塩素処理水の染色体異常誘発性・形質転換誘発性の変化過程 と強変異原物質 MX の指標性

伊藤 禎彦* 仲野 敦士** 荒木 俊昭*

Changes in Activity Inducing Chromosomal Aberrations and Transformations in Chlorinated Water and Use of MX as an Index

Sadahiko ITOH*, Atsushi NAKANO** and Toshiaki ARAKI*

*Department of Environmental Engineering, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

**TOHO GAS Co, Ltd., 19-18 Sakurada-cho, Atsuta-ku, Nagoya 456-8511, Japan

Abstract

Changes in the toxicity in chlorinated water after chlorine addition were examined. For toxicity evaluation, the chromosomal aberration test and the transformation test were conducted as indexes of initiation activity and promotion activity, respectively, in the carcinogenesis process. Activity inducing chromosomal aberrations in chlorinated Lake Biwa water gradually decreased over time after chlorination. In contrast, activity inducing transformations determined by the two-stage assay gradually increased. Thus, toxicity that decreases or increases is present in chlorinated water. Furthermore, activity inducing transformations determined by the non-two-stage assay gradually decreased over time. This direction of change is opposite to that of activity inducing transformations determined by the two-stage assay and is consistent with that of activity inducing chromosomal aberrations. The drastic decrease in initiation activity detected as activity inducing chromosomal aberrations could be the main cause for the decrease in activity inducing transformations determined by the non-two-stage assay (an index of the sum of initiation and promotion activity). MX change was quantitatively consistent with those of activity inducing chromosomal aberrations and transformations determined by the non-two-stage assay. On the other hand, directions of changes in concentrations of typical by-products such as chloroform were consistent only with that of activity inducing transformations determined by the two-stage assay. Findings of this study suggest that MX is appropriate as an index for comparing the carcinogenicity of tap water near and far from a water purification plant.

Key words : chromosomal aberration test, transformation test, chlorination, disinfection by-products, MX

1. 緒 言

一般に、水道水の配水過程ではトリハロメタンやハロ酢酸の濃度は次第に増大していくことからわかるように、消毒処理水の毒性は一定ではない。著者らは、これまでに消毒が終了した後その処理水の毒性は安定ではなく変化するという観点から検討を行ってきた^{1,2)}。その過程では、塩素処理を行うことで生じる染色体異常誘発性は、その後次第に低減していくことを示し、トリハロメタンなどの典型的な副生成物の挙動とは異なることも指摘した。

本研究では毒性の測定のために、発がん過程におけるイニシエーション活性、およびプロモーション活性の指標となるバイオアッセイを実施する。イニシエーション

活性の指標としてはチャイニーズハムスター肺細胞を用いる染色体異常試験を行い、プロモーション活性の指標としてはマウス繊維芽細胞を用いる形質転換試験を行う。

本研究は、これらの試験法を用いて、塩素処理後の水の染色体異常誘発性、形質転換誘発性の変化と、副生成物の濃度変化を測定し、両者の対応関係について検討するものであるが、著者らは既に、試薬フミン酸を用いてこれらの検討を行っている³⁾。その結果、試薬フミン酸を塩素処理することによって生じた染色体異常誘発性は次第に低減していく一方、形質転換誘発性は逆に増大することを示した。このように塩素処理水中には、次第に減少する有害性と次第に増大する有害性とが含まれている。したがって、水道水の配水過程において、トリハロメタンやハロ酢酸が増大するのをみて、有害性が増大すると

* 京都大学大学院工学研究科 〒 606-8501 京都市左京区吉田本町

** 東邦ガス株式会社 〒 456-8511 名古屋市熱田区桜田町 19-18

考えるのは早計ではないかとの見解を示している。

本研究では、典型的な塩素処理副生成物に加えて、強変異原物質として知られるMX (3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone) をとりあげる。本物質は、当初、塩素処理水の変異原性の相当部分を説明できる物質としてとりあげられたが、その後発がん性が確認⁹⁾されるに至り、水質管理の必要性についても議論⁹⁻¹¹⁾されている物質である。MXは、水中での不安定性や塩素との反応性が指摘されてきており、塩素処理水中でいったん生成した後、次第に低下していく物質である。すなわち、トリハロメタンやハロ酢酸といった通常測定される指標副生成物とは逆の変化傾向を示すのである。ここにあげた物質は、いずれも発がん性を有する副生成物であるが、水道水の有害性の変化はどの物質に着目すれば把握できるかといえるだろうか。

本研究では試薬フミン酸を用いた基礎実験の結果を受けて、水道原水として琵琶湖水を対象とした検討を行う。すなわち、塩素処理を行った琵琶湖水に対し、そのバイオアッセイを行うとともに、副生成物の濃度変化を測定し、両者の対応関係について検討する。その結果から、配水過程における水道水の有害性を比較する目的に適した指標副生成物を提示することを目的とする。

ただし、本研究の範囲では、水の発がんに関連する有害性を*in vitro*試験によって測定しており、毒性と指標副生成物との関連はあくまで推定できるところにとどまる点に注意が必要である。

2. 実験方法

2.1 琵琶湖水の塩素処理と濃縮

琵琶湖南湖表流水を採水し、メンブランフィルター(孔径1.0 μ m, ADVANTEC)によりろ過を行った。ろ過水の溶存有機炭素(DOC)は1.9mg $\cdot$ l⁻¹であった。このろ過水に初期残留塩素濃度が約2mgCl₂ $\cdot$ l⁻¹程度となるように次亜塩素酸ナトリウムを添加した。あらかじめ塩素要求量計(CD-20型, セントラル科学株式会社)を用いて塩素要求量を求めたところ1.8mgCl₂ $\cdot$ l⁻¹であったので、塩素注入量は3.8mgCl₂ $\cdot$ l⁻¹とした。塩素添加後は20℃, 暗所, 密封条件下で静置した。この間pH調整操作は行わなかったが、7.4~7.8で大きな変動はなかった。

試料の濃縮には変異原性物質の回収に優れているとされるCSP800樹脂を用いた。Sep-Pak Plus(Long)CSP800(日本ウォーターズ)は、三菱化成製MCIゲルCSP800を内容積約2mlのカートリッジに充填して販売されているものである。コンディショニング、吸着、脱離の各操作は、浦野の方法⁹⁾にしたがって行った。この濃縮法では、脱離にDMSOを使用し、脱離液はそのまま細胞への投与試料となることから、揮発性物質も試験対象とすることが可能な方法である。また、本法によれば、変異原活性の90%以上を回収できるという⁹⁾。

塩素を添加して所定時間経過後、試料水のpHを2に調整した。試料水中には残留塩素が存在するが、亜硫酸ナトリウムなどの還元剤を添加すると塩素副生成物が還元され、変異原性が大きく低下することが知られているた

め脱塩素は行わなかった。試料水20lをコンディショニング済みCSP800樹脂に流量50ml $\cdot$ min⁻¹で吸着させた。脱離液にはDMSOを用い、流量は0.2ml $\cdot$ min⁻¹とした。試料水30lを3mlに濃縮し濃縮倍率は10000倍であった。

2.2 バイオアッセイ

2.2.1 染色体異常試験法^{9,10)}

染色体異常試験には、新生チャイニーズハムスター肺細胞(細胞名CHL/IU, 大日本製薬)を使用した。染色体標本を1000倍で検鏡するとともに、任意の50細胞に対して、画像解析(Image-Pro Plus Ver4.0使用)を行い、異常染色体を定量化した。染色体異常は大きく切断型、交換型の2つに分けられるが、本法では交換型異常のみを検出している。染色体異常誘発性は、50細胞中の交換型異常検出数(異常染色体数/50細胞)で表した。陰性対照の交換型異常検出数は、平均4.5/50細胞、標準偏差2.6であった。

濃縮試料は、培養液12mlに対して0.06ml添加したので、DMSO濃度は培養液中で0.5%となった。

2.2.2 形質転換試験法^{11,12)}

形質転換試験法には、マウス繊維芽細胞BALB/3T3A31-1-1(JCRB0601, ヒューマンサイエンス振興財団)を使用した。試験方法は、はじめにイニシエーターとして既知の発がん性物質である3-メチルコラントレン(3-MC)を作用させ、DNAに損傷を与える。その後、試料を加え形質転換した細胞を検出する。このように2段階で化学物質を作用させることから二段階形質転換試験ともよばれており、発がん過程のプロモーション段階の有害性を検出する指標となりうる。

3-MCの添加濃度は0.5mg $\cdot$ l⁻¹, 処理時間を2日とした。その後、試料を3~5日に1度の割合で培地交換しつつ添加し、約2週間培養した。濃縮試料は、培養液6mlに対して0.015mlを添加したので、培養液中DMSO濃度は0.25%であった。培養終了後、ギムザ染色標本作製した。標本を画像解析により解析し、形質転換を起こしたとみられるコロニーを定量した。結果は形質転換誘発率として表した。3-MCを作用させただけの陰性対照の形質転換誘発率は、平均0.032, 標準偏差0.005であった。

一方、3-MCを作用させず、はじめから試料を添加し続ける方法があり、これは非二段階形質転換試験とよばれている。この場合、形質転換細胞が誘発されるためには、試料が遺伝子障害性も有している必要があることから、試料のイニシエーション段階を含めた有害性を測定できる方法といえる。この場合の陰性対照、すなわち何も添加していない細胞における形質転換誘発率は、平均0.011, 標準偏差0.002であった。

2.3 塩素水中でのMXの挙動に関する実験

MXの標準物質(和光純薬)をpH7, 67mMリン酸緩衝液とした。所定濃度の次亜塩素酸ナトリウムを添加し、20℃, 暗所, 密閉条件にて静置した。経時的に採水し、MX濃度を測定するとともに、バイオアッセイに供した。

バイオアッセイ用試料の調製のためには、2.1と同様にCSP800樹脂を用いた。試料水のpHを2に調整した後、コンディショニング済みCSP800樹脂に流量30ml $\cdot$ min⁻¹で

吸着させた。脱離液には酢酸エチルを用い、流量 $0.3\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で脱離を行った。脱離後の酢酸エチルに窒素ガスを吹き付けて乾固させた後、DMSO に転溶させた。この DMSO 溶液をバイオアッセイ用試料とした。

2.4 MX 濃度の測定¹³⁾

MX 濃度の測定は、まず試料水を塩酸性条件下で CSP800 樹脂に吸着させ、酢酸エチルで溶出する。ついでトリメチルシリル (TMS) 化誘導体とした後、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて定量する方法を用いた。ガスクロマトグラフ質量分析計への試料の注入法としては、プログラブル加熱気化注入法を採用した。本法は、注入時に注入口温度を溶媒の沸点付近に冷却しておき、マルチインジェクション機能を用いて通常より多量の試料をカラムに導く方法である。以下に測定操作の概略を示す。

試料水 20l の pH を 2 程度に調整し、CSP800 樹脂に流量 $30\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で吸着させた。ヘキサン 8ml で洗浄後、酢酸エチル 15ml、下向流 $0.3\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で溶出した。溶出した酢酸エチルは Sep-Pak Silica (コンディショニング済み) に通液し脱水、洗浄した。内部標準物質としてムコブロン酸 (MBA) 100ng を添加した後、窒素ガスを吹き付けて、約 $200\text{ }\mu\text{l}$ に濃縮した。TMS 化のために、BSTFA + 1% TMCS (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% Trimethylchlorosilane, PIERCE) $100\text{ }\mu\text{l}$ を添加し、室温で 30 分間静置した。再度窒素ガスを吹き付け $200\text{ }\mu\text{l}$ まで濃縮し、これを検液とした。

検液はガスクロマトグラフ質量分析計を用いて測定した。試料の注入法としてプログラブル加熱気化注入法を採用し、1 回の注入量を $2\text{ }\mu\text{l}$ 、注入回数を 20 回として、合計 $40\text{ }\mu\text{l}$ の試料を導入した。運転条件を以下に示す。1) 使用機器: ガスクロマトグラフ Agilent 社製 6890plus, 質量分析計 日本電子製 JMS-AX505, オートインジェクター Agilent 社製 7683 シリーズ インジェクター G2613A, カラム J&W 製キャピラリーカラム DB-1 (長さ 15m, 内径 0.25mm , 膜厚 $0.25\text{ }\mu\text{m}$), 2) GC 測定条件: インジェクション温度 $78^\circ\text{C}(10.5\text{min})\rightarrow 720^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}\rightarrow 200^\circ\text{C}(21\text{min})$, カラム温度 $80^\circ\text{C}(10.5\text{min})\rightarrow 6^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}\rightarrow 200^\circ\text{C}(0\text{min})\rightarrow 25^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}\rightarrow 250^\circ\text{C}(2\text{min})$, 試料注入量 $40\text{ }\mu\text{l}$ ($2\text{ }\mu\text{l}$ を 20 回注入), キャリアガス ヘリウム ($1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$), 3) 定量: 測定質量数 TMS-MX $m/z=135, 273, 275$, TMS-MBA $m/z=313, 315, 317$ 。

2.5 MX 以外の副生成物などの分析

MX 以外の副生成物の測定法の概略を示す。トリハロメタンは、ヘキサンで液液抽出したものを ECD 付ガスクロマトグラフ (島津製作所, GC-14B) で測定した。ハロ酢酸類は、 t -ブチルメチルエーテルで液液抽出後、ジアゾメタンにより誘導体化して、ECD 付ガスクロマトグラフで測定した。

溶存有機炭素 (DOC) は全有機体炭素計 (島津製作所, TOC5000A), 全有機ハロゲン化合物 (TOX) は全有機ハロゲン化合物分析装置 (三菱化学, TOX10-Σ) でそれぞれ測定した。また、残留塩素濃度は DPD 滴定法により測定した。

3. 実験結果と考察

3.1 塩素処理した琵琶湖水のバイオアッセイ結果

3 種類のバイオアッセイを行った結果を Fig. 1 に示す。横軸は塩素添加後の経過日数を表している。なお、経過時間 0 日とは塩素を添加せず、琵琶湖原水の試験結果を意味する。また、実験期間中の残留塩素は塩素処理後 4 日で $0.8\text{mgCl}_2\cdot\text{l}^{-1}$ であり、pH は $7.4\sim 7.8$ 程度であった。

染色体異常誘発性は塩素注入後、上昇しやがて低減するという傾向を示した。また、染色体異常誘発性が最大となり低減過程に移行するのは、塩素注入後 1 日以内であった。これまでに著者らは、試薬フミン酸を塩素処理したときに生成する染色体異常誘発性物質は加水分解に対して不安定であることを報告している。本実験においても、安定ではなく加水分解などの影響を受けて徐々に減少したと考えられる。

二段階試験による形質転換誘発性は、塩素注入後に上昇し、上昇傾向が継続した。また、この傾向は染色体異常誘発性のそれとは異なっていた。これは水中有機物と塩素の反応により生成した形質転換誘発性物質は、染色体異常誘発性物質とは異なり、水中において比較的安定であるためと推定できる。

一方、非二段階形質転換誘発性については、上昇した後低減しており、その変化傾向は二段階試験による形質転換誘発性とは異なり、染色体異常誘発性と類似している。

このように、塩素処理水中には、次第に増大する有害性と次第に低減する有害性の両者が含まれていることが明らかとなった。また、非二段階試験では、イニシエーション過程を含めた形質転換誘発性を測定しているが、この結果は、その活性が次第に低減していくことを示したものである。

以上の結果は、著者らがこれまでにやってきた試薬フミン酸を用いた結果³⁾と定性的に一致している。

Fig. 1 Activity inducing chromosomal aberrations and transformations in chlorinated Lake Biwa water.

Fig. 2 Relationship between activity inducing chromosomal aberrations and transformations.

Activity inducing transformations were measured by the two-stage assay.

(□→□) change in activity in chlorinated Lake Biwa water.

1, 4-NQO; 2, quercetin; 3, 5-fluorouracil; 4, sodium nitrite; 5, TPA; 6, mezerein; 7, BHA; 8, 3-MC; 9, theophylline; 10, urea; 11, caffeine; 12, chloroform; 13, dichloroacetic acid; 14, trichloroacetic acid; 15, MX.

3.2 他の化学物質との比較

文献¹⁴⁻¹⁷⁾からイニシエーション活性、プロモーション活性またはその両方の活性をもつと考えられる物質を選定し、染色体異常試験および二段階の形質転換試験に供した。Fig. 2に14物質の結果を示す。横軸は染色体異常誘発強度、縦軸は形質転換誘発強度を示している。さらにこの平面上に、Fig. 1の染色体異常誘発性および(二段階)形質転換誘発性の結果を同時に示した。矢印は経時変化の向きを示している。

まず、塩素処理水の初期の水についてプロットされた位置を他の物質と比較すると、塩素処理水は形質転換誘発性よりも染色体異常誘発性の方が相対的に強いものであるとすることができる。つぎに、その後の変化をみると、染色体異常誘発性が大きく低減する一方、形質転換誘発性は増大するもののその変化量は比較的小さいことがわかる。

本研究では、染色体異常誘発性はイニシエーション活性の指標として測定しているが、塩素処理水はイニシエーション活性の方が強い。すなわちFig. 1で、非二段階形質転換誘発性が生じた後、低減に転じたのは、染色体異常誘発性として測定されるイニシエーション活性が大きく低減したためであると考えることができる。同時に、(二段階)形質転換誘発性はプロモーション活性の指標として測定しているが、その増大量は比較的小さい(Fig. 2)ため、非二段階形質転換誘発性としては低減した(Fig. 1)と推定することができる。

3.3 副生成物の測定結果

琵琶湖水を塩素処理したときのクロロホルム、トリク

Fig. 3 Concentrations of by-products in chlorinated Lake Biwa water.

ロロ酢酸、抱水クロラル、TOX濃度の経時変化をFig. 3に示す。いずれの物質(群)も経時的に増加傾向を示した。これらは定性的に、(二段階)形質転換誘発性の変化傾向と類似しており、染色体異常誘発性や非二段階形質転換誘発性の変化傾向とは異なっている。

Fig. 1とFig. 3から指摘されるべき重要な点は、典型的な塩素処理副生成物が増加していくのに対して、発がん過程のイニシエーション段階とプロモーション段階を合わせた有害性を測定している非二段階形質転換誘発性は低減しており、両者は逆傾向を示したということである。したがって、Fig. 3で測定したような、指標副生成物として広く測定されている物質群は、塩素処理後すなわち配水過程における有害性の変化を把握する指標としては適切でないともいえる。

つぎに、MXの測定結果をFig. 4に示す。MXは、塩素注入後生成し、その後減少した。これは染色体異常誘発性や非二段階形質転換誘発性と定性的に一致し、かつ最大値が出現するのが塩素注入後1日以内という点もほぼ同じである。MXは塩素処理後の変化過程全体において、染色体異常誘発性や非二段階形質転換誘発性の変化傾向を追従している。すなわち、MXはこれらの指標となる物質の一つと考えられる。

Fig. 4 Concentration of MX in chlorinated Lake Biwa water.

生成したMXがやがて減少に転じるのは加水分解や塩素による分解が原因である。これらの変化速度や、濃度変化とバイオアッセイ結果との対応について、つぎに検討を行った。

3.4 MXのバイオアッセイと水中での挙動に関する実験結果

ここでは、塩素処理水の有害性の指標物質であると指摘したMXについて、バイオアッセイを行うとともに、水中での挙動に関する基礎的な実験を行った。

MXの染色体異常誘発性、および(二段階)形質転換誘発性を調べた結果をそれぞれFig. 5, Fig. 6に示す。いずれの場合も、これ以上の投与濃度では、細胞毒性によって試験を行うことができなかった。形質転換試験の結果をみると、染色体異常試験の場合よりも低濃度で形質転換を誘発していることがわかる。

以上の試験結果を他の化学物質のそれと比較してみる。MXの染色体異常誘発強度、および形質転換誘発強度を求め、他物質とともにプロットしたものをFig. 2に示してある。MXは右上方に位置し、染色体異常誘発強度、形質転換誘発強度ともに強い物質であることがわかる。この図では、横軸付近に位置する物質群はイニシエーション活性が強く、縦軸付近に位置する物質群はプロモーション活性が強いことを示している。そして、右上方に位置する物質群とは、イニシエーション活性とプロモーション活性を有する完全がん原性物質である。本バイオ

Fig. 5 Activity inducing chromosomal aberrations of MX.

Fig. 6 Activity inducing transformations of MX.
Activity inducing transformations were measured by the two-stage assay.

アッセイの結果からは、MXはこれら完全がん原性物質にグルーピングされる物質であるということが出来る。

つぎに、蒸留水中および塩素水溶液中のMXの挙動を調べた。MXの濃度変化を測定した結果をFig. 7に示す。塩素を添加していない水中でもわずかに減少していること、および添加塩素濃度が高いほど減少速度が大きいことがわかる。

MXが水中で加水分解を受けつつ減少していくことはKinaeら¹⁸⁾およびMeierら¹⁹⁾によって示されている。また、大阪市の調査²⁰⁾では、MXは残留塩素と反応して減少することを示すとともに、浄水中では加水分解による減少よりも残留塩素との反応による減少の方が卓越すると推定している。

さらに、MX水溶液に塩素添加した後の染色体異常誘発性の変化について調べた結果をFig. 8に示す。塩素の非存在下でも染色体異常誘発性は徐々に低減していること、および塩素を添加するとさらに染色体異常誘発性は低減していることがわかる。

この変化は、Fig. 7に示したMX濃度の変化とほぼ対応

Fig. 7 Change in concentration of MX in water and chlorinated water.

Fig. 8 Change in activity inducing chromosomal aberrations of MX in water and chlorinated water.

している。すなわち、MXは残留塩素と反応しつつ減少し、それとともに染色体異常誘発性を失っていくものであるといえる。

3.5 MXの指標性に関する考察

以上のように、染色体異常誘発性、非二段階形質転換誘発性、MX濃度はよく似た変化傾向を示した。そこで、MXの指標性について変化速度定数を用いて定量的に検討してみた。減少速度定数は次式から求める。

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (1)$$

ここに、 C :MX濃度($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)、 t :反応時間(day)、 k :減少速度定数(day^{-1})。ただし、ここではMXの減少を想定しているので、対象はFig. 4で減少傾向がみられる1日から4日の間とする。この結果、MXの減少速度定数として 0.19day^{-1} を得た。また、 C を染色体異常誘発性におきかえて、Fig. 1より染色体異常誘発性の減少速度定数を求めると 0.14day^{-1} となる。また、 C を非二段階形質転換誘発性におきかえて、同様に減少速度定数を求めると 0.18day^{-1} となる。これらの定量範囲もMXにあわせて1日目から5日目の間における結果である。

このように、3者の速度定数の値には大きな差がないという結果となった。すなわち、MXは配水過程において、染色体異常誘発性や非二段階形質転換誘発性の指標となる物質であることが定量的にも示されたといえる。

つぎに、指標としての適用範囲として残留塩素濃度の条件について実験的検討を行った。

Fig. 7に示したように、MXは残留塩素の影響を強く受け、残留塩素濃度が高いほど分解されやすく速やかに減少していく。一方、染色体異常誘発性について住友ら²⁾は、残留塩素濃度が高いほど低減しにくいことを明らかにしている。すなわち、染色体異常誘発性は主として加水分解によって低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あると考えられる。

なお、以下の検討では、有害性としては染色体異常誘発性のみを対象とした。これは、これまでの研究結果から、塩素処理水の有害性の変化傾向を染色体異常誘発性が代表するとみなすことができるためである。

孔径 $1.0 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターによりろ過を行った琵琶湖南湖表流水に対して、次亜塩素酸ナトリウムを希釈して添加した。Fig. 1およびFig. 4に対する追加実験であるため、初期残留塩素濃度が $25\text{mgCl}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ および $100\text{mgCl}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ となるように添加した。その他の塩素処理条件は2.1に述べたものと同一である。

塩素処理水の染色体異常誘発性とMX濃度の変化を測定し、低減過程における両者の速度定数を求めた。Fig. 1およびFig. 4から本節で算出した減少速度定数とあわせて、塩素注入量に対してプロットしFig. 9を得た。染色体異常誘発性をみると、塩素注入量の増加に伴い、減少速度定数は小さくなる、つまり減りにくくなることを示

Fig. 9 Decreasing rate constants of activity inducing chromosomal aberrations and MX.

している。これに対して、MXをみると、塩素注入量の増加とともに減少速度定数は大きくなる、つまりMXは減りやすくなることを示している。すなわち、水中の残留塩素濃度が大きくなるほど、両者の変化速度は乖離し、MXは指標として適さなくなるということである。

しかし、通常の水道水に近い濃度条件で塩素処理を行った場合の、MXの減少速度定数は 0.19day^{-1} 、染色体異常誘発性は 0.14day^{-1} であった。通常の水道水中の残留塩素濃度は $0.5\text{mgCl}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ 程度であることから、通常の水道水を想定する限り、みかけ上MXを指標とすることが可能と考えられる。

一方、MXについては、pHが水中での安定性に影響を与えることが知られている。Kinaeら¹⁸⁾およびMeierら¹⁹⁾はMXの安定性に対するpHの影響について検討した結果、酸性側よりアルカリ条件下で不安定であることを示すとともに、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を示している。これに対し、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¹⁹⁾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する。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。これに対し本研究では、pHおよび残留塩素ともに通常の水道水の範囲で実験および測定を行った結果、実際の水道水の条件下では、MXを配水過程における有害性変化の指標とみなせることを示したことになる。

このように本研究は、配水過程をみる限り、トリハロメタンやハロ酢酸は有害性の変化を把握する指標としては不適当で、MXが適していることを指摘したものである。しかし、汚濁が進んだ水道原水に塩素処理を行えばトリハロメタンやハロ酢酸は多く生成するのであり、それらの指標物質としての有為性は変わらない。重要なことは、水質管理の場に応じて指標物質の使い分けを行うことであろう。

4. 結 言

1) 琵琶湖水に塩素処理を行ったところ、処理水の染色体異常誘発性はいったん上昇した後、次第に低減した。また、形質転換誘発性(二段階試験)は次第に増大し、両者の変化傾向は異なっていた。このように、塩素処理水中には、次第に増大する有害性と次第に低減する有害性の両者が含まれていることがわかった。一方、イニシエーション過程を含めた有害性を検出できる非二段階試験によって測定した形質転換誘発性は次第に低減した。この傾向は、二段階形質転換試験の結果とは異なり、染色体異常誘発性の変化傾向と類似していた。

2) 塩素処理水のアッセイ結果を他の化学物質と比較し、塩素処理水はイニシエーション活性の方が強い特性を有することを指摘した。そして、染色体異常誘発性として測定されるイニシエーション活性が大きく低減した結果、増大する有害性を含むものの、非二段階形質転換誘発性は低減するものと推定した。

3) クロロホルム、トリクロロ酢酸、抱水クロラール、TOX 濃度はいずれも塩素注入後増加傾向を示した。これらは定性的に、形質転換誘発性の変化傾向と類似しており、染色体異常誘発性や非二段階形質転換誘発性の変化傾向とは異なっていた。このような副生成物は、配水過程の有害性の変化を把握する指標としては適切ではないことを指摘した。

4) MX は、塩素注入後生成し、その後減少した。この傾向は染色体異常誘発性や非二段階形質転換誘発性の変化傾向を定量的にも追従していることを示した。

5) MX の指標性を論ずる場合、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を指摘した。しかし、通常の水道水の条件下であれば、MX を指標とすることが可能である。すなわち、MX は配水過程における水道水の発がんに関連する有害性を比較する目的に適していると考えられた。

謝 辞

本研究を行う機会を与えていただいた京都大学名誉教授・ポリテクカレッジ滋賀短大校長 住友恒先生に謝意を表す。GC/MS の運転は、京都大学大学院工学研究科環境工学専攻 長尾正悟技官から多大な協力を得たものであり謝意を表す。また MX の分析法については名古屋市上下水道局 奥村学氏から助言を得ており謝意を表す。さらに本研究は、平成12-13年度日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究(B)(2)一般、および平成11-13年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業の援助を得て行われた。

(原稿受付 2003 年 1 月 30 日)

(原稿受理 2003 年 5 月 13 日)

参 考 文 献

- 1) 伊藤禎彦, 村上仁士, 塩素処理水の染色体異常誘発性に対する加水分解の影響, 環境工学研究論文集, **30**, 219-226, 1993.
- 2) 住友恒, 伊藤禎彦, 水道水の消毒と変異原性の生成, 土木学会環境工学委員会 用水・廃水の高度処理技術に関する研究小委員

会, 7-12, 1998.

- 3) Itoh, S., Ikeda, D., Toba, Y. and Sumitomo, H. (2001) Changes of activity inducing chromosomal aberrations and transformations of chlorinated humic acid, *Water Research*, **35**(11), 2621-2628.
- 4) Komulainen, H., Kosma, V.-M., Vaitinen, S.-L., Vartiainen, T., Kaliste-Korhonen, E., Lotjonen, S., Tuominen, R. K. and Tuomisto, J. (1997) Cacinogenicity of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in the rat, *J. Nat. Cancer Inst.*, **89**(12), 848-856.
- 5) Melnick, R. L., Boorman, G. A. and Dellarco, V. (1997) Water chlorination, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), and potential cancer risk, *J. Nat. Cancer Inst.*, **89**(12), 832-833.
- 6) Hirose, A., Nishikawa, A., Kinae, N. and Hasegawa, R. (1999) 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX): Toxicological properties and risk assessment in drinking water, *Review on Environ. Health*, **14**(3), 103-120.
- 7) 木苗直秀, 杉山千歳, 下位香代子 (2000), 水中の直接変異原 MX の生成と毒性発現の機構, 環境変異原研究, **22**, 141-148.
- 8) 鈴木基之, 内海英雄編 (1998), バイオアッセイ 水環境のリスク管理, 講談社サイエンティフィク, 262pp.
- 9) 住友恒, 伊藤禎彦 (1990), 画像解析を導入した染色体異常試験法の開発, 衛生工学研究論文集, **26**, 107-115.
- 10) 伊藤禎彦, 住友恒 (1993), 染色体異常試験, 環境微生物学研究法, 379-382, 技報堂出版, 土木学会衛生工学委員会編.
- 11) Tsuchiya, T. and Umeda, M. (1995) Improvement in the efficiency of the *in vitro* transformation assay method using BALB/3T3 A-31-1 cells, *Carcinogenesis*, **16**(8), 1887-1894.
- 12) 住友恒, 伊藤禎彦, 山下基, 池田大助 (1998) マウス繊維芽細胞を用いる形質転換試験結果の画像解析による評価方法, 環境衛生工学研究, **12**(3), 181-185.
- 13) 奥村学 (2002), 固相抽出-GC/MS 法による MX の分析方法の検討, 厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 WHO 飲料水水質ガイドライン改訂等に対応する水道における化学物質等に関する研究 平成 13 年度研究報告書, 347-350.
- 14) Ishidate, M. Jr., Harnois, M. C. and Sofuni, T. (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, *Mutat. Res.*, **195**, 151-213.
- 15) Sakai, A., Umeda, M., Nakamura, Y., Sakaki, K. and Iwase, Y. (1993) *In vitro* assays for tumor promoters, *Environ. Mutagen Res.*, **15**, 131-153.
- 16) Budunova, I. V. and Williams, G. M. (1994) Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication, *Cell Biol. Toxicol.*, **10**, 71-116.
- 17) 祖父尼俊雄監修 (1999) 染色体異常試験データ集 1998年改訂版, L・I・C.
- 18) Kinae, N., Sugiyama, C., Nasuda, M.Y., Goto, K., Tokumoto, K., Furugori, M. and Shimoi, K. (1992) Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water, *Water Science and Technology*, **25**(11), 333-340.
- 19) Meier, J.R., Knohl, R.B., Coleman, W.E., Ringhand, H.P., Munch, J.W., Kaylor, W.H., Streicher, R.P. and Kopfler, F.C. (1987) Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solutions, *Mutat. Res.*, **189**, 363-373.
- 20) MX の検出実態とその前駆物質の挙動 (2000) 平成 11 年度厚生科学研究 水道における化学物質の毒性, 挙動及び低減化に関する研究 報告書, 2-152~2-159.