

枯草菌Rec-assayを用いた フミン酸によるDNA損傷性改善効果の検討

山本裕史¹・滝上英孝²・清水芳久³・松井三郎⁴

¹学生員 工修 京都大学工学部附属環境質制御研究センター (〒520-0811 大津市由美浜1-2)

²学生員 工修 京都大学工学部研究科環境地球工学専攻博士後期課程

³正会員 Ph.D. 京都大学助教授 工学部附属環境質制御研究センター

⁴正会員 Ph.D. 京都大学教授 工学部附属環境質制御研究センター

都市下水の終末処理場の活性汚泥処理槽前後の水試料についてXAD-2を用いた濃縮をおこない、その後フミン酸添加および無添加の条件で枯草菌Rec-assayに適用した。その結果、フミン酸添加は流入水にはDNA損傷性緩和効果がみられなかったが、流出水はフミン酸添加濃度が高くなるにつれDNA損傷性がわずかに緩和された。次に、3種のDNA損傷性物質に対しフミン酸添加および無添加におけるXAD-2による回収率についても比較検討したが、有意な差はみられなかった。さらに、その3物質をフミン酸添加および無添加の条件で枯草菌Rec-assayに適用したところ、疎水性の高いPyreneやBenzo(a)pyreneのDNA損傷性は大きく緩和されたが、アミノ基を有する比較的親水性の高い1-Aminopyreneには緩和効果は小さかった。

Key Words : activated sludge treatment, antimutageniceffect, *Bacillus subtilis* rec-assay, DNA damaging potential, humic substances

1. はじめに

われわれ日本人がよく飲用する緑茶をはじめとしたお茶の成分であるカテキンやフラボノイド¹⁾などのポリフェノール類には、抗ガン効果もしくは抗変異効果があることが疫学的調査もしくは実験的検討により報告されている²⁾⁴⁾。このことから、さらに高分子でポリフェノール類に類似しベンゼン環および多くの官能基を有すると考えられるフミン質にも同様の効果があることが推測される。しかしながら、フミン質の抗変異効果については、今までの研究において諸説があり、その有無が明らかになっていない。研究例としては、Satoら⁵⁾が土壌から抽出されたフミン酸にはBenzo(a)pyreneおよび3-Aminoanthraeneの変異原性を打ち消すはたらきがあるが、4NQO, MNNGおよび1-Nitropyreneに対してはその効果はみられなかったことをAmes法による変異原試験により報告している。また、除草剤とフミン酸の混合物のヒトのリンパ球への遺伝毒性を調べた結果、Maleic hydrazideについてはフミン酸による緩和効果を示したものの、Alachlorについては相乗効果をもたらす場合があったという報告もなされている⁶⁾。

一方、下水処理場の放流水には強いDNA損傷性が

検出⁷⁾されており、二次処理方法として広く用いられている活性汚泥処理プロセスにおけるDNA損傷性物質の除去率の不十分さが指摘されている⁸⁾。この原因として、本研究では以下の仮説を想定した。DNA損傷性物質は都市下水に混入していると考えられるフミン質等の界面活性作用を有する共存有機物質との結合により、活性汚泥処理槽内を処理されずに素通りしてしまうと仮定する。更に、この仮説は活性汚泥処理槽の流出水を採取した場合、DNA損傷性物質はDNA損傷性試験の前処理である固相抽出の際にフミン質とともに、もしくはフミン質から脱着して捕集されると考えられるとするものである。

以上のことから、本研究では大きく分けて3つの実験的検討をおこなった。まず、活性汚泥処理槽前後でのDNA損傷性の改善の不十分さを指摘するべく、都市下水の終末処理場内の活性汚泥処理槽前後の試料水を、従来から用いているXAD-2を用いて濃縮し、枯草菌Rec-assay法を適用してDNA損傷性の消長を比較検討した。次に、DNA損傷性物質を多く含むと考えられる両濃縮試料を、これらに菌体と反応させる直前にフミン質を添加した際の抗変異効果あるいはDNA損傷性緩和効果についても評価することとした。また、上記の仮説の真偽を更に明白にすることを目的として、試料水の濃縮時に用いるXAD-2樹脂を用

いた固相抽出について実験的検討をおこなった。具体的には、いくつかのDNA損傷性物質の回収率について、DNA損傷性物質の水溶液にフミン質を添加した系および添加しない系について比較検討をおこなうこととした。最後に、1つめの検討をさらに発展させ、先の回収率実験に用いた典型的なDNA損傷性物質について、フミン質によるDNA損傷性緩和効果を調べることにした。なお、この実験系についても先の活性汚泥処理槽前後のサンプル同様に、菌体とDNA損傷性物質を反応させる直前にフミン質を添加するフミン質添加系および無添加系で枯草菌Rec-assay法に適用することとした。

2. 対象物質の選定

(1) フミン質の選定

フミン質 (Humic Substances) は、腐植物質とも呼ばれ植物体や動物の死がいの分解や腐植化に伴って生じ、微生物の代謝物などの有機物が複雑に反応してできた物質のことを指すとされている。このフミン質は、土壌、底質あるいは水中とあらゆる環境中に存在しており、有害化学物質との相互作用や反応によりその毒性を変化させたり移動を助けたりする作用を有するほか、水中のフミン質は塩素処理によりトリハロメタンを生成することも知られている。また複雑な化学構造を持っており、構造はもとより分子量についても諸説があり、定説は存在しない。フミン質はその分離、精製の際の酸およびアルカリへの溶解性からフルボ酸、フミン酸、ヒューミンの3つに大別されている(表-1)^{9),10)}。

本研究では、フミン質としてはAldrich社製のフミン酸を採用することとした。このフミン酸は土壌から抽出回収されたものであるとされていることから水中での現象を厳密に再現することはできない¹¹⁾ものの、その特徴についての情報が蓄積されていること、すでに有機汚染物質との収着に関する研究がおこなわれていること¹²⁾、試料の前処理の必要性がないこと等の十分な利点を有するといえる。

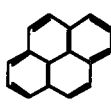
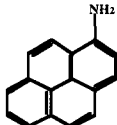
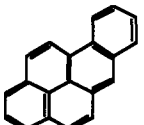
(2) DNA損傷性物質の選定

一方、DNA損傷性物質については、その物質の疎水性に着目して選定をおこなった。化学物質の疎水性はオクタノール/水分分配係数の値で考えることができ、一般にこの値が高い物質ほど疎水性が高くそのDNA損傷性をはじめとした毒性が強いと考えられるほか、フミン酸などの共存有機物質にも収着しやすいとされている。そこで、本研究では疎水性の高

表-1 フミン質の分類

フルボ酸	全てのpHで水に可溶
フミン酸	酸性側(pH2未満)で沈殿 pH2以上では水に可溶
ヒューミン	全てのpHで水に不溶

表-2 対象とするDNA損傷性物質の物性

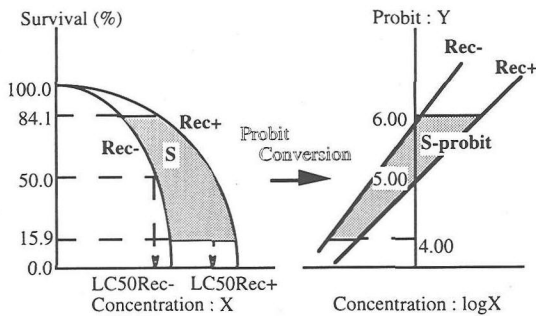
	Pyrene	1-Aminopyrene	Benzo(a)pyrene
分子式	C ₁₆ H ₁₀	C ₁₆ H ₁₁ N	C ₂₀ H ₁₂
分子量	202.26	217.27	252.32
構造式			
水溶解度 (mg/L) (25℃)	0.135-0.148	可溶	0.0005-0.006
オクタノール/水分分配係数 (log Kow) (25℃)	4.88	—	6.50

い多環芳香族炭化水素類(以下PAHとする)として、琵琶湖底泥中からも検出されている¹³⁾Pyrene、間接変異原性物質としてよく知られるBenzo(a)pyreneのほか、Pyreneにアミノ基が1つ付加した構造である1-Aminopyreneを採用した。これらの化学物質の物性値を表-2に示す^{14),15)}。これらの物質は、自動車排ガスや路面流出水に多く含まれることが知られており、下水処理場内の活性汚泥処理槽に流入している可能性も高いと考えられる。さらにこれらのPAHはmg/Lオーダーの比較的低濃度域でも検出可能な蛍光検出器により容易に検出が可能であるという長所も有する。

3. 実験方法

(1) 枯草菌Rec-assay法

Rec-assayに使用する菌株は、枯草菌の野生株H17 (Arg-, Trp-, RecE+) と組換え修復機構欠損株M45 (Arg-, Trp-, RecE-) で、H17株をRec+, M45株をRec-と呼称している。DNA損傷性を有する試料を枯草菌Rec-assayに適用した場合、Rec+はDNAに損傷が生じても組換え修復によりDNA修復がなされるがRec-ではなされないため、両者の生存率曲線には図-1の左側の図のように差が生じることになる。こ



図一 枯草菌Rec-assay法の概念図

表一 3 DNA損傷性判定基準

判定	S-probit
強陽性 (++)	>0.593
陽性 (+)	0.200-0.592
陰性 (-)	-0.123-0.199
逆転 (r)	<-0.124

の両者の差をProbit変換することによって、図一1の右側の図のS-probitの値をもとにDNA損傷性を評価することができる方法が考案されている。表一3にS-probitによるDNA損傷性判断基準を示す。このように枯草菌Rec-assayはRec+, Rec-両者間のDNA修復機構の違いによりDNA損傷性を検索する方法であることから、Ames法やumuテストなどの他の変異原試験で菌体自身の死によって測定不可能となるKilling効果の影響を受けないことが特徴としてあげられる¹⁶⁾。

DNA損傷性試験や変異原性試験において河川水や水道水、そして今回対象としている活性汚泥処理水などの環境水を試料とする場合、検出感度の問題上、濃縮を行うことが不可欠である。枯草菌Rec-assayでは親水性から疎水性（脂溶性）まで幅広い有機物を偏りなく回収することができ、再生可能で経済的にも優れているXAD-2を用いた固相抽出法を採用した。

従来のL字管を用いるRec-assay法¹⁷⁾は、操作が複雑であり手間がかかる上、比較的大きな振とう器を設置するためのスペースを必要とすることなどから、一度に多数のサンプルを処理することは困難であった。また、試料量がL字管一本あたり0.7mL必要であるために、環境水試料に適用する場合には大量の水を濃縮する必要があった。本研究においては新たに考案、開発された96穴マイクロプレートを用いる方法を採用することとした¹⁸⁾。本方法では菌液と試料の反応時間（1時間）、菌液量と試料量の混合比率（3：7）等の各種条件はほぼ従来法に準じてい

る。その一方で、試料希釈をマイクロプレート上でおこなうこと、試料の測定をマイクロプレートリーダーによりおこなうことのほか、使用する試料量も1穴あたり70mLと従来法の10分の1で十分になるなど従来法の問題点の改善がおこなわれた。振とう方法に関しても、従来のL字管を用いた方法よりも検出感度が悪くならないように開発が進められ、試験結果を比較することにより往復振とう法を採用している¹⁸⁾。なお、フミン酸は前述の通り、試料と菌体を反応させる直前に添加した。

(2) XAD-2を用いた固相抽出法^{7), 17), 19)}

採取した試料水18Lはガラスウールで夾雑物を除去後、ろ紙（東洋ろ紙No.5A）でろ過し、コンディショニングをおこなったXAD-2樹脂を詰めたガラスカラムに通水した。通水後の樹脂はN₂パージにより水分を取り除き、エタノールおよびジエチルエーテルで抽出、蒸発乾固した。その残さを10mLのDMSOに再溶解し枯草菌Rec-assay法に適用することとした。結局、ここでは1,800倍濃縮をおこなっていることになる。

一方、回収率実験については、本研究で採用した3種のPAHの水溶液を試料水として濃縮をおこなった。ただし、これらの物質の水溶解度が比較的低いことから一旦ジクロロメタンに溶解させた後、ジクロロメタンを揮散させ、蒸留水を加えて3日以上攪拌することにより標準水溶液を作成した。なお、濃縮液中のPAH濃度は蛍光検出器付きHPLC（Waters社製600E-474）を用いて測定し、回収率を算出した。

4. 実験結果および考察

(1) 下水処理場における調査結果

合流式の都市下水道の終末処理場の一つで、生物処理として標準活性汚泥法を採用しているA処理場の生物反応槽前後において試料水を採取しXAD-2樹脂を用いた濃縮をおこない、濃縮液にフミン酸を添加する系としない系でマイクロプレートを用いた枯草菌Rec-assay法を適用した。その結果を表一4、図一2および図一3に示す。ここでフミン酸濃度はpreincubation時のTOC値を、LC50はそれぞれRec+およびRec-の半数致死濃縮倍率、そしてS-probit値の右のカッコ内はDNA損傷性判定結果を示したものである。

フミン酸濃度0、つまりフミン酸無添加系での生物反応槽前後のサンプルの結果を比較すると、生物

表-4 活性汚泥処理槽前後のサンプルのRec-assay結果

	フミン酸 添加濃度 (mg/L as TOC)	LC50Rec+ (濃縮倍率)	LC50Rec- (濃縮倍率)	S-probit
活性汚泥処 理槽流入水 (一次処理水)	0	1.9	2.0	-0.07(-)
	8.0	2.9	1.9	0.33(+)
	24	1.8	2.3	-0.19(r)
	80	1.5	2.2	-0.33(r)
活性汚泥処 理槽流出水 (二次処理水)	0	26	6.1	1.25(++)
	6.4	26	7.2	1.10(++)
	19	27	8.4	1.02(++)
	64	33	11	0.98(++)

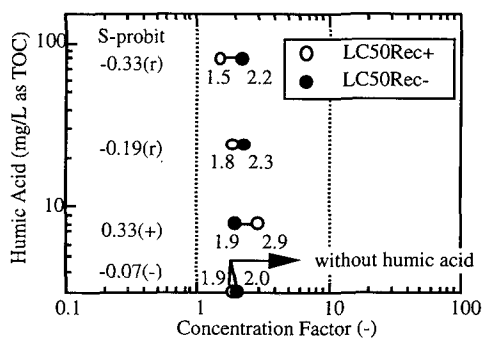


図-2 活性汚泥処理槽前サンプルのRec-assay結果

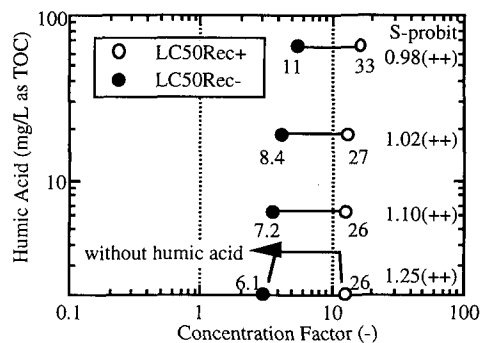


図-3 活性汚泥処理槽後サンプルのRec-assay結果

反応槽前の一次処理水ではLC50Rec+が1.9, LC50Rec-が2.0と一けた位の強い毒性レベルを示す一方で, DNA損傷性は陰性であった。しかし, これはRec-だけでなくRec+に作用すると考えられる細胞毒性物質の毒性によってRec-のみに作用すると考えられるDNA損傷性物質の毒性がマスキングされた¹⁸⁾とも考えられ, 試料水内にDNA損傷性物質が含まれていないことを意味するものではないと考えられる。つまり, DNA損傷毒性だけでなく細胞毒性も強いサンプルにRec-assayを適用した結果をS-probitだけを

用いて評価することに限界があることを指摘する結果である。また, 濃縮操作において同時に回収してしまった可能性のある共存有機物質とDNA損傷性物質との結合や吸着といった収着現象の関与も示唆される。これに対して, 活性汚泥処理を受けた生物反応槽後のサンプルでは, LC50Rec+が1.9から26と活性汚泥処理によって1オーダー程度改善されているものの, LC50Rec-は2.0から6.1と比較的改善されておらず, その結果S-probitは1.25となり, DNA損傷性強陽性と判定されている。これは活性汚泥処理プロセスにおけるDNA損傷性物質の除去率の悪さをあらためて示唆する結果である。

次にフミン酸添加の影響についてみてみると, 図-2から生物反応槽前のサンプルについては, フミン酸濃度を8.0, 24, 80と増やした場合でも, そのDNA損傷性緩和効果は確認できなかった。逆にフミン酸添加量8.0 (mg/L as TOC) のときにはS-probitが0.33で陽性となっている。それに対して生物反応槽後のサンプルでは, 図-3に示すようにフミン酸濃度を6.4, 19, 64と上昇させると, LC50Rec+で26から33へ, LC50Rec-で6.1から11へ, またS-probitが1.25から0.98へとわずかながらDNA損傷性改善効果がみられた。試料原水のTOC値が生物反応槽前で19.7mg/Lだったことから, 濃縮操作によりさらに1,800倍濃縮したことを考えても, DNA損傷性物質が大量の共存有機物質に複雑に結合または吸着することにより添加したフミン酸の効果がなかったと考えられる。生物反応槽後ではTOCは4.0mg/Lと量的に減少しただけでなく, 質的にも活性汚泥による分解などの作用を受けてDNA損傷性物質をはじめとする毒性物質を収着しにくいものへと変化したものと考えられる。しかしながら, 比較的DNA損傷性等の毒性を緩和する効果が大きかった生物反応槽後のサンプルについても大幅な毒性改善には至らず, 実験操作中に添加したフミン酸よりも試料原水にもとから含まれると考えられる共存有機物質の影響の方が大きいことが示唆された。

(2) XAD-2を用いた固相抽出法による回収率実験結果

枯草菌Rec-assay法に環境水を適用する際におこなう前処理法であるXAD-2樹脂を用いた固相抽出による濃縮方法をPyrene, 1-AminopyreneおよびBenzo(a)pyreneの3種について, それぞれフミン酸添加系と無添加系でおこなった。その結果を表-5に示す。なお, ここでフミン酸濃度は下水二次処理水のTOC値を想定して3.9(mg/L as TOC)とした。

表-5より, Pyreneの回収率は, フミン酸無添加

表一五 DNA損傷性物質のフミン酸添加系および無添加系でのXAD-2による回収率

	Pyrene	1-Aminopyrene (pH7)	Benzo(a)pyrene
フミン酸 添加系	56.4%	3.6%	65.2%
フミン酸 無添加系	51.8%	87.1%	63.4%

(フミン酸濃度3.9 mg/L as TOC, Pyrene7.7mg/L, 1-Aminopyrene29.5mg/L, Benzo(a)pyrene1.8mg/L)

系(51.8%)よりも添加系(56.4%)の方がやや高くなっている。また、Benzo(a)pyreneについてもフミン酸添加系の回収率63.4%は無添加系の回収率65.2%とほとんど同じであり、これらの結果より疎水性有機化合物は、フミン酸などの共存有機物質が存在する場合でもこれらが共存しない場合と同様にXAD-2樹脂により回収されていることがわかった。このように、PyreneおよびBenzo(a)pyreneの2種のPAHについてはフミン酸の有無に関わらずXAD-2による回収率はほぼ同程度であることから、初めに示した仮説の妥当性が示唆されたといえる。

これに対して、1-Aminopyreneはその濃縮試料をpH7に調整して回収率を測定したところフミン酸無添加系では87.1%と高い回収率を得たものの、フミン酸添加系では、3.6%とほとんど回収されなかった。PyreneやBenzo(a)pyreneのような疎水性PAHのフミン酸への収着は物理的収着が支配的であると考えられるのに対し、アミノ基を有する1-Aminopyreneはフミン酸と化学的にも結合していると考えられる。1-Aminopyreneの抽出溶液中のフミン酸の濃度を吸光度(254nm)によって分析したところ回収率が78%であった。これらのことから回収されたフミン酸に収着している1-AminopyreneはHPLCに使用した疎水性カラム(C18)内においてもフミン酸と分離分析ができず、実際はフミン酸無添加系に近い回収率が得られているにもかかわらず、見かけ上は低い回収率となってしまったものとも考えられる。なおこれは1-Aminopyreneの蛍光放出波長が442nmと高いうえ、PyreneやBenzo(a)pyreneと異なりフミン酸も同波長に比較的高いレベルの蛍光を有すること、またHPLCでのフミン酸と1-Aminopyreneの保持時間が近いこと、極性有機溶媒であるDMSOの混入により1-Aminopyreneの保持時間がさらにフミン酸のそれと近づいたこと等に起因しているとも考えられる。

次に各物質のフミン酸無添加系での違いをみると、疎水性が最も高く、したがって回収率も高いと考えられるBenzo(a)pyreneの回収率は65.2%となり、

これはベンゼン環が一つ少なく、疎水性がBenzo(a)pyreneよりも低いPyreneの回収率51.8%よりは高かった。しかし、最も回収率が高かったのはアミノ基を有する1-Aminopyreneであった。これは操作手順の一部でプラスチック製のポリタンクを用いたことから、疎水性のPAHは比較的水溶解度の高い1-Aminopyreneよりも壁面に多く吸着されてしまい、XAD-2樹脂によって回収されなかったことによるものと考えられる。

いずれにせよ、1-Aminopyreneに対しては多少の疑問点が残ったものの、PyreneおよびBenzo(a)pyreneについてはXAD-2による回収率はフミン酸添加の有無によらないことが示された。つまり、本研究で採用されたDNA損傷性物質については、もしこれらの物質が活性汚泥処理槽をフミン酸に収着して処理されずに素通りしてしまうものと仮定した場合でも、フミン酸とともにもしくはフミン酸から脱着してXAD-2樹脂によって回収されるという仮説が正しいことが示されたといえる。逆に考えると、先の活性汚泥処理槽前後でDNA損傷性が改善されなかったという実験結果から、活性汚泥処理プロセスにおけるDNA損傷性物質の除去率の不十分さが改めて指摘されたとも考えることができる。

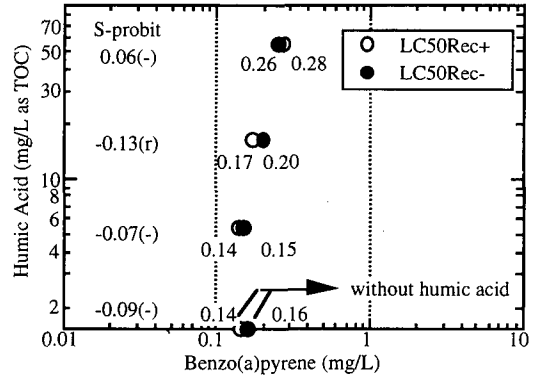
(3) DNA損傷性物質の試験結果

次に選定したDNA損傷性物質である1-Aminopyrene, Benzo(a)pyrene, そしてDNA損傷性物質ではないものの毒性が高いとされるPyreneについて、フミン酸添加および無添加の系で枯草菌Rec-assay法を適用した。なおBenzo(a)pyreneはS9-mix添加の間接変異原試験系でのみDNA損傷性を有するが、フミン酸への収着現象を考慮に入れるとそれ自身が別の収着特性を持つと考えられるS9-mixの添加はそのメカニズムが複雑で扱いにくいため、本研究においては3物質ともにS9-mix無添加の直接変異原試験を適用することとした。

各物質をフミン酸添加および無添加の系で枯草菌Rec-assay法に供した結果を表一六、図一四～一六に示す。ここでフミン酸濃度については先の下水処理場のサンプルの結果と同様にpreincubation時のフミン酸濃度のTOC値を、LC50Rec+およびLC50Rec-はそれぞれRec+およびRec-の半数致死濃度を表したものである。またS-probitの右のカッコ内の表示についても活性汚泥処理槽前後のサンプルのときと同様にDNA損傷性判定結果を示している。なお、フミン酸のDNA損傷性については、本研究で適用したフミン酸濃度範囲では検出されなかった。まず、表一六のフミン酸濃度0であるフミン酸無添加系の結果をみ

表一 6 DNA損傷性を持つ3物質のフミン酸添加および無添加における枯草菌Rec-assay結果

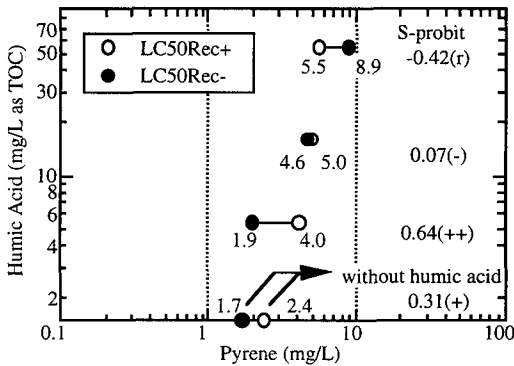
	フミン酸 添加濃度 (mg/L as TOC)	LC50Rec+ (mg/L)	LC50Rec- (mg/L)	S-probit
Pyrene	0	2.4	1.7	0.31(+)
	5.4	4.0	1.9	0.64(++)
	16	5.0	4.6	0.07(-)
	54	5.5	8.9	-0.42(r)
1-Amino- pyrene	0	0.87	0.55	0.41(+)
	5.4	0.76	0.61	0.19(-)
	16	0.65	0.60	0.07(-)
Benzo(a) pyrene	0	0.14	0.16	-0.09(-)
	5.4	0.17	0.15	-0.07(-)
	16	0.17	0.20	-0.13(r)
	54	0.28	0.26	0.06(-)



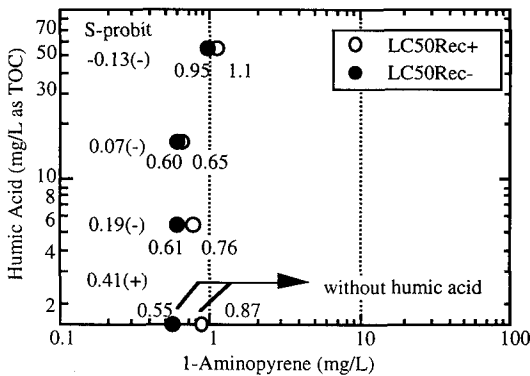
図一 6 Benzo(a)pyreneのフミン酸添加，無添加におけるRec-assay結果

ると、1-AminopyreneはLC50Rec+が 0.87mg/L 、LC50Rec-が 0.55mg/L 、S-probitが 0.41 とDNA損傷性陽性と判定されたのをはじめ、Benzo(a)pyreneはLC50Rec+が 0.14mg/L 、LC50Rec-が 0.16mg/L と低く、毒性レベルとしては他の2物質より高かったが、S9-mixを添加しないこの実験系ではS-probitが 0.09 とDNA損傷性陰性と判定された。

次にフミン酸添加によるDNA損傷性緩和効果についてみてみると、図一4のPyreneについてはフミン酸の添加量を5.4、16、54と増やすとそれぞれRec+で4.0、5.0、5.5、Rec-で1.9、4.6、8.9と毒性の低減効果がみられただけでなく、S-probitも0.64、0.07、-0.42とフミン酸添加量5.4(mg/L as TOC)で強陽性と判定されたものの、さらに添加量を増やすとDNA損傷性陰性、さらには逆転に転じた。このことから、本研究においてはフミン酸添加によりPyreneのDNA損傷性緩和効果があることが示されたといえる。また、図一6のBenzo(a)pyreneについてもフミン酸添加濃度を増やすに従ってLC50Rec+で0.14、0.17、0.28、LC50Rec-で0.15、0.20、0.26とPyreneほど顕著ではないものの毒性の低減効果が確認できた。それに対して図一5の1-Aminopyreneでは、フミン酸添加量を54(mg/L as TOC)まで上げたときには無添加の時に比べてLC50Rec+で0.87から1.1に、さらにS-probitで0.44から0.13とDNA損傷性が陽性から陰性に転じてDNA損傷性改善効果がみられたが、フミン酸添加量が比較的少ない5.4および16 (mg/L as TOC)では無添加のときとほぼ同等な結果となった。この理由としては、枯草菌Rec-assay法で採用しているNutrient Broth中にはPeptoneやYeast Extractなどのタンパク質を含有しており、これらの物質はフミン酸よりも容易にDNA損傷性物質等の化学物質を収着することが原因として考えられる。つまり、1-



図一 4 Pyreneのフミン酸添加，無添加におけるRec-assay結果



図一 5 1-Aminopyreneのフミン酸添加，無添加におけるRec-assay結果

Aminopyreneは他の2種のPAHとは異なってイオン化しやすい構造であることから、フミン酸添加量が少ない際にはフミン酸ではなくNutrient Broth中のこれらの物質への吸着が支配的になったことから、枯草菌と反応して毒性を発現する量にほとんど変化がなかったものと推測される。つまり、この系ではNutrient Broth 自身に毒性物質を吸着してその毒性評価結果を緩和させる効果があり、フミン酸のDNA損傷性といった毒性緩和効果を測定することには若干の問題があることは否めない。

5. まとめ

本研究において得られた知見を以下にまとめる。

最初に下水処理場の活性汚泥処理槽前後のサンプルを枯草菌Rec-assayに適用した結果、フミン酸無添加系では活性汚泥処理槽前のサンプルからDNA損傷性は検出されなかったものの、活性汚泥処理槽後のサンプルでは強いDNA損傷性を検出し、活性汚泥処理プロセスでのDNA損傷性物質の除去率の不十分さが指摘された。また、フミン酸添加系では活性汚泥処理後のサンプルではフミン酸添加量の増加に伴わずにDNA損傷性緩和効果がみられたものの、活性汚泥処理槽前のサンプルではフミン酸添加量を増やしてもDNA損傷性緩和効果はみられなかった。これは実験操作中に添加するフミン酸よりもサンプル濃縮時に混入することが予想される共存有機物質の影響が強いことによるものと考えられる。

次に、Pyrene, 1-AminopyreneおよびBenzo(a)pyreneの3物質についてフミン酸添加系および無添加系で枯草菌Rec-assay法の前処理として用いられてきたXAD-2樹脂を用いた固相抽出法を行った。その結果、PyreneおよびBenzo(a)pyreneでは、フミン酸添加系と無添加系でほぼ同じ回収率が得られ、フミン酸などの共存物質を含む試料水のDNA損傷性物質もXAD-2樹脂により抽出することが可能であり、これらが枯草菌Rec-assay法に適用されていることが示唆された。また1-Aminopyreneについてはフミン酸無添加系では回収率が高かったものの、添加系ではほとんど回収されなかった。しかしこれは1-Aminopyreneのフミン酸との吸着に物理的吸着のみならず化学的結合も関与していること、フミン酸の回収率が高かったことから、HPLCのカラム内においてフミン酸と1-Aminopyreneを分離できずに抽出試料中に存在する1-Aminopyreneの一部が見かけ上検出されなかった可能性があること等により、添加系の場合も無添加系に近い回収率が得られているも

のと推定された。これらのDNA損傷性物質についてフミン酸添加の有無によりXAD-2による回収率が変わらないという結果、そして活性汚泥処理槽前後でDNA損傷性が改善されていないという先の結果を合わせると、活性汚泥処理プロセスにおけるDNA損傷性物質の除去率の不十分さが改めて強く示唆されたといえる。

さらにPyrene, 1-Aminopyrene, Benzo(a)pyreneの3物質について、フミン酸添加および無添加の条件においてS9-mixを導入しない直接変異原試験系で枯草菌Rec-assayを適用した。そのうち、Pyreneについてはフミン酸添加量の増加に伴いDNA損傷性が陽性から陰性に転じ、DNA損傷性緩和効果がみられた。またBenzo(a)pyreneについてはPyreneほどではないものの毒性の低減効果がみられた。それに対して1-Aminopyreneについては少量のフミン酸添加ではフミン酸無添加系とほぼ同様で、フミン酸添加量を最も多くした系でDNA損傷性緩和効果がみられた。これはPyrene, Benzo(a)pyreneなどのPAHと1-AminopyreneなどのAminopyrene類との間でアミノ基の有無によって、Nutrient Broth 中に含まれるタンパク質等への吸着特性が異なることに起因するものと考えられる。

今後の課題としては、枯草菌Rec-assayの試験中に使用するNutrient BrothやDMSOと対象物質との親和性についても考慮して、菌体と対象物質が十分に反応するPreincubation条件を検討する必要がある。またXAD-2樹脂による回収実験についても、XAD-2を用いた方法からXAD-2とほぼ同様のポリスチレン系の固相であるCSP-800カートリッジを用いたより簡便な方法への移行が検討されており、今後は共存有機物質の含まれる試料水でのDNA損傷性物質のCSP-800による回収効率に関しても研究を進めていくことが重要であろう。一方、本研究において活性汚泥処理槽におけるDNA損傷性物質の除去率の不十分さが改めて指摘されたことから、これらの物質の活性汚泥処理プロセスにおける挙動について、フミン酸の影響を含めて研究を進めていくことも不可欠であるといえる。

さらに本研究においてもDNA損傷毒性だけでなく高い細胞毒性を持つと考えられるサンプルにおいて、Rec+の生存率がRec-の生存率を下回る逆転現象がみられたことから、Probit変換を用いた結果の評価方法の再検討とともに、他のバイオアッセイにおいて一般的に利用される菌の増殖率による評価を検討すること、Rec+菌とRec-菌の組換え修復機構以外の差異を検索することなどが挙げられる。

参考文献

- 1) Graham, H. N.: Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry, *Preventive Medicine*, Vol.21, pp.334-350, 1992.
- 2) Mukhtar, H., Wang, Z. Y., Katiyar, S. K. and Agarwal, R.: Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects, *Preventive Medicine*, Vol.21, pp.351-360, 1992.
- 3) Serafini, M., Ghiselli, A. and Ferro-Luzzi, A.: *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man, *European Journal of Clinical Nutrition*, Vol.50, pp.28-32, 1996.
- 4) Katiyar, S. K., Agarwal, R. and Mukhtar, H.: Green tea in chemoprevention of cancer, *Comprehensive Therapy*, Vol.18, No.10, pp.3-8, 1992.
- 5) Sato, T., Ose, Y. and Nagase, H.: Desmutagenic effect of humic acid, *Mutation Research*, Vol.162, pp.173-178, 1986.
- 6) Ribas, G., Carbonell, E., Creus, A., Xamena, N. and Marcos, R.: Genotoxicity of humic acid in cultured human lymphocytes and its interaction with the herbicides alachlor and maleic hydrazide, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol.29, pp.272-276, 1997.
- 7) 仙波範明, 紺野貴史, 滝上英孝, 松井三郎: 環境水中のDNA損傷性評価と試料濃縮方法について検討, 環境工学研究論文集, Vol.30, pp.235-242, 1993.
- 8) 松井三郎: 環境にやさしい下水道のあり方に関する調査, 土木学会編, 平成5年度版, 1993.
- 9) 篠塚則子: フミン物質と有機汚染物質の相互作用, 水環境学会誌, Vol.18, No.4, pp.261-265, 1995.
- 10) 筒木潔: フミン物質の生成機構とその性質, 水環境学会誌, Vol.18, No.4, pp.252-256, 1995.
- 11) Malcolm, R. L. and MacCarthy, P.: Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 20, No 9, pp904-pp.904-911, 1986.
- 12) Suffet, I. H. and MacCarthy, P. (eds.): *Aquatic humic substances and their influence on the fate and treatment of pollutants*, American Chemical Society, Washington D.C., pp.381, 1989.
- 13) 原田淳, 山敷庸亮, 山下尚之, 清水芳久, 松井三郎: 湖沼底泥中の微量有機汚染評価のための指標物質の検出 - 琵琶湖赤野井湾を対象として -, 環境工学研究論文集, Vol.33, pp.341-348, 1996.
- 14) *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Polynuclear Aromatic Compounds*, 1984.
- 15) 環境庁環境化学物質研究会: 環境化学物質要覧, 丸善, 1988.
- 16) 田島彌一郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶: 環境変異原実験法, 1980.
- 17) 松井三郎, 環境微生物工学研究法, 技法堂出版, 367-370, 1993.
- 18) Matsui, S., Takigami, H., Matsuda, T. and Shimizu, Y.: DNA toxicity assessment of polluted and clean waters, *The Proceedings of Workshop Monitoring Tailor-made II Nunspeet*, the Netherlands, pp.185-191, 1996.
- 19) 山吉孝雄, 土井均, 奥村為男, 山本正規: 水道協会雑誌, Vol.58, No.10, 1989.

(1997. 8. 25 受付)

EVALUATION ON DIMINISHING EFFECTS OF DNA DAMAGING POTENTIAL BY HUMIC SUBSTANCES USING THE *BACILLUS SUBTILIS* REC-ASSAY

Hiroshi YAMAMOTO, Hidetaka TAKIGAMI, Yoshihisa SHIMIZU
and Saburo MATSUI

Antimutagenic effect of humic substances has been reported by various investigators. In this research, the diminishing effect of DNA damaging toxicity by humic acid was evaluated for the influent and effluent of activated sludge tank receiving municipal wastewater and several DNA damaging chemicals [e.g., pyrene, 1-aminopyrene and benzo(a)pyrene] using *Bacillus subtilis* rec-assay. The diminishing effect was not apparent for influent but observed in the effluent. Among the DNA damaging chemicals, the DNA toxicity was effectively suppressed by humic acid for pyrene and benzo(a)pyrene. However, the effect was relatively smaller for 1-aminopyrene.