

	R1	R2	分子量
Microcystin-LR	Leu	Arg	994
Microcystin-RR	Arg	Arg	1037

Anatoxin-a

図1 Microcystin-LR、-RR及びanatoxin-aの化学構造

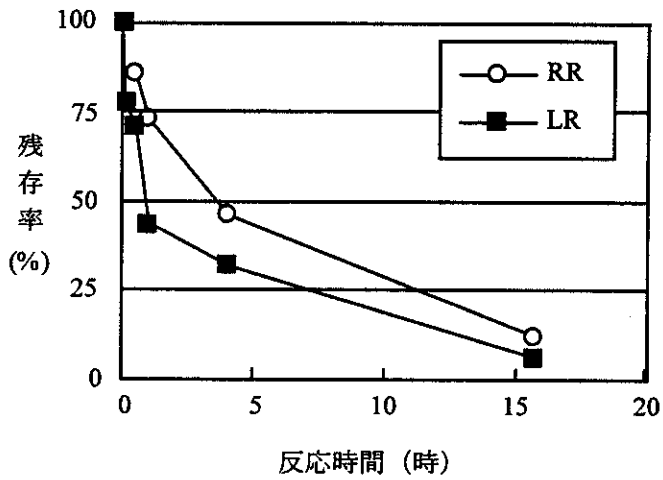


図2 二酸化塩素によるmicrocystinの分解挙動
(Microcystin-LR及び-RRの初期濃度は1.0 mg/L、
二酸化塩素の初期濃度は0.8 mg/L)

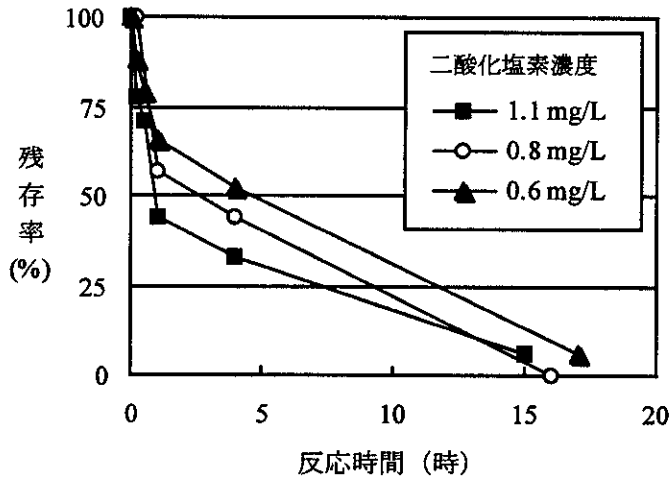


図3 二酸化塩素濃度の違いによるmicrocystin-LRの分解挙動
(Microcystin-LRの初期濃度は2.0 mg/mL)

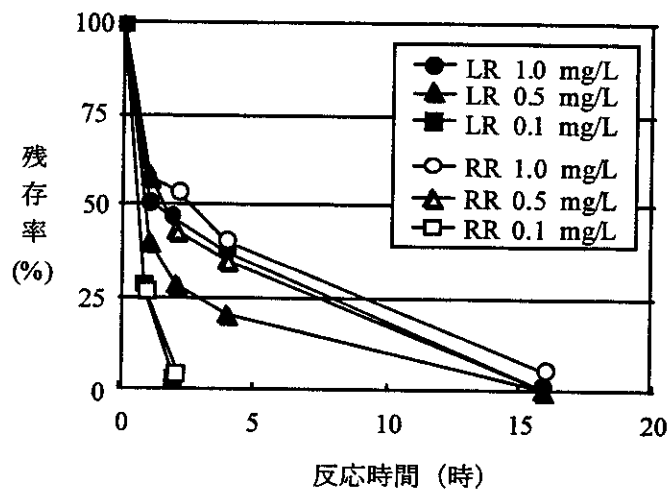


図4 Microcystin濃度の違いによるmicrocystinの分解挙動 (二酸化塩素の初期濃度は0.8 mg/L)

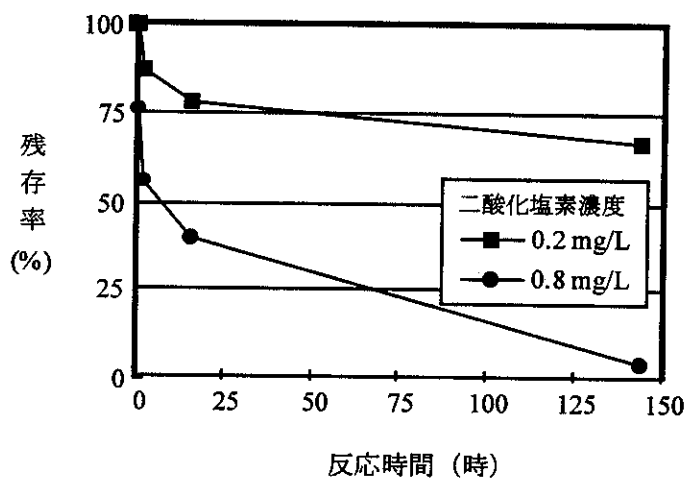


図5 二酸化塩素によるanatoxin-aの分解挙動 (Anatoxin-aの初期濃度は1.0 mg/L)

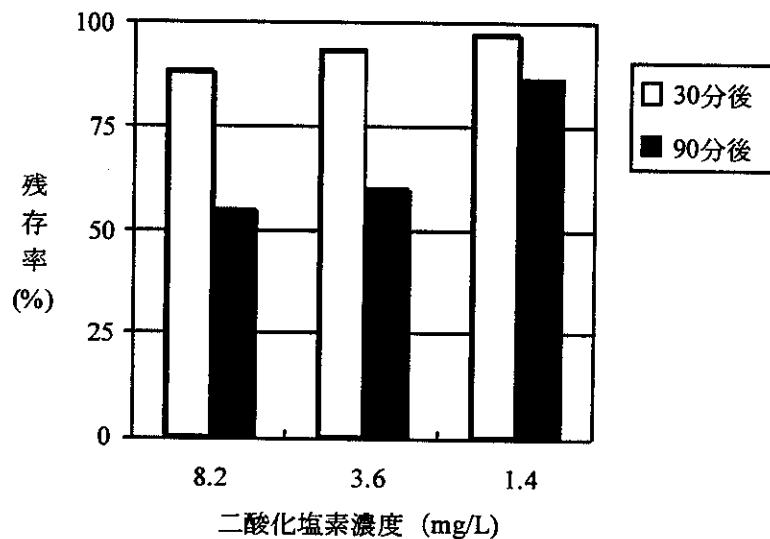


図6 二酸化塩素濃度の違いによるanatoxin-aの分解挙動 (Anatoxin-aの初期濃度は1.0 mg/L)

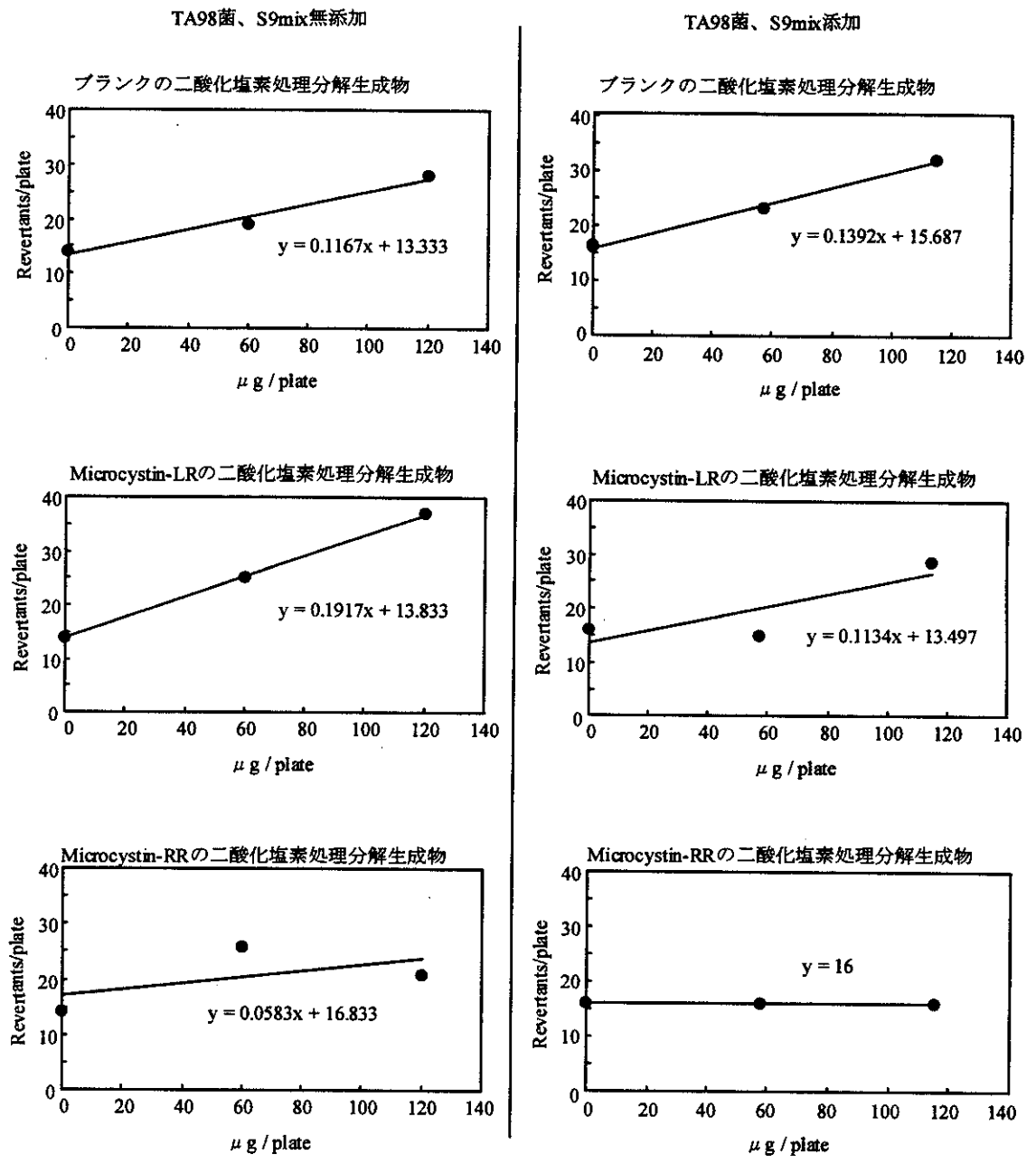


図7-1 TA98菌によるmicrocystinの二酸化塩素処理生成物の変異原性試験

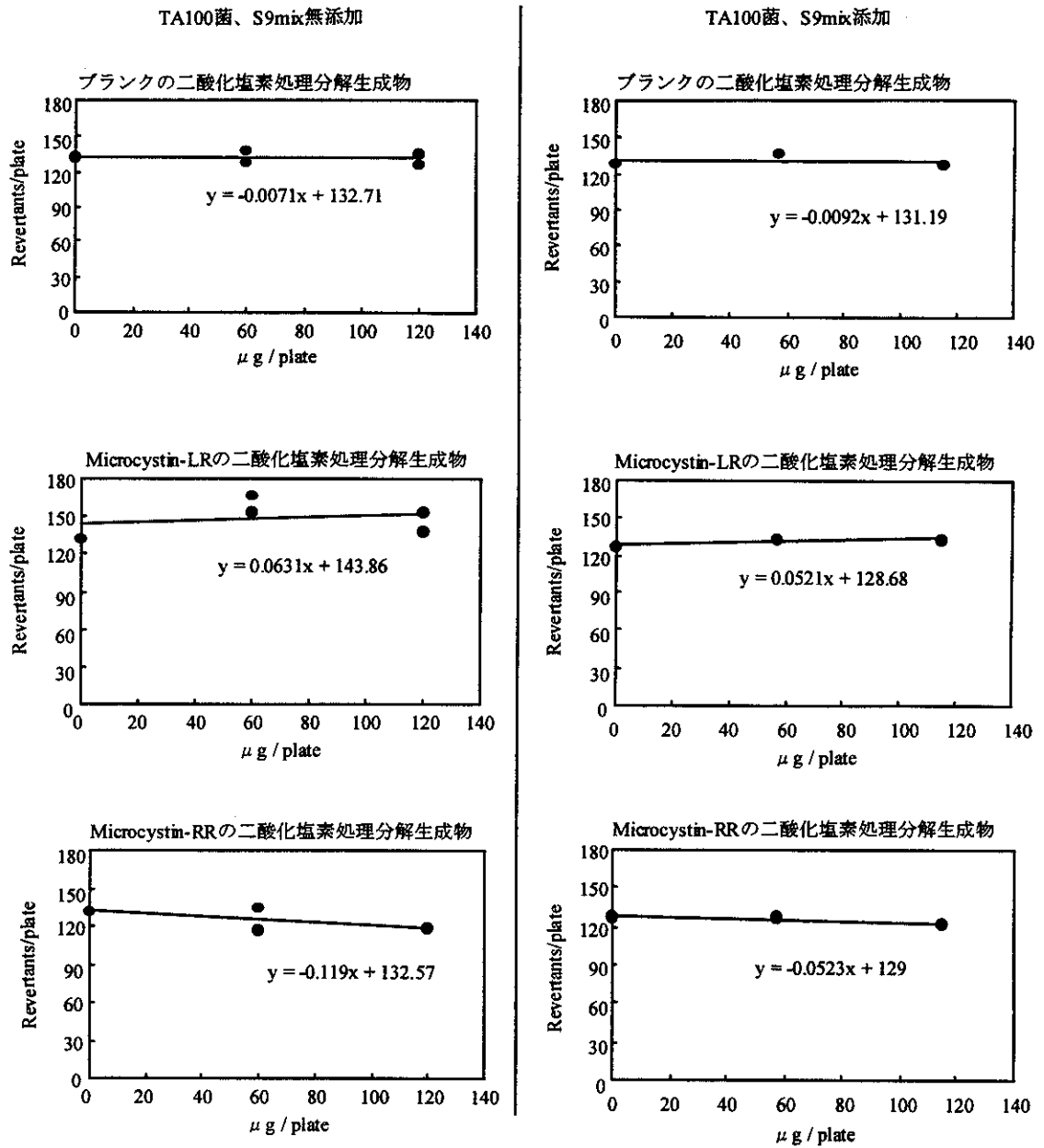


図7-2 TA100 菌によるmicrocystinの二酸化塩素処理生成物の変異原性試験

3. 培養ラット肝細胞による二酸化塩素処理 Microcystin-LR および-RR の生物評価

3.1 はじめに

著者らは昨年度の本研究班において、microcystin-LR 溶液のオゾン処理によって、ラット肝細胞に対する microcystin 様の活性が最大に見積もっても処理前の 5%以下に低下することを報告した。

本年度は二酸化塩素処理に伴う microcystin 様活性の消長を明らかにする目的でラット肝細胞によるバイオアッセイを実施した。評価指標としては、昨年度と同様に「glycogen 量」、「TNF- α 産生量」および「細胞生存率」を用いた。これらの指標の他に、著者らが行った基礎研究の結果として microcystin-LR が細胞の増殖・分化に関するシグナル伝達に重要な役割を果たしている mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) 系に対して影響を及ぼすことが明らかになったため、昨年度の「セリン/スレオニン残基のリン酸化」に代えて「肝細胞 MAP kinase 系の活性化」を指標として採用した。

3.2 実験方法

(1) 試料水

二酸化塩素処理した試料水は神奈川県衛生研究所の辻先生から入手した。処理方法は、3 mg/l microcystin-LR 溶液、3 mg/l microcystin-RR 溶液あるいは Milli-Q 水 (ブランク水) を 0.8 mg/l の二酸化塩素で 18 時間処理した後に、残存する二酸化塩素を除去するために窒素ガスを 1 時間通気し、さらにアスコルビン酸ナトリウム (0.16 mg/l) を添加したものであり、試験を行うまで冷蔵保存した。

(2) 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% CO₂-95% 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) 二酸化塩素処理 microcystin-LR 溶液および-RR 溶液と二酸化塩素処理ブランク水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% の二酸化塩素処理 microcystin 溶液あるいは二酸化塩素処理ブランク水に溶解した。培地の pH を pH 7.2 に調整し、Milli-Q 水で必要量までメスアップした。この段階で、試料水は 1.1 倍希釈されたことになる。したがって、調製した培地中の microcystin-LR および-RR 濃度は、二酸化塩素処理前の濃度

に換算してそれぞれ 2.7 μ M、2.6 μ M に相当する。

24 時間培養した肝細胞の培地を、血清およびホルモンを含まない Williams' E 培地に交換してさらに 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。また、肝細胞を microcystin-LR に曝露する場合は、20% ethanol-saline 溶液を Williams' E 培地に直接添加した (ethanol の最終濃度は 0.1%)。

(4) 肝細胞内 glycogen 量の定量

2 時間曝露後に肝細胞を氷冷 phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、0.3 M HClO₄ 1 ml に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 (2500 rpm、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 ml 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。

(5) Western blot によるリン酸化 MAP kinase の検出

2 時間あるいは 6 時間曝露後に肝細胞を氷冷 PBS で洗浄した後に Lysis Buffer 400 μ l を加えて細胞を溶解し、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。遠心上清中のタンパク質を 4%濃縮ゲル-10%分離ゲルを用いて SDS-PAGE で分離し、セミドライ法で PVDF メンブランに転写した。この PVDF メンブランを 5% skim milk-TBST 中、室温で 2 時間ブロッキングした後に、5% skim milk-TBST で 1000 倍希釈した抗 phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体、または 5% BSA-TBST で 500 倍希釈した抗 phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) 抗体あるいは抗 phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) 抗体溶液中、4°C で一晩インキュベートした。ついで、5% skim milk-TBST で 5000 倍希釈した Horseradish Peroxidase-抗 Rabbit IgG 抗体溶液中、室温で 2 時間インキュベートした後に、ECL Plus を用いて免疫複合体の検出を行った。

(6) ELISA による TNF- α の定量

24 時間曝露後の培地中に放出された TNF- α 量を ELISA キットを用いて定量した。各試料につき 2 回の測定を行い、その平均値を TNF- α 濃度とした。

(7) 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

表 1 は microcystin-LR および二酸化塩素処理 microcystin 類に曝露したラット肝細胞の glycogen 量、TNF- α 産生量および細胞生存率をまとめたものである。Microcystin-LR は 50 nM 以上の濃度で肝細胞 glycogen 量の統計的に有意な減少を引き起こし、細胞生存率

の低下は試験を行った最低濃度である 20 nM でも統計的に有意であった。これらの指標に対して、TNF- α 産生は最高濃度の 200 nM のみで有意な増加が認められた。

一方、二酸化塩素処理ブランク水および microcystin 溶液についてみると、二酸化塩素処理 microcystin-LR 溶液のみで対照と比較して有意な TNF- α 産生量の増加と細胞生存率の低下が認められた。One-way ANOVA-Tukey's Multiple Comparison Test による統計解析の結果では、二酸化塩素処理 microcystin-LR 溶液中に残存している microcystin 様の活性は、glycogen 量で比較すると(microcystin-LR として) 50 nM 未満であり、細胞生存率では 50 nM に相当することになる。また、TNF- α 産生量で比較した場合、二酸化塩素処理 microcystin-LR 溶液中には 200 nM 相当の microcystin 様活性が残存していることになる。二酸化塩素処理 microcystin-LR 溶液を用いて調製した培地中の microcystin-LR 濃度が処理前の濃度に換算して 2.7 μ M であることを考慮すると、これらの結果は二酸化塩素処理後の microcystin-LR 溶液中には処理前の 2~7%に相当する microcystin 様の活性が残存していることを示している。本研究では microcystin-RR 標準品についての試験を行っていないため、二酸化塩素処理 microcystin-RR 溶液中に残存する microcystin 様の活性を定量的に評価することはできない。しかし、著者らは肝細胞 glycogen 量の減少に関して microcystin-RR は microcystin-LR よりも 50 倍程度作用が弱いというデータを得ており、microcystin-RR によって有意な glycogen 量の減少が引き起こされる最低濃度は 2.5 μ M 程度であると推察される。二酸化塩素処理水を用いて調製した培地中の microcystin-RR 濃度が処理前の濃度に換算して 2.6 μ M に相当することと合わせて考えると、microcystin-RR の二酸化塩素処理後に残存する microcystin 様活性をラット肝細胞によるバイオアッセイで評価するためには、初期濃度を少なくとも 10 倍程度増加させる、あるいは処理水を 10 倍以上濃縮する必要がある。

著者らは、microcystin-LR がプロテインセリン/スレオニンホスファターゼ PP1 および PP2A の強力な阻害物質であることに起因して、肝細胞タンパク質セリン残基、スレオニン残基のリン酸化を亢進させることを昨年度報告した。ただし、このようなリン酸化亢進を検出するには 125 ないしは 250 nM という比較的高い濃度の microcystin-LR が必要であった。本年度新たに指標として採用した MAP kinase 系は、セリン/スレオニン残基およびチロシン残基のリン酸化/脱リン酸化によって調節される細胞内情報伝達機構であり、細胞の増殖・分化あるいはストレス応答において重要な役割を果たすことが明らかにされている。ここでは結果は示さないが、microcystin-LR は哺乳動物細胞の主要な MAP kinase である ERK1/2、SAPK/JNK および p38 MAP kinase のリン酸化を亢進させる、すなわち MAP kinase 系を活性化することが明らかになり、この活性化は 20 nM という低い microcystin-LR 濃度でも検出可能であった。図 1 は 6 時間曝露後の肝細胞 ERK1/2、図 2 は 6 時間曝露後の SAPK/JNK、図 3 は 2 時間曝露後の p38 MAP kinase のリン酸化状態について検討した結果をまとめたものであり、それぞれ上段に Western blot、

下段には画像解析ソフト ScnImage により各バンドの濃さを数値化した棒グラフを示した。図 1 に示したように microcystin-LR は 20~200 nM の範囲で濃度依存的に肝細胞 ERK1/2 の活性化を引き起こした。二酸化塩素処理 microcystin-LR 溶液でも ERK1/2 の活性化が認められ、その程度は 50~100 nM microcystin-LR とほぼ同じレベルであった。microcystin-LR に曝露した肝細胞の SAPK/JNK では最高濃度の 200 nM でリン酸化が低下する傾向がみられたが (図 2)、ERK1/2 の場合と同様に二酸化塩素処理 microcystin-LR 溶液では 50~100 nM microcystin-LR に相当する SAPK/JNK の活性化がみられた。一方、p38 MAP kinase については、100 nM microcystin-LR 曝露によって 1 時間後ないしは 2 時間後をピークとする一過性のリン酸化亢進がみられたことから、曝露 2 時間後に評価を行った。図 3 に示したように、二酸化塩素処理 microcystin-LR 溶液の曝露によって 100~200 nM microcystin-LR に相当する p38 MAP kinase の活性化が認められた。MAP kinase 系の活性化に関するこれらの結果は、二酸化塩素処理後の microcystin-LR 溶液中には処理前の 2~7% に相当する microcystin 様の活性が残存していることを示している。

興味あることに glycogen 量、TNF- α 産生量および細胞生存率では対照と比較して全く有意な変化が認められなかった二酸化塩素処理 microcystin-RR 溶液でも 20 nM microcystin-LR に相当する ERK1/2 の活性化が観察された。Microcystin による ERK1/2 の活性化には PP2A の阻害が関与すると考えられるが、今までに報告されている IC₅₀ 値で比較すると microcystin-RR の PP2A 阻害作用は microcystin-LR の 1/85 程度である (microcystin-LR の IC₅₀ 値 40 pM に対して microcystin-RR の IC₅₀ 値は 3.4 nM)。この値をもとにして粗く見積もると、20 nM microcystin-LR は 1.7 μ M microcystin-RR に相当し、二酸化塩素処理水を用いて調製した培地中の microcystin-RR 濃度が処理前の濃度に換算して 2.6 μ M に相当することと合わせて考えると、65%程度の microcystin 様活性が二酸化塩素処理後に残存していることになる。前述したように、今回の二酸化塩素処理で用いた microcystin-RR 濃度 (3 mg/L) は、残存する microcystin 様活性を肝細胞バイオアッセイで評価するには十分ではない。したがって、ここで計算された残存率 65%にはかなり大きな誤差が含まれることが予想されるものの、二酸化塩素処理によって microcystin-LR あるいは microcystin-RR 自体が検出できないレベルにまで消失した場合でも本研究で示した microcystin 様の活性がわずかながら残存していることは注目に値すると言えるであろう。

3.4 まとめ

microcystin 溶液の二酸化塩素処理に伴う microcystin 様活性の消長を、glycogen 量、TNF- α 産生量、細胞生存率および MAP kinase の活性化を指標としてラット肝細胞バイオアッセイにより検討した。その結果、二酸化塩素処理によって microcystin-LR が消失した場合でも、処理前の 2~7% に相当する microcystin 様の活性が残存していることが明らかになった。また、microcystin-RR については定量的な評価はできないものの、肝

細胞 MAP kinase の活性化を引き起こす何らかの物質が二酸化塩素処理 microcystin-RR 溶液中に残存していることが明らかになった。

表 1 Microcystin-LR および二酸化塩素処理 Microcystin 類に曝露したラット肝細胞の Glycogen 量、TNF- α 産生量および細胞生存率

Treatment	Glycogen ($\mu\text{mol glycosil units/dish}$)	TNF- α (pg/ml)	Viability (%)
Control	1.23 \pm 0.08	13.4 \pm 0.2	92.9 \pm 2.8
Microcystin-LR (nM)			
20	1.14 \pm 0.10	15.1 \pm 0.5	84.3 \pm 1.4 †
50	0.95 \pm 0.06 †	16.0 \pm 1.7	67.1 \pm 0.9 †
100	0.77 \pm 0.05 †	16.7 \pm 2.5	42.2 \pm 2.1 †
200	0.53 \pm 0.04 †	24.0 \pm 1.2 †	18.2 \pm 3.9 †
ClO ₂ -Blank	1.20 \pm 0.11	10.7 \pm 1.7	93.2 \pm 0.7
ClO ₂ -Microcystin-RR	1.18 \pm 0.10	13.6 \pm 1.1	91.8 \pm 2.2
ClO ₂ -Microcystin-LR	1.12 \pm 0.12	21.0 \pm 1.4 †	73.2 \pm 2.5 †

24時間前培養したラット肝細胞を microcystin-LR を添加した Williams' E 培地、あるいは二酸化塩素処理したブランク水 (ClO₂-Blank)、microcystin-RR 溶液 (ClO₂-Microcystin-RR) または microcystin-LR 溶液 (ClO₂-Microcystin-LR) で調製した Williams' E 培地に曝露した。Control には microcystin-LR の添加に使用した溶媒 (20% ethanol-saline, 20 μL , ethanol の最終濃度は 0.1%) のみを添加した。2 時間後の細胞内 glycogen 量および 24 時間後の TNF- α 産生量、細胞生存率を測定した。結果は同一の処理を行った 3 枚のディッシュの mean \pm SD として表した。

†, ‡は統計解析 (One-way ANOVA-Tukey's Multiple Comparison Test) によってそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ の水準で有意な差が認められたもの。

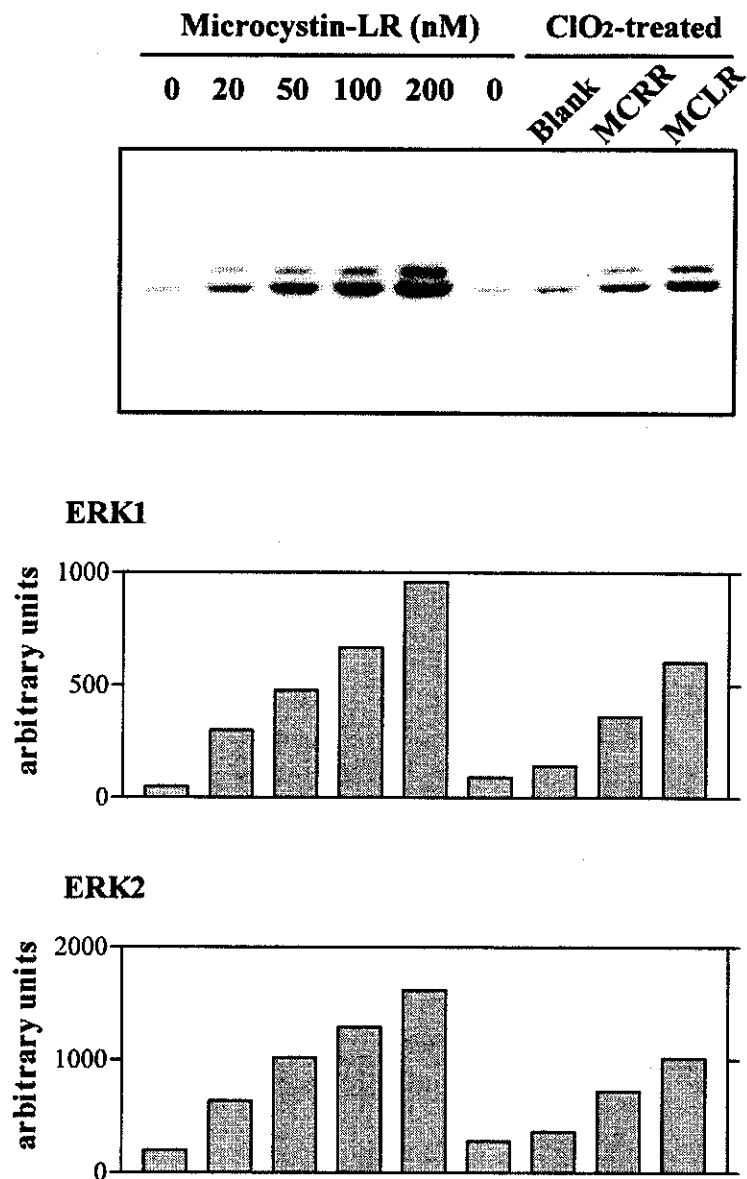


図 1 Microcystin-LR および二酸化塩素処理 Microcystin 類に曝露したラット肝細胞の ERK1/2 リン酸化

6 時間曝露後の肝細胞から調製した lysate 中のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、Western blot によりリン酸化 ERK1/2 を検出した。それぞれのバンドの濃さを ScnImage を用いて解析した結果を棒グラフとして示した。

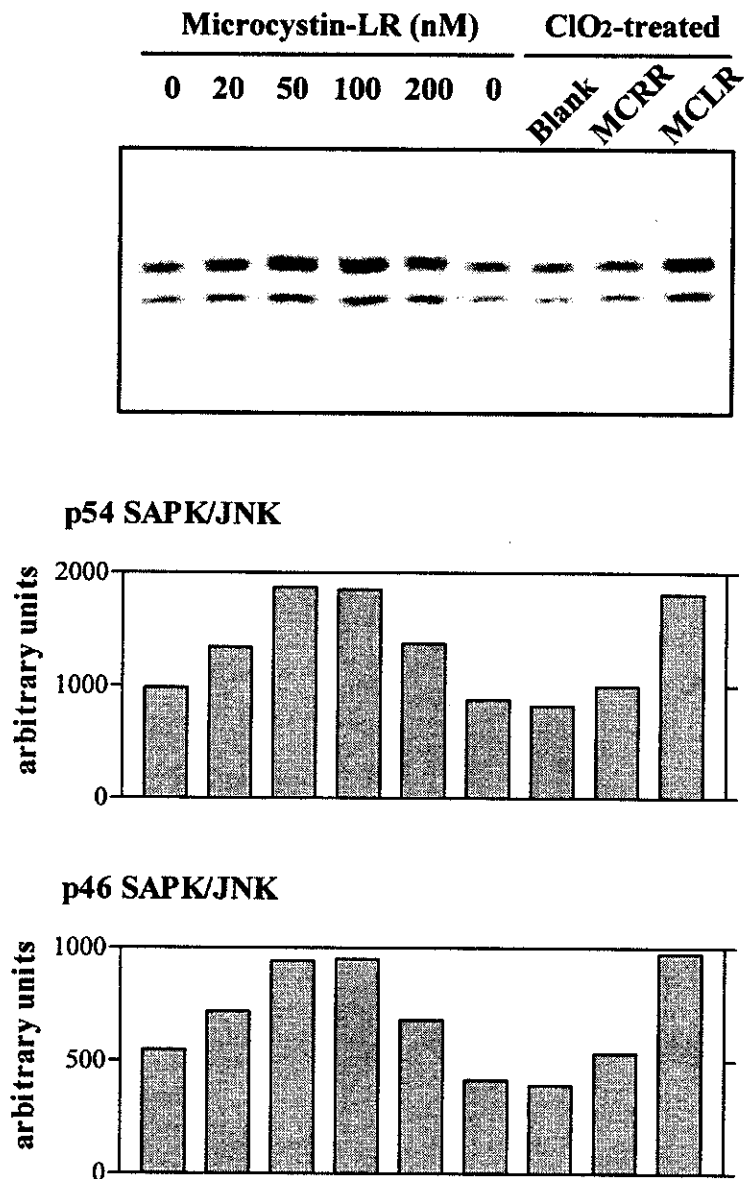


図 2 Microcystin-LR および二酸化塩素処理 Microcystin 類に曝露したラット肝細胞の SAPK/JNK リン酸化

6 時間曝露後の肝細胞から調製した lysate 中のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、Western blot によりリン酸化 SAPK/JNK を検出した。それぞれのバンドの濃さを ScnImage を用いて解析した結果を棒グラフとして示した。

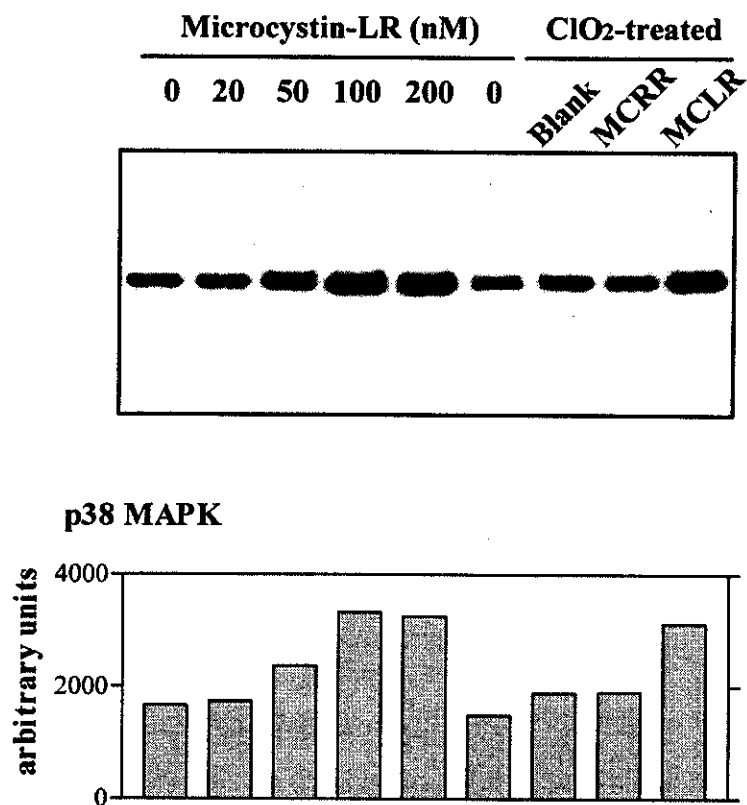


図 3 Microcystin-LR および二酸化塩素処理 Microcystin 類に曝露したラット肝細胞の p38 MAPK リン酸化

2 時間曝露後の肝細胞から調製した lysate 中のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、Western blot によりリン酸化 p38 MAPK を検出した。それぞれのバンドの濃さを ScnImage を用いて解析した結果を棒グラフとして示した。

4. Anatoxin-a の毒性に関する文献調査

4.1 anatoxin-a の急性毒性とそのメカニズム

Anabaena、*Aphanizomenon*、*Oscillatoria* などの藍藻類が産生する anatoxin-a (2-acetyl-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene)は、図 1 に示した化学構造をもつアルカロイド毒素である。anatoxin-a をマウスに腹腔内投与した場合の LD₅₀ は 200 µg/kg で、生存時間は 4~7 分である (Carmichael, 1989)。静脈投与による anatoxin-a の急性毒性は腹腔内投与の場合よりも強く、その LD₅₀ は 100 µg/kg 未満である (Fawell *et al.*, 1994)。これに対して経口で投与した場合の LD₅₀ はこれらの値より少なくとも 1 桁高い 1-10 mg/kg の範囲であり、投与後の潜伏時間を経て攣縮、喘ぎ、痙攣、致死などの中毒症状が現れる (Astrachan *et al.*, 1980)。

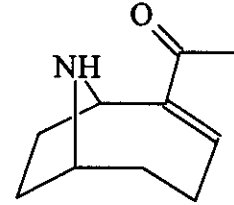


図1 Anatoxin-aの化学構造

anatoxin-a は代表的なニコチン性アセチルコリンレセプター作動物質であり、その作用は神経伝達物質であるアセチルコリンよりも約 20 倍強力である (Thomas *et al.*, 1993)。ニコチン性アセチルコリンレセプターは骨格筋、自律神経節、脳および副腎髄質などに分布するイオントロピック型レセプターであり、神経伝達物質アセチルコリンが結合してニコチン性アセチルコリンレセプターが活性化されると陽イオン選択性チャネルを開放して主に Na⁺を透過させる。その結果、後シナプス細胞が脱分極を起こして興奮性シナプス後電位が発生し、例えば神経筋接合部では最終的に筋肉の収縮が起きる (図 2)。anatoxin-a は神経筋接合部においてニコチン性アセチルコリンレセプターに結合して持続的な刺激を引き起こし、脱感作とよばれる現象によってそれ以降の電氣的な伝達を遮断する。このような伝達は骨格筋の活動に必要不可欠であるため、十分に高い投与量の anatoxin-a は筋肉の麻痺によって窒息死を引き起こす (Carmichael, 1989)。

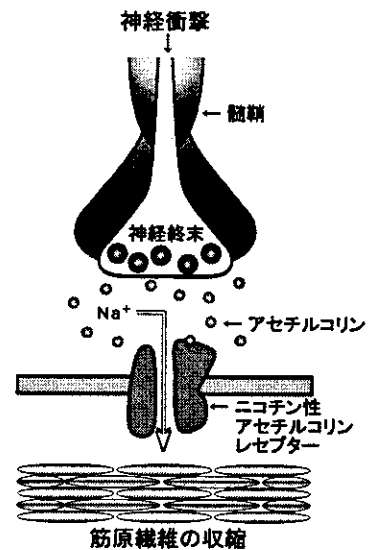


図2 神経筋接合部における化学的伝達の過程

4.2 anatoxin-a の 28 日間反復投与毒性試験

前述した anatoxin-a の急性毒性については数多くの報告が存在するが、リスクアセスメントに使用できるような長期間の研究は極めて少ない。ここでは、Fawell *et al.* (1999)によって最近報告された anatoxin-a の 28 日間反復投与試験の概要を記す。

[実験方法] 1群が雌雄各10匹で構成される4群のマウスに対して、0(溶媒対照)、0.12、0.6あるいは3 mg/kg 体重/日の投与量で anatoxin-a 塩酸塩(純粋な anatoxin-a としてそれぞれ 0.098、0.49、2.46 mg/kg 体重/日に相当する)を1日1回、28日間にわたって胃管投与した。全ての動物について臨床的な毒性症状あるいは疾病の有無を毎日検査した。体重および摂餌量は1週間ごとに記録し、眼の試験は投与の開始時および終了時に行った。血液学および血清生化学的な試験のために最後の週に血液試料を採取した。投与期間中に死亡した動物の組織とともに、対照群および高投与群の動物の全ての組織を顕微鏡で検査した。全ての動物を屠殺する際に、組織障害の有無を精査した。

[実験結果] 試験期間中に3匹のマウスが死亡した。0.6 mg/kg 体重/日投与群の雄1匹と3 mg/kg 体重/日投与群の雌1匹がそれぞれ10日目、14日目に死亡した。死亡するまでの間、これら2匹のマウスに顕著な臨床症状は観察されなかったが、投与後2.5時間以内に死亡した。剖検からも顕著な知見は得られず、顕微鏡による検査でも死因を特定することはできなかった。したがって、これらの死亡例が anatoxin-a 投与に関連している可能性を完全に除外することはできない。3例目は anatoxin-a 投与に関連するとは考えられず、0.12 mg/kg 体重/日投与群の雄が同じケージ内の他のマウスに攻撃された兆候が見られたため人道的な理由で屠殺した。体重および体重増加量の平均はこれらの投与群の間で差異はなく、摂餌量および検眼鏡検査の結果も同様であった。臓器重量あるいは体重あたりの臓器重量には anatoxin-a 投与に起因すると考えられる差異は認められなかった。肉眼による検査および顕微鏡による検査においても、全ての検査結果は試験に用いたものと同じ週齢、系統の無処理のマウスでみられる通常の変動の範囲内であり、毒性症状はみられなかった。2つの血液学的な指標にわずかながら統計学的に有意な変化が観察された。雄 anatoxin-a 投与群のヘモグロビンの平均値と雌投与群のヘモグロビン濃度の平均値に増加がみられた。しかし、これらの変化に毒性学的な意義があるとは考えられない。それ以外の血液学的な指標には統計学的に有意な変化は認められなかった。血液生化学的な試験の結果から、0.6 mg/kg 体重/日投与群あるいは3.0 mg/kg 体重/日投与群の雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)レベルの平均値に若干の増加が認められたが統計学的な有意差はなかった。これは各投与群で2、3匹の個体が非常に高いASTレベルを示したことに起因すると考えられる。これに関連した組織学的な変化およびその他の生化学的な変化がみられないことから、観察されたASTレベルの変化に生物学的な意義があるとは考えられない。統計学的な有意差が得られたその他の指標もその変動はわずかであり、また投与量依存性も認められなかった(雌投与群のナトリウムは例外であるが、この変化も生物学的な意義があるとは考えられない)。28日間にわたる anatoxin-a の経口投与で得られた最大無作用量(NOEL)は0.12 mg/kg 体重/日であった。anatoxin-a 塩酸塩を投与したため、これは純粋な anatoxin-a として

0.098 mg/kg 体重/日に相当する。この研究での anatoxin-a 塩酸塩の真の NOAEL は実際には 3.0 mg/kg 体重/日かもしれないが、高投与群で 2 匹のマウスが死亡した原因を特定できなかったことは、anatoxin-a 投与との関連を除外できないことを意味している。

著者らは、この 28 日間反復投与毒性試験で得られた最も控えめな NOAEL 0.098 mg/kg 体重/日をもとに、体重 10 kg の子供が 1 日 1 l の飲料水を摂取すると仮定して、飲料水の中の anatoxin-a の”guideline value”として 1 µg/l を提案している (不確実係数は 1000 を採用した)。

参考文献

- (1) Astrachan NB, Archer BG, Hilbelink DR. (1980) Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicol.* 18: 684-688.
- (2) Carmichael WW (1989) Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In: *Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics*. Owenby-CL, Odell-GV (eds.) Pergamon Press, Oxford, 3-16.
- (3) Fawell JK, Pames HA (1994) Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of anatoxin-a and method for its determination in reservoir water. FWR Report No. FR0434/DoE 3728.
- (4) Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE, Everett DJ. (1999) The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II anatoxin-a. *Hum Exp Toxicol.* 18: 168-173.
- (5) Thomas P, Stephens M, Wilkie G, Amar M, Lunt GG, Whiting P, Gallagher T, Pereira E, Alkondon M, Albuquerque EX, et al. (1993) (+)-Anatoxin-a is a potent agonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 60: 2308-2311.

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

非イオン界面活性剤の合成中間体である 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 トン程度であったが、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、その後もそのまま横ばいで推移している。また、生産・使用されている 1,4-ジオキサン以外に、ポリオ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、発生源や環境中における挙動は十分に明らかにされていない。1,4-ジオキサンに対しては世界がん研究機関(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、厚生省は「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。

平成 11 年度は、環境水、下水処理水あるいは水道処理過程の水について、1,4-ジオキサンの実態調査を行った。また、生活排水のみ流入する下水処理場と生活排水と事業所排水の両方が流入する下水処理場について非イオン界面活性剤及び 1,4-ジオキサンの流入濃度、流出濃度を測定し、1,4-ジオキサンの生活排水及び事業所排水からの負荷の割合について調査を行った。さらに、一日摂取量の実態推定のために、大気及び食料品経由の摂取量について予備的な調査を行った。

2. 実験方法等

2.1 1,4-ジオキサン試験方法

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。

(1) 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。褐色のアンフ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。褐色のアンフ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、1g 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 2 μ l 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 2 μ l 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 2 μ l 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ォーター(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。

(2)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 1~10 μ l 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 の熔融シリカまたはホウ珪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 0.1~0.2 μ m 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) ウォーターズ社製 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) ウォーターズ社製 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。

(3) 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。(ミネラルウォ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。

(4) 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 を逐次通してコンデিশニングする。サロゲートとして 0.5 μ g 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 で洗浄する。窒素ガス 2kg/cm²で 20 分間以上パージして充分水分を除去する。2ml のアセトン(注1)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(1~2 μ l)をとり、スプリットレス方式でガスクロマトグラフィー質量分析計に注入する。SIM 法又はマスキンググラフ法を用いて、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認、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2)。
- 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: 1. 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取り、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: 「(7)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) 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 イオンがあるので、アセトンの方がよい。

(注2) 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、河川水・地下水等の水道原水や下水および浄水を対象とし、1,4-ジオキサンを測定した。

2.3 1,4-ジオキサンの摂取量調査

1,4-ジオキサンの摂取量調査を実施するためのプロトコールを作成した。今後これを基にマーケットバスケット方式による摂取量調査を行うこととしている。

3. 結果

3.1. 実態調査

本研究を分担した各機関における環境水、下水処理水あるいは水道処理過程の水について、1,4-ジオキサンおよび、1,1,1-トリクロロエタンの調査結果を表1に示す。

1,4-ジオキサンでは、115河川水中111河川水の約97%で検出され、その濃度は $2.5 \mu\text{g/l}$ の値を示した。また地下水では、68地下水のうち実に93%の63地下水で存在が確認され、その濃度も河川水より高い $5 \mu\text{g/l}$ に近い値であった。一方、下水では、3試料と少ないものの、全流入下水で検出され、 $7 \mu\text{g/l}$ の平均値で最も高い値であった。また、下水処理水では、流入下水の濃度は異なるものの 0.3 から $3.2 \mu\text{g/l}$ の値であった。また、浄水では全ての試料で検出されており、処理により低下していることは見られるものの平均で $1.59 \mu\text{g/l}$ の値を示していた。

また、111-トリクロロエタンは、河川水やその他の水中にはみられず、地下水のみにおいて全試料で検出されその平均値は $0.25 \mu\text{g/l}$ であった。