

〈はじめに〉

現在様々な化学物質の製造に伴う技術の発展により、我々の生活水準は大幅に向上したが、一方で有害な化学物質が日々環境中に放出されている。過去に発生した水俣病やイタイイタイ病などはその放出される物質に対して十分な策を講じなかったゆえに発生した代表的な事例であり、これを機に我が国では様々な事業に対して規制が敷かれた。しかし非特定汚染源から排出される有害化学物質は面的に広く分布し、規制することが困難で、動態解明が強く求められている。そこで本研究グループでは燃焼という幅広く普遍的な発生源を持ち、発がん性もあるとされている多環芳香族炭化水素(PAHs)を指標として捉え、このPAHsの定量化とバイオアッセイを組み合わせ大気や海洋などの各ステージにおける微量有害物質の環境毒性評価を行ってきた¹⁾。バイオアッセイの方法は多岐にわたるのだが、本研究では標準化された手順で、また豊富なデータベースがある海洋性発光細菌を用いた毒性試験で研究を行ってきた。この試験法は海洋性発光細菌にサンプルを曝露させ、発光量の減少からそのサンプルの毒性をみる試験である。PAHsをはじめとする有害化学物質はその疎水性ゆえに粉塵や底質に吸着している状態で環境中に存在しているものが多く、それゆえ本研究では採取してきたサンプルに対し抽出、濃縮といった前処理を行い、それを試験に用いるといった方法で研究を行ってきた。この前処理はこの分野における一般的な操作であり、抽出法や溶媒の種類は様々だが、本研究では図1に示す様に行った。ただし前処理を行うにあたっていくつかの問題点が考えられる。その問題とはまず抽出に関しては溶媒の選択性などがある。そして多くの場合抽出に用いる溶媒では試験に用いる生物に対し毒性を示す為、溶媒転移という操作を行う。しかしこの溶媒転移に関しても、物質のロスや転移後の溶媒の毒性といった問題が考えられる。また他にも濃縮がもたらす問題もあり、本来無害な物質が濃縮によって微生物に対し毒性を示す程高濃度になる可能性がある。そこで本研究ではこの前処理の問題の中で溶媒転移後の溶媒の毒性の有無、濃縮による無害性物質の高濃度阻害に着目し、これらの問題を検討した。

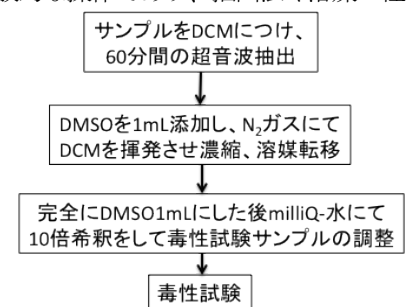


図1 前処理フロー

〈実験方法〉

1.海洋性発光細菌を用いた毒性試験方法

毒性試験の方法を示す。まずは希釈系列を作成し(1 ウェルに $100\mu\text{L}$ 。1 倍の系は検液 $100\mu\text{L}$ で、他は 2 倍、4 倍と倍希釈してゆく。)、全ての系に発光細菌を曝露させ($100\mu\text{L}$ 曝露し、最終的に 1 ウェルに $200\mu\text{L}$)、15 分後の発光量を測定する。発光量の減少は GAMMA 値を用い、これは消失した発光量/残存している発光量として表され消失した発光量に対してはブランク補正を行う。なお試験に用いた海洋性発光細菌 (*Vibrio fischeri* NRRL B-11177) は ISO 11348-1(2007)の基準に沿って培養し、発光量の測定は発光マイクロプレートリーダー(マイクロテックニチオン社: LP-5000)を用いた。

2.前処理検討方法

まず溶媒転移に関しては、図1の手順では最終的に試験用の検液に DMSO が 10%含まれてしまうので、DMSO に対して直接毒性試験を行い、毒性を示し始める濃度を算出して影響の有無を確認した。また、DCM の揮発は目視で行っているため、微量だが検液に残留し、それが細菌に影響を与えることも考えられる。それゆえ DCM の残留を再現するため、1mL の DMSO に対して 0.01mL、0.05mL、0.1mL の DCM を添加して検液を作成し毒性試験を行なった。

次に濃縮に関して述べてゆく。まずこの問題を検討する際、各ステージの中で本研究は様々な物質の環境動態の終着点である海洋性底質を対象とした。そして高濃度阻害を引き起こす無害性物質として、無機物に関しては海洋水の影響で多く含まれている塩分、そして有機物に関しては糖やタンパクなどの生体起源の一般有機物を選定し、これらの濃縮による影響を調べた。底質は河口付近ではなく、かつ有機物も程よく含まれていることを考慮し、呉湾の底質(IL=11.7%)を検討に用いた。サンプリング地点の詳細な位置情報を表1に示す。そしてこの底質を図1の手順に沿って処理し、最終的に1ウェルごとに $100\mu\text{L}$ の希釈系列が作成され、そこに菌液 $100\mu\text{L}$ を曝露した際に高濃度阻害を引き起こす程の塩分、有機物が抽出されているかを判定した。また抽出に用いる底質の量は 1g とし、この抽出法における最大量で行った。これは最も塩

座標		位置	陸からの距離
北緯	34° 13' 30"	江田島市江田島町秋月沖	0.9km
東経	132° 30' 0"		

表1 底質のサンプリング地点

分、有機物が抽出されやすい条件で検討することで他のケースでの濃縮の問題を包括的に評価できるようにするためである。

次に塩分、有機物の抽出量の測定方法を示す。まず塩分に関しては、1g を超音波抽出する。そして抽出後、本研究で用いる塩分濃度計(HORIBA 社：ES-51)は有機溶媒には対応していないため、milli-Q 水 30mL に溶媒転移を行い塩分濃度を測定する。この濃度から抽出する塩分量が分かり、そして濃縮されて希釈された時の塩分濃度を算出し、高濃度障害があるかを判定するといった流れで行う。またどの程度の塩分濃度で毒性を示すかを明確化させる為、NaCl 溶液に対して毒性試験を行った。

有機物の検討は、まず抽出によって全有機物量の内どの程度の有機物が抽出するかを、抽出前後のサンプルの減少量から、底質の量に IL を乗じたものを含まれている全有機物量(g)とし、それに対して抽出前後の減少した重量を抽出された有機物量(g)とし、それらの比を抽出率(%)として求めた。その結果から抽出に用いるサンプル量(1g)に強熱減量(%)、抽出率(%)を乗じることで抽出される有機物量が分かり、前処理後の有機物濃度を算出し、高濃度障害があるかを判定するといった流れで行う。ここでもまたどの程度の有機物濃度で毒性を示すかを明確化させる為、一般有機物に対して毒性試験を行い、毒性を示す有機物濃度を求めるのだが、塩分と違い無害と考えられる有機物の種類は多岐にわたる為、今回はその中で、糖類としてグルコース、タンパク質としてペプトン、その他にも微生物の培養液に含まれている Brain Heart Infusion Broth、Yeast extract、を対象とし試験を行った。これらの物質はその無害性から他の一般有機物もある程度カバーできると考える。

〈結果と考察〉

まずは DMSO の毒性試験の結果を図 2 に示す。毒性を示し始める濃度の定め方は安全率を考慮し、濃度が高い系からみて GAMMA 値が負の値になっている点の濃度を採用した。この結果から、DMSO が発光細菌に影響を与え始める濃度は 11.3%であった。したがって、DMSO を 10% 含む検液は毒性を示さないことが確認された。また、残留している DCM の影響に関しては、それぞれの毒性試験結果から DCM が毒性を及ぼす残留量を算出したところ、0.003mL 以下であれば影響を示さないことが分かった。したがって、抽出液の溶媒置換を行なう際、DCM の残留量を 0.3%以下に納めるよう注意する必要があると考える。

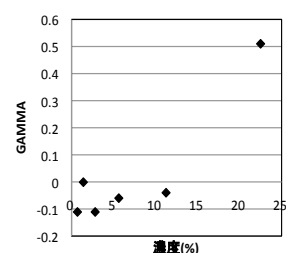


図2 DMSO 毒性試験結果

次に塩分の濃縮についての検討結果を示す。まず NaCl 溶液の毒性試験結果を図 3 に示す。この結果から塩分は濃度が 3.4%以下であれば毒性を示さないということが分かった。ここで実際に底質を用いて上記した流れで抽出した塩分濃度を測定した。結果としては抽出液からは塩分が検知されず、これは塩分が全く抽出していないか、もしくは抽出されているが塩分濃度計の検出限界以下(0.001%以下)であったためと考えられ、図 3 より問題ないといえることが分かった。

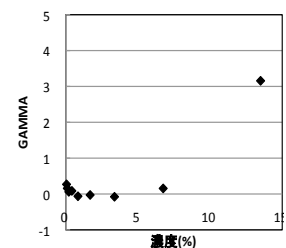


図3 NaCl 毒性試験結果

次に有機物の検討結果について示す。今回は 4 物質に対して試験を行い、結果は物質によって異なっていたが、その中でも最も毒性が強かったペプトンの結果を検討に用いた。試験結果を図 4 に示す。この結果からペプトンは濃度が 0.8%以下であれば毒性を示さないことが分かった。この濃度を、毒性を示し始める有機物濃度とし、底質から抽出される有機物量を上記した式にて算出したところ、 $1(g) \times \text{抽出率}(75.1\%) \times \text{IL}(11.7\%)$ から抽出する有機物量は 0.088g であった。この結果から底質を抽出、1mL に濃縮し、10 倍希釈した毒性用の検液の有機物濃度を算出すると約 0.009% となり、この検液を用いて毒性試験を行ったとしても図より判断すると問題ないといえることが分かった。

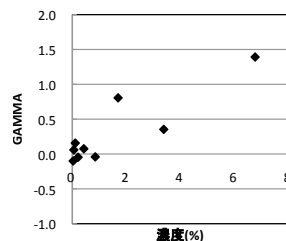


図4 ペプトン毒性試験結果

〈今後の課題〉

溶媒に関しては従来の方法で前処理を行う限り、DMSO の影響はないと言えることが分かったが、残留する DCM は 0.003mL から毒性を示し始めることが考えられ、それゆえ DCM の揮発の際には窒素パージを十分に行うこと、また必要に応じて沸点の違いを利用して DMSO と DCM を分離させる作業も必要だと考える。濃縮に関しては塩分はほとんど抽出することではなく、それゆえ高濃度障害は起こり得ないということが言えるという結論に至った。一方有機物に関しても今回の基準では問題はなかったが、毒性を示し始める有機物濃度を脂質などの物質に対しても試験を行い明確化させる必要があると考える。

〈参考文献〉

1) 鞍掛太郎：大気粉塵が水系に至る過程における PAHs 含有量および毒性の変化、広島大学工学部卒業論文、2010