

## 川崎港運河内底質の変異原性について

### Mutagenicity of the Canal Sediment in Port Area of Kawasaki

林 久 緒 Hisao HAYASHI  
吉 川 サナエ Sanae YOSHIKAWA  
石 田 哲 夫 Tetsuo ISHIDA

#### 1 はじめに

環境中の化学物質による汚染はそれらを生産・消費・廃棄する過程からひき起こされる。また、その汚染は環境中の様々な媒体にわたっており、時には人を含めた生物生態系に影響を及ぼす。これら化学物質による影響を未然に防止することを念頭に、当所では今までにいくつかの物質について、水域環境中の化学物質の分布の実態などを調査している。しかしながら、環境中には多種の微量化学物質が存在しており、それらの全てを明らかにすることはほとんど不可能に近い。一方、環境の汚染状況を生物への影響を評価検討する視点から調査する方法として、生態影響試験や毒性試

験などがあげられる。これらのうち、比較的簡易で、近年よく用いられてきている方法として変異原性試験がある。変異原性試験による環境評価は発がん性または遺伝的毒性に関し評価法の角度を広げるための初期段階として重要であり、さらに陽性と判断された画分からGC-MS等により遺伝的毒性の強い物質の同定を行い、化学分析を行うための優先順位をつける手段にもなり得る。

そこで、今回、比較的長期間の汚染を反映すると考えられる媒体として底質を選び、特に今までの調査から汚染の著しい川崎港の運河の底質に対してエームス法による変異原性試験を試みたのでその結果について述べる。

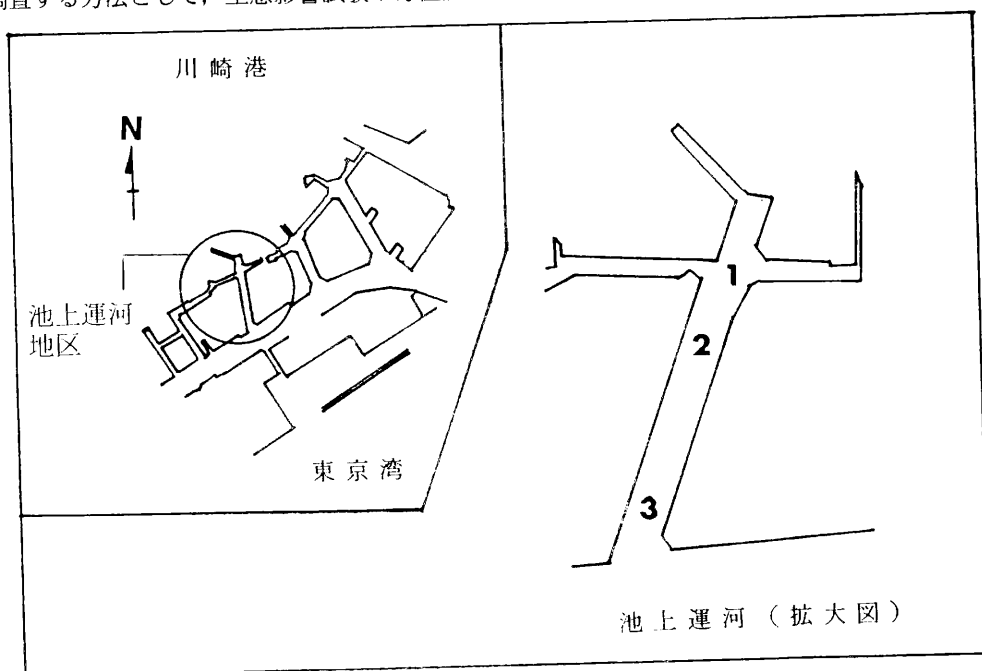


図1 底質の採取地点

## 2 調査方法

### 2.1 試料

川崎港のうち、比較的汚染されていると考えられ、また多環芳香族炭化水素類について既存のデータのある池上運河の底質を試料とした。試料は昭和60年10月、図1の地点でエックマンバージ型採泥器を用い採取した底泥で、遠心分離後、褐色ビンに入れ、冷蔵庫で保存しておいたもの(湿泥)を用いた。

### 2.2 底質からの有機物の抽出と中性画分の分離

前年度、底質粗抽出物の変異原性試験に関する予備実験を行ったところ、ジクロロメタン粗抽出物では、変異原性の認められる用量-反応曲線(Dose-response curve)が得られなかった。この原因としてジクロロメタン粗抽出物に含まれるイオウ等の致死作用を示す物質の影響が考えられた。また、これまでの他機関による同様の調査では中性画分の変異原性が比較的高い<sup>1),2)</sup>。そこで今回、粗抽出物から中性画分を分離しセップバックシリカでクリーンアップ後、変異原性試験に供した。その抽出及び分画は以下のように行った。

湿泥 50g を 500ml ビーカーにとり、ジクロロメタン-エタノール(4:1) 100ml を添加し、15分間超音波を照射の後、内容物を 200ml の分液ロートに移し、振とう抽出(10分)後、上澄みを遠心分離して抽出液を得た。さらに分液ロートにジクロロメタン 100ml を加え、振とう抽出-遠心分離を2回繰り返した。これらの上澄みをあわせて1l の分液ロートに移し、これに15%塩化ナトリウム溶液 200ml を加えて振とう洗浄(10分)し、ジクロロメタン抽出液を分離した。

中性画分の分画は、まずジクロロメタン抽出液に0.2N, NaOH 溶液 300ml を加え振とう(10分)し、酸性成分を水層に移した後、有機層を分取し、それに0.2NHCl, 300ml を加え振とう(10分)し塩基性成分を水層に移した。有機層を3% NaCl 溶液 300ml で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水しロータリーエバポレーターで濃縮、乾固させた。乾固物を数ml のヘキサンに溶解または懸濁させ、セップバックシリカに添加し、ヘキサン4ml で洗浄後、ベンゼン-メタノール(1:1), 10ml で溶出させた。これを窒素気流中で乾固させ、その内容物を秤量し中性画分抽出量

(Neutral Fraction, 以下ではNFと略す)とした。

この乾固物にジメチルスルホオキシド(DMSO)を加え、10mg/ml の溶液を調製し変異原性試験用試料とした。

### 2.3 変異原性試験

変異原性試験は試験菌株として、Salmonella typhimurium のTA98(フレイムシフト型)及びTA100(塩基置換型)を用い、エームス試験-プレインキュベーション法<sup>3)</sup>により行った。その主な操作は以下の通りである。

試料 100 $\mu$ l を滅菌試験管中、S9-Mix の存在下または非存在下で、菌懸濁液とともに37°Cで20分間、プレインキュベーションし、この反応液にヒスチジン・ビオチンを含むソフトアガーを加え混合後、寒天平板培地(プレート)上にひろげ、37°Cで48時間培養した後、復帰変異株のコロニー数を計測した。

なお、S9-Mix はフェノバルビタール&5,6-ベンゾフラボンで誘導したrat liver-S9(ラット肝臓ホモジネート)を用い調製した。陽性対照はAF-II及びベンゾ(a)ピレンを用い、陰性対照はDMSOを用いた。試験の各プレートに供した試料は10mg NF/ml DMSO 溶液を5段階以上順次希釈して、100 $\mu$ l あたり0.1~1,000 $\mu$ g のNFとし、1用量単位につき2プレートずつ試験を行った。

## 3 結果及び考察

### 3.1 変異原性試験等の結果

変異原性試験は3検体につき延べ4回(Run-1~4)行った。その結果を表1、用量-反応関係を図2~9に示す。表には底質乾燥重量及び中性画分(NF)当りの復帰変異コロニー数を示した。また、各底質の含水率、灼熱減もあわせて示した。試料の復帰変異コロニー数(Revertant, 以下Revと略す)は容量-反応曲線にもとづき次の計算により求めた。

$$\{\text{Rev/plate(Dose)} - \text{Rev/plate(Control)}\} / \text{Dose}$$

ここで、Rev/plate(Dose)は用量-反応曲線の最も傾きの大きくなる用量の復帰変異コロニー数、Rev/plate(Control)は陰性対照の復帰変異コロニー数、DoseはNFの用量( $\mu$ g)である。

なお、Run-1は後に行ったRun 2～4と抽出方法が若干異なるため、表から除外した。

表1 底質中の中性画分の変異原性

調査地点 No	変異原活性								底質中の 中性画分 *1 DCM・NF/ mg・dry・sed.	底質の 含水率 %	底質の 灼熱減 %
	TA100				TA98						
	+S9-Mix		-S9-Mix		+S9-Mix		-S9-Mix				
Rev/ μg・NF	Rev/ g・dry・sed.	Rev/ μg・NF	Rev/ g・dry・sed.	Rev/ μg・NF	Rev/ g・dry・sed.	Rev/ μg・NF	Rev/ g・dry・sed.				
1	5.75	29,800	0.224	1,160	0.85	4,400	—	—	5.18	53.7	15.3
2	2.88	25,400	—*2	—	—	—	—	—	8.84	62.0	20.4
3	0.67	1,150	—	—	0.044	76	—	—	1.73	37.7	7.8

\*1：ジクロロメタン（DCM）抽出物中の中性画分（NF，μg）

\*2：-は変異原性が認められない事をあらわす

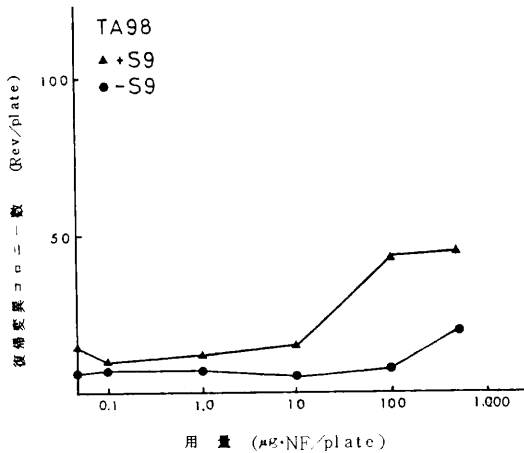


図2 No. 1地点の底質中性画分の用量-反応関係

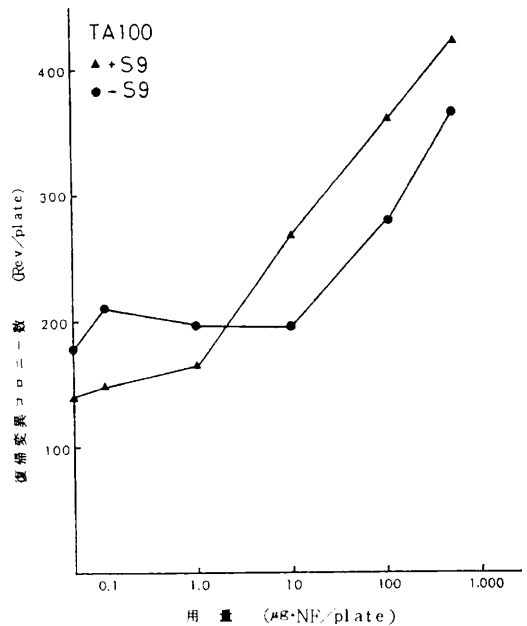


図3 No. 1地点の底質中性画分の用量-反応関係

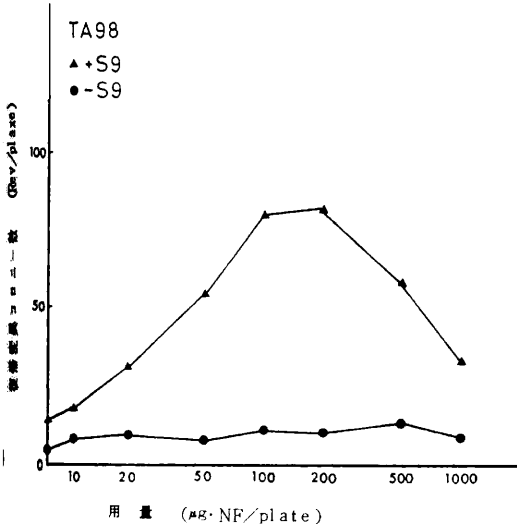


図4 No.1地点の底質中性画分の  
用量-反応関係

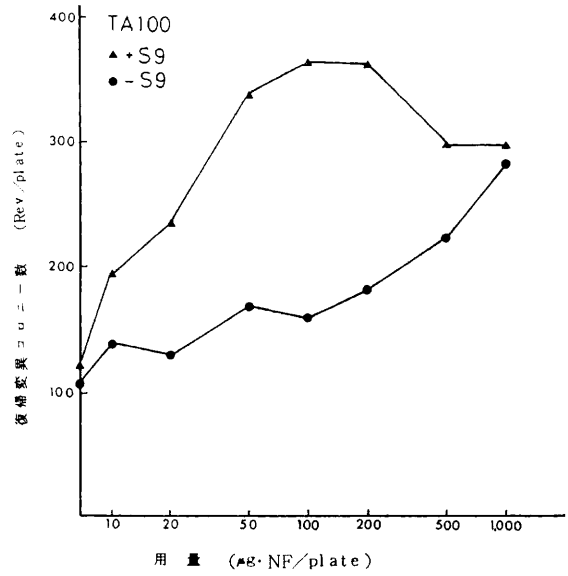


図5 No.1地点の底質中性画分の  
用量-反応関係

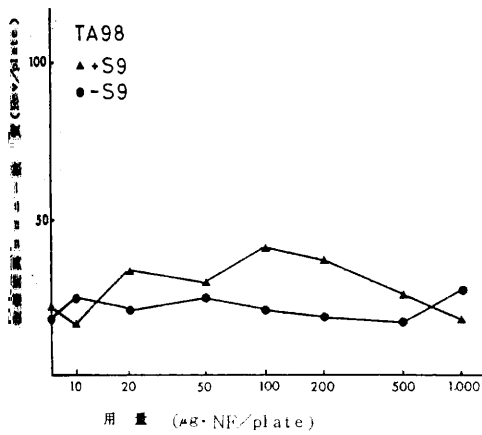


図6 No.2地点の底質中性画分の  
用量-反応関係

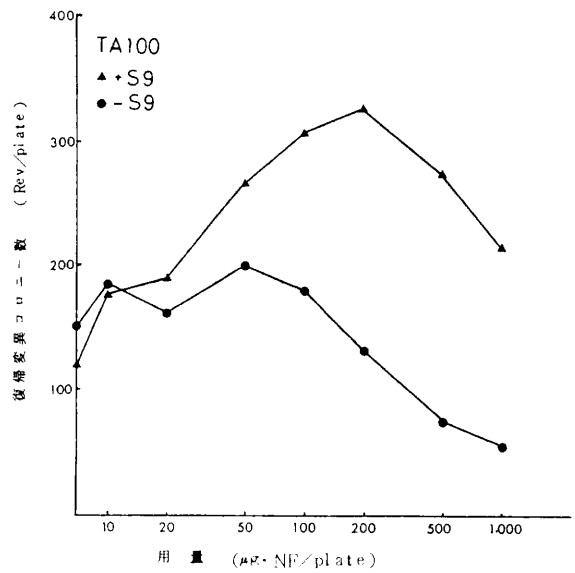


図7 No.2地点の底質中性画分の  
用量-反応関係

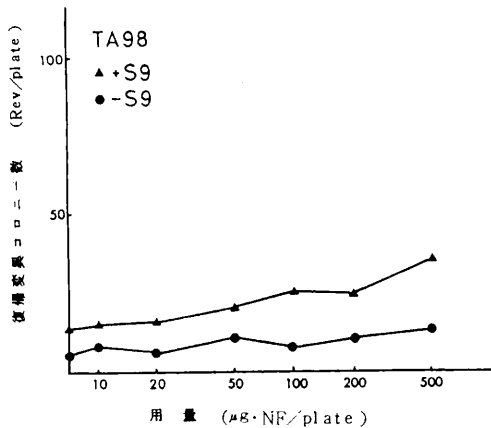


図8 No. 3地点の底質中性画分の用量-反応関係

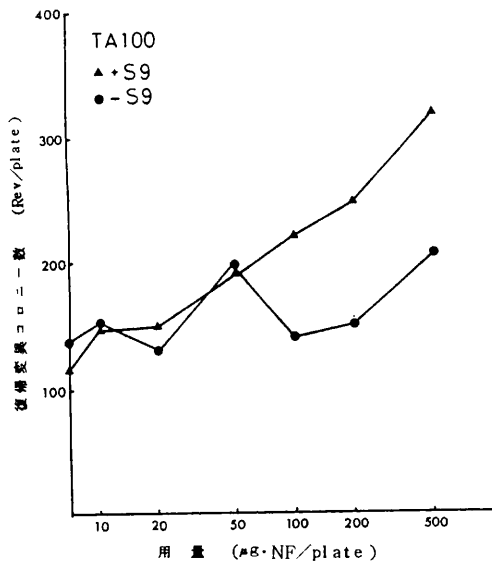


図9 No. 3地点の底質中性画分の用量-反応関係

### 3.2 底質中性画分の変異原性の有無

変異原性は試料のコロニー数と陰性対照でのコロニー数の比で判定し、その比が2倍以上でかつ用量に対応して反応曲線が立上る場合、陽性(プラス, +)であると評価した。

#### (1) Run-1/地点No. 1

Run-1は、適切な用量-反応曲線が得られる濃度範囲を見極めるために、低用量から高用量(0.1~500 μg NF/plate)まで範囲をひろげて、

予備実験としておこなった。その結果、用量が10 μg/plate以上であれば代謝活性化の有無にかかわらず、陽性の反応がでることが予測された。ただし、Run-1では予備実験であったため、第1段階の抽出法として超音波抽出のみを採用したので、粗抽出物が少なく、1,000 μg/plateのDoseは行っていない。

#### (2) Run-2/地点No. 1

Run-1と同一サンプルについて、2.2に示す方法で前処理操作を行い、NFについて10~1,000 μg/plateの用量をほどこした。その結果をみると、TA100株では代謝活性化の有無にかかわらずプラス(+), TA98では代謝活性化をほどこしたものにのみプラス(+の反応がみられた。

これを詳細にみると、両菌株ともS9-Mix添加条件下では100 μgの用量までは明らかにプラスの反応があるが、200 μgではカーブが鈍化し、それ以上の用量になると復帰変異コロニー数は減少している。これは、サンプルによる致死作用が生じていることが考えられる。

#### (3) Run-3/地点No. 3

地点No. 3のサンプルについては、TA100及びTA98両株とも代謝活性化をほどこしたものがプラス(+ )となったが、地点No. 1と異なりTA100株の-S9-Mix条件下では明確な反応はみられなかった。

また、No. 1のサンプルで見られたような致死作用は認められなかった。

#### (4) Run-4-地点No. 2

地点No. 2のサンプルについては、TA100株の代謝活性化をほどこしたもののみ、プラス(+ )であった。また、TA100においてはS9-Mix添加条件下の場合、500 μg/plate以上、-S9-Mix条件下の場合、100 μg/plate以上で明確な致死作用がみられた。

以上のように、TA100株では代謝活性化をほどこした場合、すべてのサンプルに明瞭な用量-反応曲線が得られ、明らかに変異原性が認められた。TA98株では代謝活性化した場合、No. 1及びNo. 3のサンプルにおいて変異原性が認められ

た。また、No. 1 のサンプルではTA100, -S9-Mix 条件下で変異原性が認められた。

3.3 変異原活性（変異原性の強さ）と地点間及び他の項目等との関係

他の項目として、底質中の有機物を表現しているNF及び灼熱減はNo. 2が最も高く、次いでNo. 1, No. 3の順であった。一方、変異原活性は、3地点全てにおいて陽性（+）であったTA100, +S9-Mix 条件下では、NFあたりの復帰変異コロニー数（Rev/μg, NF）及び乾燥底質あたりの復帰変異コロニー数（Rev/g·dry·sed.）のいずれもNo. 1地点が最も活性が強く、以下No. 2, 3地点の順であり、NFや灼熱減と必ずしも対応していない。このことは3地点の変異原性に係る有機物の組成が異なっている事を示唆している。特に、NFあたりの復帰変異コロニー数を見ると、No. 1地点が変異原物質の割合が最も高いことがわかる。

また、変異原活性の地点間の関係は別に測定し

た多環芳香族炭化水素のうち変異原性のあるベンゾ（a）ピレン（以下B(a)Pと略す）の底質中の濃度の順位（表2）と対応しており、最も汚染されていると考えられるNo. 1地点が変異原活性も最も高い。そこで、B(a)P濃度と各地点の復帰変異コロニー数との関係を見たところ、図10のようになり、非常によい関係が得られた。また、表2には、陽性対照として用いたB(a)Pの復帰変異コロニー数とB(a)Pの濃度から各地点のB(a)Pによる復帰変異コロニー数の予測値を求め、さらにB(a)Pの変異原性が実際の試料において他の共存物により影響されないとして、予測値から寄与率を算出した結果を示した。B(a)Pの寄与率はTA100, +S9-Mix 条件下で6.7~14.8%, TA98, +S9-Mix 条件下で6.7~13.2%であった。このように、変異原性の全てがB(a)Pの寄与とはいえないまでも、その寄与は比較的大きく、B(a)Pを始めとする多環芳香族炭化水素を中心とした汚染が変異原性に大きく寄与していることが考えられた。

表2 ベンゾ(a)ピレン濃度とその寄与率

調査地点 No	B(a)P 濃度 μg/ g·dry·sed.	B(a)P濃度から推定した変異原性とその寄与率			
		TA100		TA98	
		Rev/ g·dry·sed.	寄与率 %	Rev/ g·dry·sed.	寄与率 %
1	13	3,458	11.6	296	6.7
2	8.7	1,701	6.7	-	-
3	0.82	170	14.8	10.1	13.2

- : 変異原性が認められない(-)

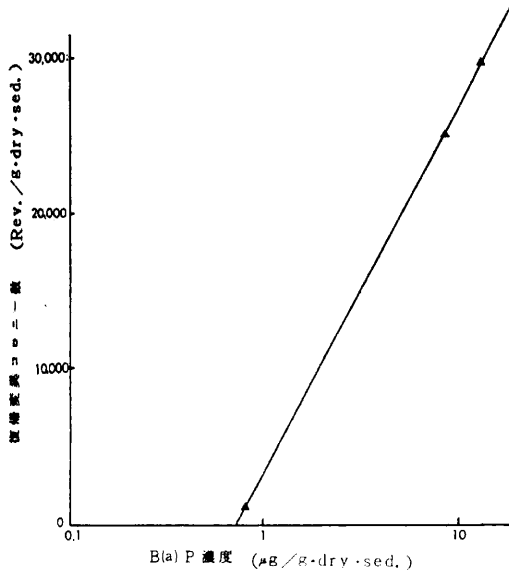


図10 復帰変異コロニー数（TA100, +S9）とB(a)P濃度との関係

3.4 他の調査における底質の変異原性との関係

底質の変異原性についての国内における知見はあまり多くなく、最近では安部らなど<sup>1-4)</sup>がある。このうちの多くは河川底質を対象としたものであり、阿部<sup>5)</sup>のレビューによれば海底質はKinaeら<sup>6)</sup>の一例<sup>2)</sup>があるのみである。Kinae等の結果は静岡県田子の浦や和歌山県新宮などでのものであるがエーテル抽出物についてみると、TA98, TA100株では代謝活性化の有無にかかわらず、変異原性は確認されず、新宮のTA1537, +S9-Mix 条件下でのみ変異原性が認められている。神奈川県中津川での安部らの結果は、変異原性が最も高いもので、TA98, +S9-Mix 条件下で約130Rev

/g·dry·sed., TA100, +S9-Mix 条件下で約 100 Rev/g·wet·sed.であった。これらに比べ、本調査では TA98, +S9-Mix 条件下で 4,400 Rev/g·dry·sed., TA100, +S9-Mix 条件下で約 30,000 Rev/g·dry·sed. であり、著しく高い結果であった。この主な要因としては 3.3 で述べたように、本調査における底質中の多環芳香族炭化水素濃度が著しく高いことが考えられる。ちなみに世界の底質中の多環芳香族炭化水素濃度をレビューした篠原らの結果<sup>7)</sup>の B(a)P の濃度と比較しても本調査の川崎港の運河地点の結果は最も高い部類に属する。

#### 4 ま と め

昭和60年10月に採取した川崎港運河底質中のジクロロメタン抽出物のうち、中性画分について、エームス法による変異原性試験を行った。

その結果、TA100, S9-Mix 添加条件下では、3地点とも、TA98, S9-Mix 添加条件下では2地点で変異原性が認められた。また、No. 1地点の底質は TA100, S9-Mix 無添加の条件下でも変異原性を示した。

TA100, S9-Mix 添加条件下における3地点の変異原活性はNo. 1, No. 2, No. 3の順であり、復帰変異コロニー数は別に測定したベンゾ(a)ピレンの濃度と非常によく対応関係が得られ、ベンゾ(a)ピレンの寄与率は7~15%と推定された。また、変異原活性は他の機関の底質に関する調査と比較し、著しく高いことが判明した。この要因として本調査の対象とした底質中のベンゾ(a)ピレンなどの多環芳香族炭化水素が他の地域の調査と比較してもかなり高い濃度であることがあげられ、今回の高変異原活性は主にそれらによるものと考えられた。

また、今後の課題として次の点があげられる。

- 本調査ではポイント数が少なかったため川崎港の全容を明らかにしたものではない。本調査地点で明らかに変異原性が認められたため、今後は生物影響の視点から、変異原性を指標に更に地点数を増やして調査を行うことが必要である。

- 底質サンプルからの抽出物中には多くの化学物質等が混入するため、中には試験菌株に対し致死作用をもたらすものもある。今回は、中性画分をセブパックでクリアアップしたため、用量-反応

曲線が得られたが、それでも、一定量以上の用量に対して致死作用がみられた。それをもたらした物質の解明と除去方法の開発が課題となる。

- 中性画分の変異原性の主要因としてベンゾ(a)ピレンを始めとする多環芳香族炭化水素が考えられたが、更に細分化したフラクションを取り、変異原性試験を行うとともに、それらの原因物質について、GC/MS等による同定、定量を行い、中でも何が強い影響力を持っているか確認することが求められる。

本調査の実施にあたって、前年に引き続き、技術指導も含め、衛生研究所理科学担当の入口氏を始めその他の方々の多大な協力を得たことを紙面をかりて感謝します。

#### 文 献

- 1) 安部明美, 杉山英俊, 久松由東, 松下秀鶴: 中津川底質の変異原性について, 衛生化学, Vol. 35, 198~205 (1989)
- 2) Knae N.; Hashizume T.; Makita I.; Kimura I.; Kanamori H.: Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents-1. Mutagenicity of the sediment samples derived from kraft paper mills, *Water Research*, Vol. 15, 17~24 (1981)
- 3) Sato T.; Kato K.; Ose Y.; Nagase H.; Ishikawa T.: Nitroarenes in Suimon River sediment, *Mutation Research*, **157**, 135~143 (1985)
- 4) Hirayama K.; Suzuki J.; Suzuki S.: Distribution of mutagens in Tama and Ayase River sediments, *Jap. J. Limnol.*, **42**, 82~88 (1981)
- 5) Maron D.M.; Ames B.M.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**, 173~215 (1983)
- 6) 安部明美: 底質中の変異原物質の分布, 水質汚濁研究, Vol. 12, 285~288 (1989)
- 7) 篠原亮太: 底質中の多環芳香族炭化水素の分布および挙動, 水質汚濁研究, Vol. 12, 279~284 (1989)