

金沢大学 大学院 学生員 小出芳久

金沢大学 建設工学科 正員 松井三郎

北電産業株式会社 正員 徳川正弘

1. はじめに

本研究の目的は、都市下水・工業廃水・河川水・浄水等の水環境中の変異原物質を検出し、その変異原性を評価することにある。このためには、再現性に優れかつ感度の良い検出方法を開発し、更に種々雑多な形で、しかも微量にしか存在しない水中容存変異原物質を効率良く捕えるのに適したサンプル調整方法を検討することが必要である。そこで我々は、変異原物質検出手法として枯草菌を用いた液体(S-9)Rec-assay Preincubation法を実施し、加えて、検水サンプルの分離濃縮の工夫を行なった。そしてこれらの手法を水型産業である染色工業廃水について適用し、活性汚泥処理前後(流入・流出)で変異原物質検出を行ない、その挙動を観測した。

2. 実験方法

1) 液体および液体S-9・Rec-assay Preincubation法について 試料水中には、微生物(枯草菌)のDNAに直接作用して変異原性を発揮する直接変異原物質と、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多数混在していると考えられる。ゆえに今回は、従来の液体Rec-assay法と薬物代謝酵素系S-9 mixを添加する液体S-9Rec-assay法とを併用し、更にPreincubationの操作を導入することを通じて、変異原検出感度の上昇を試みた。

2) 試料の調整方法について 染色廃水を3,000 r.p.m., 5 min.遠心後、その上澄み液を試料水とした。この試料水中に容存している変異原物質をより効率的に分離濃縮する手段として、ジクロロメタン(CH_2Cl_2)溶媒抽出を利用したpH別分離濃縮、ゲルクロマトグラフィー分析と凍結乾燥を併用した分画別分離濃縮およびXAD樹脂による吸着濃縮を試みた。

3. 変異原性の評価方法

得られた実験データは、Probit理論²⁾による統計処理を施された後、Rec⁺・Rec⁻の50%致死濃縮倍率比R50($\text{C}_{50\text{Rec}^+}/\text{C}_{50\text{Rec}^-}$)の算出に供される。そして、この値の大小により試料水の変異原性の有無を検討する。尚、我々は、変異原性を有しないKanamycinの50%致死濃度比R50が1.30であることを考慮して、表-1の様に変異原性を略記する。

表-1 変異原性の有無の評価

—	R50 = 1.30 以下
+	R50 = 1.30 ~ 2.00
++	R50 = 2.00 ~ 4.00
+++	R50 = 4.00 以上
傾向有り	R50の算出はできないが、Rec ⁺ ・Rec ⁻ の生存率が100%未満で、両者の間に差があることを示す
不	最大濃縮倍率試料*でも、Rec ⁺ ・Rec ⁻ 共に生存率100%を越え、変異原性の有無の判断が不可能であることを示す

* 溶媒抽出法で200倍、ゲル分析で10倍、なお振とう培養時のL字管内濃縮倍率は、それぞれ20倍、1倍

表-2 染色廃水の水質

Sample	pH	TOC (mg/l)	COD (mg/l) non-fil. fil.	全クロム (mg/l)	n-1キサン抽出物質 (mg/l)
流入	11.69	338.5	1024 942	0.2 以下	22.4
流出	9.39	166.0	520 430	0.2 以下	18.6

4. 実験結果および考察

染色廃水の水質分析結果を表-2に示す。

また、溶媒抽出法、ゲル分析法、XAD樹脂

法により分離濃縮した検定試料を液体(S-9)Rec-assay Preincubation法に供した実験・解析結果をそれぞれ表-3、表-4および表-5に示す。

1) 溶媒抽出法: 表-1に観られる様に、染色廃水のpHは流入・流出ともに塩基性に傾いていたため、まず、廃水のpHで抽出を行ない、続いて、それぞれのpHに順次調整して溶媒抽出を実施した。全体的にみて、表-3より、流

入・流出共に弱い直接変異原性が出現している

表-3 染色废水の溶媒抽出法によるRec-assayの実験結果

Sample	pH	S-9mix	変異原性の有無	R50=C50Rec+/C50Rec ⁰
流入	11.69	-	+	1.50=12.53/8.34
		+	傾向有り	算出不可能
	2.00	-	傾向有り	算出不可能
		+	不	算出不可能
流出	12.00	-	-	算出不可能
		+	-	算出不可能
	7.00	-	+	1.92=13.84/7.22
		+	-	算出不可能
流出	9.39	-	-	1.27=10.33/8.12
		+	不	算出不可能
	2.00	-	+	1.32=20.31/15.42
		+	不	算出不可能
流出	12.00	-	-	0.66=13.25/20.03
		+	-	算出不可能
	7.00	-	+	1.79=18.80/10.50
		+	傾向有り	算出不可能

唆している。

0) - : 直接変異原検出系でのRec-assay
+ : 間接変異原検出系でのRec-assay

2) ゲルクロマトグラフィ-分析法: 表-4より、

b) R50については、Probit理論の適用および外挿可能なものについて算出した。

弱い直接変異原性が出現している

表-4 染色废水のゲルクロマトグラフィーで得られた各分画のRec-assayの実験結果

ことは観測されるが、特定の分画

に特に強い変異原性が現われているという様な特徴的な傾向はない。

また、R50に関しては、濃度的に

充分な致死効果を導くまでには致

らなかつた。この方法は、変異原

物質が分子量の大小により分離さ

れるにもかかわらず、低い濃縮倍

率しか得られないという欠点を有

している。すなわち、ゲル分析を用

いて、R50を求め変異原性を論じ

ることは困難であると思われる。

3) XAD樹脂法: 表-5にみられる

様に、この濃縮方法においては、

充分な致死効果が得られている。

これは、XAD樹脂法の濃縮性の良

Sample	Frac. No.	凍結乾燥濃縮後の分画溶液の水質		S-9mix	変異原性の有無	R50=C50Rec+/C50Rec-
		TOC (mg/l)	TOC 回収率 (%) a)			
流入	15~20	548	37.4	-	+	算出不可能
				+	不	算出不可能
	23~27	95	66.4	-	-	算出不可能
				+	-	算出不可能
流出	29~36	3593	79.0	-	傾向有り	算出不可能
				+	不	算出不可能
	60~70	42	54.6	-	傾向有り	算出不可能
				+	傾向有り	算出不可能
流出	11~18	1378	71.3	-	-	算出不可能
				+	不	算出不可能
	19~24	246	61.7	-	-	算出不可能
				+	不	算出不可能
流出	25~33	4640	122.2	-	-	1.16=0.37/0.32
				+	-	1.07=0.77/0.72
流出	51~60	43	80.5	-	傾向有り	算出不可能
				+	-	算出不可能

$$a) \text{ 分画溶液のTOC回収率 (\%)} = \frac{\text{凍結乾燥濃縮後の分画溶液の容積} \times \text{凍結乾燥濃縮後の分画溶液のTOC (mg/l)}}{\text{凍結乾燥濃縮前の分画溶液の容積} \times \text{凍結乾燥濃縮前の分画溶液のTOC (mg/l)}} \times 100$$

さを示していると言えよう。R50を判断する限り

においては、強い変異原性は有していない。しか

し、傾向としては、先の2つのサンプル調整方法

の結果とは逆に、弱い間接変異原性を示している。

このことは、サンプル調整法の違いにより分離される変異原物質が異な

ることに起因していると思われる。

以上より、染色废水中には、変異原物質が比較的高濃度で存在し、これらの物質は、活性汚泥法では除去され

表-5 染色废水のXAD樹脂抽出によるRec-assayの実験結果

Sample	S-9mix	変異原性の有無	R50=C50Rec+/C50Rec-
流入	-	-	0.81=1.45/1.78
	+	+	1.40=11.94/8.51
流出	-	-	0.71=0.80/1.13
	+	-	1.27=11.99/9.47

最後に、金沢大学医学部癌研究所吉川寛教授、飯田克乎助教授、福井県庁竹内一介君に感謝します。

参考文献 1) 松井・徳川・小出: 枯草菌のRec-assayにおき環境変異原物質の検出と評価, 工学会報告集, 1981

2) 佐久間昭: 生物検定法, 東京大学出版会, 1964