

ノート 三重県北部7河川水の Ames 試験結果

佐来栄治、加藤進、市岡高男、早川修二、山川雅弘

三重県北部の7河川水を対象に、再現性・定量性に優れている Ames 試験を行いバイオアッセイからみた、変異原性の評価を試みた。

今回の調査は、サルモネラ菌、TA98 株を用いて行い、その結果5河川から、わずかではあるが変異原性が認められた。

1. はじめに

現在、多種多様な化学物質、金属類が、環境中に放出され安全性の面から様々な問題となっている。そのような物質に対して、すべて機器分析による濃度測定からの評価だけでなく、早急な未知物質への対応などにおいて、種々のバイオアッセイ試験が行われている。当所においても、バイオアッセイによる産業廃棄物の溶出液の毒性評価^{1, 2)}を実施した。平成9年度には、三重県北部3河川5地点についてマイクロトックス毒性試験、Ames 試験(TA100, TA98)、umn 試験を用いた河川水の評価³⁾を行った。その結果、Ames 試験の TA98 株で陽性反応が出た河川があったので、平成10年度に、三重県北部7河川水に Ames 試験を応用したので報告する。



図1 調査河川と採水地点

2. 実験方法

2-1. 調査地点、期間

図1に示したとおり三重県北部の員弁川、朝明川、海蔵川、三滝川、大井の川、鈴鹿川、金沢川の7河川を調査対象とし、平成10年7月から平成11年4月まで調査を行った。

2-2. Ames 試験

2-2-1. 試薬及び機器

今回の Ames 試験では、平成9年度の結果³⁾に基づき、TA98 の代謝活性剤(S9mix)を添加したものと(以下「+S9」という)と、しなかったもの(以下「-S9」という)で行った。

(試薬等)

・サルモネラ菌 TA98 株、国立公衆衛生院地域環境衛生学部から分与された菌を使用した。

・S9Mix [代謝活性剤](オリエンタル酵母社)

・寒天(DIFCO LAB 社製)

・ニュートリエントプロス(OXOID社)

・ジメチルスルホキシド(以下「DMSO」という)(関東化学分光分析用)

・2-アミノアントラセン(以下「2AA」という)

[S9Mix を加えた場合の陽性対照物質]

DMSO で、10 µg/mL を作成し、2 mL の褐色ネジ口瓶に、冷凍保存を行う。試験直前に解凍を行い、原液、2倍に希釈して 100 µL を試験に使用した。

・4-ニトロキノリン-1-オキシド(以下「4NQ0」という)[S9Mix を加えない場合の陽性対照物質]

DMSO で、5 µg/mL を作成し、2AA と同様に使用した。

・ヒスチジン・ピオチン溶液(0.5 mmol/L)

- ・Vogel-Bonner 最少培地(硫酸マグネシウム2 g/L、クエン酸 20 g/L、リン酸二カリウム 100 g/L、リン酸水素アンモニウムナトリウム 35 g/L 溶液)
- ・リン酸緩衝液 (0.1 mmol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液に 0.1 mmol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液を加えて、pH 7.4 に調製したもの)

吸着剤：Sep-Pak Plus(Long)CSP800、Waters 社製を使用した。

コンディショニングは、浦野ら⁴⁻⁶⁾の示すとおり行った。

CSP800 を、4 個直列に接続し、酢酸エチルを 10 mL/min の上向流で流した後、エタノールを 10 mL/min の下向流で流し、その後、イオン交換水を 10 mL/min の上向流で 100~200 mL 流し、吸着剤中のエタノールの除去を行い調整した。

(機器等)

- ・高圧蒸気滅菌器 (オートクレーブ)
- ・乾熱滅菌器
- ・クリーンベンチ
- ・ふ卵器
- ・恒温振とう培養槽 (プレインキュベーション及び菌の前培養操作用)
- ・低温冷凍庫 (-20)
- ・超低温冷凍庫 (-80)
- ・Waters 社製 Sep-Pak コンセントレータ
- ・線滅菌済みディスポーザブルシャーレ

2 - 2 - 2 . 河川水試料の前処理

河川水 2 L を加圧型の濾過器 (ろ紙 0.45 μm) でろ過を行い、硫酸 (約 5 規定) を用いて pH2 に調整を行う。その後、コンディショニングした Sep-Pak Plus(Long) CSP800 カートリッジに 約 20mL/min で通水を行い、最終段階で空気を入れないように注意しながら続け、カートリッジ内をイオン交換水で洗浄を行い、最後にカートリッジ内に水を満たした。その後、DMSO を 0.2 mL/min で流し、カートリッジ内の水が DMSO に置換され、DMSO が流出し始めてからネジ口瓶に 2 mL 分取をし、河川水に応じて、2、4、8 倍と順次希釈を行い、100 μL を各段階の試験溶液として使用した。速やかに試験できないときには、-20 の冷凍庫で保存を行い、試験直前に希釈を行った。

2 - 2 - 3 . 試験方法

試験は、プレインキュベーション法で行い、図 2

の操作フローに従って実施した。

(操作 3) の菌の前培養において、7~2 月は、37、約 8 時間でおこなったが、3、4 月は、久保ら⁸⁾の報告とおり、25、24 時間でおこなった。

2 - 2 - 4 . 判定方法

希釈段階のいずれかの倍率で、復帰コロニー数が陰性対照値の 1.4 倍以上⁷⁾のとき変異原性があるとした。

3 . 結果及び考察

3 - 1 . 試験結果

今回、行った Ames 試験の陽性対照物質添加量と復帰コロニー数の関係を表す容量 - 作用量のグラフの一例を図 3 に示した。X 軸は、1 プレート当たり注入した陽性対照物質添加量を、Y 軸は、1 プレート当たりの復帰コロニー数を示している。表 2 に、陽性対照物質添加量と復帰コロニー数の関係から求めた、試験に使用した菌の平均活性度とバラツキを示した。活性度は、陽性対照物質 1 μg あたりに復帰するコロニー数を示しており試験に用いる菌の状態を示すものであり、試験には、著しく高い菌株や低い菌株は使用することに適していない。今回は、試験に不慣れなこと、ニュートリエントブross の劣化等の原因で、特に +S9 でばらついたと思われる。前報で菌の活性が確認されていることから、操作のバラツキとして後の解析を行った。

(操作 3) において、菌の前培養条件を、37、8 時間から、3 月以降、25、24 時間に変更しておこなった結果、-S9,+S9 とともに 3 月以前のブランク、活性度とも差がなく良好であった。

3 - 2 . 調査結果

今回の調査において、高梨ら⁷⁾の報告に沿って、陽性を陰性対照値の 1.4 倍とし解析を行った。図 4 に示すように、復帰コロニーに生育阻害が見られる場合は、前の 3 点をもちいて 1 L 当たりの復帰コロニー数の算出を行った。河川の調査結果を表 2、図 5 に示した。図 5 は、1000 倍濃縮した河川水試料の DMSO 溶液の試料添加量とその時に復帰したコロニー数の関係を示しており、その関係式から、もともと河川水 1 L 当たりの復帰コロニー数を表 2 に示した。調査の結果、朝明川、大井の川、金沢川の三河川で、復帰コロニー数の増加があった。表 3 に、

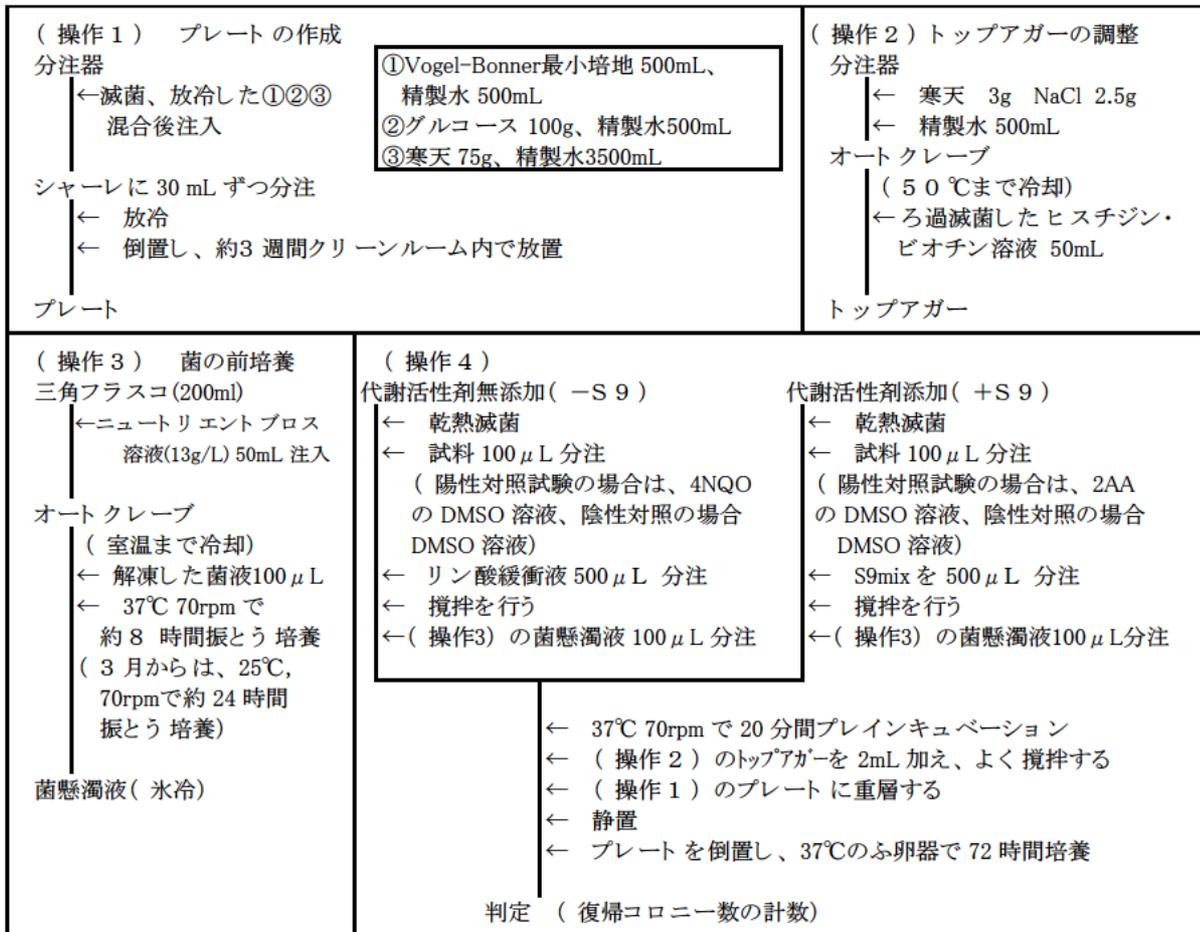


図2 Ames 試験の操作フロー

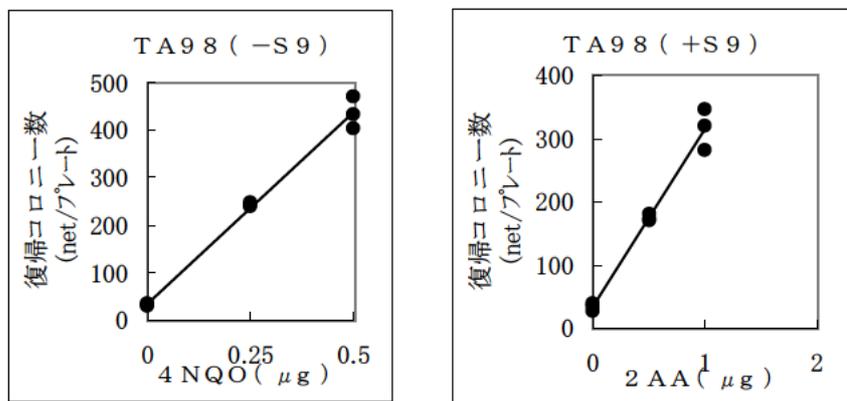


図3 陽性対照物質の添加量と復帰コロニー数の関係

表1 Ames 試験期間における菌の平均活性度とバラツキ

| 菌の種類 | 活性度 | CV(%) |
|-----------|-------------------|-------|
| TA98(-S9) | 740 (net/4NQO μg) | 10 |
| TA98(+S9) | 400 (net/2AA μg) | 48 |

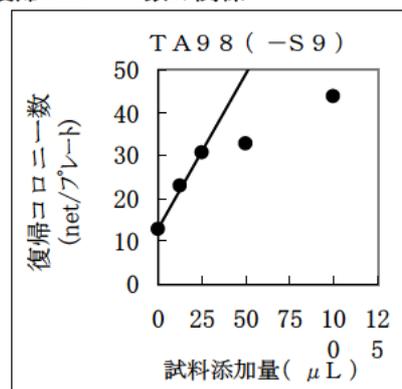


図4 河川水試料と復帰コロニーの関係

表2 河川調査結果 (1L中の復帰数)

| | | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 | 1月 | 2月 | 3月 | 4月 |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| 員弁川 | +S9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | -S9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 朝明川 | +S9 | - | 230 | - | 270 | - | 440 | - | 520 | - | 960 |
| | -S9 | - | 220 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 海蔵川 | +S9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | -S9 | - | 170 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 三滝川 | +S9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | -S9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 大井の川 | +S9 | 700 | 220 | - | - | - | - | - | 1300 | 280 | 480 |
| | -S9 | - | - | - | 280 | 480 | 490 | 250 | 420 | - | 300 |
| 鈴鹿川 | +S9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | -S9 | - | 220 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 金沢川 | +S9 | 530 | - | 200 | - | - | - | - | 550 | - | 730 |
| | -S9 | - | 260 | - | - | 290 | - | - | - | - | 160 |
| Blank | +S9 | 38 | 44 | 34 | 34 | 35 | 45 | 40 | 78 | 56 | 35 |
| | -S9 | 32 | 30 | 34 | 34 | 28 | 13 | 27 | 28 | 27 | 29 |

(復帰コロニー数/換算通水量 1L : 生育阻害がみられた)

表3 河川調査結果 (1L中の陽性対照換算量)

| | | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 | 1月 | 2月 | 3月 | 4月 |
|------|-----|-----|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| 朝明川 | +S9 | - | 0.26 | - | 0.36 | - | 0.57 | - | 3.0 | - | 1.9 |
| | -S9 | - | 0.33 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 海蔵川 | +S9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | -S9 | - | 0.26 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 大井の川 | +S9 | 1.8 | 0.31 | - | - | - | - | - | 8.3 | 0.34 | 0.93 |
| | -S9 | - | - | - | 0.37 | 0.62 | 0.69 | 0.39 | 0.69 | - | 0.34 |
| 鈴鹿川 | +S9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | -S9 | - | 0.33 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 金沢川 | +S9 | 1.3 | - | 0.6 | - | - | - | - | 3.3 | - | 1.4 |
| | -S9 | - | 0.39 | - | - | 0.4 | - | - | - | - | 0.17 |

(+S9 : net/2AA μg -S9 : net/4NQO μg : 生育阻害がみられた)

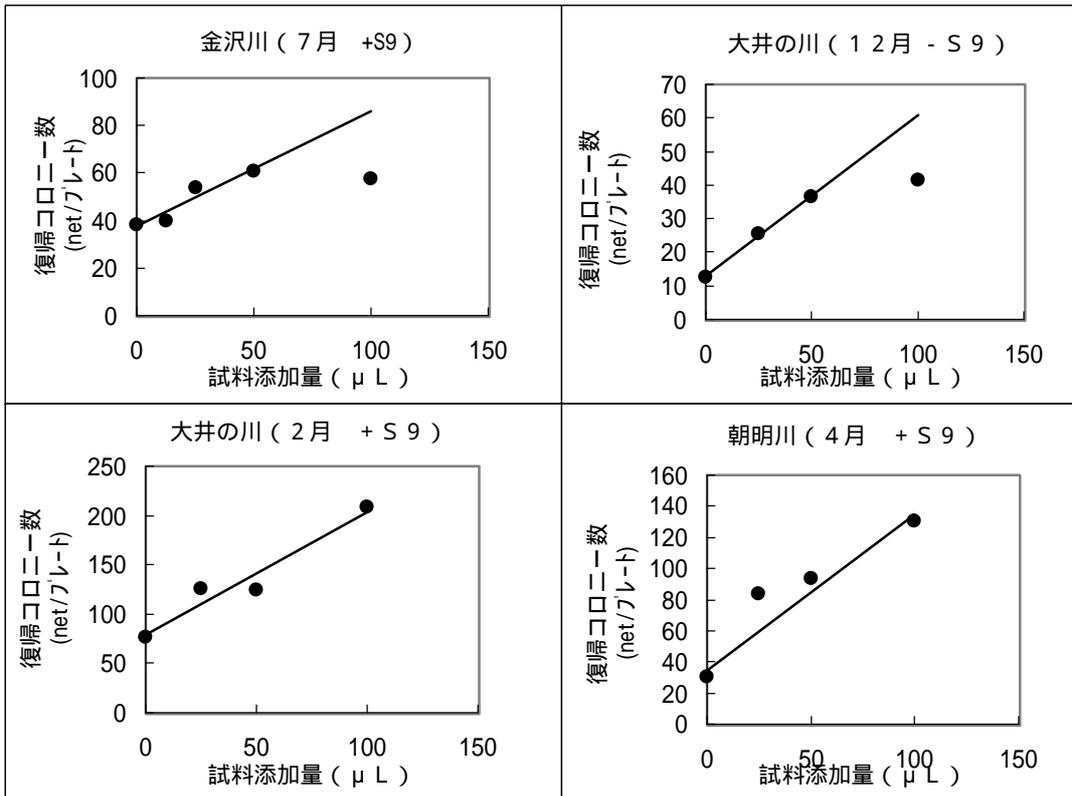


図5 河川調査結果 (試料と復帰コロニーの関係)

陽性対照物質に換算した結果、+S9の欄には、2AA、-S9の欄には、4NQO 換算値を示した。換算値で評価すると、最高値は、2月に現れた。一般に変異原性が冬場に高い傾向を示すといわれているが、今回の調査では、はっきりしなかった。

4. まとめ

従来の試験では、陽性を陰性対照値の2倍とすると、2試料しか陽性と判断されず、弱い変異原性を検出できないこともあり、今回の評価は、1.4倍で行った。

平成10年度の朝明川の結果は、前年度の結果に比べて低い傾向にあった。金沢川においても前年は、すべて生育障害だったのに、本年度の試験では1回だけであった。

菌の前培養を、久保らの報告とおり、25℃、24時間で行っても Ames 試験が支障なく行えた。

参考文献

- 1) 水谷博和、山川雅弘、前田雅也、地主昭博、松岡行利、白井宣一郎、バイオアッセイによる産業廃棄物の溶出液の毒性評価について、三重県環境科学センター研究報告、16,21-29(1996)
- 2) 山川雅弘、水谷博和、前田雅也、中谷純夫、伊東友

夫、高桑三明、松岡行利、白井宣一郎、バイオアッセイによる産業廃棄物溶出液の毒性評価について(第2報) 三重県環境科学センター研究報告、17,11-17(1997)

- 3) 山川雅弘、バイオアッセイを用いた河川水の評価、第13回全国公害研協議会東海・近畿・北陸支部 支部研究会 研究発表要旨集、27-28

- 4) 浦野紘平、金澤伸浩、高梨啓和、藤江幸一、水道水の Ames 変異原性に関する研究 第1報 変異原性物質濃縮回収用の吸着剤、日本水環境学会誌、17、451-460(1994)

- 5) 浦野紘平、高梨啓和、金澤伸浩、岡部文枝、藤江幸一、水道水の Ames 変異原性に関する研究 第2報 高性能吸着剤を用いた変異原性物質の濃縮・回収方法、日本水環境学会誌、17、461-469(1994)

- 6) 浦野紘平、岡部文枝、高梨啓和、藤江幸一、水道水の Ames 変異原性に関する研究 第3報 日本の水道水の変異原性レベルの解析、日本水環境学会誌、18、1001-1011(1995)

- 7) 高梨啓和、藤江幸一、浦野紘平、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、764-765(1994)

- 8) 久保隆、近貞光治、浦野紘平、Ames 変異原性試験の効率化と化学物質の変異原性解析、第33回日本水環境学会年会講演集、503(1999)