〈論 文〉

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—

Fundamental study on monitoring of mutagenicity in river sediments
Elimination of the lethal action

安部 明美*   杉山 英俊*   井口 潔*
Akemi ABE   Hidetoshi SUGIYAMA   Kiyoshi IGUCHI
久松 由東**   西村 哲治**   松下 秀鶴**
Yoshiharu HISAMATSU   Tetsuji NISHIMURA   Hidetsuru MATSUSHITA

Abstract

Method for eliminating lethal action substances in river sediments was investigated as a part of the study to establish a routine method for monitoring mutagenicity of river sediments. Mutagenicity test was carried out by the pre-incubation method using *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 with and without S9 mix. River sediments were collected at each estuary of four rivers, the Tama river, the Tsurumi river, the Sagami river and the Sakawa river, in Kanagawa prefecture.

All crude extracts from the sediments showed the lethal action on the tester strains. The lethal action was stronger in the extracts from heavily polluted rivers than slightly polluted rivers. Mutagenicity was only observed in the extract from the Sagami river, a slightly polluted river, suggesting the elimination of the lethal action substances is essential for the mutagenicity assay of river sediments.

Treatment of the crude extracts with the activated copper column was effective in reducing the lethal action. However, it was not enough for the complete elimination of the lethal action substances.

Most of the lethal action substances were in the neutral fraction of the crude extract. Then, the neutral fraction was separated by a high performance liquid chromatography (HPLC), and each separated fraction was served for mutagenicity test and survivor test. HPLC was effective for the separation of the lethal action substances and mutagenic substances in the neutral fraction. These results suggest strongly that HPLC is useful for the preparation of test samples for mutagenicity assay of river sediments.

Key words: river sediment, mutagenicity, lethal action substance, high performance liquid chromatography

1. はじめに

近年、生活様式の高度化、多様化に伴い、化学物質の需要は多様化と増大の一途をたどっている。これらの化学物質は、製造、使用および廃棄などの各過程で環境中に放散され、環境を汚染していると考えられる。特に、発がん性など人間の健康に有害な影響を与える

ことが疑われる化学物質による環境汚染は、十分に監視していく必要がある。一方、変異原性試験は、発がん性物質の簡便なスクリーニング法として開発された¹⁾が、環境試料のように多くの化学物質を含む複雑な成分の中から変異原物質を検出する手段としても有効である。環境試料の変異原性に関する研究は、大気

* 神奈川県公害センター 横浜市旭区二俣川1-87-1, Kanagawa Prefectural Environmental Center, 1-87-1, Futamatagawa, Asahi-ku, Yokohama

** 国立公衆衛生院 東京都港区白金台4-6-1, The Institute of public Health, 4-6-1, Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo

2.5 変異原性試験

試験菌株には *Salmonella typhimurium* TA98 および TA100 両菌株を用い、試験は Ames らの方法¹⁾を一部改良したプレインキュベーション法⁹⁾を用いて行った。S-9 mix は Ames らの方法に従い調製した¹⁾。また、S-9 は PCB (KC500) により酵素誘導した *Sprague-Dawley* 系雄ラット肝臓の9000×g 上清画分を用いた。陽性対照試薬は、4-ニトロキノリン-N-オキシド(和光純薬工業製)および2-アミノフルオレン (Aldrich 化学製)を用いた。

2.6 生菌数の測定

生菌数の測定は、Oxoid Neutrient Broth (25g/l) に寒天 (15g/l) を加え寒天平板を用い、通常の変異原性試験と同様の操作を行い、出現したコロニー数を測定した。試験菌液としては、変異原性試験に用いる菌液を滅菌0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で 10^5 倍希釈したものを用いた。

3. 結果および考察

3.1 底質粗抽出物の変異原性

底質粗抽出物の変異原性試験結果の1例を Fig. 3 に示す。横軸に平板あたりに用いた底質量を、縦軸に平板あたりの復帰変異コロニー数をとった。Fig. 3 から分かるように明らかに変異原性が認められたのは、寒川 (相模川) の粗抽出物を TA98 株を用いて S-9 mix 添加条件下で試験した場合のみであった。TA98, TA100 両株共、S-9 mix 無添加の場合には、すべての地点で変異原性は認められず、S-9 mix 添加の場合でも、上記の寒川以外の地点の試料では、変異原性があると認められる用量-反応曲線は得られなかった。

しかし一般的な水質調査結果¹⁰⁾によると、寒川 (相模川) および飯泉橋 (酒匂川) の水質は多摩川大橋 (多摩川) および潮鶴橋 (鶴見川) の水質よりも良好である。このため、寒川以外の底質では共存物質の影響により変異原性が検出できない可能性が考えられた。そこで変異原性試験と同じ試料を用いて、生菌数試験を行った。その結果、Fig. 4 に示すように、S-9 mix 無添加の場合には、TA98, TA100 両菌株共にすべての試料で致死作用が認められた。S-9 mix 添加の場合には、TA98 株では潮鶴橋の試料に、TA100 株では多摩川大橋と潮鶴橋の試料に致死作用が認められた。

底質粗抽出物中には、フミン酸¹¹⁾、イオウ¹²⁾、不飽和脂肪酸¹³⁾、界面活性剤¹⁴⁾ など変異原性試験に対して致死作用あるいは阻害作用を示す物質が含まれている可能性がある。Table 2 に示すように、特に潮鶴橋の底質では粗抽出物の重量も多く、共存阻害物質も多いと推定

された。そこで、潮鶴橋の粗抽出物を酸性、中性、塩基性の各成分に分け、これらを変異原性試験に供した。各成分の重量割合を Table 3 に、変異原性試験結果を Fig. 5 に示す。酸性成分は粗抽出物重量の2.4%であったが、致死作用はみられず、TA98 株の S-9 mix 添加時に弱い変異原性を示した。中性成分の粗抽出物重量に占める割合は86%ときわめて大きかったが、中性成分では TA98 株では S-9 mix 添加の有無にかかわらず変異原性は認められず、また TA100 株では S-9 mix 添加時に復帰変異コロニー数の増加が認められたが、用量の増大に伴って致死作用が現われ自然復帰コロニー数の2倍には達しなかった。なお、中性成分は両菌株に対して致死作用を示し、これは特に S-9 mix 無添加時に顕著であった。一方、塩基性成分は、粗抽出物重量の0.6%と少く、致死作用、変異原性ともに認められなかった。

以上のように、底質粗抽出物の変異原性試験を行う

Fig. 3 Dose-response curves of mutagenic activity of sediments.

(a) Tamagawaohashi (b) Shiotsurubashi
(c) Samukawa (d) Iizumibashi —○— -S-9mix
—●— +S-9mix

Fig. 4 Survival ratio on each dose of sediments.
(a) Tamagawaohashi (b) Shiotsurubashi
(c) Samukawa (d) Iizumibashi $\triangle$ - S-9 mix
 $\blacktriangle$ - S-9 mix + S-9 mix

Table 2 The amounts of extracts per 100g of sediments

Sampling point	Amount of extract mg
Tamagawaohashi (Tama river)	65
Shiotsurubashi (Tsurumi river)	590
Samukawa (Sagami river)	19
Iizumibashi (Sakawa river)	7.9

Table 3 Contribution of the acidic, neutral and basic fraction to the amount of the crude extract

	Weight mg (%)
Crude	590
Acidic frac.	14 (2.4)
Neutral frac.	508 (86)
Basic frac.	3.5 (0.6)

Fig. 5 Dose-response curves of mutagenic activity of three fractions of sediment.

(a) Acidic fraction (b) Neutral fraction (c) Basic fraction $\circ$ - S-9 mix $\bullet$ - S-9 mix + S-9 mix

と、ほとんどの場合に、致死作用のために変異原性を認めることができなかった。比較的水質のきれいな地点の底質粗抽出物を S-9 mix 添加条件下で試験する場合にのみ致死作用の影響を受けずに変異原性試験を行うことができた。

3.2 活性銅カラムの効果

分子状イオウはバクテリア等に対する致死作用物質のひとつとして知られているので、各地点の粗抽出物および潮鵜橋の粗抽出物中性成分について、活性銅カラム処理⁹⁾を行って分子状イオウを除去し、変異原性試験を行った。その1例として、中性成分(潮鵜橋)を活性銅カラム処理した場合の変異原性試験結果を Fig. 6 に、菌の生存率を Fig. 7 に示す。S-9 mix 添加条件下では、TA98, TA100両株共に致死作用は認められなくなり、TA100株で変異原性が明らかに認められ、TA98株でも弱い変異原性が認められた。しかし、S-9 mix 無添加の場合には、致死作用の除去は不十分で、変異原性は認められなかった。

多摩川大橋、寒川、飯泉橋の各底質粗抽出物では、S-9 mix 添加の有無にかかわらず、致死作用は抑制された。しかし寒川以外の地点では変異原性は認められなかった。

Fig. 6 Effect of the copper column treatment on the dose-response curves. ○— -S-9mix
●— +S-9mix

Fig. 7 Effect of the copper column treatment on the survival ratio.
(a) Neutral fraction (b) Elute of the copper column of (a) -△- -S-9mix -▲- +S-9mix

以上の結果から、活性銅カラムによるイオウの除去は、若干の底質では致死作用を除くのに有効であるが、すべての底質試料から致死作用を除去するには適していないと判断された。

3.3 分取高速液体クロマトグラフィーによる致死作用画分の分離

潮鶴橋のように汚染の進んだ地点の底質では、イオウの除去だけでは、致死作用の影響を十分に除くことができなかったため、底質粗抽出物の中性成分を分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離した。得られたクロマトグラムを Fig. 8 に示す。また同じ試料の活性銅カラム流出・濃縮液の HPLC クロマトグラムを図中に点線で示した。活性銅カラム流出・濃縮液で

はフラクション(以下 Frac. という) 1 のピークが小さくなっていたが、他の Frac. については中性成分のそれとほとんど同じであった。Frac. 1~12 の各画分について変異原性試験を行った結果を Fig. 9 に示す。S-9 mix 添加時には、TA100 株で Frac. 5~8 と Frac. 12 に自然復帰コロニー数の約 2 倍以上の変異原性が認められ、TA98 株では Frac. 4~6 および Frac. 12 に変異原性が認められた。S-9 mix 無添加条件下では、Frac. 12 が TA98 株に対して変異原性を示したが、TA100 株では変異原性は認められなかった。

一方、致死作用は Fig. 9 に示すように、TA98 株の S-9 mix 無添加時には Frac. 1~4 に、TA100 株の S-9 mix 添加時には、Frac. 1~2 に認められた。致死作用画分(Frac. 1)を変異原性画分(Frac. 4~8 および Frac. 12)に添加すると、菌の生育は著しく阻害され、変異原性は全く認められなくなることを確認した。

以上の結果、底質粗抽出物あるいはその中性成分では変異原性で明らかに認められない場合でも、HPLC により致死作用画分を分離することにより、変異原性が現われるようになることが分かった。また HPLC 分画を行う場合には、活性銅カラムによるイオウ除去は必要ないことが分かった。

Fig. 8 Chromatogram of HPLC.

Column: Nucleosil 100-30 ϕ 1.0cm $\times$ 30cm
Flow rate: 4ml/min

Eluent: (1)n-hexane (2)n-hexane: benzene(9:1) (3)n-hexane: benzene(8:2) (4)n-hexane: benzene(7:3) (5)n-hexane: benzene(1:1) (6)benzene

Temp: 30 $^{\circ}$ C

Detector: UV 310nm

Fig. 9 Mutagenic activity and survival ratio of fractions by HPLC.

..... -S-9mix Mutagenic activity
 ——— +S-9mix
 -△- -S-9mix Survival ratio
 -▲- +S-9mix

4. ま と め

神奈川県内の多摩川、鶴見川、相模川、酒匂川の4河川の河口域近くの底質を用いて、変異原性をモニタリングするための手法について基礎的検討を行い、次のような結果を得た。

1) 底質粗抽出物の変異原性試験では、S-9 mix無添加の場合には、すべての試料が致死作用を示し、変異原性を確認することができなかった。S-9 mixを添加した場合には、比較的水質の良好な寒川(相模川)および飯泉橋(酒匂川)の試料については致死作用が見られず、寒川の試料がTA98株に対して変異原性を示していた。しかし、多摩川大橋(多摩川)および潮鶴橋(鶴見川)の試料では致死作用が見られ変異原性は認められなかった。特に潮鶴橋の試料では致死作用が強かった。

2) 潮鶴橋の底質粗抽出物を酸性、中性、塩基性成分に分画すると、酸性成分では弱い変異原性が認められたが、他の成分では変異原性は認められなかった。粗抽出物重量の大部分が移行する中性成分で強い致死作用が認められた。

3) 致死作用の原因のひとつと考えられるイオウを除くために活性銅カラムを用いた結果、中性成分(潮鶴橋)ではS-9 mix添加時に致死作用が抑制され、

TA100株に対する変異原性が認められたが、S-9 mix無添加条件下では致死作用は十分除去されず、変異原性も認められなかった。多摩川大橋、寒川、飯泉橋の各粗抽出物では、S-9 mix添加の有無にかかわらず致死作用は抑制されたが、寒川の試料以外は変異原性を示さなかった。

4) 潮鶴橋の底質粗抽出物中性成分をHPLCで分画することにより、致死作用画分が分離されること、HPLCの各画分はS-9 mix添加時にTA98, TA100両菌株に対して変異原性を示す画分、S-9 mix添加時にTA100株に対して変異原性を示し、かつ、S-9 mix添加の有無にかかわらずTA98株に対して変異原性を示す画分とに分けられることを認めた。

以上の結果から、底質の変異原性を調べる場合には同時に生菌数を調べる必要があること、致死作用が認められた場合には、HPLC分画により致死作用画分を分離して変異原性を調べる必要があることが判明した。今後これらの結果を基礎に、底質を用いて変異原性をモニタリングするためのより簡便で有効な手法についての検討や底質中のおもな変異原物質の同定を行いたいと考えている。

謝 辞

本研究の費用の一部は厚生省がん研究助成金によってまかなわれた。関係各位に深謝の意を表します。(1985年日本薬学会第105年会で論文の一部を発表しました。)(原稿受理 昭和61年11月13日)

引 用 文 献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised method for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215.
- 2) H. Tokiwa, K. Morita, H. Takeyoshi, K. Takahashi and Y. Ohnishi (1977) Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants. *Mutation Research*, **48**, 237-248.
- 3) Y. Ohnishi, K. Kachi, K. Sato, I. Tahara, H. Takeyoshi and H. Tokiwa (1980) Detection of mutagenic activity in automobile exhaust. *Mutation Research*, **77**, 229-240.
- 4) Grabow, W.O.K., Rossum, P.G., Grabow, N.A. and Denkhaus, R. (1981) Relationship of the raw water quality to mutagens detectable by the ames salmonella/microsome assay in a drinking-water supply. *Water Research*, **15**, 1037-1043.
- 5) 佐々木裕子, 川井利雄, 遠藤立一, 古井戸良雄, 半谷高久 (1981) 多摩川河川水および底質の変異原

- 性について, 変異原学会要旨集, 35.
- 6) T. Sato, T. Momma, Y. Ose, T. Ishikawa and K. Kato (1983) Mutagenicity of Nagara River sediment. *Mutation Research*, **118**, 257-267.
  - 7) Samoiloff, M.R., Bell, J., Birkhoiz, D.A., Webster, G.R., Arnoff, E.G., Rulak, R. and Madrid, A. (1983) Combined Bioassay-Chemical Fractination Scheme for the Determination and Ranking of Toxic Chemicals in Sediments. *Environmental Science Technology*, **17**, 329-334.
  - 8) Blumer, M (1957) Removal of elemental sulfur from hydrocarbon fractions. *Analytical Chemistry*, **29**, 1039-1041.
  - 9) T. Yahagi, N. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of N-nitrosoamines on Salmonella. *Mutation Research*, **48**, 121-130.
  - 10) 神奈川県 (1985) 神奈川県水質年表, 44-165.
  - 11) 佐藤孝彦, 小瀬洋喜, 永瀬久光 (1985) フミン酸の抗変異原作用, 第12回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム講演要旨集, 27-29.
  - 12) J. Suzuki, T. Sadamasu and S. Suzuki (1982) Mutagenic activity of organic matter in an urban river sediment. *Environment Pollution*, **29**, 91-99.
  - 13) 早津彦哉 (1980) 発癌性物質の変異原活性を抑制する因子, 第7回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム講演要旨集, 18-22.
  - 14) 小田美光 (1980) 細菌を用いた生活環境物質の変異原性に関する研究 (第2報) 大阪府立公衛研所報, **11**, 123-131.

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―

安部 明美* 杉山英俊* 井口 潔* 久松由東** 西村哲治** 松下秀鶴**

* 神奈川県公害センター, ** 国立公衆衛生院

〈水質汚濁研究 Vol.10 No.2 (1987) pp.123~129〉

底質の変異原性のモニタリングおよび変異原物質の検索を目的とし、神奈川県内の多摩川、鶴見川、相模川、酒匂川の河口近くの底質を用いて、変異原性試験(エームス法)を行った。底質はジクロロメタン/エタノールで超音波抽出し、溶媒を留去して粗抽出物試料とした。すべての粗抽出物試料が菌に対する致死作用を示したが、汚染の進んだ河川の試料は、比較的汚染の少ない河川の試料より強い致死作用を示した。変異原性は比較的汚染の少ない相模川の試料のみに認められた。このことから河川底質の変異原性試験には、致死作用の除去が必要であると考えられた。活性銅カラムによる粗抽出物試料の処理は、致死作用の軽減に効果があったが、強い致死作用を示す試料に対しては不十分であった。そこで、特に強い致死作用を示した鶴見川の粗抽出物の中性成分を高速液体クロマトグラフィーで分離したところ、致死作用画分が分離し、変異原性が認められた。

ひも状接触材を用いた回転接触装置による生活排水の処理について

井上 充* 井口 潔*

* 神奈川県公害センター水質部水質科

〈水質汚濁研究 Vol.10 No.2 (1987) pp.130~133〉

生活排水による水質汚濁が問題となっているが、この処理対策のひとつとして、ひも状接触材の利点を生かし、それを可動式とした処理装置で検討を行なった。

本装置は回転円板法における回転円板部の代りに、回転するひも状接触材の帯状ベルトが用いられているため、閉塞しにくく、汚泥捕捉力が強く、省エネルギー的でありまた槽の形による制限がなくなるなどの特徴を有している。

人工下水で行なった処理の適正範囲はBOD接触材面積負荷 $5 \sim 14 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ 、滞留時間4時間以上及び周辺速度 $0.9 \sim 1.5 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。通常回転円板法で用いられている適正範囲と比べると、処理装置が小型であったため、周辺速度が遅かった。

適正範囲に設定した処理条件でのし尿浄化槽流入水及び下水路排水の処理を行ったところ、BOD除去率はいずれも90%近くあり、ほぼ満足できるものであった。