塩素処理をしていない試料の画群Ⅳ、Ⅴにおいて、S-9 Mix添加の場合に変異原性が表われ、このことから間接変異	Survival (%)								すべて20倍濃縮 試料原水の水質 COD : 145.0 (mg/l) TOC : 34.5 (mg/l) PH : 7.4
	REC +				REC -				
	溶 媒 抽 出			直接濃縮	溶 媒 抽 出			直接濃縮	
	PH 2.0	PH 7.4	PH12.0		PH 2.0	PH 7.4	PH12.0		
-	88.5	64.3	113.5	130.4	83.0	43.0	116.5	94.7	COD : 145.0 (mg/l) TOC : 34.5 (mg/l) PH : 7.4
+	63.9	84.7	122.3	107.3	52.0	74.7	92.7	138.8	

Table 2 ゲルクロマトグラフィーで分離した各画群のRecassay

画群	画群の水質		S-9 mix	Survival (%)	
	TOC(mg/l)	PH		REC +	REC -
Nonchlorinated					
I	72.5	5.5	-	108.1	105.7
			+	98.4	111.8
II	173.5	4.7	-	101.5	106.7
			+	104.0	102.8
III	168.5	5.8	-	116.2	104.3
			+	102.6	107.3
IV	209.0	9.8	-	106.1	83.9
			+	99.8	65.0
V	444.0	9.4	-	104.2	107.8
			+	103.1	67.0
Chlorinated					
I	239.5	5.1	-	123.8	106.4
			+	107.1	100.5
II	295.5	5.1	-	110.7	98.5
			+	118.3	135.4
III	140.0	9.8	-	126.7	111.3
			+	119.4	118.9
IV	219.5	9.6	-	76.0	44.8
			+	83.5	90.6
V	277.5	9.8	-	118.8	94.6
			+	95.8	98.2
200倍濃縮水の塩素処理水	-	-	-	113.3	78.2
			+	114.7	98.7

4. おわりに

下水中の変異原物質を検出する上で、試料水の濃縮および溶存成分の分離を効果的に行なうことは重要である。今回は、溶媒抽出とゲルクロマトグラフィーによる濃縮分離法を導入し、これより、従来の直接濃縮法では必ずしも変異原性を示さなかった直接および間接変異原の混在した試料の変異原性を検討できるようになった。

<謝辞> 本研究を進めるにあたり、終始援助いただいた金沢大学癌研究所吉川寛教授、村上清史助教授、飯田克平助教授、小笠原直毅助手に謝意を表します。また、

共に研究して下さった山本良子さん、島崎俊昭君にも感謝します。

<参考文献>

- 1) R.Denkhaus, W.O.K.Grabow et al : Removal of mutagen compounds in wastewater reclamation system evaluated by means of the Ames salmonella/microsome assay, Wat. Tech. Vol. 12, Toronto, LAWPR, 1980
- 2) 亀井・丹保 : 水質のマトリックスの評価のためのゲルクロマトグラフィー, 水道協会誌, 第519号, 1977

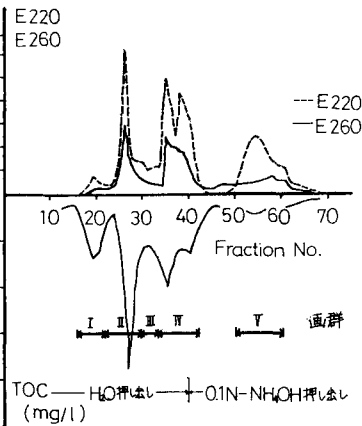


Fig.1 A処理場最初沈殿池越流水のゲルクロマトグラム (200倍濃縮, 10ml 添加)

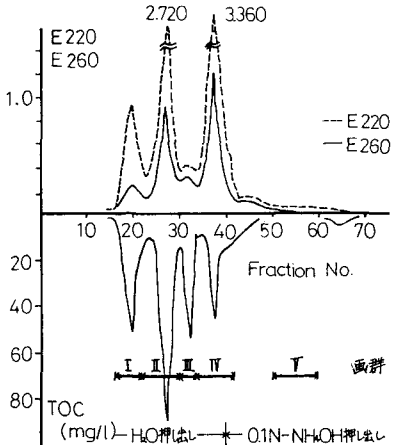


Fig.2 A処理場最初沈殿池越流水の塩素処理水のゲルクロマトグラム (200倍濃縮, 10ml 添加)