

【学術論文】

umu 試験による長崎県の底質及び 水質の遺伝子毒性評価

伊藤剛史*・久保 隆**・高尾雄二***

Evaluation of Genotoxicity by the *umu*-test of
Sediment and River Water in Nagasaki, Japan

Takeshi ITO, Takashi KUBO and Yuji TAKAO

Abstract

Genotoxicities of sediment from three rivers in Nagasaki, Japan were evaluated by the *umu*-test. The sediment of the Urakami river, which wastewater treatment plant (WTP) effluent flow in, indicated genotoxic activity. The river water of the same site also indicated genotoxicity. Comparing the values per unit weight, the genotoxicity of the sediment was 33 times higher than the river water. On the other hand, the genotoxicity of sediment which WTP effluent flow in was 2.5 times higher than that of sediment with relatively high polycyclic aromatic hydrocarbons from bay.

Key Words: genotoxicity, sediment, *umu*-test, WTP effluent

1. はじめに

化学物質が持つ性質の一つに遺伝子毒性がある。遺伝子毒性とは、化学物質（化学的要因）や放射線（物理的要因）が遺伝形質情報を担う DNA や染色体に作用し、遺伝子の突然変異や染色体の異常を誘発させられる能力である。遺伝子毒性を持つ物質が環境中に放出され、生物の生存や生殖に関わる遺伝子にダメージを与えると、生物個体数や繁殖可能個体数の減少を引き起こし、ひいては生態系に深刻な影響を与える可能性がある。

遺伝子毒性を評価する手法として *umu* DNA 損傷性試験(*umu* 試験)がある。本試験は、試験期間が短い、試験操作が簡便、一度に多数の試料を 1 種類の

菌株で評価できる、histidine による妨害を受けないなどといった特徴がある。本試験は 1998 年に国際標準化機構 (ISO: International Organization of Standardization)により排水の遺伝子毒性評価法として採用された¹⁾。また、日本の上水試験方法および下水試験方法^{2,3)}、ドイツ排水令にも記載され、これまでに河川水や排水などについての様々な報告がなされた^{4~6)}。とりわけ下水処理場排水は高い遺伝子毒性を示すと報告されている^{7~10)}。

また、水中に含まれる難溶性の有機化合物は底質に蓄積されることが多い。例として、過去に工業排水中の多環芳香族炭化水素類(PAHs)は底質中に蓄積されるという報告がある^{11~13)}。久保らは 255 種の化合物の遺伝子毒性を評価し、PAHs や含窒素環状化合物には遺伝子毒性を示すものが多いと報告している¹⁴⁾。これらのことから底質の遺伝子毒性を評価することは非常に有意義である。しかし、底質は細胞毒性物質等の共存物質の妨害によって遺伝子毒性の評価が難しいことが多く報告されている^{15~18)}。

*長崎大学大学院生産科学研究科博士前期課程

**長崎大学共同研究交流センター

***長崎大学大学院生産科学研究科

受領年月日 2008 年 5 月 2 日

受理年月日 2008 年 9 月 2 日

そこで本研究では、長崎県内の下水処理場放流水の流入する河川の底質と流入しない河川の底質の遺伝子毒性を比較することを目的とした。また、得られたデータと比較するため、同地点の河川表層水およびPAHsを多く含む海域の底質についても遺伝子毒性の評価を行うこととした。

2. 実験

2.1 試料採取

試料採取地点を figure 1 に示す。浦上川の採取地点は下水処理場放流口の約 50 m 下流である。時津川および長与川には下水処理場放流水は流入していない。時津川の採取地点は河口域、長与川の採取地点は下流域である。また小菅修船場跡の底質は比較的高濃度のPAHsを含むことが確認されている。

表層底質試料はエクマンバージ採泥器を用いて、10~20 m の範囲内で 3ヶ所以上の地点の試料を採取し、混合した。実験室までは、500 ml ポリ瓶に入れ、5 °C以下で冷暗輸送した。その後、2 mm の篩を通して後、ドラフト内で室温で一晩静置した。表層水試料はバケツとロープを用いて採取した後、共洗いした 3 L 褐色ガロン瓶に移し、前処理まで室温で保存した。

2.2 S9について

S9とは、薬剤(Phenobarbitalと5, 6-benzoflavone)を投与して酵素誘導したラットの肝臓を摘出し、これを磨碎して遠心分離した上澄液のことである。S9には cytochrome P-450 などに代表される肝臓の酸化酵素系が含まれており、試料に加えることで生体内で代謝されてから遺伝子毒性を示す物質を検出できる。S9を使用していない試験を-S9試験、S9を使用した試験を+S9試験と呼ぶ。本研究では ISO 13829¹⁾にしたがって-S9試験、+S9試験を行った。

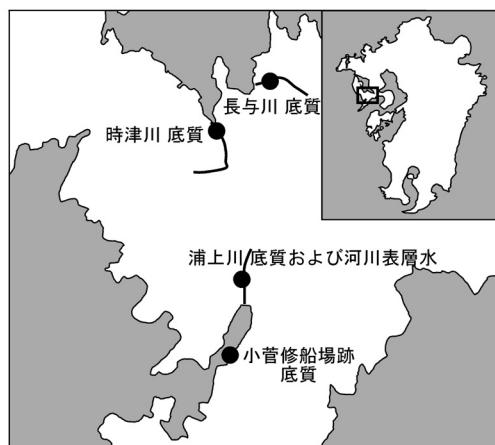


Figure 1 遺伝子毒性評価のための試料採取地点

2.3 試薬

超音波抽出に用いる溶媒には、和光純薬社の dichloromethane(DCM)および ethanol(EtOH)を用いた。転溶に用いる溶媒にはナカライトスク社の dimethyl sulfoxide(DMSO)を用いた。超音波抽出液の脱硫にはナカライトスク社の hydrochloric acid(HCl)で酸処理したキシダ化学社の copper を用いた。超音波抽出液の脱水にはマッフル炉で 700 °Cで焼成したナカライトスク社の sodium sulfate を用いた。水試料の pH 調整にはナカライトスク社の sulfuric acid(H₂SO₄)を用いた。水試料の固相抽出には WATERS 社の Sep-Pak Plus PS-2 を用いた。

培地作成には和光純薬社の ampicillin、magnesium chloride hexahydrate、2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid、D(+)-glucose、potassium chloride、sodium chloride、DIFCO 社の tryptone を用いた。

umu 試験の試験菌には横浜国立大学大学院環境情報研究院亀屋研究室から提供していただいた *salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 を用いた。

umu 試験には和光純薬社の o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside(ONPG)、magnesium sulfate heptahydrate、disodium hydrogenphosphate 12-water、sodium dihydrogenphosphate dihydrate、2-mercaptop-ethanol、sodium dodecyl sulfate、sodium carbonate を用いた。-S9 試験の陽性対照物質として和光純薬社の 4-nitroquinoline=N-oxide(4-NQO)を用いた。また、+S9 試験の陽性対照物質として和光純薬社の 2-aminoanthracen(2-AA)を用いた。

+S9 試験のためにオリエンタル酵母工業の S9、またコファクターとして和光純薬社の β-nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidized form および D-glucose-6-phosphate disodium salt を用いた。

2.4 前処理

2.4.1 底質の前処理

湿泥 200 g に DCM/EtOH(4:1)200 ml を加え、20 分間超音波抽出した後で上澄みをとった。残渣に DCM 200 ml を加え、20 分間超音波抽出した。上澄みを取り、残渣に DCM 100 ml を加え、20 分間超音波抽出し、遠心分離した。さらに、この上澄みをとり、上澄みをすべて合わせて超音波抽出液とした。超音波抽出液に sodium sulfate を加えて脱水し、吸引ろ過して sodium sulfate を除いた。ろ過後、酸処理した copper で脱硫した。酸処理は copper を 3.5 N の HCl に 30 分間浸して行った。次にエバボレート、N₂吹

き付けにより超音波抽出液を乾固させ、DMSO 1.5 ml に転溶した。転溶後、試験直前に水で 12 %DMSO 溶液に薄め、umu 試験に供した。

2.4.2 水試料の前処理

表層水 1.5 L を 5 N H₂SO₄ で pH2 に調整した。次に acetone 20 ml、水 30 ml を通水してコンディショニングした Sep-Pak Plus PS-2 に通水した(20 ml/min)。その後、通水とは逆方向から DMSO 1.5 ml で溶出させた(0.15 ml/min)。溶出後、試験直前に水で 12 % DMSO 溶液に薄めた。

2.5 umu 試験

2.5.1 試験方法

umu 試験は水環境ハンドブック¹⁹⁾に準拠した。また ISO13829¹⁾を参考にした。

検液は 12 % DMSO でマイクロプレート上に 4 段階の希釈列を作成し、菌株と 2 時間接触させ、さらに 37°C で 2 時間の培養で β-galactosidase を產生させ、これと反応して発色する ONPG を加え、28°C で 0.5 時間の発色反応のあと、420±20 nm における吸光度を測定して β-galactosidase 產生量を見た。

2.5.2 評価基準

本研究では試料濃度(希釈率)および測定して得られた吸光度から、次のように計算して評価を行った。

T : 検液、S : 溶媒対照、B : ブランク

A_{595} : 菌体濃度 (595 nm における吸光度)

A_{415} : 発色量 (415 nm における吸光度)

Growth factor(Gf : 増殖比) : 溶媒対照に対する菌体濃度の比

$$Gf = (A_{595,T} - A_{595,B}) / (A_{595,S} - A_{595,B})$$

Color factor(Cf : 発色比) : 溶媒対照に対する発色量の比

$$Cf = (A_{415,T} - A_{415,B}) / (A_{415,S} - A_{415,B})$$

Induction ratio(IR : β-galactosidase 産出誘導率) : 溶媒対照に対する菌体濃度あたりの発色量の比

$$IR = Cf / Gf$$

本研究では、単位用量を水は L、底質は g とした。希釈倍率を 4 段階に分け、各用量で 3 ウエルずつ試験をしたので、IR は用量ごとに 3 点ずつある。縦軸に IR、横軸に用量をとり、切片を 1 とした近似直線を引く。この近似直線の傾きを GA(遺伝子毒性強度)と呼び、 $0.2 \leq GA < 0.5$ のときに遺伝子毒性が検出限

界以上、定量限界未満とし、 $GA \geq 0.5$ のときに遺伝子毒性を定量評価した。

試験時には菌に対する生育阻害、発色阻害が問題となる。生育阻害とは、試料が試験菌の生育を妨げる作用のことであり、この度合いは Gf で表される。Gf が 0.75 以上の場合は生育阻害作用がないとみなし、その IR を評価に使用した。結果のグラフにはこの IR を白丸で記す(fig. 2, 3)。 $0.5 \leq Gf < 0.75$ の場合は弱い生育阻害作用があるとみなし、その IR を評価に使用するが、定量における信頼性が低いものとした。結果のグラフにはこの IR を白三角で記した。 $Gf < 0.5$ の場合は強い生育阻害作用があると見なし、その IR は評価に使用しなかった。評価しなかった IR は結果のグラフに示していないので、生育阻害があつた場合は各用量で 3 点ずつあるポイントが 0~2 点に減る。

発色阻害とは試料が試験時の発色を妨げる作用のことであり、これが起きると用量が増すとともに IR が低下する。発色阻害が起きた場合、サンプル中に遺伝子毒性を抑制する物質が含まれている、もしくは umuC'-lacZ 融合タンパク質と ONPG の反応を抑える物質があると考えられる。

3. 結果と考察

3.1 底質試料の測定結果

長崎県内の 3ヶ所の河川底質の遺伝子毒性を評価した結果を figure 2 に示す。ただし、浦上川の底質試料は前処理の段階でロスしたので、+S9 試験のみの結果を示す。

時津川の底質は-S9 試験、+S9 試験ともに用量が 0 で $IR = 1$ を通る正の傾きの直線を引くことができず、遺伝子毒性を示さなかった。また、生育阻害を示したため、プロット数が少ない。この生育阻害の原因是 humic acid 等が考えられた²⁰⁾。長与川の底質も-S9 試験、+S9 試験ともに用量が 0 で $IR = 1$ を通る正の傾きの直線を引くことができず、遺伝子毒性を示さなかった。さらに、両河川の底質は IR が 1 より小さく、ばらついた。この原因は共存物質の影響で試験時に試料が濁ってしまったために Gf が増加したためと考えた。過去にいくつかの報告があるように、底質は毒性物質や共存物質の影響により遺伝子毒性の評価が難しい^{15)~18)}。そこで共存物質による妨害を除くために液液抽出による共存物質の除去やフィルターによる濁りの除去を試みたが、共に濁りは除去できたものの、同時に遺伝子毒性を低下させてしまった。そのため現段階ではこのような試料の遺伝

子毒性は正確に評価できない。一方、浦上川の底質は+S9 試験で遺伝子毒性を示した。GA は 1.6 g^{-1} であった。これは陽性対照物質(2-AA)換算で $70 \text{ ng as 2-AA/g-dry sediment}$ 相当である。過去に下水処理場排水は高い遺伝子毒性を示したと報告されて^{7, 9, 10}いることから、これは、浦上川の下水処理場排水の影響と考えた。

3.2 水試料の測定結果

底質が遺伝子毒性を示した浦上川において、河川表層水を評価した。結果を figure 3 に示す。表層水試料は-S9 試験、+S9 試験ともに遺伝子毒性を示した。GA はそれぞれ 93 L^{-1} 、 48 L^{-1} であった。これを陽性対照物質に換算すると、-S9 試験では $770 \text{ ng as 4-NQO/L}$ 、+S9 試験では $2200 \text{ ng as 2-AA/L}$ である。浦上川の底質と表層水の試料 1 g 当たりの遺伝子毒

性を比較すると、+S9 試験において底質の GA は表層水の約 33 倍だった。このことから、下水処理場排水が表層水及び底質の遺伝子毒性に影響を与える等質量においては水試料よりも底質試料の方が遺伝子毒性は高いことがわかった。Gisela らは工業排水の流入する地点の河川表層水の遺伝子毒性を評価し、その結果と同じ地点の底質の遺伝子毒性を評価した Roubicek の報告²¹⁾との比較を行い、底質の遺伝子毒性が表層水の約 23~310 倍となる数値を報告している²²⁾。我々の算出した 33 倍も、この範囲に含まれた。Gisela らもそうであるように、底質と水試料の遺伝子毒性を比較する際には他の研究者の報告と比較することはあるが、同一の研究者が底質、水質両方の遺伝子毒性の評価を行い、比較している報告は非常に少ない。その意味でも、今回のデータは貴重と考える。なお、この河川水の試験では生育阻害

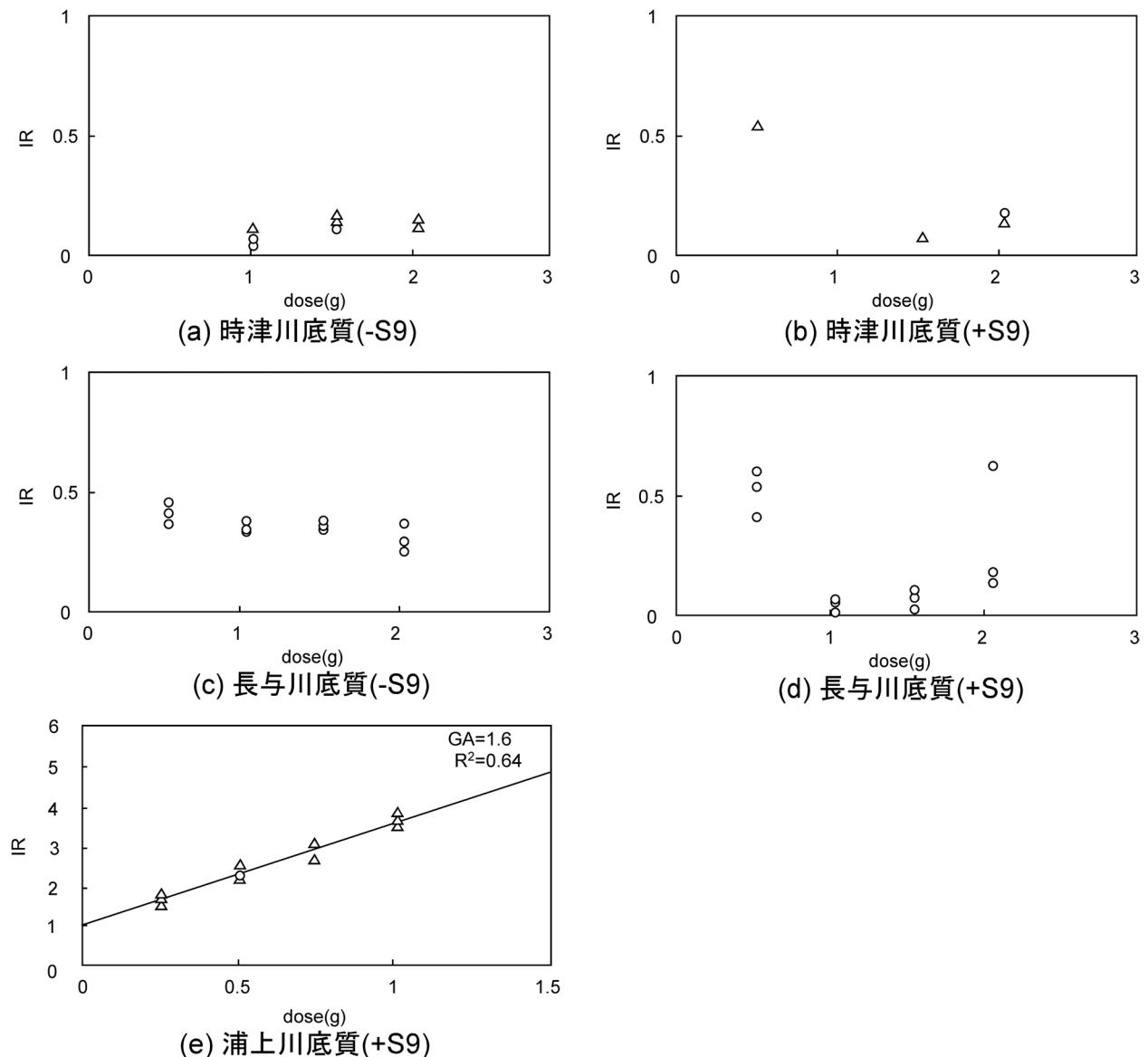


Figure 2 河川底質の遺伝子毒性。○: $Gf \geq 0.75$, △: $0.5 \leq Gf < 0.75$, プロットなし: $Gf < 0.5$

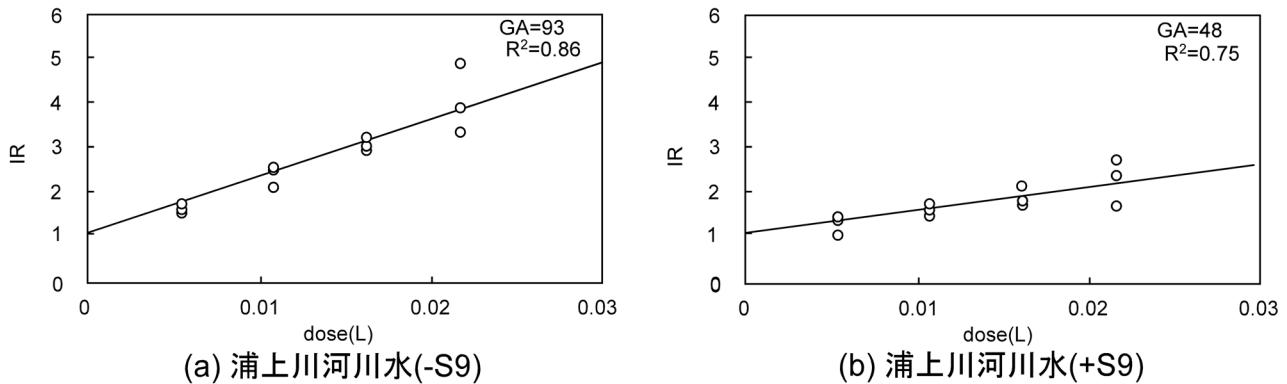


Figure 3 河川水の遺伝子毒性

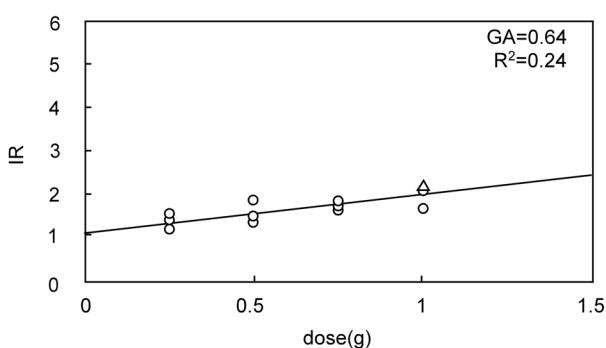


Figure 4 小菅修船場跡底質の遺伝子毒性, ○: $G_f \geq 0.75$, △: $0.5 \leq G_f < 0.75$, プロットなし: $G_f < 0.5$

は示さなかった。

加藤らが神奈川県内 21ヶ所の下水処理場排水の遺伝子毒性評価を行ったところ、GA は検出限界以下(220 L^{-1})以下~ 2800 L^{-1} 程度まで、様々であった⁸⁾。また、加藤らは GA が数百~ 2000 L^{-1} 程度の下水処理排水が流入する河川において、河川表層水の GA が $160 \sim 380 \text{ L}^{-1}$ となる結果を報告している⁷⁾。これは本研究で評価した河川表層水(GA=93 L^{-1})よりも 2~4 倍高い値である。これは、浦上川に流入している下水処理場排水の遺伝子毒性が比較的弱いことや、この地点が汽水域であり、潮汐による遺伝子毒性物質の拡散の影響等が考えられる。この点を明らかにするためには、今後、下水処理場排水の遺伝子毒性の評価を行う必要がある。

3.3 沿岸部底質の測定結果

過去のいくつかの報告によると、PAHs には+S9 試験で遺伝子毒性を示すものが多い^{11, 14, 23)}。

過去に我々が測定した中で比較的高濃度($\Sigma \text{PAHs} = 8572 \text{ ng/g-dry sediment}$)の PAHs を含むことを確認している²⁴⁾小菅修船場跡の底質の遺伝子毒性を+S9 試験で評価した。結果を figure 4 に示した。

その結果、小菅修船場跡の底質は遺伝子毒性を示

した。GA は 0.64 L^{-1} であった。これは陽性対照物質(2-AA)換算で $28 \text{ ng/g-dry sediment}$ 相当である。小菅修船場跡の底質中には、PAHs の中でも+S9 試験で比較的遺伝子毒性の強い¹⁴⁾ Benzo(a)pyrene が多く含まれていた($713 \text{ ng/g-dry sediment}$)²³⁾。小菅修船場跡の底質には下水処理場排水は流入しておらず、PAHs が主な原因物質となって遺伝子毒性を示した可能性がある。なお、Bihari らは PAHs の検出された北アドリア海の底質の遺伝子毒性を評価し、遺伝子毒性は検出限界以上、定量限界未満と報告している²⁵⁾。

PAHs は工業排水の流れ込む水域の底質に多く含まれる物質であるが、下水排水の流れ込む浦上川底質の遺伝子毒性は小菅修船場跡の底質の遺伝子毒性よりも約 2.5 倍高かった。この結果から、これまでに調査対象とされている工業排水流入地点よりも^{11 ~13)}、下水処理場排水の流れ込む地点の遺伝子毒性の評価がより重要と考えられる。

4.まとめ

本研究では、これまでに報告の少ない河川や沿岸部の底質の遺伝子毒性を評価することができた。さらに、初めて長崎県の河川等の遺伝子毒性を明らかにした。浦上川では底質、表層水とともに遺伝子毒性を示したが、等質量では底質のほうが約 33 倍高い遺伝子毒性を示した。小菅修船場跡と浦上川の底質の遺伝子毒性を比較すると浦上川の底質が約 2.5 倍高い遺伝子毒性を示したことから、本研究では下水処理場放流水に含まれる遺伝子毒性物質が比較的強く遺伝子毒性に寄与していると考えられた。また、PAHs の底質中遺伝子毒性への寄与はそれほど強くないことが推察されたが、遺伝子毒性に主要に寄与する化学物質の決定には至らなかった。今後の更なる研究で、下水排水中の遺伝子毒性物質を明らかにする必要があると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、(財)クリタ水・環境科学振興財団の助成を受けて行われた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) International Organization for Standardization (ISO), Water quality-Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test, ISO13829, ISO/TC147/SC5 (2000).
- 2) 日本水道協会, 上水試験方法 (2001).
- 3) 日本下水道協会, 下水試験方法 1997 年版 (1997).
- 4) 大江 武, 竹内 信江, *O*-アセチル転移酵素高産生株を用いたウムテストおよび Ames 試験による河川水の遺伝毒性モニタリング, 水環境学会誌, **20**, pp.722-731 (2007).
- 5) 毛利 紫乃, 宗宮 功, 小野 芳朗, 都市水環境中に存在するヒト食生活由来の遺伝毒性物質のリスク評価, 水環境学会誌, **19**, pp.847-854 (1996).
- 6) 久保隆, 王麗莎, 胡洪營, 亀屋隆志, 浦野紘平, umu 試験による水道水の DNA 損傷性強度の評価, 第 40 回日本水環境学会年会講演集, p.550 (2006).
- 7) 加藤由紀子, 亀屋隆志, 小林剛, 久保隆, 下水放流水及び河川水における遺伝子毒性の実態把握 第 42 回日本水環境学会年会 講演集, p.464 (2008).
- 8) 加藤由紀子, 亀屋隆志, 小林剛, 吉野秀吉, 浦野紘平, umu 試験を用いたDNA 損傷生強度の評価, 第 41 回日本水環境学会年会 講演集, pp.204 (2007).
- 9) 木苗直秀, 生活環境中の変異原物質の分離同定とそれらの腫瘍発生との関連に関する研究, 環境変異原研究, **25**, pp.93-100 (2003).
- 10) R. Crebelli, L. Conti, S. Monarca, D. Feretti, I. Zerbini, C. Zani, E. Veschetti, D. Cutilli, M. Ottaviani, Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid or hypochlorite disinfected sewage wastewater, *Water Research*, **39**, pp.1105-1113 (2005).
- 11) Y.F. Song, B.-M. Wilke, X.Y. Song, P. Gong, Q.X. Zhou, G.F. Yang, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals (HMs) as well as their genotoxicity in soil after long-term wastewater irrigation, *Chemosphere*, **65**, pp.1859-1868 (2006).
- 12) Gisela de A. Umbuzeiro, Fabio Kummrow, Deborah A. Roubicek, Maria Y. Tominaga, Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges, *Environment International*, **32**, pp.359-364 (2006).
- 13) V.S. Houk, The genotoxicity of industrial wastes and effluents, *Mutation Research*, **277**, pp.91-138 (1992).
- 14) Takashi Kubo, Kohei Urano, Hideo Utsumi, Mutagenicity Characteristics of 255 Environmental Chemicals, *Journal of Health Science*, **48**, pp.545-554 (2002).
- 15) Black, J. J., Holmes, M., Dymerski, P. P. and Zapisek, W. F., Fish tumor pathology and aromatic hydrocarbon pollution in a Great Lakes Estuary, *Environmental Science Reserch*, **16**, pp.559-565 (1980).
- 16) 安部明美, 杉山英俊, 井口潔, 久松由東, 西村哲治, 松下秀鶴, 河川底質をモニタリングするための基礎的検討(1)一致死作用の検討について一, 水質汚濁研究, **10**, pp.123-129 (1987).
- 17) Fabacher, D. L., Schmitt, C. J. and Besser, J. M., Chemical characterization and mutagenic properties of polycyclic aromatic compounds in sediment from tributaries of the Great Lakes, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **7**, pp.529-543 (1988).
- 18) Grifoll, M., Solanas, A. M., Pares, R., Centellas, V., Bayona, J. M. and Albaiges, J. Assessment of mutagenic activity of coastal sediments Off Barcelona, *Toxicity Assessment, An International Journal*, **3**, pp.315-329 (1988).
- 19) 日本水環境学会, 水環境ハンドブック, (2006)
- 20) Akemi Abe and Kohei Ueno, Interactions of Sediment Contaminations in the Testing of Mutagenicity, *Water Schience and Technology*, **30**, pp.139-144 (1994).
- 21) Roubicek DA, Estrategias para avaliacao da genotoxicidade de sedimentos, Departamento de Toxicologia e Analises Toxicologicas, Sao Paulo Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, **125** (2003).
- 22) Gisela de A. Umbuzeiro, Fabio Kummrow, Deborah A. Roubicek, Maria Y. Tominaga, Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in

relation to the sediment contamination and effluent discharges, *Environment International*, **32**, pp.359-364 (2006).

- 23) Gary C. Barbee, John Barich, Bruce Duncan, John W. Bickham, Cole W. Matson, Christopher J. Hintze, Robin L. Autenrieth, Guo-Dong Zhou, Thomas J. McDonald, Leslie Cizmas, Dale Norton and Kirby C. Donnelly, In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2008).
- 24) 大園明寛, 九州沿岸底質中の有害有機化合物汚染レベルと発生源の推定, 長崎大学環境科学部卒業論文 (2007).
- 25) Nevenka Bihari, Maja Fafandel, Bojan Hamer, Blanka Kreji-Bilen, PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal marine sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic, Croatia, *Science of the Total Environment*, **366**, pp.602-611 (2006).