水道水中の変異原物質の性質について

濱田佳子,* 野坂富雄, 中川善雄,¹⁾ 森田久男, 広瀬義文, 田中章男²⁾

埼玉県衛生研究所

Modifier of Mutagenicity of Tap Water

Yoshiko Hamada,* Tomio Nozaka, Yoshio Nakagawa,¹⁾ Hisao Morita,Yoshifumi Hirose and Akio Tanaka²⁾

Saitama Institute of Public Health, 639-1 Kamiokubo, Urawa 338-0824, Japan

(Received January 5, 1999; Accepted May 28, 1999)

Previously we reported the mutagenicity of drinking water using *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98 with and without S9 mix, and suggested that mutagens might be produced by the chlorination process. It is quite important to determine factors present in our environment affecting the mutagenicity of drinking water. Therefore, as a further study, modifiers of the mutagenicity of drinking water were investigated including dismutagens in order to invent means of the prevention of producing mutagens in drinking water. The mutagenicity of drinking water decreased as the treatment temperature of drinking water samples increased. Freezing and melting treatment of drinking water did not affect the mutagenicity of these samples. The UV irradiations of the samples reduced mutagenicity levels significantly. On the other hand the sunlight did not affect the mutagenicity of drinking water. The mutagenicity of drinking water samples decreased when the samples were treated by reducing agents such as ascorbic acid and glutathion. Especially, glutathion contained in most human tissues, reduced the mutagenicity of drinking water with 100%. It was suggested that the mutagenic compounds in drinking water are electrophilic and the conjugation of electrophiles with glutathion may represent a dismutagenic mechanism.

Keywords — drinking water, Ames test, chlorination by-products, glutathion

緒言

水道水中には多種類の有機化合物が存在し、そのうちのいくつかは発がん性の疑いが指摘されている。¹⁾ 実際に都市部の水道水は Ames 試験で変異原性を示し、その対策が急務となっている。既知の変異原物質についてはかなりその性質が調べられているのに対し、²⁾ 水道水が示す変異原性そのものの性質は、濃縮が必要となるためあまり検討されていない。前報³⁾において飲料水の変異原性の地域変動、季節変動、飲料水の変異原性と塩素処理との関連性などについて報告した。今回は、水道水の変異原性を修飾する因子の検索、特に変異原性を低減化もしくは不活化させる因子の検索を目的に調査を行い、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料水 埼玉県内の都市化が進んでいる県南部の3地域（浦和市、大宮市、岩槻市）の給水栓水を選定した。採水は1996–1998年にかけて行った。Ames 試験用試料溶液のための濃縮操作と塩素処理副生成物の測定は、採水当日行った。

2. 変異原物質の濃縮 浦野等⁴⁾の方法に準じて、Sep-Pak Plus CSP800（日本ミリポアリミテッド製）を用いた固相抽出法により変異原物質の濃縮を行った。固相を酢酸エチル、エタノール、純水の順で洗浄したのち、硫酸で pH 2 に調製した試料水 2 l を通過させた。続いて dimethylsulfoxide (DMSO) 2 ml で変異原物質を溶出し、Ames 試験用試料溶液とした。Ames 試験は可能な限り早く行ったが、すぐに試験できない場合は DMSO 溶出試料溶液を -20℃ の冷凍庫内で凍結保存した。なお、溶媒には残留農薬試験用試薬（和光純薬工業）を用い、その他は特級試薬を用いた。

3. Ames 試験 国立医薬品食品衛生研究所より分与されたサルモネラ菌 TA100 及び TA98 を用い、矢作⁵⁾のプレインキュベーション法に従った。陽性対照には benzo[a]pyrene(B[a]P)（和光純薬工業

*To whom correspondence should be addressed: Saitama Institute of Public Health, 639-1 Kamiokubo, Urawa 338-0824, Japan, Tel.: +81-48-853-6121; Fax: +81-48-840-1041

¹⁾Present address: Water Quality Management Office, 1632 Kobari, Gyoda-si, Saitama 361-0024, Japan.

²⁾Present address: Saitama Prefectural University, 820 Sannomiya, Kosigaya-si, Saitama 343-8540, Japan.

製) 及び 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) (上野製薬より分与された) を用いた。S9 は 5,6-benzoflavone (和光純薬工業製) 及び phenobarbital sodium (和光純薬工業製) を腹腔内投与した Sprague-Dawley 系雄ラットの肝臓をホモジナイズして調製した (遺伝毒性・突然変異実験法, 1978)。S9 mix の組成は矢作の方法に準じた。試験管に 0.1 ml の試験溶液 (溶媒対照は DMSO), 0.5 ml の S9 mix (溶媒対照はりん酸緩衝液), 0.1 ml の菌懸濁液をいれ, 37°C 20 分間プレインキュベートした。その後, トップアガー 2 ml を加えてよく混合してからプレート上に注いで一様に広げた。2 日間培養後, コロニーをカウントした。試験はプレートへの添加量を 1 検体につき 3 段階とし, 1 段階につき 3 枚のプレートを使用した。平均値を算出し, 試料水換算の添加量の復帰変異コロニー (His+) 数とした。変異原性の判定基準は, 菌株の His+ の数に用量依存性があり, かつ溶媒対照の His+ コロニー数の 2 倍以上のものを陽性とみなした。今回の実験において陽性対照の His+ 数は, AF-2 (-S9 mix, 0.02 µg/plate で TA100 では 373-612; 0.2 µg/plate で TA98 では 344-576), B[a]P (+S9 mix, 5 µg/plate で TA100 では 474-772; TA98 では 112-280) であった。また溶媒対照の His+ 数は 85-117 (-S9 mix, TA100), 12-29 (-S9 mix, TA98), 89-112 (+S9 mix, TA100), 30-63 (+S9 mix, TA98) であった。変異原性 (net rev./l) の値は, 被検物質の復帰コロニー数から溶媒対照の復帰コロニー数を引いた数を被検物質のプレートあたりの添加量で除して計算した。

4. 塩素処理消毒副生成物の測定 塩素処理消毒副生成物の測定はすべて固相処理前の水道水について行い, 上水試験方法「1993 年版」(日本水道協会編, 1993) に準じた。水道水中の trihalomethanes (THMs) の測定には関東化学㈱の揮発性有機化合物混合標準原液 II (基準及び監視項目 23 物質, 各 1 mg/ml メタノール溶液) を用いた。haloacetic acids, chloral hydrate の分析には和光純薬工業㈱の標準液, haloacetonitriles, formaldehyde と acetaldehyde の分析には関東化学㈱の混合標準原液を用いた。

THMs の測定はページ・アンド・トラップ装置にオートサンプラーを装着し, GC-MS (HP 製 5972) に接続することにより行った。

カラム: DB-1301 (J&W 社) (0.25 mm×60 m, 膜厚 1 µm), カラム温度: 45°C (7 min)→15°C/min→180°C (5 min), 注入口温度 150°C, キャリアガス: He 1 ml/min

Haloacetic acids は *t*-ブチルメチルエーテルで抽出後ジアゾメタンで誘導体化して測定した。Haloacetonitriles, chloral hydrate は *t*-ブチルメチルエーテルで抽出後測定した。アルデヒド類は

PFBOA で誘導体化し *n*-ヘキサンで抽出して測定した。

5. 水道水の変異原性を修飾する因子の実験

今回の試料水は前報同様代謝活性化系 (S9 mix 添加) では変異原性を示さず, 非代謝活性化系 (S9 mix 無添加) で変異原性を示した。そこで以下の実験は非代謝活性化系で行った。

①変異原性及び塩素処理消毒副生成物の加温による変化——浦和市, 大宮市の水道水 2 l をビーカーで 50°C, 70°C, 95°C に加温し, 目的とする水温になった直後に加温をやめ室温に下がるまで静置した。それを試料水とし, それぞれの変異原性及び THMs を測定した。これとは別に 97°C 以上で 10 分間沸騰させ続けたのち, 室温に下がるまで静置した後, 変異原性と THMs を測定した。また加温前と 95°C 加温後にたいしては他の消毒副生成物の測定もあわせて行った。

②冷凍, 解凍による変異原性の変化——浦和市水道水を濃縮, DMSO に溶出したのち冷凍庫で冷凍した。そのあと室温で解凍した。この冷凍, 解凍の過程を 4 回繰り返し, 各回について Ames 試験を行った。

③光照射による変異原性の変化——浦和市水道水をビーカーに入れ, 太陽光線下 (3 月末, 晴) で 0-3 時間静置したものを試料水とした。365 nm の紫外線強度は 1.1 mW/cm² (12 時測定) であった。同時に殺菌灯 (15 WAT GL-15, 1.3×10 erg/mm²) を用いて UV 254 nm (紫外線強度 1.2 mW/cm²) 下で 0-3 時間静置したものを試料水とし, Ames 試験を行った。

太陽光線による再試験を 5 月末 (晴, 紫外線強度 1.9 mW/cm²) に同条件で行い, 殺菌灯による試験も同時に行った。

④添加剤による変異原性の変化——浦和市, 大宮市, 岩槻市の水道水 2 l にアスコルビン酸ナトリウム 0-2 g を溶解し, 直ちに濃縮, DMSO に溶出したのち, Ames 試験を行った。

グルタチオン (還元型) 0-0.3 g をそれぞれ 2 l の水道水に溶解し, 同様に Ames 試験を行った。

結果及び考察

1. 加温による変化

加温による変異原性の変化を Fig. 1 に示した。処理前 (18°C) では浦和市水は 2600 net rev./l, 大宮市水は 2520 net rev./l であった。50°C 処理すると変異原性はそれぞれ 1500 net rev./l, 1600 net rev./l と約 40% 減少した。70°C 処理では 1300 net rev./l, 720 net rev./l と減少し, 95°C では浦和市水は 400 net rev./l, 大宮市水は 120 net rev./l と処理前の変異原性の 85% 以上減少した。このように水道水の変

Fig. 1. Effect of Heating on the Mutagenicity of Tap Water

TA100 His+ revertants/plate. Spontaneous revertants/plate: 116 (–S9 mix), 112 (+S9 mix). 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2): 452 (0.02 µg/plate, –S9 mix). Benzo[a]pyrene (B[a]p): 564 (5 µg/plate, +S9 mix). Samples were dissolved in DMSO.

Fig. 2. Effect of Heating on THMs Concentration of Tap Water.

Fig. 3. Concentrations of Chlorination By-products on 18°C and 95°C

異原性は水温が高くなるに従い減少した。これとは逆に THMs の濃度は水温が高くなるに従い増加した (Fig. 2)。処理前 (18°C) では chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane, bromoform, total THMs はそれぞれ 15, 10, 4, 0, 29 µg/l であったが, 50°C では 21, 13, 6, 0, 40 µg/l となった。70°C では 24, 14, 7, 0, 45 µg/l となり 95°C では 25, 12, 5, 0, 42 µg/l となった。しかし, 97°C 以上でさらに 10 分以上の沸騰をさせると 2, 0, 0, 0, 2 µg/l と THMs 濃度は減少した。変異原性については沸騰直後と変化はみられなかった。他の消毒副生成物の加温による濃度の変化

を, 加温前 18°C 及び 95°C について Fig. 3 に示した。Dichloroacetonitrile, dibromoacetonitrile, bromochloroacetonitrile, chloral hydrate, trichloroacetic acid, bromodichloroacetic acid の濃度は減少したが他の物質は増加した。この傾向は浦和市, 大宮市の水道水に共通していた。

水道水中の消毒副生成物の加温に対する濃度変化の結果は長谷川ら⁶⁾の結果と若干異なり, 多くの物質が増加傾向を示した。超純水に添加した場合は加温により減少するのみであるが, 実際の水道水中では, 揮発もしくは分解反応より生成反応の方が優勢だったためと思われる。加温により変異原性の減少

を示した Ames 試験の結果とこの現象は相関が見られず、今回測定した消毒副生成物は水道水の変異原性にあまり寄与していないと考えられた。

2. 冷凍及び解凍による変化

浦和市水道水を冷凍したのち解凍したところ不溶物ができ、Sep-Pak Plus CSP800 から DMSO への溶出は不可能であった。そこで冷凍した際にできる不溶部分を除き、残りの部分を集め試料水とし Ames 試験を行った。その結果、変異原性の顕著な減少はみられなかった。冷凍時の不溶部分に変異原物質が濃縮されるという可能性は少ないと思われた。水道水 2 l を濃縮、DMSO に溶解したのち冷凍、解凍を 2 回、3 回、4 回と繰り返した場合についての結果を Fig. 4 に示した。冷凍、解凍処理前の変異原性は 1870 net rev./l で、処理 1 回では 1810 net rev./l、2 回、3 回、4 回はそれぞれ 1560、1650、1830 net rev./l とこの場合も変異原性の減少はほとんどみられなかった。これらの結果から、水道水の変異原性は冷凍、解凍を繰り返してもほとんど変化しないこと、また冷凍、解凍によってできる不溶部分は変異原物質ではない可能性が強いことがわかった。

3. 光照射による変化

浦和市水道水の変異原性は、光源にあてない場合 (0 h) 1630 net rev./l であった。太陽光線下では 1 時間 (1 h)、2 h、3 h まで日光にあてても変異原性は 1400、1200、1310 net rev./l とあまりかわらなかった。同時に行った UV 254 nm 下による試験では、UV 照射 1 h、2 h、3 h ではそれぞれ 970、660、640 net rev./l であった。変異原性は UV 無照射と比べて約 60% 減少した (Fig. 5-A)。5 月末に再試験した時も日光ではあまり減少せず、UV 照射時に効果がみられた (Fig. 5-B)。残留塩素は 2 回とも日光、UV 照射時どちらも 1 時間でなくなっていた。なお冷暗所に静置した場合では、3 時間及び 6 時間でも変異原性、残留塩素の変化はなかった。

Trichloroethylene, tetrachloroethylene などの有機塩素化合物が UV ランプによる UV 照射で分解することが知られているが、⁷⁾ UV 照射による有機塩素化合物の分解と変異原性の関係について今後さらに検討したい。

4. 添加剤による変化

変異原物質を不活化することが知られている還元剤について、水道水の変異原性に及ぼす影響を検討した。アスコルビン酸ナトリウムの添加による実験では、大宮市水 (無添加時 2850 net rev./l) 及び岩槻市水 (無添加時 2100 net rev./l) と比較の変異原性の強い水道水はアスコルビン酸ナトリウム 0.2 g 添加で変異原性がそれぞれ 45%、35% 減少したが、さらに添加量を多くしても変異原性は変化しなかった。また、浦和市水 (無添加時 1530 net rev./l) は 0.2 g、1 g 添加時に変異原性の若干の減少傾向はみられたものの、2 g 添加で 55% と大きく減少した

Fig. 4. Effect of Freezing and Melting on the Mutagenicity of Tap Water

TA100 His+ revertants/plate. Spontaneous revertants/plate: 97 (-S9 mix), 101 (+S9 mix). AF-2: 464 (0.02 μ g/plate, -S9 mix). B[a]p: 693 (5 μ g/plate, +S9 mix). Samples were dissolved in DMSO.

Fig. 5. Effect of Light Energy on the Mutagenicity of Tap Water

(A) March, (B) May. TA100 His+ revertants/plate. (A) Spontaneous revertants/plate: TA100 102 (-S9 mix), 104 (+S9 mix). AF-2: 389 (0.02 μ g/plate, -S9 mix). B[a]p: 660 (5 μ g/plate, +S9 mix). (B) Spontaneous revertants/plate: TA100 88 (-S9 mix), 75 (+S9 mix). AF-2: 373 (0.02 μ g/plate, -S9 mix). B[a]p: 772 (5 μ g/plate, +S9 mix). Samples were dissolved in DMSO.

Fig. 6. Effect of Ascorbic Acid Sodium Salt on the Mutagenicity of Tap Water

TA100 His+revertants/plate. Spontaneous revertants/plate: 108 (-S9 mix), 116 (+S9 mix). AF-2: 446 (0.02 μ g/plate, -S9 mix). B[a]p: 704 (5 μ g/plate, +S9 mix). Samples were dissolved in DMSO.

Fig. 7. Effect of Glutathione on the Mutagenicity of Tap Water

TA100 His+revertants/plate. Spontaneous revertants/plate: 125 (-S9 mix), 122 (+S9 mix). AF-2: 390 (0.02 μ g/plate, -S9 mix). B[a]p: 476 (5 μ g/plate, +S9 mix). Samples were dissolved in DMSO.

(Fig. 6). 添加直後に濃縮した場合と1時間接触時間をおいた場合ではとくに差はみられなかった。

グルタチオンでは浦和市水（無添加時 1150 net rev./l）及び大宮市水（無添加時 1770 net rev./l）ともその変異原性がグルタチオンの用量に依存して減少した。0.3 g の添加で両市水道水の変異原性はほぼ100%抑制された。岩槻市水（無添加時 2090 net rev./l）は0.1 g の添加でほぼ100%抑制された（Fig. 7）。

グルタチオンは人体に0.5–10 mmol/l程度存在するSH化合物として知られている。化学物質の酸化抑制あるいは還元に関与している可能性や、求核性試薬として働き有害物質を不活化する可能性が指摘されている。⁸⁾ 今回のグルタチオン添加の結果は、水道水中の変異原物質の中に容易に還元剤、または求核性試薬と反応する構造部分が含まれ、グル

タチオンと反応し変異原性が抑制された可能性を示唆した。

環境におけるグルタチオン及びグルタチオントランスフェラーゼの重要性が、環境化学物質との反応性においてField⁹⁾らにより指摘されている。水道水の変異原性がグルタチオンで減少することは水道水の安全性を評価する上で重要知見と思われる。

まとめ

現在、3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2-(5H)-furanone (MX) 等の寄与が問題とされているが、今回水道水中の変異原物質はMXとよく似たふるまいを示した。MXは中性からアルカリ性では還元剤に対し不安定で、熱処理によっても簡単に分解する。¹⁰⁾ Ames試験ではTA100-S9の条件下で直接的な変異原性を示す。^{11,12)} 水道水中の変異原物質も加熱するに従い減少を示した。また水道水中の変異原物質が塩化アンモニウムや亜硫酸ナトリウムなどの還元剤で減少を示すことはよく知られているが、^{13,14)} 今回、アスコルビン酸ナトリウム及びグルタチオン添加により水道水の変異原性が抑制されることが明らかとなった。特にグルタチオンでは0.3 gの添加で変異原性を100%抑制した。

水道水中の変異原物質はUV下で減少を示したが、MXがUV下でどのように変化するかは今後検討する予定である。しかしながらMXにしても、その寄与は15–34%¹⁵⁾といわれ、ほかの強力な変異原物質の寄与も疑われている。今後、さらに多方面からのアプローチを行い報告したい。

REFERENCES

- 1) Ugawa M., Nakamura S., Nisimura H., Otake T., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 421–430 (1993).
- 2) Kada T., *Gekkan Yakuzi*, **24**, 2127–2132 (1982).
- 3) Morita H., Tadaki S., Nozaka T., Omura T., Haga M., Tanaka A., *Environ. Mutagen Res.*, **19**, 127–134 (1997).
- 4) Urano K., Takanashi H., Kanazawa N., Fujie K., *J. Jap. Soc. Wat. Environ.*, **17**, 451–460 (1994).
- 5) Yahagi T., *Tanpakku·Kakusan·Kouso*, **20**, 1178–1189 (1975).
- 6) Hasegawa K., Utunomiya A., Setuda S., *Bull. Kanagawa P.H. Lab*, 43–47 (1996).
- 7) Otaki M., Ogaki S., Yamamoto K., Kamiko N., *J. Jpn. Water Works Assoc.*, **64**, 24–32

- (1995).
- 8) Nakazawa Y., "Yakudokubutu To Seitai Tono Sougosayou," Nanzando, Tokyo, p.53, 1992.
- 9) J.A. Field, E.M. Thurman, *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1413—1418 (1996).
- 10) Ugawa M., Miyano K., Nakamura S., *Osaka Furitu Kousyu Eisei Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, **30**, 79—88 (1992).
- 11) Kronberg L., Christman R.F., Singh R., Ball L.M., *Environ. Sci. Technol.*, **25**, 99—104 (1991).
- 12) Kato M., Saito H., Nagaoka N., *Ann. Rep. Yokohama Inst. Health*, **34**, 51—57 (1995).
- 13) Suzuki N., Nakanishi J., Matuo T., *J. Jap. Soc. Wat. Environ.*, **15**, 814—821 (1992).
- 14) Cheh A.M., Skochdopole J., Koski P., Cole L., *Science*, **207**, 90—92 (1980).
- 15) Meier J.R., Knohl R.B., Coleman W.E., Ringhand H.P., Munch J.W., Kaylor W.H., Streicher R.P., Kopfler F.C.: *Mutat. Res.*, **189**, 363—373 (1987).