

(24) 環境水のDNA損傷性評価と試料濃縮方法についての検討

EVALUATION OF DNA TOXIC POLLUTION IN THE WATER ENVIRONMENT AND EXAMINATION OF THE CONCENTRATION METHOD TO APPLY WATER SAMPLES

仙波範明**・紺野貴史*・滝上英孝*・松井三郎*

Noriaki SEMBA**, Takashi KONNO*, Hidetaka TAKIGAMI*, Saburo MATSUI*

ABSTRACT; The *Bacillus subtilis* rec-assay which can detect DNA toxicity was applied to water samples from various points and non-point sources.

In the application of the assay, there are technical problems such as a concentration method of DNA toxic substances. In general, there is a close relationship between biological concentration factor and Pow (Octanol-water Partition Coefficient). Hydrophobic chemicals whose value of Pow is high, have more significant effects in ecological toxicity including DNA toxicity. This means that the selection of concentration methods of DNA toxic substances in water, should focus on better capacity of absorption of hydrophobic substances. Four kinds of resins, XAD-2, XAD-4, Blue-rayon and Sep-Pak Plus C18 were examined in the capacity of absorbing hydrophobic chemicals. XAD-2 and XAD-4 resins were found to be better among the four.

The application of the assay using XAD-2 resin was conducted for the samples of municipal sewage, primary treatment effluent, secondary treatment effluent, night soil treatment effluent, rain water and run-off water. We could detect DNA toxicity in all the samples, which means DNA toxic pollution extended widely in our environment.

KEYWORDS; *Bacillus subtilis*; rec-assay; DNA toxicity; concentration method; Pow

1. はじめに

Amesテストやumuテスト、Rec-assay等の変異原性試験やDNA損傷性試験は、本来発ガン性試験のスクリーニングとして開発された微生物を用いたin vitro試験である。しかし、水道水中に発ガン性物質の存在が明らかになって以来、これらの試験を水道水やその水源である河川水、湖沼水に適用し、汚染状況を把握しようとする研究が行われ、多くの成果をあげてきている^{1)~5)}。筆者らも、琵琶湖・淀川水系において、枯草菌Rec-assayを用いた調査を行い、調査した全ての地点でDNA損傷性を認めている⁶⁾。

ところで、上記のような試験を環境水に適用する際には、試験の感度の問題上、環境水を濃縮する必要がある。濃縮方法には、Dichloromethane等の有機溶媒による液々抽出法、エバポレーターによる直接乾固法、凍結乾燥法、及び逆浸透膜法等があるが、最もよく用いられているのがXAD樹脂やBlue-rayonによる固相吸着法である。しかし、この際に用いられる吸着剤には様々なものがあり、比較的好く用いられているもの

*京都大学工学部附属環境微量汚染制御実験施設 〒520 大津市由美浜1-2

Kyoto Univ. Lab. for Control of Env. Microplutants, 1-2 Yumihama, Otsu City, 520

**三菱重工業株式会社

に限っても4、5種類になる。どの吸着剤を用いて濃縮を行うかということは、試験結果に大きな影響を及ぼす⁷⁾。そこで本研究では、現在、環境水の濃縮によく使用されている4種類の吸着剤について、その物質選択性を調べるとともに、同一の水試料をこれらの吸着剤を用いてそれぞれ濃縮試料を作製し、枯草菌Rec-assayに供することによって、その試験結果がどのように異なるのかを確認した。そして、これらの結果から、変異原性試験やDNA損傷性試験の前処理に最適な吸着剤について検討を行った。

また、前述した琵琶湖-淀川水系での調査結果を踏まえて、河川水中に存在していると考えられるDNA損傷性物質が、どのようなものに由来しているのかを明らかにするために、汚染源と考えられる下水処理場やし尿処理場の放流水、近年水質への影響が問題となっている非特定汚染源(Non point source)として代表的な雨天時の路面雨水流出水等を対象に、DNA損傷性の調査を行ったので、Rec-assayの環境水への適用例として併せて報告する。

2. 枯草菌Rec-assay法

枯草菌(*Bacillus subtilis*)とは、好気性、グラム陽性の桿菌で、土壌、枯草、塵埃中など自然界に広く分布している細菌である⁸⁾。枯草菌Rec-assay法では、枯草菌の野生株 H17 (Arg⁻, Trp⁻, RecE⁺, 以下Rec⁺とする)と組換え修復機構欠損株 M45 (Arg⁻, Trp⁻, RecE⁻, 以下Rec⁻とする)を用い、両者のDNA修復機構の違いを利用して、化学物質のDNA損傷性を検出する。すなわち、Rec⁺菌はDNAに傷を受けたとしてもそれを修復することができるが、Rec⁻菌はrecEという遺伝子を欠いており、DNAの修復能力がRec⁺菌にくらべると劣っている。したがって、仮に検定試料がDNA損傷性をもっている場合、Rec⁺菌とRec⁻菌の生存率に差が生じ、Rec⁻菌の生存率の方が低くなる。DNA損傷以外の原因によって増殖が阻害された場合には、両方とも同じ阻害を受けることになるので生存率に差は生じない。したがって両株の増殖阻害曲線のずれによって、試料のDNA損傷性を検出することができる(図1参照)。

また、変異原性試験やDNA損傷性試験では、生体中での代謝を考慮するため、代謝活性化酵素系S-9mixを添加することがある。S-9mixを添加する場合を間接変異原性試験、添加しない場合を直接変異原性試験という。

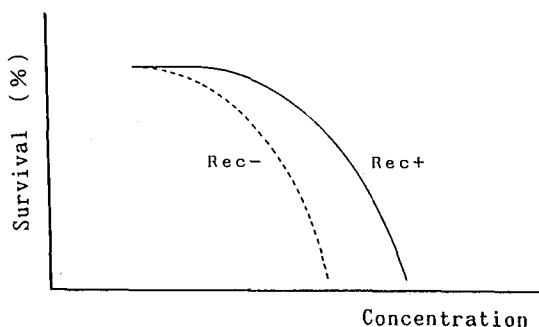


Fig.1 Rec-assay for DNA damaging sample

3. 濃縮方法について

3.1 濃縮の対象物質

前述したように環境水の変異原性試験やDNA損傷性試験を行う際には、試験の感度の問題上、濃縮が不可欠である。従来の研究では、試験の結果のみから濃縮方法の最適化を考えている場合が多い。すなわち、変異原性やDNA損傷性が強く出る濃縮方法が最もよい方法であると結論づけているものがほとんどである。しかし、DNA損傷性や変異原性をもつ物質は多種多様であり、またその物質自身はそのような毒性をもたないものの、他の物質の毒性を強めたり、逆に弱めたりするものも存在している。このような物質を漏れなく捕捉する、つまり「環境水のDNA損傷性」を濃縮することは困難であるといえる。濃縮とは、その対象となる物質を分離、回収する操作であり、濃縮方法については、どのような物質を、どれだけ回収できるのかという2点から検討する必要がある。どれだけ回収できるかという定量的な点は、その物質の回収率によって判断できるが、どのような物質をという定性的な点は、その実験の目的によって決まるものである。

すなわち、実験の対象物質が何であるのかが重要となる。そこで環境水のDNA損傷性を評価する際には何らかの判断基準から、評価の対象とする物質を想定することが重要であると考え、本研究では、どのような物質をという定性的な点に重点をおき濃縮法について検討を行った。

DNA損傷性や変異原性、ひいては発ガン性と言った毒性は、数年から数十年という比較的長期的なものである。このような長期的な生体への影響で重要なのが生物濃縮の問題である。環境中の化学物質が生体に影響を及ぼすまでの過程は、図2のように表される⁹⁾。すなわち、作用の発現までには、膜透過や作用部位までの移動といった輸送と、作用部位での反応という2つの過程がある。一般に、生物濃縮と膜透過等の輸送過程には深い係わりがあるといわれ、生物濃縮係数(Bioconcentration Factor :BCF)と膜透過性を表す水-オクタノール分配係数(Octanol-Water Partition Coefficient :Pow)の間には図3に示すような相関がみられる¹⁰⁾。すなわち、Powの大きな物質ほど生物濃縮されやすいということになる。

また、Powと生物を用いた毒性試験の結果との間にも、しばしば良好な相関関係がみられる。そこで、枯草菌Rec-assayの結果とPowの相関関係を調べた。その結果を図4に示す。用いた物質はChloroform、Trichloroethylene等有機塩素化合物13種、アルデヒド2種、芳香族アミン1種、その他1種の計17の化合物であり、LC₅₀の値はすべてS-9mixを添加しない直接試験のRec-菌のものである。図4からわかるようにLC₅₀の対数値とPowの対数値の相関は、右下がりの直線関係になっている。これらの物質については、Powの値が大きいものほどLC₅₀値が小さい、すなわち毒性が強いことがわかる。Rec+菌についても同様の結果を得ている。したがって、Rec-assayにおけるRec+およびRec-に対する毒性には、膜透過性が大きく影響している。

以上のことから、濃縮の対象とする物質としては、水-オクタノール分配係数を考慮することが重要であると考えられる。すなわち、分配係数の大きい物質に対して選択性をもつ吸着剤が、環境水のDNA損傷性試験を行う際の濃縮には最も適しているといえる。

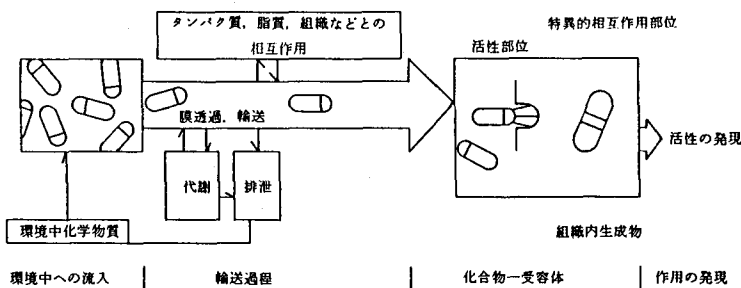


Fig.2 Model of transport and interaction of environmental chemicals with reacting sites in a living body

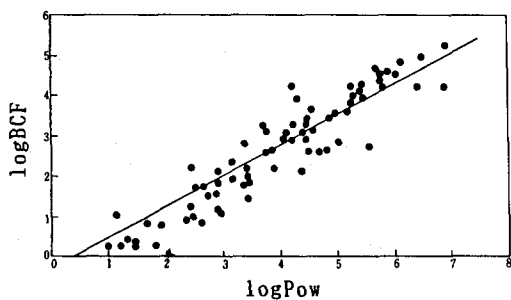


Fig.3
Correlation between Bioconcentration Factor(BCF) and n-Octanol-Water Partition Coefficient(Pow)

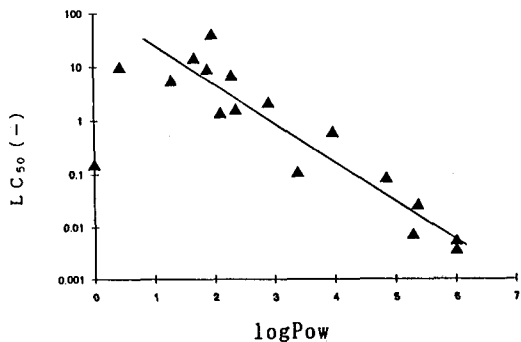


Fig.4
Relationship between Pow and LC50 values of Rec-

3.2 実験方法

DNA損傷性や変異原性の試験の前処理として、環境水を濃縮するために現在よく用いられている4つの吸着剤、XAD-2、XAD-4、Blue rayon及びSep-Pak Plus C18（以下Sep-Pakと記す）について、これらの吸着剤の物質選択性を調べるために、密閉系での吸着実験を行った。この4つの吸着剤はいずれも疎水性の有機物に対して選択性をもっているといわれている。また、下水2次処理水を試料水として、これら4つの吸着剤を用いて濃縮を行い、作製した濃縮試料を枯草菌Rec-assayで試験した。この結果から、濃縮に用いる吸着剤の違いが試験結果にどのように影響するのか、さらに、処理水中のDNA損傷性物質や細胞毒性物質がどの程度濃縮、回収されているかについて考察する。以下にそれぞれの実験方法について説明する。

(1) 吸着実験

実験に用いた物質は、鎖状有機塩素化合物4種（Chloroform, Carbon tetrachloride, Trichloroethylene, Tetrachloroethylene）、芳香族有機塩素化合物2種（o-Dichlorobenzene, 1,2,4-Trichlorobenzene）、及びアゾ染料1種（C.I.Reactive Red 22, 以下Dye Red B）の計7種である。

実験は、フランビン（容量102mL）を用いた密封系で行った。以下に実験手順を示す。

①各吸着剤を1.0g量りとり、フランビン中に入れる。Sep-pakについては吸着剤量はカートリッジ1個分、すなわち0.36gとした。

②濃度1mg/Lで作製した溶液をフランビンに満たし、気泡が入らないようにフタをする。

③振とう機中で、20℃、120rpmの条件下で振とう吸着させる。

④十分平衡に達してから、その平衡濃度を測定し、吸着率を算出する。

各物質の測定方法は次のとおりである。鎖状有機塩素化合物はECDを用いてヘッドスペース・ガスクロマトグラフ法^{11)・12)}で濃度を測定した。芳香族有機塩素化合物の濃度は、ヘキサン抽出の後、鎖状のものと同様にECDで測定した。アゾ染料は、UV（波長512nm）で濃度の測定を行った。

(2) 同一試料水（下水2次処理水）による濃縮方法の比較実験

試料水の通水、濃縮に用いた実験装置を図5に示す。

試料水には下水2次処理水各10Lを用いた。吸着剤の量はXAD-2、XAD-4は各50mL（重量は46.3gと47.3gになる）、Blue rayonは5gであり、またSep-pakは0.36g入りのカートリッジ4個を用いた。通水速度は10 mL/min、温度条件は20℃とした。

XAD-2、XAD-4及びBlue rayonについては、通水終了後、窒素ガスを通じて水層を除去、吸着剤をビーカーに取り出し、その後Ethanol 300mL及びDiethylether 300mLで吸着した物質を抽出した。そして、ロータリーエバポレーターを用いて、抽出液から溶媒を除去、蒸発乾固させ、残渣をDMSO 5mLに溶解し、濃縮試料とした。Sep-pakについては、窒素ガスを通じた後、ガラス製のシリンジを用いてEthanol及びDiethyletherを通じ、吸着質を脱離させた。通過速度は100mL/hrであり、溶媒の総量は他の吸着剤と同じ量で行った。その後の操作は他の吸着剤と同様である。作製した試料の濃縮倍率は2000倍である。

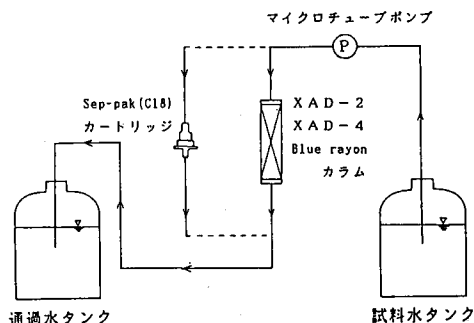


Fig.5 Apparatus of concentration of environmental samples

3.3 実験結果及び考察

XAD-2とBlue rayon、及びSep-pakについて、(1)の吸着実験の結果をそれぞれ図6、図7、図8に

示す。図の横軸について、DYEとは、Dye Red Bのことである。以下、CF ; Chloroform、TCE ; Trichloroethylene、CTC ; Carbontetrachloride、PCE ; Tetrachloroethylene、DCB ; o-Dichlorobenzene、TCB ; 1,2,4-Trichlorobenzene、という対応になる。また、分配係数の不明なDYEを除いて、左から分配係数の小さいものから順に並べており、最も小さいCFは1.94、最大のTCBは3.98（いずれも対数値）である。図6より、XAD-2については、DYEとCTCの吸着率が他の物質に比べてやや低いが、物質の選択性については今回の対象物質の範囲では偏りが小さく、ほぼ7種類の物質を吸着できると考えてよいと思われる。これに対して、図7からわかるようにBlue rayonではこれらの物質の吸着がほとんど見られない。Sep-pakは、両者の中間的な結果であり、CF、CTC及びTCEの吸着率が、他の物質より低くなっていることがわかる。この結果より、Sep-pakは、これらの物質の回収について、XAD-2、XAD-4に劣っているといえる。結果は示さないが、XAD-4はほぼXAD-2と同様の結果であり、この両者は、今回の実験の対象とした物質では、吸着率に大きな差はなく、無極性の樹脂とはいうもののある程度広い範囲の物質を吸着しているものと考えられる。今回用いた物質は、いずれも水環境中での存在が問題視されている物質であり、最も小さい分配係数をもつChloroformでさえ、試験対象と考えるべき物質であるといえる。

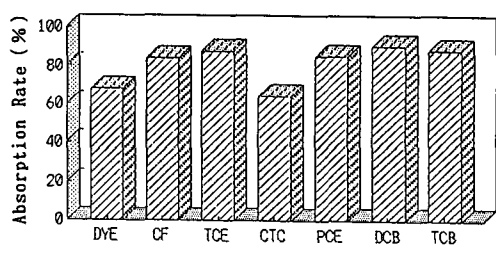


Fig.6 Absorption of various chemicals by XAD-2

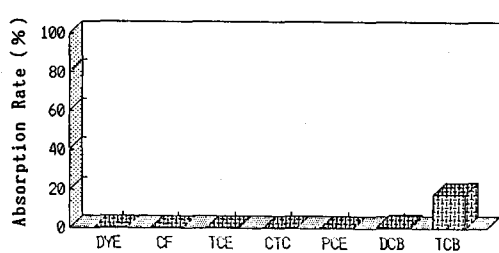


Fig.7 Absorption of various chemicals by Blue rayon

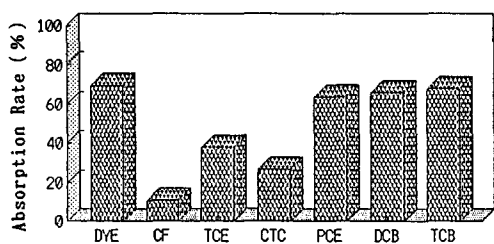


Fig.8 Absorption of various chemicals by Sep-pak

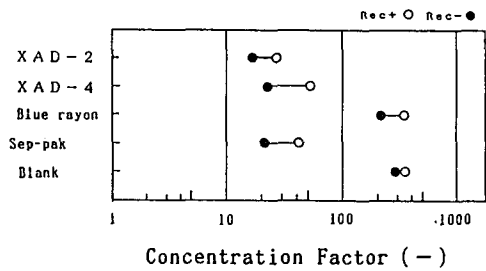


Fig.9

LC50 values obtained by various concentration resins

実際の環境水を用いて行った実験（2）によって得られたRec-assayの結果を図9に示す。図の横軸には水試料の濃縮倍率をとっている。吸着剤の違いによって試験結果がどのように異なるのかをみると、まずBlue rayonのLC₅₀の値がRec+、Rec-ともに、他の吸着剤に比べて非常に大きい、これは実験（1）の結果から、限られた狭い範囲の物質のみを吸着しており、その他の多くの微量汚染物質については、あまり吸着できないためであると考えられる。残りの3つの吸着剤の試験結果をみると、Rec-についてはそれほど大きな差が見られないのに対してRec+では、XAD-4、Sep-pakに比べXAD-2のLC₅₀の値がやや小さくなっている。

Rec-assayの結果得られたRec+、Rec-のLC₅₀の値を図10に示す。下水処理場の処理過程でのDNA損傷性物質の消長についてみれば、流入水に比べ1次処理水の毒性が強くなり、2次処理水になると毒性は弱くなり水質は改善され、処理の効果が現れている。1次処理水の水質が流入水より悪化する原因は、污泥処理系からの編流水による。表1に示されているTOC、E-260の値からもそのことが裏付けられている。しかし、改善された2次処理水の値でさえ、Blankに比べると毒性が強く、河川や湖沼のDNA損傷性物質による汚染の一因になっていると考えられる。し尿処理水のDNA損傷性は都市下水処理水と比べると少ないといえるが、かなり残っていることがわかる。このことから現在、広く排水処理に用いられている活性污泥法では、DNA損傷性をもつ物質の除去が十分に行えない可能性があると考えられる。

図11に路面雨水流出水の①と②、及び雨水のRec+ならびにRec-のLC₅₀値を示す。同じ日の試料ではないのでその点に注意する必要があるが、雨水のLC₅₀値に比べ、路面雨水流出水①のLC₅₀値は、左の方へ移動しており、毒性が増加していることがわかる。これは、自動車の排ガス中に含まれている物質や路面とタイヤとの摩擦によって生じる物質等、路面に付着していたものが、雨水によって洗い流されて水中に溶解し、その影響が現れたものといえる。また、大気中にも、Benzo(a)pyrene等の芳香族炭化水素や、そのニトロ置換体であるニトロアレーン等の変異原物質やDNA損傷性物質が存在していることが、明らかになっており、これらの影響があるものと思われる。また、路面雨水流出水②についても、①ほどではないが、わずかながら毒性が強まっている傾向が見受けられる。これも①の場合と同様の物質によるものと思われる。さらに、雨水にも他のものと比べると弱いものではあるがDNA損傷性が見られ、大気汚染の影響が確認できた。

また、今回の調査をみる限り、路面雨水流出水の2試料及び雨水のDNA損傷性が陽性であったことは、降雨後の河川や湖沼に流れ込む水量を考慮すれば、これら非特定汚染源に由来する水が、水環境に対して、非常に大きな影響を与えていることを示唆している。これら非特定汚染源の特徴から、琵琶湖-淀川水系におけるDNA損傷性物質による汚染が、広範囲にわたっている一因とも考えられる。

また、今回の調査をみる限り、路面雨水流出水の2試料及び雨水のDNA損傷性が陽性であったことは、降雨後の河川や湖沼に流れ込む水量を考慮すれば、これら非特定汚染源に由来する水が、水環境に対して、非常に大きな影響を与えていることを示唆している。これら非特定汚染源の特徴から、琵琶湖-淀川水系におけるDNA損傷性物質による汚染が、広範囲にわたっている一因とも考えられる。

5. まとめ

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

濃縮方法については生物濃縮とRec-assayの試験結果との相関から、水-オクタノール分配係数に着目し、濃縮に最適な吸着剤について検討、XAD-2、XAD-4樹脂が適当であるとの結論を得ることができた。また、下水処理場放流水等の環境水試料について、DNA損傷性の調査を行い、下水処理場やし尿処理場の放流水、雨天時の路面流出水ならびに雨水についてもDNA損傷性が認められた。

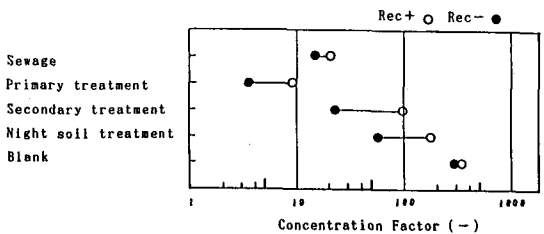


Fig.10
LC50 values of different wastewater treatment stages

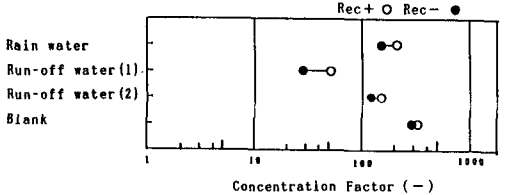


Fig.11
LC50 values of run-off water from a road and rain water

このように同じ水試料であっても、吸着剤が異なると全く違う試験結果になってしまう。濃縮が必要不可欠なものである以上、どのような濃縮を行うのかは非常に大きな問題である。

以上の実験結果から、環境水のDNA損傷性試験を行う際の濃縮方法としては、本研究で用いた樹脂の中では、Powを判断基準として問題視される物質を広く吸着できると考えられるXAD-2、XAD-4を用いるのが適当であると考えられる。

4. 環境水のDNA損傷性 一下水処理場放流水等－

4.1 調査対象

調査対象とした下水処理場は〇市のもので、都市部の生活排水が流入水の中心であり、一部工場排水も含まれている。処理方法は、標準活性汚泥法であり、放流水は塩素処理されている。この下水処理場の流入水（着水井で採取）、1次処理水（ばっき槽の流入時に採取）、及び2次処理水（塩素処理済み、放流水）について枯草菌Rec-assay法でDNA損傷性を調査した。なお、1次処理水には汚泥濃縮、脱水処理工程からの返送水が混入している。

し尿処理場も〇市のものを調査対象とした。処理方法は、1次処理として湿式酸化、2次処理として活性汚泥法の2段階処理法、さらに高度処理として生物学的硝化脱窒処理、リンの凝集沈澱処理、及び砂ろ過と活性炭吸着処理を行っている。

雨天時の路面流出水については、滋賀県の県道大津湖岸線の京都大学工学部附属環境微量汚染実験施設前大津市由美浜の交差点で採取した。この道路は、大津市内を東西に通る幹線道路であり、交通量は多い。また、他の時期ではあるが、同じ場所で採取した雨水についても、Rec-assayの試験対象とした。

濃縮には、XAD-2を用いたが、下水処理場の試料のうち流入水と1次処理水については、浮遊物が非常に多く、ガラスウールとろ紙No.5Aによる除去だけでは不十分で、濃縮試料中にも浮遊物がみられたので、20 μ mのメンブレンフィルターを通し、試験に供した。また、雨天時の路面流出水についてはSS成分が多く、SS分にもDNA損傷性物質が存在する可能性や、DNA損傷性物質がSS分に吸着していることも考えられる。そこで、ろ過後にろ紙を約2cm四方に切り、Diethylether500mLに浸し、2時間静置抽出を行った。抽出液は、XAD-2樹脂からのものと同様に、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固させ、残渣を10mLのDMOに溶解させ濃縮試料とした。このろ紙上の物質から抽出した濃縮試料についても、Rec-assayを行った。

4.2 調査結果

表1に各試料の採水時、E-260、TOC及びRec-assayの解析結果を併せて示す。雨天時の路面流出水については、XAD-2樹脂によって濃縮した試料を路面雨水流出水①、ろ紙上より抽出したものを路面雨水流出水②とし、以下この名称で記述する。

TABLE 1 Results of Rec-assay of effluents from a municipal wastewater treatment plant, a night soil treatment plant, run-off water from a road and rain water

Samples	Date of Sampling	E-260	TOC (mg/L)	LC50Rec+ C.F.	LC50Rec- C.F.	S-Probit
Municipal sewage	'92.12.10	.269	16.7	20.43	14.98	.27(+)
Primary treatment	'92.12.10	.674	25.0	9.21	3.21	.91(++)
Secondary treatment	'92.12.10	.065	5.0	96.27	24.59	1.19(++)
Night soil treatment	'92.02.21	.014	6.0	175.16	57.87	.96(++)
Run-off water①	'92.07.10	.174	10.8	52.16	28.03	.54(+)
Run-off water②	'92.07.10	.174	10.8	149.06	118.41	.20(+)
Rain water	'92.11.20	.114	9.3	203.86	152.32	.25(+)

謝辞

本研究を進めるに当たり、日本生命財団の研究助成を受けたこと及び、滋賀県琵琶湖研究所の委託研究の成果の一部が発表されていることを記して、ここに感謝します。

参考文献

- 1) S.Maruoka, S.Yamanaka: Environ.Sci.Technol., 17, 3, 177-180, 1983
- 2) 阪本 博、早津彦哉: 環境変異原研究, 12, 41-45, 1990
- 3) Y.Sayato, K.Nakamuro, H.Ueno and R.Goto: Mutation Research, 242, 313-317, 1990
- 4) 佐谷戸安好、中室克彦、上野 仁、長谷川達也、後藤里花: 水道協会雑誌, 60, 6, 12-20, 1991
- 5) 篠目貴大、浦野紘平: 第21回水質汚濁学会講演集, 249-250, 1987
- 6) 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, 37-44, 平成3年度版
- 7) 金澤伸浩、高梨啓和、藤江幸一、浦野紘平: 第25回水質汚濁学会講演集, 204-205, 1991
- 8) 天児和暢: 微生物, 5, 4, 1989
- 9) 薬事公衆衛生学, 小瀬洋喜編, 廣川書店, 250-255, 1986
- 10) 化学物質の物理化学性状測定法, 日本環境協会編, 産業図書, 1987
- 11) 環境庁水質保全局: 水質汚濁に関する環境基準等の項目追加等についての答申, 1989
- 12) 衛生試験法・注解, 日本薬学会編, 金原出版, 1990