

II-418 塩素処理水の分画と変異原試験(Rec-assay)

北海道大学工学部 正会員 丹保憲仁 正会員 亀井翼
北海道公害防止研究所 正会員 奥山秀樹

1. はじめに

環境変異原物質の検出に最も一般的に用いられている方法はAmes試験である。しかしながら、水道水のように有機物濃度が低い場合に、Ames試験において10mg/plateで変異原陽性となるような弱い変異原物質をも検知しようとすれば高倍率の濃縮操作が必要となる。Rec-assayはAmes試験のように物質の変異原性を直接知ることはできないが、DNAの損傷の程度を高感度で検出するとされている¹⁾。また、Rec-assayに用いる菌株の保存温度も-20℃程度で充分であり、Amesの菌株保存に必要な-85℃よりも、はるかにゆい低温条件下で保存できる等の利点がある。一方、別報²⁾で述べるように環境変異原性試験を行うにあたって、物質の存在状態により性格付けられるどのような成分が最も大きな変異原性を持つかということが水処理による有機成分の除去プロセスとのかかわりで重要である。別報では吸着剤と水での分配がどのように行われるかという親水性の大小の観点から成分分画を行ったが、本報では主として官能基の種類等の違いにより成分を分画するDEAE-セファデックスA-25を用いて試水を分画し、高感度の変異原物質検出の能力を持つRec-assayにより分画群について変異原性試験を行うこととした。

2. 用いた試料と塩素処理条件

塩素処理に用いた試料は①泥炭地土壌の0.1N-NaOH抽出液、②減圧濃縮した泥炭地水、③芝草フミン酸のアルカリ抽出液、④市販フミン、等である。

試料の塩素化はTOC濃度を200~300mg/Lとし、塩素と有機炭素比(Cl_2/DOC)を1, pHを7.0に設定し、24時間反応を行なせた後、残留塩素をチオ硫酸ナトリウムで消去して行った。市販フミンを塩素処理し、有機成分の分画を行った実験では、 Cl_2/DOC を各種(0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20)の比に設定した。

3. DEAE-セファデックスA25による分画

塩素処理を行った試料の分画をDEAE-セファデックスA-25で行った。操作条件は次のようである。

カラム: 12mmφ×200mm, 溶離液: 0.1Nアンモニア水, NaCl 0M(50ml)-2M(50ml)の直線濃度勾配, 流速: 30~40ml/hr, フラクション採取量: 5ml。

4. Rec-assay

松井らの殺体Rec-assay³⁾に準拠して行った。DNA損傷性の評価は、 Rec^+ 、 Rec^- の50%致死濃度($C50Rec^+$ 、 $C50Rec^-$)の比 $R50$ を算出し、この値の大小によってDNA損傷性の程度を検討した。また、このような見方と並行して、 $R50/C50Rec^-$ の値によって試料のDNA損傷性の程度を検討も試みた。

5. Rec-assayの結果

図1, 2は泥炭地底泥(湿地)の0.1N-NaOH抽出液、図-3は泥炭地土壌の0.1N-NaOH抽出液、図-4は芝草フミンのアルカリ抽出液、図-5は泥炭地水の減圧濃縮液を夫々塩素処理し、Rec-assayを行った結果である。

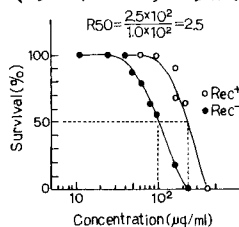


図1 泥炭地底泥①の0.1N-NaOH抽出液、塩素処理水のRec-assay

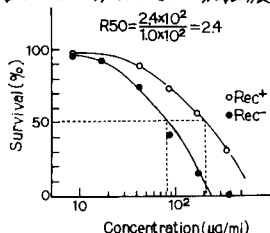


図2 泥炭地底泥②の0.1N-NaOH抽出液、塩素処理水のRec-assay

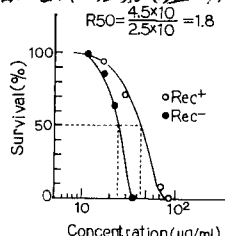


図3 泥炭地土壌の0.1N-NaOH抽出液、塩素処理水のRec-assay

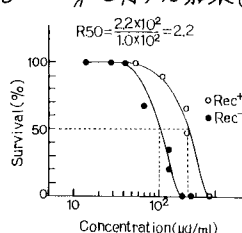


図4 芝草フミンのアルカリ抽出液、塩素処理水のRec-assay

図のように、 R_{50} 値は1.8~3.2をとり、DNA損傷性が陽性であることを示している。試料間のDNA損傷性の差異を表-1に示す。ここで、 R_{50} 値ではほぼ同一のDNA損傷性の程度を表すのに対し、 R_{50}/C_{50Rec} という指標によれば、泥炭地土壌と芝草フミンの間でみられるように有意な差異を認めることができる。なお、塩素処理を加えなかった試料について同一DOC濃度範囲でRec-assayを行ったが、DNA損傷性は検出されなかった。

表-1. 塩素化試料間のDNA損傷性

試料	指標	C_{50Rec}^+	C_{50Rec}^-	R_{50}	R_{50}/C_{50Rec}^-
泥炭地底泥(湿泥) ①		2.5×10^2	1.0×10^2	2.5	2.5×10^{-2}
②		2.4×10^2	1.0×10^2	2.4	2.4×10^{-2}
泥炭地土壌		4.5×10	2.5×10	1.8	7.2×10^{-2}
芝草フミン		2.2×10	1.0×10	2.2	2.2×10^{-1}
泥炭地水		3.6×10	1.1×10	3.2	2.9×10^{-1}

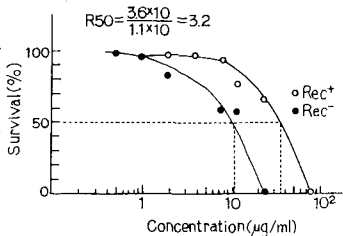


図5. 泥炭地水減圧濃縮水の塩素処理水のRec-assay

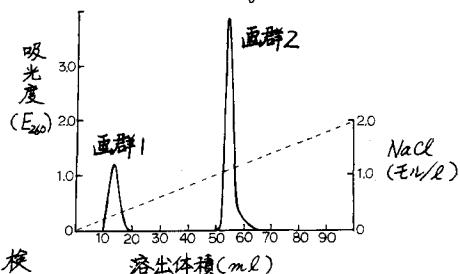


図6. DEAE-セファデックスA-25による分画パターン

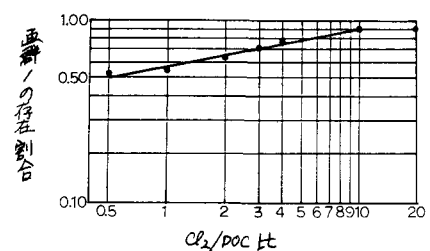


図7. Cl_2/DOC 比と画群1生成の関係

次に、DNA損傷性の強弱を陰イオン親和性の大小を指標として検討を行った。DEAE-セファデックスA-25による分画パターンを図-6に示す。クロマトグラムは2個のピークを有しており、先に溶出する区分は非イオン性あるいは陽イオン性の物質群である。遅れて溶出する区分はDEAEカラムに親和性の強い、陰イオン性の物質群である。前者を画群1、後者を画群2とする。塩素処理を加えない試料はカラムと親和性が強く、実験条件下では溶出し難く、一部が画群2に出現する。塩素処理の際の Cl_2/DOC 比を高めると、画群1の有機成分の割合が増す。図-7はこの関係を示す。 $Cl_2/DOC=10$ 程度で有機成分の90%を画群1が占める。

次に、分画成分のDNA損傷性について検討を行った。図-8, 9は夫々、試料を $Cl_2/DOC=8$ の条件で塩素化した画群1と2のRec-assayの結果である。画群1の $R_{50}=3.2$ に対して画群2の $R_{50}=1.3$ となり、DNA損傷性は画群1の成分についてみられる。同様に $Cl_2/DOC=1$ の条件で塩素化を行った結果、画群1, 2の R_{50} は夫々3.6, 1.4となり、画群1は Cl_2/DOC 比によらずDNA損傷性を発現する。

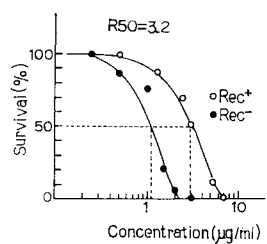


図8 画群1のRec-assay

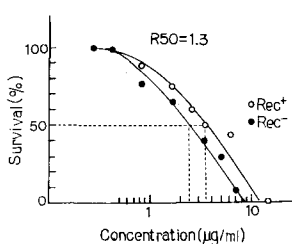


図9 画群2のRec-assay

6. まとめ

表2のようにDEAEセファデックスA25カラムを用いる陰イオン親和性の差による分画方法により、塩素処理水中の有機成分を2つの画群に分画することができた。塩素処理条件を Cl_2/DOC 比が大きくなるにつれてDEAEカラムに親和性を持たない成分(画群1)が増加する。DNA損傷性は画群1のみで発現し、その強度は Cl_2/DOC 比にかかわらず同程度であった。

表-2 DEAEセファデックスA25による有機成分の分画

画群	1	2	3
試料	DEAEカラムに対して親和性 弱い	中程度	強い
原水	なし	微量	存在
塩素処理水	存在	存在	なし(微量)

7. 参考文献

- 1) Kada, T. et al. Mutation Research, 16, 165 (1992)
- 2) 丹保, 亀井. 水の塩素処理及びオゾン処理による好環境変異原性試験
- 3) Matsui, S. Water Research, 14, 1613 (1980)