

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740042

研究課題名(和文)加熱土壌の遺伝毒性評価とその原因物質の探索

研究課題名(英文) Evaluation of the genotoxicity of thermally treated soils using the electrochemical genotoxicity assay based on a SOS/umu test

研究代表者

佐澤 和人 (Sazawa, Kazuto)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・助教

研究者番号：80727016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では我々が開発した電気化学的遺伝毒性試験法を用い、加熱後の土壌残渣を直接菌体に暴露した際の遺伝毒性を評価した。遺伝毒性を評価した結果、350℃以上で加熱した土壌から遺伝毒性の発現が観察された。また、加熱した土壌から3、4環系の多環芳香族炭化水素(PAHs)が主に検出され、遺伝毒性強度との間に正の相関を示した。本研究の結果から、泥炭のような有機物質を多く含む土壌ほど火災後に土壌生物の染色体異常を誘発するリスクが高いということが分かった。加えて、極東ロシアにおいて採取した森林火災跡地土壌の遺伝毒性を評価した結果、火災による影響が強い表層で高い遺伝毒性強度およびPAHs濃度が検出された。

研究成果の概要(英文)：The effect of forest fire can be seen in the physical, chemical and biological properties of soil. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are produced by the incomplete combustion of soil organic matter, and they induce DNA damage in bacterial cell. The purpose of this study is to evaluate the genotoxicity of thermally treated soils using a new umu test based on hydrodynamic electrochemical detection. It was found that the genotoxicity of soil drastically increase when samples were heated over 350℃. The intensity of genotoxicity showed a good liner correlation with the concentration of three- and four-rings PAHs and b* values of thermally treated samples. The change of b* value is strongly related to the dehydration and decarboxylation of soil organic matter. The result obtained from this study concluded that the soil with a high organic matter content such as peat soil indicate high genotoxicity risk.

研究分野：環境化学

キーワード：土壌有機成分 森林火災 多環芳香族炭化水素

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界で発生している森林・原野火災は広大な森林資源を消失させると同時に、人間活動由来の 20~60%に相当する大量の CO₂ を放出していることが明らかとなり、温暖化を加速させる要因の一つとして注目されている。また、いくつかの研究報告により、さらに温暖化が進行した場合、全世界における森林・原野火災の発生リスクは増大することが予測されている [1]。大規模な森林・原野火災は地上部の植生だけでなく、地表層及び地下部の土壌を燃焼させ、土壌有機成分の量的、質的变化を引き起こす。加えて、煙霧や火災跡地土壌から多環芳香族炭化水素 (PAHs) 等の遺伝毒性物質が検出されており、ヒトへの健康被害や生態系へ及ぼす影響が懸念されている [2]。

(2) 遺伝毒性試験の一つである *umu*-test は、DNA 損傷によりネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) から生産される酵素活性を発色基質の吸光度から評価する手法である。しかし、光学的検出法に依存していることから懸濁物質を含む試料には適応しておらず、土壌の遺伝毒性を評価する際は有機溶媒抽出によって得た試料を用いる必要がある。これまでに我々の研究室は、電気化学的検出法を利用した遺伝毒性試験を開発した [3]。この方法は、*p*-アミノフェニル-β-D-ガラクトピラノシド (PAPG) を基質として用い、菌体の酵素反応によって得られる *p*-アミノフェノール (PAP) の電流応答から遺伝毒性の評価をする。本法の特色は、光学的阻害を受けず、土壌試料を生体に直接暴露した際の遺伝毒性を評価可能な点にある。

2. 研究の目的

本研究では、電気化学的遺伝毒性試験法を用い、異なる温度で加熱した土壌残渣を直接菌体に暴露した際の遺伝毒性を分析した。試料として国内の土壌に加え、森林火災の多発が報告されている国外の熱帯および寒冷地土壌を用いた。加熱条件および土質が加熱土壌の遺伝毒性に及ぼす影響を評価することで、遺伝毒性発現の原因となる土壌有機成分の特徴を明らかにすることを目的とした。さらに、加熱土壌中に含まれる PAHs、ニトロ芳香族化合物 (N-PAHs) の濃度・種類を分析し、遺伝毒性強度との関係性をみることで、森林火災で発生する土壌中の PAHs 量や生体に及ぼす影響について考察した。

3. 研究の方法

(1) 土壌試料として岐阜県の天生湿原泥炭、富山県の森林土壌 (広葉樹林、針葉樹林) に加え、インドネシア・カリマンタン島の熱帯泥炭、および、極東ロシア・アムール州の広葉樹林、針葉樹林、草地、泥炭土壌を用いた。土壌は火災による影響を受けていない地点の A 層から採取した。また、ロシア産の泥炭土壌のみ 0 層も採取した。加えて、ロシアにおいて実際に火災の影響を受けた広葉樹林土壌 (0 層、A 層) を得た。本報告書では各

土壌の略称を以下のようにする。天生湿原泥炭: JP、富山広葉樹林土壌: JB、富山森林樹林土壌: JC、インドネシア泥炭: IP、ロシア広葉樹林土壌: RB、ロシア針葉樹林土壌: RC、ロシア草地: RG、ロシア泥炭 (0・A 層): RP (0・A)、ロシア火災跡地土壌 (0・A 層): Rb (0・A)。

(2) 元素分析、熱分解ガスクロマトグラフィー・質量分析法 (Py-GC/MS) から本研究で使用した土壌の有機成分の特徴を評価した。また、熱分析-示差熱熱量同時測定 (TG-DTA) を用いることで燃焼特性を明らかにした。

(3) マッフル炉を用い、土壌を異なる温度 (250、300、350、400 °C) および時間 (1、30 分) で加熱後、遺伝毒性試験に供した。また、色彩色差計を用い加熱土壌の色彩変化を分析した。遺伝毒性の評価には NM2009 株を使用した。培養した菌液 450 μL に土壌試料 45 mg を加え、37 °C で 24 時間暴露した。また、暴露時に薬物代謝酵素誘導ラット肝 S9 を添加することで、代謝活性化によって発現する遺伝毒性について評価した。暴露後、菌液に PAPG を基質として添加し、酵素反応生成物である PAP の酸化電流の過渡応答をクロノアンペロメトリーで記録した。ブランクの値に対し、電流応答が 2 倍以上の値を示した場合、遺伝毒性を陽性と判定した。

(4) 本研究で測定対象とした PAHs、N-PAHs、を以下に示す。PAHs: ナフタレン (Nap)、アセナフチレン (Acnyl)、アセナフテン (Acna)、フルオレン (Fluo)、フェナントレン (Phen)、アントラセン (Anth)、フルオランテン (Fluant)、ピレン (Pyr)、ベンゾ[a]アントラセン (Bzaan)、クリセン (Chry)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、ベンゾ[b]フルオランテン (Bzbf1)、ベンゾ[k]フルオランテン (Bzkl1)、ジベンゾ[a, h]アントラセン (Dibzan)、ベンゾ[g, h, i]ペリレン (Bzper)。N-PAHs: 1-ニトロナフタレン、3-ニトロフルオランテン、1-ニトロピレン、2,7-ジニトロピレン。加熱土壌からの PAHs の抽出・分析は既存の報告を参考に行った [4]。試料にジクロロメタンを加え、超音波 (40 kHz) による抽出を行った。抽出液をアルミナ、シリカゲルを詰めたカラムで処理後、ジクロロメタンで 500 μL に定容し、Py-GC/MS で分析した。濃度既知の各 PAHs を用い前処理後分析した結果、Nap、Acnyl、Acna の回収率は 20%以下であった。一方、Fluo は 40%、Anth は 70%、それ以外の PAHs は 80%以上であった。

4. 研究成果

(1) 元素分析の結果、国内、インドネシア、ロシアの泥炭土壌、および、ロシアで採取した広葉樹林土壌は高い炭素含有量 (23.4~52.0%) と窒素含有量 (1.03~2.23%) を示した。また、Py-GC/MS のクロマトグラム解析から、リグニン由来の熱分解生成物量は、同じ泥炭土壌でもインドネシア、ロシア産のものが 30%程度であったのに対し、国内で採取したものは 20%と少なかった。一方で、国

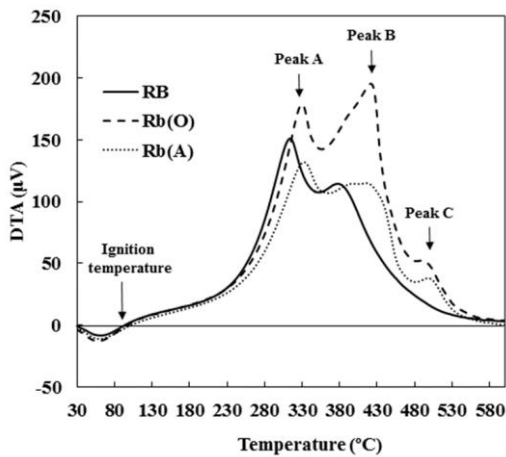


Fig. 1 ロシア産広葉樹林土壌 (RB) および火災跡地土壌 0 層、A 層 (Rb (O)、Rb (A)) の DTA 曲線。

Table 1 各土壌の着火温度、発熱ピーク温度、600 °C で加熱後の重量減少量。

	Ignition temperature (°C)	Peak A	Peak B	Peak C	Ignition loss at 600°C (%)
IP	114.2	336.9	439.6	n.d.	100.0
JP	109.1	326.3	439.6	n.d.	77.3
JB	80.5	312.3	n.d.	n.d.	26.4
JC	101.7	312.9	n.d.	n.d.	48.5
RB	93.2	314.0	377.1	n.d.	53.7
RC	72.3	302.5	n.d.	n.d.	21.4
RG	98.3	327.8	423.1	n.d.	15.3
RP (O)	98.5	288.9	n.d.	n.d.	73.4
RP (A)	116.9	293.2	n.d.	n.d.	46.6
Rb (O)	98.0	330.1	421.7	488.6	67.8
Rb (A)	102.6	332.4	415.9	498.5	48.2

内で採取した泥炭は脂肪酸の含有量が 80% と高い値を示した。これらの分析結果から、本研究で用いた土壌の有機物質含量、有成分組成の違いを明らかにした。TG-DTA は試料を加熱可能な精密天秤にのせ、温度を一定の割合で上昇させながら重量変化 (TG) と試料からの熱の出入り (DTA) を測定する手法である。この測定により、常温から数百度にかけて温度を変化させたときの対象試料の着火温度、吸熱、発熱特性が明らかとなる。ロシアで採取した広葉樹林土壌および火災跡地土壌 (0 層、A 層) を 600 °C まで加熱した際の DTA 曲線を Fig. 1 に示す。また、Table 1 に本研究で用いた土壌の燃焼ピーク温度および 600 °C まで加熱した時の重量減少量を示す。未火災地土壌の DTA 曲線を測定した結果、300~340 °C (Peak A) および 380~440 °C (Peak B) 付近に燃焼ピークが確認された (Fig. 1)。また、土壌によって燃焼ピークの数や温度が異なることが明らかとなった (Table 1)。重量減少量は各泥炭土壌およびロシアの広葉樹林土壌で 53~100% と高く、元素分析の結果と同様の傾向を示した。また、火災跡地土壌では 500 °C 付近に未火災地土壌ではみられない燃焼ピークが観察された (Fig. 1、Peak C)。これは加熱による難燃性有機成分の生成を示している。

(2) TG-DTA の結果をもとにマッフル炉を用い、各土壌を異なる温度 (250、300、350、400 °C)、時間 (1、30 分) で加熱した。は

じめに、遺伝毒性評価における菌体と加熱土壌の最適な暴露時間の検討を行った。250、400 °C で 30 分加熱した天然湿原泥炭、インドネシア泥炭を、S9 を 10% 含む菌液に 2~32 時間暴露した際の β -ガラクトシダーゼ活性による電流応答の変化を評価した。未加熱および 250 °C 30 分で加熱した土壌ではどの暴露時間でも電流応答の変化は観察されなかった (Fig. 2A)。一方、400 °C で 30 分加熱した土壌を暴露したところ 8 時間以降、電流応答の増大が観察され、24 時間で一定になることが明らかとなった。加熱したインドネシア泥炭を菌体に 24 時間暴露後、PAPG を添加することで得られたクロノアンペログラムを Fig. 2B に示す。350 °C 以上で加熱した土壌はブランクに対して 2 倍以上の応答を示し、加熱土壌が菌体の遺伝子に強い影響を与えていることが明らかとなった。

(3) 350、400 °C で 1、30 分加熱した土壌を、S9 を 10% 含む菌液に 24 時間暴露した際の遺伝毒性強度を評価した (Fig. 3)。ロシア泥炭を除き、350 °C で 1 分加熱した土壌を暴露した場合、遺伝毒性の発現は観察されなかった。また、国内で採取した広葉樹林土壌を除き、400 °C で 1 分、350 および 400 °C で 30 分加熱した土壌から遺伝毒性の発現が観察された。発現する遺伝毒性強度は土壌によって大きく異なり、ロシア泥炭は 350 °C 1 分の加熱でも遺伝毒性を発現するのに対して、富山県広葉樹林土壌では、どの加熱条件においても遺伝毒性を発現しないことが分かった。

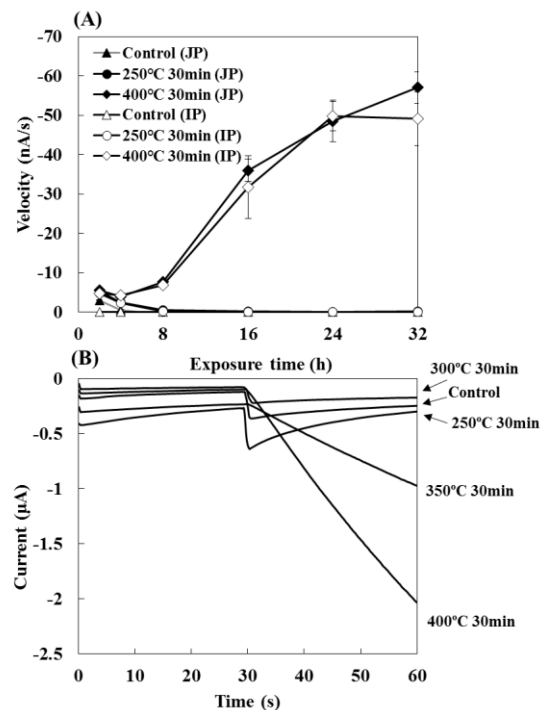


Fig. 2 (A) 250、400 °C、30 分で加熱した天然湿原泥炭 (JP)、インドネシア泥炭 (IP) を菌液に暴露した際の酵素活性による電流応答の経時変化。(B) 異なる温度で 30 分加熱した IP を 24 時間暴露した菌液に基質を添加した際に得られたクロノアンペログラム。

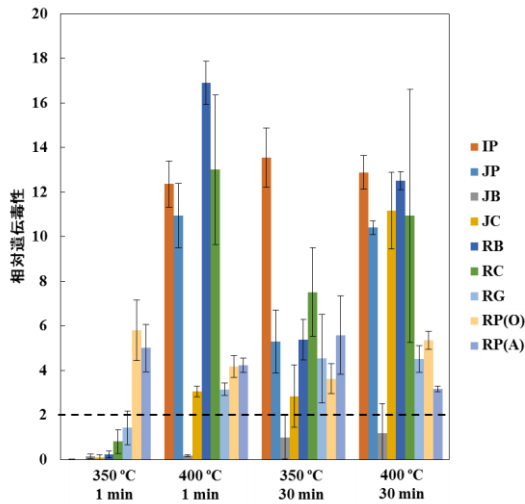


Fig. 3 異なる温度、時間で加熱した土壌を S9 共存下の菌体に暴露した際に得られた遺伝毒性強度。相対遺伝毒性：加熱土壌で得られた応答値を未加熱の土壌の値で割ったもの。2 倍以上の値を示した場合、陽性と判定。

既存の報告により、火災時に表層土壌の温度は 400 °C 以上に達することが知られていることから [5]、加熱土壌による遺伝毒性の発現は野外においても十分起こりうるということが分かった。また、S9 を添加せず遺伝毒性を評価した結果、S9 添加した場合に比べ得られる遺伝毒性強度は低かった。これは、加熱によって生じた遺伝毒性物質の多くが、代謝活性によって強い遺伝毒性を示す PAHs 等であることを示唆している。また、ロシアで採取した火災跡地土壌を同様に評価した結果、0 層、A 層の遺伝毒性はともに陽性を示した。加熱土壌の重量減少率と遺伝毒性強度の関係性を評価した結果、正の関係性が観察された。特にロシア産の針葉樹林土壌は重量減少率が低いにも関わらず、高い遺伝毒性を示した。これは、土壌有機物質の量だけでなく質の違いによって、発生する遺伝毒性物質が異なることを示している。しかしながら、Py-GC/MS や元素分析から得られた土壌有機成分の組成に関するパラメータと遺伝毒性強度の間に関係性はみられなかった。加熱土壌の Δb^*

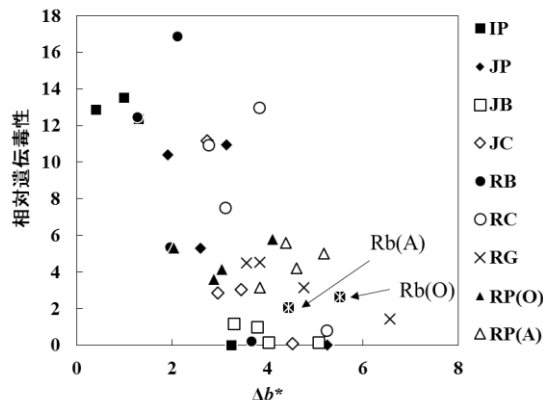


Fig. 4 加熱土壌の遺伝毒性強度と Δb^* 値との関係。

値 (黄、青の色彩の指標) は加熱温度の上昇、および、加熱時間の経過に伴い減少し、遺伝毒性強度と負の相関を示した (Fig. 4)。我々の以前の研究から、加熱土壌の色彩変化は有機成分の炭化の初期過程と強い関係を有することが分かっている [6]。従って、加熱土壌の遺伝毒性は炭化の進行に伴い増大していることに加え、火災跡地土壌の色彩は遺伝毒性の指標になることが明らかとなった。

(4) 加熱土壌中の PAHs、N-PAHs を GC/MS を用いて分析した。その結果、N-PAHs はほとんど検出されなかった。また、Nap、Acnyl、Acna は回収率が 20% 以下であったため解析に加えなかった。350 °C で 1 分、400 °C で 30 分加熱した土壌を分析した結果、総 PAHs 濃度は 8.4~489.4 ppb/g soil と土壌によって大きく異なることが分かった。また、Fluo、Phen、Anth、Fluant、Pyr、Bzaan、Chry の合計濃度は総 PAHs 濃度の 55~98% であり、加熱により主に 3、4 環からなる PAHs が生成していることが明らかとなった。各土壌の遺伝毒性強度と 3、4 環系 PAHs の濃度との関係性を評価した結果、正の相関関係がみられた (Fig. 5)。特に、350 °C で 1 分加熱した土壌に対して、400 °C で 30 分加熱した土壌のほうが、その関係性は明らかにみられた。また、ロシアで採取した火災跡地土壌の PAHs を分析したところ、室内で加熱した土壌と同様に 3、4 環系 PAHs が主に検出され、その濃度は火災による影響が強いと考えられる 0 層で高かった。これらの結果から、加熱土壌を菌体に直接暴露した際に発現する遺伝毒性は不完全燃焼によって生じた PAHs によるものであり、泥炭のような有機物質を多く含む土壌ほど火災後に土壌生物の DNA 損傷や染色体異常を誘発するリスクが高いということが分かった。

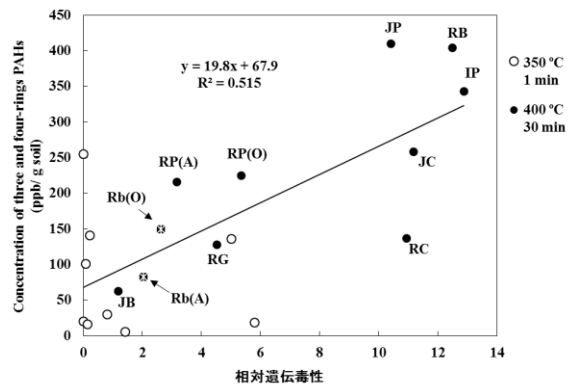


Fig. 5 加熱土壌の遺伝毒性強度と 3、4 環系 PAHs 濃度との関係。

(5) 本研究の結果から以下のことが明らかとなった。①加熱土壌を菌体に直接暴露した結果、350 °C 以上で加熱した土壌は強い遺伝毒性を発現する。②有機物質を多く含む土壌ほど加熱により高い遺伝毒性強度を示した。また、加熱によって生じる土壌の色彩変化は遺伝毒性発現の指標として利用可能であることが分かった。③加熱によって土壌から生

成する PAHs は 3、4 環からなるものが主であり、その濃度は遺伝毒性強度と関係していた。既存の報告では火災跡地の土壤に発生する PAHs を分析した研究は幾つか存在しているが、加熱土壤の遺伝毒性を評価した研究は国内外において少なかった。特に、土壤の遺伝毒性評価は有機溶媒によって抽出した成分に関する報告のみがなされていた。従って、加熱土壤を生体に直接暴露した際の遺伝毒性を評価した研究は本報告が初めてであり、生体毒性評価における重要な知見となると考えられる。また、森林火災頻発地であるインドネシア熱帯泥炭や極東ロシアの泥炭、森林土壤の特徴を分析し、火災による影響を比較した研究は少ないことから、本研究で得られたデータは土壤環境学の分野においても有益である。

本研究では PAHs と同様に N-PAHs の分析を試みたが、分析方法の感度が不十分であることから、検出することが出来なかった。本研究で用いた NM2009 株は N-PAHs に対して高い感受性を示すことが知られていることから、N-PAHs が遺伝毒性に寄与していると考えられる。従って今後は N-PAHs の分析方法を検討し、遺伝毒性への関係を明らかにする必要があると考えている。また、加熱土壤中の PAHs が菌体の DNA を損傷させる機構は十分に明らかになっていない。そのため、今後は加熱土壤における PAHs の動態の評価として、水や有機溶媒を用いた抽出を行い、抽出後の加熱土壤残渣を菌体に暴露した際に得られる遺伝毒性強度の違いを比較する必要があると考えている。

<引用文献>

1. Flannigan, M., Cantin, A. S., Groot, W. J., Wotton, M., Newbery, A., Gowman, L. M., Global wildland fire season severity in the 21st century, *Forest Ecology and Management*, 294, 2013, 54-61.
2. Vergnoux, A., Malleret, L., Asia, L., Doumenq, P., Theraulaz, F., Impact of forest fires on PAH level and distribution in soils, *Environmental Research*, 111, 2011, 193-198.
3. Kuramitz, H., Sazawa, K., Nanayama, Y., Hata, N., Taguchi, S., Sugawara, K., Fukushima, M., Electrochemical genotoxicity assay based on a SOS/*umu* test using hydrodynamic voltammetry in a droplet, *Sensors*, 12, 2012, 17414-17432.
4. Buco, S., Moragues, M., Doumenq, P., Noor, A., Mille, G., Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by curie point pyrolysis coupled to gas chromatography-mass spectrometry, an alternative to conventional methods, *Journal of Chromatography A*, 1026, 2004, 223-229.
5. Knicker, H., How does fire affect the nature and stability of soil organic nitrogen and carbon? A review, *Biogeochemistry*, 85, 2007, 91-118.
6. Sazawa, K., Wakimoto, T., Hata, N., Taguchi, S., Tanaka, S., Tafu, M., Kuramitz, H., The evaluation of forest fire severity and effect on soil organic matter based on the *L**, *a**, *b** color reading system, *Analytical Methods*, 5, 2013, 2660-2665.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Sazawa, K. and Kuramitz, H., Hydrodynamic voltammetry as a rapid and simple method for evaluating soil enzyme activities, *Sensors*, MDPI, 15, pp 5331-5343, 2015. DOI: 10.3390/s150305331 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

佐澤和人, 和田直也, 倉光英樹, 電気化学的遺伝毒性試験法を用いた加熱土壤の遺伝毒性評価と発現条件に関する研究, 日本生態学会中部地区会 2015年度大会, 2015年10月24日, 高山市民文化会館.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐澤 和人 (SAZAWA, Kazuto)
富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・
助教
研究者番号: 80727016

(2) 連携研究者

和田 直也 (WADA, Naoya)
富山大学・研究推進機構極東地域研究セ
ンター・教授
研究者番号: 40272893

倉光 英樹 (KURAMITZ, Hideki)
富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・
教授
研究者番号: 70397165