<論文>

化学酸化処理での反応生成物の遺伝毒性に関する研究

小野 芳朗* 宗 宮 功* 河 村 正 純*

Genotoxicity of By-products in the Chemical Oxidation Processes

Yoshiro ONO*, Isao SOMIYA* and Masasumi KAWAMURA*

* Dept. of Environmental and Sanitary Eng., Faculty of Engineering, Kyoto University, Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606

Abstract

The *umu*-test, which can detect the genotoxicity by the induction of error in the repair of damaged DNA, was applied to chemicals which are produced in the chlorination and ozonation processes.

In this research, 37 commercial chemicals were tested by the *umu*-test. When the retention time of the test strain with chemicals was 2 hours, the genotoxicity of the following organic chemicals were clearly detected with and/or without microsomal activation: *m*-dichlorobenzene; 1,2,4-trichlorobenzene; bromoform; dichloroacetic acid; trichloroacetic acid; chloral; formaldehyde; ionone; furfural; carvone; glyoxal and acrolein. These dose response results are discussed and compared with results obtained in other bacterial assays.

Some of the selected organic compounds - chloroform, bromoform, trichloroethylene, acetyl acetone, acrolein, etc. - were identified as having genotoxicity which increased as the reaction time became longer values. From these results, it can be shown that there are different rate of transportation of chemicals across the cell membrane, the rate of damage and repair of DNA.

Key words: *umu*-test, chemical oxidation, genotoxicity, DNA repair

1. 結 論

本研究では水道水,あるいは下水処理水の塩素消毒やオゾン滅菌操作により副生成物として水中に存在すると想定される有機物質の安全性を評価する一手法として,*umu*テスト¹⁾の適用による判定を試みた。塩素消毒においては,とくに生成物中のトリハロメタンを中心とする有機塩素化合物の変異原性,発ガン性が指摘されてきている。一方,塩素消毒に代替する技術として普及しつつあるオゾン酸化処理に関しても,その副生成物の安全性の評価が定量的になされる必要がある。

ここでは,中村,小田らによって開発されたDNA修

復にともなう突然変異誘発遺伝子の検出を原理とする*umu*テストを用いて塩素処理工程,あるいはオゾン処理工程において生成されると予想されるいくつかの有機物質に関して,その安全性の評価をなした。

2. 実験方法

本研究における*umu*テストでは,凍結保存した試験菌株を完全培地中で一晩で復活させ,これをTGA培地で希釈,前培養後,被験化学物質と2時間反応させた。その後,菌体の細胞膜を破碎し,SOS修復反応で発現した*umuC'*-*'lacZ*遺伝子を,それにより産生した β -galactosidase活性で測定している。

また試験対象とする化学物質により試験菌株の

* 京都大学工学部衛生工学科 〒606-01 京都市左京区吉田本町

SOS 陽性反応を呈するまでの反応時間は異なることが予想される。そこで本研究では開発された常法による化学物質との反応時間の2時間の他、長時間試験菌体と反応させて陽性反応を判定することとした。

生成したDNA修復反応を示す酵素 β -galactosidaseを抽出する過程において、陰イオン界面活性剤であるSDSを用いているが、この過程でも一部のデータはSDSの代わりにトルエン処理を行った。

本研究で扱った被験化学物質は、塩素処理あるいはオゾン処理によって生じると想定されている有機物質で、各々18および19物質を選択した^{2),3)}。それらの物質をTable 1に示す。これらの物質を適当な溶媒(水, エタノール, DMSO)に溶解し、10倍希釈で約5段階の希釈列を作った。

被験化学物質の中には揮発性を有するものもあるので、これらについては50mlバイアル瓶に菌懸濁液と化学物質をいれ、密栓し、反応のために振とう培養した。

陽性の判定は以下に示す方法によった。反応2時間の間に菌のDNA中での自然発生的に生じる損傷を考慮し、被験化学物質のある検体量における反応2時間後の酵素活性量Aから、溶媒対照における同2時間後

の酵素活性量Bを差し引いた上で、溶媒対照の酵素活性量Bで除し、それが2以上を強陽性、1から2を陽性、1以下を陰性と判定することとした。

長時間処理の実験は、TGA培地中で増殖した菌懸濁液を100ml培養フラスコに分注し、これに被験化学物質を所定濃度になるよう投与した。同時に必要に応じて $S9_{mix}$ 溶液を添加した。培養フラスコを145rpm, 37°Cで振とうし、2時間毎に5.4mlを採取し、菌体濃度 OD_{600} と、 β -galactosidase活性を測定した。同時に溶媒対照も測定し、上記と同様の判定基準で被験物質の遺伝毒性を評価した。

被験物質は、Table 1の化学物質中、反応2時間のumuテストの結果を勘案して以下のものを選択した。

m-ジクロロベンゼン, 1,2,4-トリクロロベンゼン, プロモホルム, クロロホルム, トリクロロエチレン, テトラクロロエチレン
アセチルアセトン, グリオキサール, イオンン, アクロレイン

3. 結果および考察

3.1 反応時間2時間に対する判定基準

被験化学物質の濃度効果の例をFig. 1 (1)~(7)に示した。図は上段が各希釈濃度列に対する菌体濃度を OD_{600} で、下段は反応2時間で呈した β -galactosidase活性を示してある。Fig. 1 (1)は典型的な強変異原物質として知られるAF-2のdose responseを示したものである。AF-2に対するumu遺伝子の誘発、すなわち β -galactosidase活性は $0.3\mu g \cdot ml^{-1} \cdot OD_{600}^{-1}$ ($1.0\mu g \cdot ml^{-1}$)で最大に達するが、それ以上の薬品を投与すると、2時間の反応時間内ではDNA修復ができず、細胞は増殖してこないことがわかる。

同様に、Table 1中に示した被験化学物質に対して行った結果、 10^4 の希釈列に対して得られたdose responseの例をFig. 1 (2)~(7)に示した。いずれも化学物質と菌懸濁液との反応時間は2時間であり、各物質である濃度以上になると、umu遺伝子の誘発(β -galactosidase活性の増加)が観察できる。ここで各化学物質の濃度が比較的高くなると OD_{600} が減じ、菌の生存率が減じているような結果にみられる。一般にAmes法においては、菌の生存率が50%以下となるようなデータについては、killingの判定をなすことが多い。ところで本法においては、液体培地中で菌体が化学物質と反応して2時間後に増殖がみられなかったことは、必ずしも菌が死に至ったとは断じ得ず、いわゆる静菌作用によって増殖が阻害され、2時間の反応時間内では増殖してこなかったことを表していると考えられる。このことが化学物質による溶菌作用ならば、

Table 1 Chemical source

Chemicals	Sources
chlorobenzene	
1,2,4-tetrachlorobenzene	
tetrachloroethylene	
dichloromethane	
1,1,1-trichloroethane	
1,1,2-trichloroethane	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)
1,2-dichloropropane	
1,4-dichlorobutane	
trichloroethylene	
1,2-dichloroethane	
carbon tetrachloride	
chloroform	
chloroacetic acid	
dichloroacetic acid	
trichloroacetic acid	
chloral	
formaldehyde	
acetaldehyde	
propionaldehyde	
acetylacetone	
carvone	
glyoxal	
benzaldehyde	
ionone	
isopropylmethylketone	
isophoron	
hexanal	
acetophenone	
anthraquinone	
hydroquinone	
oxalic acid	
m-dichlorobenzene	Nakarai Tesque Ltd. (Kyoto, Japan)
p-dichlorobenzene	
bromoform	
furfural	Tokyo Kasei Industries, Ltd. (Tokyo, Japan)
acrolein	
n-valeraldehyde

Fig. 1 Dose-related response of tested chemicals

再び増殖することはあり得ないが、DNA の損傷による増殖阻害ならば、修復機構は働いていると考えられ、*umuDC* 遺伝子の誘発は、この間も続いていると考えられる。その意味で units/OD₆₀₀ は *umuDC* 遺伝子の誘発と、細胞増殖双方を示す単位といえる。細胞死と判定できるケースは Fig. 1 (6)~(7) の +S9_{mix} のように、OD₆₀₀ も β-galactosidase 活性も減じた場合と考えられる。

Table 2 に、塩素処理による副生成物として知られる化学物質に対して *umu* テストを適用した結果のうち、反応時間 2 時間の成果を示した。表中、化学物質の濃度は反応させた菌懸濁液中における各化学物質の濃度を反応初期菌体濃度を示す吸光度 OD₆₀₀ で除してある。また表中、*umu* test 欄の数値は判定基準 (A-B)/B を示したものである。さらに Ames テストの結果^{4)~6)} と、Rec-assay 法による DNA 損傷試験の結果⁷⁾ を併記してある。

同表より、*umu* テストにより遺伝毒性陽性を呈する化学物質は、代謝活性なし (-S9_{mix}) で① *m*-ジクロロベンゼン ((A-B)/B=2.06)、②1,2,4-トリクロロベンゼン (7.00)、③プロモホルム (1.30) であった。また代謝活性あり (+S9_{mix}) の場合、陽性を示したものは、① *m*-ジクロロベンゼン (1.60)、②ジクロロ酢酸 (1.50)、③トリクロロ酢酸 (1.18)、④クロラール (1.30) であった。このうち、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸は比較的低い濃度 (58.5 μg·ml⁻¹·OD₆₀₀⁻¹ (10 μg·ml⁻¹)) で陽性を示した。また、+S9_{mix} で1,2,4-トリクロロベンゼンとプロモホルムは、表示した濃度においては、反応 2 時間内にて菌体の増加および β-galactosidase 活性の増加も観察できず、前記のような化学的ストレスとは異なり、いわゆる細胞死(killing)と判定してある。

以下の物質は S9_{mix} の投与により本試験において (A-B)/B 値を増した。

クロロベンゼン；*p*-ジクロロベンゼン；ジクロロ

Table 2 Evaluation of genotoxicity for chlorination by - products in 2 hours reaction

Chemicals	Concentration		<i>umu</i> test (A-B)/B		Ames test	Rec-as.	
	($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	S9-	S9+		S9-	S9+
chlorobenzene	442.5	100	0.45	-	0.67	-	-
m-dichlorobenzene	442.5	100	2.06	++	1.60	+	-
p-dichlorobenzene	442.5	100	0.02	-	0.16	-	-(Z)
1,2,4-trichlorobenzene	442.5	100	7.00	++	-	k	-
tetrachloroethylene	442.5	100	0.10	-	0.13	-	+
dichloromethane	442.5	100	0	-	0.48	-	+
1,1,1-trichloroethane	476.2	100	0.76	-	0.21	-	+
1,1,2-trichloroethane	476.2	100	0.08	-	0	-	-
1,2-dichloropropane	476.2	100	0	-	0.07	-	+
1,4-dichlorobutane	476.2	100	0	-	0	-	?
bromoform	476.2	100	1.30	+	-	k	+
trichloroethylene	476.2	100	0.36	-	0.06	-	+
1,2-dichloroethane	393.7	100	0	-	0.18	-	+
carbon tetrachloride	393.7	100	0.46	-	0.30	-	+(M)++
chloroform	393.7	100	0.22	-	0	-	+
chloroacetic acid	485.4	100	0.08	-	0.34	-	-
dichloroacetic acid	58.5	10	0.47	-	1.50	+	-
trichloroacetic acid	58.5	10	0.72	-	1.18	+	+
chloral	58.5	10	0.81	-	1.30	+	+

Concentration indicates the minimum concentration which is defined to be positive.

S9-; Without microsomal activation

S9+; With microsomal activation

k; bacterial cells were killed

r; reverse effect in Rec-assay

++; strongly positive

++; positive

-; negative

Data of Ames test (Z); Zeiger

(M); MacCann et al.

others; RTECS

Data of Rec-assay; Matsui et al.

メタン; 1,2-ジクロロエタン; クロロ酢酸; ジクロロ酢酸; トリクロロ酢酸; クロラール

また, 1,2,4-トリクロロベンゼンとプロモホルムは $S9_{mix}$ の投与によって毒性が増し, この反応2時間内での細胞死が観察された。

さらに *umu* テストの結果を Ames 法ならびに Rec-assay の結果と比較した。 *umu* テストで2時間の反応で陰性と判定された物質のうち, テトラクロロエチレン, ジクロロメタン, 1,1,1-トリクロロエタン, 1,2-ジクロロプロパン, トリクロロエチレン, 1,2-ジクロロエタン, クロロホルムは, Ames 法では陽性と判定されている。このことは, Ames 法は化学物質を投与し, mutation をおこして増殖コロニーを検出するまで, 判定に48時間要しているのに対し, *umu* テストでは2時間での結果をみていることから, 反応時間の差に起因している可能性が考えられる。したがって, ここで試験した19種の有機塩素化合物に対しては, 反応時間を長くとることにより, 陽性反応を示す物質も存在することが予想される。一方の Rec-assay と *umu* テストの関係は, Rec-assay が *recA* 遺伝子の有無による DNA 損傷試験であるのに対し, *umu* テストは DNA 損傷時の最初の誘発が *recA* 遺伝子の発現, および続いて起こる *umuDC* 遺伝子と *lacZ* により直接測

定している。これら反応機構の点から, 両法の関連は大きいように思われるが, 試験菌の増殖までを考えると, 両方の結果を連続した SOS 反応の原理の中で捉えきれないことも事実であることが観察された。表中での有機塩素化合物では Rec-assay で陽性と判定され, *umu* テストで陰性であった物質にはテトラクロロエチレン, 四塩化炭素, クロロホルムがあるが, *recA* の発現により, その後細胞が死んだのか, あるいは変異したのかは DNA 損傷試験ではわからず, 少なくとも2時間内では *umuDC* 遺伝子の発現はみられなかったということになる。

Table 3 には同様にオゾン処理について生成されるとされる化学物質について, *umu* テストの結果を示した。

- $S9_{mix}$ で陽性を示したものは, ①ホルムアルデヒド ((A-B)/B=1.46), ②イオノン (5.37) であった。また + $S9_{mix}$ で反応した化学物質は, ①ホルムアルデヒド (38.8), ②フルフラール (1.02), ③カルボン (2.21), ④グリオキサール (2.50), ⑤アクロレイン (1.80) であった。このうち比較的低濃度で陽性を呈した物質はホルムアルデヒド ($123.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)) とアクロレイン ($49.3\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)) である。

Table 3 Evaluation of genotoxicity for ozonation by-products in 2 hours reaction

Chemicals	Concentration		umu test(A-B)/B		Ames test	Rec-as.			
	($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	S9-	S9+		S9-	S9+		
formaldehyde	123.5	10	1.46	+	38.8	++	+	++	++
acetaldehyde	1234.6	100	0.25	-	0.95	-	+	-	+
propionaldehyde	1234.6	100	0.25	-	0.93	-	-	-	r
furfural	1234.6	100	0.22	-	1.02	+	+	r	-
acetylacetone	1234.6	100	0.57	-	0.95	-	-	-	+
carvone	1234.6	100	0.29	-	2.21	++	-	-	-
glyoxal	492.6	100	0.98	-	2.50	++	+	++	++
acrolein	49.3	10	0.17	-	1.80	+	+	++	-
benzaldehyde	492.6	100	0.11	-	0.27	-	+	-	+
ionone	492.6	100	5.73	++	-	k	-	r	r
n-valeraldehyde	492.6	100	0.28	-	0.51	-	-	-	-
isopropylmethylketon	492.6	100	0.13	-	0.25	-	-	-	-
isophoron	680.3	100	0.55	-	0.46	-	-	+	r
hexanal	680.3	100	0.46	-	0.65	-	-	-	-
acetophenone	680.3	100	0.22	-	0.33	-	-	-	-
anthraquinone	680.3	100	0	-	0.04	-	+	-	-
hydroquinone	680.3	100	0	-	0.07	-	+	-	-
oxalic acid	719.4	100	0.01	-	0.14	-	-	-	-

Concentration indicates the minimum concentration which is defined to be positive.

S9-; Without microsomal activation

S9+; With microsomal activation

k; bacterial cells were killed

r; reverse effect in Rec-assay

++; strongly positive

++; positive

-; negative

Data of Ames test; RTECS

Data of Rec-assay; Matsui et al.

S9_{mix}の投与でおおむねの物質は(A-B)/B値を増加させている。またイオンンはS9_{mix}の投与で反応時間2時間では細胞死と判定した。

以上の結果をAmesテスト⁴⁾やRec-assay法⁷⁾と比較してみると、18種のカルボニル化合物に関しては、ほぼ一致した判定結果を示しているといえる。

これらの事実より、物質群により各アッセイの原理上判定結果の一致に差異を生じることが示唆され、umuテストにおいては次節に示すように反応時間について検討を試みることにする。

3.2 反応時間を長時間とした場合の判定結果

細胞の化学物質による増殖阻害では、化学物質のタンパク質などの細胞成分との反応、DNAとの結合、細胞膜との反応等が原因とされ、細胞が増殖を抑制される静菌作用が観察されることがある⁸⁾。また化学物質の構造や、物理化学的性状が生物への毒性に関連することは、たとえば化学物質の疎水性が分子の生体膜透過性評価上の主要なパラメータとなることなどが指摘されている⁹⁾。このように開発された常法による被験化学物質との反応時間は2時間とされているものの、物質によっては、細胞膜の透過や、細胞質内拡散、DNA塩基との反応に時間を要するものも存在することを想定される。実際、本法の開発者である小田らもhydro-

gen peroxideやglutaraldehydeなどの物質については反応5時間の中でumuDC遺伝子の誘発を検討している¹⁰⁾。そこで前項で示したTable 2およびTable 3の結果から、短時間処理ばかりでなく、試験菌株と化学物質を2~24時間反応させ、菌のβ-galactosidase(umuDC遺伝子)の誘導を観察した。結果をTable 4に示した。

表中には被験物質を試験菌懸濁液に与えたときの濃度 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ ()中は $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ に対しての、代謝活性なし(-S9_{mix})と代謝活性あり(+S9_{mix})の結果を記した。反応の陽性、陰性の表示(+++, +, -)は、被験物質を菌濁液に投与した直後からの反応時間2~24時間に対して示されており、各々溶媒ブランクの値に対して、前述と同じで判定方法によった。また同様にAmesテストとRec-assay法の結果を併記した。

本表より、これら化学物質と試験菌株との反応時間を常法の2時間に比して、より長くすることで、陽性反応を強く呈したものがあることがわかる。

たとえば、m-ジクロロベンゼンは+S9_{mix}で、濃度 $370\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ ($10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)の場合、2~6時間でも陽性を示していたが、反応開始後20時間において、強陽性を呈するようになった。

また-S9_{mix}でのプロモホルムも2時間で陽性を示したが、よりその陽性反応を強く呈するようになった。+S9_{mix}においては2時間では陰性と判定されていたが、4時間以後、強い陽性を示すようになった。さらにクロロホルムは比較的高い濃度(1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)において反応時間を長くすることにより、+-S9_{mix}の双方において陽性を呈するようになった。トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンも-S9_{mix}において、反応20時間後に陽性反応を示した。

このように本研究で扱った有機塩素化合物は、

Table 2 における反応2時間での判定では、Ames 法において陽性を示したデータに対し、*umu* テストでは陰性と判定されたものが比較的多かったが、反応時間を長くすることにより陽性反応を呈するものがあることがわかった。

一方、Rec-assay の結果と比較してみると、Rec-assay で陰性と判定された物質は、-S9_{mix}での1,2,4-トリクロロベンゼン、プロモホルム、クロロホルム、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンであったが、*umu* テストでは陽性を示し得た。逆に Rec-assay

Table 4 Evaluation of genotoxicity for by-products in long-term reaction

Chemicals	concentration $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ OD ₆₀₀ ⁻¹ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	S9- ++	reaction time (hrs.)	concentration $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ OD ₆₀₀ ⁻¹ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	S9+ +	reaction time (hrs.)	Ames	Rec S9- S9+
m-dichloro benzene	196 (100)	++ ++ ++	2 4 6	370 (100)	+ + + ++	2 4 6 20	-	?
1,2,4-trichloro benzene	185 (100)	+ ++ ++ ++	2 4 6 20	370 (100)	- - - -	2 4 6 20	-	- ++
bromoform	185 (100)	+ + ++ ++	2 4 6 20	370 (100)	- ++ ++ ++	2 4 6 8	+	- ++
chloroform	4900 (1000)	- - +	2 4 6	4000 (1000)	- - - +	2 4 6 20	+	- ++
acetylacetone	196 (100)	- - - -	2 4 6 20	410 (100)	- - - ++	2 4 6 24	-	- +
glyoxal	408 (100)	- + +	2 4 6	350 (100)	++ ++ ++	2 4 6	+	++ ++
ionone	490 (100)	++	2	350 (100)	- - - ++	2 4 6 24	-	r r
acrolein	408 (100)	+	2	35 (10)	- - - +	2 4 6 8	+	++ -
trichloroethylene	490 (100)	- - - +	2 4 6 20				+	- -
tetrachloroethylene	490 (100)	- - - +	2 4 6 20				+	+ +

S9-;Without microsomal activation
S9+;With microsomal activation
k;bacterial cells were killed
r;reverse effect in Rec-assay
++;strongly positive
+;positive
-;negative

Data of Ames test; RTECS 7)
Data of Rec-assay; Matsui et al. 10)

Table 5 Positive chemicals and its concentration in *umu*-test

positive chemicals	S9mix	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{OD}_{600}^{-1}$) ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	
m-dichlorobenzene	-	442.5	100
1,2,4-trichlorobenzene	-	442.5	100
bromoform	-	476.2	100
m-dichlorobenzene	+	442.5	100
dichloroacetic acid	+	58.5	10
trichloroacetic acid	+	58.5	10
chloral	+	58.5	10
formaldehyde	-	123.5	10
ionone	-	492.6	100
formaldehyde	+	123.5	10
furfural	+	1234.6	100
carvone	+	1234.6	100
glyoxal	+	492.6	100
acrolein	+	49.3	10

で1,2,4-トリクロロベンゼンは+S9_{mix}で陽性と判定されたが、*umu* テストでは20時間の反応時間をとっても陰性であった。ここで双方のテストで必ずしも同一の投与濃度、培養条件でなく、しかも試験菌株が異なるゆえに、これらの結果をもってただちに assay の優劣を論じられないことには注意を要する。

また Table 3 で示したオゾン処理生成物の反応中、反応時間を長くすることでより陽性反応を強く示すようになったケースが示されていた。アセチルアセトン は+S9_{mix}で、反応2時間後では陰性反応しか示しえなかったが、反応24時間後には強い陽性反応を示すようになった。グリオキサールは-S9_{mix}の場合、反応4時間後に陽性を呈しはじめた。イオノンは、Table 3 中で濃度 $490\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) で細胞死が観察されたが、 $350\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) に減じた結果、反応開始24時間後にして、強い陽性を示すようになった。この場合は反応2時間で細胞死と判定したものの、結局静菌状態にあり、増殖が抑制されていたと考えられる。さらにアクロレインの-S9_{mix}の場合も、濃度を $408\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) と増加させた場合に反応2時間で陽性反応を呈した。

以上の結果より、常法2時間の化学物質と菌懸濁液に反応時間に対して、比較的長時間反応させてやることにより、より強く陽性反応を示す物質があり、遺伝毒性の判定を明確にすることができた。

このように、化学物質の種類、濃度によって陽性を呈する時間に差異を生じることは、各化学物質の細胞の透過性、すなわち脂溶性や、DNA 鎖上へのアタックの速度、損傷部位、さらには修復速度が化学物質ごとに異なっていることを示唆するものであると推察できる。

4. 結 論

水の塩素処理、あるいはオゾン処理により生成するとされている化学物質に関して、*umu* テストを実施し、その遺伝毒性について検討した。得られた成果を以下に要約する。

1) 塩素処理生成物とされる化学物質19種中、菌体と化学物質との反応時間2時間で陽性を示した物質を Table 5 に S9_{mix}の有無と陽性を示した菌体当りの最小投与濃度とともに示す。ここで示された最小投与濃度は、あくまでも 10^6 希釈列で得られた結果であり、より詳細な dose-response を得るためには、さらに細かい希釈列に関する検討が必要となる。ここでは 10^6 希釈列による結論ということに限定して要約して示すこととする。

またラット肝酵素 (S9_{mix}) の投与により *umu* テストにおける判定強度値 (A-B)/B を増した物質を以下に示す。

クロロベンゼン、*p*-ジクロロベンゼン、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、クロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、クロラール
S9_{mix}の投与で反応2時間内で増殖がみられず、細胞死と判定されたものは、1,2,4-トリクロロベンゼン、プロモホルムであった。

2) オゾン処理生成物とされる化学物質18種中、反応時間2時間で陽性反応を呈したものを同様に Table 5 に示す。

S9_{mix}を投与して反応2時間内に増殖がみられなかった物質は、イオノンであった。

3) 試験菌株と化学物質との反応時間を2~24時間と比較的長くすることで、陽性に転じた、あるいは陽

性反応でもその遺伝毒性強度をさらに増した物質を検索した。以下に示す。

- −S9_{mix}; クロロホルム, トリクロロエチレン, テトラクロロエチレン, グリオキサール, イオノン
 +S9_{mix}; *m*-ジクロロベンゼン, プロモホルム, クロロホルム, アセチルアセトン, イオノン, アクロレイン

以上の結果より化学物質の種類, 濃度により陽性を呈する時間に差を生じることは, 物質の試験菌株における細胞透過性, DNA の損傷・修復速度, 損傷部位が化学物質ごとに異なっていることを示唆するものであることが推測された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり, 試験菌株の分与, 試験法に関して大阪府立公衆衛生研究所の小田美光博士に提供していただいた。また試験法および RTECS 検索にあたっては同研究所中村清一博士のアドバイスをいただいた。深甚の謝意を表する。

(原稿受付 1990年 7月16日)

(原稿受理 1991年 6月30日)

引 用 文 献

- 1) Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I. and Kato, T. (1985) Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Research*, **147**, 219-229.
- 2) 宗宮功, 山田春美 (1987) オゾン処理特集 水中有機物との反応, 工業用水, **344**, 71-82.
- 3) 宗宮功, 遠藤伸一, 藤井滋穂 (1980) 塩素処理に関する基礎的研究 (III) 一有機塩素化合物の生成について, 下水道協会誌, **17**(188), 1-12.
- 4) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, 1981-82 EDITION and 1983-84 supplement, National Institute for Occupational Safety and Health.
- 5) Zeiger, E. (1987) Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity, *Cancer Research*, **47**, 1287-1296.
- 6) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames B.N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **72**, 5135-5139.
- 7) Matsui, S., Yamamoto, R. and Yamada, H. (1989) The *bacillus subtilis*/microsome rec-assay for the detection of DNA damaging substances which may occur in chlorinated and ozonated waters, *Water Science and Technology*, **21**, 875-887.
- 8) 柳田友道 (1981) 化学的ストレスに対する反応, 微生物科学 2, 学会出版センター所収, pp.405-466.
- 9) 茂岡忠義, 吉田喜久雄, 保坂千登勢, 早月陽子, 山内文雄 (1988) クロロフェノール類の活性汚泥微生物に対する増殖阻害性とその構造および微生物による分解性との関連, 衛生化学, **34**, 266-273.
- 10) 小田美光 (1989) 活性酸素産生に係わる変異株に *umu* 遺伝子導入した菌株を用いた高感度変異原検出系, 環境変異原研究, **11**, 164.

ションタンクに比較して、バイオフィルターの酸素溶解性能が優れていることが明らかになった。坑火石発泡体を充填した装置では、微生物保持濃度を $4,000\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ 以下に維持できれば、最大 $3\text{ kg-O}_2\cdot\text{kWh}^{-1}$ 程度の動力効率を期待できる。

化学酸化処理での反応生成物の遺伝毒性に関する研究

小野 芳朗* 宗宮 功* 河村 正純*

* 京都大学工学部衛生工学科

〈水質汚濁研究 Vol.14 No.9 (1991) pp.633~641〉

水道水や下水処理水の塩素あるいはオゾンによる化学酸化処理によって生成するとされる化学物質の遺伝毒性を、DNA 修復にともなう修復エラーを誘発する遺伝子量を測定する umu-テストを用いて評価した。

化学物質と試験菌体の反応時間2時間では、m-ジクロロベンゼン、1,2,4-トリクロロベンゼン、プロモホルムジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、クロラール、ホルムアルデヒド、イオノン、フルフラール、カルボン、グリオキサール、アクロレインに陽性が認められた。これらの濃度効果の結果は、他のバクテリアアッセイの結果と比較された。

またクロロホルム、プロモホルム、トリクロロエチレン、アセチルアセトン、アクロレイン等には菌体との反応時間を長くすることで遺伝毒性を増す傾向が認められた。これらより、化学物質の種類により、細胞膜透過や DNA の損傷、修復に差のあることが示唆された。