

# 下水処理水の 新たな生物検定方法の検討調査

## 1. 背景と目的

近年、水域環境の水質保全や水の安全性に対する関心が高まっているため、総合的な安全性の指標の一つとして、生物に与える変異原性等の生物検定が注目されている。

そこで、建設省土木研究所が（財）下水道新技術推進機構に委託して、水質の安全性の観点から評価する方法について調査することになった。本調査では、この安全性の評価方法を確立することを目的とし、今年度では先ず、生物検定による安全性評価方法等の文献調査と代表的な一方法による標準物質を用いて試験を行った。

## 2. 調査の内容

平成4年度の調査においては、微生物を対象にした水の安全性に関する生物検定方法（変異原性試験<sup>\*1</sup>等）にかかわる文献調査を主として行った。そして一つの試験方法について、標準物質を用いた試験を行った。

具体的な調査検討項目は次のとおりである。

- 1) 生物検定用試料濃縮方法の文献調査
- 2) 水の安全性に関する生物検定方法の文献調査
- 3) 標準物質を用いた試験

## 3. 生物検定用試料濃縮方法の検討

生物検定を行う際に有意な試験結果を得るには高い用量 (dose) を与える必要がある。そのためには、環境試料に対して濃縮操作が必要になる。

河川水や水道水を対象とした変異原性試験では、下水や下水処理水を対象とする場合と比べて濃縮倍率が大きい。濃縮方法別の濃縮倍率を比較してみると、文献調査よりおよそ次のようになる。

中空糸膜、樹脂吸着 (XAD-2 樹脂等)

＞ブルーレイヨン<sup>\*2</sup>＞溶媒抽出＞凍結濃縮

また、作業的、時間的に容易な順に濃縮方法を並べるとおよそ次のようになる。

中空糸膜、溶媒抽出

＞ブルーレイヨン＞凍結濃縮＞樹脂吸着

変異原性試験等に用いられている各種濃縮方法についてその濃縮特性等の特徴を整理してみると表-1のようになる。

以上より、濃縮を行う際には、各濃縮方法の特徴を十分に理解した上で試料の特性に応じた方法を選定する必要がある。

## 4. 水の安全性に関する生物検定方法の調査

水の安全性について、水の総合的な毒性指標はいまだ確立するに至っていない。

水試料中の有害物は単一の化学物質ではなく、多種類の化学物質の相互作用も考えられ、また、その中身は常に変動するため、短期間で経済的に、しかも再現性の高い定量的試験方法が必要とされる<sup>3)</sup>。生物検定のうち遺伝毒性試験における検索系と検索の容易さについて、黒田ら<sup>4)</sup>の「遺伝毒性 その試験法と毒性評価における位置づけ」には表-2のように示されている。この表よりわかるように、遺伝毒性試験には微生物を用いるのが、検索期間の短さ・

表-1 濃縮方法の特徴等についての文献の整理

濃縮方法名	長 所	短 所
樹脂カラム吸着法 (XAD-2樹脂等)	<ul style="list-style-type: none"> <li>樹脂の種類も多く、その水質に応じた樹脂を用いることによって回収率の向上が図れる。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>樹脂のコンディショニングに非常に手間がかかる。</li> <li>サンプルの通水は20～50 m/min程度であり、サンプルの量が多いと処理に時間がかかりすぎる。</li> </ul>
溶媒抽出法	<ul style="list-style-type: none"> <li>溶媒をかえることにより、その水質に応じた回収率の向上が図れる。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>多量の試料の濃縮には適さない。</li> </ul>
ブルーレイオン吸着法	<ul style="list-style-type: none"> <li>多環芳香族炭化水素の吸着に選択的であり<sup>1)</sup>、濃縮操作も簡便である。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2環以下の炭化水素は吸着できない。</li> </ul>
凍結乾燥濃縮法	<ul style="list-style-type: none"> <li>全ての溶質を濃縮し得る<sup>2)</sup>。</li> <li>低温操作のためシアンのような揮発性成分についても回収率は良い。</li> <li>溶質の構造上の変化も少ない。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>溶質の多い場合は、回収率が悪くなり、また、生物にとって致命的なほどに浸透圧が上昇する。</li> </ul>
中空糸膜濃縮法	<ul style="list-style-type: none"> <li>多量の水が処理でき、耐薬品性や微生物に対する抵抗性がある。</li> <li>安定な変異原物質に対しては回収率が良い。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>不安定な変異原物質に対しては回収率が良くない。</li> <li>あまり実験されていないためデータが不足している。</li> </ul>

表-2 検索系と検索の容易さ<sup>4)</sup>

(黒田 他: 遺伝毒性 その試験法と毒性評価における位置づけ) (1989)

検 索 系	検索期間	通常経費	設備経費	検 索 の 容 易 さ	
				遺伝子突然変異	染色体異常
微生物(代謝活性化)					
サルモネラ菌	2～3日	きわめて安価	安 価	きわめてやさしい	
大腸菌	2～3日	きわめて安価	安 価	きわめてやさしい	
枯草菌	2～3日	きわめて安価	安 価	きわめてやさしい	
酵母	2～5日	中 程 度	安 価	やさしい	
アカバシカビ	1～3週	中 程 度	中 程 度	非常にやさしい	やさしい
哺乳類培養細胞 (代謝活性化)	2～5週	中程度から やや高価	中 程 度	きわめてやさしい かやさしい	やさしい
宿主経由法					
微生物	2～7日	安価から中程度	安価から中程度	やさしい	
哺乳類細胞	2～5週	中程度から高価	中 程 度	やさしい	やさしい
植 物					
ソラマメ	3～8日	安 価	安 価	きわめてやさしい	
ムラサキツユクサ	2～5週	安価から中程度	中 程 度	きわめてやさしい	
昆 虫					
キイロショウジョウバエ	2～7週	中 程 度	中 程 度	やさしいきわめてやさしい	やさしいきわめてやさしい
カイコ	2～10日	中 程 度	中 程 度	やさしいきわめてやさしい	
実 験 動 物					
優生致死突然変異	2～4月	中程度からやや高価	中 程 度		
転 座	5～7月	中程度からやや高価	中 程 度		非常にやさしい
血液及び骨髄細胞	1～5週	中 程 度	中 程 度		やさしい
特定座位突然変異	2～3月	高価からきわめて高価	高価からきわめて高価		

経費の安さ・検索の容易さの点において有利である。

次に、遺伝毒性試験の中で、短期間に経済的で容易にできる試験として変異原性試験があり、この試験方法について主として調査を行った。微生物を用いた変異原性試験には、代表的な方法として次の3つの方法が挙げられる。

- 1) Ames テスト
- 2) umu テスト
- 3) Rec-Assay 法

これらの方法の原理・手順等について文献調査を行い、整理を行った。

上記の試験方法について、方法の概説と文献調査により得られた知見を以下に簡単に述べる。

#### 1) Ames テスト

この試験では、使用菌種としてはネズミチフス菌やサルモネラ菌等を用い、それらの野生株であるヒスチジン非要求性 ( $His^+$ ) の菌とフレームシフト型の突然変異の生じたヒスチジン要求性 ( $His^-$ ) の菌を用いる。本法は、これらの菌を培養し、 $His^-$  から  $His^+$  への突然変異、すなわち復帰突然変異を用いて変異原性の有無及びその強さを調べる方法である。

#### 2) umu テスト

この試験では、使用菌種としてはネズミチフス菌 TA 1535 にプラスミド psk 1002 を導入した TA 1535/psk を使用する。本法は、DNA 損傷に対する緊急の修復反応である SOS 反応の際に発現する SOS 遺伝子群の産物である UmuC'-LacZ タンパクの有する  $\beta$ -ガラクトシターゼ活性の測定により変異原性を評価する方法である。

#### 3) Rec-Assay 法

この試験では、使用菌種としては枯草菌や大腸菌等の DNA 修復機能欠損株 ( $Rec^-$ ) と DNA 修復能株 ( $Rec^+$ ) を使用する。本法は、DNA の修復機能を利用して、修復機能を欠損した菌株と修復機能を有する野生菌株の化学物質による生育感受性を比較して、DNA に損傷を与えているかどうかを判定する方法である。

#### 4) 各変異原性試験の比較

上記の3つの各変異原性試験の比較等について述べられている文献としては次のようなものがあった。

- ① umu テストは Ames テストに比較して致死作用を示す物質を含む場合に有効である<sup>6)</sup>。
- ② 一般に umu テストと Ames テストの発ガン

性に対する感度、特異性、正確度はほぼ同程度とされている。有機塩素化合物を中心とした場合、発ガン性との関係で見ると、枯草菌 Rec-Assay は、Ames テストで検出されていない物質を陽性として検出している<sup>6)</sup>。

- ③ killing 等の問題となっている Ames 法における変異原性試験には umu テスト及び Rec-Assay 法が有効と示唆された<sup>7)</sup>。

### 5. 標準物質を用いた試験

文献調査から水の安全性に関する生物検定方法の一つとして、Rec-Assay 法の一つである枯草菌 Rec-Assay 液体法を選定し、試験手順の検討及び試験を行った。

#### 1) 枯草菌 Rec-Assay 液体法の原理

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の野生株  $Rec^+$  と組換え修復機構欠損株  $Rec^-$  を用い、両株の 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。 $Rec^+$  菌は DNA に損傷を受けてもそれを修復することが出来るが、 $Rec^-$  菌は組換え修復を司る *recE* 遺伝子を欠損しているため、組換え修復を誘導することができない。従って、化学物質が DNA 損傷性を持っている場合、 $Rec^+$  と  $Rec^-$  の生存率に差が生じ、 $Rec^-$  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、両株とも同じ阻害を受けるので生存率に差は生じない。この DNA 損傷による両株の増殖阻害曲線のずれにより、化学物質の DNA 損傷性を表す (図-1 参照)。

#### 2) 枯草菌 Rec-Assay 液体法の試験手順

本試験に用いる菌は、枯草菌 H 17 ( $Rec^+$ ) と M 45 ( $Rec^-$ ) とする。

試験手順は図-2 に示すとおりであるが、順をおって説明すると以下のとおりである。

図-1 枯草菌 Rec-Assay 液体法による DNA 損傷性の検定

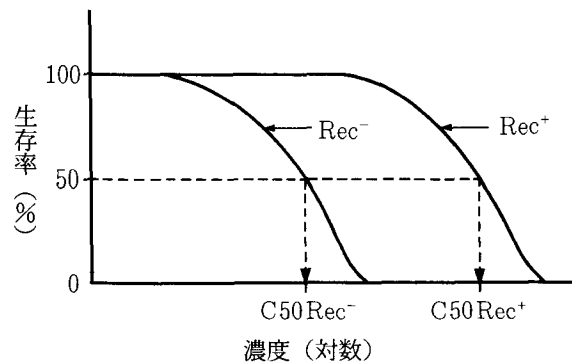
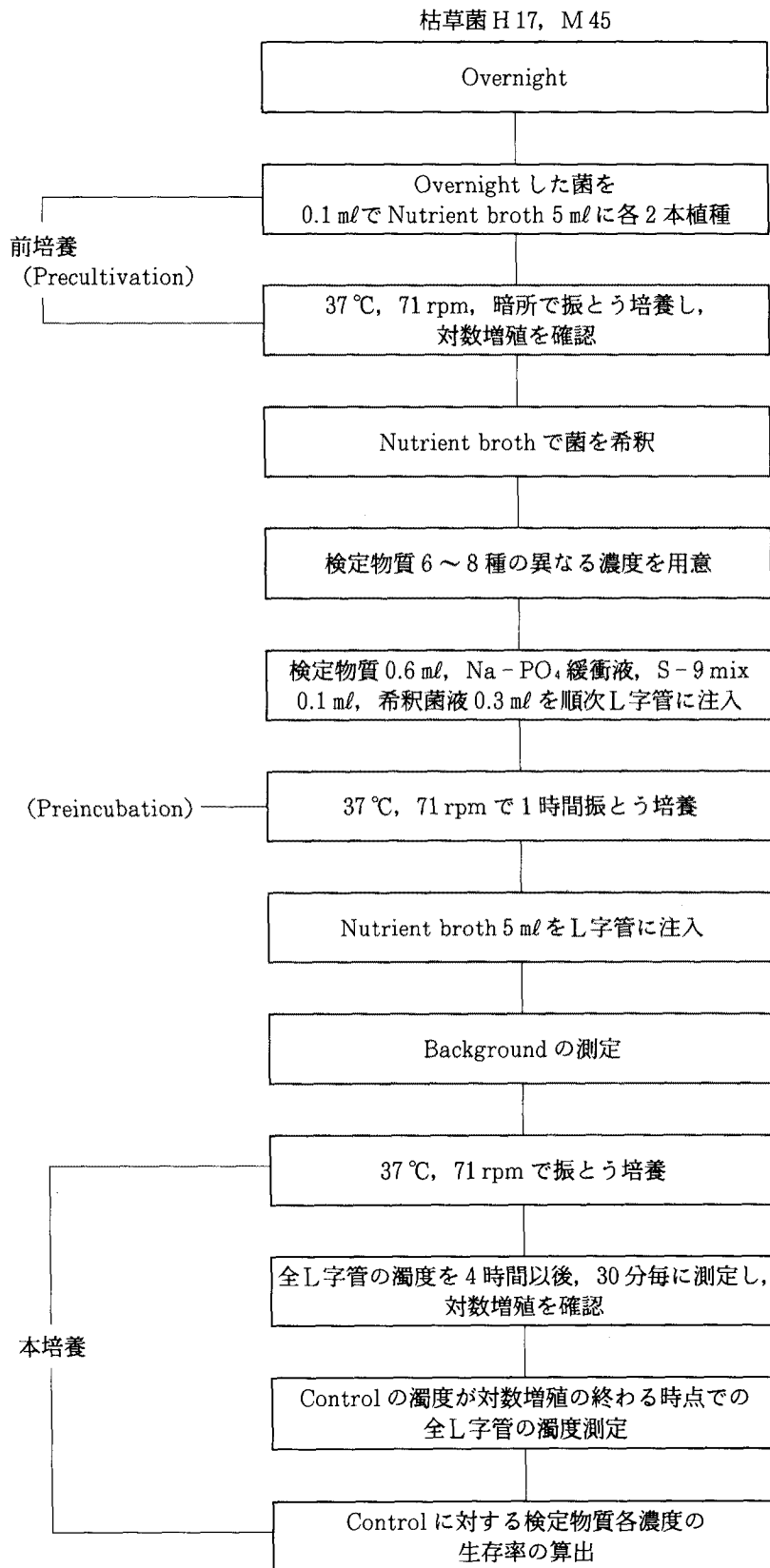


図-2 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) Rec-Assay 液体法

試験手順のフロー



## 各培地の組成

## Nutrient broth 液体培地

1L H <sub>2</sub> O	
ANTIBIOTIC MEDIUM 3 (DIFCO 社)	17.5 g

## Nutrient broth 寒天培地

1L H <sub>2</sub> O	
ANTIBIOTIC MEDIUM 3 (DIFCO 社)	17.5 g
AGAR	15 g

## Schaeffers 寒天培地

1L H <sub>2</sub> O	
ANTIBIOTIC MEDIUM 3 (DIFCO 社)	8 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.25 g
KCl	1 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.98 mg (10 <sup>-6</sup> mol)
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.278 mg (10 <sup>-3</sup> mol)
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	236 mg
Glucose	10 ml 50 % aq solution
Ager	15 g
Tryptophan	50 mg
Arginine	50 mg
Leucine	50 mg
Methionine	50 mg
Histidine	50 mg
Adenine	20 mg

## 緩衝液の組成

2.5M Na-PO<sub>4</sub> buffer を作成する。

(A) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液

150 ml H <sub>2</sub> O	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5.9 g

(B) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液

500 ml H <sub>2</sub> O	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	44.8 g

B水溶液に、A水溶液を pH が 7.4 になるまで加える。(B水溶液 500 ml に対して A水溶液をおよそ 117 ml 加える。) 試験には 0.1 M の buffer を用いるので、この buffer を 25 倍に希釈して使用する。

## S-9 mix の組成

S-9 画分 (購入分)	1.0 ml
0.4 M MgCl <sub>2</sub> 水溶液	0.2 ml
1.65 M KCl 水溶液	0.2 ml
1.0 M グルコース-6-リン酸水溶液	0.05 ml
0.1 M NADHP 水溶液	0.4 ml
0.1 M NADH 水溶液	0.4 ml
0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	5.0 ml
水	2.75 ml
(全量)	10.0 ml

図-3 4NQOによる生存率

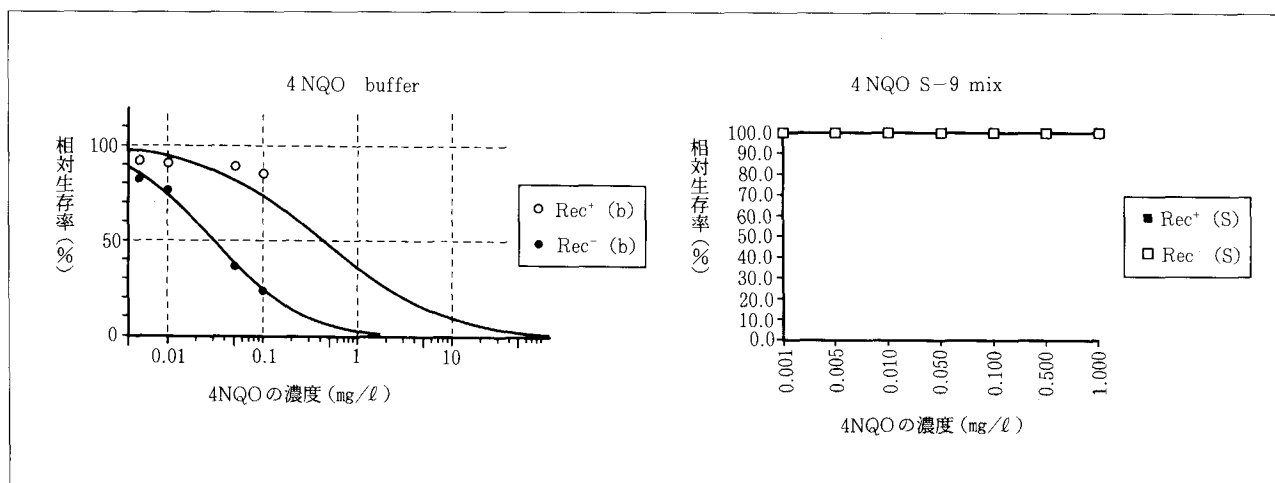


表-3 標準物質の試験結果

標準物質	S-9 mix	R 50	変異原性の評価
4NQO (4-ニトロキノリン-オキソド)	+		変異原性なし
	-	14.1	変異原性あり
MMC (マイトマイシン-C)	+	6.76	変異原性あり
	-	6.47	変異原性あり
TCE (トリクロロエチレン)	+		判定できず
	-		判定できず

代謝活性剤の有無	S-9 mix 添加	+
	S-9 mix の代わりに buffer	-

$$R\ 50\ (50\ \%\text{致死濃度比}) = \frac{C\ 50\ Rec^+ \text{ (Rec}^+\text{ の } 50\ \%\text{致死濃度)}}{C\ 50\ Rec^- \text{ (Rec}^-\text{ の } 50\ \%\text{致死濃度)}}$$

- ① 枯草菌は通常孢子状態で保存されているため、先ず孢子状態から栄養状態にすることが必要となる。この操作を Overnight という。
- ② 栄養状態細胞となった菌から少量をメスピペットで Nutrient broth 培養液 5 ml 入った L 字管に各 2 本ずつ植種し、37°C、70 rpm、暗所で振とう培養し、菌が対数増殖しているのを確認する。
- ③ Rec<sup>+</sup> と Rec<sup>-</sup> それぞれを Nutrient broth 培養液を用いて希釈する。Rec<sup>+</sup> は 4 × 10<sup>5</sup> cells/L (濁度 0.2 程度)、Rec<sup>-</sup> は 8 × 10<sup>5</sup> cells/L (濁度 0.4 程度) とする。
- ④ 6~8 種の異なる濃度の検定物質を用意する。
- ⑤ 検定物質 0.6 ml, Na-PO<sub>4</sub> 緩衝液 0.1 ml または代謝活性剤 S-9 mix 0.1 ml, 及び希釈菌液 0.3 ml を順次メスピペットで L 字管に注入する。この時、Control として検定物質の代わりに滅菌蒸留水 0.6 ml を注入したものをつくっておく (1 種類の濃度に対して L 字管各 3 本)。
- ⑥ 37°C、70 rpm で 1 時間 振とう培養する (Preincubation)。
- ⑦ 各 L 字管に Nutrient broth 培養液 5 ml を加え、混合して濁度を測定する。37°C、70 rpm で振とう培養を始める (本培養)。

- ⑧ 増殖が見られるようになる4時間目以降より濁度の測定を定期的に行う。
- ⑨ Controlが対数増殖を終える直前で本培養を終える。
- ⑩ 各L字管の濁度を測定し、Controlの濁度で除したパーセンテージを生存率として増殖阻害曲線を描く。
- ⑪ Rec<sup>-</sup>菌の復帰変異性及び雑菌の混入を調べるためにストリークアッセイ(画線培養)を行う。

### 3) 標準物質による試験

Amesテストやumuテストで変異原性が確認されており、物性に特徴のある標準物質を用いて枯草菌Rec-Assay液体法を行い、変異原性試験の評価基準の基礎資料を求めた。

標準物質としては次の3物質を用いた。

- 4-ニトロキノリン-オキンド(4NQO)  
(代表的なガン原性芳香族ニトロ化合物の一つで、代謝作用の有無で変異原性が異なる)
- マイトマイシン-C(MMC)  
(DNA合成を特異的に阻害する抗生物質で、アルキル化剤の一種である)
- トリクロロエチレン(TCE)  
(発ガン性のある揮発性の有機塩素化合物)  
変異原性の評価は、松井ら<sup>8)</sup>の提示しているR50(50%致死濃度比)より評価した。

$$R50 = \frac{C50 \text{ Rec}^+ (\text{Rec}^+ \text{の} 50\% \text{致死濃度})}{C50 \text{ Rec}^- (\text{Rec}^- \text{の} 50\% \text{致死濃度})}$$

R50 ≤ 1.3の場合 DNA損傷性無し

R50 > 1.3の場合 DNA損傷性有り

(R50 = 1.3はカナマイシン<sup>9)</sup>の値)

例えば、4NQOの枯草菌Rec-Assay液体法による枯草菌の生存率(増殖阻害曲線)を示すと図-3のようになる。この増殖阻害曲線よりR50を求めると、

(bufferの場合)

$$R50 = 4.23 \times 10^{-1} / 2.99 \times 10^{-2}$$

$$= 14.1$$

となる。同様にして求めた他の標準物質のR50は表-3のようになった。

実験の結果より、揮発性物質であるTCEの場合、ほとんどが気相に移ってしまったため変異原性の評価ができなかったが、4NQO、MMCについては

変異原性の評価を行い、R50値を示すことができた。

## 6. おわりに

本調査では、文献調査を行い、試料の濃縮方法や水の安全性に関する生物検定方法等の基礎的な知識を得ることができた。そして、枯草菌Rec-Assay液体法についてその手順を文献調査より整備するとともに、試験を行って標準物質の変異原性の評価を行うことができた。

次年度においては、umuテストについて調査・検討を行うとともに、さらに両法の適用性についての検討を進める予定である。また、今年度、課題として残った揮発性物質の枯草菌Rec-Assay液体法の試験方法の検討も併せて行う予定である。

### 注)

#### \* 1 変異原性試験

特殊毒性試験法の一種で、化学物質による突然変異性の有無を試験するものである。

#### \* 2 ブルーレイオン

青色素である銅フタロシアニンを結合させた繊維物質で、試料中に懸垂しておくだけで多環芳香族炭化水素を選択的に吸着する性質を持つ。

#### \* 3 カナマイシン

水溶性のある塩基性の抗生物質で、細胞質膜の障害、タンパク質合成の阻害等を行うが、DNA損傷性のないDNA損傷性陰性対照物質。

### <参考文献>

- 1) 佐谷戸, 安好 他: 水中変異原物質のブルーレイオン及びXAD-2樹脂による前処理濃縮法の比較及び濃縮物の変異原特性, 環境庁委託業務報告書 参考文献 5 (1991)
- 2) 中室 克彦 他: Ames-Assayによる水中変異原物質の検出, 第25回水質汚濁学会講演集 (1991)
- 3) 浦野 紘平 他: 細胞などを用いた毒性試験方法と水試料への適用例, 用水と廃水 Vol. 33, No. 9 (1991)
- 4) 黒田 他: 遺伝毒性 その試験法と毒性評価における位置づけ (1989)
- 5) 森田 啓次郎 他: 環境水域における変異原物質の抽出法の検討, 全国公害研究会誌 Vol. 16, No. 3 (1991)

- 6) 松井 三郎 他：レックアッセイ・ウムテスト，第25回水質汚濁学会講演集（1991）
- 7) 小瀬 洋喜 他：陸水域における環境変異原物質の動態に関する研究，環境保全研究成果集（1987）
- 8) 松井 三郎 他：枯草菌 Rec - Assay 液体法による水環境変異原の検出方法，水質汚濁研究 Vol. 8, No. 3（1985）

---

● この調査に関する問い合わせは

建設省土木研究所下水道部

水質研究室長 中村 栄一

主任研究員 田中 宏明

(財)下水道新技術推進機構

技術部長 村上 忠弘

技術部技術課長 村上 孝雄

研究第二部研究員 深尾 忠司