

により、回帰式を求め、予測値と実測値を比較した結果を図-26に示す。予測値と実測値では、相関がかなり低く ($r=0.34$)、この方法により、浄水場送水のクロホルムから送水末端のジクロ酢酸濃度を予測することは困難であった。

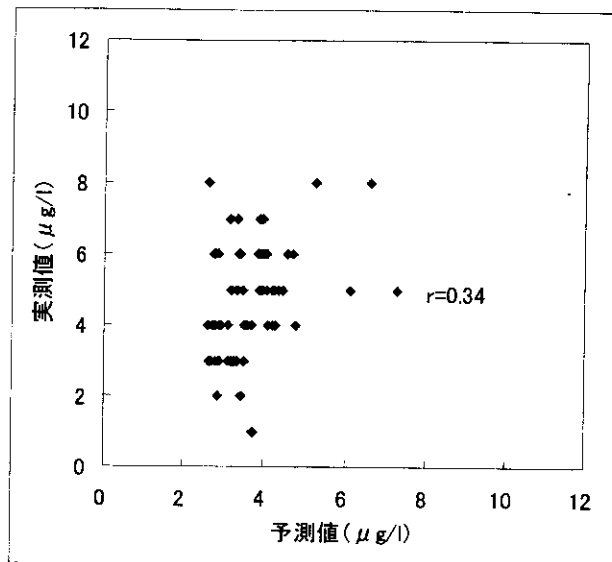


図-26 浄水場送水のクロホルムから予測した送水末端のジクロ酢酸と実測値の関係

4. バイオアッセイからみた塩素処理水の指標副生成物に関する研究

概 要

一般に、配水過程では、トリハロメタンやハロ酢酸の濃度は次第に増大していくことが知られている。一方、MXの濃度は、逆に次第に低下していく。これらはいずれも発がん性を有する副生成物であるが、水道水の有害性の変化を把握するにはどの物質に着目すればよいのだろうか。

本研究は、発がん過程におけるイニシエーション活性、およびプロモーション活性の指標となるバイオアッセイを行うことによって、配水過程における水道水の有害性を比較する目的にはMXが指標物質として適していることを推定したものである。

1. 調査研究の目的と内容

一般に、配水過程では、トリハロメタンやハロ酢酸の濃度は次第に増大していくことが知られている。一方、MXについては不安定性が指摘されてきており、逆に次第に低下していく。これらはいずれも発がん性を有する副生成物であるが、水道水の有害性の変化はどの物質に着目すれば把握できるといえるだろうか。一方、汚濁が進んだ水道原水に塩素処理を行えばトリハロメタンは多く生成するのであり、トリハロメタンの指標物質としての有為性は変わらない。それでは各々の指標物質は、いかなるときに測定意義があり、いかなる限界があると考えればよいのだろうか。

本調査研究は、バイオアッセイによって毒性の大小や変動を測定しつつ、水質管理の場に応じた指標物質を提示することを目的とするものである。

本研究では毒性の測定のために、発がん過程におけるイニシエーション活性、およびプロモーション活性の指標となるバイオアッセイを実施する。イニシエーション活性の指標としてはチャイニーズハムスター肺細胞を用いる染色体異常試験を行い、プロモーション活性の指標としてはマウス繊維芽細胞を用いる形質転換試験を行う。

これらの試験法を用いて、塩素処理後の水の染色体異常誘発性、形質転換誘発性の変化と、副生成物の濃度変化を測定し、両者の対応関係について検討する。その結果から、配水過程における水道水の有害性を比較する目的に適した指標副生成物を提示する。

ただし、本研究の範囲では、水の発がんに関連する有害性を *in vitro* 試験によって測定しており、毒性と指標副生成物との関連はあくまで推定できるにとどまる点に注意が必要である。

2. 試薬フミン酸を用いた基礎的検討

はじめに、自然水中有機物質のモデルとして試薬フミン酸をとりあげ、その塩素処理水に関する基礎的検討を行った。

2.1 実験方法

2.1.1 バイオアッセイ法

(1) 染色体異常試験法^{1,2)}

染色体異常試験には、新生チャイニーズハムスター肺細胞（細胞名 CHL/IU、大日本製薬）を使用した。染色体標本は1000倍で検鏡するとともに、任意の50細胞に対して、画像解析（Nikon LUZEX2D 使用）を行い、異常染色体を定量化した。染色体異常は大きく切断型、交換型の2つに分けられるが、本法では、交換型異常のみを検出している。染色体異常誘発性は、50細胞中の交換型異常検出数（異常染色体数/50細胞）で表した。陰性対照の交換型異常検出数は、平均4.5/50細胞、標準偏差2.6であった。

培養液19mLに対して試料は1mL添加した。この結果、培養液中で試料は20倍に希釈されている。

（2）形質転換試験法^{3,4)}

形質転換試験法には、マウス繊維芽細胞 BALB/3T3A31-1-1（JCRB0601、ヒューマンサイエンス振興財団）を使用した。試験は、Tsuchiyaらによる改良法にしたがった⁴⁾。はじめにイニシエーターとして既知の発癌性物質である3-メチルコラントレン（3-MC）を作用させ、DNAに損傷を与える。その後、試料を加え形質転換した細胞を検出する。このように2段階で化学物質を作用させることから二段階形質転換試験ともよばれており、発がん過程のプロモーション段階の有害性を検出する指標となりうる。

3-メチルコラントレン（3-MC）の添加濃度は0.5mg/L、処理時間を2日とした。その後、試料を3～5日に一度の割合で培地交換しつつ添加し、約2週間培養する。培養終了後、ギムザ染色を行い、標本を作製する。標本を画像解析により解析し、形質転換を起こしたとみられるコロニーを定量した³⁾。結果は、形質転換誘発率として表した。3-MCを作用させただけの陰性対照の形質転換誘発率は、平均0.0318、標準偏差0.0053であった。

一方、3-MCを作用させず、はじめから試料を添加し続ける方法があり、これは非二段階形質転換試験とよばれている。試料の遺伝子障害性を含めた有害性を測定できる方法といえる。この場合の陰性対照すなわち何も添加していない細胞における形質転換誘発率は、平均0.0109、標準偏差0.0020であった。

2.1.2 試薬フミン酸の塩素処理

試薬フミン酸には、和光純薬製のものを用いた。フミン酸溶液（1080mg-TOC/L）にリン酸緩衝液（200nM）を加えた後、次亜塩素酸ナトリウムを添加し、密閉状態、pH7.0、20℃の条件で暗所に3日間静置した。この間に添加した塩素の95%以上が消費された。脱塩素は行わず、そのまま染色体異常試験、形質転換試験の試料とした。試料水中の残留塩素は200mg/Lまでは試験結果に影響を与えないことを確認している。

塩素処理水の毒性と副生成物との関係を調べるため、加水分解の影響について検討した。塩素を2000mg/L添加し、pH 5として、同様に3日間反応を行わせ、塩素処理水を作製する。その後、pHを所定の値に再調整した。この水について、経時的に染色体異常誘発性、形質転換誘発性、および副生成物濃度の変化を測定した。なお、このpH調整操作は、加水分解反応の影響について検討するためのもので、実際の浄水過程での操作を意図したものではない。

2.1.3 分析方法

クロロホルム、抱水クロラールはそれぞれヘキサン、MTBEで抽出して、GC-ECDで

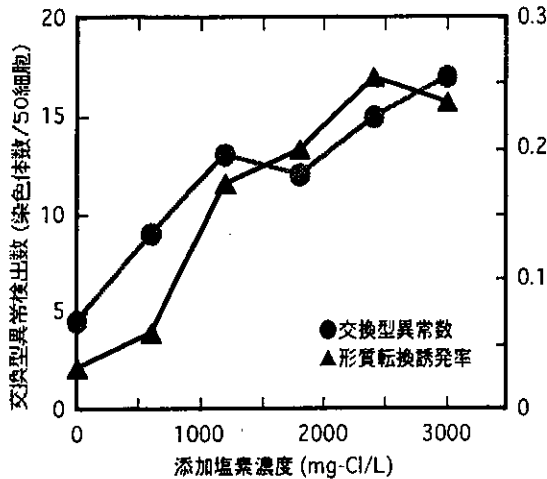


図1 塩素処理した試薬フミン酸の染色体異常誘発性と形質転換誘発性

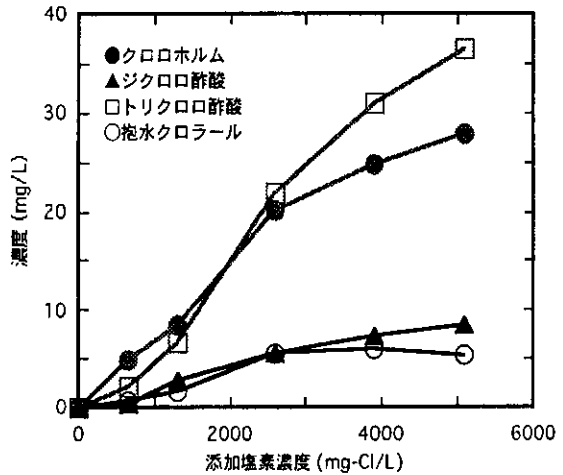


図2 試薬フミン酸の塩素処理による副生成物生成

測定した⁵⁾。ハロ酢酸は、ジアゾメタンでメチル化した後、GC/MSで測定した⁵⁾。

染色体異常誘発性の指標のひとつになりうるものとしてカルボニル化合物⁶⁾を測定した。酸性亜硫酸ナトリウムを用いる滴定法⁷⁾によってアルデヒドおよびメチルケトン炭素を定量する方法を用いた。これは試料水に一定量の亜硫酸ナトリウムを添加して反応させ、その後過剰の亜硫酸イオンをヨウ素で滴定するものである。結果はカルボニル基炭素量として表示した。

2.2 実験結果と考察

(1) 染色体異常誘発性、形質転換誘発性および副生成物濃度の変化

図1は、塩素添加にともなう染色体異常誘発性、形質転換誘発性の生成を調べた結果である。形質転換誘発性は二段階試験の結果である。添加塩素量1000mg/Lのところから、ほぼTOC:Cl=1:1に相当するが、染色体異常誘発性、形質転換誘発性ともに3000mg/Lまで増大している。

図2はこのときの副生成物を調べた結果である。図1の誘発性に対する、生成したこれ

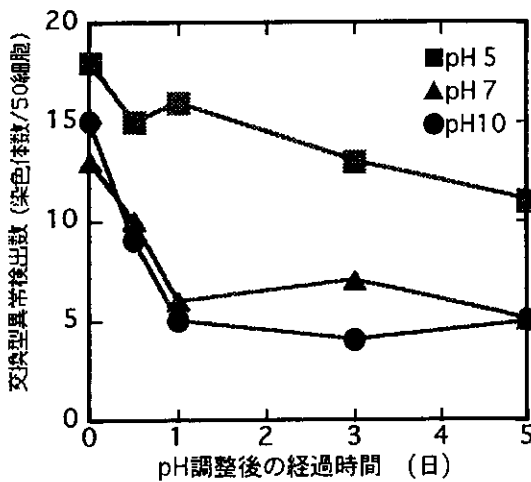


図3 染色体異常誘発性の変化

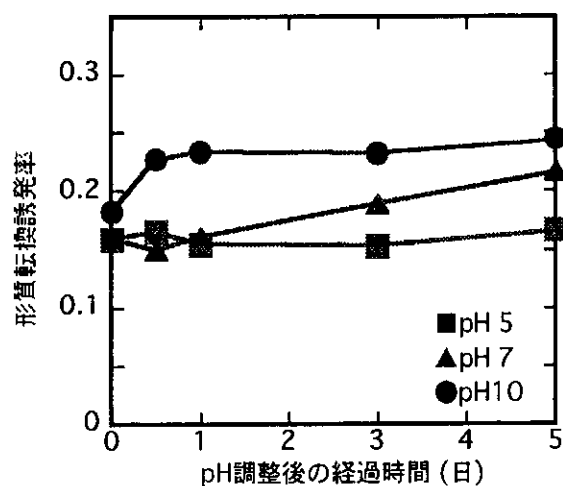


図4 形質転換誘発性の変化

ら生成物の寄与は非常に小さいことがわかっている。例えば、ジクロロ酢酸の場合、染色体異常誘発性に対する寄与率は0.2-1.2%、形質転換誘発性に対する寄与率は0.1-0.4%である。

図3は、染色体異常誘発性の変化を示したものである。明らかに不安定で、次第に低減していくものであることがわかる。pH値が高いほど速やかに低減している。

図4は、二段階試験によって測定された形質転換誘発性の変化を示したものである。増大傾向を示し、pH値が高いほど増大速度も大きいことがわかる。

図3、4から、染色体異常誘発性と形質転換誘発性とは変化傾向が全く逆であることが明らかとなった。

このときのクロロホルムとジクロロ酢酸濃度の変化を、それぞれ図5、6に示す。ともに増大し、pH値が高いほど増大速度も大きい。

一方、TOXおよびカルボニル化合物の変化を、それぞれ図7、8に示す。ともに減少し、pH値が高いほど減少速度も大きいことがわかる。ただし、減少速度は両者の間で異なっている。

ほかに、プロモーション活性との関連を想定して芳香族有機塩素化合物を測定したが、形質転換誘発性が増大する(図4)のとは逆に低減する結果となった⁸⁾。

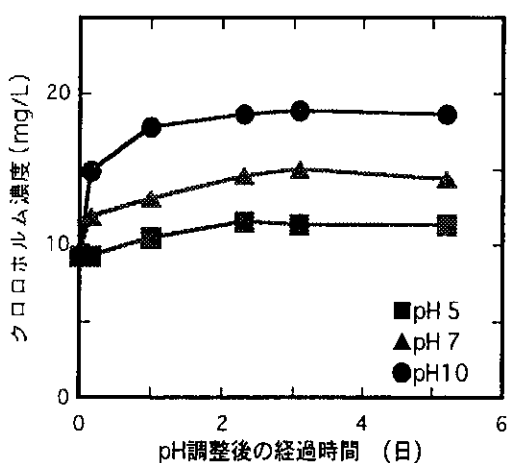


図5 クロロホルム濃度の変化

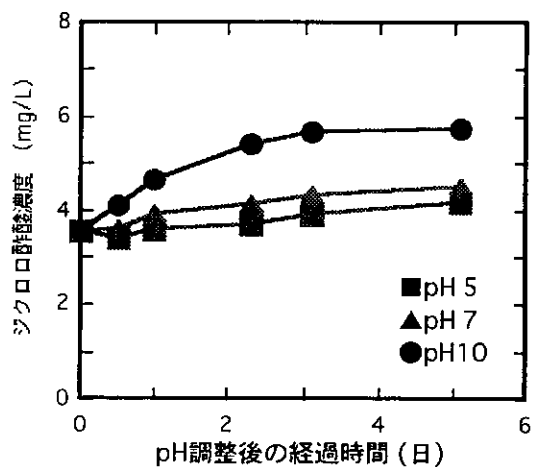


図6 ジクロロ酢酸濃度の変化

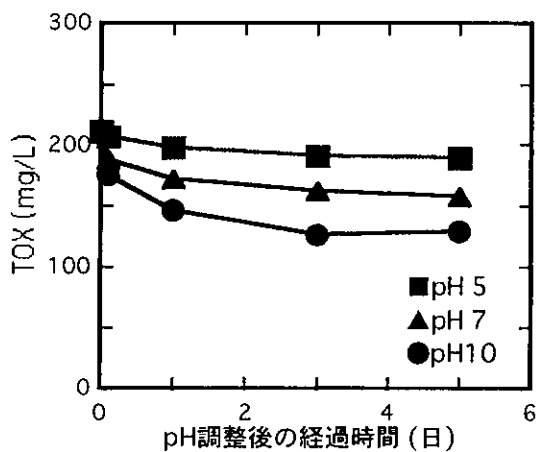


図7 TOXの変化

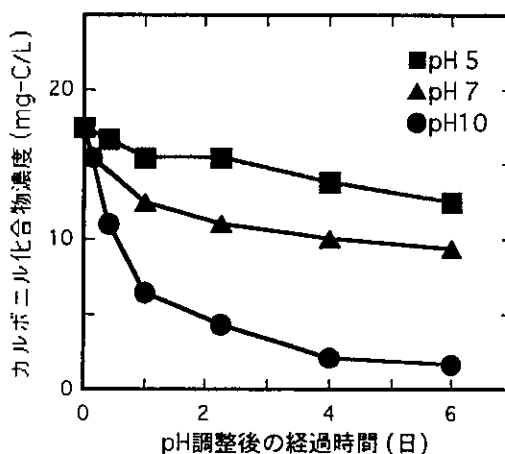


図8 カルボニル化合物の変化

以上の結果、定性的に、TOX とカルボニル化合物は染色体異常誘発性の変化傾向に一致し、クロロホルムとジクロロ酢酸は形質転換誘発性と変化傾向が一致することがわかった。

次に低減または増大速度を求めてみる。低減速度については次の一次反応を仮定した式を用いる。

$$I_t = I_0 \cdot \exp(-K_t t) \quad (1)$$

ここに、 I_0, I_t : 初期または t 時間後の誘発性または物質濃度、 K_t : 減少速度定数。図 9 に結果を示す。染色体異常誘発性の低減は、TOX とカルボニル化合物の低減よりも速やかであることがわかる。

染色体異常誘発性の低減は、pH すなわち水酸化物イオンの濃度と比例関係にある点特徴である⁹⁾。また、この低減速度を、二酸化塩素処理水の染色体異常誘発性の低減速度と比較すると、塩素処理水の方が大きくより不安定であることを示した¹⁰⁾。二酸化塩素処理水の染色体異常誘発性の方がより安定であることを意味する。二酸化塩素処理によって生成する有機塩素化合物は極めて少量で、変異原性も低いとされる。実際、染色体異常誘発性は二酸化塩素処理水の方が弱い。しかし、その染色体異常誘発性は、二酸化塩素処理水の方がより安定であるので、時間の経過とともに塩素処理水との差は縮まっていき、約 4 日後には同じレベルに達する。さらにその後は大小関係が逆転し、二酸化塩素処理水の染色体異常誘発性の方が大きくなることを推定した¹¹⁾。

一方、増大速度については、前駆物質の存在を仮定した次式によって定量化する。

$$P_t = P_0 + (P_m - P_0)(1 - \exp(-K_t t)) \quad (2)$$

ここに、 P_0, P_t : 初期または t 時間後の誘発性または物質濃度、 P_m : pH10 における最大値。図 10 に結果を示す。形質転換誘発性の増大はクロロホルムやジクロロ酢酸よりもやや速やかである。

(2) 非二段階試験による形質転換誘発性の変化

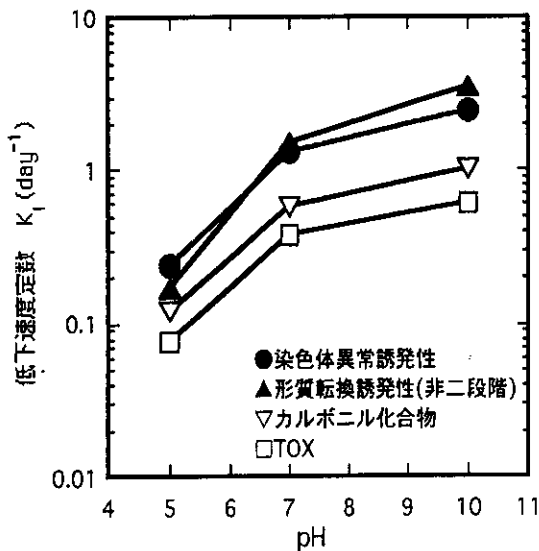


図 9 塩素処理後の低下速度

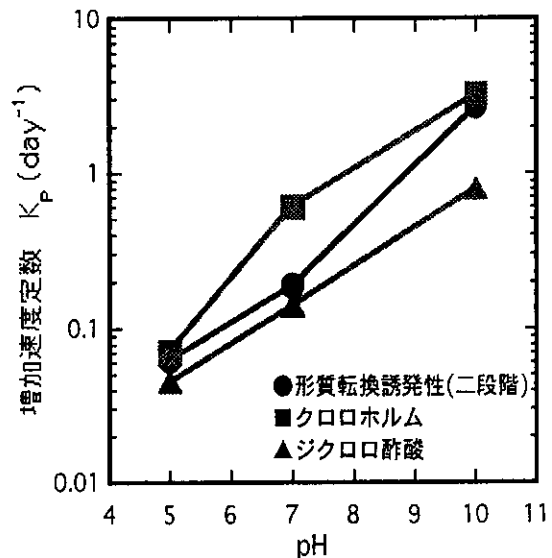


図 10 塩素処理後の増加速度

図11は、非二段階試験によって測定した形質転換誘発性の変化を示したものである。形質転換誘発性は次第に低減する結果となった。また、pH値が高いほど低減速度は大きい。この傾向は、図4の二段階試験の結果とは逆で、図3の染色体異常誘発性の変化傾向と一致している。非二段階試験では、イニシエーション過程を含めた形質転換誘発性を測定しているが、図11は、この活性が次第に低減していくことを示したものと重要である。

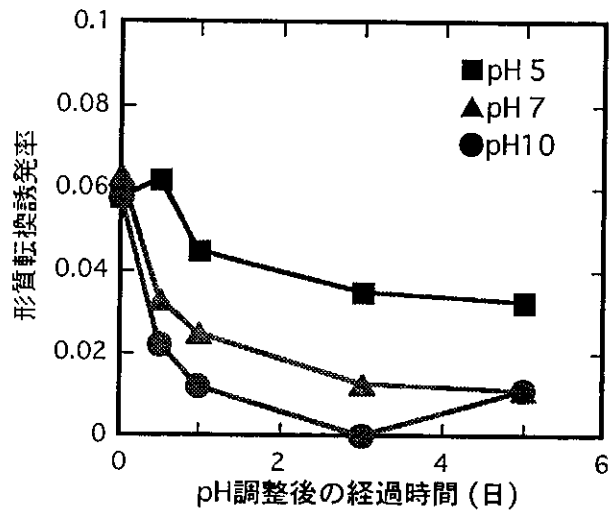


図11 形質転換誘発性の変化
(非二段階形質転換試験の結果)

図11でみられた減少速度を定量化

した結果を図9中に同時に示した。非二段階試験による形質転換誘発性の低減速度は、染色体異常誘発性の低減速度と同レベルであることがわかる。すなわち、染色体異常誘発性として測定されるイニシエーション活性が大きく低減した結果、非二段階の形質転換誘発性も低減したと考えることができる。またこの結果は、塩素処理水のイニシエーション活性がプロモーション活性よりもはるかに大きいことを示唆している。

以上から得られた重要な結果は、クロロホルムやジクロロ酢酸のような典型的な副生成物が増大していくのとは逆に、塩素処理水の発がんに関連する有害性は次第に低減していくと推定される点である。

(3) 他の化学物質との比較

文献からイニシエーション活性、プロモーション活性またはその両方の活性をもつと考えられる物質を選定し、染色体異常試験および二段階の形質転換試験に供した。図12に14物質の結果を示す。横軸は染色体異常誘発強度、縦軸は形質転換誘発強度を示している。さらにこの平面上に、図3、4におけるpH7の結果を同時に示した。経時的変化は矢印によって示されている。

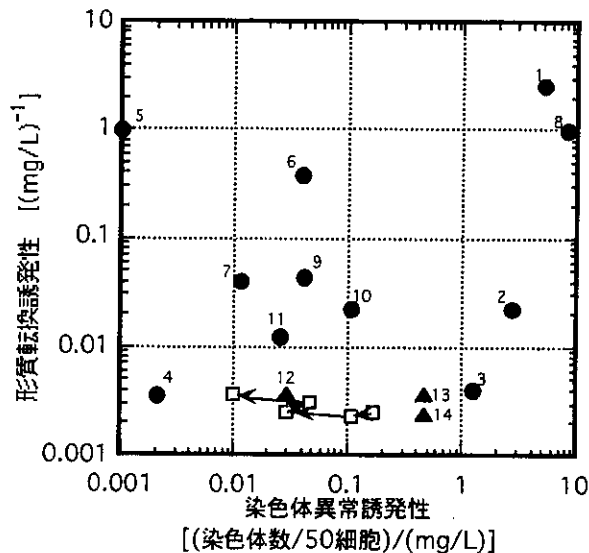


図12 染色体異常誘発性と形質転換誘発性の関係
形質転換試験は二段階試験による。

□→□は、塩素処理水の変化を示す。

まず、塩素処理水の初期の水についてプロットされ

- 1, 4-NQO; 2, Kercetin; 3, 5-fluorourasil; 4, sodium nitrite; 5, TPA; 6, mezerein; 7, BHA; 8, 3-MC; 9, teoferin; 10, urea; 11, caffen; 12, chloroform; 13, dichloroacetic acid; 14, trichloroacetic acid.

た位置を他の物質と比較すると、塩素処理水は形質転換誘発性よりも染色体異常誘発性の方が強いことがわかる。先に考察したように、染色体異常誘発性が大きく低減するとともに、非二段階の形質転換誘発性も低減したのはこのためであろうと推察できる。次に、その後の変化をみると、形質転換誘発性は増大するも

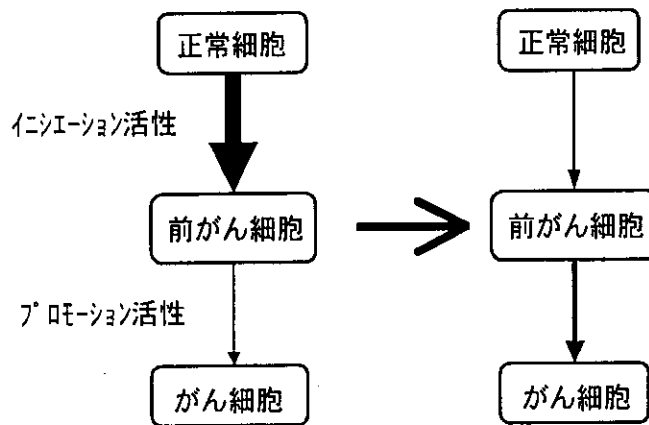


図13 塩素処理水のイニシエーション活性・プロモーション活性の変化推定図

のその変化量はわずかであり、染色体異常誘発性の方が大きく低減していることがわかる。この変化を図示したものが図13である。塩素処理水はイニシエーション活性の方が強いいため、この変化によって全体としては、有害性は低減するものと考えられる。

ここで行ったバイオアッセイは、いずれもイニシエーション活性およびプロモーション活性の指標として行っているものである。しかし、得られた知見からは、塩素処理水の発がんに関連する有害性は、イニシエーション活性が卓越するもので、時間とともに次第に低減していくと推定するのが妥当と考える。

2.3 ま と め

- 1) フミン酸の塩素処理水の染色体異常誘発性は、塩素処理後時間とともに次第に低減した。一方、形質転換誘発性（二段階試験）は次第に増大し、両者の変化傾向は全く逆であった。
- 2) TOX とカルボニル化合物は定性的に染色体異常誘発性の変化傾向に一致し、クロロホルムとジクロロ酢酸は形質転換誘発性と変化傾向が一致していた。
- 3) 非二段階試験によって測定した形質転換誘発性は次第に低減した。この傾向は、二段階形質転換試験の結果とは逆で、染色体異常誘発性の変化傾向と一致した。
- 4) 得られた結果を総合すると、塩素処理水の発がんに関連する有害性は、イニシエーション活性が卓越するもので、時間とともに次第に低減していくと推定するのが妥当と考えられた。

3. 琵琶湖水を用いた検討

ここでは自然水として琵琶湖南湖水を用いて実験的検討を行う。

3.1 実 験 方 法

琵琶湖南湖表流水を採水（1999年11月24日、TOC 2.7mg/L）し、グラスファイバーフィルター（AP40、MILLIPORE）により吸引濾過を行った。塩素要求量計（CD-20型、セントラル科学株式会社）を用いて塩素要求量を求め（約1.2mg/L）、これに加えて塩素

濃度が1mg/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウムを添加した。塩素添加後は20℃、暗所、密封条件下で静置した。この間pH調整操作は行わなかったが、7付近で大きな変動はなかった。

試料の濃縮には変異原性物質の回収に優れているとされるCSP800樹脂を用いた¹²⁾。Sep-Pak Plus(Long)CSP800（日本ウォーターズ）は、三菱化成製MCIゲルCSP800を内容積約2mLのカートリッジに充填して販売されているものである。コンディショニング、吸着、脱離の各操作は、浦野の方法¹²⁾にしたがって行った。脱離にはDMSOを用い、試水30Lを3mLに濃縮した。

この濃縮法では、脱離にDMSOを使用し、脱離液はそのまま細胞投与の試料となることから、揮発性物質も試験対象とすることが可能な方法である。また、本法によれば、変異原活性の90%以上を回収できるという¹²⁾。

濃縮試料は、染色体異常試験の場合には培養液12mLに対して0.06mL添加し、DMSO濃度は培養液中で0.5%とした。形質転換試験の場合は、培養液6mLに対して0.25%にあたる0.015mLを添加した。染色体異常試験法および形質転換試験法は、試薬フミン酸の場合と同様である。

MXは、CSP800カートリッジを用いる固相抽出操作を行い、2%硫酸・メチルアルコール溶液を添加してメチル化を行った後、GC/MSで測定した⁵⁾。クロロホルム、抱水クロラール、ハロ酢酸は、2.1.3の方法と同様である。

3.2 実験結果と考察

染色体異常試験の結果を図14に示す。染色体異常誘発性は塩素注入後増加し1日以内に最大となった。その後は、経時的に低減していった。

形質転換誘発性（二段階試験）の結果を図15に示す。増加傾向を示し、染色体異常誘発性とは逆であった。

さらに、非二段階の形質転換試験の結果を図16に示す。低減する傾向にあることがわかる。

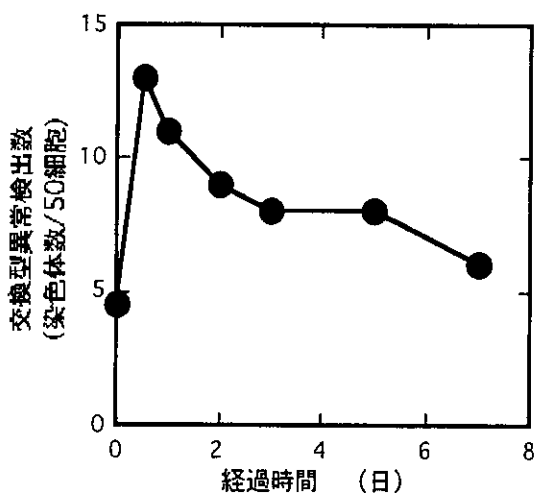


図14 塩素処理した琵琶湖水の染色体異常誘発性の変化

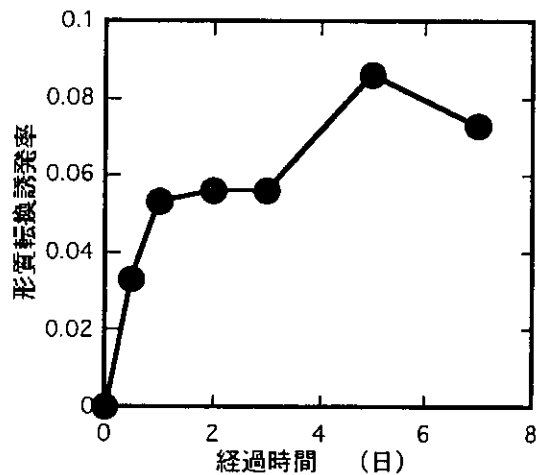


図15 塩素処理した琵琶湖水の形質転換誘発性の変化
形質転換試験は二段階試験による。

以上の結果は、試薬フミン酸を用いた結果と定性的に一致しているといえる。

さて、副生成物のうち、MXの変化を図17に示す。一般に水道水中でのMX濃度は数ng/L以下であると報告されてきているのと比較すると測定値はかなり高く、この測定値そのものは再検討を要する。しかし、変化傾向を論ずることは可能と考えられ、図17より、MXは生成後次第に低減することがわかる。実際、標品MXを用いた実験によっても水中での不安定性が示されてきている^{13,14)}。

また、生成し定量できたトリハロメタン3種の変化を図18に示す。3種類とも増加する傾向にある。トリクロロ酢酸および抱水クロラールの結果を図19に示すが、ジクロロ酢酸は定量できるほどには生成していなかった。トリクロロ酢酸、抱水クロラールともに増加している。

一方、TOXの変化を図20に示す。次第に増加する結果となっており、試薬フミン酸を用いた結果(図7)とは異なっている。

琵琶湖水を用いた以上の結果、まず、

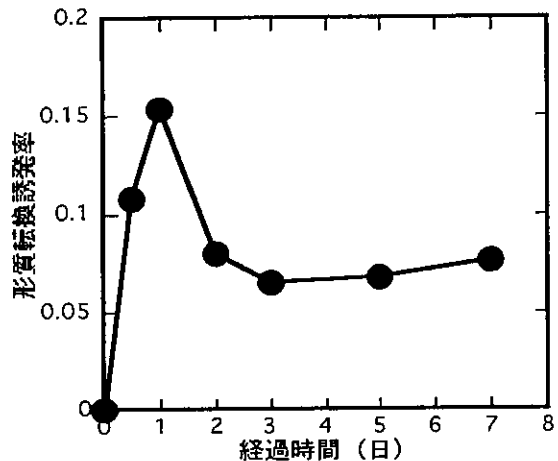


図16 塩素処理した琵琶湖水の形質転換誘発性の変化
形質転換試験は非二段階試験による。

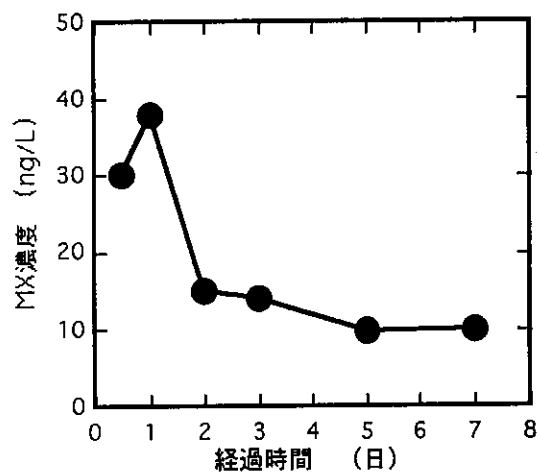


図17 塩素処理した琵琶湖水中のMX濃度の変化

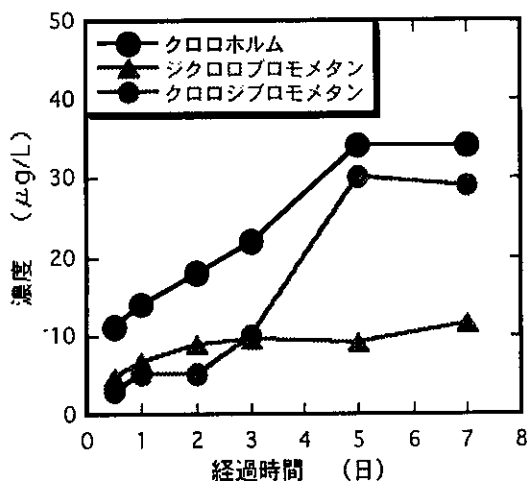


図18 塩素処理した琵琶湖水中のトリハロメタン濃度変化

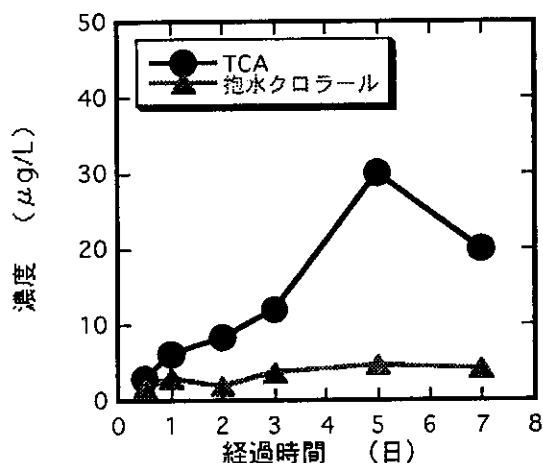


図19 塩素処理した琵琶湖水中のトリクロロ酢酸、抱水クロラール濃度変化

染色体異常誘発性、二段階形質転換誘発性、非二段階形質転換誘発性の変化傾向については、試薬フミン酸を用いた実験結果と一致していることがわかった。そして測定した副生成物のうちでは、MXがこの有害性の変化傾向とよく対応しているものと考えられる。

次節では変化速度を定量化し、有害性の変化をどの程度追従できるかを検討する。

最後に、本実験結果の見方や限界などについて考察を行っておく。

まず、本研究で行ったようなバイオアッセイを実施するためには、上述のように試料水を濃縮する必要があるが、水中物質を平等に濃縮することはできない。すなわち、ここに示したバイオアッセイは、濃縮によって回収できた物質のみの毒性を検出しているという限界がある。

しかし、濃縮操作を必要としない試薬フミン酸を用いた結果と、濃縮した琵琶湖水で得られた結果は、TOXを除きほぼ同様の变化傾向を示していた。すなわち、本調査研究で行った濃縮操作にともなう上記限界は、結論に大きな影響を与えないと推定することができる。恐らく、CSP800樹脂を用い、揮発性物質を含む変異原物質の90%以上を回収できるとされる方法を採用しているためであろう。

また、ここで行った染色体異常試験および形質転換試験は、それぞれイニシエーション活性、プロモーション活性の指標として行った*in vitro*バイオアッセイである。したがって、その結果と試料の毒性との関係はあくまで推定できるとどまるものであり、この点慎重さが求められる。しかし*in vivo*試験によっては、ここで示した毒性の経時変化を追跡することは極めて困難であろう。すなわち、ここに示した結果は、水質管理の場に応じたバイオアッセイを活用する例を示すものとなっていると考える。

4. MXのバイオアッセイと水中での挙動に関する検討

4.1 実験方法

染色体異常試験、形質転換試験とも前述した方法と同様である。

水中でのMXの変化に関する実験では、まずMX標準液（和光純薬）をpH7、67mMリン酸緩衝液とした。ただしMX標準液にはアセトンが用いられている。所定濃度の次亜塩素酸ナトリウムを添加し、20℃、暗所、密閉条件にて静置した。経時的に採水し、MX濃度を測定するとともに、染色体異常試験に供した。

MXは、BSTFA+1%TMCSを用いてTMS化させてから、GC/MSで測定した。

4.2 実験結果と考察

(1) MXの染色体異常誘発性と形質転換誘発性

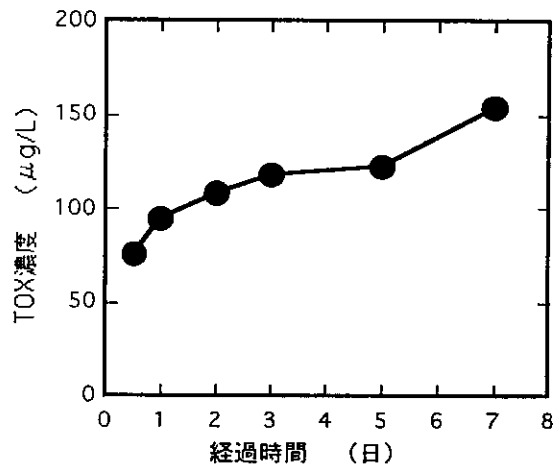


図20 塩素処理した琵琶湖水中のTOX濃度変化

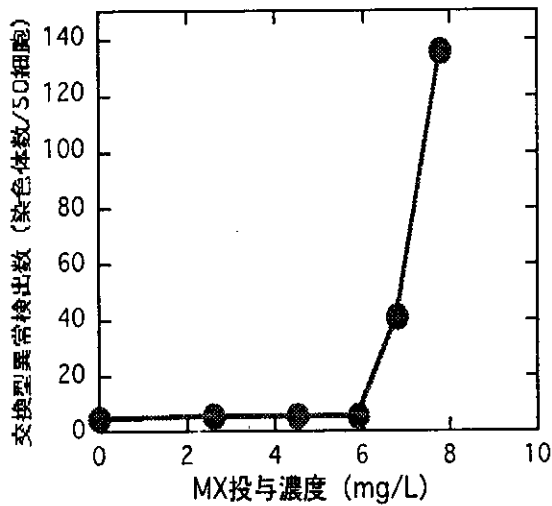


図21 MXの染色体異常試験結果

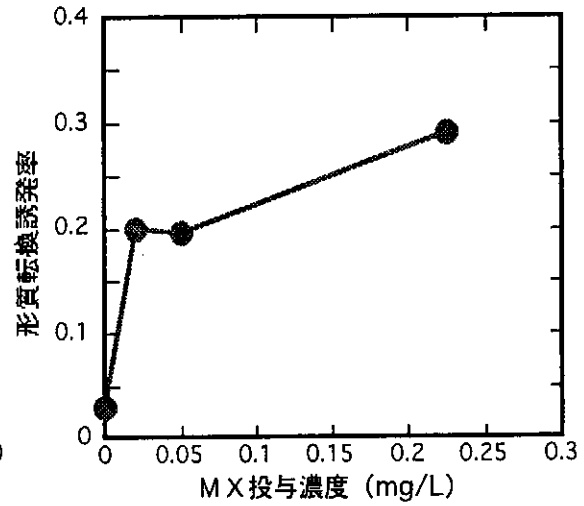


図22 MXの二段階形質転換試験結果

MXの染色体異常試験結果を図21に示す。狭い濃度範囲で急激に異常を誘発するという結果となった。これ以上の投与濃度では、細胞毒性によって試験を行うことができなかった。

二段階の形質転換試験結果を図22に示す。染色体異常試験の場合よりも低濃度で形質転換を誘発した。同様にこれ以上の投与濃度では、細胞毒性によって試験を行うことができない。

以上の試験結果を他の化学物質のそれと比較してみる。MXの染色体異常誘発強度、および形質転換誘発強度を求め、他物質と共にプロットしたものを図23に示す。MXは右上方に位置し、染色体異常誘発強度、形質転換誘発強度ともに強い物質であることが分かる。ここで、右上方に位置する物質群とは、イニシエーション活性とプロモーション活性を有する完全がん原性物質である。MXはこれら物質群に属する物質であるということができる。

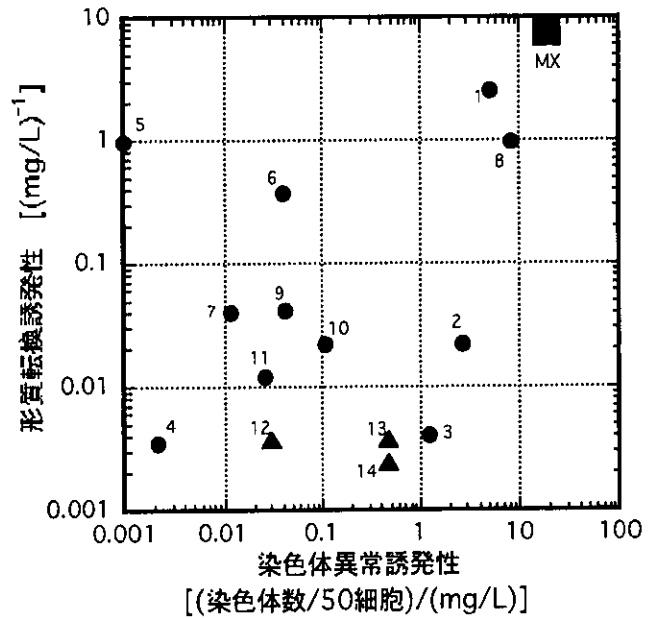


図23 染色体異常誘発性と形質転換誘発性の関係
形質転換試験は二段階試験による。

- 1, 4-NQO; 2, Kercetin; 3, 5-fluorourasil; 4, sodium nitrit
5, TPA; 6, mezerein; 7, BHA; 8, 3-MC; 9, teoferin; 10, ure
11, caffenin; 12, chloroform; 13, dichloroacetic acid;
14, trichloroacetic acid.

てみた。琵琶湖水からのMX生成濃度を考慮すると、寄与率は0.3%以下であると算定された。

ところで、*Salmonella typhimurium* TA100 株(-S9mix)を用いたAmes試験結果からは、これまでにMXの変異原性に対する寄与率が数十%に達することが報告されてきた¹⁵⁾。ところが、本研究のCHLを用いた染色体異常試験によって測定すると、上記のようにきわめて低い寄与率となった。

MXの変異原性に対する寄与率については、このように、Ames試験の結果と哺乳動物の培養細胞を用いた結果に大きな差があることが近年報告されている。Plewaら¹⁶⁾は哺乳動物培養細胞であるCHOを用いて単細胞ゲル電気泳動アッセイ(コメットアッセイ)で数種の臭素化合物とMXのDNA損傷能を検討した。その結果、MXのDNA損傷能は低くプロモ酢酸、ジプロモ酢酸、トリプロモ酢酸のほうがDNA損傷能は大きかったとし、*S. typhimurium*を使用する試験系ではMXが圧倒的にこれらより強い作用を示すことからさらなる研究が必要であるとしている。またMarsteinstredetら¹⁷⁾もHL-60を用いてMXの作用が*S. typhimurium*に対するものよりもかなり小さいことを指摘している。細菌を用いたアッセイと哺乳動物培養細胞を用いたアッセイとで結果に大きな差があることは、バイオアッセイを組み合わせる必要性を示唆しているともいえよう。

(2) 水道水中でのMXの変化特性

MXの濃度変化を図24に示す。塩素を添加していない水中でもわずかに減少していること、および添加塩素濃度が高いほど減少速度が大きいことがわかる。

この結果をもとに、MXの反応速度を次式によって定量化してみる。

$$dC/dt = -(k_1 + k_2)C$$

ここに、C:MX濃度($\mu\text{g/L}$)、t:反応時間(hr)、 k_1 :塩素による反応速度定数(hr^{-1})、 k_2 :加水分解速度定数測定値(hr^{-1})である。まず、図24からpH7における k_2 を求めると、

$$k_2 = 0.0008 \text{ hr}^{-1}$$

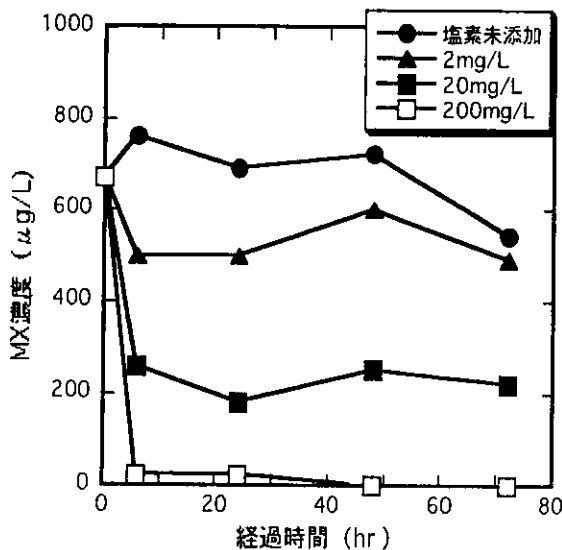


図24 塩素添加にともなうMX濃度の変化

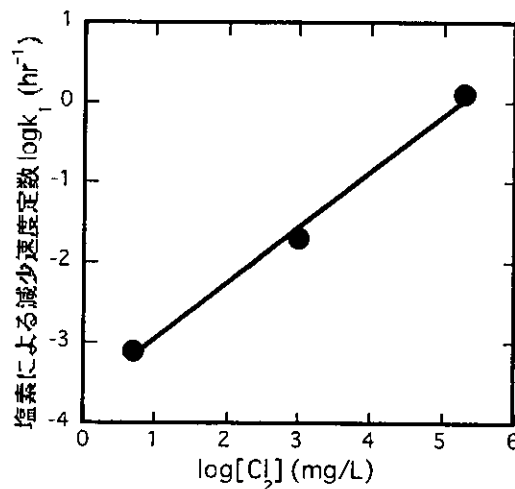


図25 MXの塩素による減少速度定数

を得る。ついで塩素を添加したときの变化速度から、 $k_2 = 0.0008 \text{ hr}^{-1}$ を差し引いて k_1 を求める。定量は初期における変化から求め、初期においては塩素はMXに対して大過剰に存在するとして塩素の濃度変化は考慮していない。 k_1 を添加塩素濃度に対してプロットしたものを図25に示す。これより、

$$\log k_1 = 0.69 \log [\text{Cl}_2] - 3.66$$

が得られる。

以上の結果を用いて、実際の水道水の条件に近い、pH7, 残留塩素濃度0.5mg/Lのときの k_1 , k_2 および半減期を求めたものを表1に示す。本条件における半減期は1.7日であると推定された。この場合、水道水中でのMX濃度の低減に寄与するのは残留塩素との反応が主であると評価できる。当然、この2つの要因の相対的大小関係は、残留塩素濃度の大小によって変化する。また、表1の結果は既往の調査研究¹⁸⁾とほぼ同様の結果である。

表1 pH7, 残留塩素濃度0.5mg/LにおけるMXの変化速度

塩素による反応速度定数 $k_1(\text{day}^{-1})$	0.39
加水分解速度定数 $k_2(\text{day}^{-1})$	0.02
$k_1 + k_2$	0.41
半減期 (day)	1.7

MX水溶液に塩素添加した後の染色体異常誘発性を測定した結果を図26に示す。塩素の非存在下でも染色体異常誘発性は徐々に低減していることがわかる。また、MXを塩素処理した水の染色体異常誘発性は急激に低減している。

MXの染色体異常誘発性の変化速度を、図24に示したMX濃度の変化速度と比較すると、染色体異常誘発性の低下速度の方が明らかに大きいことがわかる。図21に示した用量反応曲線を見ると、MXはごく狭い濃度範囲でのみ染色体異常誘発性を示す。このことがMXの変化速度よりも染色体異常誘発性の変化速度の方が大きくなった原因であると考えられる。

しかし、MX濃度の変化と染色体異常誘発性の変化とは定性的には一致している。すなわち、MXは残留塩素と反応しつつ染色体異常誘発性を失っていくものであるといえる。

(3) MXの指標性に関する考察

以上の結果をもとに、MXの指標性について考察を行う。

まず、図14, 図16における変化速

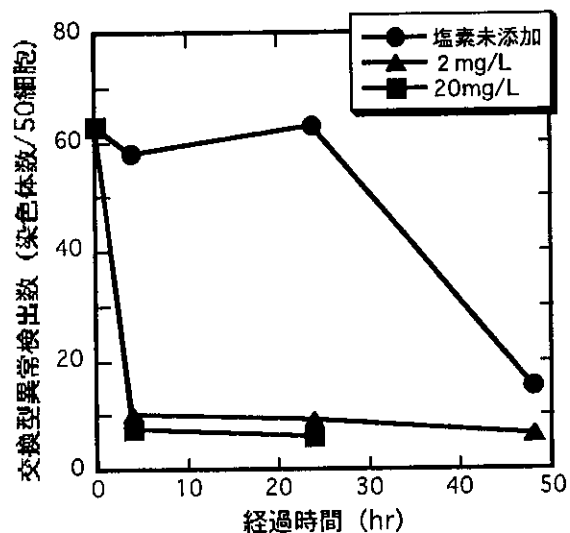


図26 MX塩素処理水の染色体異常誘発性の変化

度を定量化してみる。低減部分をとりあげると、染色体異常誘発性の減少速度定数は 0.16day^{-1} であり、非二段階形質転換誘発性の減少速度定数は 0.18day^{-1} となる。水道水を想定して計算し表1に示したMXの 0.41day^{-1} と比較するとやや小さいが、MXは変化傾向を大まかに追跡できる物質ということは可能であろう。

MXの指標としての限界についても考察しておく。MX濃度の変化速度を定量化したことでわかるように、MXは残留塩素の影響を強く受け、残留塩素濃度が高いほど速やかに減少していく。一方、染色体異常誘発性について住友ら¹¹⁾は、残留塩素濃度が高いほど逆に低減しにくいことを明らかにしている。すなわち、染色体異常誘発性は主として加水分解によって低減していくのであり、MXの濃度変化とはその機構が異なっている。したがって、バイオアッセイ結果とMX濃度変化が対応するのは、ごく限られた残留塩素濃度の範囲でのこととなる。上述の通り、通常の水道水の残留塩素濃度レベルでは、MXは大まかな指標物質となりうることを指摘した。

また、本調査研究ではpHの影響について検討していない。Kinaeら¹³⁾およびMeierら¹⁴⁾はMXの安定性に対するpHの影響について検討した結果、酸性側よりアルカリ条件下で不安定であることを示すとともに、pH6よりもpH8の方がより安定となる不連続領域があることを示している。著者らの染色体異常誘発性に対するpHの影響に関する検討結果^{6,9,19)}では、このような不連続な影響はみられず、酸性側よりアルカリ条件下で染色体異常誘発性は速やかに低減している。ここでも両者の変化機構の違いをみることができる。

以上のことから、バイオアッセイ結果に対するMXの指標性を論ずる場合には、pH条件と残留塩素濃度の条件を限定して論ずる必要があることがわかる。

5. 淀川水とその塩素処理水の試験結果

以上の検討から、水質指標物質については、水質管理の場に応じて適切に選択する必要があることがわかる。すなわち今後、以下の目的に適した指標物質について再検討が必要となろう。

- ①塩素注入直後の水と給配水系統を流下した水の有害性を比較する目的
- ②塩素を注入した直後の水の有害性を比較する目的
- ③積分値としての有害性を比較する目的(年間変動とその積分値を追跡可能な副生成物という観点)

ここではこのための第一段階として、淀川水とその塩素処理水のバイオアッセイを実施した。この中では、特に、自然水の形質転換試験を実施するのが新しい試みである。

5.1 実験方法

調査期間は2000年2月～8月で、淀川の枚方大橋地点左岸の表流水を採水した。1.0 μm メンブレンフィルターでろ過した後、初期残留塩素濃度が1.0mg/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、20℃、暗所、密閉条件にて12時間静置した。

琵琶湖水に関する実験と同様に、CSP800樹脂(日本ウォーターズ)に通水し、DMSOで溶出させた。この方法で30Lを3mLに濃縮した。染色体異常試験の場合、DMSO濃度は培

養液中で0.5%としたので、培養液中での最終濃縮倍率は50倍である。形質転換試験の場合、DMSO濃度は培養液中で0.25%としたので最終濃縮倍率は25倍であった。これも琵琶湖水を用いた実験と同様の条件である。

5.2 実験結果

淀川水およびその塩素処理水の試験結果を図27, 図28, 図29に示す。また水質の測定結果を表2に示す。

染色体異常誘発性、二段階形質転換誘発性、非二段階形質転換誘発性ともに、冬に高い値を示し、夏になるにつれて低減する傾向を示した。本研究での染色体異常試験の場合、コントロールは4.5染色体/50細胞付近であり、6～8月の試料からは染色体異常誘発性はほとんど検出されていない。

塩素処理水をみると、染色体異常誘発性は増大しているのに対して、二段階形質転換誘発性、非二段階形質転換誘発性は低減するという逆の傾向を示したのが特徴である。

淀川水系河川水は、塩素処理によって変異原性が増加する場合と減少する場合があることが報告されている^{20, 21)}。環境変異原物質の一部は塩素処理によって消滅するが、同時に原水中の有機物と塩素が反応し、新たな変異原性が発現する。形質転換誘発性試験においてもこの両者の効果が含まれていると考えられる。すなわち、河川水中にすでに含まれている変異原物質は同時にプロモーション活性を持つものも少なくないと考えられるが、これら物質が塩素と反応して分解する結果、形質転換誘発性が減少するという効果が大きかったものと推察される。

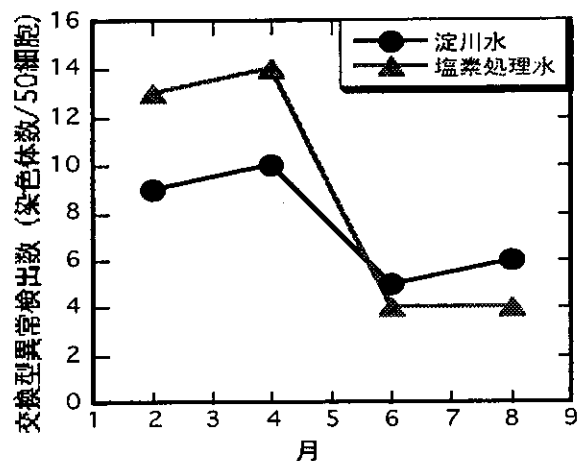


図27 染色体異常誘発性の変化

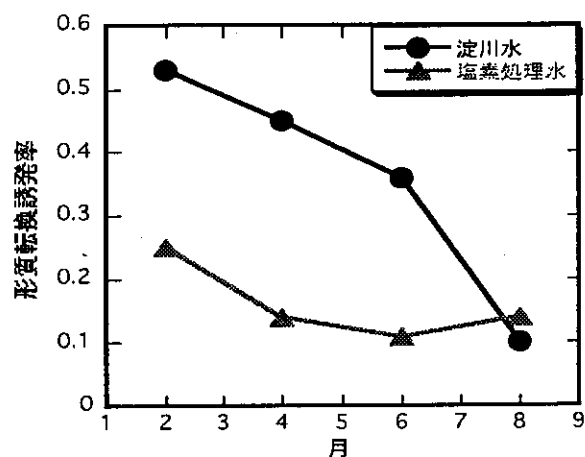


図28 二段階形質転換誘発率の変化

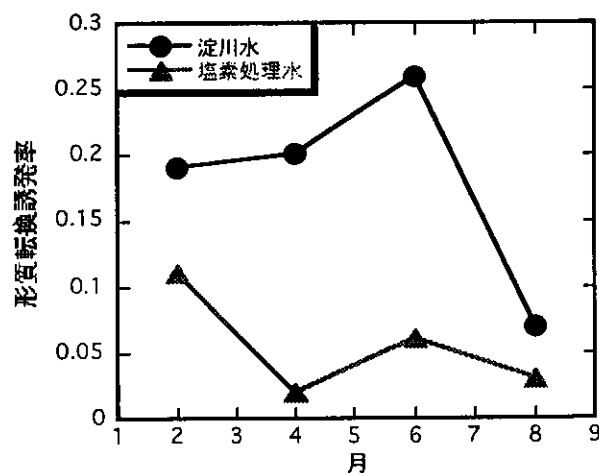


図29 非二段階形質転換誘発率の変化

また、塩素処理水のバイオアッセイ結果に最も良く追従した副生成物は、クロロホルムおよびクロロホルム生成能であった²²⁾。今後はMXについても測定を行い、ある特定の場所での水道水の有害性を経時的に管理する目的にも使用可能かを検討する必要がある。

表2 淀川水（枚方大橋地点）とその塩素処理水の水質測定結果

月 日	2.23	3.22	4.14	5.9	6.21	7.26	8.30	
淀川水位(枚方大橋地点)(m)	-3.48	-3.61	-3.62	-3.78	-3.55	-3.47	-3.69	
原水水質	pH			8.41	7.49	7.49	7.55	
	導電率(mS/cm)			0.207	0.187	0.201	0.205	
	濁度			6	10	6	5	
	溶存酸素(mg/L)			9.8	8.1	7.1	7.2	
	水温(℃)	7.0	12.0	18.0	22.0	23.7	26.5	28.6
ろ水水質	E ₂₆₀	0.0418	0.0791	0.121	0.0555	0.0564	0.0539	0.0474
	TOC (mg/L)	2.9	3.4	3.1	3.6	2.9	5.0	3.3
副生成物	TOX (μg/L)	142	166	238	98	66	258	195
	クロロホルム (μg/L)	17	18	14	7.8	5.7	9.7	6.7
	ブロモジクロロメタン(μg/L)	7.7	6.8	6.2	6.2	2.5	5.0	7.2
	ジブロモジクロロメタン(μg/L)	9.2	4.0	11	7.1	30	2.2	2.8
	ブロモホルム (μg/L)	ND	1.4	0.4	ND	18	ND	ND
	総トロハロメタン (μg/L)	34	31	32	21	56	17	17
	抱水クロラール (μg/L)	6.9	8.0	15	12	22	12	2.9
	トリクロロ酢酸 (μg/L)	3.3	2.8	6.8	0.9	5.3	9.4	3.2
	TOXFP (μg/L)	332	154	247	144	68	318	246
	クロロホルムFP (μg/L)	18	25	29	8.4	13	14	11
ブロモジクロロメタンFP (μg/L)	10	7.8	8.8	7.1	3.0	6.0	8.6	
ジブロモジクロロメタンFP (μg/L)	2.7	4.0	2.6	3.9	29	2.5	3.4	
ブロモホルムFP (μg/L)	ND	1.6	0.5	ND	17	ND	ND	
総トロハロメタンFP (μg/L)	31	38	41	19	62	22	23	
抱水クロラールFP (μg/L)	11	8.5	9.7	17	4.4	18	6.0	
トリクロロ酢酸FP (μg/L)	5.4	4.4	3.6	5.8	6.3	11	5.6	

6. ま と め

(1) 試薬フミン酸の塩素処理水の染色体異常誘発性は、塩素処理後時間とともに次第に低減した。また、形質転換誘発性（二段階試験）は次第に増大し、両者の変化傾向は全く逆であった。一方、非二段階試験によって測定した形質転換誘発性は次第に低減した。この傾向は、二段階形質転換試験の結果とは逆で、染色体異常誘発性の変化傾向と一致した。

(2) TOX とカルボニル化合物は定性的に染色体異常誘発性の変化傾向に一致し、クロロホルムとジクロロ酢酸は形質転換誘発性と変化傾向が一致していた。

(3) 試薬フミン酸を用いて得られた結果を総合すると、塩素処理水の発がんに関連する

有害性は、イニシエーション活性が卓越するもので、時間とともに次第に低減していくと推定するのが妥当と考えられた。

(4) 琵琶湖水を用いた実験の結果、染色体異常誘発性、二段階形質転換誘発性、非二段階形質転換誘発性の変化傾向については、試薬フミン酸を用いた実験結果と一致していた。測定した副生成物のうちでは、MXがこの有害性の変化傾向とよく対応していた。

(5) MXの染色体異常試験および形質転換試験を行った結果、MXは強力な完全がん原性物質の中にグルーピングされた。また、残留塩素と反応しMX濃度が低下するのに伴い、染色体異常誘発性を失っていくことを示した。

(6) 水道水中でのMX濃度の低減に寄与するのは、加水分解よりも残留塩素との反応が主であると評価した。pH7, 残留塩素濃度0.5mg/Lの場合の半減期は1.7日と推定した。

(7) 塩素処理水の発がんに関連する有害性は時間とともに低減すると推定されるが、MXはその傾向を把握する大まかな指標となりうることを示した。またこの際、pHと残留塩素濃度条件を限定して論ずる必要がある点も指摘した。

(8) 淀川水の染色体異常誘発性、二段階形質転換誘発性、非二段階形質転換誘発性ともに、冬に高い値を示し、夏になるにつれて低減した。塩素処理を行った結果、染色体異常誘発性は増大したのに対して、二段階形質転換誘発性、非二段階形質転換誘発性は低減するという逆の傾向を示した。

参考文献

- 1) 住友恒、伊藤禎彦、画像解析を導入した染色体異常試験法の開発、衛生工学研究論文集、Vol.26, pp.107-115, 1990.
- 2) 伊藤禎彦、住友恒、染色体異常試験、環境微生物工学研究法、pp.379-382, 技報堂出版、土木学会衛生工学委員会編、1993.
- 3) 住友恒、伊藤禎彦、山下基、池田大助、マウス繊維芽細胞を用いる形質転換試験結果の画像解析による評価方法、環境衛生工学研究、Vol.12, No.3, pp.181-185, 1998.
- 4) Tsuchiya, T. and Umeda, M., Improvement in the Efficiency of the in vitro Transformation Assay Method Using BALB/3T3 A-31-1-1 Cells, Carcinogenesis, Vol.16, No.8, pp.1887-1894, 1995.
- 5) 日本水道協会、上水試験方法、1993.
- 6) Itoh, S. and Matsuoka, Y., Contributions of Disinfection By-products on Activity Inducing Chromosomal Aberrations of Drinking Water, Water Research, Vol.30, No.6, pp.1403-1410, 1996.
- 7) 日本分析化学会編、分析化学便覧、丸善、1981.
- 8) 伊藤禎彦、鳥羽裕一郎、池田大助、住友恒、NMRによる塩素処理水中の芳香族塩素化合物の定量およびその有害性の実験的考察、環境衛生工学研究、Vol.13, No.3, pp.122-127, 1999.
- 9) 伊藤禎彦、村上仁士、塩素処理水の染色体異常誘発性に対する加水分解の影響、環境工学研究論文集、Vol.30, pp.219-226, 1993.

- 10) 伊藤禎彦、村上仁士、戸田博之、福原勝、二酸化塩素処理水の染色体異常誘発性とその安定性、環境工学研究論文集、Vol.31, pp.215-224, 1994.
- 11) 住友恒、伊藤禎彦、水道水の消毒と変異原性の生成、土木学会環境工学委員会 用水・廃水の高度処理技術に関する研究小委員会、pp.7-12, 1998.
- 12) 鈴木基之、内海英雄編、バイオアッセイ 水環境のリスク管理、講談社サイエンティフィック、262p., 1998.
- 13) Kinae,N., Sugiyama,C., Nasuda,M.Y., Goto,K., Tokumoto,K., Furugori,M. and Shimoi,K., Seasonal Variation and Stability of Chlorinated Organic Mutagens in Drinking Water, Proceedings of the First IAWPRC International Symposium on Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants in Water, Otsu, Japan, Nov.25-28, pp.476-483, 1991.
- 14) Meier,J.R., Knohl,R.B., Coleman,W.E., Ringhand,H.P., Munch,J.W., Kaylor,W.H., Streicher,R.P. and Kopfler,F.C., Studies on the Potent Bacterial Mutagen, 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: Aqueous Stability, XAD Recovery and Analytical Determination in Drinking Water and in Chlorinated Humic Acid Solutions, Mutation Research, Vol.189, pp.363-373, 1987.
- 15) 木苗直秀、杉山千歳、下位香代子、水中の直接変異原MXの生成と毒性発現の機構、環境変異原研究、Vol.22, pp.141-148, 2000.
- 16) M. J. Plewa, Y. Kargalioglu, D. Vankerk, R. A. Minear, and E. D. Wagner, Development of Quantitative Comparative Cytotoxicity and Genotoxicity Assays for Environmental Hazardous Chemicals, Proceedings of The 3rd IWA Specialized Conference on Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants - ECOHAZARD '99-, Otsu, Japan, 5-8 Dec., pp.147-154, 1999.
- 17) Marsteinstredet
- 18) MXの検出実態とその前駆物質の挙動、平成11年度厚生科学研究 水道における化学物質の毒性、挙動及び低減化に関する研究 報告書、pp.2-152~2-159, 2000.
- 19) S. Itoh, D. Ikeda, Y. Toba, and H. Sumitomo, Change of Activity Inducing Chromosomal Aberrations and Transformations of Chlorinated Humic Acid, Water Research, 2001 (in press).
- 20) 佐谷戸安好、中室克彦、上野仁、都市河川水とその塩素およびオゾン処理水の変異原性に関する研究、変異原性試験、Vol.1, No.1, pp.18-27, 1992.
- 21) 石本知子、寺嶋勝彦、水道水源に存在する変異原性物質およびその前駆物質の挙動と特性、水道協会雑誌、Vol.69, No.1, pp.9-18, 2000.
- 22) 藪下登史子、哺乳動物培養細胞を用いたバイオアッセイからみた水道水質指標の活用法に関する研究、京都大学修士論文、67p., 2001.

(3) 毒性情報が不足している物質
の毒性評価に係る研究