〈論 文〉

水道水の Ames 変異原性に関する研究 第2報 高性能吸着剤を用いた変異原性物質の濃縮・回収方法

浦野 紘平* 高梨 啓和* 金澤 伸浩*
岡部 文枝* 藤江 幸一*

Ames Mutagenicity of Tap Water II. Sample Preparation Method Using A Superior Adsorbent

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

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

Abstract

Sample preparation method using a cartridge (Sep-Pak Plus Long) in which 2m^l of a superior adsorbent CSP800 was packed was optimized for convenient and quantitative Ames mutagenicity assay of tap water.

Mutagenicity activities were decreased considerably by free chlorine reduction by sodium sulfite. Recovery of mutagens from tap water augmented much in lower pH. There was no influence of adsorbing flowrate in the range from 8 to 80m^l·min⁻¹ on the recovery of mutagens. Therefore, it is optimal that tap water adjusted at pH2 without free chlorine reduction is fed to the cartridge at a flowrate of c.a. 50m^l·min⁻¹. By this method, the mutagens less than 8,000 net revertants·l⁻¹ could be recovered completely from 2^l of water sample, and those more than that could be recovered from 1^l. The adsorbed mutagens could be desorbed by 2m^l-dimethyl sulfoxide (DMSO) at 0.15 m^l·min⁻¹ in upper flow.

This newly developed method requires only 1 or 2^l of water sample and less than an hour to concentrate mutagens with over 90% recovery. Furthermore, the desorbing DMSO solution can be used directly to Ames assay without solvent exchange, because concentration factor of mutagens by this method attains 500 or 1,000 times.

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

1. はじめに

現在、様々な有害化学物質が環境中に放出され、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、特定有害物質の個別分析に加えて、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、低濃度での長期間の摂取が問題と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の併用が重要である。

* 横浜国立大学工学部物質工学科 〒240 横浜保土ヶ谷区常盤台156

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¹⁾。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する必要がある。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いるが、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²⁾。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。

前報³⁾では、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、多孔質ポリスチレン樹脂である CSP800 が従来の吸着剤に比べて変異原性物質の回収性能が優れていることを示し、その精製・コンディショニング方法について報告した。しかし、CSP800 を用いて水道水中の変異原性物質を的確に濃縮するためには、試料水の調製方法および吸着と脱離の最適条件について詳しく検討する必要がある。

従来、試料水に亜硫酸ナトリウムなどを添加して残留遊離塩素を消去している例が多い。しかし、亜硫酸ナトリウムが水中変異原性物質と反応する可能性があるという報告^{4),5)}がある。pH についても、pH2 付近の酸性に調整している例が多く^{6)~9)}、また水道水中に存在する強変異原性物質である MX、すなわち 3-クロロ(4-ジクロロメチル)-5-ヒドロキシ-2 (5H)-フラノン、は、pH7 では不安定であるが pH2 では安定であるとの報告¹⁰⁾もあるが、至適 pH についての詳細な報告はない。また、水中変異原性物質の吸着率を上げるためには通水速度をなるべく遅くした方がよいが、通水速度が遅いと操作時間が長くなることや水道水の変異原性が経時変化するとの報告^{11),12)}があり、最適な通水速度も不明確である。さらに、従来の報告では通水倍率が数百倍から数万倍と大きく異なり²⁾、汚染の進んだ試料水でも変異原性物質を完全に回収できているか否か、また比較的にきれいな試料水でも変異原性を検出できるだけの濃縮率が得られているか否かも明らかにされていない。さらに、著者ら^{2),13)}は、脱離溶媒として溶媒転換せずに Ames 試験の検体にできるジメチルスルホキシド (DMSO) を CSP800 と等体積 (2 ml) 用いてきたが、等体積で十分であることの確認のほか、CSP800 との親和力が著しく強く、DMSO では脱離できないような変異原性物質がないことの確認がされていない。

そこで本研究では、水道水中の変異原性物質を Sep-Pak Plus (Long) CSP800 カートリッジ (充填量約 2

ml) を用いて簡便かつ効率的に濃縮回収する方法を確立するため、遊離塩素消去と pH 調整の影響、通水速度と通水倍率の影響、脱離に用いる DMSO の液量の影響および DMSO での変異原性物質脱離能力の確認などについて検討した。

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内容積約 2 ml の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を用いた。この Sep-Pak Plus (Long) CSP800 は、前報³⁾で決めた方法で精製・コンディショニングした。すなわち、5 個直列に接続し、400ml の酢酸エチルを $10\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通液した後、200ml のエタノールを $10\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 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 100ml を $10\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通水し、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。さらに、使用前にカートリッジ 1 本ごとに純水 20ml を約 $50\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で通水してから使用した。ただし、トルエンで脱離した実験の場合のみ、酢酸エチルの代わりにトルエンを用いて精製した。

2.1.2 試料水

試料水としては、相模湖を水源とする横浜市保土ヶ谷区の水栓から採取した水道水 (Y)、江戸川を水源とする葛飾区の水栓から採取した水道水 (K)、および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 (T) を使用した。水道水の採取は、水栓を開い

Table 1 Principal qualities of water samples

Sample	A ₂₆₀ [(50mm) ⁻¹]	TOC [mg·l ⁻¹]	TOX [mg·l ⁻¹]	Free Cl [mg·l ⁻¹]
T1	0.101	2.22	-	0.40
T2	0.095	-	0.235	0.65
T3	0.033	-	0.310	0.90
T4	0.083	1.81	0.271	0.26
T5	0.087	2.24	-	0.40
T6	0.078	3.78	0.202	0.28
T7	0.119	1.88	0.250	0.77
T8	0.061	1.30	-	0.73
K1	0.055	1.52	0.155	0.71
K2	0.040	0.82	-	0.90
Y1	0.032	0.88	-	0.70
Y2	0.017	0.53	0.048	0.70

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あるまま約5規定の硫酸をゆっくりと攪拌しながら添加し、pH2に調整して用いた。

これらの水道水の水質をTable 1に示す。なお、有機物質の総括的濃度は、260nmでの吸光度(A_{260})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50mmセルで測定した。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DR3000型を用いて測定した。

2.2 濃縮・回収方法

2.2.1 吸着・脱離の装置と方法

吸着・脱離に用いた装置は前報³⁾と同様のものを用いた。

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 (Long) カートリッジにガラスウールを充填したものを吸着剤カートリッジの前に取り付けた。また、低沸点成分の揮散を防ぐため、キャピラリーで外気と接続してほぼ密閉系とした。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50ml・min⁻¹(SV=1,500h⁻¹)とした。なお、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。

脱離にはDMSOを用いるので、シリコンゴムチューブなどを使用しない20ml注射筒付きのHarvard Apparatus製シリンジポンプを用いた。吸着後、DMSOを0.15ml・min⁻¹で通液して、カートリッジ内の水がDMSOに置換され、DMSOが流出し始めてからネジ口瓶に2mlを採取した。また、トルエンで脱離した場合は、1ml・min⁻¹の上向流で120ml通液して十分に脱離した。このトルエンはロータリーエバポレーターを用いて40℃で蒸発させ、残留物を2mlのDMSOに再溶解した。

これらの脱離液は、孔径0.45μm、直径25mmの溶媒耐性のある再生セルロース製メンブレンフィルターで汙過滅菌して変異原性試験に用いた。なお、脱離後すぐに変異原性試験を行えない場合には、-30℃以下の

冷凍庫に保存した。

2.2.2 残留遊離塩素除去の影響の検討

水道水中に遊離塩素が残留していると試料水を取り扱っている間に遊離塩素と水中の有機物や吸着樹脂が反応して変異原性物質を新たに生成する可能性があるため、従来の研究では還元剤である亜硫酸ナトリウムを残留遊離塩素と当量添加して除去していた^{2),13)}。しかし、還元剤を添加した場合に変異原性が低下するとの報告^{4),5)}がある。そこで、残留遊離塩素除去の影響について検討するため、試料水に亜硫酸ナトリウム水溶液を添加してSep-Pak Plus (Long) CSP800カートリッジに2~4lを通水して吸着濃縮し、変異原性の変化を調べた。

遊離塩素と亜硫酸ナトリウムは(1)、(2)式に示すとおり、1:1のモル比で反応する。したがって、遊離塩素濃度がX(mg・l⁻¹)の試料水V(l)に、1:nのモル比で添加するためには、亜硫酸ナトリウムを(3)式で与えられるA(mg)だけ添加すればよい。

$$A = 3.55nVX \quad (3)$$

なお、亜硫酸ナトリウムは溶存酸素などにも一部が消費されるため、n=1で添加したい場合には、計算量添加後に遊離塩素濃度を測定し、遊離塩素が残留していれば亜硫酸ナトリウムを少量添加し直して完全に消去した。また、n>1となるように添加したい場合には、遊離塩素が消去されたことが確認された添加量を1当量とし、それに(3)式で計算したモル比のn-1分の亜硫酸ナトリウムをさらに添加した。また、亜硫酸ナトリウムおよびその水溶液は、長期間保存すると空気中の酸素によって酸化されて硫酸ナトリウムになるので、常に新しいものを用いた。

2.2.3 試料水のpHの影響の検討

濃縮に使用した吸着樹脂はポリスチレンであるので疎水性であり、幅広い有機物を吸着できるが、極性の強い物質は吸着しにくい。一方、水中の有機物にはカルボキシル基などの弱酸性基をもち、中性付近で解離しているものが多いと考えられる。このため、試料水のpHを低くすることによりカルボキシル基などの解離を抑えれば、吸着しやすくなり、回収率が高くなると考えられる。しかし、pH調整によって水中有機物に変化してしまう可能性もあるため、pH調整の是非を含めて最適pHを検討する必要がある。

そこで、遊離塩素を除去していない試料水に、約5規定の硫酸を泡立たない程度に攪拌しながら、pHが約5, 3, 2, または1になるまで徐々に添加してからCSP800カートリッジに4lを通水して回収物の変

異原性を比較した。また、pH を調整することによって水中有機物質が反応することがないことを確認するために、同一試料水について pH を 2 に調整して常温で 17 時間放置した後に、約 5 規定の水酸化ナトリウム水溶液を添加して再び pH7 に戻した水、pH2 に調整して 17 時間放置した水、pH 未調整 (pH 約 7) の水を 17 時間放置した水について、4 l 通水して回収物の変異原性を比較した。

2.2.4 通水速度の検討

通水速度が速いほど操作が短時間ですみ、また水道水中の変異原性物質が経時変化する^{11),12)}ため、なるべく通水速度は速い方がよい。しかし、あまり通水速度が速すぎるとカートリッジ内の流れが不均一になったり、吸着帯が長くなって変異原性物質の一部が吸着できずに流出してしまう可能性がある。そこで、通水速度の影響を検討するために、試料水を入れた同じタンクから、並列した Sep-Pak Plus (Long) CSP800 カートリッジに、 $8 \sim 80 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\text{SV} = 240 \sim 2,400 \text{ h}^{-1}$) で 1 ~ 4 l 通水して回収物の変異原性を比較した。

2.2.5 通水可能倍率の検討

吸着樹脂量を減らすか通水量を増やす、すなわち通水倍率を高くすると濃縮率が高くなり、水道水の変異原性を高感度で検出できることになる。しかし、変異原性物質等を高濃度に含む試料水について通水倍率を高くし過ぎると、変異原性物質が吸着しきれずに流出してしまう可能性がある。このため、試料水を濃縮する際の最適な通水倍率を求める必要がある。そこで、Sep-Pak Plus (Long) CSP800 カートリッジを 5 ~ 7 個直列に接続し、残留遊離塩素が存在するまま pH を 2 に調整した試料水を 2 ~ 8 l 通水し、それぞれのカートリッジを別々に脱離し、各カートリッジでの回収物の変異原性を測定して通水倍率の影響を検討した。すなわち、Sep-Pak Plus (Long) カートリッジを 7 本直列に接続し、通水速度 $17 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で 3.2 l 通水、または $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で 4 l 通水、5 本接続して $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で 4 l または 8 l を通水するか、CSP800 の充填量が半分の約 1 ml である Sep-Pak Plus (Short) カートリッジを 5 本直列に接続し、 $33 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で 2 l 通水して、通水倍率の異なる各カートリッジでの回収物の変異原性を比較した。

2.2.6 必要脱離液量と DMSO の脱離性能の確認

CSP800 に吸着した物質を変異原性試験に直接使用可能な DMSO を用いて脱離できれば、従来のように脱離溶媒を蒸発乾固させて他の溶媒に転換する操作が不要なので簡便である。また、蒸発乾固操作を含む濃縮法では揮発性のある物質を回収することは不可能であるのに対して、DMSO を用いて脱離できれば特に揮

発性の高い物質以外は回収できる。しかし、濃縮倍率を高くするためには少量の DMSO で脱離しなければならない。そこでまず、脱離に必要な DMSO の液量を確認するため、試料水 1 ~ 2 l を通水後に DMSO で脱離し、0 ~ 2 ml、2 ~ 3 ml および 3 ~ 4 ml の液を採取して変異原性試験を行った。

さらに、DMSO の脱離性能を確認するために、DMSO で脱離した後に CSP800 の樹脂母体であるポリスチレンと構造的に類似し、親和力、すなわち脱離能力が高いと考えられるトルエンで脱離して残存変異原性物質の有無を調べた。すなわち、残留遊離塩素が存在するまま pH を 2 に調整した試料水 4 l を通水後、2 ml の DMSO で脱離して DMSO 画分を得た後に、トルエンで脱離してトルエンを蒸発後、DMSO に再溶解したトルエン画分の変異原性を調べた。

なお、2 ml の脱離液を得るには、カートリッジの空間容積を含めて約 3 ml 通液する必要がある、通液速度を $0.15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ としたので、約 20 分を要する。操作性から考えて、これ以上通液速度を速くして時間を短縮する必要はないと考えられる。一方、通液速度を低くすれば、接触時間が長くなり、脱離効率が高くなる可能性があるが、逆に液中境界膜拡散が遅くなり、脱離効率が低くなる可能性もあり、また操作時間が長くなる。したがって、通液速度は $0.15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 程度で良いと考えられる。

2.3 Ames 変異原性試験

Ames 変異原性試験は、前報³⁾と同様に、労働省の微生物を用いる変異原性試験ガイドブック¹⁴⁾を基にしてブレインキューベーション法で行った。なお、今回用いた試料水中から CSP800 に吸着され、DMSO で脱離される物質は TA100+S 9、TA98±S 9 の条件では変異原性が検出されないことが既に明らかになっている^{3),15)}ので、特に示されていない場合は TA100-S 9 の条件のみで試験した。なお、代謝活性化剤 S 9 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 S 9 を用いた。また、陽性対照物質としては、S 9 無添加の場合には 4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO)、S 9 添加の場合には 2-アミノアントラセン (2AA) を用いた。また、同じ条件の試験を必ず 2 枚のプレートで行い、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った。

試験結果は、前報³⁾と同様の方法でプレート上に復帰した正味のコロニー数を試料水 1 l あたりに換算した値 R ($\text{net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$) で表示した。

また、一部の結果は MR 値、すなわち、試料の復帰

Fig. 1 Influence of chlorine reduction

コロニー数 R_m の自然復帰コロニー数 R_0 に対する比 R_m/R_0 で表し, MR 値が1.4以下で明確な変異原性が認められない (N.D.) と判断した¹⁶⁾。なお, 変異原性試験結果のバ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。

3. 結果と考察

3.1 遊離塩素除去と残留遊離塩素の影響

3.1.1 遊離塩素除去の影響

亜硫酸ナトリウムを添加した場合の影響を検討した結果を Fig. 1 に示す。亜硫酸ナトリウムを添加することによって変異原性は明らかに低下した。すなわち水道水中には還元されると変異原性が低下する物質が含まれていることが明らかになった。特に, 亜硫酸ナトリウムの添加量が0.5当量で, 遊離塩素が残留している状態の場合でも変異原性が低下したことから, 変異原性物質の中には遊離塩素より酸化力が強い物質が含まれていると考えられた。また, 添加量が1~10当量までは変異原性が無添加のときの約2分の1で大きな変化が認められなかったことから, 水道水中の変異原性物質は酸化力が強く, 還元されると変異原性が半減して還元された後は安定な物質であるか, あるいは還元剤と反応すると変異原性が著しく減少する物質と還元剤と反応しない物質とが約2分の1ずつ含まれていると考えられる。なお, 変異原性物質の同定、定量については, 別報で報告する予定である。

以上より, 水道水の変異原性を測定する際には, 還元剤を添加しないで濃縮すべきであることが明らかにされた。

Table 2 Examinations of producing mutagens by reaction of CSP800 with free chlorine

Stain and addition of S9mix	Concentration of free chlorine in water[mg·l ⁻¹] ¹⁾²⁾				
	0.35	0.77	3.1	9.5	32
TA100-S9	1.2	0.9	1.4	1.4	1.2
TA100+S9	—	—	—	—	0.9
TA98-S9	—	—	—	—	1.4
TA98+S9	—	—	—	—	1.0

1) Show the value of mutagenicity ratio at maximum dose (100 μ l-DMSO·plate⁻¹)

2) Pure water of 4l containing sodium hypochlorite was fed to 2ml-CSP800 and desorbed with 2ml-DMSO

Fig. 2 Effect of pH of water sample on recovery of mutagens

3.1.2 残留遊離塩素と吸着剤との反応の影響

遊離塩素が残留している試料水を濃縮すると遊離塩素と吸着剤である CSP800 または吸着剤中の不純物とが反応して変異原性物質を生成する可能性もある。そこで, イオン交換後に活性炭処理した純水に塩素として最高32mg·l⁻¹の次亜塩素ナトリウムを添加した試料水を精製・コンディショニングした Sep-Pak Plus (Long) CSP800 に通水倍率2,000倍, すなわち, 4 l 通水して 2 ml の DMSO で脱離した液の変異原性を検討した結果を Table 2 に示す。水道水より著しく高濃度の遊離塩素水溶液を2,000倍通水しても MR 値が1.4以下になり, 吸着剤からの変異原性物質の生成は無視できることが示された。

以上より, 遊離塩素が残留したままの水道水を精製・コンディショニングした Sep-Pak Plus (Long) CSP800 に通水して吸着濃縮しても遊離塩素の変異原性試験への影響はないことが確認された。

Table 3 Examination of mutagens by pH adjustment

pH	Mutagenicity ratio ¹⁾²⁾
7	1.8
2	5.4
7→2→7	1.7

1) Water sample: T3

2) At maximum dose (100 μ l-DMSO $\cdot$ plate⁻¹)

3.2 試料水の pH の影響

試料水の pH を変えて吸着した場合の変異原性試験結果を Fig. 2 に示す。pH の低い方が明らかに変異原性が高くなっており、pH2 では pH7 の 6 倍以上となっているが、pH1 と pH2 では大差なかった。また、pH を 1 に調整するためには大量の酸を添加しなければならないため、試料水の pH は約 2 とするのが適当であると考えられた。

つぎに、同一の試料水について pH を 2 に下げた後、約 17 時間放置してから再び pH7 に戻して吸着濃縮した試料 (pH7 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 7)、pH を 2 に下げたまま 17 時間放置して濃縮回収した試料 (pH2) および pH を調整せずに pH7 のまま 17 時間放置して濃縮回収した試料 (pH7) の変異原性を比較した結果を Table 3 に示す。pH2 では明らかに変異原性が高く、pH7 と pH7 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 7 では明確な差がなかった。これらのことから、pH を 2 に調整したことによって反応がおり、中性でも安定な変異原性物質が生成することはないことが確認された。ただし、pH を 7 に戻せばもとに戻る可逆反応が生じている可能性や pH2 で生成した変異原性物質が pH7 では吸着されなかったという可能性を完全に否定することはできないが、これらを確認することはきわめて困難である。一方、水中有機物の多くがカルボキシル基などの弱酸性基をもつことから、pH を 2 に調整することによって解離が抑えられ、変異原性物質が CSP800 に吸着されやすくなった可能性が高いと考えられる。また、水道水の生体への影響を考える場合、飲用された水は pH1.0~1.5 の胃液にさらされるので、生体内では pH2 程度になることもあり得る。したがって、pH を 2 に調整して吸着濃縮し、水道水の変異原性を評価する方法がよいと考えられる。

3.3 通水速度の検討

通水速度の影響について検討した結果を Fig. 3 に示す。流速 8~80 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の範囲で変異原性がほぼ一定になったことから、この範囲内では通水速度の影響

Fig. 3 Influence of flow rate on recovery of mutagens

はなく、変異原性物質は十分に吸着できると考えられた。したがって、80 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ までは任意の通水速度を選べるが、通水速度が速すぎるとカートリッジの圧力損失が大きくなり、ジョイント部分からの液漏れなどをおこすことがあるので 50 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 程度が最適と考えられた。

なお、通水速度の影響がなかったことから、この通水速度範囲においては、水中変異原性物質の CSP800 樹脂への吸着は粒内拡散律速になっていると考えられる。粒内拡散の場合、Fick の第 2 法則より一定吸着量になるまでの吸着時間が吸着剤半径の 2 乗に比例することになる。本研究で用いた CSP800 は、従来の XAD 4 に比べて平均粒径が約 2.8 分の 1 である。したがって、CSP800 は XAD 4 に比べ約 8 分の 1 の時間、すなわち約 8 倍の通水速度で同等以上の吸着量が得られることになる。このことから、前報⁹⁾で示したように、従来の XAD 4 より CSP800 が変異原性物質の濃縮回収に著しく優れた性能を示すことが説明される。

3.4 通水可能倍率の検討

Sep-Pak Plus (Long) カートリッジを直列に接続して各カートリッジでの回収物の変異原性を測定し、入口側から順次変異原性の値を積算した結果を Fig. 4 に示す。この結果は、通水量当りの樹脂量を変化させた場合の変異原性の変化を示している。試料水 1 l あたりの樹脂量 (ml) を増やすと変異原性が増加し、ほぼ一定値に漸近する。使用樹脂量を非常に多くすれば試料水中の変異原性物質の回収率が 100% になると考えられるが、樹脂量を多くすると脱離液量が多く必要になるので濃縮率が低下してしまう。そこで、90% 程度以上回収できる樹脂量を検討してみたところ、100% 回収時の変異原性が約 5,000 net rev. $\cdot$ l⁻¹、3,300 net

Fig. 4 Changes of recovery of mutagens with resin volumes for unit volume of water sample

rev.・ l^{-1} 、および2,800net rev.・ l^{-1} の通常の汚染度の試料水の場合には、いずれも試料水1 l 当たり1 ml の樹脂で約90%以上の回収率が得られた。すなわち、変異原性が8,000net rev.・ l^{-1} 程度以下の試料水については、通水倍率1,000倍までは変異原性物質を約90%回収できることが明らかになった。これに対して、100%回収時の変異原性が約21,800net rev.・ l^{-1} および約11,600net rev.・ l^{-1} と著しく高い試料水 T 7 および T 6 の場合には、試料水1 l 当たり1 ml の樹脂では約70~80%しか回収できず、2 ml の樹脂で約90%の回収率が得られた。すなわち、変異原性が8,000net rev.・ l^{-1} 程度以上の試料水については、通水倍率500倍までは変異原性物質を約90%回収できることが明らかになった。

また、水道水の変異原性の地域差を評価したり、変異原性の高い水道水に対する対策を考える場合、変異原性の最も高い試料水の10分の1から20分の1程度までの変異原性が測定可能であればよいと考えられる。試料水 T 7 を500倍に濃縮すると、約21,800net rev.・ l^{-1} の復帰コロニーが得られたが、これは従来の研究および本研究で得られた最高値である。したがって、変異原性の低い試料水については、1,000~2,000net rev.・ l^{-1} 程度まで測定できればよいと考えられる。しかし、このように変異原性の低い試料水を濃縮倍率500倍で試験すると、プレートへの最多 DMSO 添加量100

Table 4 Investigation on minimum volume of desorbing solvent

Fraction [ml-DMSO]	Water sample ¹⁾		
	K1	Y2	T7
0~2	5.9	2.8	11.8
2~3	1.1	1.2	1.1
3~4	0.9	1.0	1.1

1) Show the values of mutagenicity ratio at maximum dose(100 μ l-DMSO-plate $^{-1}$)

μ l が試料水換算で0.05 l ・plate $^{-1}$ 添加に相当するので、50~100net rev.・plate $^{-1}$ 程度の復帰コロニー数しか得られないことになる。これではMR値が1.4以下で陰性対照の偶発誤差範囲内に入ってしまう、変異原性を定量できない。これに対して、1,000倍程度まで濃縮したDMSO溶液をプレートに100 μ l 添加することになれば、100~200net rev.・plate $^{-1}$ 程度の復帰コロニーが得られることになり、MR値が2程度になるので定量できる。したがって、多くの水道水では、通水倍率を1,000倍、すなわち、Sep-Pak Plus (Long) CSP800に2 l 通水すればよいと考えられる。ただし、全有機炭素(TOC)が1.5mg・ l^{-1} 以上、トリハロメタン (THM) が50 μ g・ l^{-1} 以上、または全有機ハロゲン (TOX) が150 μ g・ l^{-1} 以上になることが多く、約8,000net rev.・ l^{-1} 以上になることが予想される水質の悪い水道水では500倍、すなわち1 l 通水すればよいと考えられる。なお、変異原性が全く予測できない試料水の場合には、Sep-Pak Plus (Long) CSP800を2本直列に接続して2 l 通水し、それぞれのカートリッジの脱離液について変異原性試験を行えば、通水倍率500倍と1,000倍の両者の結果が得られ、いずれかで正確な定量ができる。

3.5 必要脱離液量とDMSOの脱離性能の確認

2 ml のCSP800から変異原性物質を脱離するための必要なDMSOの液量を検討した結果をTable 4に示す。いずれの試料水でも脱離液0~2 ml の画分には変異原性が検出されているが、脱離液2~3 ml と3~4 ml の画分には、プレートへの最多添加量である100 μ l でもMR値がすべて1.4以下となり、明確な変異原性が検出されなかった。とくに試料水 T 7 の場合は、0~2 ml の画分のMR値が11.8 (21,800net rev.・ l^{-1}) と非常に高い変異原性が検出されているに

もかわらず、2～3 ml ではMR 値が1.4以下で2 ml のDMSO ですべて脱離できていた。これほど多くの変異原性物質を吸着することは少ないので、脱離用のDMSO は2 ml で十分であることが確認された。ただし、すでに1 ml では不十分であることがわかってい^{2),13)}。

つぎに、DMSO では脱離できない変異原性物質が残存していないことを確認するため、試料水を2,000倍通水し、2 ml のDMSO で脱離してDMSO 画分を得た後に、トルエンで充分に脱離してトルエン画分を得て、各々を変異原性試験した結果をTable 5 に示す。トルエン画分のMR 値は1.2以下で明確な変異原性認められなかった。試料水T 8を2,000倍濃縮した場合のDMSO 画分のMR 値は5.8 (net で4.8相当) であり、トルエン画分のMR 値は1.1 (net で0.1相当) であったことより、DMSO で脱離できない物質の変異原性はDMSO で脱離できる物質の48分の1 以下であることが確認された。したがって、通常の条件で吸着した場合には、2 ml のDMSO でほぼ完全に変異原性物質を脱離できることが確認された。

以上の研究により決定された、水道水中から変異原性物質の濃縮回収方法をまとめてFig. 5 に示す。

4. 結 論

水道水の安全性を変異原性という遺伝子毒性指標で

総括的に評価するために、高性能多孔質ポリスチレン樹脂CSP800を充填したSep-Pak Plus (Long) CSP800 (充填量約2 ml) を用いて水道水中変異原性物質を濃縮回収するための最適条件を検討し、以下の結論を得た。

1) 残留遊離塩素を亜硫酸ナトリウムで消去すると変異原性が著しく低下した。また、残留塩素が存在しても樹脂または樹脂中の不純物から変異原性物質が生成することはないことが確認された。

2) pH が低い方が変異原性物質の回収率が高く、

Table 5 Confirmation of desorptivity by DMSO

Stain and addition of S9mix	Fraction ¹⁾²⁾	
	DMSO ³⁾	Toluene ⁴⁾
TA100-S9	5.8	1.1
TA100+S9	—	1.2
TA98-S9	—	0.6
TA98+S9	—	1.2

1)Show the values of mutagenicity ratio at maximum dose(100 μ L-DMSO-plate⁻¹)

2)Water sample T8 of 4l was fed to 2ml-CSP800

3)Desorped by 2ml-DMSO

4)Desorped by 120ml-toluene after 2ml-DMSO desorption

Fig. 5 Sample preparation method of tap water for mutagenicity assay

遊離塩素が存在するまま pH を 2 に調整して通水し、変異原性物質を吸着するのがよいと考えられた。

3) 通水速度の影響は小さく、 $50\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 程度がよいと考えられた。

4) 変異原性が $8,000\text{net rev}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度以下の通常の水道水では 2 l 通水(通水倍率1,000倍)、それ以上の特に汚染度の高い水道水では 1 l 通水(通水倍率500倍)とすればよいことが明らかになった。

5) 脱離は、ジメチルスルホキシド(DMSO)を $0.15\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 程度で 2 ml 通液すればよいことが確認された。

以上の方法によれば、試料水量が 1～2 l の少量で済み、変異原性物質の90%程度以上を 1 時間以内に500倍から1,000倍に濃縮回収でき、水道水等の変異原性を迅速に高感度で測定できる。

(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) 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.
- 2) 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.
- 3) 浦野紘平, 高梨啓和, 金澤伸浩, 藤江幸一 (1994) 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吸着剤—, 水環境学会誌, **17**, 451-460.
- 4) 高梨啓和, 岡部文枝, 藤江幸一, 浦野紘平 (1992) 水道水の変異原性試験のための試料調製方法の確立, 第26回日本水環境学会年会講演集, 94-95.
- 5) 鈴木規之, 中西準子, 松尾友矩 (1992) 水道水の変異原性原因物質の分画および還元剤との反応性に関する研究, 水環境学会誌, **15**, 814-821.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 林信吾, 井上嘉高, 神野透人, 植岡伸光, 安藤正典, 小嶋茂雄 (1992) フミン水の塩素処理に伴う MX の生成に関する研究, 第43回全国水道研究発表会講演集, 714-716.
- 11) 畑野和広, 神野透人, 岡田寛, 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 高梨啓和, 林幸載, 藤江幸一, 浦野紘平 (1994) 水試料の変異原性物質生成能 (MFP) の測定方法, 第28回日本水環境学会年会講演集, 464-465.
- 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.