〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
31 (6) 385-390 (1985)

ポリエチレン多孔質中空糸膜による飲料水中変異原の吸着と吸着変異原の若干の性質

橋爪 崇,^a 横山 剛,^a 沢田洋介,^b 河合 厚,^b 伊神生雄,^b

神木照雄,^c 木苗直秀,^d 富田 勲^d

和歌山県衛生公害研究センター,^a 三菱レイヨン株式会社商品開発研究所,^b

神戸市環境保健研究所,^c 静岡薬科大学^d

Adsorption of Mutagens from Drinking Water by the Membrane of Microporous Polyethylene Hollow Fibers and Some Properties of the Mutagens

TAKASHI HASHIZUME,^a TSUYOSHI YOKOYAMA,^a YOSUKE SAWADA,^b

ATSUSHI KAWAI,^b IKUO IGAMI,^b TERUO KAMIKI,^c

NAOHIDE KINAE^d and ISAO TOMITA^d

Wakayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health,^a

3-3-45, Sunayama-minami, Wakayama 640, Japan, Product and

Development Center, Mitsubishi Rayon Co.Ltd.,^b 4-1-60, Sunadabashi,

Nagoya 461, Japan, Public Health Research Institute of Kobe

City,^c 4-6, Minatojimanakamachi, Chuo-ku, Kobe 650, Japan

and Shizuoka College of Pharmaceutical Sciences,^d

2-2-1, Oshika, Shizuoka 422, Japan

(Received June 24, 1985)

A membrane of microporous polyethylene hollow fibers (EHF membrane) has often been used to prepare sterilized water in medical institutions.

In the present investigation, we have studied the capacity of EHF membrane to adsorb mutagens from drinking water and examined some properties of the mutagens.

Through the module of EHF membrane, drinking water of three cities (A, B and C) was passed and the adsorbate extracted with methanol. The methanol extract was dissolved in dimethylsulfoxide and tested for the mutagenicity to *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 and TA 1537 with and without S9 mix. All the extracts showed mutagenic activities to these three tester strains, and it was demonstrated that the EHF membrane has a capacity to adsorb mutagens from drinking water. The mutagenic activities of the extracts decreased by the addition of S9 mix to these test systems. When the adsorption ability of EHF membrane was compared to that of the activated charcoal, the ability of the former was about 4.6 times higher than that of activated charcoal.

Mutagens adsorbed to EHF membrane were soluble in most organic solvents, especially in ethyl ether. When the methanol extract was separated into acidic, basic and neutral fractions with ethyl ether, the neutral fraction showed the highest mutagenic activity. The mutagens adsorbed to EHF membrane were relatively stable to heat.

Keywords—EHF membrane; adsorbate; mutagenicity; Ames assay; drinking water; activated charcoal

はじめに

米国の環境保護局 (EPA) の水道研究所が1974年ニュー
ーオールリンズ市の水道水中より、クロロホルム、プロモ

ジクロロメタンなどを検出して以来,¹⁾ 飲料水中の低沸点
有機塩素化合物の毒性,²⁾ 分析³⁾ などについて詳細な検
討がなされるようになり、わが国でも古賀ら⁴⁾ により水

水道よりハロゲン化合物を含むおよそ 100 種の化合物が分離同定されている。

最近、飲料水には、癌原性又は変異原性を有する低沸点有機塩素化合物のほか、変異原性を有する難揮発性物質も含有されていることが明らかにされた。Nestmann ら,⁵⁾ Grimm-Kibalo ら⁶⁾ は XAD 樹脂法により、Grabow ら,⁷⁾ Kfir ら⁸⁾ はジクロロメタン抽出法により、それぞれ飲料水を濃縮して得た難揮発性画分中に変異原が存在することを報告している。Schwartz ら⁹⁾ は、飲料水をポリウレタンフォームカラムに通して変異原を分離している。著者らは、ポリエチレン多孔質中空糸膜 (EHF 膜、三菱レイヨン製) が、酸、アルカリ、有機溶剤などに対する耐薬品性が強く、微生物に対する抵抗性が良く、かつ細菌及びパイロジェンを除去する能力を有することから、水処理用フィルターとして、手術室手洗い用水の調製に広く利用されていることに着目して、EHF 膜が飲料水中変異原を吸着する能力があるか否かを検討した。また、この EHF 膜と水道水の脱色、脱臭の目的で使用されている市販の活性炭との変異原の吸着能を比較検討し、併せて EHF 膜吸着変異原の若干の性質についても検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬・試液 Bacto agar, nutrient-broth: Difco 製, D-glucose (日本薬局方): 第一製薬製, S9 (phenobarbital 及び 5,6-benzoflavone で酵素誘導した Sprague-Dawley ラット肝), D-glucose-6-phosphate (G-6-P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (還元型, β -NADPH): オリエンタル酵母工業製, S9 mix: 矢作¹¹⁾の方法により調製した。

活性炭 (浄水用、粒状白鷺 WH): 武田薬品工業製。

次亜塩素酸ナトリウム溶液 (約 10%): 和光純薬工業製。

その他の試薬は、すべて特級試薬を使用した。

2. EHF 膜フィルターモジュール 使用した EHF 膜 (三菱レイヨン製, EHF-390C) は、ポリエチレンの高結晶性未延伸中空糸を適切な温度条件で一段又は多段に延伸したのち熱固定し、多孔質化した中空糸膜で、その基本的性能を Table I に示した。

この EHF 膜を 540 mm の長さに切断し、重ねあわせてループをつくり、両端を Fig. 1 に示したように、ポリカーボネート製のモジュール (内径 88 mm, 高さ 365 mm) 内に接着した。モジュール 1 本につき EHF 膜を 6 m² (外表面積)、約 99.6 g 使用した。

飲料水は、吸水口 (IN) からモジュール内に入り、

TABLE I. Properties of EHF Membrane

Outer diameter	390 μ m
Wall membrane thickness	55 μ m
Porosity	63 %
Water flux	3.6 l/min/m ^{2a)}
Surface area	31.7 m ² /g

a) The values were determined in 0.5 kg/cm² at 25°C.

Fig. 1. Module of EHF Membrane

EHF 膜の外側から内側にろ過され、中空部分を通って接着部から漏出し、排水口 (OUT) より流出する。

3. 通水方法 EHF 膜のフィルターモジュールをあらかじめ 1000 ml のメタノールで洗浄したのち、A, B, C の 3 都市の水道水の蛇口に接続した。それぞれに流量計を連結し、毎分 2—3 l の流速で流れるように調節しながら連続通水した。

4. 抽出方法 通水を終了したモジュールは、排水口からアスピレーターで吸引して水分を除いた。ついで、吸水口からメタノール 1000 ml を入れ、時々振とうしながら 1 時間放置したのち、排水口よりメタノールを流出させた。このメタノール抽出操作を 3 回繰り返したのち、抽出液をあわせて減圧下 50°C で溶媒を留去した。

この残渣には、EHF 膜に残存する水分により抽出されたメタノール難溶性物質が混在することが考えられたので、残渣に少量のメタノールを加えてろ過し、ろ液を同様に減圧下エバポレーターで濃縮し、茶褐色固体状のメタノール抽出物を得た。

5. 変異原性試験 メタノール抽出物をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かし一定濃度としたのち、Ames 法¹²⁾ を改良した矢作¹¹⁾ のプレインキュベーション法により、*Salmonella typhimurium* TA100, TA98 及び TA1537 株を用いて変異原性試験を行った。また、S9 mix を加えて代謝活性化したのち、同様に変異原性試験を行った。陽性対照物質としては、4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO, 和光純薬工業製)、9-aminoacridine hydrochloride (9-AA, 半井化学薬品製) 及び benzo[a]pyrene (B[a]p, 和光純薬工業製) を DMSO に溶解し、一定濃度の溶液として用いた。

結果と考察

1. EHF 膜による変異原の吸着

水道水中に存在する変異原が EHF 膜に吸着されるか否かを調べるために、1983年9月から1984年8月までの間に、A, B, C の3都市で通水実験を行い、その結果を Table II に示した。EHF 膜モジュールに通水した試験水の量、メタノール抽出物の量、及び抽出物の TA 100 に対する変異活性を通水量 1 m³ あたりの net revertant 数で示した。

飲料水を通していないモジュールからは、100 mg のメタノール抽出物が得られたが、この抽出物は変異活性を示さなかった。なお、EHF 膜モジュールへの残留塩素濃度 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液 3 l の通水実験により、EHF 膜が残留塩素により塩素化されて変異原を生成する可能性が低いことが示唆された。

通水したモジュールからは、560—950 mg のメタノール抽出物が得られ、いずれの抽出物も TA 100 に対して変異活性を示し、EHF 膜に飲料水中の変異原が吸着されることを確認した。A のメタノール抽出物は4回のサンプリングにおいて 2000—3100 net His⁺ revertants/m³ と比較的高い変異活性を示した。しかし、B では通水時期による変動がみられ、C では A のおよそ3分の1の変異活性を示した。

2. 飲料水のメタノール抽出物の変異原性

1983年12月から1984年1月にかけて、A, B, C 3都市で、83—88 m³ と EHF 膜モジュールの許容量を超える大量の飲料水を通し、メタノール抽出物を調製した。

各メタノール抽出物の TA 100 に対する変異活性を Fig. 2 に示した。プレートあたりメタノール抽出物 5

TABLE II. Mutagenic Activities of Methanol Extracts to *S. typhimurium* TA 100 without S9 Mix

Samples	Volume of water (m ³)	Weight of extract (mg)	Net His ⁺ revertants/m ³
[A] Sept., 1983	15	680	3100
Apr., 1984	15	820	2600
May, 1984	35	670	2000
Aug., 1984	32	880	2400
[B] Sept., 1983	13	560	810
May, 1984	18	870	2400
[C] Sept., 1983	10	580	990
May, 1984	17	950	660
Control	-	100	0

Fig. 2. Dose-response Curves of the Methanol Extracts to *S. typhimurium* TA 100 without S9 Mix

○—○: A, △—△: B, □—□: C, ●—●: control.

mg までは、A, B, C いずれの試料も良好な用量依存曲線を示した。プレートあたり 5 mg の revertant 数は、A が 503, B が 431, C が 288 であった。ついで、最も高い変異活性を示した飲料水 A のメタノール抽出物について、TA 100, TA 98, TA 1537 の3種の菌株に対する変異活性を±S9 mix で検討し、その結果を Fig. 3 に示した。メタノール抽出物は、使用した3種の菌株いずれに対しても変異活性を示し、塩基対置換型及びフレームシフト型の変異を引き起こす複数の変異原が混在していることが予想された。また、+S9 mix では、3菌株いずれも revertant 数が減少する傾向を示し、飲料水には代謝活性化を必要としない直接変異原が存在することを認めた。

Fig. 3. Mutagenic Activities of Methanol Extract A to *S. typhimurium*

○—○: without S9 mix, ●—●: with S9 mix.

3. EHF 膜と活性炭の変異原吸着能の比較

現在、飲料水を浄化する目的で浄水用活性炭が繁用されている。この活性炭と EHF 膜について、飲料水中の変異原の吸着能を比較するために以下の実験を行った。まず、EHF 膜の吸着能をみるために、EHF 膜モジュール (外表面積 2 m², 約 33.2 g) を 2 本連結し、飲料水を 10.7, 15.0, 20.0, 25.0, 29.0 m³ 通水し、2 次トラップの目的で連結したモジュールへの変異原の吸着を検討した。ついで、活性炭についても同様に、浄水用活性炭をつめたカラムに EHF 膜モジュールを連結し、連結モジュールへの変異原の吸着能を測定した。活性炭量と通水量の関係は、500 g-35.0 m³, 300 g-30.0 m³, 200 g-24.5 m³, 200 g-30.0 m³, 100 g-20.0 m³, 100 g-30.0 m³, 50 g-30.0 m³ とした。両実験より得られた結果を Fig. 4 に示した。

横軸には、EHF 膜又は活性炭 1 g あたりの通水量を、縦軸には、2 次トラップとして用いた EHF 膜モジュールに吸着した変異原の量を通水量 1 m³ あたりの net His⁺ revertant 数で示した。活性炭では 1 g あたり 0.07

Fig. 4. Adsorption of Mutagenic Compounds through EHF Membrane or Activated Charcoal

●—●: EHF membrane, ○—○: activated charcoal.

m², EHF 膜では 0.32 m² の通水量で、それぞれ、変異原の吸着量が最大となり、それ以上の通水では、2 次トラップのモジュールに変異原が吸着され始めた。この結果から、重量あたりで比較した場合、EHF 膜は活性炭のおよそ 4.6 倍の変異原吸着能を示した。しかし、活性炭に吸着した物質と EHF 膜に吸着した物質の変異活性を直接比較したわけではなく、活性炭が EHF 膜で吸着できないものを吸着している可能性も考えられる。なお、活性炭の表面積 1200 m²/g と EHF 膜の表面積 31.7 m²/g より換算して、表面積あたりで比較した場合、EHF 膜の変異原吸着能は活性炭のおよそ 170 倍となった。

4. EHF 膜に吸着された変異原の性質

1) 有機溶媒に対する溶解性 飲料水 A より分離したメタノール抽出物の各種溶媒に対する溶解性を検討した。抽出物 10 mg に、エチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼン、*n*-ヘキサン の 4 種の溶媒をそれぞれ 1 ml 加え、10 分間超音波処理したのち、遠心分離 (2500 rpm × 10 分) し、溶媒可溶性画分と難溶性画分に分け、両画分の溶媒を窒素気流中で留去した。ついで DMSO 0.4 ml を加え、メタノール抽出物に換算して、2.5 mg 相当量として TA 100 に対する変異活性を検定し、その結果を Table III に示した。いずれも可溶性画分に高い変異活性が認められ、特にエチルエーテル可溶部が 590 revertants と最も高い変異活性を示した。エチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼンを用いた場合、各可溶性画分がもとのメタノール抽出物の 354 revertants よりも高い変異活性を示し、難溶性画分には変異活性をもたないか又は低下させる物質が存在することが示唆された。

2) エチルエーテルによる系統的分画 飲料水 A より分離したメタノール抽出物 100 mg を最も高い抽出効率を示したエチルエーテルに溶解し、0.1 N NaOH 及び 0.1 N HCl を用いて、酸性 (pH=2)、塩基性 (pH=11)、中性 (pH=7) 画分に分画し、それぞれの画分の TA 100 に対する変異活性を検定し、Table IV の結果を得た。収量は、塩基性画分が 3.1 mg と最も少なく、酸性画分が 30.0 mg、中性画分が 29.3 mg とほぼ同程度であった。それぞれ TA 100 に対する変異活性を mg あたりの net His⁺ revertant 数で比較したところ、中性画分が 243 と最も高く、分画前のメタノール抽出物の 120 に比べておよそ 2 倍の活性を示した。

Tabor ら¹³⁾ は、水道水の活性炭-クロロホルム抽出物をヘキサンを用いて分画して、また、Grabow ら⁷⁾ は、水道水を直接ジクロロメタンを用いて液々抽出して、それぞれ変異活性を検討したところ、中性画分が最も高い変異活性を示したことを報告しており、著者らの実験結

TABLE III. The Extracting Efficiency of Various Organic Solvents of the Mutagenic Compounds from the Methanol Extract

Samples treated with		TA 100 His ⁺ revertants/plate
Ethyl ether	Soluble fr.	590
	Insoluble fr.	179
Ethyl acetate	Soluble fr.	540
	Insoluble fr.	187
Benzene	Soluble fr.	492
	Insoluble fr.	243
<i>n</i> -Hexane	Soluble fr.	331
	Insoluble fr.	272
Methanol extract		354
4NQO (0.1 µg)		470
Control (DMSO)		117

In each experiment, methanol extract equivalent to 2.5 mg was used per plate.

TABLE IV. Fractionation of Methanol Extract A and Their Mutagenic Activities

Samples	Yield (mg)	TA 100, -S9 mix
		Net His ⁺ revertants/mg
Acidic fr.	30.0	28
Basic fr.	3.1	56
Neutral fr.	29.3	243
Methanol extract		120

果も同様の傾向であった。

3) 変異原の熱安定性 飲料水 A より分離したメタノール抽出物 10 mg をメタノール 0.5 ml に溶かし、蒸留水 20 ml を加えたのち 10 分間煮沸した。ついでエバポレーターで水を留去し、DMSO 1 ml を加えて変異活性を検定した。その結果、煮沸後の 1 mg あたりの His⁺ revertant 数が 175 (対照: 119) で、煮沸前の 208 と比べると、62.9% の変異活性を示した。このことから、メタノール抽出物中に含まれる変異原は、熱に比較的安定な物質であることが示唆された。

ま と め

EHF 膜が飲料水中の変異原の吸着能を有するか否か、また、吸着変異原が如何なる性質を有しているかを検討して次の結果を得た。

1) EHF 膜による 3 都市 (A, B, C) の飲料水吸着物のメタノール抽出物は、いずれもサルモネラ TA 100, TA 98, TA 1537 に対して変異活性を示し、その活性は、

S9 mix の添加により低下する傾向を示した。

2) EHF 膜は、重量あたり浄水用活性炭のおよそ4.6倍の変異原吸着能を示した。

3) EHF 膜に吸着した変異原は、エチルエーテルで分画した場合、中性画分に最も高い変異活性が認めら

れ、熱に比較的安定であった。

4) 本実験より、EHF 膜は飲料水中の変異原の除去に利用できることが示唆された。

なお、本研究の要旨は、日本薬学会第105年会（昭和60年4月、金沢）において発表した。

引用文献

- 1) 岡沢和好, 用水と廃水, **17**, 1259 (1975).
- 2) 佐谷戸安好, 安藤正典, 中室克彦, 変異原と毒性, 第7集, 65 (1979); 富田基郎, 用水と廃水, **23**, 907 (1981).
- 3) 梶野勝司, 芦谷和芳, 用水と廃水, **23**, 939 (1981); 浦野紘平, 和田 洋, 水処理技術, **22**, 567 (1981).
- 4) 古賀 実, 篠原亮太, 貴戸 東, 衛藤修一, 堀 悌二, 秋山 高, 水質汚濁研究, **1**, 23 (1978); 秋山 高, 古賀 実, 篠原亮太, 貴戸 東, 衛藤修一, 産業医科大学雑誌, **2**, 285 (1980); R. Shinohara, A. Kido, S. Eto, T. Hori, M. Koga, T. Akiyama, *Water Res.*, **15**, 535 (1981).
- 5) E.R. Nestmann, G.L. LeBel, D.T. Williams, D.J. Kowbel, *Environ. Mutagen.*, **1**, 337 (1979).
- 6) S.M. Grimm-Kibalo, B.A. Glatz, J.S. Fritz, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 188 (1981).
- 7) W.O.K. Grabow, P.G. Van Rossum, N.A. Grabow, R. Denkhaus, *Water Res.*, **15**, 1037 (1981).
- 8) R. Kfir, W.O.K. Grabow, C.A. Hilner, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 641 (1982).
- 9) D.J. Schwartz, J. Saxena, *Environ. Sci. Technol.*, **13**, 1138 (1979).
- 10) 神木照雄, 河合 厚, 伊神生雄, 藤井礼子, 防菌防黴, **10**, 239 (1982).
- 11) 矢作多貴江, 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178 (1975).
- 12) B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, *Mutat. Res.*, **31**, 347 (1975).
- 13) M.W. Tabor, J.C. Loper, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **8**, 197 (1980).