<論文>

水道水の Ames 変異原性に関する研究 第1報 変異原性物質濃縮回収用の吸着剤

浦野 紘 平* 高 梨 啓 和*
金 澤 伸 浩* 藤 江 幸 一*

Ames Mutagenicity of Tap Water I. A New Superior Adsorbent for Recovering Mutagens

Kohei URANO*, Hirokazu TAKANASHI*,
Nobuhiro KANAZAWA* and Koichi FUJIE*

* Laboratory of Safety and Environmental Engineering, Yokohama National University, 156, Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240 Japan

Abstract

A new superior adsorbent was selected for a convenient and quantitative mutagenicity assay of tap water. Adsorption abilities of various adsorbents such as CSP800, XAD4, XAD4/8, blue rayon, and blue cotton were investigated for recovering mutagens from tap water. CSP800 and XAD4 are highly porous polystyrene resins, but CSP800 has larger surface area and smaller particle size than XAD4. XAD4/8 is a mixture of a XAD4 and XAD8 of porous polyacrylate. Blue rayon and blue cotton are cellulose bonded copper phthalocyanine trisulfonate.

It was confirmed clearly that a new adsorbent CSP800 could recover much more mutagens in a short time than the others. Then convenient refining and conditioning method of the CSP800 was defined as follows; Five cartridges packed 2m^l of CSP800 (Sep-Pak Plus Long) were connected in series, and washed by 400m^l of ethyl acetate, 200m^l of ethanol, and 100m^l of pure water by turns at 10m^l•min⁻¹. After this refining and conditioning method, any mutagens did not elute from the adsorbent, and a little remained ethanol did not disturb the adsorption of mutagens from tap water.

Key words: mutagenicity, tap water, recovering method, adsorbent, Sep-Pak CSP800, Ames assay

1. はじめに

現在、世界中で商業的に生産されている化学物質の数は約10万種類にものぼる¹⁾。これらの化学物質が様々な経路から環境中に放出され、水道水中にも混入してきている。また、塩素消毒によってフミン質等の無害な有機汚染物質から様々な有害物質が生成されることが明らかになってきている。このため、水道水質

基準が15年ぶりに見直され²⁾、これまで26しかなかった水質基準項目が46に増やされた。しかし、米国 EPA (環境保護庁) の調査では、水道原水中から400種類以上の化学物質が同定され、そのうち235種類の化学物質が水道水中からも見いだされたと報告されている³⁾。これらの物質のうち、日常的に個別分析できる数には限界があり、また、複合作用についてはほとんど明らかにされていない。したがって、水道水の安全性を管

理するためには、代表的な有害物質の個別分析に加えて、水中の有害物質をまとめて試験する方法を併用する必要がある。特に、低濃度での長期間摂取が問題になる遺伝子毒性物質を評価するためには、簡便なバイオアッセイ法を併用する必要があると考えられる。

様々な遺伝子毒性試験方法の中でも Ames 変異原性試験法は、試験期間が短く、少量の検体で試験でき、比較的高感度であり、再現性が高く、費用も安く、簡易であることなどの利点があるため、工業薬品や食品添加物の試験にも広く使われている⁴⁾。しかし、この試験法を水道水等に適用する場合には、微量の水中変異原性物質を濃縮回収して試験しなければならない。

Ames 変異原性試験の水試料への適用例は数多く報告されており、中でも河川水およびその塩素処理水やオゾン処理水に対する適用例は多くの国で報告されている⁵⁾。しかし、いずれの報告でも変異原性物質の回収率が低いか、または不明確であるため、定量的な議論をすることができない。このため、迅速、簡便で、濃縮率や回収率が高い試料調製方法の確立が大きな課題となっている。

水中変異原性物質の濃縮回収方法としては、液一液抽出法、減圧濃縮法、逆浸透法、吸着脱離法などが報告されている⁶⁾。しかし、液一液抽出法は、有機溶媒で抽出後、溶媒を蒸発させて変異原性試験用のジメチルスルホキシド (DMSO) に再溶解 (溶媒転換) するため、操作が煩雑であるだけでなく、大量の試料水からの抽出が困難であり、また揮発性物質は回収できない。減圧濃縮法は、同様に大量の試料水を処理することが困難であり、揮発性物質は回収できない。また、無機塩類等の析出があり、濃縮率を高めることが難しい。逆浸透膜法は、濃縮率が低く、また大量の試料水を短時間で処理するためには大きな装置が必要となる。したがって、吸着脱離法が最も多く使われている。

水中変異原性物質の濃縮回収用の吸着剤には、XAD2, XAD4, CSP800 などの多孔質ポリスチレン樹脂、XAD8 などのポリアクリル酸エステル樹脂、CHPA25 などの陰イオン交換樹脂、ブルーコットンやブルーレイヨンなどの銅フタロシアニン系吸着剤などがある。

著者ら^{6)~8)}は以前、pH 未調整 (約 pH 7) および pH を 5 に調整した水道水等を用いて、ブルーコットン、XAD 2, XAD4, XAD4/8, CSP800, CHPA25 を比較し、変異原性物質、全有機ハロゲン (TOX)、総トリハロメタン (THM) などの回収率が XAD 系樹脂よりも CSP800 を用いた方が高くなり、これと CHPA25 を直列に接続すればさらに高い回収率が得られることを報告した。しかし、その後の研究によって、水道水

等の変異原性物質を濃縮する場合には、pH を約 2 程度にすると CSP800 での回収率が著しく高くなること、pH 2 では CHPA25 にはほとんど変異原性物質が吸着されないことなどが明らかになった。また、多孔質ポリスチレン樹脂を用いる場合、pH を約 2 の酸性に調整した方がよいとの報告^{9)~12)}がいくつかある。このため、改めて pH 2 における吸着脱離法に最適な樹脂を選定して、そのコンディショニング方法を決定し、また、最適な吸着条件と脱離条件を明らかにすることが必要になった。

そこで本研究では、pH 2 で水道水中の変異原性物質を濃縮回収するために、各種の吸着剤を比較し、適切な吸着剤のコンディショニング方法を検討した。なお、pH 2 が適切であるか否かの検討を含め、吸着・脱離の最適条件については次報で報告する。

2. 実験

2.1 試料

2.1.1 吸着剤

吸着剤には、三菱化成製の MCI ゲル CSP800 を、日本ウォーターズリミテッドがカートリッジに充填して Sep-Pak Plus (Long) CSP800 として販売しているもののほかに、フナコシ製ブルーコットンとブルーレイヨン、Rohm and Haas 製のアーバンライト XAD4 および XAD8 を用いた。これらの吸着剤の化学構造および物性値を Table 1 に示す。なお、XAD4 と類似の吸着剤である XAD2 は、XAD4 より内部表面積が小さく吸着容量も小さいことがすでに明らかにされている^{6),7)}ので、本研究では使用しなかった。

CSP800 と XAD4 は、いずれも極性のないポリスチレン樹脂で幅広い有機物を吸着できるが、粒径などが異なっている。XAD8 はカルボニル基をもったポリアクリル酸エステル樹脂で、弱極性となっている。ブルーレイヨンおよびブルーコットンは、 π 電子相互作用で 3 環以上の多環芳香族を選択的に吸着する銅フタロシアニンをレイヨンおよび綿に共有結合させたもので、ブルーレイヨンは銅含有率がブルーコットンの約 3 倍になっている。

なお、これらの吸着剤は、いずれも同じ容量約 2 ml の Sep-Pak Plus (Long) カートリッジに充填して用いたが、XAD8 は、XAD4 と体積比で 1 : 1 に混合した XAD4/8 に相当するように、内容積約 1 ml の Sep-Pak Plus (Short) カートリッジ 2 本に、それぞれ XAD4 と XAD8 を充填し、XAD4, XAD8 の順に直列に接続して用いた。なお、ブルーレイヨンおよびブルーコットンは Sep-Pak Plus (Long) カートリッジに 0.35g 充填した。

Table 1 Structures and properties of adsorbents

Adsorbents	CSP800	XAD4	XAD8	Blue rayon Blue cotton
Type	Highly porous nonionic resin	Highly porous nonionic resin	Porous nonionic resin	Cellulose bonded with copper phthalocyanine trisulfonate
Structure
Surface area [m ² ·(dry-g) ⁻¹]	710	630	310	-
Wet packed density [dry-g·cm ⁻³]	0.25	0.31	0.29	0.20 ^{a)}
Size [μm]	149-250	297-840	297-840	30-50
Pore volume ^{b)} [cm ³ ·g ⁻¹]	1.13	1.07	0.44	-

a)packed most densely , b)values for pores smaller than 20nm in diameter

CSP800 と XAD4 は、5 個直列に接続し、酢酸エチルを10ml・min⁻¹の上向流で通液した後、エタノールを10ml・min⁻¹の下向流で通液して精製した。精製後、イオン交換水を活性炭処理した純水を10ml・min⁻¹の上向流で通し、吸着剤中のエタノールを除去してコンディショニングした。ただし、トルエンで脱離した場合のみ、酢酸エチルの代わりにトルエンを用いて精製した。また、XAD8 はエタノールを10ml・min⁻¹の上向流で、235nmの吸光度が10mmセルで0.01以下となるまで通液した後、純水を10ml・min⁻¹の上向流で通水して精製、コンディショニングした。なお、ブルーレイヨンの精製、コンディショニングは特に必要ないとされている^{13),14)}で行わなかった。

2.1.2 試料水

試料水としては、利根川支川を水源とする千葉県旭市の水栓から採取した水道水を使用した。水道水の採取は、水栓を開いてしばらく水を流した後、共洗いを行ってから20lのポリタンクに口いっぱいまで採取し、速やかに実験室に運搬した。採取後、可能な限り早く実験したが、すぐに実験できない場合は5℃に冷

Table 2 Principal qualities of water samples

Sample	A ₂₆₀ [(50mm) ⁻¹]	TOC [mg·l ⁻¹]	TOX [mg·l ⁻¹]	Free Cl [mg·l ⁻¹]
T1	0.140	2.76	-	0.24
T2	0.114	2.24	0.114	0.42
T3	0.086	2.50	-	0.41
T4	0.101	2.22	-	0.40

却して保存した。

また、これらの試料水は、吸着濃縮直前に遊離塩素が存在するまま約5規定の硫酸をゆっくりと攪拌しながら添加し、pH 2 に調整して用いた。

これらの水道水の水質を Table 2 に示す。なお、有機物質の総括的濃度は、260nmの紫外光の吸光度(A₂₆₀)と全有機炭素濃度(TOC)を測定して求めた。吸光度は、島津製作所製の可視紫外分光光度計 UV-1200型を用いて測定した。TOC は、島津製作所製の2チャンネル全有機炭素計 TOC-500型または TOC-5000型を用いて測定した。また、全有機ハロゲン濃

Fig. 1 Adsorption system

Fig. 2 Desorption system using dimethyl sulfoxide

度 (TOX) は、三菱化成製の全有機ハロゲン分析装置 TOX-10型を用いて測定した。残留遊離塩素濃度は、HACH 製のデジタル直読水質分析器 DR/3000を用いて測定した。

2.2 試料濃縮と Ames 変異原性試験

2.2.1 変異原性物質の濃縮

変異原性物質の吸着に用いた吸着装置を Fig. 1 に示す。プレカラムは水温変化に伴って発生する気泡を取り除くために Sep Pak Plus カートリッジにガラスウールを充填したカラムである。通水には、Cole-Parmer Instrument 製の MASTERFLEX MODEL70 または日本ウォーターズリミテッド製定流量シリンジポンプ (コンセントレーター) を用い、流量は、 $50\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ とした。また、試料水容器は揮発性成分の揮散や汚染を少なくするために、外気とキャピラリーで接続し、ほぼ密閉系になるようにした。また、通水はカートリッジ中の気泡が抜け易いように上向流で行った。

CSP800 とその他の吸着剤を比較する場合には、それぞれの吸着剤を充填したカートリッジを直列に接続し、通水順序を変えて通水した。

また、CSP800, XAD4, XAD4/8 からの変異原性物

Fig. 3 Desorption system using toluene

質の脱離に用いた装置を Fig. 2 に示す。20 ml の注射筒つきシリンジポンプにカートリッジを吸着時と出入口を逆方向にセットし、DMSO を流速 $0.15\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の上向流で通液して流出液を水の入ったガラス容器に受け、滴下液面の変化で DMSO が流出し始めたことが確認されてからネジ口瓶に 2 ml 採取した。また粒径の大きな XAD4 は脱離速度が遅く、2 ml の DMSO では十分に脱離できない可能性があったが、脱離 DMSO 液量を増やすと変異原性物質濃度が低くなり、検出限界以下になってしまう可能性が高かった。そこで、Fig. 3 に示したコンセントレーターを用いて CSP800 の樹脂母体であるジビニルベンゼンと構造的に類似して脱離能力が強く、毒性の低い、トルエンを $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の上向流で 120 ml 通液して十分に脱離し、トルエンをロータリーエバポレーターを用いて 40°C で蒸発させ、残留物を 2 ml の DMSO に再溶解した。

銅フタロシアニン系吸着剤からの脱離は、まず、吸着の終わった銅フタロシアニン系吸着剤を純水で 2 回洗浄し、沄紙で十分に水分を取り除いた後、300 ml 共栓付きフラスコ中で 50:1 メタノール-アンモニア溶液 100 ml を入れて 30 分間振盪抽出した。抽出液を 300 ml ナス型フラスコに移し、再び同様の脱離操作を行い、この抽出液も同じナス型フラスコに移した。次に抽出液の入ったナス型フラスコを約 20°C のウォーターバスに入れ、ヤマト科学製 WP-11 型アスピレータで吸引し、減圧濃縮した。抽出液が濃縮されて数 ml となったところで試験管に移し、さらに濃縮して乾固した。再度ナス型フラスコの内壁に付着した物を回収するため、メタノールを加えて溶解し、同じ試験管に

移して同様に乾固し、最後に2.5mlのDMSOを加えて再溶解した。

これらの濃縮液は、孔径0.45 μ m、直径25mmの再生セルロース製メンブレンフィルターで濾過滅菌して変異原性試験に供した。なお、脱離後すぐに変異原性試験を行えない場合は、DMSO溶液を-30°Cの冷凍庫で保存した。

2.2.2 Ames 変異原性試験

Ames 変異原性試験は、労働省の微生物を用いる変異原性試験ガイドブック¹⁵⁾を基にしたプレインキュベーション法で行い、菌株にはTA98とTA100を用いた。すなわち、TA98またはTA100を37°Cで9時間前培養した液100 μ lに、上記の方法で濃縮して得たDMSO溶液100 μ lと緩衝液またはS9mix液500 μ lを加え、37°Cで20分間プレインキュベーションしたものに、ソフトアガー2mlを加えて混合した。これを予め作っておいたベースアガーのプレートにDMSO溶液が25~100 μ l $\cdot$ plate⁻¹の範囲の3~4段階となるだけ添加し、均一に広げ、37°Cで48時間培養して復帰コロニー数を数えた。この試験では、同じ条件の試験を必ず2枚のプレートで行った。また、陽性対照物質のDMSO溶液を用いた陽性対照試験を2枚のプレートで、DMSOのみを用いた陰性対照試験を4枚のプレートで同時に行い、菌の活性等を確認した。

なお、代謝活性化剤S9には、オリエンタル酵母製のフェノバルビタール、5,6-ベンゾフラボン誘導 Rat Liver S9を用いた。また、陽性対照物質としては、S9mixを使用しない場合には4-ニトロキノリン-1-オキシド(4NQO)、S9mixを使用する場合には2-アミノアントラセン(2AA)を用いた。

試験結果は、プレート上に復帰したコロニー数を試料水1lあたりに換算して表示した。すなわち、1試料あたり3~4段階の添加量で試験し、用量作用曲線の直線性が確認された範囲での試料水換算最多添加量 D_m (l-試料水 $\cdot$ plate⁻¹)の復帰コロニー数の平均値 R_m (rev. $\cdot$ plate⁻¹)と、添加量0である陰性対照試験での自然復帰コロニー数の平均値 R_o (rev. $\cdot$ plate⁻¹)とから、(1)式によって1lあたりの正味の変異原性 R (net rev. $\cdot$ (l-試料水)⁻¹)を求めた。

$$R = (R_m - R_o) / D_m \quad (1)$$

また、一部の結果は、MR値、すなわち、試料の復帰コロニー数の自然復帰コロニー数に対する比 R_m/R_o で表し、MR値 ≤ 1.4 で明確な変異原性が認められないと判断した¹⁶⁾。なお、変異原性試験結果のパラツキ範囲と信頼性については別に報告する予定である。

2.2.3 CSP800の精製・コンディショニング

吸着性能が優れていることが明らかになった

CSP800の精製とコンディショニングの条件を決めるため、カートリッジを5個直列に接続し、エタノールまたは酢酸エチルを10ml $\cdot$ min⁻¹で通液し、高速液体クロマトグラフ用のUV検出器(日本分光製UVIDEC100-III)型で流出液の紫外光の吸光度を測定して不純物の溶出の程度を調べた。なお、酢酸エチルを通液した場合には、発生する気泡が抜け易いように上向流で通液し、酢酸エチル自体の吸光度が小さく、できるだけ短波長で感度の高い260nmでの吸光度 A_{260} を測定した。また、酢酸エチルで精製後、酢酸エチルより密度が低いエタノールを通液した場合には、密度差による混合を防ぐために下向流で通液し、エタノール自体の吸光度が小さく、酢酸エチルや様々な有機物を高感度で検出する短波長の235nmでの吸光度 A_{235} を測定した。これらの有機溶媒で精製後、イオン交換後に活性炭処理した純水を10ml $\cdot$ min⁻¹の上向流で通水し、流出水のTOCを測定してエタノールの水への置換の程度を調べた。なお、純水を上向流で通液したのはエタノールより密度が高いためである。

3. 結果と考察

3.1 CSP800と銅フタロシアニン系吸着剤との比較

CSP800と銅フタロシアニン系吸着剤を順序を変えて直列に接続し、試料水を1l通水してそれぞれで回収された物質の変異原性を比較した結果をTable 3、Table 4に示す。また、この試験の用量作用曲線の例をFig. 4に示す。

Table 3に示したように、TA98 $\pm$ S9および、TA100+S9ではCSP800画分とブルーレイヨン画分のいずれについてもMR値が1.4以下になり、明確な

Table 3 Mutagenicity ratios in testing with TA98 $\pm$ S9 and TA100+S9 for the concentrated samples by CSP800 and blue rayon

Stain and addition of S9mix	CSP800 ¹⁾²⁾	Blue rayon ¹⁾²⁾
TA98-S9	1.1	1.1
TA98+S9	1.1	1.0
TA100+S9	1.3	1.0

1) Show the values at maximum dose (100 μ l-DMSO $\cdot$ plate⁻¹)

2) Sample water T1 of 1l was fed to each cartridges and finally concentrated to 2ml of DMSO

Table 4 Mutagenic activities of recovered matters by series cartridges of CSP800 and copper phthalocyanine adsorbents

Flow order	CSP800 → Blue rayon		Blue rayon → CSP800	
Fraction	CSP800	Blue rayon	Blue rayon	CSP800
Mutagenic activity ¹⁾²⁾ [net rev.·l ⁻¹]	5400	N.D. ⁴⁾	N.D. ⁴⁾	6500
Mutagenicity ratio ³⁾	2.5	0.9	0.7	2.8

Flow order	CSP800 → Blue cotton		Blue cotton → CSP800	
Fraction	CSP800	Blue cotton	Blue cotton	CSP800
Mutagenic activity ¹⁾⁵⁾ [net rev.·l ⁻¹]	7900	N.D. ⁴⁾	N.D. ⁴⁾	8600
Mutagenicity ratio ³⁾	3.3	1.0	1.2	3.5

1)TA100-S9, 2)Sample water:T1

3)At maximum dose(100μl-DMSO·plate⁻¹)

4)N.D.≤1400 net rev.·l⁻¹, 5)Sample water:T2

変異原性は認められなかった。しかし、Table 4 に示したように、TA100-S9 では、CSP800 をブルーレイヨンまたはブルーコトンの前に接続した場合も後に接続した場合も、CSP800 画分のみに明確な変異原性が認められた。

なお、銅フタロシアニン系吸着剤は π 電子相互作用で多環芳香族類等を吸着するので、吸着に対する pH の影響は小さいことがわかっている⁸⁾。

銅フタロシアニン系吸着剤画分から明確な変異原性が認められていないのは、銅フタロシアニン系吸着剤で回収できる物質は+S9 で変異原性が検出される多環芳香族化合物類が多く、これらが水道水中には少ないためと考えられる。通水倍率を大幅に増やせば銅フタロシアニン系吸着剤でも変異原性が検出される可能性もあるが、銅フタロシアニン系吸着剤で吸着できる多環芳香族化合物は CSP800 にもよく吸着され、回収されることが明らかになっている⁸⁾。すなわち、銅フタロシアニン系吸着剤では多環芳香族類しか回収できないのに対して CSP800 では疎水性の物質を幅広く回収できると考えられること、銅フタロシアニン系吸着剤は脱離操作が煩雑であり、また蒸発乾固操作を含むので揮発性物質を全く回収できないことなどから、水道

Fig. 4 Examples of dose-response curve
Sample water: T1, TA100-S9,
Fraction: CSP800

水中の変異原性物質の回収にはブルーレイヨン、ブルーコットンよりも多孔質ポリスチレン樹脂 CSP800 を用いるのがよいことが明らかになった。

3.2 CSP800 と XAD4 との比較

CSP800 と XAD4 を順序を変えて直列に接続して試料水を 1 l 通し、各々で回収された物質の変異原性を比較した結果を Table 5 に示す。なお、本研究で使用している水道水中から多孔質ポリスチレン樹脂で回収される物質は、濃縮倍率 1,000 倍でも TA98±S9 および TA100+S9 では明確な変異原性が認められなかったため、TA100-S9 のみで試験した。

いずれの試料水でも CSP800 から先に通水した場合は XAD4 画分には明確な変異原性は認められなかったのに対して、XAD4 から先に通水した場合は XAD4 画分と CSP800 画分にはほぼ同程度の変異原性が認められた。すなわち、CSP800 ではほぼ完全に変異原性物質を回収できるのに対して、XAD4 では回収が不十分であり、XAD4 で回収できなかった変異原性物質も

Table 5 Mutagenic activities of recovered matters by series cartridges of CSP800 and XAD4 (desorped by DMSO)

Flow order	CSP800→XAD4		XAD4→CSP800	
Fraction	CSP800	XAD4	XAD4	CSP800
Mutagenic activity ¹⁾²⁾ [net rev.·l ⁻¹]	7300	N.D. ⁴⁾	2100	2800
Mutagenicity ratio ³⁾	3.1	1.1	1.6	1.8

1)TA100-S9, 2)Sample water:T2

3)At maximum dose(100μl-DMSO·plate⁻¹)4)N.D.≤1400 net rev.·l⁻¹**Table 6** Mutagenic activities of recovered matters by series cartridges of CSP800 and XAD4 (desorped by toluene)

Flow order	CSP800→XAD4		XAD4→CSP800	
Fraction	CSP800	XAD4	XAD4	CSP800
Mutagenic activity ¹⁾²⁾ [net rev.·l ⁻¹]	3500	N.D. ⁴⁾	1300	2200
Mutagenicity ratio ³⁾	3.8	1.4	2.1	2.8

1)TA100-S9, 2)Sample water:T3

3)At maximum dose(100μl-DMSO·plate⁻¹)4)N.D.≤490 net rev.·l⁻¹

CSP800 では回収できることが明らかになった。

ただし、CSP800 画分の復帰コロニー数と XAD4 画分の復帰コロニー数の和は通水順序によってやや異なっていた。これは、粒径の大きな XAD4 では 2 ml の DMSO で十分に脱離できていなかったためと考えられた。しかし、1 l 通水で脱離に用いる DMSO の液量を増やすと変異原性が検出限界以下 (N.D.) になってしまうと推定された。そこで、試料水 T 4 を 2 l 通水して同様の実験を行い、XAD4 については 120ml のトルエンで十分に脱離し、2 ml の DMSO に再溶解して試験した結果を Table 6 に示す。この場合も CSP800 から先に通水した場合は XAD4 画分には明確な変異原性は認められなかったが、XAD4 から先に通水した場合は XAD4 画分と CSP800 画分に変異原性が認められ、両者の復帰コロニー数の和がほぼ一致した。

これらの結果から XAD4 より CSP800 の方が変異

Table 7 Mutagenic activities of recovered matters by series cartridges of CSP800 and XAD4/8 (desorped by DMSO)

Flow order	CSP800→XAD4/8		XAD4/8→CSP800	
Fraction	CSP800	XAD4/8	XAD4/8	CSP800
Mutagenic activity ¹⁾²⁾ [net rev.·l ⁻¹]	2500	N.D. ⁴⁾	N.D. ⁴⁾	1900
Mutagenicity ratio ³⁾	2.6	1.0	1.3	2.2

1)TA100-S9, 2)Sample water:T4

3)At maximum dose(100μl-DMSO·plate⁻¹)4)N.D.≤610 net rev.·l⁻¹

原性物質の吸着性も脱離性も優れていることが確認された。XAD4 と CSP800 はいずれもポリスチレン樹脂であるため同様の物質を吸着でき、また、XAD4 は CSP800 より内部表面積や細孔容積がやや小さい程度であるので吸着容量には大きな差はないと考えられる。しかし、XAD4 は CSP800 より粒径が大きいので吸着速度が遅く、変異原性物質の一部が吸着されずに流出してしまったと考えられる。なお、吸着速度が遅いための影響は、通水速度を遅くすることによって改善できる可能性もある。しかし、pH 2 とすると試料水の変異原性が経時変化するとの報告もある^{17),18)}ので、可能な限り迅速に濃縮回収しなければならない。本研究では、50ml·min⁻¹で通水しているので樹脂体積 2 ml の 500倍から1000倍、すなわち 1 l～2 l を通水するのに従来法より著しく短時間の20～40min ですむ。以上のことより、XAD4 よりも CSP800 を用いるのがよいことが確認された。

3.3 CSP800 と XAD4/8 の比較

CSP800 と XAD4/8 を順序を変えて直列に接続して試料水を 2 l 通水し、各々で回収された物質の変異原性を比較した結果を Table 7 に示す。

なお、XAD4/8 で回収される物質も TA98±S9 および、TA100+S9 では MR 値が1.4以下になり、明確な変異原性は認められなかった。すなわち、XAD8 を用いて回収しても TA98±S9, TA100+S9 で変異原性を示す物質は検出限界以下であった。

TA100-S9 では、CSP800 から先に通水した場合は CSP800 画分には明確な変異原性が認められたが、XAD4/8 画分には MR 値が1.4以上の明確な変異原性が認められなかった。また、XAD4/8 から先に通水した場合も CSP800 画分のみに明確な変異原性が検出された。

XAD4/8はXAD4とXAD8を各1 ml/を用いたものである。3.2で示したように回収率は低いもののXAD4がTA100-S9で検出される変異原性物質を一部を回収できたことから、XAD4/8画分にも変異原性物質が回収されているはずである。しかし、試料水T3の変異原性が低かったこと、XAD4の充填量が半分になっていること、2 ml/のDMSOで脱離がやや不十分になったことなどからXAD4で回収された変異原性物質でのMR値が1.4以下になったものと考えられる。

また、XAD8で回収された変異原性物質も検出限界以下になっていることは、TA100-S9で検出される水道水中の変異原性物質のうち、XAD4では回収されず、XAD8で回収されるような物質も無視できるほど少量であることを示している。

したがって、XAD4/8よりもCSP800を用いるのがよいことが確認された。

なお、CSP800画分の復帰コロニー数とXAD4/8画分の復帰コロニー数の合計が通水順序によりやや異なっているが、これは、XAD4/8にも多少の変異原性物質が回収されていること、XAD4/8では脱離がやや不十分になったことおよび偶然誤差によるものと考えられる。

3.4 CSP800の精製、コンディショニング方法

3.4.1 有機溶媒による精製

以上の研究でCSP800は他の吸着剤より変異原性物質の濃縮回収性能が優れていることが確認された。しかし、市販のCSP800には製造原料や反応中間体などの不純物が含まれているので、これらが脱離液中に溶出して変異原性を示す可能性があるほか、変異原性物質の吸着を阻害することも考えられる。また吸着剤の初期状態を一定にし、再現性を向上させるためにも、使用前にCSP800を精製、コンディショニングする必要があるため、その方法について検討した。

不純物を有機溶媒で除去するために、まず取り扱いが容易で安全であるエタノールを選び、カートリッジ5本に $10\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通液し、精製した結果をFig. 5に示す。1,280 ml/と大量に通液しても A_{235} が $0.07 \cdot (10\text{ mm})^{-1}$ を示し、エタノールでは通液量を増しても十分に精製することは困難であると考えられた。このため、エタノールより不純物の溶出力が強いと考えられる酢酸エチルを用いて $10\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通液し、精製した結果もFig. 5に示した。酢酸エチルを400 ml/通液することによって、 A_{260} が約 $0.01 \cdot (10\text{ mm})^{-1}$ まで下がったが、 A_{260} では一部の有機物しか検出できないため、十分に洗浄できているか否かを確認できなかった。また、最終的には酢酸エチルを純水に

Fig. 5 Elution of organic matters from CSP800 in refining by organic solvents

置換する必要があるため、さらに水と相互溶解するエタノールを用いて $10\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の下向流で精製を行った結果、Fig. 5に示したように200 ml/通液することによって、 A_{235} が検出下限の $0.001 \cdot (10\text{ mm})^{-1}$ まで下がった。すなわち、カートリッジ5本あたり、酢酸エチル400 ml/とエタノール200 ml/を通液することによって、短時間に充分な精製が行えることが明らかになった。なお、この液量はカートリッジ1本あたりでは酢酸エチル80 ml/、エタノール40 ml/であり、従来のソックスレー抽出法などに比べても特に多量ではない。

3.4.2 純水によるコンディショニング

樹脂中にエタノールが大量に残存していると、水中変異原性物質の吸着を妨げることが考えられるので、純水でこれを除去してコンディショニングする必要がある。そこで、イオン交換処理後に活性炭処理した純水を $10\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通液し、溶媒転換した結果をFig. 6に示す。カートリッジ5本に対し、はじめの100 ml/で流出水のTOC濃度が急激に減少し、約 $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ になった。これは、樹脂の間隙や比較的大きな細孔内にあるエタノールが流出したためと考えられる。

次に、最も洗浄されていない5番目のカートリッジ1本を取り外し、純水を $10\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通液した結果をFig. 7に示す。最初の約15 ml/で流出水のTOC濃度が急激に減少し、その後、約 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ で安定した。これは、細孔内に入り込んでいた少量のエタノールが徐々に流出してくるためと考えられる。この残存エタノールは、吸着を妨害することも考えられる

Fig. 6 Elution of ethanol from refined CSP800 in first conditioning by pure water

Fig. 7 Elution of remained ethanol from CSP800 in last conditioning by pure water before use

が、一方で疎水性の樹脂と水との架け橋の役割を果たすため、少量存在すると水中有機物質の回収率を向上させるという報告もある¹⁹⁾。

そこで、残存エタノールの影響を調べるため、カートリッジからの流出水のエタノールのTOCが204 mg·l⁻¹および0.1mg·l⁻¹になるまで洗浄したCSP800に試料水T3を2 l 通水して変異原性物質を濃縮し、濃縮液の変異原性に明確な差が認められるか否かを検討した結果をTable 8に示す。両者の間には明確な差は認められなかった。したがって、TOCで5 mg·l⁻¹程度になるまで純水で置換すれば十分であると考えられた。

3.4.3 精製、コンディショニングしたCSP800からの溶出物の変異原性

上記のようにコンディショニングしたCSP800から、脱離溶媒であるDMSOで脱離される物質に変異原性が認められないことを確認する必要がある。そこ

Table 8 Influence of residual ethanol on recovery of mutagens

Residual ethanol [mg·C·l ⁻¹]	Mutagenic activity ¹⁾²⁾ [net rev.·l ⁻¹]
204	2500
0.1	2100

1)TA100-S9, 2)Sample water:T4

Table 9 Mutagenicity ratio for eluatants from CSP800 after refining and conditioning

Stain and addition of S9mix	Mutagenicity ratio ¹⁾²⁾
TA98-S9	0.8
TA98+S9	1.2
TA100-S9	0.8
TA100+S9	1.0

1)Desorbed by 2ml-DMSO

2)At maximum dose(100μl-DMSO·plate⁻¹)

で精製、コンディショニングし終えた状態のCSP800にDMSOを0.15ml·min⁻¹の向上流で通液し、その脱離液2 mlを変異原性試験した結果をTable 9に示す。TA98±S9, TA100±S9の条件で、いずれもMR値が0.8~1.2で1.4以下であり、明確な変異原性は認められなかった。

これより、Fig. 8に示した方法で精製、コンディショニングしたSep-Pak Plus (Long) CSP800を用いれば、容易に、高い回収率と濃縮率で変異原性物質を回収できることが明らかになった。

4. 結 論

水道水の総合的な安全性を変異原性という遺伝子毒性指標で簡易に評価できるようにするため、まず、水道水中の変異原性物質を濃縮回収するための吸着剤について詳細な検討を行った結果、以下の結論を得た。

1) 銅フタロシアニン系吸着剤ブルーレイオンおよびブルーコットンでは、1,000倍に濃縮しても水道水中

Fig. 8 Refining and conditioning method of Sep-Pak Plus (Long) CSP800 cartridge

から回収される変異原性物質は検出限界以下であった。

2) 同じ多孔質ポリスチレン樹脂で従来の XAD4 と XAD4 より内部表面積がやや大きく、粒径がかなり小さな CSP800 とを比較した結果、CSP800 で回収できる物質が XAD4 では回収できず、XAD4 で回収できる物質は CSP800 で回収できた。

3) XAD4 と多孔質ポリアクリル酸エステル樹脂 XAD8 の併用 (XAD4/8) では、わずかしかな変異原性物質を回収できず、CSP800 より性能が大幅に低かった。

4) CSP800 の不純物を除き、コンディショニングする方法を検討し、Sep-Pak Plus (Long) CSP800 を 5 本直列に接続し、酢酸エチルを約 $10\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の上向流で 400ml 通液後、エタノールを約 $10\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の下向流で 200ml 通液し、さらに、イオン交換処理後に活性炭処理した純水を約 $10\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の上向流で 100ml 通水して保存し、使用のつど、1 本ずつ純水を約 $10\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の上向流で約 20ml 通水すればよいことが確認された。

以上の結果から、新しい多孔質ポリスチレン樹脂である CSP800 が変異原性物質の濃縮回収に最も優れた性能を示すことが確認され、その精製、コンディショニング方法が確立された。

(原稿受付 1993年10月26日)

(原稿受理 1994年5月16日)

引用文献

- 1) 森田晶敏 (1991) 有害化学物質に関する研究の現状と将来動向, 生活と環境, 36, 51-53.
- 2) 厚生省 (1993) 水道水質に関する基準の制定について, 水道協会雑誌, 62, 85-123.
- 3) U.S.EPA (1975) Report to the U.S. congress on suspect carcinogens in water supplies, June 17, U.S.EPA Washington D.C.
- 4) 石館基編集 (1991) 変異原性, 遺伝毒性, 毒性試験講座 12, 224pp, 地人書館, 東京.
- 5) 浦野紘平, 金澤伸浩 (1991) 細胞などを用いた毒性試験方法と水試料への適用例, 用水と廃水, 33, 711-724.
- 6) 浦野紘平, 芳賀伸之, 江本ふで子 (1988) 水道水等の変異原性試験方法, 水道協会雑誌, 57 (3), 36-49.
- 7) Urano, K., Haga, N., Emoto, F. and Shinome, T. (1988) Method for evaluating mutagenicity of water I. A new method of preparing samples for mutagenicity test, *The Science of Total Environment*, 74, 177-189.
- 8) 浦野紘平, 金澤伸浩 (1990) 水中微量有機物質の濃縮回収と変異原性試験, 第24回水質汚濁学会講演集, 403-404.
- 9) 北森成治, 中村又善, 松尾宏 (1989) 環境水に関する変異原性の評価—機械すきと紙製造工場排水の影響—, 用水と廃水, 31, 992-997.
- 10) Kito, K., Otsuki, T., Suzuki, N. and Nakanishi, J. (1988) Mutagenicity of drinking water and the relation to total organic halogen, *Chemosphere*, 17, 2219-2232.
- 11) Omura, M., Inamasu, T. and Ishinishi, N. (1991) Mutagenicity assays of leachate from domestic waste landfills in Japan: The establishment of a protocol for measuring mutagenicity levels of leachate, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 46, 561-568.
- 12) 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野仁 (1993) Ames 試験による水質評価, 用水と廃水, 35, 311-319.
- 13) Sakamoto, H. and Hayatsu, H. (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water, mutagens in Yodo river system, Kyoto-Osaka, *Environ. Contam. Toxicol.*, 44, 521-528.
- 14) 山内あい子, 松本典文, 中川博之, 大塚孝子, 山崎裕康, 垣内靖男 (1989) ブルーコットン吸着法による河川水中の多環芳香族炭化水素の分析, 衛生化学, 35, 283-290.
- 15) 労働省化学物質調査課 (1986) 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 187pp, 中央労働災害防止協会, 東京.
- 16) 高梨啓和, 藤江幸一, 浦野紘平 (1994) 水試料の Ames 変異原性試験結果の統計的解析と評価, 第28回日本水環境学会年会講演集, 764-765.
- 17) 畑野和広, 神野透人, 関田寛, 安藤正典, 武田明治 (1990) 水道水中の変異原物質の濃縮方法の検討, 第42回全国水道研究発表会講演集, 572-574.
- 18) 岡部文枝, 高梨啓和, 藤江幸一, 浦野紘平 (1992) 水道水中の変異原性物質の特性, 第26回日本水環境学会年会講演集, 96-97.
- 19) Bolygo, E. and Atreya, N.C. (1991) Solid-phase extraction for multi-residue analysis of some triazole and pyrimidine pesticides in water, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 339, 423-430.