機物に感受性を示す TA98、及び塩基対置換型の突然変異を引き起こす有機物に感受性を示す TA100 菌の S9mix による代謝活性時で、ブランクに比較して revertants が高い傾向を示した。しかし、代謝活性時の復帰コロニー数が自然復帰コロニー数の 2 倍以下であるため、0〜0.1mg の範囲では変異原性は認められないと判断される。Microcystin-RR のオゾン分解生成物も同様に変異原性は認められなかった。

2.3.3 急性毒性

Microcystin-LR、-RR 及びそれらのブランクのオゾン処理を行った分解物について、マウスを用いた毒性試験を行った結果、すべての試料の LD_{50} が 5.0mg/kg（腹腔内投与）以上であり、毒性は認められなかった。

2.4 まとめ

Microcystin のオゾン処理による分解と分解生成物の毒性について検討した結果、以下の結果が得られた。

1）Microcystin-LR（1mg/L）を溶存オゾン初期濃度 0.51mg/L で処理したところ、1 分で容易に分解することが判明した。Microcystin-RR も同様な結果であった。

2）オゾン処理分解生成物の 1 つとして、microcystin の構成アミノ酸の一つである Adda 由来の mmpb を 0.8〜1.2 μ g/L の範囲で検出した。

3）オゾン処理による microcysti-LR の分解生成物の変異原性は、TA98(+S9)、TA100(+S9) でブランクに比較して revertants が高い傾向を示した程度で、0〜0.1mg の範囲では変異原性は示さなかった。

4）オゾン処理による microcystin-LR、-RR の分解生成物について、マウスを用いた毒性試験を行った結果、すべての試料の LD_{50} が 5.0mg/kg（腹腔内投与）以上であり、毒性は認められなかった。

2.5 参考文献

1) Kado, N., Manson, C., Eisenstadt, E., and Heieh, D. P. H.:The kinetics of mutagen excretion in the urine of cigarette smokers. Mut. Res., 157, 227-233(1985)

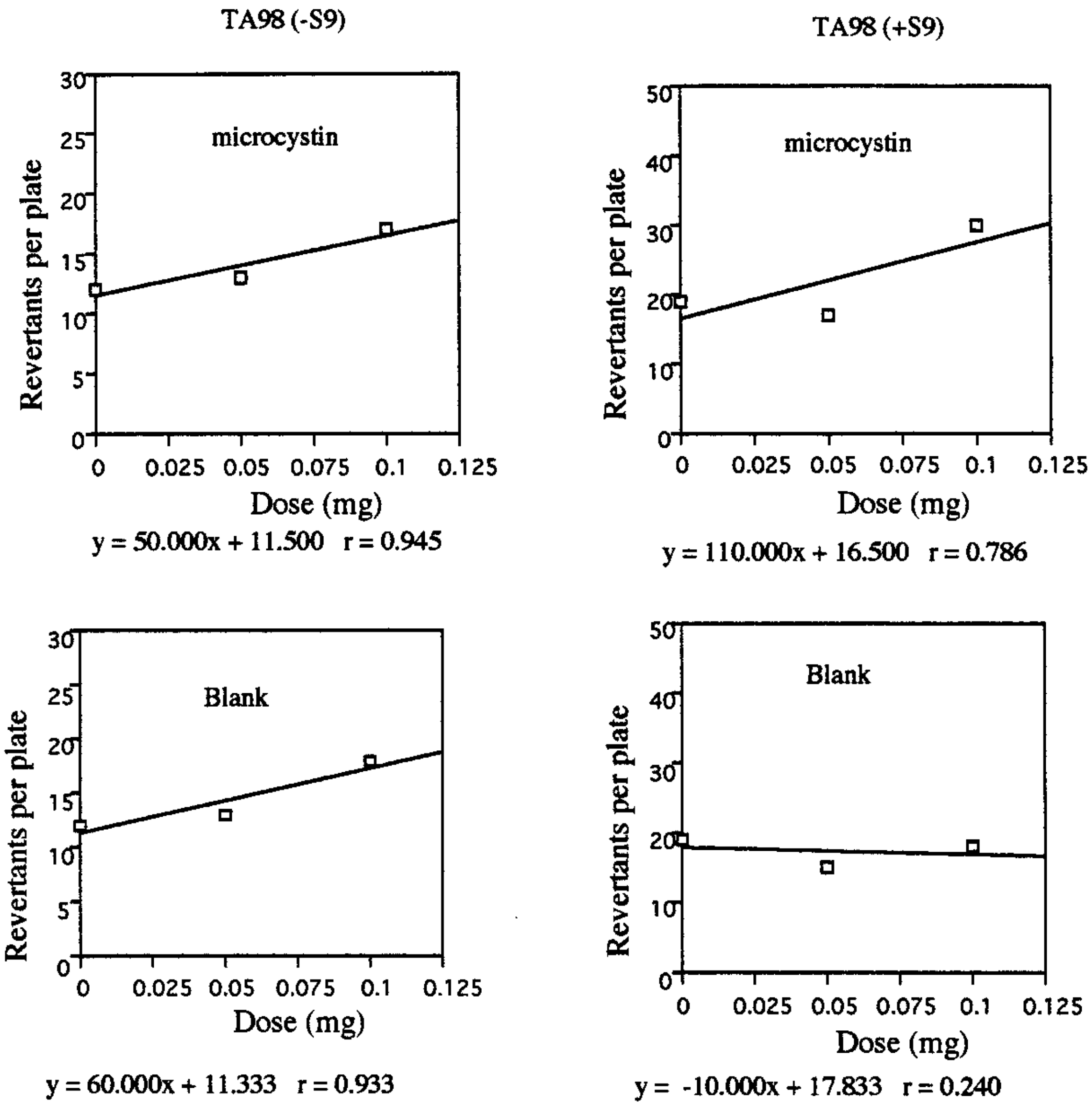


図-2 TA98 菌による microcystin-LR のオゾン処理生成物の変異原性

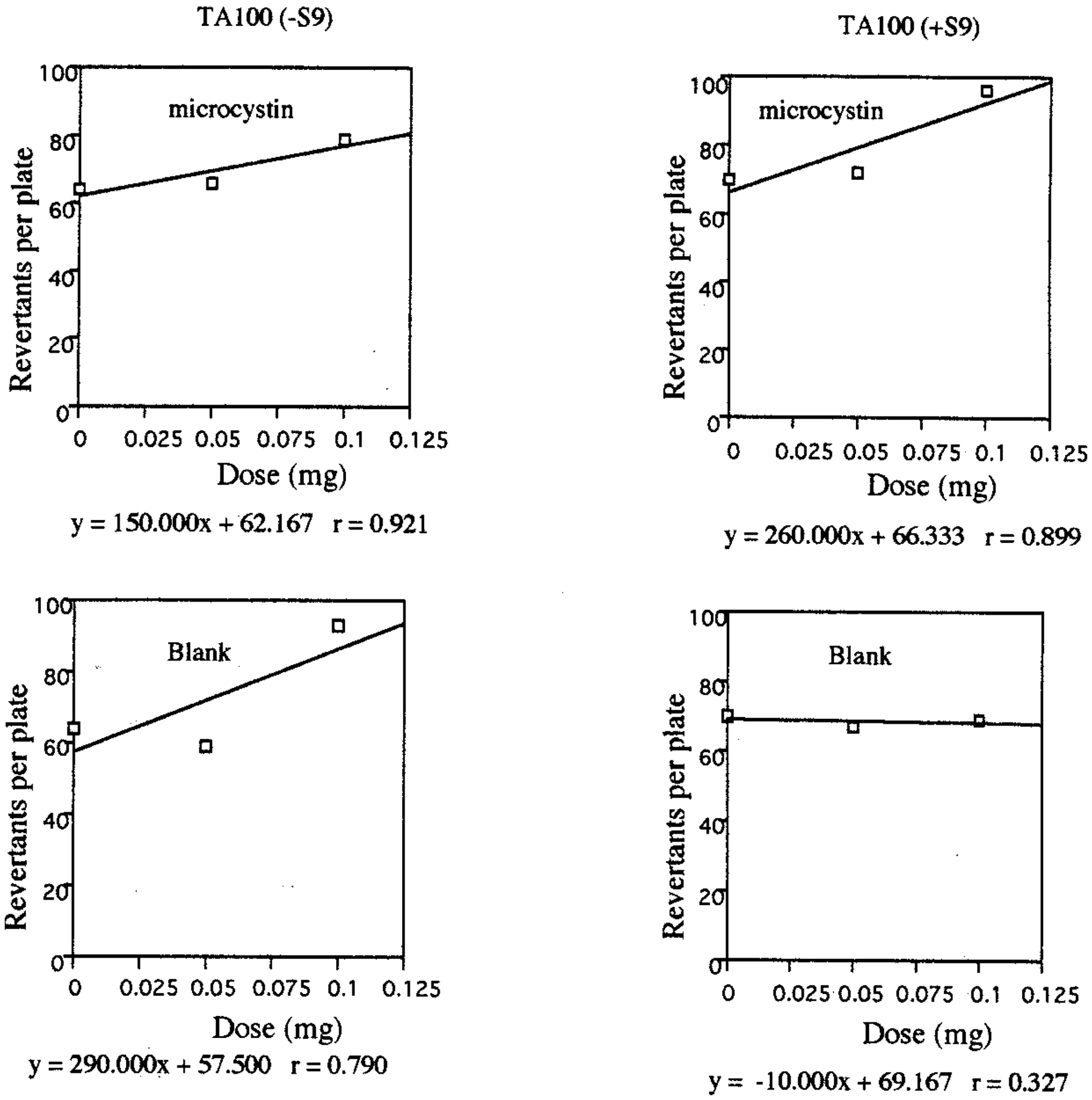


図-3 TA100 菌による microcystin-LR のオゾン処理生成物の変異原性

3．培養ラット肝細胞によるオゾン処理 microcystin-LR 溶液の生物評価

3.1 はじめに

microcystin 類は *Microcystis* 属や *Anabaena* 属、*Oscillatoria* 属などの藍藻が産生する環状ペプチド毒素である。Microcystin 類は 7 個のアミノ酸で構成され、その基本骨格は cyclo(D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-)で表される。ここで、D-MeAsp は D-*erythro*-β-methylaspartic acid 、Mdha は *N*-methyldehydroalanine 、Adda は特殊なβ-アミノ酸 (2*S*,3*S*,8*S*,9*S*)-3-amino-9methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid であり、X 及び Y は種々の L-アミノ酸を示している。例えば、microcystin-LR には L-アミノ酸として L-leucine と L-arginine が含まれている。このように L-アミノ酸の異なる一群の microcystin 類に加え、D-MeAsp あるいは Mdha のメチル基が脱離した変種など、構成アミノ酸の異なる 50 種類以上の同族体が今までに報告されている。

microcystin 類を腹腔内投与した齧歯類では肝細胞構造の破壊や洞様毛細血管構造の消失、肝臓内出血による肝重量の増加及び出血性のショックという特徴的な肝障害が起きる (Theiss *et al.*, 1988; Hooser *et al.*, 1989; Lovell *et al.*, 1989)。肝臓の他に肺及び腎臓も microcystin 類の投与によって障害を受けるが、これは肝臓から流出した肝細胞や細胞片が肺や腎臓で塞栓症を引き起こすためであると考えられている (Hooser *et al.*, 1990)。このような急性症状の他に、2 段階発癌実験において microcystin 類が発癌プロモーターとして作用することが明らかにされている (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992)。

「水の華」と呼ばれる藍藻類の異常発生が起きている湖沼の中には水道水源として利用されているものもあり、microcystin 類の曝露、特に飲料水を介した慢性的な曝露による人の健康影響が懸念されている。一方で、水道原水中に存在する microcystin 類は活性炭吸着あるいは塩素処理、オゾン処理によって比較的効率よく除去できることが明らかにされている。しかし、塩素あるいはオゾンとの反応で生じる分解生成物が microcystin 様の生物活性を保持している場合、化学的な分解による microcystin 類自体の減少が必ずしも microcystin 様生物活性の変化と一致しないこともあり得る。したがって、浄水処理によって microcystin 類のリスクが低減あるいは消失したことを確かめるためには、最終的に(全ての)分解生成物を同定し、それらの化合物に microcystin 様の生物活性がないことを明らかにする必要がある。このような観点に立つ先駆的な研究として、Tsuji *et al.* (1997)は microcystin-LR の主要な塩素処理生成物の構造を明らかにし、分解生成物の PP2A 阻害活性は極めて弱いことを明らかにしている。一方、現在までのところ microcystin 類オゾン処理生成物の化学構造及びその生物活性に関する報告はない。

本研究では、オゾン処理に伴う microcystin 様生物活性の変化を明らかにする目的で、培養ラット肝細胞を用いる *in vitro* バイオアッセイを適用し、オゾン処理 microcystin-LR 溶液中に microcystin 様の生物活性をもつ反応生成物が残存しているか否かについて検討を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 肝細胞の分離と培養

collagenase 灌流法により 6 週齢の雄 Wistar ラットから分離肝細胞を調製した。この肝細

胞を、10%新生仔ウシ血清、10^{-8} M insulin、10^{-8} M dexamethasone、30 mg/L kanamycin sulfateを添加したWilliams' E培地に5×10^5細胞/mLの細胞濃度で懸濁し、直径60 mmのcollagen-coated dishに4 mLずつ分注した。

この肝細胞を37°C、5% CO_2-95% Airの気相下で4時間培養した後に、上記の血清、ホルモン及び抗生物質を同濃度で添加したWilliams' E培地で培地交換を行って死細胞を除き、さらに20時間培養した。

3.2.2 オゾン処理microcystin-LR溶液およびオゾン処理ブランク溶液による培地の調製と肝細胞への曝露

粉末Williams' E培地を秤量し、必要量の90%のオゾン処理microcystin-LR溶液あるいはオゾン処理ブランク溶液に溶解した。培地のpHをpH 7.2に調製し、Milli-Q水で必要量までメスアップした後にろ過滅菌した。この段階で、試料水は1.1倍希釈されたことになる。

24時間培養した肝細胞の培地を、血清、ホルモン及び抗生物質を含まないWilliams' E培地に交換して30分間培養した後に、試料水で調製したWilliams' E培地で再度培地交換を行って曝露を開始した。

3.2.3 Western blotによるリン酸化アミノ酸の検出

2時間曝露後に肝細胞を氷冷phosphate buffered saline (PBS)で洗浄し、細胞をSDS-PAGE用sample buffer 300 μLに懸濁した。同一の処理を行った3枚のディッシュから得られた細胞試料を集めて音波処理した。

4%濃縮ゲル-10%分離ゲルを用いてSDS-PAGEを行い、肝細胞タンパク質を分離した。ゲル上のタンパク質をセミドライ法でPVDF膜に転写した後に、PVDF膜を1%ウシ血清アルブミン-TBST中、4°Cで24時間ブロッキングした。リン酸化チロシンはECLチロシンリン酸化タンパク質検出システム (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて検出した。リン酸化セリンおよびリン酸化スレオニンの検出では、ブロッキングしたPVDF膜をTBSTで希釈した抗リン酸化セリン抗体あるいは抗リン酸化スレオニン抗体 (いずれもZymed)と室温で1時間反応させ、ついでHorseradish Peroxidase標識抗Rabbit Ig (Amersham Pharmacia Biotech)と1時間反応させた。バンドの検出には化学発光法 (ECLウェスタンブロッティング検出システム)を用いた。

3.2.4 glycogen量の定量

2時間曝露後に肝細胞を氷冷PBSで洗浄し、0.3 M $HClO_4$ 1mLに肝細胞を懸濁して試験管に回収した。凍結・融解により細胞を破壊した後に遠心分離 (2500rpm、20分間)を行って変性タンパク質を除き、得られた上清中のglycogen量を測定した。

上清0.5 mLに1 M NaOH 0.25 mLを加え、沸騰水浴中で10分間加熱して既存のglucoseを分解した。この溶液に、amyloglucosidase 1 mgを溶解した0.3 M acetic acidと2 M sodium acetate buffer, pH 4.5の1:1混液 0.25 m*l*を加えて45°Cで2時間インキュベートした。遊離したglucoseを、glucose oxidase法により定量した。

3. 2. 5 ELISA による TNF-αの定量

24 時間曝露後の培地中に存在する TNF-α量を市販の ELISA キット (*Rat* TNF-α US, Cosmo Bio)を用いて定量した。本キットによる TNF-αの検出下限は 0.7 pg/mL 未満である。

3. 2. 6 細胞生存率の測定

24 時間曝露後の培地中の lactate dehydrogenase (LDH)活性を、LDH Cytotoxic-Test *Wako* を用いて測定した。細胞生存率は、全 LDH 活性 (細胞内 LDH 活性と培地中 LDH 活性の和)に対する細胞内 LDH 活性の比率として計算した。

3. 3 結果と考察

図-4 に示したように、microcystin-LR は肝細胞タンパク質セリン/スレオニン残基のリン酸化を亢進させたのに対し、抗リン酸化チロシン抗体を用いた Western blot では microcystin-LR 曝露によるリン酸化タンパク質の増加はほとんど認められなかった。リン酸化セリンの分子量 170kDa 及び 50kDa のバンド、リン酸化スレオニンの分子量 148-200kDa のスメアなバンド及び約 47kDA のバンドで比較すると、125 ないしは 250nM 以上の濃度で明らかなセリン/スレオニンリン酸化タンパク質の増加がみられた。これに対して、オゾン処理 microcystin-LR 溶液あるいはオゾン処理ブランク溶液では未処理肝細胞との間に差異は観察されなかった。microcystin 類はプロテインセリン/スレオニンホスファターゼ PP1 及び PP2A の強力な阻害物質であることが明らかにされている (Honkanen *et al.*, 1990; Mackintosh *et al.* 1990; Yoshizawa *et al.*, 1990; Runnegar *et al.* 1993)。細胞内の情報伝達機構の一つとして、酵素 (タンパク質)内の特定のアミノ酸残基 (セリン、スレオニンあるいはチロシン)のリン酸化/脱リン酸化による活性の調節がある。前者の反応を触媒する酵素がプロテインキナーゼ、後者の反応に関与する酵素がプロテインホスファターゼであり、相反的な働きをする両酵素群のバランスよって細胞の恒常性が維持されている。したがって、microcystin 類による PP 1 及び 2A の阻害はリン酸化タンパク質を増加させることになり、細胞内で見かけ上プロテインキナーゼが活性化された状態を作り出すことになる。microcystin 類によるこのような肝細胞タンパク質のリン酸化亢進に関しては、既に Yoashizawa *et al.* (1990)の報告がある。しかし、本研究では ^{32}P のタンパク質への取り込みでリン酸化亢進を評価する従来の方法ではなく、個々のリン酸化アミノ酸に特異的な抗体を用いてリン酸化タンパク質を検出したため、microcystin 類によるリン酸化の亢進がセリン/スレオニン残基に選択的であることが確認された。

図-5 は肝細胞の glycogen 量に対する microcystin-LR の影響を表したものである。microcystin-LR は 62.5nM 以上の濃度で glycogen 量の濃度依存的な減少を引き起こした。PP 1 及び PP2A の阻害によって、タンパク質リン酸化/脱リン酸化によって制御されている細胞機能に異常をきたすことになるが、その機能の一つに糖代謝がある。glycogen 分解に関与する glycogen phosphorylase はリン酸化によって活性化され、glycogen 合成に関与する glycogen synthase はリン酸化によって不活性化される。したがって、microcystin 類によるタンパク質リン酸化の亢進は肝細胞からの glucose 放出を促進し、肝細胞 glycogen 量の減少を引き起こすと考えられる。実際に、microcystin 類と同様の作用機構で毒性を発現する okadaic acid で肝細胞の glucose 放出が促進されることが明らかにされている (Haystead *et al.*,

1989)。

図-6 は microcystin-LR に 24 時間曝露した肝細胞の培地中に放出される TNF-α を ELISA 法で定量した結果である。125μM 以上の濃度で microcystin-LR は肝細胞の TNF-α 産生量を有意に増加させた。TNF-α は炎症などに伴ってマクロファージから放出される cytokine であるが、発癌プロモーターとして作用する可能性も指摘されている (Komori *et al.*, 1993)。最近の研究で、microcystin-LR あるいは nodularin を肝細胞に曝露すると肝細胞自身が TNF-α を産生することが明らかにされ、肝細胞自身の産生する TNF-α が microcystin 類の肝発癌プロモーション作用に関与する可能性が示唆されている (Sueoka *et al.*, 1997)。

細胞生存率は必ずしも microcystin 類に特異的な指標ではないが、本研究ではオゾン処理によって microcystin 類とは作用機構が全く異なる細胞毒性物質が生成する可能性を考慮して採用した。図-7 に示したように、microcystin-LR は 62.5nM 以上の濃度で有意な細胞生存率の低下を引き起こした。

肝細胞の glycogen 量、TNF-α 産生量及び細胞生存率に対する、オゾン処理 microcystin-LR 溶液あるいはオゾン処理ブランク溶液の影響をまとめたものが表-4 ある。何れの指標に関しても未処理肝細胞と比較して有意な差異は認められなかった。

オゾン処理を行う前の microcystin-LR 溶液濃度は 2.7μM であり、本研究で培地を調製する際に試料水を 1.1 倍希釈したことを考慮すると、これは培地中の microcystin-LR 濃度として 2.4μM に相当する。したがって、microcystin-LR による肝細胞グリコーゲン量の減少及び細胞生存率の低下が認められる最低濃度が 62.5nM、リン酸化の亢進及び TNF-α 産生量の増加が 125nM であることとから、オゾン処理 microcystin-LR 溶液中に残存する microcystin 様の活性は、最大に見積もっても処理前の 5%以下であると考えられる。

3.4 引用文献

1)Haystead-TA; Sim-AT; Carling-D; Honnor-RC; Tsukitani-Y; Cohen-P; Hardie-DG (1989) Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337: 78-81.

2)Honkanen-RE; Zwiller-J; Moore-RE; Daily-SL; Khatra-BS; Dukelow-M; Boynton-AL (1990) Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J.Biol. Chem.* 265: 19401-19404.

3)Hooser-SB; Beasley-VR; Lovell-RA; Carmichael-WW; Haschek-WM (1989) Toxicity of microcystin LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from Microcystis aeruginosa, to rats and mice. *Vet. Pathol.* 26: 246-252.

4)Hooser-SB; Beasley-VR; Basgall-EJ; Carmichael-WW; Haschek-WM (1990) Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Vet. Pathol.* 27: 9-15.

5)Komori-A; Yatsunami-J; Suganuma-M; Okabe-S; Abe-S; Sakai-A; Sasaki-K; Fujiki-H (1993) Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res.* 53: 1982-1985.

6)Lovell-RA; Schaeffer-DJ; Hooser-SB; Haschek-WM; Dahlem-AM; Carmichael-WW; Beasley-VR (1989) Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 9: 221-237.

7)MacKintosh-C; Beattie-KA; Klumpp-S; Cohen-P; Codd-GA (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264: 187-192.

8)Nishiwaki-Matsushima-R; Ohta-T; Nishiwaki-S; Suganuma-M; Kohyama-K; Ishikawa-T; Carmichael-WW; Fujiki-H (1992) Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118: 420-424.

9)Runnegar-MT; Kong-S; Berndt-N (1993) Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *Am. J. Physiol.* 265: 224-230.

10)Sueoka-E; Sueoka-N; Okabe-S; Kozu-T; Komori-A; Ohta-T; Suganuma-M; Kim-SJ; Lim-IK; Fujiki-H (1997) Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123: 413-419.

11)Theiss-WC; Carmichael-WW; Wyman-J; Bruner-R (1988) Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) Microcystis aeruginosa strain PCC-7820. *Toxicon* 26: 603-613.

12)Tsuji-K; Watanuki-T; Kondo-F; Watanabe-MF; Nakazawa-H; Suzuki-M; Uchida-H; Harada-K (1997) Stability of microcystins from cyanobacteria--IV. Effect of chlorination on decomposition. *Toxicon* 35: 1033-1041.

13)Yoshizawa-S; Matsushima-R; Watanabe-MF; Harada-K; Ichihara-A; Carmichael-WW; Fujiki-H (1990) Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116: 609-614.

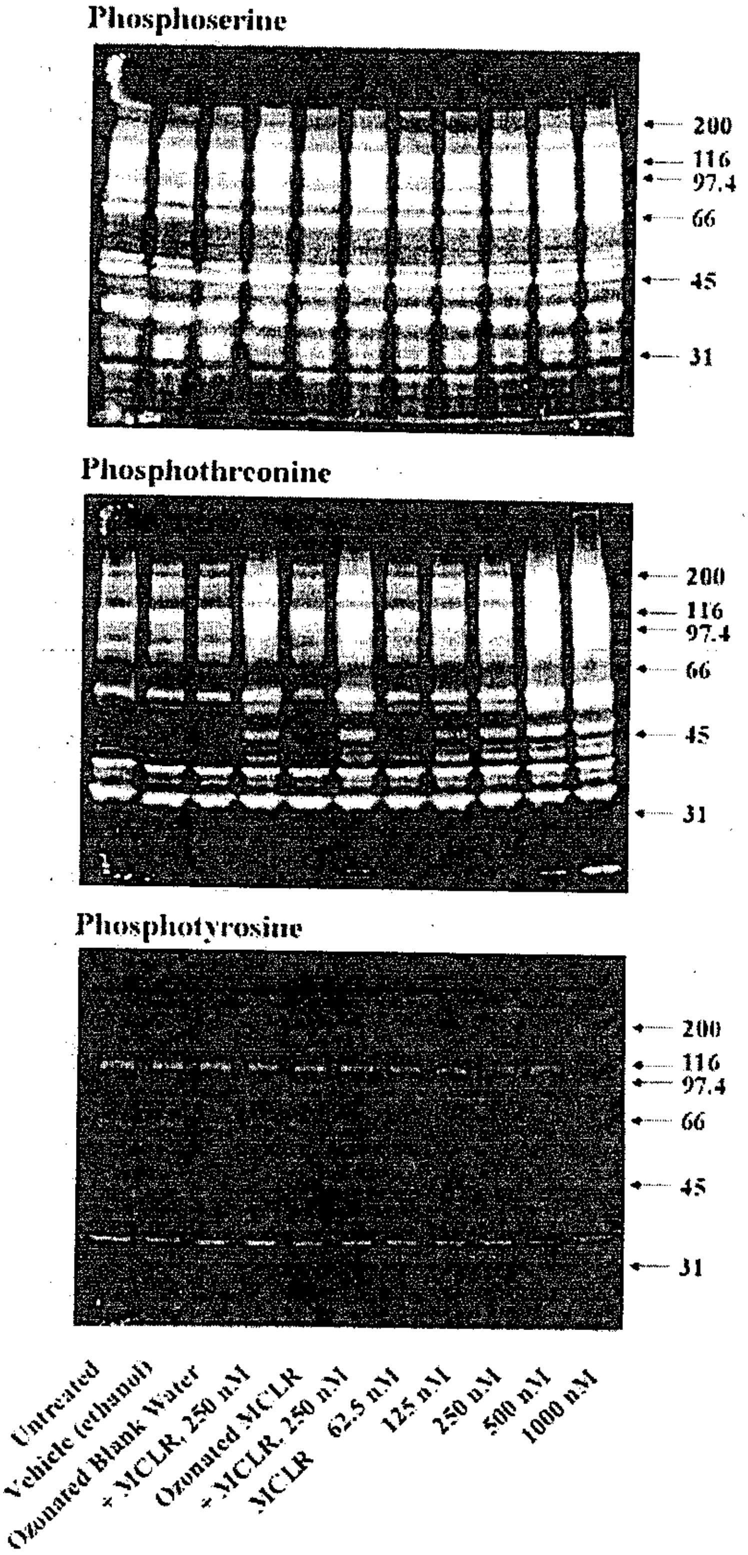


図-4 Microcystin-LR による培養ラット肝細胞のタンパク質リン酸化の亢進
24 時間前培養したラット肝細胞に Microcystin-LR あるいはオゾン処理 Microcystin-LR 溶液を 2 時間曝露した。肝細胞タンパク質を SDS-PAGE で分離し、抗リン酸化アミノ酸抗体を用いて Western blot を行った。

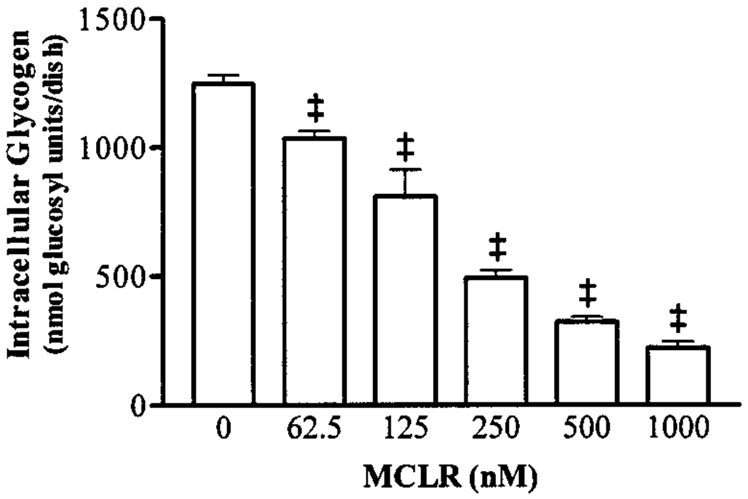


図-5 培養ラット肝細胞のグリコーゲン量に対する Microcystin-LR の影響

24 時間前培養したラット肝細胞に Microcystin-LR を 2 時間曝露し、0.3 M 過塩素酸で肝細胞を回収した。遠心上清中の既存グルコースを分解した後に、アミログルコシダーゼでグリコーゲンを加水分解した。遊離したグルコースをグルコースオキシダーゼ法で定量した。‡: $p < 0.01$

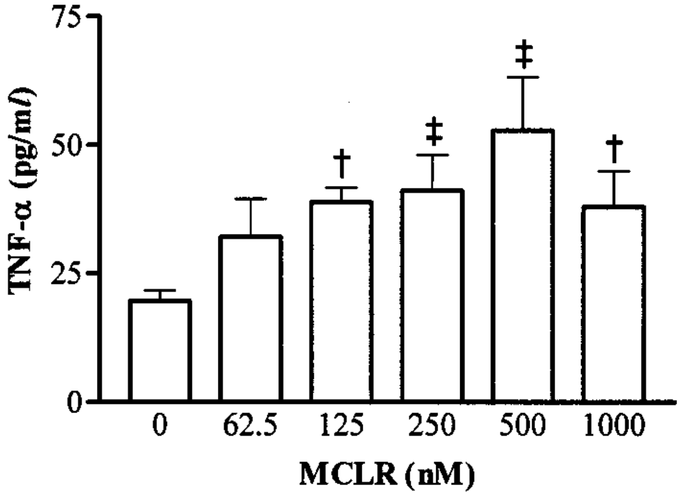


図-6 培養ラット肝細胞の TNF-α産生に対する Microcystin-LR の影響

24 時間前培養したラット肝細胞に Microcystin-LR を 24 時間曝露し、培地中に放出された TNF-αを市販の ELISA キットを用いて定量した。†: $p < 0.05$, ‡: $p < 0.01$

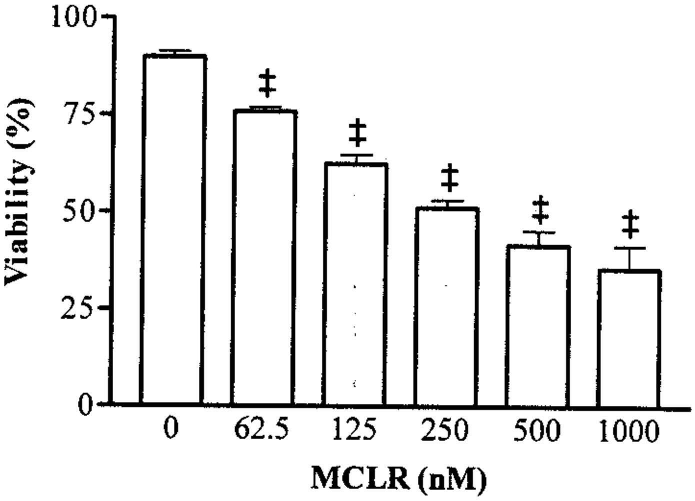


図-7 培養ラット肝細胞の細胞生存率に対する Microcystin-LR の影響

24 時間前培養したラット肝細胞に Microcystin-LR を 24 時間曝露し、培地中に漏出した乳酸脱水素酵素 (LDH)活性をもとに細胞生存率を算出した。‡: $p < 0.01$

表-4 培養ラット肝細胞のグリコーゲン量、TNF-α産生量および細胞生存率に対するオゾン処理 Microcystin-LR 溶液の影響

Treatment	Glycogen (μmol/dish)	TNF-α (pg/ml)	Viability (%)
Untreated	1.41 ± 0.03	24.1 ± 3.2	89.0 ± 0.5
+ Vehicle (ethanol)	1.25 ± 0.03	19.6 ± 2.0	90.0 ± 1.4
Ozonated Blank Water	1.51 ± 0.08	25.5 ± 5.5	90.5 ± 1.7
+ MCLR, 250 nM	0.48 ± 0.05	36.8 ± 2.3	53.0 ± 2.7
Ozonated MCLR Solution	1.42 ± 0.03	20.4 ± 3.4	90.3 ± 1.1
+ MCLR, 250 nM	0.42 ± 0.03	44.2 ± 13.1	49.5 ± 1.7

Ⅲ. 1,4－ジオキサンの水道における存在状況調査

1. はじめに

1,4-ジオキサンは主に溶剤や、1,1,1-トリクロロエタンの安定剤として用いられてきた。日本での生産量はここ数年、年間 7,000 トン程度で推移していたが、1,1,1-トリクロロエタンの廃止に伴い、平成 8 年度には約 4,500 トンとやや減少する兆しが見られている。世界がん研究機関（IARC）が動物に対する発がん性を 2B にランクする等、その毒性が指摘されており、環境庁は「化学物質の審査及び製造の規制に関する法律」に基づき、1,4-ジオキサンを昭和 62 年に指定化学物質とし、製造・輸入の届出を義務づけている。また、平成元年度から指定化学物質等検討調査の対象物質として水域の濃度をモニタリングしている。本調査では、全国 30 数地点の河川、湖沼及び海域で行っているが、水域での検出割合が高く、汚染が広範囲に及んでいることが認められている。また、溶剤等に使用される 1,4-ジオキサン以外に、ポリキシエチレン系の非イオン界面活性剤及びその硫酸エステルの製造工程において副生する 1,4-ジオキサンの存在も指摘されている。廃棄物処分場の浸出水や下水処理場排水からも高濃度に検出されており、汚染原因については未解明な部分も多い。

そこで、本分科会では、測定法に関連する低回収率にもかかわらず高精度で測定するためのサロゲート法についてのデータの積み上げを行った。次いで、この方法を用いた原水等の 1,4-ジオキサンの存在状況調査の予備的検討を行った。

2. 測定方法の検討

1,4-ジオキサンは環状エーテル構造で、水に無制限に溶解し、沸点も 101℃と比較的低く、水の沸点とも近い。このため、水試料からの分離、抽出及び濃縮を効率よく行うことが困難であった。従来、活性炭カラム吸着-CG/MS 法、改良型ディーンスターク濃縮-CG/MS 法等が用いられてきたが、これらの方法は特殊な器具を必要とし、操作が煩雑で水試料を多数処理するには必ずしも適当ではなく、回収率も充分ではなかった。

本研究では、安部が開発した 1,4-ジオキサンの抽出・濃縮に活性炭カートリッジを用い、少量の水試料を用いて短時間に効率よく前処理を行い GC/MS で定量する迅速で簡便且つ高精度なサロゲート法による方法の検討を行った。

2.1 分析方法

［試薬］

(1) 1,4-ジオキサン標準原液：（市販の 2000mg/mL 溶液）メタノールで希釈して 100mg/L 溶液としたもの。褐色のアンプルに封入して保存する。

(2) 1,4-ジオキサン-d8 標準原液：（市販の 1g を全量）メタノールで 2000mg/L 溶液とする。さらに、メタノールで希釈して 100mg/L 溶液としたもの。褐色のアンプルに封入して保存する。

(3) 1,4-ジオキサン標準液：標準原液 1mL をアセトンで希釈し、10mL とする。この溶液 1mL は、10μg の 1,4-ジオキサンを含む。

(4) ジクロロメタン：残留農薬試験用（1000倍濃縮保証品）に相当するもので、20mLを1mLに濃縮し、その2μLをガスクロマトグラフ・質量分析計で測定し、1,4-ジオキサンが含まれていないことを確認したもの。

(5) アセトン：残留農薬試験用（1000倍濃縮保証品）に相当するもので、50mLを1mLに濃縮し、その2μLをガスクロマトグラフ・質量分析計で測定し、1,4-ジオキサンが含まれていないことを確認したもの。

(6) メタノール：残留農薬試験用（1000倍濃縮保証品）に相当するもので、20mLを1mLに濃縮し、その2μLをガスクロマトグラフ・質量分析計で測定し、1,4-ジオキサンが含まれていないことを確認したもの。

(7) 水：再精製水もしくは市販のペットボトル入りミネラルウオーター（注１）で、1,4-ジオキサンが含まれていないことを確認したもの。

（注1）　例えば、エビアン水等。

［器具および装置］

(1) 固相カラム：活性炭固相カラム（注１）およびスチレンジビニルベンゼンポリマー固相カラム（注２）。

(2) マイクロシリンジ：容量1～10μLのもの。

(3) 固相抽出用装置：

(4) ガスクロマトグラフ－質量分析計システム：

a) 試料導入部：スプリットレス方式で、200～250℃にしたもの。

b) 分離管：内径0.20～0.53mm、長さ60～75mの溶融シリカまたはホウ硅酸ガラス製のものであって、内面に25%フェニル-75%ジメチルポリシロキサンを0.1～0.2μmの厚さで被膜したもの、またはこれと同等の分離性能を有するもの（注3）。

c) 分離管の温度：最適分離を示す昇温条件。一例として、45℃（1分間保持）-10℃/分-200℃（5分間保持）。

d) 検出器：イオン選択検出器(SIM)またはマスクロマトグラフ法が行えるもの。

e) セパレーター温度：機器の最適条件とする。

f) イオン化電圧：電子衝撃イオン化電圧（EI）を70eVにしたもの。

g) イオン源温度：機器の最適条件とする。

h) 測定質量数：1,4-ジオキサン；88および58、 1,4-ジオキサン-d8；96および64。

i) キャリアーガス：純度99.999v/v%以上のヘリウムガス。

(注１) ウオーターズ社製　Sep-Pak Plus AC-2もしくはこれと同等の精能を有するもの。

(注２) ウオーターズ社製　Sep-Pak Plus PS-2もしくはこれと同等の精能を有するもの。

(注３) 例えば、Aquatic、HP-624、WAX系カラムなど。

［試料の採取］

試料は、BOD ふらんびん又はガラスびんを精製水で洗浄した後、アセトン洗浄後、120℃で 2 時間程度加熱したものに VOC 用検体の採取に準じて採取する。（ミネラルウ

オーターのペットボトルの空き瓶を洗わずにそのまま用いてもよい。但し、空けたばかりのものを直ちに使用する。)

200mLを、以下の操作により抽出・濃縮を行う（注1）。

試料は氷冷して輸送し、速やかに測定する。速やかに測定できない場合は、冷暗所に保存する。

（注1）今回の測定では、同時に測定を行う物質もあるので、必要充分量の試料を採取することに注意。

[試験操作]

(1) 固相抽出：活性炭固相カラムとスチレンジビニルベンゼンポリマー固相カラムを直列に接続し、スチレンジビニルベンゼンポリマー固相カラム側からジクロロメタン10mL、アセトン20mL、及び水40mLを逐次通してコンデイショニングする。サロゲートとして0.5μgの1,4-ジオキサン-d8を添加した検水200mLを、調整した固相カラムにスチレンジビニルベンゼンポリマー固相カラム側から流速 10mL/分で通水する。通水後、活性炭固相カラムを取り外して、再精製水 10mL で洗浄し、アスピーレーター等で吸引して水分を切る。さらに窒素ガス 2kg/cm^{2}で 20 分間以上パージして充分水分を除去する(注1)。2mL のアセトン(注2)を流速約 1mL/分で通水方向とは逆にゆっくり通し、1,4-ジオキサンを回収する。流出液に窒素ガスを緩やかに吹き付け、正確に1mLとし、これを検液とする。

(2) 分析：得られた検液の一定量（1～2μL）をとり、スプリットレス方式でガスクロマトグラフ-質量分析計に注入する。SIM法又はマスクロマトグラフ法を用いて、1,4-ジオキサンの特有のフラグメントイオンをモニターし、標準物質と一致することを確かめ、保持時間に相当する位置のピーク高さまたはピーク面積を求める(注3)。

(3) 空試験：空試験として、再精製水を200mL用い、(1)および(2)と同様に操作してピーク高さまたはピーク面積を求める。

(4) 検量線の作成：［試薬］(3)で調整した1,4-ジオキサン標準液を0.02～1.0mLの間で数段階とり、各濃度段階の溶液すべてに内部標準物質として1,4-ジオキサン-d8標準原液100mg/Lを0.05mL加え、アセトンによりそれぞれ全量10mLとし、段階希釈標準液を調製する。これら標準列の一定量をとり、横軸に「1,4-ジオキサンと1,4-ジオキサン-d8の濃度比」、縦軸に各濃度比における「1,4-ジオキサンのピーク高さまたはピーク面積と、1,4-ジオキサン-d8のピーク高さまたはピーク面積の比」をとって検量線を作成する。

(5) 濃度の計算：「検液のピーク高さ又はピーク面積と、1,4-ジオキサン-d8のピーク高さまたはピーク面積の比」から、検量線を用いて「検液中の1,4-ジオキサンと1,4-ジオキサン- d8の濃度比」を求め、1,4-ジオキサン-d8の濃度を代入すれば検液中の1,4-ジオキサンの濃度が求められる。これに濃縮倍率をかけて試料1リットル中の濃度を算出する。

(注1)水分除去が不十分だと、ピーク形状が不良となり定量結果に影響を及ぼす。

(注2) 固相カラムからの脱離溶媒は、ジクロロメタンでもよいが、ジクロロメタンからは88イオンがでるので、アセトンの方がよい。

(注３)一度は脱離液をさらに濃縮して Scan し、ジオキサンのマススペクトルを確認すること。

2.2 実態調査

上記の方法を用いて、以下の試料水及び採水方法で水道原水中の存在状況を調査した。

試料水：表流水および地下水

試料水採取回数：1 回もしくは 2 回

測定項目：非イオン界面活性剤の他、陰イオン界面活性剤 TOC、VOC

結果の報告：別紙の様式に従って、1,4-ジオキサン、非イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤 TOC、VOC を各試料毎に 3 回繰り返し測定し、その測定値から算出された試料の濃度を平均せずに各々記載することとした。また、定量下限値も記入させた。

３．結果及び考察

3.1 1,4-ジオキサン及びサロゲートのマスクロマトグラム

1,4-ジオキサン及びサロゲート物質のマスクロマトグラムを図-1 に示した。サロゲートは 9.6 分、1,4-ジオキサンは 9.7 分に検出されている。また、これらの物質に対して、データライブラリーから検索した結果を図-2､3 に示したが、両物質とも検索が可能であった。

3.2 試料水を用いた 1,4-ジオキサン及びサロゲートのマススペクトル

試料水の固相抽出検液を約 300 倍に濃縮し、原水で検出した 1,4-ジオキサンと思われるピークについてマススペクトルの確認を行った。

図-4､5 に 1,4-ジオキサン及びサロゲートのマススペクトルと検索結果を示した。マススペクトルは標準物質のものと比べてノイズが増加しているが、データライブラリーによる検索で同定が可能であった。

3.3 検量線

内部標準物質を用いた検量線では、1,4-ジオキサン濃度が 0～1 μg/mL になるように標準物質をアセトンで希釈し、それぞれに内部標準物質を 0.5 μg/mL になるように加えた。定量は 1,4-ジオキサン及び内部標準物質の分子イオンピーク(M^+)である m/e88 と 96 で複数回の試験を行ったところ、複数の分析機関が実施した検量線は、表-1､2 及び図-6､7､8 に示すように、どちらも標準列による検量線は良好な直線性を示した。

なお、今回の分析条件では、1,4-ジオキサンの m/e58 のフラグメントイオンは、溶媒のアセトンのテーリングに妨害され、定量性の面で実用的ではなかった。また、使用溶媒からのブランクは検出されなかった。検出限界は S/N=5 で 0.1 μg/L であった。

3.4 添加回収試験

3.4.1 絶対検量線による回収率

試料水の回収率について検討した。ボトルドウォーターを用いて回収率は表-3、浄水添加は表-4 及び原水添加は表-5 のように、絶対検量線を用いた回収率は何れの試料水でも40 数～60 数%の結果であった。この状況は複数の機関でも 51～67%と同様の結果であった。

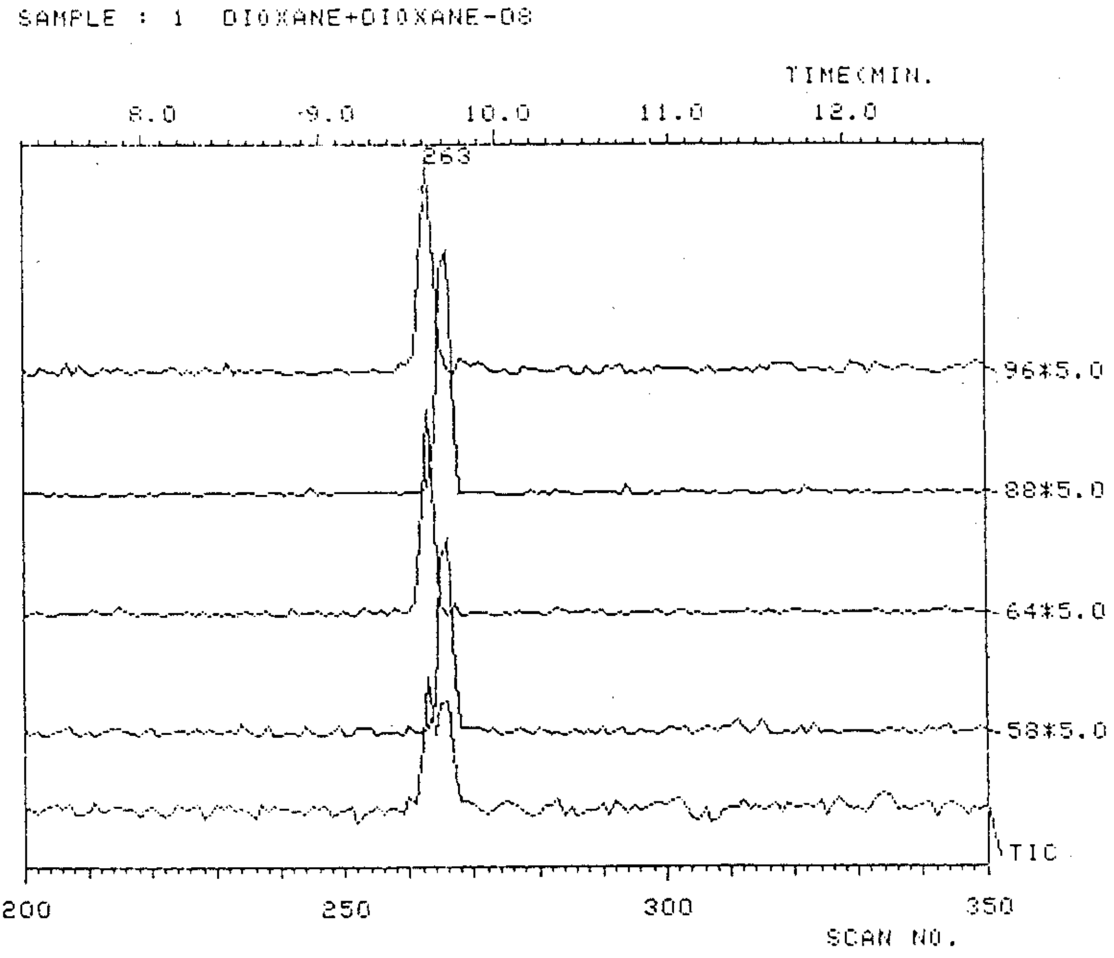
3.4.2 サロゲートを用いた添加回収試験

次に、1,4-ジオキサンの添加と同時にサロゲート添加による回収率をミネラル水、浄水及び原水について複数の分析機関で比較検討した。機関 A では、表-3､4､5 にみられるように 108～120%の回収率を示した。また、機関 B では、表-6､7 に示すように、原水にジオキサンを 0.2μg 添加したものについて回収試験(n=2×2 回)を行ったところ 92.2%～106%が得られた。また、試験方法に熟達した場合では表-8 に見られるように、0.02μg の添加でも 100%以上の良好な結果が得られた。しかしながら、サロゲートを用いても 63～76%の結果の場合も見られ、試験方法の習熟が必要であることがみられた。ただし、サロゲートによる回収率では変動係数は小さい傾向は観察された。

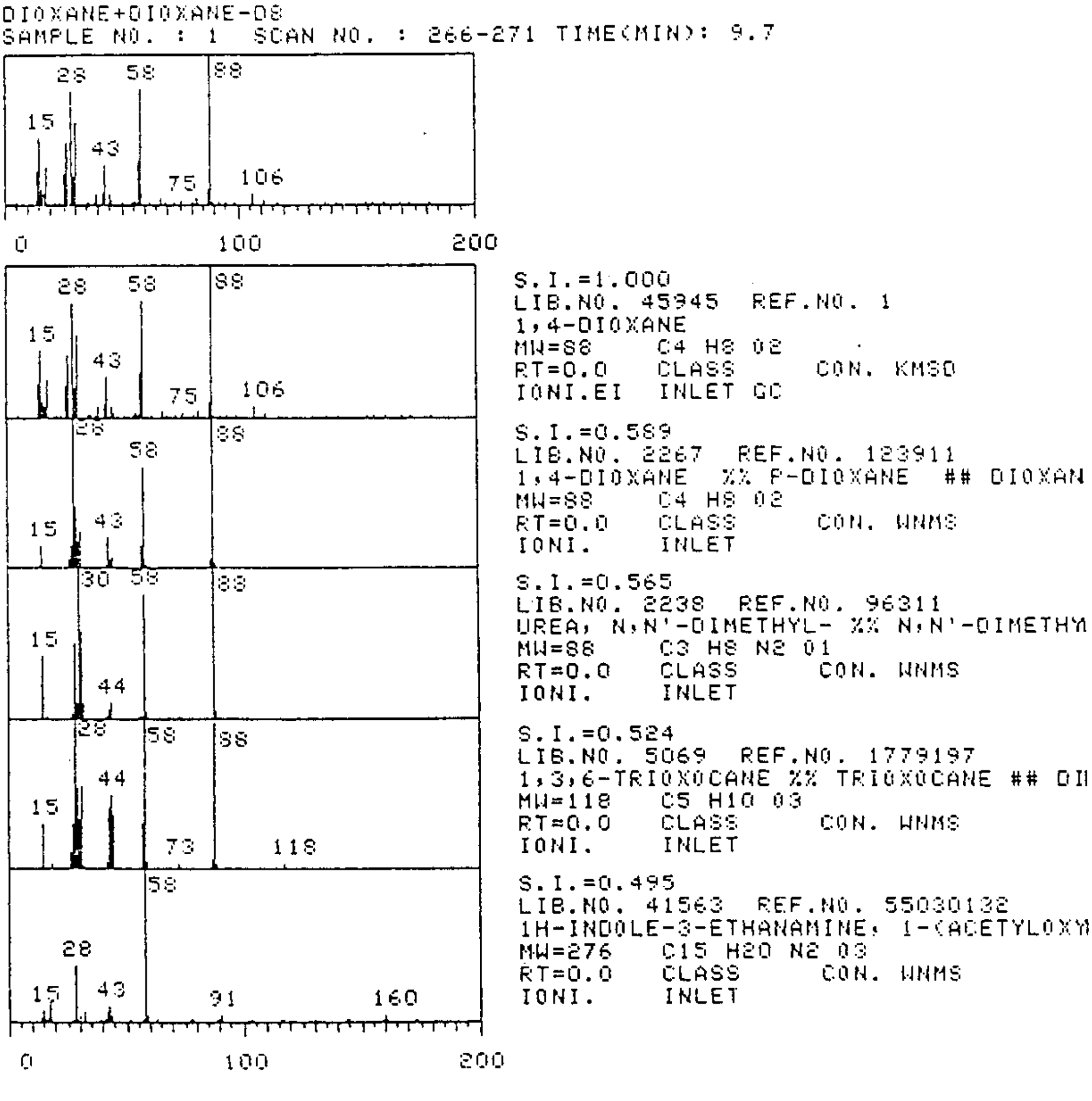
また、ミネラル水についてもブランクとして測定を行ったが、ほとんどピークを認めず定量値は<0.1μg/L であった。添加回収試験(n=2)では、100%と 103%の回収率が得られた。

3.5 試料測定結果

実試料における測定結果として、河川水等表流水については表-9 に示すように定量下限以下～13μg/L、井戸水については表-10 のように定量下限値以下～9.1μg/L までの範囲が確認され、公共用水域では殆どの地点で検出された。また、浄水については表-11 示したようであった。以上のように、1,4-ジオキサンは、殆どの試料で検出されると考えられるが、検討した試料数があまりにも少ないことから、今後広範囲な検討が必要である。

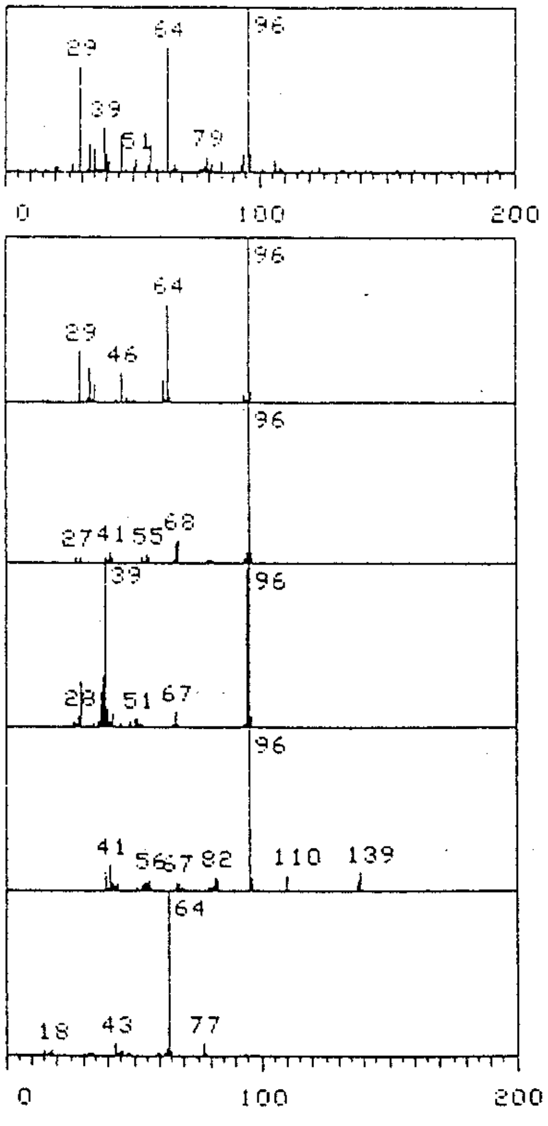


図－1 標準物質のマスクロマトグラム



図－2　標準物質のマススペクトルと検索結果（ジオキサン）

DIOXANE+DIOXANE-D8
SAMPLE NO. : 1 SCAN NO. : 262-257 TIME(MIN): 9.6



S.I.=0.679
LIB.NO. 45943 REF.NO. 1
1,4-DIOXANE-D8
MW=96   C4 D8 O2
RT=0.0   CLASS   CON.
IONI.EI INLET GC

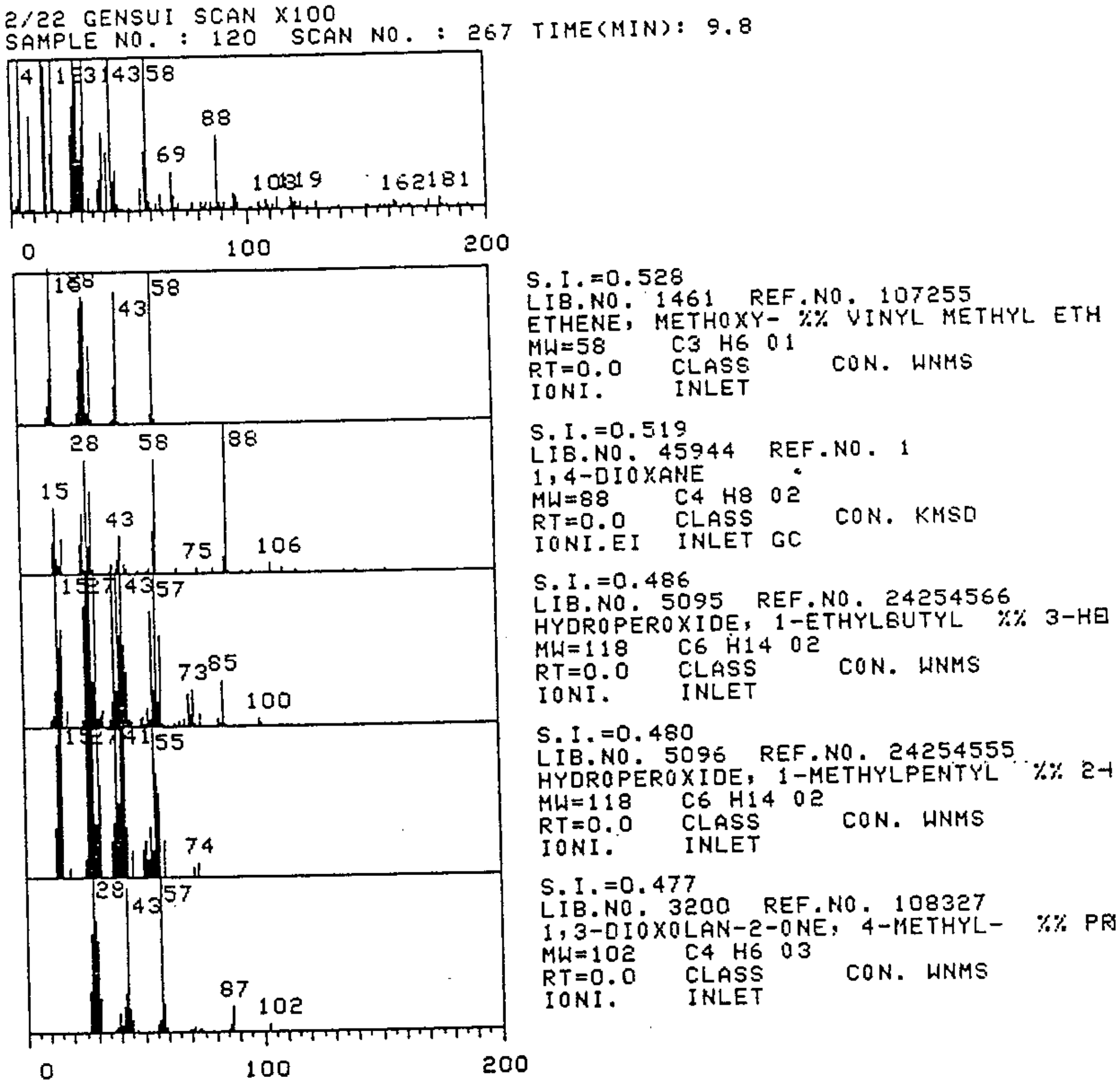
S.I.=0.523
LIB.NO. 11502 REF.NO. 0
BICYCLO 2,2,1 HEPTANE, 2-(1-BUTEN-3-
MW=150   C11 H17 D1
RT=0.0   CLASS   CON. WNMS
IONI.   INLET

S.I.=0.407
LIB.NO. 2567 REF.NO. 98011
2-FURANCARBOXALDEHYDE %% FURFURAL #
MW=96   C5 H4 O2
RT=0.0   CLASS   CON. WNMS
IONI.   INLET

S.I.=0.404
LIB.NO. 8792 REF.NO. 2051287
QUINOLINE, DECAHYDRO- %% DECAHYDROQ
MW=139   C9 H17 N1
RT=0.0   CLASS   CON. WNMS
IONI.   INLET

S.I.=0.399
LIB.NO. 7172 REF.NO. 0
NN-DI-D3ME ETHANOLAMINE ACETATE 137
MW=131   C6 H7 D6 N1 O2
RT=0.0   CLASS   CON. WNMS
IONI.   INLET

図－3　標準物質のマススペクトルと検索結果（サロゲート）



図−4 原水のマススペクトルと検索結果（ジオキサン）