

Umu試験による生活系排水の遺伝毒性評価

毛利紫乃¹⁾²⁾・小野芳朗³⁾・河原長美³⁾

1) 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻

2) 岡山大学大学院自然科学研究科

3) 岡山大学環境理工学部環境デザイン工学科

Evaluation of genotoxic potential in sewage and treated effluent with the umu-test

Shino MOHRI¹⁾²⁾, Yoshiro ONO³⁾, Osami KAWARA³⁾

1) Department of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

2) Okayama University Graduate School of Natural Science and Technology

3) Department of Environmental and Civil Engineering, The University of Okayama

Abstract

The *umu*-test, which can detect genotoxic activities of a wide variety of environmental carcinogens and mutagens, was carried out with samples from several sewage treatment processes. We applied the *umu*-test to raw sewage and treated effluent from two points of view, one is to evaluate a treatment process and the other is to identify the genotoxic substances. The original strain of *umu*-test, *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 can detect nonspecific genotoxicity, on the other hand, by using *S. typhimurium* NM2009 of the *umu*-test highly sensitive to aromatic amines, genotoxicity related to aromatic amines is measured. The result showed that genotoxic substances which have the polycyclic aromatic amino structures in the sewage remained after biological treatment. Tow-step HPLC fractionation followed by MS analysis to identify the genotoxic substances was applied to samples to detect mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines. The concentration of Trp-P-1 and Trp-P-2 determined in the effluent calculated from HPLC-UV analysis were on the order of 10^{-5} mg/L. Because of the possibility of the reuse of wastewater in urban areas, the need for the investigation of the safety of the treated water from the sewage treatment plants was suggested, in order to evaluate strategies for advanced treatment, if necessary.

1. はじめに～水環境管理における生物試験

バイオアッセイ（生物評価法）とは、対象物質の生物作用量を生物材料を用いてその生物応答から評価する方法とされ¹⁾、医薬品、機能性食品などの有用性評価と、例えば化審法における新規化学

物質のスクリーニング、環境管理や排水の毒性削減を目的とする有害性評価がある。

さて、近年、水環境汚染の多様化、複雑化が指摘されて久しいが、発がん物質に対する規制の始まり、内分泌攪乱化学物質群に対する世論の高ま

り等、事実上、個々の毒性物質をすべて評価、規制することは不可能であり、従来の化学分析と異なる、未知物質、変化体それらの複合作用を含め、総合的に評価するシステムとして、生物試験が有望視されている²⁾。この場合、ヒトへの健康影響を指向したものと、生態系への影響を指標としたものに区別され、また、対象とする毒性から、致死、急性毒性と慢性、特殊毒性などに分けられる。生物材料から分類した一例として表1をあげる。

表1 生物材料と毒性指標の例

供試生物		毒性指標
生物 個 体	げっ歯類 (ラット、マウスなど)	生存率、臓器障害、奇形、 発がん、染色体異常、小核 試験
	(魚類、ミジンコ、藻類な ど)	生存率、行動異常、代謝、 成長、増殖、奇形、染色体 異常、小核試験
単 一 細 胞	(大腸菌、サルモネラ菌な ど)	突然変異、遺伝子傷害、機 能障害
	酵母	生存率、機能障害
	培養細胞	生存率、細胞機能障害、染 色体異常、小核試験

最近では各系において遺伝子操作により、道具としての側面を強化した様々な検出系が開発されつつある。

水環境管理における生物試験の具体的役割として、(a)致死・急性毒性物質の汚染事故に対する警告、(b)慢性毒性物質による毒性負荷評価、(c)処理プロセスの有用性評価と改善対象の検索、(d)汚染源の特定、(e)毒性物質の検索などが考えられる。

さて本研究で生物試験として適用した遺伝毒性試験は、発がんの第1段階である遺伝子損傷性の第一次スクリーニング法として脚光を浴び始めた試験法であるが、のみならず老化やある種の生活習慣病との関わりから水環境への慢性毒性負荷評価法としての広がりを見せている。

本論では、処理プロセスの評価、物質分析と組

み合わせた原因物質の探索の二つの観点より生活排水に遺伝毒性試験*umu*試験を適用した結果を述べる。

2. バクテリアを用いた遺伝子損傷検出法 ～*umu*試験

2-1. 原理と概要

遺伝毒性の検出法として短期バクテリアアッセイである*umu*試験を適用した。これはAmes試験株をもとに、遺伝子損傷と直接に関わりがあるとされるSOS修復を行う*umuDC*遺伝子の発現を測定できるよう開発された試験系である³⁾。物質の膜透過性が高く、遺伝毒性物質の検出感度が高いネズミチフス菌TA1535株に、遺伝子操作によりプラスミドpSK1002を導入した試験菌株TA1535/pSK1002を親株とする。プラスミドpSK1002は*umuC*遺伝子にラクトースオペロンの一つである*lacZ*遺伝子を融合させた*umuC'*-*lacZ*融合遺伝子を持つため、 β -galactosidase活性を吸光度測定することにより、遺伝子損傷により誘導される修復遺伝子を定量できる。導入する元の株により、種々の毒性作用機序に基づく特定の物質群に対する高感度株が作製されている。

水環境管理における*umu*試験は、遺伝毒性(変異原性)検出法として上水試験方法1993、下水試験方法1997、ドイツ排水令、ISOにも記載され、環境試料において各種排水、処理水、河川水等の検出結果が得られている⁴⁾。

2-2. 試験方法

標準的な*umu*試験方法を図1に示す。

凍結保存された菌株をLB培地(1% Bactotrypton, 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract, 20 mg/L ampicillin)に植菌し、一夜振とう培養する。TGA培地(1% Bactotrypton, 0.5% NaCl, 0.2%, 20 mg/L ampicillin)で希釈し、約2時間前培養、対数増殖期に達した菌液、緩衝液を試験管に分注し、濃縮試料を投与す

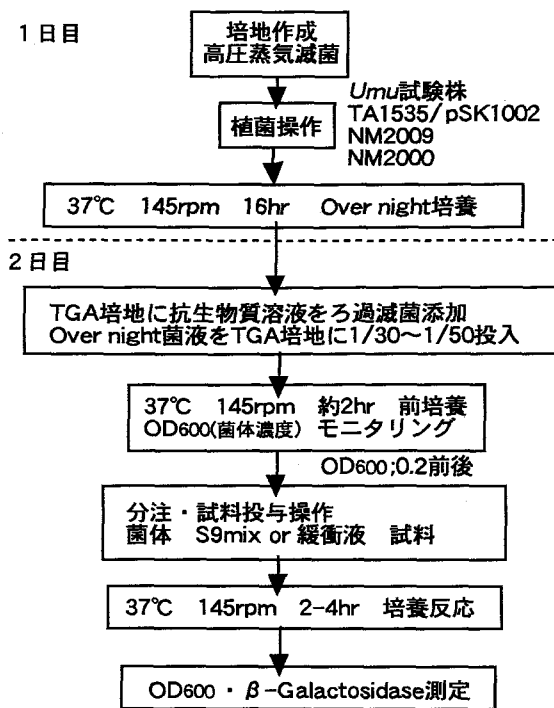


図1 Umu試験法の手順

る。さて、遺伝毒性物質の中には、芳香族アミンをはじめとして、生体内の酵素代謝を経て初めて強力な遺伝子損傷性を示すものがある。バクテリアにおいてその経路を再現するために、ラット肝S9画分と補酵素、助酵素群（オリエンタル酵母工業）を含むS9mixを添加する系も評価される。37°C、145 rpmで2時間振とう反応させた後、 β -galactosidase活性を測定した。酵素活性の測定法、単位の計算式は、Miller⁹⁾によった。

本論中では、検体を投与した β -galactosidase活性値(A)より溶媒対象の活性値(B)を引いた値(A-B)を遺伝毒性の指標とした。

3. 環境施設評価・排水モニタリング法としての適用～排水処理プロセスの評価

3-1. 試料と実験法

A大学生生活排水合併処理槽三カ所を対象とし、2000年5月に生物処理前後の貯留槽より1Lずつ採水した。各排水の履歴は(a)一般厨房施設・合宿所(b)教養部一般棟(c)薬・農学部一般・実験棟である。前処理として減圧濾過後、35°Cの湯浴中にてロータリーエバポレータで減圧濃縮を行い、umu試験に供した。

3-2. 試験結果と考察

減圧濃縮試料の遺伝毒性試験結果を図2に示す。横軸は反応菌液中での試料の濃縮倍率を示す。いずれの施設においても処理前に検出された毒性が生物処理によって低減していた。また、試料の履歴によって、処理前の毒性値に対比して、薬、農学部の排水中の遺伝毒性物質は処理されにくいことが示唆されている。今回、処理プロセスの遺伝毒性負荷低減効果の評価を行ったが、今後この試験系によって、その他排水処理施設、及び処理過程試料においても定期的な調査を行い、季節、時

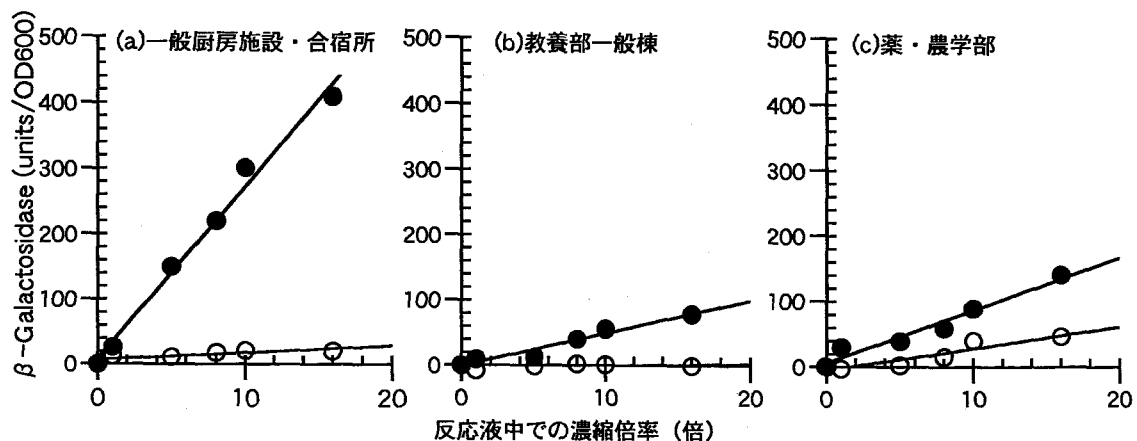


図2 大学合併処理施設試料の遺伝毒性とその消長

活性値は試料の値Aより陰性対照の値Bを引いたもの(A-B)とする。●; 処理前, ○; 処理後の各遺伝毒性値

間の要素を含めた毒性値の変動を追うことにより、水系に対する、もしくは施設内での毒性負荷源となる経路を検索することができる。また、処理効率を含めた改善策の検討にも適用できるであろう。

4. 毒性物質の検索手法としての適用～食品由来の発がん性芳香族アミンに着目して

4-1. 発がん性ヘテロサイクリックアミン

ヘテロサイクリックアミンは加熱食品中に同定されている強力な発がん性・遺伝毒性物質群であり、環境中での挙動が注目されている¹⁰⁾。さて、試験的研究で河川水や各種処理水に遺伝毒性が検出されているが、その原因物質の同定は難航している。ここでは、生活排水中に、ヒト食生活由来のヘテロサイクリックアミン群の存在を推定し、物質の構造に特異的な濃縮（精製）法と、毒性作用機序に着目した高感度株を組み合わせることによって、毒性物質群定性、定量を目的とした生物試験の適用法の一例を述べる。

4-2. 試験方法

4-2-1. 試料と分析手順

都市下水処理場試料は、合流式のB下水処理場で採取した。同処理場では流入した生下水（流入水）と、場内返送水とを混合し、原水とする。沈砂池、最初沈殿池を経て、活性汚泥法を用いた生物処理後、最終沈殿池流出水は塩素消毒されて河川に放流されている。試料として、原水、および処理水として最終沈殿池の塩素消毒前の流出水を1995年5月、12月に採取した。毒性物質同定の試験手順の流れを図3に示す。ブルーレーヨン濃縮¹¹⁾、ネズミチフス菌 NM 2009株¹²⁾の適用によりS9mixを添加した系で多環芳香族アミンの遺伝毒性を特異的に検出し濃縮率-応答曲線を得た。つぎに濃縮試料の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分画-UV分析を行った。分取した画分をロータリーエバ

ポレータによる10倍の減圧濃縮を行ってから遺伝毒性試験に供した。毒性画分中のヘテロサイクリックアミン標準物質に対応するピークを減圧蒸発乾固のち、さらなるHPLC-UV分析により発がん性ヘテロサイクリックアミンの定量を行い、MS分析に供し、存在を確認した。

4-2-2. ブルーレーヨン濃縮

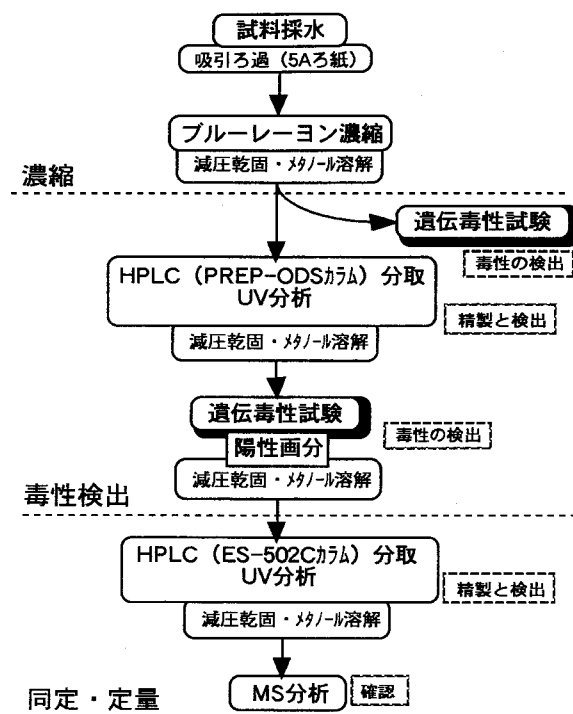


図3 遺伝毒性検出と毒性物質同定の流れ

ポレータによる10倍の減圧濃縮を行ってから遺伝毒性試験に供した。毒性画分中のヘテロサイクリックアミン標準物質に対応するピークを減圧蒸発乾固のち、さらなるHPLC-UV分析により発がん性ヘテロサイクリックアミンの定量を行い、MS分析に供し、存在を確認した。

ヘテロサイクリックアミンの精製のため、3環以上の構造を持つ多環芳香族を選択的に吸着するブルーレーヨンを適用した。ガラス管(6mmφ×200mm)に1.0gのブルーレーヨンを充填し、メタノール/25%アンモニア水(50/1,v/v)、超純水による前処理の後、流速10mL/minでろ過後の試料50Lを通水した。超純水で洗浄した後、メタノール/25%アンモニア水(50/1,v/v)100mLを通過させ溶出した。これをロータリーエバポレータで減圧蒸発乾固し、メタノールに溶解させた。

4-2-3. 物質分析法

本実験で使用した発がん性ヘテロサイクリックアミン標準試料の略称、名称を表2に示す。

表2 本実験で使用したヘテロサイクリックアミン

略式名称	正式名称
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole
Trp-P-2	3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole
MeA α C	2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole
Glu-P-1	2-Amino-6-methyl-dipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分画・分析条件ならびにガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) 条件は既報¹³⁾ に準じる。

4-2-4. 遺伝毒性試験

芳香族アミンは生体内での代謝活性化の後に毒性を示すとされており、その代謝酵素O-アセチル転移酵素高産生株であるネズミチフス菌 NM2009株と、酵素活性を持たないNM2000株を適用し、その差を芳香族アミン由来の遺伝毒性とした。

4-3. 実験結果

4-3-1. 下水処理水試料中の芳香族アミン由来の遺伝毒性の検出

図4に、芳香族アミン由来の遺伝毒性であると判断されるNM2009株とNM2000株の β -galactosidase活性値の差を示した。下水処理水のブルーレーヨン濃縮により得られた抽出物は、芳香族アミン由来

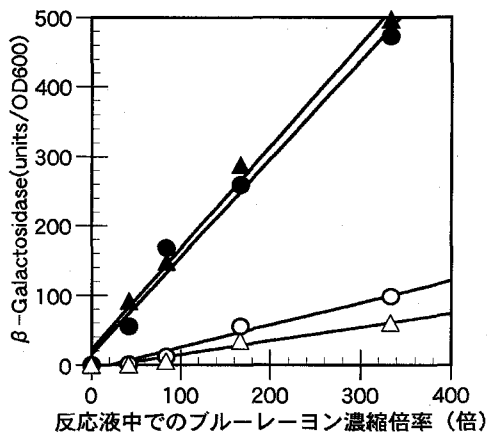


図4 都市下水処理場試料の芳香族アミン由来の遺伝毒性

活性値は試料の値Aより陰性対照の値Bを引いたもの(A-B)とする。
●; 処理前, ○; 処理後 (1995年5月)
▲; 処理前, △; 処理後 (1995年11月) の各遺伝毒性値

の遺伝毒性を示すことが示唆された。下水原水の芳香族アミン由来と見られる遺伝毒性活性値は、一般的な生物処理によって低減していることが示された。

4-3-2. 試料中のヘテロサイクリックアミンのHPLC分析と遺伝毒性画分の検出

一例として、ヘテロサイクリックアミン標準試料と5月の処理水のHPLC分析結果を図5に、分画された画分の、芳香族アミン由来の遺伝毒性であると判断されるNM2009株とNM2000株の β -galactosidase活性値の差を図6に示す。これらの図よ

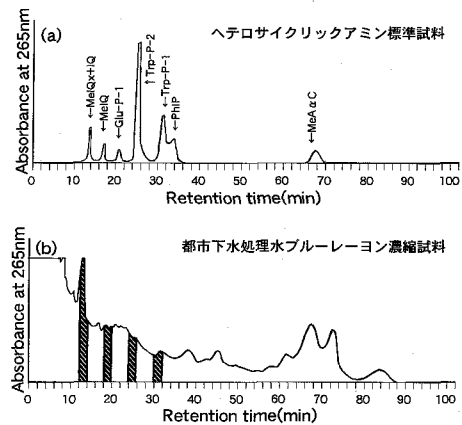


図5 都市下水処理水HPLC-UV分析結果

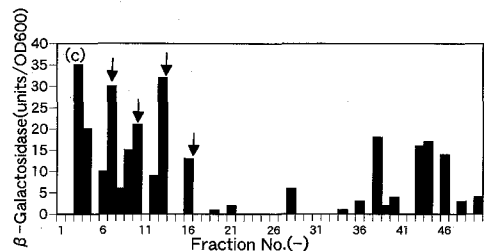


図6 都市下水処理水HPLC画分の芳香族アミン由来の遺伝毒性

り、比較的高い遺伝毒性を示し、かつ標準試料のピークに相当するとみられる濃縮試料中の4つのエリアを斜線で示す(b)。それぞれ、(a)標準試料HPLCクロマトグラム上のMeIQx+IQ, Glu-P-1, Trp-P-2, Trp-P-1相当のピークと同保持時間であった。すなわち、下水処理水中に検出される遺伝毒性が標準物質で同定されるヘテロサイクリックアミン由来である可能性が強く示唆された。

4-3-3. 定量とMS分析

Trp-P-2, Trp-P-1画分のES-502Cカラムを使用

したHPLC-UV分析による定量結果を表3に示す。

表3 下水処理場試料中の定量結果(ng/L)

	Trp-P-1	Trp-P-2
下水原水	11	13
下水処理水	7.5	8.1

直接導入法によるMS分析の結果、Trp-P-1、Trp-P-2が同定された。

4-4. 考察

筆者らはこれまでにし尿処理場、浄水場、都市河川水試料に対し同様の分析を行っているが、都市下水処理場試料中のTrp-P-2の濃度はし尿処理場と都市河川水の間位置し、処理場放流水が環境への遺伝毒性負荷源の一つであることが示唆されている。またTrp-P-2の標準物質の濃度-反応関係より、芳香族アミン由来の遺伝毒性に対するTrp-P-2の寄与率を求めた。処理場試料において10~30%であった寄与率は河川水試料において1~9%と低減していたことから、環境においては稀釈に加えて、その他の毒性をもつ芳香族アミン類の混入が考えられる。

5. まとめ

環境試料に対する遺伝毒性試験umu試験の適用法について検討した。一般的な生活排水処理プロセスの毒性モニタリング法としては、減圧濃縮-親株の組合せによる簡易、包括的な検出方法が適しており、一例として大生活系排水合併処理プロセスの評価では、一般的な生物処理によって毒性が低減していることが示された。また、選択的な濃縮法、株の組合せにより、発がん性芳香族アミンが同定され、同様の手法でさらに毒性物質を検索してゆくことにより、リスク評価や対策への情報を得ることができよう。結果が試験生物の特質に左右される生物試験の適用においては、目的に適合した試験系を選択し、特徴を把握することによって、結果を過大評価することのない、

適切な判断が必要とされる。手法の簡便化などの改良によっては、将来、環境の分野においても、生物試験が新たな規制概念として組み込まれる可能性も大きいであろう。

謝辞

本研究を進めるに当たり多大な助言とご指導をいただいた宗宮功京都大学教授ならびに菌体を分与していただいた大阪府立公衆衛生研究所の小田美光氏に深謝いたします。

参考文献

- 1) 内海英雄(1996)水環境の安全性評価のためのバイオアッセイの今後、水環境学会誌, 19(10),758-763.
- 2) 鈴木基之内海英雄 バイオアッセイ 水環境のリスク管理講談社サイエンティフィック
- 3) Oda,Y.,S.Nakamura,I. Oki,T.Kato,H. Shinagawa (1985) Evaluation of the new system(*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Research*, 147, 219-229.
- 4) Ono,Y., I.Somiya and T.Kawaguchi (1996) Genotoxicity of substances in the nightsoil and its biologically treated water, *Water Research*, 30(3),569-577.
- 5) Salem,S.,Rao,B.Kent,Burnison,S.Efler(1995) Saaesment of Genotoxic Potential of Pulp Mill Effluent and an Effluent Fraction Using Ames Mutagenicity and *Umu*-C Genotoxicity Assays, *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10,301-305.
- 6) Ohe,T.,H.Nukaya(1996) Genotoxic activity of 1-nitropyrene in water from the Yodo River, Japan, *The Science of the Total Environment*,181,7-12.
- 7) Vahl, H. H.,L.Karbe, J.Westendorf(1997) Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river:comparison of Salmonella microsome test, arabinose resistance test, and *umu*-test, *Mutation Research*, 394, 81-93.
- 8) Reifferscheid,G.,J.Heil,Y.Oda,R.K.Zahn(1991) A microplate version of the *SOSumu*-test for rapid detection of genotoxins and genoyoxic potentials of environmental samples, *Mutation Research*, 253, 215-222.
- 9) Miller, J.H.(1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harvour Laboratry
- 10) Yamazaki,H., Y.Oda, T.Shimada (1992) Use of newly developed strain *Salmonella Typhimurium* NM2009 for the study of metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by rat liver microsomal cytochrom P450 enzymes, *Mutation Research*, 272, 183-192.
- 11) 早津彦哉(1992)ブルーコットン、ブルーレーヨンの変異原研究への利用に関する文献、変異原性試験,1(2),47-51.
- 12) Yamazaki,H., Y.Oda, T.Shimada (1992) Use of newly developed strain *Salmonella Typhimurium* NM2009 for the study of metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by rat liver microsomal cytochrom P450 enzymes, *Mutation Research*, 272, 183-192.
- 13) 毛利紫乃 宗宮功 小野芳朗(1996)：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(11), 847-854.