

Ames 変異原性試験を用いた雨天時道路排水の評価

廃棄物・有害物管理工学研究室 奥田絵美
指導教官 小松俊哉 藤田昌一 姫野修司

1. 背景

わが国はここ数十年間で著しく開発が進み、都市の大部分をコンクリートやアスファルトなどの不浸透区域が多く占めるようになった。それにより、雨水が浸透可能な区域は大幅に減少し、これにより今まで地下に浸透していた雨水も行き場をなくしてしまった。さらに、この雨水は大気中を漂う大気粉塵を取り込み、道路上に堆積している道路粉塵を洗い流し雨水とともに河川へ有害物質が流入する割合は不浸透区域の拡大に伴い増加している。その中には、変異原性を示す物質が存在していることが知られており、変異原性を示すということは発ガン性、催奇形性を示す可能性が高いことから雨天時道路排水の有害性が懸念される。

有害性評価のため、雨天時道路排水中の物質全てに個別分析を行うことは不可能であり、多種多様な物質が存在している排水中での化学物質における相乗効果・抑制効果などの総括的評価や生態系への評価を個別分析では行えないことなどから、個別分析では限界があり、バイオアッセイが有効であると考えられる。本研究で行っている Ames 変異原性試験（以下 Ames 試験）は、変異原性を測定するバイオアッセイ法として使用例も多く、変異原性強度を高感度で定量的に評価することのできる試験方法である。

2. 目的

本研究では実際の雨天時道路排水の変異原性の特徴・強度を明らかにし、水環境への負荷を検討した。また、一般的に排水や環境水に塩素を添加することによって変異原性強度が上昇することや、それらの排水が河川へ流入し、浄水工程に流入した時のことを想定し塩素を添加した際の変異原性生成能（Mutagen Formation Potential : MFP）¹⁾の測定により、評価することも目的とした。

3. 採水地点

本研究では、採水地点を選定する際に道路排水の採水が可能である以下の3地点にて検証を行った。

- 1) 古正寺地区 雨水吐き口
- 2) 長岡 I.C.下 道路
- 3) 国道 17 号線 雨水吐き口

古正寺地区においては、完全分流式の地区であるが数件が浄化槽を使用しているため、浄化槽排水の流入が懸念された。また、I.C.下を通る道路は雨水を地下に集め、ポンプアップを行い排水を行っているが、壁のクラックより鉄分を含む地下水が常時流出しており、排水中の地下水の割合が高いことが示唆された。このような現場調査と Ames 変異原性試験を3箇所の排水で行った結果、国道 17 号線のサンプルが擬陽性を示したことや道路排水のみの採水が可能であること、幹線道路であるため交通量が多いことなどから、採水場所を国道 17 号線の道路排水の排水口とした。また、ひとつの排水口が受け持つ道路面積は約 110m²である。

4. 実験方法

4-1. 水質項目測定

本研究における実験の流れを図 1 に示す。採水してきた試料は直ちに溶解性有機態炭素（DOC）浮遊物質（SS）の測定を行った。

4-2. 試料水中の変異原性物質の濃縮と回収

試料水中に含まれる変異原性物質は微量であるため、濃縮・回収して試験に供する必要がある。その方法は既報²⁾に従った吸着剤として高性能吸着樹脂である CSP-800 (日本ウォーターズ製) を使用した。濃縮操作には定流量ポンプ (Waters 製) を使用して、通水速度 10mL / min、濃縮倍率 500 倍 (DOC,SS の濃度によっては 250 倍) の条件で濃縮した。その後、カラム内に吸着された物質の回収にはメタロールポンプ(日興エンジニアリング製)を使用し、ジメチルスルホキシド (DMSO) を流速 0.15 mL / min で通水し、脱離液 2 mL をねじ口ピンに採集して、濃縮された試料の回収を完了させた。

4-3. Ames 変異原性試験

Ames 変異原性試験方法は労働省のガイドブック³⁾に準じて行った。代表的な変異株である Salmonella typhimurium TA98 株および TA100 株を用い、代謝活性物質 S9mix 無添加 (-S9) と代謝活性剤 S9mix 添加 (+S9) で、37、20 分間のプレインキュベーション法で行った。1 検体につき DMSO により溶解した試料の濃度は 50, 100 μL / plate の 2 段階 (2 プレートずつ) に分注した。菌体の活性を確認するために、検体の添加量と同量の DMSO のみを添加した 4 枚のプレートをを用いた陰性対照試験と、-S9 では 4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO)、+S9 では 2-アミノアントラセン (2AA) による 2 枚のプレートをを用いた陽性対照試験を毎回行った。各実験での復帰コロニー数を計数した結果から、試料水換算の検液添加量と復帰コロニー数との用量 作用関係を描き、回帰直線の勾配を最小二乗法で求め、

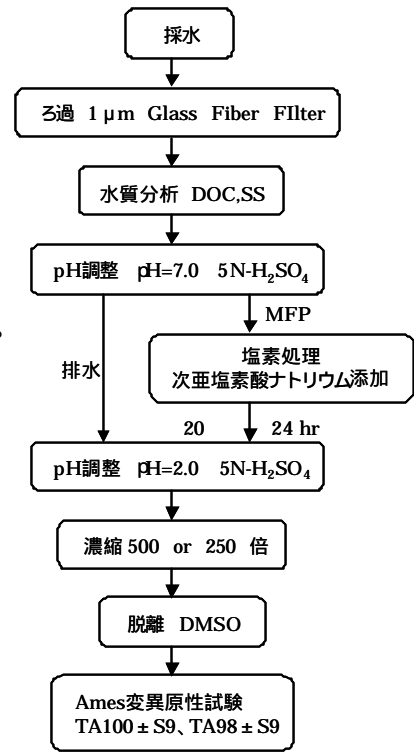


図 1 実験全体の流れ

濃縮前の試料 1 L に換算した正味の復帰コロニー数 [net rev./L] として変異原性の強度を表示した。さらに MR (Mutation Ratio) 値、すなわち試料の復帰コロニー数の自然復帰コロニー数に対する比で表し、MR 値 < 1.4 で陰性、1.4 < MR 値 < 2.0 で擬陽性、2.0 < MR 値で陽性と判断した。

5. 雨天時道路排水実験結果

5-1. Ames 変異原性試験における最適実験条件

本研究室の従来の研究により、塩素処理を施した試料では TA100-S9 条件にて検出される変異原性物質が多く生成されることが分かっている¹⁾。本研究の試料である雨天時道路排水中に含まれているとされる PAHs は Ames 試験にて代謝活性剤を添加 (+S9) した系で感受性が高いことが報告されているが³⁾⁴⁾、どの株で代謝活性を施した際にもっとも変異原性を示すのかはまだ明らかであるとは言い難い。さらに、環境中で非意図的に生成、分解する物質なども存在していることから最適試験条件を知ることが、本研究を遂行する上で非常に重要であると考えられる。

表 1 雨天時道路排水の Ames 試験における最適試験条件の選定実験結果

	塩基対置換型		フレームシフト型	
	TA100-S9	TA100+S9	TA98-S9	TA98+S9
AM9:00	670	560	40	0
AM10:00	580	540	80	50
AM11:00	500	520	90	130
雨水ます	1030	480	100	210

[net rev./L]

MR値 < 1.4 : 陰性 1.4 < MR値 < 2.0 : 擬陽性 2.0 < MR値 : 陽性

そこで実際に採水した雨天時道路排水の試験条件の検討を行ったので、その結果を表 1 に示す。表 1 より、雨天時道路排水においては塩基対置換型の間接変異原性を示す変異原性物質 (TA100+S9 で検出) が多く存在していることが明らかとなった。この結果より、本節以降では主に TA100+S9、およびその次に変異原性強度が高い値を示した TA100-S9 においても試験を行い、検討を行っていくこととする。

5-2. 雨天時道路排水の変異原性強度における経時変化

図 2 に 12 月 16 日の雨天時道路排水の経時変化を示す。採水開始直後の 12 時 20 分のサンプルは SS,DOC とともに非常に高い値を示し、次の 12 時 30 分のサンプルでは両項目とも急激に低下している。これがファーストフラッシュ現象であり、初期に高濃度の汚濁が流出することを確認した。12 時から 12 時 30 分までに降った雨量は 0.6mm / 30min であり、SS、DOC とともに

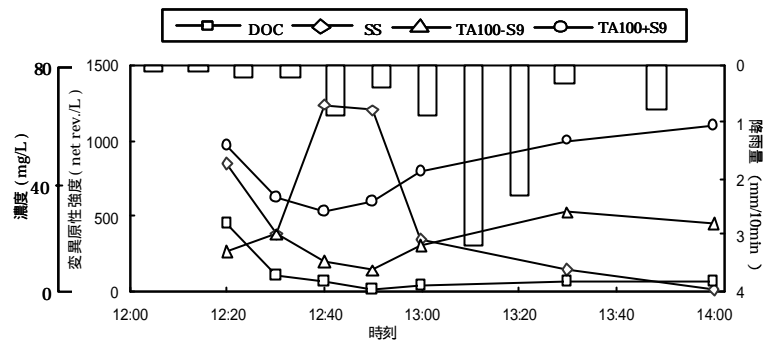


図 2 雨天時道路排水の経時変化

その程度の降雨で一気に流出することが明らかとなった。さらに 2 回目の強い降雨の際に再び SS が急激に上昇していることや、DOC 成分は時間の経過とともに減少していることから SS の流出は降雨強度に支配され、DOC 成分は比較的流出しやすい形態で道路上に存在していることが示唆された。SS 成分ははじめの降雨では表面に堆積していた SS 分が一気に流出し、2 回目の急激な上昇では道路表面の凹凸などに詰まっていたそれらが降雨によって洗い流され一気に流出したのではないかと考えられた。

さらに Ames 試験に供したところ、TA100 - S9 では 2 回目の降雨のあと、少し変異原性強度が上昇するがその後減少の傾向が確認された。これより、限りなく初期流出に近いサンプルでは直接変異原性物質、間接変異原性物質の両方が多く流出し、以降の流出に関してはそれらの流出の速度に差がある、もしくはそれぞれの存在量が異なることが考えられた。また、MR 値は 13 時 30 分、14 時のサンプルで TA100 ± S9 とともに高い値を示した。また、雨天時道路排水中の変異原性物質は SS や DOC とは異なった流出を示しており、また統計処理においても両者の間に相関性がないことが確認された。

6. 雨天時道路排水 MFP 実験結果

6-1. Ames 変異原性試験における最適実験条件の選定

表 2 より、TA100±S9、TA98-S9 条件においてすべてのサンプルで擬陽性もしくは陽性を確認した。

しかしながら、これまでの実績で塩素処理を施した排水では塩基対置換型の直接変異原性物質が多いこと、また本試料においても TA100-S9 の数値が最も高いことから、MFP では主に TA100-S9 条件において検討していくこととする。

表 2 雨天時道路排水 MFP の Ames 試験における最適試験条件の選定実験結果

	TA100-S9	TA100+S9	TA98-S9	TA98+S9
AM9:00	1800	650	200	120
AM10:00	2200	490	120	140
AM11:00	1800	530	210	90
雨水ます	6630	540	260	190

[net rev./L]

MR値 < 1.4 : 陰性 1.4 MR値 < 2.0 : 擬陽性 2.0 MR値 : 陽性

6-2. 雨天時道路排水 MFP 強度における経時変化

図 3 に図 2 で示した雨天時道路排水に塩素を添加し、MFP を測定した結果を示す。塩素を添加した

MFP サンプルでは、TA100-S9,TA100+S9 とともに SS,DOC とは全く異なる挙動を示した。

MFP では、-S9 条件にて感度が高いことが確認された。+S9 条件と比較し、約 1.65 倍感度が高かった。この日のサンプルは 13 時 30 分、14 時といった後半のサンプル高い値を示した。また、そのままの雨天時道路排水に対する MFP 強度の平均値における増加率は+S9 条件において約 1.08 倍、-S9 条件では 4.4 倍であり、雨天時道路排水中には塩基対置換型の間接変異原性前駆物質が多く含まれていることが

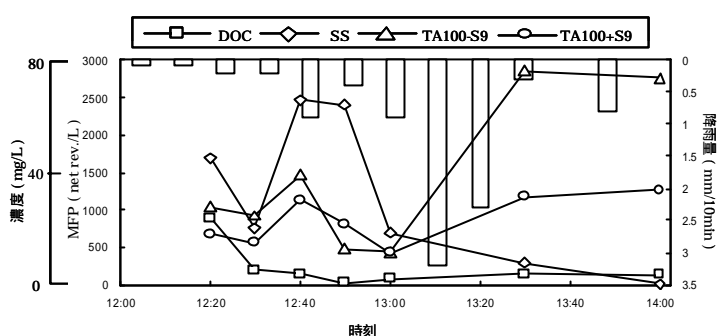


図 3 雨天時道路排水 MFP 経時変化

明らかとなった。また、採水した時間ごとにおけるその上昇率は、排水の後半につれ上昇する傾向にあり、塩基対置換型の間接変異原性前駆物質が排水の後半で多く排出されていることが示唆された。また、雨天時道路排水雨天時道路排水中の変異原前駆物質は SS や DOC とは異なった流出を示しており、また統計処理においても両者の間に相関性がないことが確認された。さらに、この日の無降雨期間は約 2 日半であり、この日の採水時間中の 1m² あたりの汚濁負荷は約 21 (mg-SS/100min)、2.9 (mg-DOC/100min) であった。採水を行った地点の高架橋の距離が 1.6km であり、この面積に換算するとそれぞれ 336 (g-SS/100min)、46.4 (g-DOC/100min) となり、無降雨期間の長期化によって、短時間で流出する汚濁負荷の増大が懸念された。

7. まとめ

雨天時道路排水の変異原性強度、変異原性生成能を調査した結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 雨天時道路排水は TA100+S9 条件において感度がよいことから、塩基対置換型の間接変異原性を示す物質が存在していることが明らかとなった。
- 2) 雨天時道路排水に塩素を添加した変異原性生成能は TA100+S9 では、さほど変化はなかったが、TA100-S9 条件では約 1.65 倍変異原性強度が増加し、その増加率は採水後半にいくに従い高くなった。これより、変異原前駆物質は降雨開始からしばらくたって流出して行く可能性が示唆された。
- 3) 雨天時道路排水、雨天時道路排水 MFP とともに SS,DOC、降雨量などとは有意な相関を示さないことが明らかとなった。
- 4) 無降雨期間の長期化によって、短時間で流出する汚濁負荷の増大が懸念された。

《参考文献》

- 1) 三田美紀：変異原性生成能を指標とした信濃川下流域水道原水の安全性評価，長岡技術科学大学大学院工学研究科修士論文 (2003)
- 2) 浦野鉦平ら：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，水環境学会誌 Vol.17 461-469 (1994)
- 3) 安衛法における変異原性試験、中央労働災害防止協会 (1991)
- 4) 奥川光治：多環芳香族炭化水素および変異原性から見た屋根流出雨水水質の流出特性，水環境学会誌 Vol.25 No.1 57-64 (2002)