

報 文

天然ゼオライトによる臭化エチジウムの吸着処理

Adsorption Treatment of Ethidium Bromide with Natural Zeolite

永田 善明*

核酸染色色素である臭化エチジウムは変異原性が指摘されており、その廃液は厳格に処理されなければならない。臭化エチジウム廃液の処理は、活性炭または樹脂による吸着処理が推奨されているが、市販の吸着処理キットはいずれも高価である。そこで、安価な臭化エチジウム吸着材を探索する目的で、天然ゼオライト、合成ゼオライト、層状鉱物、無機吸着材について、吸着等温線により臭化エチジウム吸着性を評価した。その結果、天然ゼオライトが臭化エチジウム吸着処理材として有望であることを見いだした。特に島根県産モルデナイト、および島根県産クリノプチロライトが優れた吸着性を示した。合成ゼオライトは、純水中における吸着性が天然ゼオライトと同程度であっても緩衝液中では吸着性能が大幅に低下するなど、臭化エチジウム吸着材としては不適當であった。また天然ゼオライトを充填した臭化エチジウム吸着カラムによる模擬廃液の吸着処理試験を行い、カラムの吸着寿命を視覚的に判断できることがわかった。さらに、カラム通過後の廃液を Ames 試験に供し、変異原性がないことを確認した。

1. はじめに

臭化エチジウム (Ethidium Bromide, 以下 EtBr と称す) は、遺伝子実験において DNA, RNA 等の核酸染色に使用される色素である。EtBr は DNA 二重鎖間にインターカレートするが、これにより核酸の塩基間距離が引き延ばされるため、フレームシフト型突然変異を引き起こすことが知られている。従って、使用の際にはビニール手袋を着用し、廃液は厳格に処理するなど、人体への接触や環境中への漏出を避けるために注意を払う必要がある。

日本における EtBr 廃液の処理は、58% が次亜塩素酸ナトリウムによる酸化分解処理のみで排水処理施設に廃棄しているとの報告がある¹⁾。しかし、この方法では変異原性が完全には消失しないと指摘があり、活性炭、または樹脂による吸着処理が推奨されている²⁾。活性炭、吸着用樹脂をフィルターやカラムに加工した EtBr 廃液処理キットが市販されているが、いずれも高価である。活性炭を用いた処理キットの場合、黒色であるため吸着寿命が分からないという欠点があり、廃液処理量を記録して規定の処理量に達したら廃棄するという方法をとっている。またフィルター型ろ過吸着材の場合、規定の通水速度を越えた場合に EtBr の吸着漏れが生じる可能性があるため、通水速度の厳守が必要となる。このように、現在市販されている EtBr 廃液処理キットは、価格および使用の簡便さにおいて改良の余地があると言える。

我々は島根県産天然ゼオライトが EtBr 吸着性を持つこ

とを見だし、既に報告した³⁾。本報告では、天然ゼオライト、合成ゼオライト、層状鉱物、アルミナ等無機吸着材の EtBr 吸着性能を比較した。さらにゼオライト充填カラムによる EtBr 吸着処理試験を行うとともに、処理後の廃液の安全性を変異原性試験により確認したので報告する。

2. 方 法

2.1 試料

評価に供した試料は、天然ゼオライト 7 種、合成ゼオライト 12 種、層状鉱物 2 種、無機吸着材 4 種である。天然ゼオライトの名称、産地、結晶型、陽イオン交換容量 (Cation Exchange Capacity, 以下 CEC と称す) を表 1 に、合成ゼオライトの名称、結晶型、CEC を表 2 に、層状鉱物および無機吸着材の名称を表 3 に示す。なお、各ゼオライト試料の CEC は、野田による改良ショーレンベルジャー氏法⁴⁾により測定した。

2.1.1 EtBr 吸着試験用試料の調製

天然ゼオライトは、粒径 2-5mm の粗砕試料を遊星ボールミルを用いて湿式粉碎し、目開き 32 μ m のふるい通過分を水篩して平均粒径が 10-30 μ m となるよう分級した。分級したゼオライトは蒸留水で十分洗浄した後 110 $^{\circ}$ C で乾燥させ、試料とした。

合成ゼオライトは、交換性陽イオンが Na⁺ のものは入手時の状態で試料とした。交換性陽イオンが Na⁺ 以外のものは、重量比 100 倍量の 1N NaCl 水溶液に 80 $^{\circ}$ C -16 時間浸漬することにより、イオン交換して Na⁺ 型とした。その後、蒸留水で十分洗浄した後 110 $^{\circ}$ C で乾燥させ、試料とした。なお、合成ゼオライトは形状が粉末と粒状のものがあるが、

*環境技術グループ

表1 天然ゼオライト試料の性状

試料名	結晶型	産地	CEC (meq/100g)
島根県産 I	モルデナイト	島根県大田市仁摩町	140
島根県産 W	モルデナイト	島根県大田市五十猛町	127
宮城県産 N	モルデナイト	宮城県白石市	185
島根県産 O	クリノプチロライト (精製品)	島根県大田市五十猛町	206
北海道産 NK	クリノプチロライト	北海道余市郡仁木町	201
秋田県産 S	クリノプチロライト	秋田県能代市二ツ井町	182
島根県産 A	フェリエライト	島根県大田市朝山町	83

表2 合成ゼオライト試料の性状

試料名*	結晶型	形状	CEC (meq/100g)
HSZ320HOA	Y	粉末	120
HSZ330HUD1C	Y	粒状	126
HSZ350HUA	Y	粉末	127
HSZ360HUD1C	Y	粒状	124
HSZ640HOA	モルデナイト	粉末	111
HSZ640HOD1S	モルデナイト	粒状	69
HSZ690HOD1A	モルデナイト	粒状	50
HSZ720KOA	フェリエライト	粉末	135
HSZ830NHA	MFI	粉末	90
HSZ890HOD1C	MFI	粒状	8
A-4	A	粉末	388
F-9	X	粉末	312

*) 試料はいずれも東ソー製

今回の試験では粉砕や粒度調整は行わず、そのまま供試体とした。

層状鉱物および無機吸着材は、入手時の状態で試料とした。

2.1.2 EtBr 吸着カラム用天然ゼオライトの調製

天然ゼオライトは、粒径2-5mmの粗砕試料を遊星ボールミルを用いて湿式粉砕し、ふるいによる湿式分級で粒径45 μ m-250 μ mのものを回収した。また、粒度による通水速度試験用には、目開き45 μ m, 75 μ m, 150 μ m, 250 μ m, 500 μ mの各ふるいによる湿式分級を行った。分級したゼオライトは蒸留水で十分洗浄した後110 $^{\circ}$ Cで乾燥させ、試料とした。

2.2 EtBr 吸着試験

2.2.1 超純水中における EtBr 吸着試験

試験操作は、以下に示す方法で行った。

粉末試料の場合は、試験管に試料を0.05-0.3g秤量し、一定濃度のEtBr溶液を3mL添加後、5-10秒の超音波処理により試料を分散させた。次にボルテックスミキサーにより攪拌し、3000rpm-10分の遠心操作により固液分離を行い、上清を回収した。粒状試料の場合は、ふた付き試験管に粉末試料の場合と同様に試料を秤量し、一定濃度のEtBr溶液を3mL添加して密栓し、80 $^{\circ}$ C-72時間放置後、上清を回収した。

粉末試料、粒状試料とも、回収した上清は孔径0.2 μ mの

表3 層状鉱物および無機吸着材の性状

試料名	商品名等	製造者または販売者
セピオライト	ミルコン G-200	昭和 KDE
セリサイト	Z20	斐川 礦業
珪藻土		ナカライテスク
シリカゲル	ワコーゲル C-500HG	和光純薬
アルミナ	Catapal Alumina	Sasol North America Inc.
酸化チタン	ST-01	石原産業

酢酸セルロース製メンブレンフィルターでろ過後、分光光度計(日本分光製V-550)により285nmの吸光度を測定し、EtBr濃度を求めた。上清のEtBr濃度から、試料に吸着されたEtBr量と平衡濃度を算出し、吸着等温線を作成した。得られた吸着等温線はいずれもLangmuir型に近い形となったため、次の方法で吸着平衡定数および飽和吸着量を算出した。Langmuir式(1)を変形すると式(2)となり、C/Wに対してCをプロットすると、切片-1/a、傾きWsの一次式となる。

$$W = a W_s C / (1 + aC) \dots\dots (1)$$

$$C = W_s (C/W) - 1/a \dots\dots (2)$$

W:吸着量, Ws:飽和吸着量, a:吸着平衡定数, C:平衡濃度

そこで、得られた実験結果によるC/WとCの一次回帰式を最小二乗法を用いて求め、切片と傾きより吸着平衡定数および飽和吸着量を算出した。

2.2.2 緩衝液中における EtBr 吸着試験

緩衝液には、核酸電気泳動で使用されるTAE, TBEを用いた。TAEの組成は、40mM Tris-酢酸(pH8.3), 1mM EDTA, TBEの組成は、89mM Tris-ほう酸(pH8.3), 2mM EDTAである⁵⁾。緩衝液は、和光純薬製特級試薬を用いて調製した。これらの緩衝液を用いてEtBr溶液を作成し、2.2.1項と同様の方法で試験を行った。

2.2.3 統計処理

飽和吸着量の差の検定は、2.2.1項式(2)より「直線の傾きの差の検定」として行うことができる。従って、3.2項の超純水と緩衝液中における飽和吸着量の差は、文献⁶⁾に従い有意水準5%の両側t検定を行った。

2.3 ゼオライト充填カラムの試作と通水試験

ゼオライト充填カラムは、2.5mL ディスポーザブル注射

器を用いて作製した。カラムの模式図を図1-Aに示す。ディスポーザブル注射器はピストンを抜き、アルカリ性洗剤でシリコングリスを洗浄した後、底の部分にポリプロピレン製焼結フィルターを装着し、その上に目開き40 μ mのナイロンメッシュを設置してゼオライト試料を充填した。さらに上部をポリプロピレン製フィルターで閉じた。このカラムを図1-Bに示すように設置し、通水試験を行った。吸引用エアープンプにはイワキ製BA-330SN(吸引力550mmHg, 最大流量34L/min)を用い、吸引力の調整は行わなかった。模擬廃液は5 μ g/mL EtBr含有TAEとし、1試験につき1Lを通水した。また、1Lを通水するのに要した時間から通水速度を算出した。

2.4 Ames 試験

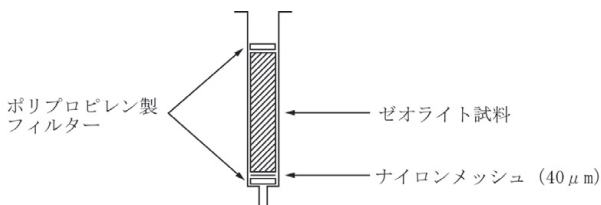
2.3項の通水試験後、カラム通過廃液の安全性を確認する目的で、Ames 試験による変異原性の確認を行った。Ames 試験の方法は、衛生試験法・注解⁷⁾に従った。試験用の *Salmonella typhimurium* 菌株はフレームシフト型変異検出用の TA98 (NBRC 14193) とし、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部より分譲を受けた。代謝活性化に要する S9 mix は、オリエンタル酵母製エームステスト用 S9/コファクター A セットを用いた。

3. 結 果

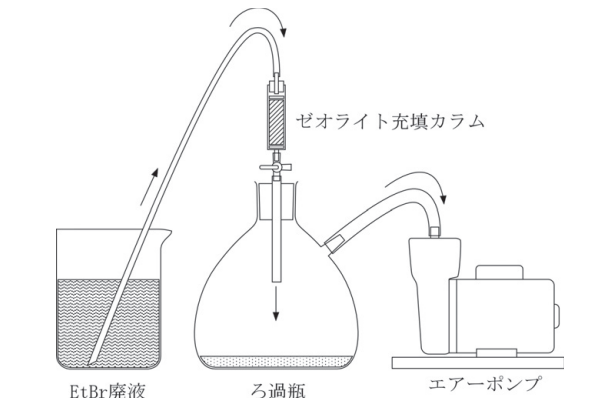
3.1 超純水中における EtBr 吸着性の評価

3.1.1 予備試験

各試料の EtBr 吸着性を評価するに当たり、EtBr の吸着量が非常に少なく吸着材に適さないものを、予備試験により除外した。予備試験の方法は、2.2.1 項に示す方法とほぼ



A ゼオライト充填カラムの模式図



B ゼオライト充填カラムによる EtBr 吸着処理試験の模式図

図1 ゼオライト充填カラムによる通水試験の概略

同様であるが、試料は0.1-0.3gの間で約0.05g間隔で秤量し、濃度5 μ g/mLのEtBr溶液を添加して、試料重量依存的なEtBr濃度の減少が見られるか確認した。図2に合成ゼオライトA-4、合成ゼオライトF-9、珪藻土、アルミナ、酸化チタンの各試験結果を示す。これら5試料は、試料重量の増加に依存したEtBr濃度の低下が見られなかったことからEtBrを吸着しないと判断し、以降の試験から除外した。

3.1.2 天然ゼオライトの EtBr 吸着性の評価

図3に天然モルデナイトのEtBr吸着等温線を、図4に天然クリノプチロライトのEtBr吸着等温線を、図5に天然フェリエライトのEtBr吸着等温線をそれぞれ示す。表4に図3-5から求めた飽和吸着量および吸着平衡定数を示す。天然モルデナイトでは、島根県産Iが飽和吸着量21.2mg/g、吸着平衡定数6.33L/mgと最も吸着性に優れ、次に宮城県産N、島根県産Wの順であった。天然クリノプチロライトでは、島根県産Oが飽和吸着量21.1mg/g、吸着平衡定数3.06L/mg、北海道産NKが飽和吸着量19.7mg/g、吸着平衡定数3.34L/mgではほぼ同等、ついで秋田県産Sであった。天然フェリエライト島根県産Aは、飽和吸着量、吸着平衡定数ともに低い値であった。

3.1.3 合成ゼオライトの EtBr 吸着性の評価

図6にY型合成ゼオライトのEtBr吸着等温線を、図7にモルデナイト型合成ゼオライトのEtBr吸着等温線を、図8にフェリエライト型およびMFI型合成ゼオライトのEtBr吸着等温線をそれぞれ示す。表5に図6-8から求めた飽和吸着量および吸着平衡定数を示す。

Y型合成ゼオライトでは、HSZ360HUD1Cが飽和吸着量19.1mg/gと天然ゼオライトの上位性能試料とほぼ同じ値であり、また吸着平衡定数は2.24L/mgで、合成ゼオライトの中では最も吸着性に優れていた。また、Y型合成ゼオライトの場合、型番が大きいくほど飽和吸着量、吸着平衡定数が大きくなる傾向が見られた。粉末、粒状という異なる形状の試料を比較することは適切ではないが、Y型合成ゼオライトは型番が大きくなるほどSiO₂/Al₂O₃比が大きくなることから、Y型ゼオライトによるEtBrの吸着は疎水

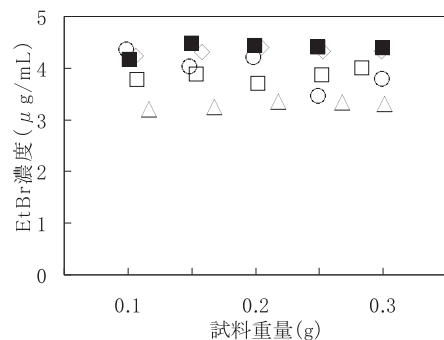


図2 EtBrを吸着しない試料の予備試験結果
□:合成ゼオライトA-4, ◇:合成ゼオライトF-9,
△:珪藻土, ■:アルミナ, ○:酸化チタン。

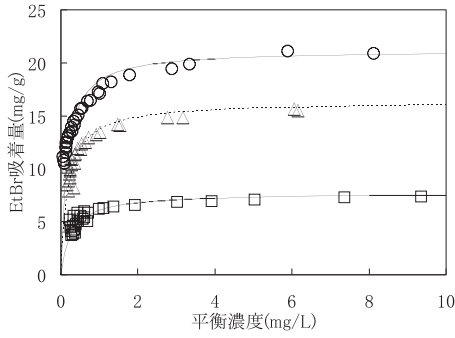


図3 天然モルデナイトの超純水中における EtBr 吸着等温線 ○:島根県産 I, △:宮城県産 N, □:島根県産 W

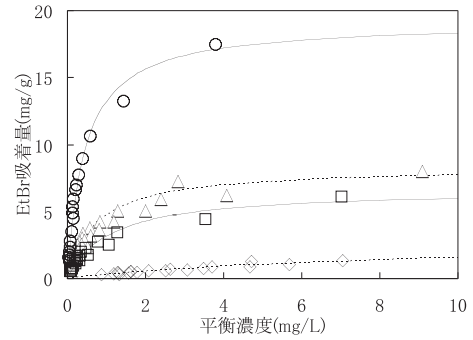


図6 Y型合成ゼオライトの超純水中における EtBr 吸着等温線 ○:HSZ360HUD1C, △:HSZ350HUA, □:HSZ330HUD1C, ◇:HSZ320HOA.

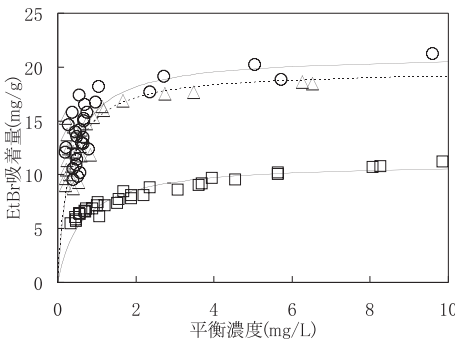


図4 天然クリノプチロライトの超純水中における EtBr 吸着等温線 ○:島根県産 O, △:北海道産 NK, □:秋田県産 S.

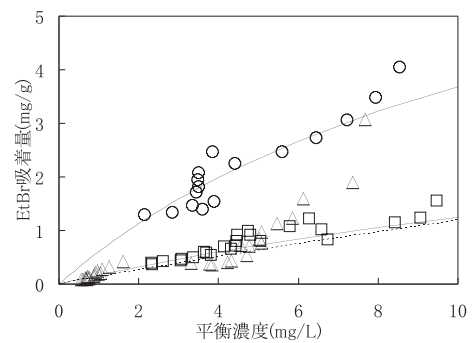


図7 モルデナイト型合成ゼオライトの超純水中における EtBr 吸着等温線 ○:HSZ640HOA, △:HSZ690HOD1A, □:HSZ640HOD1S.

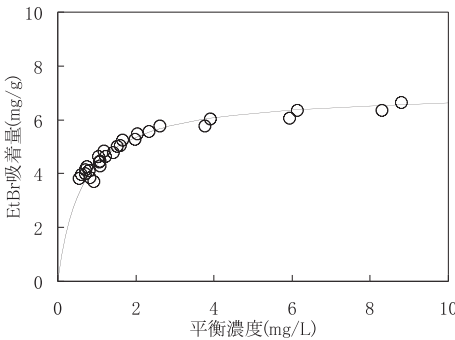


図5 天然フェリエライト島根県産 A の超純水中における EtBr 吸着等温線

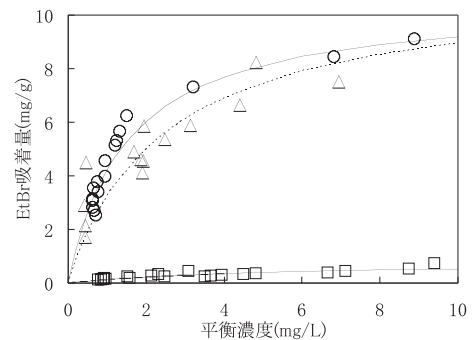


図8 フェリエライト型, MFI型合成ゼオライトの超純水中における EtBr 吸着等温線 ○:HSZ720KOA, △:HSZ830NHA, □:HSZ890HOD1C.

表4 天然ゼオライトの EtBr 飽和吸着量および吸着平衡定数

試料名	飽和吸着量 (mg/g)	吸着平衡定数 (L/mg)
島根県産 I	21.2	6.33
島根県産 W	7.7	3.71
宮城県産 N	16.3	5.30
島根県産 O	21.1	3.06
北海道産 NK	19.7	3.34
秋田県産 S	11.2	1.65
島根県産 A	7.0	1.59

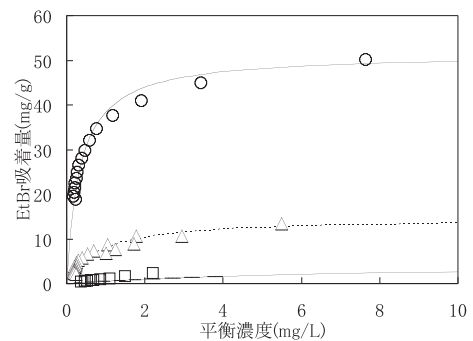


図9 セピオライト, セリサイト, シリカゲルの超純水中における EtBr 吸着等温線 ○:セピオライト, △:セリサイト, □:シリカゲル

表5 合成ゼオライトのEtBr 飽和吸着量および吸着平衡定数

試料名	飽和吸着量 (mg/g)	吸着平衡定数 (L/mg)
HSZ320HOA	3.0	0.11
HSZ330HUD1C	6.6	0.92
HSZ350HUA	8.3	1.32
HSZ360HUD1C	19.1	2.24
HSZ640HOA	8.5	0.08
HSZ640HOD1S	10.3	0.01
HSZ690HOD1A	4.5	0.04
HSZ720KOA	10.6	0.66
HSZ830NHA	11.2	0.40
HSZ890HOD1C	0.8	0.19

表6 層状鉱物,無機吸着材のEtBr 飽和吸着量および吸着平衡定数

試料名	飽和吸着量 (mg/g)	吸着平衡定数 (L/mg)
セピオライト	51.5	2.93
セリサイト	14.7	1.18
シリカゲル	4.8	0.13

的相互作用による可能性がある。

合成モルデナイトの吸着等温線は、いずれの試料も図7に示されるように傾きの小さいほぼ直線であり、表5の吸着平衡定数の値からもEtBr 選択性が低いと言える。Langmuir 式(1)より、吸着等温線は希薄溶液(平衡濃度Cが小さい値をとる時)においてaWsを傾きとする直線に近くなる。従って、Wsがほぼ同じである試料を比較する場合、吸着平衡定数aの値が大きい吸着材ほど希薄溶液におけるEtBr 吸着能力が高いことがわかる。逆に、吸着平衡定数が小さい場合、飽和吸着量が十分に大きくなれば低濃度EtBr 溶液の処理においてEtBr が吸着されずに残存する可能性を示唆している。

合成モルデナイトの形状によるEtBr 吸着性について検討すると、粉末のHSZ640HOAに比較して粒状のHSZ640HOD1Sでは吸着平衡定数が大幅に小さくなった。今回の試験では、合成ゼオライトは市販品をそのまま使用することを想定し、敢えて粉碎・分級をせずに試験に供したが、同じ型番であるにもかかわらず形状の違いによって吸着性に差が出たことは、粒状の場合、80℃-72時間ではEtBr 吸着平衡に達していない可能性を示している。またこのことは、Y型のHSZ360HUD1Cを粉末にした場合には本試験の結果以上の吸着性を示す可能性を示唆している。

合成フェリエライト、MFI型合成ゼオライトは、飽和吸着量の大きなものでも10mg/g程度であり、また吸着平衡定数はいずれも天然ゼオライトに及ばなかった。

3.1.4 ゼオライト以外の試料のEtBr 吸着性の評価

図9にセピオライト、セリサイト、シリカゲルのEtBr 吸着等温線を、表6に図9から求めた飽和吸着量および吸着平衡定数を示す。セピオライトが全試料中最も飽和吸着量が大きく、51.5mg/gに達した。また吸着平衡定数は2.93L/mgであり、島根県産Oに匹敵する選択性を示した。セリサイトは飽和吸着量14.7mg/gで天然ゼオライトに匹敵する吸着量を示したが、吸着平衡定数は1.18L/mgと、天然ゼオライトよりも選択性が低かった。シリカゲルは飽和吸着量、吸着平衡定数ともに小さく、EtBr 吸着材としての性能は低かった。

3.2 緩衝液中におけるゼオライトのEtBr 吸着性

EtBr 廃液として最も多いと考えられるのが、核酸電気泳動に用いられるEtBr 含有TAE緩衝液、またはTBE緩衝液である。そこで、これら緩衝液における天然ゼオライトのEtBr 吸着性を評価した。図10-16に各天然ゼオライト試料のTAE、TBEにおけるEtBr 吸着等温線を、表7に図10-16より求めた飽和吸着量および吸着平衡定数を示す。なお、飽和吸着量については超純水とTAE、またはTBEの差の検定を行い、p値を併記した。

天然モルデナイトでは、島根県産Iおよび宮城県産Nは、超純水とTAEにおける飽和吸着量の差に統計的な有意差はなく、TAEによる飽和吸着量への影響は小さいと判断された。超純水とTBEの間では飽和吸着量の統計的な有意差が観測されたが、島根県産Iの場合は5.2%の上昇、宮城県産Nの場合は3.1%の減少と、その差はわずかであった。島根県産Wの飽和吸着量は、TAE、TBEともに11.7%の減少となった。飽和吸着量の減少は、EtBr 吸着サイトに緩衝液の成分が吸着したためEtBr が吸着できなくなったことを表しているが、TAE中における飽和吸着量はWのみが減少しているため、WにはI、Nとは異なるEtBr 吸着成分があるものと考えられる。緩衝液中における吸着平衡定数は、全ての天然モルデナイト試料において小さくなり、EtBr 選択性が低下したことが示された。吸着平衡定数が小さくなる理由は、EtBr 吸着サイトに対して緩衝液の成分が競合するためと考えられる。

天然クリノプロチロライトでは、緩衝液中における飽和吸着量は、超純水中と比較して全ての試料において有意に小さくなった。飽和吸着量の減少率は、島根県産Oの場合TAE 11.8%、TBE 11.4%、北海道産NKの場合TAE 4.1%、TBE 4.6%、秋田県産Sの場合TAE 35.7%、TBE 38.4%であり、秋田県産Sの減少率が大きいことが分かった。

緩衝液中における吸着平衡定数は、秋田県産SのTBE中における値を除いて小さくなり、モルデナイト同様EtBr 選択性が低下したことが示された。秋田県産SにおいてTBE中の吸着平衡定数が上昇している理由は不明であるが、図15に示されるようにTAE、TBE中におけるEtBr 吸着等温線はほぼ重なっていることから、その影響はわずかと考えられる。

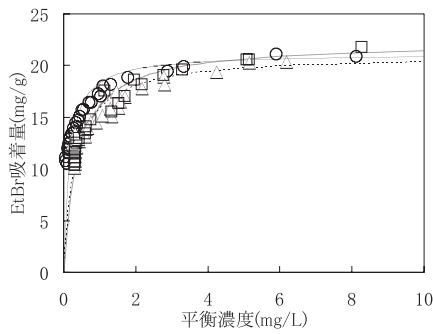


図10 島根県産Iの超純水, TAE, TBE中における吸着等温線 ○:超純水, △:TAE, □:TBE.

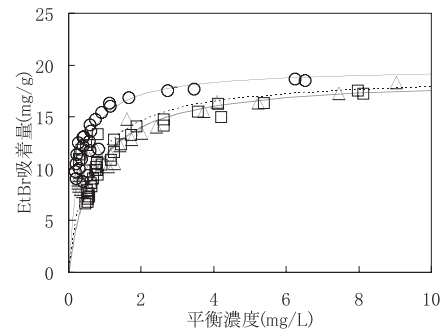


図14 北海道産NKの超純水, TAE, TBE中における吸着等温線 ○:超純水, △:TAE, □:TBE.

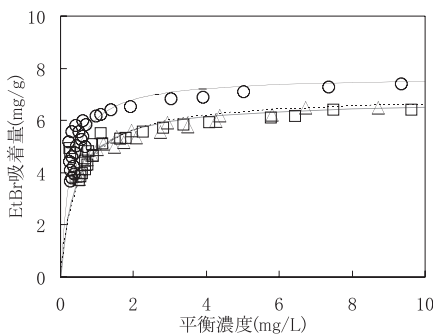


図11 島根県産Wの超純水, TAE, TBE中における吸着等温線 ○:超純水, △:TAE, □:TBE.

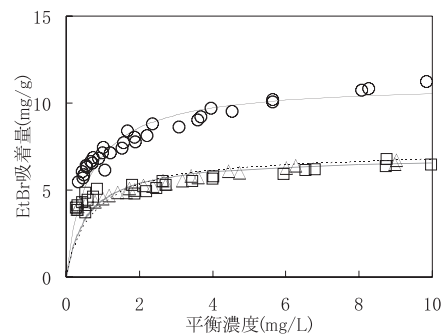


図15 秋田県産Sの超純水, TAE, TBE中における吸着等温線 ○:超純水, △:TAE, □:TBE.

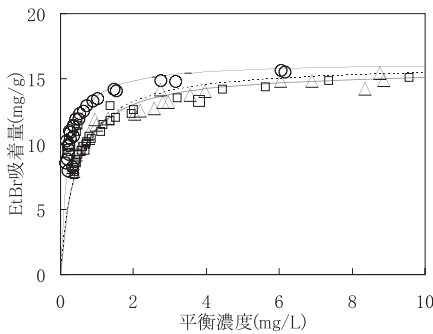


図12 宮城県産Nの超純水, TAE, TBE中における吸着等温線 ○:超純水, △:TAE, □:TBE.

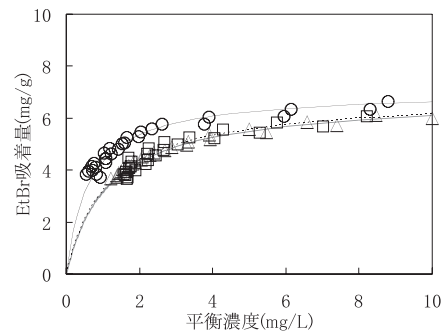


図16 島根県産Aの超純水, TAE, TBE中における吸着等温線 ○:超純水, △:TAE, □:TBE.

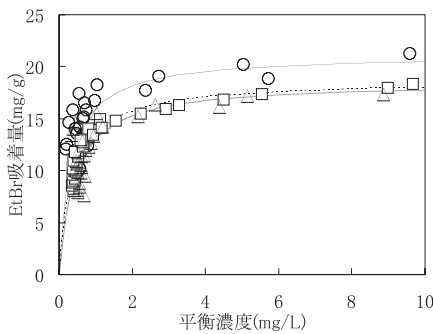


図13 島根県産Oの超純水, TAE, TBE中における吸着等温線 ○:超純水, △:TAE, □:TBE.

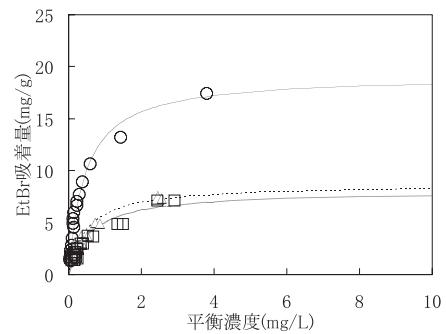


図17 HSZ360HUD1Cの超純水, TAE, TBE中における吸着等温線 ○:超純水, △:TAE, □:TBE.

表7 TAE, TBE 中における天然ゼオライトの EtBr 飽和吸着量および吸着平衡定数

試料名	飽和吸着量 (mg/g)			吸着平衡定数 (L/mg)		
	超純水	TAE	TBE	超純水	TAE	TBE
島根県産 I	21.2	21.0 (p=0.383)	22.3 (p=0.000*)	6.33	3.04	2.56
島根県産 W	7.7	6.9 (p=0.000*)	6.8 (p=0.000*)	3.71	2.15	2.50
宮城県産 N	16.3	16.2 (p=0.479)	15.7 (p=0.001*)	5.30	2.24	2.41
島根県産 O	21.1	18.7 (p=0.000*)	18.6 (p=0.000*)	3.06	2.63	2.31
北海道産 NK	19.7	18.9 (p=0.023*)	18.8 (p=0.008*)	3.34	1.69	1.45
秋田県産 S	11.2	7.2 (p=0.000*)	6.9 (p=0.000*)	1.65	1.38	1.74
島根県産 A	7.0	6.8 (p=0.017*)	6.8 (p=0.017*)	1.59	0.88	0.85

*) p<0.05

表8 TAE, TBE 中における HSZ360HUD1C の EtBr 飽和吸着量および吸着平衡定数

超純水	飽和吸着量 (mg/g)		吸着平衡定数 (L/mg)		
	TAE	TBE	超純水	TAE	TBE
19.1	8.6 (p=0.000*)	8.1 (p=0.000*)	2.24	1.99	1.66

*) p<0.05

フェリエライト島根県産 A は、緩衝液中の飽和吸着量は TAE, TBE ともに 2.9% の減少であり、吸着平衡定数も小さくなった。

合成ゼオライトでは、最も吸着性に優れる HSZ360HUD1C について評価した。図 17 に HSZ360HUD1C の TAE および TBE における EtBr 吸着等温線を、表 8 に図 17 より求めた飽和吸着量および吸着平衡定数を示す。超純水と比較した場合の飽和吸着量の減少率は TAE 55.0%, TBE 57.6% と大幅に小さくなり、また吸着平衡定数も小さくなった。このことから HSZ360HUD1C は実用には適さないと判断した。

以上より、実廃水に対して最も吸着性に優れるのは、島根県産 I であることが示された。

3.3 天然ゼオライトによる EtBr 吸着処理用カラムの試作

3.3.1 ゼオライト充填カラムの試作

EtBr 廃液の処理法として、ゼオライト充填カラムに廃液を通水して EtBr を吸着除去する方法を想定し、島根県産 O および島根県産 A を除く天然ゼオライト 5 種について、粒径 45 μ m-250 μ m のゼオライトを充填した EtBr 除去カラムを試作した。このカラムに廃液として 5 μ g/mL EtBr を含有する TAE 緩衝液 1L を通液し、EtBr のゼオライトへの吸着状態を確認するとともに、処理にかかる時間を測定した。なお、島根県産 O は、今回用いた試料が粉末精製品であることからカラムに充填した際の通水抵抗が大きかったため、また島根県産 A は天然ゼオライト中最も吸着性が低かったため、評価を行わなかった。図 18 に廃液通水後のカラムを、表 9 に 1L の廃液を処理するのに要した平均時間を示す。試験には 1 試料につき 3 本のカラムを用いた。着色がカラム中間に留まったものは島根県産 I と宮城県産 N であった。他の 3 試料については一部のカ

ラムにおいて着色が下端に達しているものがあり、EtBr がカラム外へ流出している可能性が示唆された。

3.3.2 ゼオライト粒子径と通水速度の関係

表 9 より、粒径 45 μ m-250 μ m のゼオライトでは 1L の通水に 1 時間程度かかることがわかる。これは微細な粒子による目詰まりのためと考えられる。そこで、廃液処理に要する時間とゼオライト粒径の関係を知る目的で、島根県産 I を粒径ごとに分級してカラムに充填し、1L の廃液処理に要する時間を測定した。図 19 に廃液通水後のカラムを、表 10 に通水速度とゼオライト粒径の関係を示す。1L の廃液処理時間を 10 分未満に設定した場合、100mL/min 以上の通水速度が必要となるので、表 10 の結果から粒径 75-150 μ m 以上のゼオライト充填カラムとすればよいことが分かる。しかし、図 19 より 150-250 μ m の粒径では EtBr による着色がカラム下端に達しており、図には示さなかったが、250-500 μ m, 500-1000 μ m も同様であった。以上のことから、カラム式 EtBr 廃液処理において EtBr の十分な除去と処理時間を両立する最も適した粒径は、75-150 μ m であることが示された。

3.4 Ames 試験によるゼオライト充填カラムによる EtBr 吸着処理の安全性評価

3.3 項による吸着処理後の廃液について、Ames 試験による変異原性の有無を確認した。

3.4.1 予備試験

予備試験により、Ames 試験における EtBr の変異原性出現濃度を確認した。図 20 に EtBr 濃度と *Salmonella typhimurium* 菌コロニー数の関係を示す。グラフでコロニー数が一端上昇した後に減少するのは、EtBr の変異原性よりも毒性が勝る濃度領域であることを示している。試験の結果、EtBr 濃度 25ng/mL においてコロニー数 35 となり、ポジテ

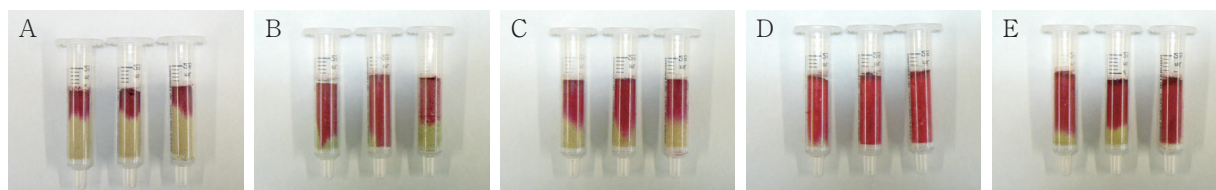


図18 EtBr-TAE廃液通液後の天然ゼオライト充填カラムの着色状況
A:島根県産I, B:島根県産W, C:宮城県産N, D:北海道産NK, E:秋田県産S.

表9 ゼオライト充填カラムによる廃液1Lの処理に要した時間

試料名	島根県産I	島根県産W	宮城県産N	北海道産NK	秋田県産S
時間(分)*	68.1	64.3	50.2	72.5	83.0

*)3本のカラムの平均値

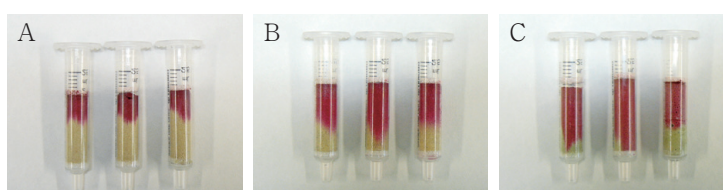


図19 粒径を選別した島根県産I充填カラムによるEtBrの吸着状況
A:45-75 μm, B:75-150 μm, C:150-250 μm

表10 ゼオライトの粒径と通水速度の関係

粒径(μm)	45-75	75-150	150-250	250-500	500-1000	カラムのみ
通水速度(mL/分)*	42	110	365	722	958	1174

*)3本のカラムの平均値

イブコントロールであるAF-2(2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide)よりも低濃度でEtBrによる変異原性が確認された。このことから、Ames試験によるEtBrの検出は25ng/mL以上であれば可能であることが示された。

3.4.2 ゼオライトカラム通過廃液のAmes試験

3.4.1項の結果を基に、3.3項のゼオライトカラム通過廃液のAmes試験を行った。検液量は、試験に用いることのできる最大量の100μLとした。表11に3.3.1項のカラム通過後の廃液によるコロニー数を示す。コロニー数はカラム3本の検液の平均値で示した。なお、市販のEtBr吸着処理キットである「Extractor(Whatman社製)」についても、プロトコールに従って廃液を10Lろ過し、処理液について同様に試験を行った。その結果、いずれの試料からも変異原性は確認されなかった。

表12に、3.3.2項のカラム通過後の廃液によるコロニー数を示す。ゼオライトの着色がカラム内部に留まっている45-75μmおよび75-150μmのカラムにおいては、変異原性は確認されなかった。一方、着色がカラム下端に達した150-250μm粒子径のゼオライト充填カラムは、通過廃液に変異原性が確認され、EtBrが十分除去されていないことが示された。以上のことから、カラムの着色によりカラム通過廃液の安全性や、カラムの吸着寿命を確認できるこ

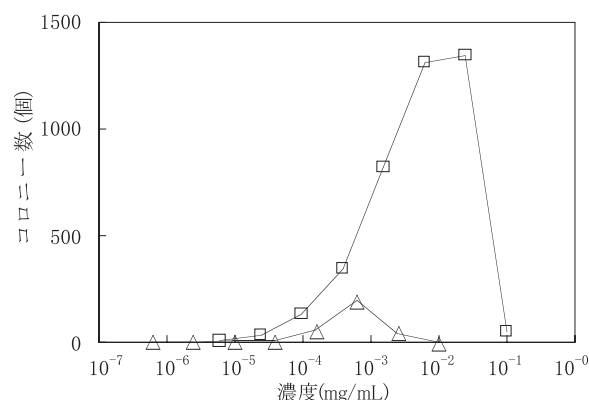


図20 Ames試験によるEtBr変異原性の確認
□:EtBr + S9mix, △:AF-2(positive control).

とが示された。

4. 考 察

4.1 ゼオライトのEtBr吸着性

今回、吸着等温線を用いて天然ゼオライト7種、合成ゼオライト12種、層状鉱物2種、無機吸着材4種についてEtBr吸着性を評価した。その結果、天然ゼオライトが高い吸着性を持つことが示された。天然ゼオライトの結晶型別では、モルデナイトは島根県産Iが最も吸着性に優れ、

表 11 Ames 試験によるコロニー数 (ゼオライト試料ごと)

試料	I	W	N	NK	S	Extractor	原液	TAE
コロニー数	25	19	23	20	19	26	76	19
変異原性*	なし	なし	なし	なし	なし	なし	あり	(溶媒)

*) 変異原性の判定基準は、コロニー数が溶媒のみの場合の2倍以上。

表 12 Ames 試験によるコロニー数 (島根県産 I・粒度ごと)

試料	45-75 μ m	75-150 μ m	150-250 μ m	TAE
コロニー数	8	9	112	9
変異原性*	なし	なし	あり	(溶媒)

*) 変異原性の判定基準は、コロニー数が溶媒のみの場合の2倍以上。

ついで宮城県産 N, 島根県産 W, クリノプチロライトは島根県産 O と北海道産 NK がほぼ同等, ついで秋田県産 S であった。島根県産フェリエライト A は, モルデナイト, クリノプチロライトに比較して飽和吸着量, 吸着平衡定数ともに小さかった。

合成ゼオライトは, 超純水中における EtBr 吸着試験の結果, HSZ360HUD1C を除いて EtBr 吸着性に乏しく, 特に吸着平衡定数が小さいことが明らかとなった。また, HSZ360HUD1C についても緩衝液中での性能低下が顕著であることから, 合成ゼオライトは EtBr 吸着材には適さないことが示された。

ゼオライトの EtBr 吸着機構について考察すると, EtBr は分子内に正電荷を持っており, この正電荷がゼオライトの陽イオン交換サイトと相互作用する可能性がある。しかし, 表 1 に示した天然ゼオライトの CEC と表 4 に示した飽和吸着量および吸着平衡定数に相関が見られないこと, CEC の大きい A-4, F-9 が EtBr を吸着しないことから, EtBr 吸着への CEC の寄与は小さいと考えられる。

次に, 結晶型の関与を考える。天然モルデナイトと合成モルデナイトを比較すると, 合成モルデナイトの吸着平衡定数はいずれの試料においても非常に小さい。このことは, モルデナイトは本来 EtBr 選択性が低いことを示しており, 天然モルデナイトの EtBr 選択性が高い理由は, モルデナイトが EtBr の主たる吸着材ではなく, むしろ天然モルデナイトの随伴鉱物が EtBr 吸着に寄与している可能性を示唆している。このことは, 最も EtBr 吸着性に優れる島根県産 I の純度が CEC 換算で 62.8% であるのに対し, それよりも EtBr 吸着性に劣る宮城県産 N の純度が 83.0% であることから言える。EtBr を吸着している物質の候補としては, 3.1.4 項に示したように, セピオライトやセリサイトが EtBr を良く吸着し, またデータは示さないが, モンモリロナイトも EtBr 飽和吸着量約 340mg/g と吸着性に優れていることから, ゼオライトに随伴する層状鉱物が考えられる。天然モルデナイトの場合, 粘土鉱物や石英, 長石を含むことが指摘されており⁸⁾, 島根県産 I に含まれる粘土鉱物がモンモリロナイトだとすれば, 6% 程度の含

有量で島根県産 I の EtBr 飽和吸着量と一致する。

クリノプチロライトの場合, EtBr 飽和吸着量および吸着平衡定数は, CEC の順位とほぼ一致している。特に島根県産 O は, CEC から見積もられる純度が 96.7% と高純度であることから, クリノプチロライトそのものが EtBr を吸着していると考えられる。しかし, EtBr 分子の大きさが 0.9nm 程度であることからクリノプチロライトの細孔内には入らない, あるいは入ったとしても分子の一部のみと考えられ, 大部分は表面吸着によるものと考えられる。

4.2 セピオライトの EtBr 吸着性

今回の試験では, セピオライトが最も飽和吸着量の値が大きかった。粘土鉱物が層間に色素や有機化合物をインターカレートすることはよく知られており⁹⁾, セピオライト, モンモリロナイトともに EtBr を吸着することから, EtBr もこれらの鉱物の層間にインターカレートされるものと考えられる。セピオライトは粉末の他に造粒品, 繊維状のものが市販されており, それらを加工することで EtBr 吸着材として十分使用可能と考えられる。

4.3 ゼオライト充填カラムによる EtBr 吸着処理

市販の活性炭による EtBr 吸着キットは, 「ティーバッグ型」「カラム型」「フィルター型」がある。そこで本試験では, 吸着処理に要する時間が短く, かつ試作が容易な天然ゼオライト充填カラムによる EtBr 廃液処理試験を行った。カラム式の場合, ゼオライトが白色系であるため図 18, 19 に示されるように EtBr の吸着状況が容易に確認でき, 処理量の記録が必要な活性炭よりも利点がある。また, 処理済み廃液の Ames 試験により, EtBr による着色がカラム内部にとどまっている場合は通過廃液に変異原性はなく, カラム下端まで着色した場合は変異原性が現れることから, ゼオライトの着色がインジケータとして有効であることが示された。なお, 北海道産 NK 充填カラムでは, 3.3.1 項において EtBr の着色が全てのカラムで下端に達していたが, 変異原性は確認されなかった。しかし, これは EtBr の流出直前の状態と考えられ, 着色がカラム下端に達する前にカラムを交換することが望まれる。

EtBr 廃液は, ほとんどが核酸電気泳動に使用される

0.5µg/mL EtBr 含有 TAE 緩衝液である。そこで、この廃液を 10L 処理した場合の市販キットによるコストを比較すると、Q-BIOgene 社製「EtBr Green Bag kit」（活性炭ティーバッグ型）が 200 円、Whatman 社製「Extractor」（活性炭フィルター型）が 3500 円、Elechrom Scientific 社製「Bind-ET」（樹脂カラム・タンク一体型）が 475 円と、いずれも高価である。天然ゼオライトは原料が安価であることに加え、前述のように EtBr 吸着を目視確認できる利点があることから、市販キットに対しても十分競争力のある製品になると考えられる。

4.4 島根県産天然ゼオライト充填カラムの注意点

島根県産 I は、今回評価したゼオライト中最も EtBr 吸着性に優れていた。しかし、これをカラムに充填して使用する際には留意すべき点がある。島根県産 I はやや軟質であり、攪拌によって崩壊し微細な粒子を生成する。従って、目開きの小さいフィルターをカラムに使用すると、微粒子による目詰まりのため通水速度の低下が起こる。今回の試験では、これを避けるために目開き 40µm のナイロンメッシュを使用し、微粒子が通過するようにした。島根県産 W は硬質であるため、吸着性は島根県産 I に劣るが目詰まりの心配は少ない。ただし、図 18 に示されるように、1L の廃液処理後のカラムは一部下端まで EtBr による着色が見られた。このため、Ames 試験結果では処理水に変異原性は認められないものの、安全性を見込んでゼオライト充填量を増やす必要がある。

5. ま と め

(1)天然ゼオライト 7 種、合成ゼオライト 12 種、層状鉱物 2 種、無機吸着材 4 種について、吸着等温線により EtBr 吸着性を評価した。その結果、島根県産モルデナイト、島根県産クリノプチロライトを筆頭に、天然ゼオライトが優れた EtBr 吸着性を持つことを明らかにした。

(2)天然ゼオライトを充填した EtBr 吸着処理用カラムを試作し、EtBr 廃液を通液してゼオライトの着色によりカラム寿命が判定できることを示した。

(3)カラムを通過した EtBr 廃液を Ames 試験に供し、変異原性がないことを確認した。

以上により、島根県産天然モルデナイト、または島根県産天然クリノプチロライトを EtBr 廃液の吸着処理に用いることを提案する。

本研究は、平成 19 年度シーズ発掘試験「イオン交換性鉱物を用いた 1step プラスミド精製法の開発」による研究成果の一部である。本研究を支援していただいた、独立行政法人科学技術振興機構に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 大峠和彦, 宮西節子. 遺伝子・染色体検査後の廃棄物処理に関するアンケート調査. 医学検査. 2002, vol.51, no.6, p.928-931.
- 2) 堤寛. 医療廃棄物の適正処理マニュアル — 感染性廃棄物を中心に — 8. 医療機関等における医療廃棄物処理例 c. 病理部門. 臨床病理レビュー, 2005, vol.133, p.66-73.
- 3) 永田善明, 田島政弘, 塩村隆信. 天然ゼオライトによる変異原性核酸染色試薬の吸着. 島根県産業技術センター研究報告. 2006, vol.42, p.29-30.
- 4) 野田修司. 天然ゼオライトの簡易塩基交換容量測定法. 粘土科学. 1980, vol.20, p.78-82.
- 5) 菅野純夫, 菅野(水島)純子. “DNA の解析 — ゲル電気泳動 —”. バイオマニュアルシリーズ 1 遺伝子工学の基礎技術, 山本雅 編, 羊土社, 1993, p.103-130.
- 6) 富田豊, 内山孝憲. エクセルを使ったバイオメカニズムのための統計学. バイオメカニズム学会誌. 2004, vol.28, no.4, p.221-225.
- 7) 矢野一好. “変異原性試験法”. 衛生試験法・注解, 日本薬学会 編, 金原出版株式会社, 2000, p.133-141.
- 8) 大森保幸, 野田修司, 川谷芳弘, 板倉雅之, 赤木和夫. 天然ゼオライトの基礎的性質に関する 2,3 の考察. 島根県立工業技術センター研究報告. 1980, vol.17, p.84-88.
- 9) 福嶋喜章, 小菅勝典. “新規材料と粘土鉱物”. 粘土科学への招待, 須藤談話会 編, 三共出版株式会社, 2000, p.205-221.