ゴルフ場排水の変異原性について

岡本直子,^a 筒井剛毅,^b 中室克彦^{*,c}京都府園部保健所^a, 京都府保健環境研究所^b, 摂南大学薬学部^c

Mutagenicity of Waste Water from Golf Links

Naoko Okamoto,^a Tsuyoshi Tsutsui,^b and Katsuhiko Nakamuro^{*,c}^aKyoto Prefectural Sonobe Health Center, 21 Hujinoki, Koyamahigasi-cho, Sonobe-cho, Kyoto 622-0041, Japan, ^bKyoto Prefectural Institute of Hygienic and Environmental Science, 375 Murakami-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612, Japan, and^{*,c}Division of Environmental Health, Faculty of Pharmaceutical Science, Setsunan University, 45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata 573-0101, Japan

(Received February 4, 1999; Accepted May 11, 1999)

In water environment, it is important to elucidate a correlation between the content of pesticides detected in waste water from golf links and mutagenicity. We investigated seasonal changes of the mutagenicity and measured the content of pesticides in water samples obtained from golf link reservoirs, such as two stations of Uji River basin and three stations of Kizu River basin during one year from spring in 1995 to winter in 1996. The mutagenicity was assayed with *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 in the presence and absence of S9mix. In the water samples obtained from the reservoirs and rivers no seasonal changes were detected. However, indirect frameshift-type or base pair substitution-type mutagens were found. The magnitude of the mutagenicity of water obtained from golf link reservoirs was presumed to be almost the same as that from the rivers. No correlation was shown between the mutagenicity and the contents of pesticides detected. Moreover, concerning water from golf link reservoirs the mutagenicity seemed not to be related with the values used as an index of the quality of water such as COD etc..

Key words — golf links waste water, golf link's reservoir, Ames-assay, mutagenicity, pesticide

1. 緒言

水域環境を保全するための監視や調査は、一般に特定の水質汚濁物質や有害化学物質を化学分析することによって評価されている。しかし、個々の化学物質を定量・評価する方法では、総合的な汚染状況の把握や保全対策は難しい。最近、水域環境の汚染を毒性学的に総合的に評価するため、バクテリア^{2,3)}や培養細胞⁴⁾を用いた bio-assay を用いて河川水、下水処理場放流水などの環境水を試験し、それらの遺伝毒性を評価した報告が多く認められるようになった⁵⁻¹⁰⁾。しかし、環境水のうち、農薬の多量使用で環境への安全性が問題となっているゴルフ場農薬のうち、変異原性情報が公表されているものは少なく、また、ゴルフ場排水の変異原性に関する報告もほとんど認められない。そのため、著者らはゴルフ場排水の変異原性の実態を把握することは、水域環境への影響を評価するうえで重要であると考え調

査を行った。

本研究においては、京都府内の5ヶ所のゴルフ場排水を対象とし、XAD-2樹脂カラム濃縮法によって得られるジクロロメタン画分及びメタノール画分の濃縮物について、Ames-assayを用いて評価を行うとともに、これら変異原性に対するゴルフ場農薬の寄与についても検討した結果を報告する。

2. 調査方法

2.1 調査地点及び調査時期 調査対象としたゴルフ場は、京都府南部を流下する宇治川流域2ヶ所及び木津川流域3ヶ所の計5ヶ所である(Fig. 1)。これらゴルフ場は、ゴルフコースに降った雨水が、一旦ゴルフ場内に設けられた貯水池に蓄えられ、この貯水池からオーバーフローした分が排水路を経由してゴルフ場の場外へ排水され、しかも、採水地点はゴルフ場の全域及び一部に散布された農薬が流入する貯水池であることを確認して調査対象ゴルフ場として選んだ。

調査時期は、1995年5月(春)から8月(夏)、11月(秋)、1996年2月(冬)の四季にわたって実施した。

*To whom correspondence should be addressed: Division of Environmental Health, Faculty of Pharmaceutical Science, Setsunan University, 45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata 573-0101, Japan. Tel.: +81-720-66-3122; Fax: +81-720-66-3123

Fig. 1. Location of Sampling Site

2.2 試料水の XAD-2 樹脂カラム法による前処理濃縮¹¹⁾ 試料 40 l (あらかじめ脱脂綿でろ過したもの) を HCl で pH 2 に調整した後、洗浄済みの XAD-2 樹脂を充填したガラスカラム (内径 20 mm×長さ 300 mm) にペリスタルティックポンプを用いて上向流で通水した。通水後水を除いた後、ジクロロメタン 500 ml で溶出しジクロロメタン画分を得た。次いで、メタノール 500 ml で溶出しメタノール画分を得た。これらの画分をいずれも 40℃ の水浴中でロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し、これを目盛り付きスピッツに移した後、窒素気流下で 4 ml に定容した。これら濃縮画分のうち 1 ml を農薬測定用試験溶液とした。また、残り 3 ml をさらに窒素気流下で溶媒を完全に除去し、残留した固形物をジメチルスルホキシド (DMSO) 3 ml に溶解し、変異原性試験溶液とした (Chart 1)。

2.3 Ames-assay による変異原性試験 変異原性試験は、*Salmonella typhimurium* の TA98 株及び TA100 株を用いた Ames-assay により実施した。各菌株の前培養液に 2.2 の前処理で得られた DMSO 試験溶液のそれぞれ 20, 50, 100 μ l を加え、37℃, 20 分間プレインキュベーション¹²⁾を行うことによる直接法と S9mix を添加する代謝活性化法で行った。代謝活性化法では、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンで誘導したラット肝臓から調製

Chart. 1 Scheme of Sample Preparation for Ames Assay

した S9mix (オリエンタル酵母製) を添加した。対照として DMSO のみで同様に操作を行った。変異原陽性物質として AF2 (直接法) 及び B(a)p (代謝活性化法) を用いた。

試料の変異原性は、菌株の復帰コロニー数に明らかに用量依存性があり、かつ対照で生じた自然復帰コロニー数の 2 倍以上のコロニー数が得られたときを陽性と判定した。変異原性の強度は試料 1 l 当たりの誘発変異コロニー数/自然復帰コロニー数の比で表した。

2.4 ゴルフ場農薬の GC-MS による測定 測定対象とした農薬は、今回調査したゴルフ場において使用された¹³⁾殺菌剤 (クロロネブ, トリクロホスメチル, イソプロチオラン, フルトラニル, メプロニル), 殺虫剤 (ダイアジノン, フェニトロチオン, クロルピリホス, イソキサチオン) 及び除草剤 (ナプロパミド, ペンディメタリン, プタミホス) の計 12 物質である。2.2 の前処理濃縮で得られたジクロロメタン画分及びメタノール画分の各 1 ml を用いて

ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) によって農薬を定量した。測定条件を以下に示す。

GC-MS 測定条件：質量分析装置 (MS)，日本電子製 AX-505WA；ガスクロマトグラフ (GC)，HP5801 SERIS-II；キャピラリーカラム，DB-5，J&W Scientific 社製，0.25 mm i.d.×30 m，膜厚 0.25 μ m；昇温条件：60℃ (2 min)－20℃/min－180℃－4℃/min－240℃－10℃/min－280℃ (3 min)；注入口温度等，注入口 280℃，セパレータ 250℃，イオン源 220℃；イオン化電流，300 μ A；キャリアーガス，He ガス，圧力 15 psi；注入量：2 μ l

2.5 水質成分の測定 クロロフィル a は試料 1 l をガラス繊維ろ紙 (Whatman GF/C) でろ過し，アセトンに溶解した後，吸光光度法¹⁴⁾により測定した。化学的酸素要求量 (COD) は酸性高温過マンガン酸カリウム法¹⁵⁾ 浮遊物質 (SS) はガラス繊維ろ紙法¹⁶⁾により測定し，総窒素及び総リンは全窒素・全リン専用全自動分析システム¹⁷⁾ (ブランルーベ社製) を用いて測定した。

3. 結果及び考察

3.1 ゴルフ場貯水池水の変異原性 A－E 5 カ所のゴルフ場貯水池排水の XAD-2 樹脂カラム濃縮法で得られたジクロロメタン及びメタノール画分の *Salmonella typhimurium* TA98 株±S9mix を用いた時の季節的な変異原性の変動に関して検討した結果を Table 1 に示す。これらの結果から，ジクロロメタン画分の TA98－S9mix に対して変異原性が認められたものは春季の C 地点のみであった。これに対して S9mix 添加においては春季の A－E の 5 地点すべてにおいて変異原性が認められた。また，A 地点では春→夏→秋→冬と季節が移るに従って

変異原性の低下する特徴的な傾向が認められた。

一方，ジクロロメタン画分においては TA100±S9mix に対する変異原性はいずれも認められなかった。

次に，メタノール画分の TA98±S9mix に対する変異原性を検討した結果，メタノール画分の TA98±S9mix に対する変異原性は，S9mix 無添加では夏・秋季の A，B，C の 3 地点で変異原性が認められた。これに対して S9mix を添加することにより－S9mix で認められた変異原性は減少傾向を示すのに対し，－S9mix では変異原性が認められなかった冬季の C，D，E の 3 地点で新たに変異原性が出現する結果が得られた。

一方，メタノール画分の TA100±S9mix に対する変異原性は Table 1 に示すごとく，－S9mix で変異原性が認められたのは秋季の C 地点のみであった。しかし，S9mix 添加によって，春季の A，B，C，D の 4 地点，夏季の B，C 地点，秋季の A，B 地点及び冬季の C，D 地点において新たに変異原性が出現し，特に C 地点においては四季にわたって変異原性を示すことが認められた。

これらの検討結果から，今回調査したゴルフ場貯水池水の変異原性は XAD-2 樹脂カラム－メタノール画分においてフレームシフト型及び塩基対置換型の直接変異原性を有意に示すため，これら変異原物質は親水性の物質であるとともに，TA100+S9mix に対して塩基対置換型の間接変異原性を発現することから，代謝活性化を受けて変異原性を示す親水性物質の存在することが考えられた。また，ゴルフ場貯水池水の TA98+S9mix に対する変異原性強度を，試料 1 l 当たりの復帰コロニー数/対照の自然復帰コロニー数の比で表すと，2－4 の値が得られた。この変異原性強度の値は，同じ水域の宇治川や木津川の河川水と同様の値を示しており⁵⁻⁷⁾，今回調査したゴルフ場貯水池水の変異原性は

Table 1. Mutagenicity of Dichloromethane and Methanol Fractions Prepared by XAD-2 Column Method of Golf Link's Reservoir Water in TA98±S9mix and TA100±S9mix

Eluate from XAD-2 column	Ames strains	Mutagenicity ratio (net revertants/spontaneous revertants) for 1 l sample																			
		Spring					Summer					Autumn					Winter				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
CH ₂ Cl ₂ fraction	TA98－S9mix	0.9	1.7	3.2	2.1	0.8	0.6	0.7	1.1	1.0	0.5	0.9	0.2	0.9	0.6	0.3	1.3	0.8	1.2	1.3	1.1
	TA98+S9mix	3.8	2.8	3.2	2.6	2.6	2.8	2.1	1.6	2.1	1.4	2.2	1.5	1.5	1.5	0.7	1.0	0.7	1.4	2.1	1.6
	TA100－S9mix	0.2	0.4	0.2	0.4	0.1	1.6	1.1	1.3	0.6	0.6	1.4	0.8	1.5	0.7	0.6	1.4	1.2	1.2	0.8	0.6
	TA100+S9mix	1.2	1.1	0.8	1.9	1.1	2.0	1.9	1.5	1.2	1.2	1.4	1.1	1.2	1.4	1.0	1.5	1.5	1.6	1.4	1.4
CH ₃ OH fraction	TA98－S9mix	2.5	1.6	1.5	2.3	1.0	3.9	4.1	5.1	2.4	1.4	4.5	4.3	4.2	0.6	0.9	4.0	1.4	2.2	0.8	2.5
	TA98+S9mix	3.8	0.9	1.0	1.6	1.0	3.0	2.5	2.8	1.6	1.0	2.9	3.8	3.5	1.9	2.1	1.5	1.7	3.0	3.5	3.9
	TA100－S9mix	1.0	1.4	1.6	1.2	1.7	1.8	2.1	1.9	1.0	1.4	2.0	2.0	2.2	0.5	1.3	1.9	1.4	1.6	1.4	1.6
	TA100+S9mix	1.2	2.4	2.7	2.7	1.6	1.6	3.0	2.7	2.0	1.5	2.1	2.7	3.5	1.0	1.6	1.5	1.6	2.3	2.3	1.7

Spontaneous revertant : TA98－S9mix, 18 ; TA98+S9mix, 23 ; TA100－S9mix, 157 ; TA100+S9mix, 166. Values show mean of duplicate plates.

河川水とほぼ同程度の変異原性強度であった。このことから、ゴルフ場排水の変異原性強度はそれほど強くなく、河川に対して強い汚濁要因となることは考えられなかった。

3.2 ゴルフ場貯水池水中農薬と変異原性との関連性 ゴルフ場内の排水が流入する貯水池水の変異原性と貯水池水中ゴルフ場農薬濃度との関連性を検討するため、ゴルフ場で散布された12種類の農薬についてGC-MS法により定量を行った。その結果、ジクロロメタン画分においてはTable 2に示すごとく殺菌剤のトリクロホスメチル、イソプロチオラン、フルトラニル、殺虫剤のダイアジノン、クロロピリホス、除草剤のペンディメタリンが各地点において規則性がなく検出されたが、0.1–0.6 $\mu\text{g/l}$ の範囲で検出された。また、検出された6種類の農薬のうちイソプロチオランとフルトラニルは5地点においていずれも検出されることが認められた。

また、ジクロロメタンで溶出しなかった農薬あるいは分解物について検討した。しかし、XAD-2樹脂カラム–メタノール画分においては5カ所のゴルフ場貯水池において測定したすべての農薬が検出されなかった。

ジクロロメタン画分で検出された6種類の農薬含

有量とTA98±S9mixに対する変異原性強度ととの間の相関性について検討した。その結果、TA98–S9mixに対する強度と6種の農薬においては相関係数が0.070–0.358 ($n=20$)、TA98+S9mixに対する強度と6種の農薬では相関係数が0.073–0.343 ($n=20$)と低く、いずれも相関が認められなかった。

また、京都府農業年報に記載されている農薬使用(散布)状況を調査解析したところ、農薬使用後に関連すると考えられる変異原性の出現が認められないことから、農薬及びこれらの分解生成物に起因する可能性も少ないことが考えられた。

3.3 ゴルフ場貯水池水の水質成分と変異原性との関連性 貯水池水の水質成分と変異原性との関連性について検討を行うため、貯水池水について、水質汚濁の指標としてCOD及びSS、植物性プランクトンや藻類などの光合成生物量の指標としてクロロフィルa、富栄養化の指標として総窒素及び総リンを測定した結果をTable 3に示す。A–E地点5カ所における貯水池水の水質成分の年平均値の変動巾はCOD 2.5–13.5 mg/l, SS 5–15.5 mg/l, クロロフィルa 13.5–40 $\mu\text{g/l}$, 総窒素 0.58–3.23 mg/l, 総リン 0.13–1.12 mg/lの値であった。これらの

Table 2. Pesticides Detected in Golf Link's Reservoirs

Sampling sites Seasons	A				B				C				D				E			
	Spr.	Sum.	Aut.	Win.	Spr.	Sum.	Aut.	Win.	Spr.	Sum.	Aut.	Win.	Spr.	Sum.	Aut.	Win.	Spr.	Sum.	Aut.	Win.
Tolclofos-methyl	0.2	ND	0.2	0.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Isoprothiolane	ND	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.5	0.2	0.2	0.2	0.6	0.3	ND	ND	0.1	0.1	ND	ND
Chlorpyrifos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flutolanil	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	ND	0.4	ND	ND	0.2	ND	ND	ND
Diazinon	ND	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pendimethalin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Detection limit : 0.1 $\mu\text{g/l}$.

Table 3. Seasonal Variation of COD, SS, Chlorophyl-a Total-nitrogen, Total-phosphorous in Golf Link's Reservoirs

Sampling sites Seasons	A				B				C				D				E			
	Spr.	Sum.	Aut.	Win.	Spr.	Sum.	Aut.	Win.	Spr.	Sum.	Aut.	Win.	Spr.	Sum.	Aut.	Win.	Spr.	Sum.	Aut.	Win.
COD (mg/l)	9	6	6	4	8	9	6	4	12	16	14	12	12	13	11	7	3	3	2	2
Mean		(6.8)				(6.8)				(13.5)				(10.8)				(2.5)		
SS (mg/l)	1	39	6	2	6	11	14	8	3	12	17	6	7	16	28	11	1	7	10	5
Mean		(13)				(9)				(10)				(15.5)				(5)		
Chlorophyl-a ($\mu\text{g/l}$)	2	11	39	2	25	58	22	8	14	31	75	25	17	57	71	15	1	49	8	2
Mean		(13.5)				(28.5)				(36.3)				(40)				(15)		
Total-nitrogen (mg/l)	1.16	1.56	0.75	0.77	1.62	0.70	0.88	0.34	1.62	1.14	1.10	1.10	2.87	3.18	4.45	2.40	0.98	0.30	0.38	0.66
Mean		(1.06)				(0.88)				(1.24)				(3.23)				(0.58)		
Total-phosphorous (mg/l)	1.12	0.34	0.13	0.10	0.71	0.18	0.93	0.05	1.30	0.32	0.15	0.14	2.43	0.81	0.65	0.61	0.13	0.25	0.03	0.11
Mean		(0.42)				(0.47)				(0.48)				(1.12)				(0.13)		

Spr, spring ; Sum, summer ; Aut, autumn ; Win, winter.

うち、リンと窒素濃度については湖沼の栄養度分類¹⁸⁾によると、すべてのA—E地点の貯水池は富栄養湖のリン：0.01—0.09 mg/l、窒素：0.5—1.3 mg/lの濃度範囲に相当する濃度を示した。

また、これらの水質成分と変異原性強度との間の相関性を検討した。その結果、水質成分と変異原性強度との間の相関係数は0.003—0.545と低く、5%の有意水準でジクロロメタン画分のTA98±S9mixに対する変異原性強度と総リンとの間において相関性が認められた ($r=0.447$; -S9mix, $r=0.545$; +S9mix) 以外は相関性が認められなかった。

これらの事実から、ゴルフ場排水の変異原性を示す物質の起源は、自然由来の物質の可能性が考えられた。

4. まとめ

ゴルフ場排水中の農薬と変異原性との関連性を明らかにする目的で、京都府南部を流下する宇治川流域の2ヶ所及び木津川流域の3ヶ所のゴルフ場を調査対象として、ゴルフ場の貯水池水について、1995年春季—1996年冬季の四季にわたり変異原性と農薬含有量の測定を行った結果、以下に示す知見が得られた。

1. ゴルフ場貯水池水で認められた変異原性の季節変動は、規則性は認められなかったが、フレームシフト型及び塩基対置換型の間接変異原性が有意に認められた。これらは、非極性よりも比較的親水性の性状を有する物質に起因することが考えられた。

これらゴルフ場貯水池水中の変異原は、流域河川の汚濁源となるほどの強い変異原性強度を示さなかった。

2. 四季にわたるゴルフ場貯水池水のXAD-2樹脂—ジクロロメタン画分において、トリクロホスメチル、イソプロチオラン、クロロピリホス、フルトラニル、ダイアジノン、ペンディメタリンが0.1—0.6 $\mu\text{g/l}$ の範囲で検出された。これらの農薬の含有濃度と変異原性強度との間に関連性は見出せなかった。

3. 5ヶ所のゴルフ場貯水池水水質はCOD 2.5—13.5 mg/l, SS 5—15.5 mg/l, クロロフィル a 13.5—40 $\mu\text{g/l}$, 総窒素 0.58—3.23 mg/l, 総リン 0.13—1.12 mg/lの値であり、5地点とも富栄養湖に相当する水質であった。また、水質成分と変異原性強度との間に相関性は認められなかった。

4. ゴルフ場排水中に含有する変異原は、農薬や一般水質成分ではなく、農薬の分解生成物による寄与が低く、自然由来の物質に起因することが考えられた。

REFERENCES

- 1) Uchiyama I., *J. Jpn. Soc. Water Environ.*, **17**, 210—216 (1994).
- 2) Sayato Y., Nakamuro K., Ueno H., *J. Water Waste*, **35**, 311—319 (1993).
- 3) Matsui S., Senba N., Konno T., Matsuda T., Yamada H., Jiku F., Nakamura M., *J. Water Waste*, **35**, 320—325 (1993).
- 4) Utsumi H., Ando M., Tsuchiya Y., *J. Water Waste*, **35**, 303—310 (1993).
- 5) Nagai A., Kanou Y., Funasaka R., *J. Jpn. Soc. Water Environ.*, **19**, 657—663 (1996).
- 6) Hashizume T., *Annual Report of Wakayama Public Health and Pollution Research Center*, **40**, 40—44 (1994).
- 7) Sayato Y., Nakamuro K., Ueno H., *Japanese J. of Mutagenicity Tests on Chemicals*, **1**, 18—27 (1992).
- 8) Urano K., Haga N., Emoto F., *J. Jpn. Wat. Works Assoc.*, **57**(3), 36—49 (1988).
- 9) Sayato Y., Nakamuro K., Ueno H., Hasegawa T., Goto R., *J. Jpn. Wat. Works Assoc.*, **60**, 12—20 (1991).
- 10) Saito H., Isoda S., Kato M., Nagaoka N., *Environ. Mut. Res. Commun.*, **17**, 169—177 (1995).
- 11) Sayato Y., Nakamuro K., Ueno H., Jyotatsu Y., Goto R., Hasegawa T., Hayatsu H., Sakamoto H., *Eisei Kasaku*, **37**, 197—204 (1991).
- 12) Maron D.M., Ames B.N., *Mutat. Res.*, **113**, 173—215 (1983).
- 13) Okamoto N., Tsutsui T., Nakamuro K., *Annual Report of Kyoto Prefectural Institute of Hygienic and Environmental Sciences*, **41**, 69—73 (1996).
- 14) Society of Water Environment, “Kosyokankyochosashishin,” 1st Ed., Kogaitaisakugijyutsudoyukai, Tokyo, 1984, pp.138—139.
- 15) Japanese Industrial Standards Committee, “Testing Methods for Industrial Wastewater,” JIS K0102, Tokyo, 1993 pp.41—43.
- 16) Japanese Industrial Standards Committee, “Testing Methods for Industrial Wastewater,” JIS K0102, Tokyo, 1993, pp.32—33.
- 17) Tada S., Tsutsui T., *Annual Report of Kyoto Prefectural Institute of Hygienic and Environmental Sciences*, **40**, 29—33 (1996).
- 18) Motohashi K., “Heisaseisuikeikankyo To Jyoka,” 1st Ed., Kogaitaisakudoyukai, Tokyo, 1992, pp.27—34.
- 19) Kyoto Prefecture, “Kyotofu-gorufujyo-nouyaku-anzenishiyoshishin,” 1995.