

環境汚染物質の変異原性に関する研究 — 土壌の変異原物質検索法に関する研究 —

大 山 謙 一 佐々木 裕 子 川 井 利 雄
仲 真 晶 子 遠 藤 立 一 川 原 浩

1 はじめに

環境大気中には、癌原物質と深い関係にある変異原物質が粉じんと共に浮遊して、生体に悪影響を及ぼすことが指摘され、多くの研究が行われている。ここで使用される検体は、ハイボリュームエアサンプラーにより、粉じんをろ紙上に捕集する方法が採用されている。しかし、この方法は、長期間の採取が困難であったり、機器の設定や電源の確保、ろ紙の交換等機動性に欠ける面がある。そこで、より簡便な手法として、土壌を検体とする変異原試験法に着目した。

浮遊粉じん中に含まれる変異原物質は、やがて粉じんと共に地表等に落下することから、土壌の変異原活性を測定することで、その地域の大气汚染状況を把握することができるかと推定される。しかし、土壌の変異原性についての報告は少く、土壌の採取方法及び変異原性試験のための検体作成方法も、まだ確立されていない。そこで、これらの方法の確立も含めて、土壌の変異原性に関する調査・研究を行っているが、今回は、都内土壌の変異原性予備調査と土壌変異原物質の検体作成法について報告する。

2 土壌変異原性の予備調査

(1) 材料と方法

ア 検 体

(ア) 採取地点

土壌変異原性の性格を検討するため、自然が維持されていると考えられる山地丘陵地、人が生活し、かつ緑の多い武蔵野台地、そして人口密集地の低地の3地域で各々2地点の土壌を採取した。また採取深度は、表層から地下1mの範囲とした。

山地丘陵地：A地点、B地点

武蔵野台地：C地点、D地点

低 地：E地点、F地点

(イ) 前処理

土壌をろ紙上に広げ、小石等のきょう雑物を取り除き、室温に設定した温風循環式乾燥器中で3～4日間乾燥した。得られた乾燥土壌をメノウ製ボールミルで粉碎し、30メッシュのふるいに通して粉末状にした。

(ウ) 抽 出

ハイボリュームエアサンプラーで採取した浮遊粉じんからタールを抽出する方法に準じて行った。

粉末土壌30gを三角コルペンに入れ、エチルアルコール(残農用)60mlを加えて数分間静置後、ベンゼン(残農用)240mlを加えて30分間超音波抽出した。得られた溶液をろ紙(5C)でろ過し、全量をロータリーエバポレーターを用いて32～34℃で減圧乾固させた。乾固物を秤量した後、酢酸エチル(残農用)1mlに溶解し、適量のジメチルスルホキシド(DMSO)(吸収スペクトル用)を加えた。さらに、酢酸エチルを減圧留去して検体とした。

イ 変異原性試験

(ア) 菌 株

Amesの*Salmonella typhimurium* TA100(塩基交換型変異株)、TA98(フレームシフト型変異株)を用いた。

(イ) 試験方法

Ames変法であるpreincubation法^{注)}を用いた。代謝活性化には、ウイスター系ラットの肝(PCB誘導)の9000g上清(S9)とNADPH-産生系によるS9Mixによって行った。試験は、2回繰返し、平均値から単位土壌重量当りの誘発変異コロニー数(rev)を算出した。

(2) 結 果

表1に示すように、土壌中にはその土壌特有の変異原

表1 各地土壌の変異原活性 (rev/g, 土壌)

地 点	山 地 丘 陵 地						武 蔵 野 台 地						低 地						
	A			B			C			D			E			F			
	0m	0.5	1.0	0m	0.2	1.0	0m	0.1	1.0	0m	0.2	1.0	0m	0.2	1.0	0m	0.2	1.0	
T A 100	-S 9	-	305	115	32	37	-	89	-	-	-	-	90	46	-	-	-	-	26
	+S 9	131	606	163	39	-	-	103	50	-	-	-	-	74	-	-	36	30	-
T A 98	-S 9	67	303	113	29	11	6	45	11	17	14	14	33	47	55	7	21	32	32
	+S 9	82	343	84	24	-	10	91	17	8	23	-	5	47	19	-	18	18	11

- : 陰性

物質が含まれているように見られ、採取地点や深さによって変異原性に違いが認められた。また、大気汚染物質が最も多く含まれると予想された表層について見ると、低地よりも山地丘陵地の方が、T A100±S 9、T A98±S 9で高い変異原性を示した。さらに、A地点では、地下0.5mと1mでの変異原性が表層(0m)に比べ非常に高い値を示した。A地点は山地丘陵地であり、他の2地点に比べて人為汚染物質は少ないと考えられるものの、高い変異原性を示した。

3 土壌中変異原物質の検体作成法の検討

上記2で行った実験において、土壌から抽出した減圧乾固物には、ハイポリウムエアサンプラーで得られる検体と違ってDMSOに不溶性浮遊物が存在した。この不溶物が、変異原活性に影響することが予想されたので、乾固物をDMSOに溶解する方法について検討した。

(1) 材料と方法

ア 検 体

都内で採取した変異原性の高い土壌と低い土壌を検体とした。

変異原性の高い土壌 : H

変異原性の低い土壌 : L

(ア) 前処理

2-(1)-ア- (イ) と同様に処理した。

(イ) 抽 出

乾固物作成までは、2-(1)-ア- (ウ) と同様である。乾固物をDMSOに溶解するまでの操作は次の4通りの方法とした。

(a) 乾固物に直接DMSOを加え超音波処理する方法

- (b) 乾固物に酢酸エチルを加え超音波処理した後、DMSOを加え酢酸エチルを減圧留去する方法
- (c) 乾固物にベンゼン・エタノール(4:1)を加え超音波処理した後、DMSOを加えベンゼン・エタノールを減圧留去する方法
- (d) 乾固物にエチルエーテル(残農用)を加え超音波処理した後、DMSOを加えエチルエーテルを減圧留去する方法

イ 変異原性試験

2-(1)-イと同様に行った。

(2) 結 果

検体Hにおいては、DMSOに不溶性浮遊物は肉眼的には認められなかった。しかし、変異原活性は、表2に示すように検体の作成方法によって差が認められ、(a)法で比較的低値を示す傾向に有り、(d)法では高値を示した。一方、検体Lでは、タール含有率が高く、DMSOに不溶性浮遊物が残存した。この浮遊物は、程度の差はあるが(a)~(d)の各方法に認められた。

表2 各試料作成法による変異原活性

検 体	試 料 作 成 法	H				L			
		(a)	(b)	(c)	(d)	(a)	(b)	(c)	(d)
T A 100	-S 9	329	288	372	400	-	-	-	-
	+S 9	442	625	894	994	-	-	-	-
T A 98	-S 9	357	481	478	528	24	21	21	12
	+S 9	461	781	947	1131	23	60	31	53

H : 変異原性の高い土壌

L : 変異原性の低い土壌

(a) : 乾固物に直接DMSOを加え超音波処理する。

(b) : 乾固物に酢酸エチルを加え超音波処理した後、DMSOを加え酢酸エチルを留去する。

(c) : 乾固物にベンゼン・エタノールを加え超音波処理した後、DMSOを加えベンゼン・エタノールを留去する。

(d) : 乾固物にエチルエーテルを加え超音波処理した後、DMSOを加えエチルエーテルを留去する。

- : 陰 性

しかし、変異原活性は、総体に低く、検体の作成方法による差は見られなかった。

(d) 法で使用したエチルエーテルは、酢酸エチルやベンゼン・エタノールに比べて、留去が容易であった。

以上の結果から、土壌から得られた変異原物質をDM S Oに溶解する媒体として、エチルエーテルが適していると考えられる。

今後は、今回得られた結果を基に、土壌の変異原性が大気汚染の指標として活用できる方法について検討する

とともに、土壌からの変異原物質の回収方法、及び変異原物質の土壌への浸透現象等、解明していく予定である。

なお、環境水の変異原性についても、変異原物質の捕集方法を含めて検討中である。

注) preincubation 法

検体、菌、S 9 Mix 又は100mM Naリン酸緩衝液 (pH7.4) の混合液を37°C、20分間振とうした後、最小培地で37°C、48時間培養する方法。