[水環境学会誌 第18巻 第9号 701-710 1995]

〈論文〉

底質の Ames 変異原性モニタリングのための 試料調製方法とその応用

安部 明美* 浦野 紘平**

A Preparation Method for the Monitoring of Mutagenicity in Sediment and Its Application

Akemi ABE* and Kohei URANO**

* Kanagawa Environmental Research Center, Water Quality Division, 842 Nakaharashimojyuku, Hiratsuka 254 Japan

** Yokohama National University, Department of Safety and Environmental Engineering, 156, Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240 Japan

Abstract

The *Salmonella*/microsome assay (Ames test) is a useful method for screening mutagens in complex environmental samples such as river water and sediment. However, no quantitative and generalized method to evaluate the mutagenicity of sediment has yet been established. In this study, the simple and effective method for monitoring the mutagenicity in sediment was investigated, and applied to river sediments and drainage sediments collected in Kanagawa prefecture.

The following method was proved to be simple, sensitive and giving good results for the Ames test for various sediment samples: sediment samples were extracted twice using ultrasonic agitation with dichloromethane/ethanol (4:1) and then dichloromethane, and crude extracts were dissolved to n-hexane/ethylacetate (95:5) and separated to the insoluble fraction, the passing fraction which should be refined by Cu column from a silica-cartridge, and the eluted fraction from the silica-cartridge with ethylacetate/methanol (1:1).

Eleven samples in the tested 13 samples showed the mutagenicities to TA98 or TA100 on addition of S9mix, and the ranges were 10-792 net revertants to TA98 and 13-1,990 net revertants to TA100 per g dry sediment. Fractionation procedure was effective not only for reducing interference caused by coexisting substances and lowering the detection limits of mutagenicity but also for getting information on characteristics of the mutagens contained in the sediment. The developed preparation method was confirmed to be adaptable to various sediment samples.

Key words: Ames test, sediment, monitoring, preparation method

1. はじめに

近年、各種の有害化学物質による水環境の汚染が認められており、人および水生生物に慢性的あるいは遺

伝的な悪影響を及ぼす化学物質を監視することが重要になってきている。しかし、化学物質は非常に種類が多く、個々には濃度も低いので、変異原性試験等のバイオアッセイを用いた一括モニタリングが求められて

* 神奈川県環境科学センター水質環境部 〒254 平塚市中原下宿842

** 横浜国立大学工学部物質工学科 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156

いる。一方、化学物質は底質中に水中の1,000倍程度の濃度に濃縮されていることが多い。したがって、底質はその水域における比較的長期の汚染を反映しており、水環境の汚染状況を把握するためにも、また、底生生物や藻類および魚類の生育の場であることから生態毒性（エコトキシコロジー）を考えるうえでも注目すべき媒体である。木苗¹⁾は、魚類腫瘍と水環境試料との因果関係に関する研究事例をまとめ、カレイ、ナマズ、ニベおよびゴンズイ等の底棲魚にみられる肝腫瘍、色素細胞腫瘍および皮膚過形成等に、底質に含まれる多環芳香族炭化水素類（PAHs）または流入排水中の変異原物質などが関与している可能性が高いことを報告している。したがって、水環境中の化学物質をエコトキシコロジー的観点も含めて総合的に監視・管理していくためには、底質のモニタリングにバイオアッセイを組み込むことが、今後重要になると考えられる。

遺伝子毒性を評価するバイオアッセイの一つとしては、Ames 試験²⁾が最もよく用いられている。しかし、底質に Ames 試験を適用した従来の報告では^{3)~5)}、底質からの変異原物質の抽出・分画に複雑な操作の組み合わせが用いられ、データの相互比較や評価が困難であった。また、毒性物質や共存物質の妨害により、変異原性の評価が難しいことが多く報告^{6)~9)}されている。

したがって、底質の変異原性モニタリングのためには、できるだけ多成分を同時に抽出でき、簡便なクリーンアップまたは分画操作による試料調製方法を確立することが必要である。本研究では、底質の Ames 変異原性試験における問題点¹⁰⁾を考慮して、簡便で共存物の影響の少ない試料調製方法を提案することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 底質試料

底質は、1993年から94年にかけて神奈川県内の Fig. 1 に示す、河川の本川、支川および工場排水の流入する側溝など13地点で採取した。地点 A（鶴見川）および地点 B（境川）では、川の中央部でエクマンバジ採泥器を用いて、その他の地点では、砂や泥が堆積していた数ヶ所の水面下の表層からステンレス製スコップを用いて採取し、汚染度や性状の異なる各種の底質を得た。採取試料は遮光しながら一晩風乾し、2 mm のメッシュで篩別してレキやごみを除いたものを褐色びんに入れて試料調製時まで冷凍保存した。

2.2 底質粗抽出物の調製

底質試料50g または100g に対し、ジクロロメタン/エタノール（4 : 1）200ml を加え、振とうして溶媒

Fig. 1 Location of sampling sites

Fig. 2 Preparation procedure of sediment sample

とよく混和した後、超音波抽出（28kHz、15分）した。遠心分離して上清を分け取り、残さに再びジクロロメタン（DCM）200ml を加えて超音波抽出を繰り返した。上清を合わせて無水硫酸ナトリウムを加え脱水した。抽出溶媒として、酢酸エチル（EtOAc）またはメタノール（MeOH）を用いて同様の操作を行い、抽出効率を比較した。

抽出液はロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去した後、窒素吹き付けにより溶媒を完全に除去して底質粗抽出物を得、これを秤量した。得られた粗抽出物は試験するまで -20°C で冷凍保存した。

粗抽出物調製時に、底質試料の水分含量および強熱減量（I.L.）を測定した。

2.3 分画および精製

粗抽出物の分画および精製の手順を Fig. 2 に示す。粗抽出物をヘキサン/酢酸エチル (95:5) に $5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ となるよう溶解して、超音波をかけてよく分散させた後、その 8 ml を遠沈管にとり、 $3,000\text{rpm}$ で遠心分離して不溶物 (P) を分けた。上清はシリカカートリッジに通し、デッド・ボリューム分として 1.5 ml を捨てた後、通過液をさらに銅カラムに通して精製した。シリカカートリッジおよび銅カラムを 5 ml のヘキサン/酢酸エチル (95:5) でそれぞれ洗浄し、通過液および洗浄液を受器に集め、通過画分 (FA) を得た。次に、シリカカートリッジに吸着している成分を 4 ml の酢酸エチル/メタノール (1:1) で溶離させ、溶離画分 (FB) を得た。P, FA および FB の各画分は、それぞれ溶媒を留去して秤量し、変異原性試験直前まで -20°C で保存した。

なお、シリカカートリッジには、Sep pak plus Silica (日本ウォーターズ社製) を予め酢酸エチル/メタノール (1:1)、ヘキサン/酢酸エチル (95:5) 各 20 ml およびヘキサン 40 ml で洗浄して保有した。このカートリッジに試料を導入する直前にヘキサン/酢酸エチル (95:5) を満たし、同様に洗浄したドライカートリッジ (無水硫酸ナトリウム 3 g , ユニフレックス社製) をつけた 10 ml の注射筒で試料を通液した。

また、銅カラムには、 $60\sim 80$ メッシュの有機元素分析用 (キシダ化学製) のアンプル入り還元銅 10 g を使用時に開封し、グラスウールを詰めてヘキサン/酢酸エチル (95:5) を満たした 10 ml の注射筒に充填して作成したものを、ヘキサン/酢酸エチル (95:5) 20 ml で洗浄して使用した。

上記の分画とは別に、シリカカートリッジからの底質中変異原物質と標準変異原物質の溶離特性を比較するため、粗抽出物または標準変異原物質溶液 1 ml をシリカカートリッジに通した後、ヘキサン/酢酸エチル (95:5)、ヘキサン/酢酸エチル (1:1)、酢酸エチル、酢酸エチル/メタノール (9:1) および酢酸エチル/メタノール (1:1) 各 4 ml を用い、順次、溶離させ5つの画分を得、それぞれの回収率を求めた。標準変異原物質には、和光純薬工業 (株) のベンゾ[a]ピレン (B[a]P)、3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド [4,3-b]インドール (Trp-P-1)、3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド [4,3-b]インドール (Trp-P-2) および Aldrich Chemical Co. Inc. 製の2-ニトロフルオレン (2-NF)、2-アミノフルオレン (2-AF) を用い、B[a]P、2-NF、2-AF は $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ のヘキサン溶液、Trp-P-1、Trp-P-2 は $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ の酢酸エチル溶液として用いた。標準変異原物質は、底質の変異原性が S9mix 添加

条件で検出される場合が多いことや環境中の存在の可能性および変異原物質の物性を考慮して選定した。

2.4 変異原性試験

試験菌株は、*Salmonella typhimurium* TA98株およびTA100株を用い、変異原性試験は労働省の微生物を用いる変異原性試験ガイドブック¹¹⁾を基にしたプレインキュベーション法で行った。

S9mix 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 Rat Liver-S9 (オリエンタル酵母) とコファクター (オリエンタル酵母) を用い、プレートあたり $50\mu\text{l}$ となるよう調製して用いた。また、底質の各画分のプレートあたりの用量は、原則として50, 100, 200, $400\mu\text{g}$ の4段階とした。

溶媒対照試験を3プレート、その他の試験を2プレートずつ同時に行って、復帰変異コロニー数の平均をとった。

3. 結果と考察

3.1 抽出方法の検討

3.1.1 抽出溶媒の比較

環境試料の変異原性試験では、未知成分を含む広汎な物質を対象とするため、多成分を同時抽出できる溶媒がよいが、試験菌株に対して毒性を示す物質、阻害物質および増殖促進物質などはあまり抽出されることが望ましい。底質は水分を含み疎水性溶媒と混和しにくいので、底質からの変異原物質の抽出にはこれまでメタノール等の極性溶媒やベンゼン/メタノールやジクロロメタン/エタノール等の混合溶媒が多用されている^{6)~8), 12), 13)}。本研究では、底質からの変異原物質の抽出効率を比較するため、メタノール、酢酸エチルおよびジクロロメタン/エタノール (4:1) を用いて抽出を行った。なお、アセトンは底質から微生物に対して毒性を示す分子状硫黄を抽出しやすいという報告¹⁴⁾があるため採用しなかった。

Table 1 に底質試料 A および S1 の各種溶媒および抽出方法による抽出物量および底質乾重量 1 g あたりの変異原性を示す。なお、底質試料 A の各粗抽出物は菌に対する強い毒性を示し、そのままでは変異原性を比較することはできなかった。そこで、各粗抽出物をジクロロメタン/エタノール (4:1) に再溶解し、銅カラムを通して精製後、変異原性試験を行った。表からわかるように、メタノールを用いると最も多量の粗抽出物が抽出されたが、単位底質重量あたりの変異原性は低く、変異原物質の抽出効率は低かった。一方、ジクロロメタン/エタノールでは、単位底質重量あたりの変異原性の高い粗抽出物が得られ、最も抽出効率の良いことがわかった。

Table 1 Comparison of extracting efficiency of mutagens in solvents

Sample	Solvent	Extracted amounts ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dry sediment)	Mutagenicity ^{a)}
A	DCM/EtOH	4830	364
	EtOAc	3960	190
	MeOH	11900	114
S1	DCM/EtOH	217	62
	EtOAc	206	50
	MeOH	265	11

a) Net revertants $\cdot \text{g}^{-1}$ dry sediment against TA98 with S9mix

Fig. 3 Change of extracted ratio (%) in weight and mutagenicity with extraction times of DCM/EtOH

▨: Weight
●: Net revertants (TA98+S9mix)

3.1.2 抽出回数

抽出方法として用いた超音波抽出法は、同時に多数の試料を処理でき抽出時間が短い等の利点があるが、変異原物質の抽出が十分に行われているか否かを確認するため、抽出回数の検討を行った。

底質試料 S1 の100g をジクロロメタン/エタノール (4 : 1) 200ml で15分超音波抽出し、残さにジクロロメタン200ml を加えて抽出を4回繰り返した場合の各抽出回数毎の抽出物量および変異原性の累積%を Fig. 3 に示す。抽出された変異原性の合計に対する2回目までに抽出された変異原性の割合は91.9%、3回目までに抽出された変異原性の割合は100%であった。

以上の結果、底質からの変異原物質の抽出方法としては、底質試料100g あたりジクロロメタン/エタノール (4 : 1) 200ml を加えて超音波抽出後、ジクロロ

メタン200ml を加え再度超音波抽出を行う方法が簡便で効果的であった。

3.2 分画・精製方法の検討

3.2.1 不溶物の分離

粗抽出物を秤量後、シリカカートリッジによる分画を行うためにヘキサン/酢酸エチル (95 : 5) に溶解すると、懸濁性の不溶物が生じたので、これを遠心分離することにした。まず、この不溶物 P の分離条件を検討するため、底質試料 C, S2, S3 および F の各粗抽出物40mg を10mg あたり 1 ml または 2 ml のヘキサン/酢酸エチル (95 : 5) で溶解し、不溶物量とその変異原性を比較した結果を Table 2 に示す。10mg あたり 2 ml 加えた場合には 1 ml 加えた場合に比べてやや不溶物量が少なくなる傾向があったが、不溶物の変異原性は変わらなかった。すなわち、溶媒の添加量によって、分離される不溶物の変異原性が大きく変化することはないと考えられたので、本方法では粗抽出物 10mg あたりにヘキサン/酢酸エチル (95 : 5) 2 ml を加えて不溶画分 (P) を分離することとした。不溶画分 (P) は、ヘキサン/酢酸エチル (95 : 5) に溶けにくいことから極性物質であると考えられたが、これをさらに酢酸エチル/メタノール (1 : 1) 可溶成分と不溶物に分離したところ、得られた不溶物はベンゼン可溶性であった。これらのことから、ヘキサン/酢酸エチル (95 : 5) 不溶画分 (P) は酢酸エチル/メタノール (1 : 1) に可溶な極性成分と、これに不溶でベンゼンに可溶な極性の低い成分の混合物である可能性が示唆された。不溶画分 (P) は、Ames 試験に使用するジメチルスルホキシド (DMSO) にも完全には溶解せず、DMSO 不溶成分は Ames 試験時の汙過滅菌操作で除かれた。

3.2.2 シリカカートリッジによる分画

標準変異原物質 B[a]P, 2-NF, 2-AF, Trp-P-1 お

Table 2 Amounts and mutagenicities of separated precipitate (P)

Sample	0.2 ml • mg ⁻¹ crude extract			0.1 ml • mg ⁻¹ crude extract		
	Precipitated amounts(mg)	Net revertants a) TA98	TA100	Precipitated amounts(mg)	Net revertants a) TA98	TA100
C	10.9	58300	8880	12.0	41200	7950
S2	9.5	114	-	10.6	527	594
S3	10.0	- b)	-	10.1	-	-
F	10.2	-	-	13.8	-	-

a) +S9 mix, b) - : MR<1.5 for 50 ~400 µg dose

Table 3 Recoveries (%) of mutagenicities by standard mutagens from a silica-cartridge (TA98)

	B[a]P 10 µg	2-NF 10 µg	2-AF 10 µg	Trp-P-1 1 µg	Trp-P-2 1 µg	Blank ^{a)}
Fraction (+S9mix)	(+S9mix)	(-S9mix)	(+S9mix)	(+S9mix)	(+S9mix)	(±S9mix)
F1	114	72.8	0	0	0	0
F2	0	34.9	91.8	0	0	0
F3	0	0	0	0	0	0
F4	0	0	0	0	0	0
F5	0	0	0	89.6	75.8	0

a) TA98, TA100

よび Trp-P-2のシリカカートリッジからの溶離位置と回収率を Table 3 に示す。B[a]P はヘキサン/酢酸エチル(95 : 5)により F1に溶離し、2-NF と2-AF はヘキサン/酢酸エチル (1 : 1) により F2 までに溶離するが、Trp-P-1および Trp-P-2は酢酸エチル/メタノール (1 : 1) ではじめて F5 に溶離した。各標準変異原物質の回収率は、それぞれ114, 108, 91.8, 89.6, 75.8%であり、Trp-P-2の回収率がやや低かったものの他はほぼ完全に回収された。

また、ブランク操作を行いシリカカートリッジから変異原物質が溶離しないことを TA98, TA100両株(±S9mix) を用いて確認した。

3.2.3 銅カラムによる精製

汚染された底質は分子状硫黄を含み試験菌株に毒性を示す。活性銅処理による分子状硫黄の除去が試験菌株への阻害を防止するのに有効であることは既報⁷⁾で報告したが、銅処理による底質中変異原物質の吸着および化学反応などによる変異原性への影響は不明であった。そこで、標準変異原物質 B[a]P, 2-NF, 2-AF, Trp-P-1および Trp-P-2を用いて銅カラム処理前後の回収率を検討した。Table 4 からわかるように、銅カ

ラムは一部の標準変異原物質に対して吸着性を示した。すなわち、B[a]P や2-NF はヘキサン/酢酸エチル溶液として銅カラム処理を行った場合に良好な回収率が得られたのに対して、2-AF, Trp-P-1および Trp-P-2では、回収率が著しく低下した。しかし、これらを酢酸エチル/メタノール (1 : 1) 溶液にして銅カラム処理を行った場合には、それぞれ88.0%, 97.6%, 89.8%と良好な回収率が得られた。一方、分子状硫黄は極性が低く、シリカゲルに保持しにくいことが分かっている⁷⁾。したがって、シリカカートリッジのヘキサン/酢酸エチル (95 : 5) 通過液のみを銅カラム処理すれば十分であり、他の不特定な変異原物質への銅処理の影響も避けることができると考えられた。

また、ブランク操作を行い銅から変異原物質が溶離しないことを TA98, TA100両株(±S9mix)を用いて確認した。

3.2.4 実試料を用いた検討

底質試料 C および I の粗抽出物各40mg を、これまでに述べた不溶画分の分離およびシリカカートリッジと銅カラムの組み合わせによって分画・精製して得た各画分の重量および変異原性を Fig. 4 に示す。図から

Table 4 Recoveries (%) of mutagenicities by standard mutagens from Cu column (TA98)

Solution	B[a]P 10 μ g (+S9mix)	2-NF 10 μ g (-S9mix)	2-AF 10 μ g (+S9mix)	Trp-P-1 1 μ g (+S9mix)	Trp-P-2 1 μ g (+S9mix)	Blank ^{a)} ($\pm$ S9mix)
n-hexane/EtOAc (95: 5)	74.2	124	42.0	0	0	0
n-hexane/EtOAc (1: 1)	83.9	84.5	45.1	15.3	19.0	0
EtOAc/MeOH (1: 1)	— ^{b)}	—	88.0	97.6	89.8	0

a) TA98, TA100

b) not tested.

Fig. 4 Composition of weight and mutagenicity of each fraction of crude extracts

■: Weight ●: TA98+S9mix

■: TA100+S9mix

F1: n-hexane/EtOAc (95: 5), F2: n-hexane/EtOAc (1: 1), F3: EtOAc, F4: EtOAc/MeOH (9: 1), F5: EtOAc/MeOH (1: 1), P: Insoluble

わかるように、底質試料 C と I の各画分の重量組成は類似していたが、変異原性の分布は試験菌株によってかなり異なっていた。すなわち、底質試料 C では不

溶画分 (P) の変異原性 (TA98, +S9mix) が高かったのに対して、底質試料 I では F1 画分の変異原性 (TA100, +S9mix) が高かった。したがって、底質試料 C 中には極性の高い変異原物質の存在が推定されたのに対して、底質試料 I 中には多環芳香族炭化水素類 (PAHs) 等のより極性の低い物質の存在が推定された。また両底質とも F3 から F5 の画分は、重量、変異原性ともにその割合が低かった。

以上のように粗抽出物を分画し、それぞれ変異原性試験を行うことによって、試験菌株と S9mix 添加の有無による変異原性の強さから、その底質に含まれる変異原物質の特徴を推定することができる。しかし、最初から多くの分画について変異原性試験を行うことは、検体数を増やし試験を煩雑にすることになる。したがって、変異原性モニタリングのための試料調製方法として、妨害の除去、簡便性および試験の感度を考慮した結果、不溶画分 P、シリカカートリッジ銅カラム通過画分 FA (F1) およびシリカカートリッジ溶離画分 FB (F2+F3+F4+F5) の 3 画分について変異原性試験を行う方法が適切であると考えられた。ただし、本試料調製方法では、風乾した底質を用い、抽出および分画・精製時に減圧下での溶媒留去操作を行っているため、難揮発性変異原物質を対象としたものである。

3.3 底質試料への応用

3.3.1 各種底質の変異原性

今回採取した神奈川県内の 13 地点の底質の性状を Table 5 に示す。また、これらの底質に本研究で開発した試料調製方法を適用して各画分ごとに変異原性試験を行った結果を Table 6 にまとめて示す。

前報¹⁵⁾により、底質抽出物のように共存物の多い試料の代謝活性化を必要とする Ames 試験 (S9 添加量: プレートあたり 50 μ l) では、変異原物質が一定量の場合に共存物が 200 μ g 以上存在すると変異原性を抑制することがわかっていたので、底質の各画分のプレート

Table 5 Characteristics of sediment samples

Sample			Appearance	Ignition loss (%)	Water content (%)	Crude extract ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$)
<u>River sediment</u>		Point				
A	Tsurumi R.	Tsurumi Bridge	Black mud	10.0	36.8	4830
B	Sakai R.	Sakaigawa Bridge	Sand	1.8	5.8	490
S1	Nakatsu R.	Aikawa Bridge	Sand	4.3	10.2	217
S2	Nagaike R.	the meeting point to the Sagami River	Black sand	2.8	9.7	2000
S3	Mekujiri R.	lower from the plant of treatment of raw sewage	Black sand	7.0	28.5	2190
S4	Sagami R.	4Km upper point from the estuary	Sand	2.1	6.0	843
F	Kaname R.	lower from the overflow of the waste plant	Brown sand	2.2	11.4	679
G	Nakamura R.	lower from the overflow of the waste plant	Brown sand	2.2	11.9	380
H	Morito R.	Sekito Bridge	Brown grain	1.8	5.1	334
<u>Drainage sediment</u>						
C	from the dye works		Sand	3.7	9.8	473
D	from the metal products-plant		Black grain	2.8	10.6	1970
E	from the delivery terminal		Black mud	8.6	15.5	15400
I	from the paper mill		Sand granule	7.1	23.6	3390

あたりの用量は、原則として50, 100, 200, 400 μg の4段階とした。この用量範囲で、MR値（復帰変異コロニー数/自然復帰変異コロニー数）が1.5以上でかつ用量－反応関係が認められた場合に、変異原性ありと判定¹⁶⁾し、底質乾重量1gあたりの復帰変異コロニー数を算出した。今回調べた13の底質試料は、強熱減量が1.8～10.0%，粗抽出物量が217～15,400 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$ の範囲にあり、性状もさまざまであったが、S9mix添加の場合には、13の底質中11の底質がTA98株またはTA100株に対して変異原性を示した。検出された変異原性の範囲は、TA98株に対しては10～792net rev. $\cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$ 、TA100株に対しては13～1990net rev. $\cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$ であり、最小値と最大値には約80～150倍の開きがあった。TA98株に対して最高値を示した底質試料Cは、染色工場排水が中津川に流入する側溝の底質であり、TA100株に対して高値を示した底質試料EおよびIは、Eが宅配トラックの集荷場近くの道路側溝、Iが製紙工場排水が流入する農業用水引き込み地点の底質であった。これらのことは、本方法による変異原性モニタリングが、環境水域への変異原性の負荷源となりうる地点を検出し、原因究明や対策を行うための手段として有効であることを示唆している。また、変異原性を菌株別に各画分ごとにみると、TA98株では、通過画分FAの変異原性は4～330net rev. $\cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$ 、溶離画分

FBの変異原性は9～397net rev. $\cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$ 、TA100株では、FAが13～903net rev. $\cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$ 、FBが96～1090net rev. $\cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$ の範囲にあった。極性成分を含んでいると考えられる不溶画分Pは、ほとんどの底質で変異原性を示さないか弱い変異原性を示すのみであったのに対し、底質Cの不溶画分PがTA98株に対して強い変異原性を示したのが特徴的であった。一方、S9mix無添加の場合には、TA98, TA100両株ともにどの底質もすべての画分で変異原性を示さなかった。このように、本方法による分画・精製操作は、Ames試験に対する妨害を小さくすると同時に、変異原性を菌株別だけでなく画分別にも把握できることから、汚染の地域特性や原因変異原物質を考察するために有効であると考えられた。

3.3.2 検出下限および濃縮倍率

共存物質の多い底質などの試料では、濃縮倍率を高めることは妨害共存物質も濃縮することになり、試験菌株やS9量に影響を与えるので^{15), 17), 18)}、必ずしも試験の感度を高めることにならない。したがって、底質の変異原性モニタリングを目的とした場合、底質の変異原性の実態に即した適切な検出感度の得られる濃縮倍率を求める必要がある。

本試験方法では、各画分はプレートあたり50～400 μg の用量範囲で試験し、MR値が1.5以下(net rev. が

Table 6 Mutagenicities of various sediment samples

Sample	Crude extract ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$)	Fraction	Weight (%)	Net revertants $\cdot \text{g}^{-1}\text{dry}$			
				TA98		TA100	
				—S9mix	+S9mix	—S9mix	+S9mix
A	4830	FA	15.9	-	88	-	330
		FB	19.9	-	68	-	-
		P	32.6	-	-	-	-
		SUM	68.4	-	156	-	330
B	490	FA	10.3	-	-	-	13
		FB	39.6	-	-	-	-
		P	16.5	-	10	-	-
		SUM	66.4	-	10	-	13
S1	217	FA	19.4	-	4	-	15
		FB	34.7	-	31	-	-
		P	23.4	-	16	-	-
		SUM	77.5	-	51	-	15
S2	2000	FA	30.5	-	125	-	200
		FB	29.0	-	71	-	96
		P	22.7	-	58	-	-
		SUM	82.2	-	254	-	296
S3	2190	FA	41.1	-	99	-	387
		FB	28.4	-	81	-	-
		P	21.8	-	-	-	-
		SUM	91.3	-	180	-	387
S4	843	FA	16.4	-	-	-	77
		FB	29.3	-	-	-	-
		P	23.0	-	12	-	-
		SUM	68.7	-	12	-	77
F	679	FA	29.6	-	22	-	45
		FB	35.6	-	24	-	-
		P	22.0	-	22	-	-
		SUM	87.2	-	68	-	45
G	380	FA	32.9	-	28	-	-
		FB	27.0	-	9	-	-
		P	28.8	-	-	-	-
		SUM	88.7	-	37	-	-
H	334	FA	26.9	-	-	-	-
		FB	28.2	-	-	-	-
		P	21.3	-	-	-	-
		SUM	76.4	-	-	-	-
C	473	FA	28.2	-	58	-	191
		FB	31.6	-	294	-	109
		P	27.1	-	440	-	85
		SUM	86.9	-	792	-	385
D	1970	FA	14.4	-	-	-	-
		FB	26.4	-	-	-	-
		P	26.1	-	-	-	-
		SUM	66.9	-	-	-	-
E	15400	FA	26.8	-	330	-	903
		FB	25.8	-	397	-	1090
		P	29.6	-	-	-	-
		SUM	82.2	-	727	-	1990
I	3390	FA	16.2	-	239	-	280
		FB	30.3	-	207	-	153
		P	32.0	-	-	-	-
		SUM	78.5	-	446	-	433

— : $\text{MR} < 1.5$ for 50~400 μg dose

Fig. 5 Detected frequencies of mutagenicity in each fraction for three groups of fractionated amounts

□: Detected frequency < 30%
 ◻: 30% ≤ Detected frequency < 70%
 ◼: 70% ≤ Detected frequency

自然復帰変異コロニー数の0.5倍以下)であった場合に検出されないと判定したので、底質乾重量1gあたりの検出下限値は下式で表され、画分量が多ければ多いほど高くなる。

$$\text{検出下限値} = \text{自然復帰変異コロニー数} \times 0.5 \\ \times \frac{\text{画分全量 } \mu\text{g/g-乾底質}}{400\mu\text{g}}$$

すなわち、抽出物量の多い底質は抽出物量の少ない底質より検出下限値が高くなってしまう。そこで、試験した13の底質試料の各画分すべてについて、底質乾重量1gあたりの画分量を①100μg未満(n=8)、②100μg以上1,000μg未満(n=25)、③1,000μg以上5,000μg未満(n=6)の3グループに分け、試験菌株および画分別にS9mix添加時の変異原性検出率を求めたところ、Fig. 5に示すようになった。すなわち、TA98, TA100両株ともに上記①～③のどのグループでも検出率は高かった。このように、画分量が多く、検出下

限値が高くなるグループにおいても変異原性の検出率が高い実態から、画分量の多い底質試料についても本方法での検出下限値が高すぎることはないと考えられ、分画操作が妨害物質を除去し、検出下限値を下げるのに有効に働いていることを示していた。

一方、環境庁が平成元年に行った調査結果¹⁹⁾では、変異原物質のひとつであるベンゾ[a]ピレン(B[a]P)は、全国45調査地区134の底質のうち122検体から検出され、その濃度範囲は0.005～3.7μg·g⁻¹、中央値は0.062μg·g⁻¹であった。このB[a]Pの中央値をAmes試験で検出するために必要な底質用量(乾重量)を試算したところ、プレートあたりそれぞれTA100株で7.9g、TA98株で3.5gとなった¹⁰⁾。これに対して、本研究ではFig. 5からわかるように、底質乾重量1gあたりの画分量が1,000μg程度になる試料が多く、このときのプレートあたりの用量は底質換算で0.4gとなる。この値は上記のB[a]Pの中央値を検出するために必要な量の20分の1または9分の1に相当する。したがって、本試験方法によって検出可能な底質の変異原性の下限は、全国の底質中B[a]P濃度の中央値の約9倍から20倍に相当する変異原性レベルになる。それにもかかわらず、本試験方法では多くの底質で変異原性が検出されていることは、底質中にはB[a]P以外にも多くの変異原物質が含まれることを意味しており、本研究で提案した分画・濃縮による試料調製方法が底質の変異原性モニタリングのために十分に有効かつ実用的であることを示しているといえる。

4. ま と め

底質中の有害化学物質のモニタリング方法の一環としてAmes変異原性試験を行うための簡便で効果的な試料調製方法について検討し、神奈川県内の汚染度の異なる種々の底質に応用した結果、次のことが明らかになった。

1) 底質からの変異原物質の抽出方法としては、ジクロロメタン/エタノール(4:1)で超音波抽出後、ジクロロメタンで再度超音波抽出を行い、粗抽出物を得る方法が簡便で効果的であった。

2) 粗抽出物を不溶画分、シリカカートリッジー銅カラム通過画分およびシリカカートリッジ溶離画分の3分画を行うことによって、毒性の認められる試料についても、妨害の影響を受けずに、比較的簡便に変異原性を判定することができた。

3) 上記の試料調製方法を各種の底質に適用したところ、13の底質試料中11の底質がS9mix添加の場合に、TA98株またはTA100株に対して変異原性を示し、その範囲は、TA98株に対しては10～792net rev.·g⁻¹

dry, TA100株に対しては $13 \sim 1,990 \text{ net rev.} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry}$ であり、最小値と最大値には約80～150倍の開きがあった。なお、S9mix 無添加の場合には、TA98, TA100両株ともに、どの底質もすべての画分で変異原性を示さなかった。

4) 分画・精製操作は、共存妨害物質の影響を小さくし、検出下限値を下げるだけでなく、画分別に各菌株の変異原性を把握できることから、汚染地域や変異原物質の特性を考察するために有効であった。

5) 全国の底質中の B[a]P 汚染レベルと本研究での変異原性の検出下限および実際の底質試料での検出率とを比較して考察した結果、本試料調製方法底質中の変異原物質のモニタリング方法として十分に有効でかつ実用的であることが示された。

謝 辞

本研究にあたり、試験菌株の分与および貴重なコメントをいただきました静岡県立大学の松下秀鶴教授と国立公衆衛生院の久松由東博士に深謝いたします。

(原稿受付 1995年3月3日)

(原稿受理 1995年6月7日)

引 用 文 献

- 1) 木苗直秀 (1993) 魚の腫瘍発生に基づいた水質評価, 用水と廃水, **35**, 349-358.
- 2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised method for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**, 173-215.
- 3) West, W.R., Smith, P.A., Booth, G.M., Wise, S.A. and Lee, M.L. (1986) Determination of genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment from the Black River (Ohio), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 241-249.
- 4) Suzuki, J., Sadamasu, T. and Suzuki, S. (1982) Mutagenic activity of organic matter in an urban river sediment, *Environmental Pollution*, **29**, 91-99.
- 5) Samoiloff, M.R., Bell, J., Birkholz, D.A., Webster, G.R.B., Arnott, E.G., Pulak, R. and Madrid, A. (1983) Combined bioassay-chemical fractionation scheme for the determination and ranking of toxic chemicals in sediments, *Environ. Sci. Technol.*, **17**, 329-334.
- 6) Black, J.J., Holmes, M., Dymerski, P.P. and Zapisek, W. F. (1980) Fish tumor pathology and aromatic hydrocarbon pollution in a Great Lakes Estuary, *Environ. Sci. Res.*, **16**, 559-565.
- 7) 安部明美, 杉山英俊, 井口潔, 久松由東, 西村哲治, 松下秀鶴 (1987) 河川底質の変異原性をモニタリングするための基礎的検討(1)—致死作用の除去について—, 水質汚濁研究, **10**, 123-129.
- 8) Fabacher, D.L., Schmitt, C.J. and Besser, J.M. (1988) Chemical characterization and mutagenic properties of polycyclic aromatic compounds in sediment from tributaries of the Great Lakes, *Environ. Toxicol. and Chem.*, **7**, 529-543.
- 9) Grifoll, M., Solanas, A.M., Pares, R., Centellas, V., Bayona, J.M. and Albaiges, J. (1988) Assessment of mutagenic activity of coastal sediments Off Barcelona, *Toxicity Assessment: An International J.*, **3**, 315-329.
- 10) 安部明美, 浦野紘平 (1994) 底質の変異原性試験における現状と課題, 用水と廃水, **37**, 191-201.
- 11) 労働省化学物質調査課 (1986) 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 187pp, 中央労働災害防止協会, 東京.
- 12) Allen, H.E., Noll, K.E. and Nelson, R.E. (1983) Methodology for assessment of potential mutagenicity of Dredged Materials. *Environ. Technology Letters*, **4**, 101-106.
- 13) Sato, T., Kato, K., Ose, Y., Nagase, H. and Ishikawa, T. (1985) Nitroarenes in Suimon River sediment, *Mutation Research*, **157**, 135-143.
- 14) 尾崎邦雄, 児玉剛則 (1984) 溶媒抽出法および吸着法を用いた難揮発性物質の分析法, 水質汚濁研究, **7**, 542-548.
- 15) 安部明美, 浦野紘平 (1995) 河川底質の変異原性をモニタリングするための基礎的検討(2)—至適 S9量について—, 水環境学会誌, **18**, 36-43.
- 16) 高梨啓和, 藤江幸一, 浦野紘平 (1994) 水試料の変異原性試験結果の統計的解析, 第28回日本水環境学会年会講演集, 764.
- 17) Abe, A. and Urano, K. (1994) Influence of chemicals commonly found in a water environment on the mutagenicity test, *Sci. Total Environ.*, **153**, 169-175.
- 18) Abe, A. and Urano, K. (1995) Interaction of sediment contaminants in the testing of mutagenicity, *J. Water Science & Technol.*, **30**, 139-144.
- 19) 環境庁保健調査部保健調査室 (1993) 平成5年度版化学物質と環境.