

下水処理水の新たな生物検定方法 の検討調査

1. はじめに

近年、多種類の微量有害物質が環境中に放出されており、水環境も汚染されている実態が明らかになりつつある。これらの汚染物質の全てを個別に計量評価する事は不可能であり、また汚染物質の相乗作用もあることから、このような微量物質を総括的に評価する指標が必要になってきている。

総括的指標の一つとして、生物に対する影響を試験する生物検定法（バイオアッセイ）が、上記の汚染を総括的に評価できる可能性があることから、水環境の総合的評価のために研究されている。¹⁾

生物検定法は単種の生物または複数種の生物群を対象とする物質に曝露し、その影響を生残率、酵素活性等により評価する試験と定義され、次のような特徴がある。

- (1) 様々な物質による有害性を総括的に評価できる。
- (2) 有害性のスクリーニング試験として利用できる。
- (3) 様々な生育段階にある生物を用いることにより、検出感度を高めることができる。
- (4) 毒性の発現機構や影響の受け易い生体の器官を推定できる。

生物検定法としては、特定水域の生物学的安全性を検証するため、その水域に生息している魚を用いる方法が欧米で実用化されているが、対象生物の養殖、異地域の相対評価等に難点があり、より一般的

な評価指標として用いることができる方法が求められている。このための手法の一つとして、物質の遺伝毒性をスクリーニングする方法に用いられている微生物に対する変異原性を調査する手法を、水環境の調査に適用する研究が進められている。

建設省土木研究所では、下水処理水の水質を安全性の観点から評価する種々の生物検定法について調査しており、その一環として、変異原性試験を用いる生物検定法について調査している。

本調査は、平成4年度より平成7年度まで、本機構が建設省土木研究所より受託し実施したもので、下水処理水の安全性評価手法の確立を最終目標として、水環境の安全性評価方法として研究されている変異原性試験について調査検討し、この内、数種の試験方法について下水処理水等を試料として試験することにより、手法と評価方法についての基礎的検討を行ったものである。

2. 調査内容

平成4年度から7年度までの調査において、次の項目について調査検討を行った。

- (1) 微生物を用いる変異原性試験に関する調査
- (2) 試料濃縮方法に関する調査
- (3) 実試料と標準物質を用いた試験

3. 調査結果

3.1 変異原性試験

微生物を用いる変異原性試験として、微生物の種類と手法との組み合わせにより、多くの試験法が提案されている。その中で、水環境調査への適用研究が報告されている試験法の中から、次の手法について調査検討した。^{2) -1)}

(1) Ames 試験

人為的に突然変異を起こさせてヒスチジン要求性 (His⁻) とした細菌が、変異原物質によりヒスチジン非要求性 (His⁺) の菌に復帰変異することによりヒスチジン欠損培地で増殖可能となった結果、形成されるコロニー数を計測し、試料の変異原性の有無を調査する。下水のようにヒスチジンが含まれる試料では培地にヒスチジンを添加することになるため測定に誤差が生じる可能性がある。

(2) Rec-Assay

変異原物質によりDNAに損傷を受けた場合、DNA修復能株 (Rec⁺) は損傷したDNAを修復できるが、DNA修復機能欠損株 (Rec⁻) は修復できないため、生残率に差異が生じる。この差の大きさを両者の生育阻害曲線から算出し、これより試料の変異原性を評価する。

(3) umu-test

変異原物質によって損傷されたDNAが、細菌自体の緊急修復遺伝子により修復される際に生産される酵素 (β-ガラクトシターゼ) の活性を測定することにより変異原性を評価する。

(4) ウムラック

umu-testをキット化し簡便化したものである。ただし、試料用量・酵素活性測定波長等がumu-

testと異なるため、umu-testと同一の結果が得られるとは限らない。

以上の試験方法の概要を表-1に示す。

この内、Rec-Assay, umu-test, ウムラックについて標準試料及び実試料を用いて試験を行い、試験結果、操作性、再現性等について比較調査した。

いずれの試験においても、代謝活性物質 (S-9 mix) の有無による変異原性の発現について調査した。これは、生体内で代謝されて初めて活性化され、変異原性が発現する物質を検証するためである。

3.2 試料濃縮

3.2.1 試料濃縮方法

水環境中の変異原物質は非常に微量であるので、変異原性試験において有意な結果が得られる濃度まで試料中の対象物質を選択的に濃縮しなければならない。

水環境中の微量物質を濃縮する手法として、表-2に示す方法などが研究されている。⁵⁾

表-2 水環境試料の濃縮方法

濃縮方法名	長 所	短 所
樹脂カラム吸着法	樹脂の種類が多く回収対象物質に応じた樹脂の選定が可能	樹脂の前処理に手間がかかる、通水速度に制限があり、多量処理に時間がかかる
浸漬吸着法 ブルーレイオン ブルーコットン	多環芳香族化合物を選択的に吸着、濃縮操作が容易、試験設備が簡単	2環以下の芳香族化合物を吸着できない
溶媒抽出法	回収対象物質に応じた溶媒により選択的回収が図れる	多量処理ができない
凍結乾燥濃縮法	全ての溶質を濃縮回収揮発性成分の回収が可能 溶質の変化が小さい	選択的回収ができない 無機物も回収するため濃縮試料の浸透圧が増加し生物試験不適となることがある
膜濃縮法	膜の分画分子量により回収物質の分子量を選択できる	濃縮倍率が低い 報告件数が少ない

表-1 調査対象変異原性試験法の比較

試験方法	Ames 試験 #1	Rec-Assay #2	umu-test	ウムラック
試験菌株	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100	<i>Bacillus subtilis</i> HI7(rec ⁻), M45(rec ⁺)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK1002	<i>Salmonella typhimurium</i>
測定項目	変異原性菌株のコロニー数	2種の菌株への生育阻害の差	酵素活性 (β-galactosidase)	酵素活性 (β-galactosidase)
判定基準	変異株コロニー数が溶媒対象の2倍以上で、かつ復帰変異数が用量依存性を示す場合、陽性とする。	R ₅₀ ≥ 1.3 (KanamycinのR ₅₀ = 1.3) その他の基準 Rec-gram Rec-volume	溶媒対象の酵素活性の2倍以上	溶媒対象の酵素活性の2倍以上
適用時の問題	下水中のヒスチジンが影響する可能性がある。	微量物質の影響が有る。	着色物質の影響が有る。	含有物質の影響がある。
急性毒性の影響	変異原性が低く出る	菌への毒性の差が影響	計算で除外	影響有り
試験	無菌操作	必要	必要	不要
	培養時間	2日	半日	半日
条件	操作時間	3日	1日	1日

*1 実試料に対する試験は実施せず。 *2 液体 Preincubation法

本調査では、この中から濃縮倍率が高く変異原物質の回収率が高いと報告されている樹脂カラム吸着法を用いることとした。

吸着用樹脂として、変異原物質の回収率が高いと報告されているもののうち表-3の樹脂について検討した。この中から変異原性調査への適用報告が多い3種の樹脂を用いて試料を濃縮し濃縮物の変異原性試験を行った。表-3でSep-Pakとあるのは、樹脂を小型容器に充填した形で製品化されたものである。

3.2.2 樹脂の前処理

本調査では、表-3の溶媒を用いて前処理を行った。

樹脂吸着法では、樹脂の前処理終了後に超純水を通水し、通水前後の超純水のTOC等を測定して樹脂から有機物が溶出しないことを確認する事により、前処理方法を検証する必要がある。

Sep-Pak C18は表-3の前処理手法で容易に精製されるのに対し、XAD-2とSep-Pak CSP800の製品自体が不純物の有機物を吸着しているため、入念な前処理が必要であることがわかった。

なお、前処理に用いる純水に極微量であっても有機物が含まれていると、この有機物が前処理の過程で樹脂に吸着されてしまい測定誤差の原因となるので、有機物を含まない超純水を用いることが必要である。また、試験に使用する器具からの有機物の溶出についても十分注意しなければならない。

3.2.3 試料pHと再抽出溶媒

樹脂吸着法では、試料濃縮時の試料のpH、再抽出溶媒等により回収物質が異なる事が知られている。本調査では、表-3に示す試験条件を用いて吸着濃縮した。

3.2.4 有機物回収率

樹脂吸着による有機物の回収率を調査するため、吸着前後の試料（下水および下水処理水）のTOCを測定したところ、XAD-2ではほとんどTOCを吸着していないのに対し、Sep-PakでC18では40~47%のTOCが吸着されており、回収率が高いことが分かった。

ただし、有機物の回収率が低くても、変異原物質を特異的に回収濃縮する場合もあるので、今後、樹脂による吸着物質の分子量分布、吸着物質の解析、変異原物質の同定など、有機物の回収率と変異原物質

表-3 吸着用樹脂

樹脂名	XAD-2	XAD-8	C-18 (Sep-Pak)	CSP800 (Sep-Pak)	Blue rayon Blue cotton	
樹脂形式	Highly porous nonionic resin ポリスチレン	Porous nonionic resin アクリルエステル	Porous nonionic resin オクタデシル ジメチルシリケート	Highly porous nonionic resin ポリスチレン	Cellulose bonded with copper phthalocyanine trisulfonate	
分子構造			$Si(CH_3)_2C_1H_{11}$ 			
比表面積	m ² /g	280~320	630	310	710	-
粒 径	μm	250~850	297~840	297~840	149~250	30~50
細孔容積	cm ³ /g	0.69	1.07	0.44	1.13	-
吸着特性	水溶液から疎水性部分を持つ有機物を吸着	水溶液から疎水性部分を持つ有機物を吸着	多くの変異原物質を吸着	多くの変異原物質を吸着	多環芳香族化合物を選択吸着	
試験条件	試験pHの調整	2, 7, 10	-	2, 7, 10	2	-
	前処理溶媒	メノール、アセトニトリル、ジクロロメタン、超純	(試験に用いず)	メノール、超純水	ジクロロメタン、超純水	(試験に用いず)
	再抽出溶媒	メノール、ジクロロメタン	-	メノール、ジクロロメタン	ジクロロメタン	-

の回収率とに関する検討が必要である。

3.3 試料

下水および下水処理水等の実試料および標準物質を用いて各種試験方法による試験を行った。

3.3.1 実試料

次の2処理場の流入下水、塩素消毒後の処理水等を試料とした。

① A処理場（生活排水主体）

濃縮物は緑色に着色

② B処理場（工場排水主体）

濃縮物は茶色に着色

3.3.2 標準物質

試験手法の再現性の調査および既報との比較を行うため、表-5に示す標準物質について試験概要に示す試験を行った。この結果、標準物質に対する既報の値と同程度の変異原性が検出された。

ただし、標準物質を溶解させた水を樹脂吸着濃縮し、その濃縮物を用いて変異原性試験することによる、濃縮方法を含めた検証は行わなかった。

また、標準試料の内トリクロロエチレンは、試験操作中に揮散してしまったため変異原性を測定できなかった。このような揮発性物質を試験する場合には、菌体と反応させる時に試料を揮発させない操作が必要である。

なお、樹脂吸着法では、濃縮再溶出の操作中に溶媒を揮散させる工程があるので、揮発性物質を回収することはできない。

このように、揮発性有機塩素化合物等の揮発性物質を測定対象とするためには、試料を揮散させない濃縮手法と試験方法が必要であることがわかった。

3.4 試験結果

3.4.1 Rec-Assay

A処理場の処理水では、XAD-2樹脂を用いてpH2で230倍に濃縮した試料でS-9mix (+)系で変異原性陽性と判定されたのに対し、B処理場の処理水ではpH7で40倍に濃縮した試料でS-9mix (-)系で変異原性陽性と判定され、処理施設により変異原物質が異なることが推察された。いずれの場合も、濃縮倍率を考慮したRec-Volumeでは、松井等の淀川水系での調査結果に比べて非常に低い値であった。⁷⁾

3.4.2 ウムラック

A処理場B処理場ともに、Sep-Pak C-18を用いて中性で2000倍に濃縮した処理水で変異原性が陽性と判定された。しかし、Sep-Pak CSP 800およびXAD-2では同様の濃縮倍率で変異原性が検出されなかった。この結果から、Sep-Pak C-18を以後の試験の吸着用樹脂として選択した。

3.4.3 umu-tast

(1) 菌体培養条件

標準物質および実試料を複数の試験機関で試験したところ、変異原性の判定結果に差が生じたため、この現象を解析し、試験手法を比較検討した。この結果、umu-testは細菌の酵素活性を調査する手法であるので、微妙な操作条件の違いによっておこる細菌の活性状態の違いにより試験結果が異なるため、試験において次の点に留意しなければならないことがわかった。

○試料暴露時に細菌が対数増殖期の初期にあること

表-5 標準物質と試験結果の概要

略 称	一 般 名	概 要	試 験 概 要
4NQO	4-Nitroquinoline-1-oxide	代表的な発ガン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	Rec-Assay試験、umu-test検証 S-9mix (-) で強い変異原性を示した
MMC	Mitomycin-C	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。	Rec-Assay試験検証 S-9mix (+) (-) で変異原性を示した
TCE	Tri-chloroethylene	発ガン性のある揮発性の有機塩素化合物、有機溶剤として使用	Rec-Assay試験検証 試験中に揮散し、測定不可
TMTD	チラム	急性毒性のある農薬（殺菌剤） Ames-testで変異原性ありとされている	ume-testに対する急性毒性の影響を評価するため使用 顕著な影響がみられなかった
TBC	チベンカルブ (ベンチカルブ)	農薬（除草剤） 変異原性、慢性毒性に関する試験データが未公表	ume-testに対する急性毒性の影響を評価するため使用 顕著な影響がみられなかった
AF-2	Furylfuramide	ニトロフラン系殺菌剤 1965年7月食品添加物に指定、1974年9月発ガン性ありとして食品添加物から指定削除	ume-testに対する急性毒性の影響を評価するため使用 顕著な影響がみられなかった
2AA	2-Amino-anthracene	多環芳香族炭化水素化合物 自動車排ガス等に含まれる発ガン性物質	ume-test検証 S-9mix (+) で変異原性を示す
Trp-p-2	3-Amino-1-methyl-5H-pirido[4,3-b]indole	食品等の加熱蛋白に含まれる ヘテロサイクリックアミンの一種	ume-test検証 S-9mix (-) で変異原性を示す

- 反応終了時にも対数増殖期内であること
- 増殖速度が常にほぼ同一であること

そこで、ほぼ同一の増殖曲線が得られるように、培養容器の形状、培養容器の振とう培養器への設置状態、培養器の振とう方向、振とう速度等について培養条件を詳細に設定した。

(2) 酵素活性測定に対する妨害の除去

umu-testでは、菌体を試料に暴露した後、発色剤を添加して吸光度により酵素活性を測定しているが、この測定波長が下水処理水濃縮物質の色と近似しているため、濃縮物質を混在したままでは、酵素活性を正確に測定できない。この妨害を回避するため、菌体を濃縮物質と混合させた後、菌体を生理食塩水で洗浄し、濃縮物質を除去する操作を行った。

(3) 再溶出溶媒

Sep-Pak C-18濃縮物質をジクロロメタンとメタノールで再溶出し、umu-testに供した結果、メタノール溶出物では陽性となったのに対し、ジクロロメタン溶出物では陰性となったことから、再溶出溶媒としてメタノールを選択した。

(4) 試験結果

667倍濃縮物で、A処理場の処理水ではS-9 mix (+) (-) 系のいずれの場合も変異原性が陽性となったのに対し、B処理場ではS-9 mix (+) 系だけが陽性となったことから、処理場により変異原物質が異なることが推察された。また、試料濃縮時のpHにより、回収物質が酸性物質と塩基性物質とに分かれると報告されているが、両処理場の処理水とも、試料濃縮時のpHによる顕著な違いは見られなかった。処理場により変異原物質が異なることが推察されることから、試料濃縮時のpHについては、更に多数の処理場の試料について試験し、検討する必要がある。

3.5 試験法の比較

ウムラックはumu-testに比べ試験操作が簡便であるが、マイクロピペットを使用するなど、熟練を要する面があり、また同じ濃縮倍率ではumu-testの方がウムラックより強い変異原性が検出されており、検出感度が高かった。

Rec-Assayで使用する2種の菌株は、同一種ではあるが一方が変異株であるので、急性毒性物質によっては耐性が異なる可能性がある。このため、試料中に急性毒性物質が存在する場合には、その影響があることが考えられる。実試料を用いた試験においても生育阻害曲線が逆転することがあり、変異

原性を評価できないことがあった。したがって、種々の微量物質が混在している下水の場合には、変異原性を厳密に測定していない可能性が考えられる。

以上のことから、umu-testを下水処理水の変異原性試験手法として選択することとした。

4. 今後の課題

4.1 試験結果の評価

下水処理水の水環境に対する影響を評価するためには定量的評価が必要であるが、本調査では、umu-testの結果を定性的に評価しており、濃縮倍率を加味した定量的評価は行っていない。

水環境の調査に用いる変異原性試験は、濃縮試料について試験を行っているが、高い倍率で濃縮した試料で変異原性が検出されたとしても、濃縮前の状態で環境に影響があるとは断定できない。

変異原性試験は有害物質をスクリーニングするための手法であり、変異原性が検出されたからといって、人や他の生物に対しては暴露経路、感受性、作用機構等が異なるため、ただちに影響があるとは限らない。

これらのことなどから、変異原性試験結果を定量評価する方法として、標準物質と比較して定量評価する手法や、人の生涯にわたる摂取によって生じる生涯リスクが、あるきわめて低い危険率より低いならば実質的に安全であるとするVSD (virtually safe dose, 実質安全用量) を用いた生涯許容濃度の考え方などが提案されている。^{9) 10)}

一方、変異原性試験は、急性毒性物質、抗変異原物質、変異原性を相乗効果により強化する物質などの影響を受けるため、共存物質によっては、同一含有量であっても試験結果が異なる可能性がある。

今後、これらの考え方を踏まえて、変異原物質の内容、人および他の生物に対する影響等を考慮した定量的評価方法について検討することが必要である。

4.2 変異原物質の解析

本調査においては、変異原性が検出された濃縮物の構成物質を同定していないため、どの様な物質が変異原として検出されているかは不明である。

今後、濃縮物を分画した試料についてさらに変異原性試験を行うなど、下水処理中の変異原物質の構成物質について解明する必要がある。

5. まとめ

- (1) 変異原物質を濃縮する方法として、Sep-Pak C-18による樹脂吸着法を選択した。この時の再溶出溶媒にはメタノールを選択した。
また、試料濃縮時のpHによる影響は明確ではなかった。
- (2) 実試料を用いて試験した手法の中ではumu-testの検出感度が高かった。
- (3) umu-testは、細菌の酵素活性を検出する試験方法であるので、供試菌体の活性を同一にするなどの試験条件を一定にしなければならない。このため、試験手法を細部にわたり設定した。
- (4) 2処理場の処理水では、代謝活性物質の有無により変異原性に違いがあったことから、変異原物質が処理場により異なることが推察された。
- (5) 変異原性試験の結果の定量的評価方法について、さらに、検討が必要である。

(参考文献)

- 1) 内海英雄他：細胞毒性試験による水質評価，用水と廃水Vol.35 No.4 (1993)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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，全国公害研会誌Vol.16, No. 3 (1991)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 小野芳朗他：突然変異誘発遺伝子の定量による遺伝毒性リスク評価，第27回日本水環境学会年会講演集 (1993)
- 11) 宗宮功他：人糞便性遺伝毒性物質の処理場における挙動に関する研究，第27回日本水環境学会年会講演集 (1993)
- 12) 小野芳朗他：Umuテストによる窒素化合物の高感度検出と実排水への適用，第28回日本水環境学会年会講演集 (1994)
- 13) 浦野紘平他：水道水のAmes変異原性に関する研究 第一報 変異原性物質濃縮回収用の吸着剤 水環境学会誌 Vol. 17. No.7 (1994)
- 14) オルガノ(株)資料
合成吸着剤 アンバーライトXAD

● この調査に関する問い合わせは

研究第一部長	佐藤	和明
研究第一部主任研究員	伊藤	久明
研究第一部主任研究員	関根	富明
研究第一部主任研究員	氷見	直孝