

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。従来の研究により、MX の安定性に対する pH の影響については、酸性側よりアルカリ条件下で不安定であること、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が示されている。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。

(2)MX の染色体異常誘発性に対する寄与率について

MX の染色体異常試験結果を用い、琵琶湖水の染色体異常誘発性に対する寄与率を求めると、琵琶湖水からの MX 生成濃度が 10ng/L 以下のレベルであることから、寄与率は 0.3%以下であると算定した。

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。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。

10. 5 淀川水とその塩素処理水の試験結果

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。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 樹脂に通水し、DMSO で溶出させた。この方法で 30L を 3mL に濃縮した。この試料を用い、染色体異常試験および形質転換試験を行った。

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。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なかった。

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った。

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。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。

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。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。

10.6 まとめ

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 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。
- (5) 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。

1.1. 活性分子種を産生する消毒副生成物のリスク評価に関するバイオアッセイ

国立医薬品食品衛生研究所 西村哲治

水道原水として使用されている一般環境水には、天然由来の物質のみならず、生産活動や生活に使用された人工化学物質が多種多様に含まれている。一般環境水に含まれる有機物質をできるだけ除去したとしても、極微量としても残存する可能性が残り、そのような「水」に塩素処理やオゾン処理などの消毒処理を行えば、酸化分解産物、塩素化合物等の消毒副生成物が発生することは、現在の技術では防ぐことができない。例えば、塩素処理を行うと、構造が複雑な化合物ほどその消毒副生成物として、種々の反応中間生成物が生じることが予想される。実験室で、最終段階まで反応を行うとすると、ある一定の化合物に収束することが想定されるが、浄水工程では必ずしも反応を完全に行うことは不可能であるし、また本来の目的からもその必要性はないと考えられる。これら塩素処理過程で生成した中間生成物を含む消毒副生成物の健康に及ぼす影響について、個々の物質レベルで十分なデータが集積されていないのが現状である。あらゆる可能性を考慮して全ての消毒副生成物に対して、健康影響に対する評価を求めることが理想である。しかしながら、反応原体となる有機化合物の量が少ないことよりそこから生成する生成物の量も限られていること、原体の有機化合物の種類が多いことから生成物の種類も原体の種類より多い物となることが予想され、全ての物質の健康影響への評価を求め、存在実態の把握をすることは非常に困難な問題となっている。また、個々の毒性評価が得られたとしても、浄水消毒工程で派生した消毒副生成物を全て個別に、削減のために対処していくことは現実的に不可能といえる。

消毒副生成物のリスクを把握し、水質の管理を行うための手法として次のことが考えられる。第一に、消毒工程の前段階で消毒副生成物の材料となる有機化合物の量を可能な限り減らす処理を行なうことがあげられる。その処理の方法は、現在用いられている手法をより厳密に行なうことである程度対応することができると考えられる。しかし、今後の新たな技術革新も必要となってくるであろう。この処理工程の指標として、TOC（全有機炭素）等を適用することができるであろう。消毒副生成物を皆無にすることは技術的にも非常に困難である。現状の技術で可能な限り消毒副生成物の生成を削減した上で、生成した消毒副精製物の把握と管理を行なうことが次に求められる。そこで、第二に、生成した消毒副生成物については、特定の化合物を代表として全体の消毒副生成物のリスクを把握する手法が考えられる。そのためには、既知の消毒副生成物の健康影響を個別に評価するとともに、消毒副生成物の生成実態を把握することにより、リスク評価をするための指標化合物を選択することが必要となってくる。効率的かつ効果的な手法として、全ての物質を把握・対処していくのではなく、重要な指標物質の把握により水質管理を行なう手法の確

立が望まれる。このためには、さらに情報の収集に努めなくてはならず、指標物質の選別や考え方の整理のための研究が進められるべきであろう。一方、視点を変えて、個別の化合物を考慮せずに、全ての消毒副生成物を総括的にとらえ、評価する第三の手法が考えられる。これには複合作用も同時に評価することのできるバイオアッセイが有効な手段となる。

本稿では、細胞内で活性分子種を生成する作用を指標とした試験法を用いて得られた結果を、消毒副生成物の健康に及ぼす影響を評価する手法として再検討して考察した。

我々が摂取した化学物質は、体内で代謝されて、排泄されるが、代謝の過程で反応性の高い代謝中間体又は代謝産物に変化することがある。これらの反応性の高い物質は、生体成分に直接作用して悪影響を及ぼす可能性が示唆されている。また、反応性に富む物質が細胞に働きかけて二次的に生理活性物質を産生して生理作用へ影響を及ぼす結果、通常と異なった現象を表す可能性も考えられる。消毒副生成物の中には、酸化作用を持つ活性分子を生体内で産生し、過酸化脂質を増加させる作用を示す物質がある。ここで示す試験法は、このような活性分子の産生を増加させる化学物質を総括的、かつ複合作用に評価することが期待される方法である。

ペルオキシゾームは、脂質酸化反応を司るために必要な酵素群を多く含む細胞内小器官である。ペルオキシゾームが増加することにより、過剰に過酸化水素などの活性分子が産生される結果、脂質の過酸化が起こり、細胞へ悪影響が及ぶ可能性が考えられる。また、ペルオキシゾームで過剰に産生された活性分子が、生体内の高分子に作用して遺伝子障害を起したり、代謝系に作用して生体内生理作用を乱すことが示唆されている。ペルオキシゾームを増加させる作用を持つ物質は、ペルオキシゾーム増殖因子受容体 (Peroxisome Proliferation-Activator Receptor : PPAR) と結合することにより、9-シス-レチノイン酸受容体 α との複合体を形成する。この複合体が、ペルオキシゾーム構成タンパク質遺伝子の制御領域に存在する特定の塩基配列に結合することにより、ペルオキシゾーム構成タンパク質遺伝子の活性化を行なっている。一方、ペルオキシゾームを増加させる物質は、同時に異物代謝に関与するシトクロム P450 の 4A1 分子種を特異的に誘導することが知られている。シトクロム P450 4A1 は、脂質の代謝に関与する代謝酵素であり、消毒副生成物によっても誘導されることが知られている。そこで、これらの遺伝子発現誘導活性を利用して、ラットのシトクロム P450 4A1 遺伝子の制御領域に存在するペルオキシゾーム増殖因子受容体結合塩基配列に被験物質と作用させた PPAR が結合した結果誘導される遺伝子活性化を指標として、活性分子種の産生を促進する化学物質の健康影響を評価する試験法を確立した。

シトクロム P450 4A1 遺伝子制御領域に存在する PPAR 結合配列を含む DNA 鎖をホタルルシフェラーゼ遺伝子に結合させたプラスミドを構築した。このプラスミドを、ラット肝臓由来の樹立細胞 (RBL) に形質導入した形質転換細胞を試験に用いた。被験物質の暴露の 2 日前に、 2×10^5 細胞を直径 60mm のプラスチックシャーレに蒔き、10% のウシ胎児

血清を添加した Ham'sF12 培地で、37℃のCO₂インキュベータにより培養した。そして、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した被験物質を、培養液の 1/100 容量 (DMSO の最終濃度が 1%) になるように添加し、37℃、4 時間暴露した。暴露後、培養液を除き、細胞表面を生理食塩水で洗浄した。次に、250 μl の培養細胞溶解液 (東洋インキ社製) を加え、室温 15 分間作用させて細胞を溶解した。細胞の溶解画分を回収し、遠心により細胞残渣を除いた細胞質画分を回収した。この細胞画分中の誘導されたルシフェラーゼの活性を測定し、その強弱で被験物質を評価した。

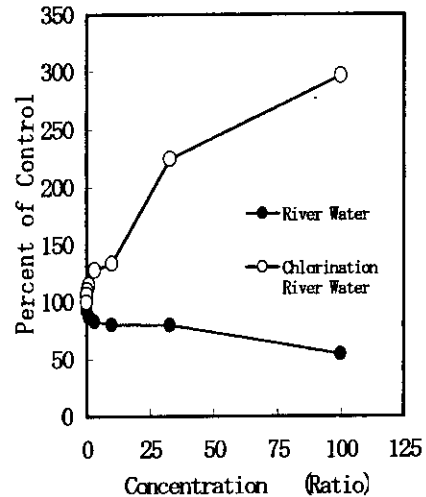
環境中に存在している可能性がある汚染化学物質から、作用機構や有害作用により 31 種を選び、本試験系における反応を検討した。最高誘導活性を DMSO で誘導された活性に対する倍率で算定した結果、Formaldehyde, Methylmercury chloride, p-Nitrophenol, Sodium arsenite, 2,4,5-Trichlorophenol, Trp-P-2 (Acetate), Lindene, Maneb, Benthocarb, Triclosan, Mercuric chloride が 300%以上, Triphenyltin chloride, Triphenyltin chloride が 250~300%, Benzo(a)pyrene, 4-Nitroquinone-N-oxide, Nickel chloride, Hexachlorophene, 2,5-Dichlorophenol, Cupric sulphate が 150~200%, 2-Aminoanthracene, Di-2-ethylhexyl phthalate, 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid, Pentachlorophenol, Potassium cyanide, Bisphenol A, Tiuram が 120~150%を示した。Paraquat, Malathion, Potassium dichloride, Phenol は 120%以下の活性しか示さず、この試験系では誘導活性を持たない化学物質と考えられる。DMSO の誘導活性の平均値 (30 回) に対し、溶媒対照とする DMSO の誘導活性は 100±10%の範囲にあった。従って、120%以上の誘導活性を示した物質は有意にシトクロム P4504A1 誘導活性を示すとした。この試験系では、陽性を示すが高濃度では細胞毒性が強く、誘導活性の現象が見られ逆 U 字型の容量-反応曲線を示した物質が Formaldehyde や Nickel chloride など 16 物質あった。実試料を評価する場合、濃縮試料を用いて検討を行なう場合が多い。従って、高濃度で誘導活性を低下させる物質が共存することにより、相加作用の結果、誘導活性が低めに見積もられる恐れがある。供試試料の濃縮倍率、試験時の複数の濃度希釈段階の試行、得られた数値の評価などには注意を要するところである。バイオアッセイを行なう場合、複数の物質が共存する実試料の場合にはこの問題は常にあり、今後解決していかなければならない点として残されている。今回行なった濃度で最高誘導活性濃度が得られなかった物質としては、Di-2-ethylhexyl phthalate や Methylmercury chloride 等 6 物質があった。しかしながら、環境中の存在濃度や試験に供する濃度を考えた場合、今回用いた濃度以上の濃度で評価を行なうことはあまり重要でないと判断し、より高濃度の検討は行っていない。Lindene, Benthocarb 及び Triclosan の 3 物質は、DMSO の 10 倍以上の強い誘導活性を示した。陽性を示した物質の中では、0.001 μM の Pentachlorophenol, 0.033 μM の Mercuric chloride や Hexachlorophene が低濃度で誘導活性を示した。一方、Maneb は 330 μM, Benzo(a)pyrene, Di-2-ethylhexyl phthalate や 2,4,5-Trichlorophenol は 100 μM と高濃度でなくては誘導を起こさなかった。以上の結果から、本紙験法は多く

の環境汚染物質に対して応答することが明らかとなった。ここで取り上げた化学物質の多くは消毒副生成物ではないが、これらの化学物質は環境中に存在する可能性もあり、弱いながらも活性分子種産生を介して有害な影響を及ぼすことが示唆され、広範囲の種類化学物質群に対する評価ができることが期待される。

消毒副生成物としてハロ酢酸類について誘導活性の有無を検討した。Dichlorobromoacetic acid は 300%以上, Dibromochloroacetic acid は 250~300% , Tribromoacetic acid は 150~200%の誘導活性を示した。しかし、

Chlorobromoacetic acid, Chloroacetic acid, Dichloroacetic acid, Tribromoacetic acid, Bromoacetic acid, Dibromoacetic acid, Chlorobromoacetic acid は 100~150%の誘導しか見られず、誘導活性が有意にあるとの評価はできなかつた。今回行なった検討では、Dichlorobromoacetic acid は $62.4 \mu\text{g/ml}$ で最高活性を示し、 $20.8 \mu\text{g/ml}$ の濃度が最低の陽性を示す濃度であった。Dibromochloroacetic acid では $25.2 \mu\text{g/ml}$ で最高活性を示し、 $8.41 \mu\text{g/ml}$ の濃度が最低の陽性を示す濃度であった。Tribromoacetic acid では $8.90 \mu\text{g/ml}$ で最高活性を示し、 $2.97 \mu\text{g/ml}$ の濃度が最低の陽性を示す濃度であった。ハロ酢酸に対する今回の試験法は応答が悪く、十分な評価はできないかもしれない。それは、細胞を用いた試験系は一般に水溶性物質の取りこみが悪く、応答が低いからだと考えられる。消毒副生成物は水溶性物質が主となることから、親水性物質に対する応答性を高める系に改良するか、無細胞系の試験法への改変を考慮することも必要である。

この試験系を用いて、実際に河川水に含まれる化学物質の活性分子種産生能によるリスクを検討した。河川水 5 リットルを塩酸で pH1.5 に調整し、GLF 固相カートリッジ (0.5g 充填) と活性炭カートリッジ (0.5g 充填) を直列に連結し、2.5 リットルずつ、10ml/分の速さで通水した。窒素ガスを通気してカートリッジを乾燥した後、GFL 固相カートリッジについては、アセトニトリル 5ml, ジクロロメタン 5ml で順次、脱離、溶出した。活性炭カートリッジについては、メタノール 1ml で脱水後、ジクロロメタン 5ml で脱離、溶出した。すべての溶離液をあわせて、30℃の加熱下で窒素ガスを吹き付け乾固した。乾固物を DMSO に溶解し、試験に供した。上図に示すように、今回用いた河川水 (黒丸) では有意な誘導活性が認められなかつた。これは、この河川水には活性分子種を産生する化学物質が検出可能な濃度まで含まれていなかった、または活性分子種を産生する作用を阻害する化学物質が含まれ外見上活性が検出されなかつた可能性が考えられる。また、誘導活性が溶媒対照以下となっていることから、細胞毒性物質が濃縮されて誘導活性を示すに至る以上に細胞致死作用が優位に作用した可能性が示唆される。



同一の河川水に、次亜塩素酸ナトリウムを添加後の残留塩素濃度が 2ppm となるように添加して 1 時間処理した。アスコルビン酸ナトリウムにより脱塩素した後、前述と同一の操作により含有物を抽出した。この抽出物の誘導活性を測定したところ、前ページの図に見られるように、濃度に依存して有意な誘導活性が認められた（白丸）。この結果は、河川中の物質が塩素と反応して、誘導活性を示す反応生成物が生じたことを示している。即ち、浄水工程で化学物質が十分な除去が行なわれず、塩素と接触することにより、活性分子種産生物質もしくはシトクロム P450 4 A1 誘導作用を示す生成物が生じることを示唆している。言葉を換えていえば、この試験法は浄水処理工程での消毒副生成物の生成挙動を把握することのできる有用な試験系であるといえるであろう。

本稿で述べた試験法は、代表的な消毒副生成物のハロ酢酸類に対しては 3 種の物質のみに対して有意な応答を示したのみであったが、河川水の塩素処理抽出物に対しては濃度依存的に応答を示す結果が得られた。塩素処理抽出物の誘導活性を示す物質の同定は今後に残された問題となるが、消毒処理の水質管理に、総括的な把握を行なうことのできる有効な手法となりうる可能性が示唆された。今後、さらに詳細な検討を進めていきたい。

参考文献：

1. 環境庁環境保全研究成果集「遺伝子工学技術を用いた環境汚染物質の健康影響評価方法の開発・確立に関する研究」平成 9 年度, 21, 1-10.
2. 環境庁環境保全研究成果集「遺伝子工学技術を用いた環境汚染物質の健康影響評価方法の開発・確立に関する研究」平成 10 年度, 19, 1-15.
3. 環境庁環境保全研究成果集「遺伝子工学技術を用いた環境汚染物質の健康影響評価方法の開発・確立に関する研究」平成 11 年度, 15, 1-18.