

下水処理放流水の細胞毒性とその活性炭への吸着特性

龍谷大学 正会員 ○越川 博元、横田裕司、鏑木悠平

龍谷大学大学院 学生員 島田知子

1. はじめに

近年、都市における水の需要が高まっている。しかしながら、都市への水の供給量には限度があることから、下水処理水を新たな水資源として捉えられている。一方、下水処理水の多くは河川などの公共水域に放流されていること、また下流域では上流域における下水処理放流水も流入している「河川水」を原水として取水し、これから浄水処理により得られた上水を利用している。従って現状においても、実質的には下水処理放流水は下流域の水源という実態が存在している。下水処理放流水の一部は修景・親水用水として利用されるなど、ヒトと直接触れる機会が増えてきた。このような背景から、下水処理放流水が有する細胞毒性強度を定量化しその強度を測定するとともに、細胞毒性強度の低減を目的として活性炭による吸着特性について検討した。また毒性試験に用いた細胞には、直接的な接触を念頭に置き、正常ヒト表皮角化細胞を選択した。

2. 実験方法

試料は河川水、あるいは下水処理場放流水とし、採水した試料水を固相抽出法により濃縮した。採水は予めメタノール、Milli-Q 水で洗浄したステンレス製やかんを用い、採水後は直ちに氷冷して実験室に持ち帰った。ガラス繊維濾紙 GF/B をアセトンで洗浄し、これを用いて試料水を濾過したのち、そのろ液を固相抽出に供した。固相抽出には Oasis HLB カートリッジを用いた。カートリッジをメタノール、Milli-Q 水でコンディショニングしたのち、流速を 10mL/min に設定した Sep-Pac コンセントレータに接続、200mL の試料水のろ液をカートリッジに通水した。通水したカートリッジを乾燥し、引き続いてメタノール 6mL で溶出後、窒素吹きつけにより乾固した。これを無血清増殖用培地に溶解して、細胞毒性試験に供した。

実験に供した細胞は、正常ヒト表皮角化細胞(クラボウ)である。これを無血清増殖用培地で培養したのち、毒性試験に用いた。培養は一般的な手順でおこない、目視で 70%程度のコンプルエント状態になった時点でトリプシン処理により細胞を回収した。トリパンプルー法に基づいて生細胞数を測定した後、これを設定した細胞数となるよう 96 穴マイクロプレートなどに播種したのち一晚培養し、細胞毒性試験に用いた。細胞毒性強度については、乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイを用いてその強度を測定した。これは細胞膜が破壊されることにより放出される LDH の活性量を測定することにより、細胞毒性強度を測定する方法である。LDH 活性の測定には「細胞毒性測定キット」(Wako)を使用した。この原理を簡単に記述する。細胞から放出された LDH により、反応液中の乳酸と NAD^+ が反応し、ピルビン酸と NADH とを生じる。この NADH はさらにジアホラーゼの触媒作用によりニトロブルーテトラゾリウムを還元して青紫色のジホルマゼンを生成する。560nm における吸光度を測定することにより生成したジホルマゼンの定量を行い、別途作成した LDH 活性と吸光度との検量線から、細胞から放出された LDH 活性量を測定するものである。LDH の活性は、25℃で 1 分間に 1 μmol の乳酸を生成する酵素量を 1unit と定義した。

吸着実験に供した活性炭は、粒径 8~32 メッシュ・ヤシ殻製(ナカライテスク)を粒径 1~2mm となるようふるい分けし、これをイオン交換水で十分に洗浄した後、105℃で乾燥したものである。吸着実験は以下の手順で行った。すなわち、Milli-Q で試料水の濃縮物を希釈した後、攪拌子とともにガラス製バイアル瓶に密閉し 20℃に設定したインキュベーター内で保温した。2 時間が経過した時点で予め準備した活性炭を所定量添加して密栓し、インキュベーター内に設置したスターラーで 8 時間攪拌した。引き続いて活性炭を遠心により除去し、その上清を先に述べた固相抽出法により濃縮して、これを細胞毒性試験に供した。

キーワード 細胞毒性、活性炭、LDH アッセイ、正常ヒト表皮角化細胞

連絡先 〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5 Tel:077-544-7102, Fax:077-544-7130

3. 結果と考察

河川水及び下水処理場放流水の有する細胞毒性を比較したものが、図-1である。採水は2007年5月19日におこない、200倍に濃縮したものを8時間暴露した結果を、細胞5,000個あたりのLDH活性で毒性強度を表したものである。琵琶湖・淀川水系のひとつである桂川は京都市内を流れており、市内では桂大橋が上流に位置し、下流位置に宮前橋がある。比較のため、また流下過程での細胞毒性強度の変化を知るため、桂大橋および宮前橋にて河川水を採取した。また処理場Aの下水処理放流水は桂大橋と宮前橋の間で放流されている。また処理場Bでは、高度処理としてオゾン処理が取り入れられている。下水処理場放流水中の細胞毒性強度は高いが、河川水の希釈によりその強度が低下していることが伺えた。また一日あたりのフラックスで考察する必要があるが、流下に伴い毒性強度が増加していた。このことは下流域で河川水が上水用に取水されている点から、注意を必要とする。

図-2は、活性炭に対する細胞毒性物質の吸着特性を示したものである。2007年12月6日に、処理場Aの放流水を採取し濃縮したものを実験に用い、3,250個の細胞に暴露して求めたLDH活性を、細胞5,000個あたりのunit数で表現した。得られた結果をFreundlichの吸着等温式で表現したものが、式-1である。

$$q = 0.5C^{1.05} \quad (\text{式-1})$$

ここで、 q ：活性炭1gあたりの吸着細胞毒性強度(U/g)、 C ：平衡細胞毒性濃度(U/L)、である。 C の指数部の値が0.1～0.5の場合には吸着が容易であり、また2以上の場合には吸着が困難であるとされる。本実験では1.05であったことから吸着が困難であるとは言えず、本研究で取り扱った細胞毒性物質は比較的活性炭に吸着されやすい傾向があることがわかった。またこのことは浄水操作における活性炭投入により、細胞毒性物質を吸着除去できることを示しており、活性炭処理の効果のひとつであるといえよう。

4. まとめ

本研究では下水処理放流水の安全性評価のひとつとしてヒトの「接触」という側面から、正常ヒト表皮角化細胞に対する細胞毒性試験を試み、河川水及び下水処理放流水を固相抽出により濃縮した試料の細胞毒性強度を乳酸脱水素酵素の活性として表現した。その結果、河川では流下に伴い細胞毒性強度が増加し、また下水処理場放流水はその強度が河川水と比較して高いことを明らかにした。本研究で取り扱った細胞毒性物質は、活性炭に吸着されることを示し、その吸着特性をFreundlichの吸着等温式で表現した。

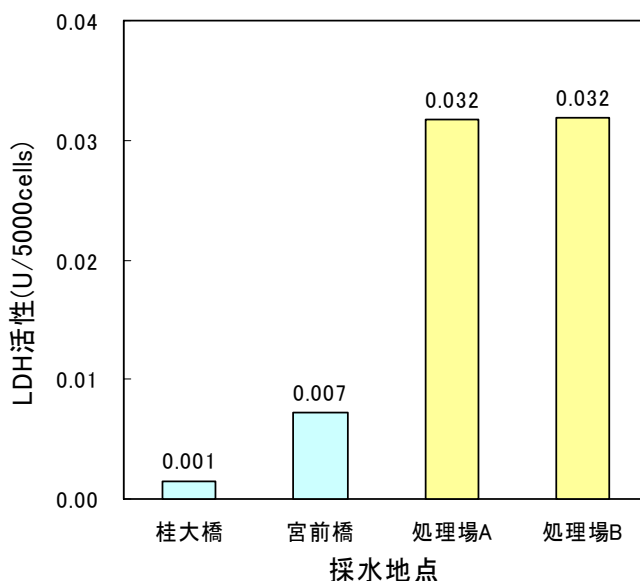


図-1 河川水及び下水処理場放流水の細胞毒性

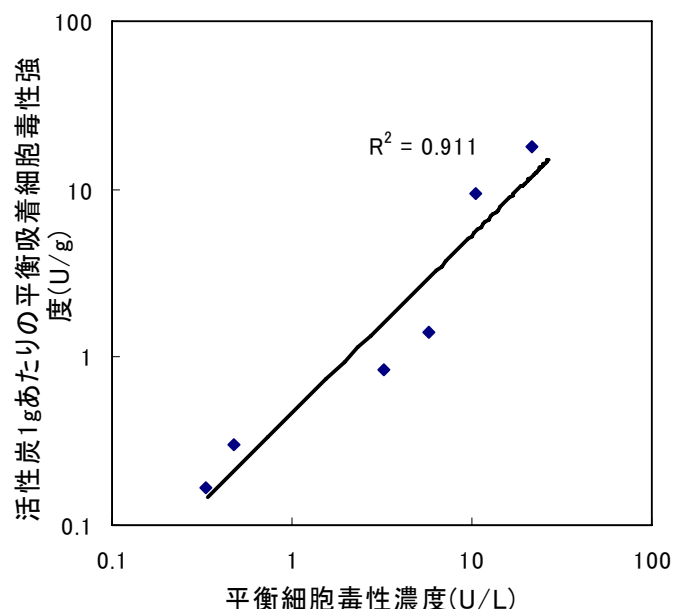


図-2 細胞毒性物質の活性炭への吸着特性