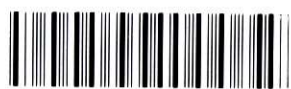


変異原性による水道水の安全性管理手法に関する研究

東京大学図書



0012213336

東京大学総合図書館

和 啓 集

要 旨

日本の水道水は、世界的に見て最も安全な水道水の一つと言っても過言ではないが、発がん性物質などの多くの化学物質が含まれていることが明らかになっており、それらの化学物質の安全性評価・管理が求められている。現在は、健康影響リスクが高い一部の物質に対しては個別濃度測定によって安全性管理が行われているが、その他の多くの物質については、管理の負担が大きくなり過ぎること等の理由から、管理が行われていない。このため、多くの物質の安全性評価・管理を一括して行うことができるバイオアッセイによる評価・管理の導入が望まれている。しかし、信頼性、定量性が高い結果を得るための適切なバイオアッセイによる評価・管理手法の開発、本格的な実態調査、汚染物質の発生源調査などが十分に行われていないことなどの理由により、導入には至っていない。

本論文では、日常的な水道水の安全性評価・管理に有効なバイオアッセイを選定し、そのバイオアッセイで簡易かつ信頼性、定量性が高い結果を得るための試料調製方法、および結果の評価方法を開発し、その有効性を示すとともに、現状の安全性レベル調査を行った。さらに、汚染物質発生源等の調査方法の開発および実態調査を行い、対策の必要性や対策に有効な情報を示した。

第1章では、バイオアッセイによる水道水の安全性評価・管理の必要性を述べ、そのための問題点の整理を行った。すなわち、未規制物質に対する安全性評価・管理の必要性、その方法として Ames 変異原性試験が有効で最初に導入すべきことを述べ、Ames 変異原性試験の役割と位置づけを明確にした。さらに、Ames 変異原性試験を用いて日常的に水道水の安全性評価・管理を行うための問題点を抽出・整理し、本研究の目的と構成を明確にした。

第2章では、水道水の Ames 変異原性試験結果の新規な統計的解析方法を確立した。すなわち、ブランク試験（陰性対照試験）との差から検出限界を決定する方法、用量作用直線の勾配の信頼区間から定量限界を定める方法を確立した。また、実際のデータを用いて両者を算出した結果、TA100 株での検出限界が陰性対照値の 1.4 倍、定量限界が 2.2 倍と見なせることを明らかにした。さらに、陰性対照試験を通常の試験より 2 枚多い 4 枚のプレートを用いて行うことにより、Ames 変異原性試験を非常に簡易に高感度化できることなどを明らかにした。

第3章では、水中の変異原性物質の新規で高効率な濃縮・回収方法を開発した。すなわち、様々な濃縮・回収方法の中で最も適切で有効と考えられる固相吸着脱離に着目し、吸着剤として無極性吸着剤の一つである CSP800 樹脂が最も優れていることを明らかにした。さらに、正確な値を安定して得るための吸着剤の精製・コンディショニング方法、90%以上の高い回収率を得るための試料水 pH、還元剤添加の是非などの試料水調整方法、通水速度、通水倍率、脱離溶媒の選定、脱離溶媒の通液速度および通液量などの吸着・脱離の操作条件を明らかにした。

第4章では、日本の水道水の変異原性強度を解析し、汚染実態を明らかにして対策の必要性を示すとともに、対策の一助となる情報を示した。すなわち、日本の 23 都道府県の各 1 ヶ所を選定して 1 年間に渡り年 5 回（4 都市については 12 回）変異原性強度を測定し、生涯発がんリスクレベルが 10^{-5} を超える可能性を否定できないこと、遺伝子に対する障害のリスクが年平均で 15 倍異なることなどから、対策が必要であることを述べた。

第5章では、水道水中の変異原性物質の有効な削減対策を施すのに必要な測定方法について検討した。すなわち、浄水処理条件下で試料水を塩素処理することにより変異原性物質に変化する物質を変異原前駆物質と定義し、変異原性物質生成能（Mutagen Formation Potential, MFP）という新しい水質指標を提案するとともに、安定した変異原性を発現させるための塩素処理時の有機物濃度、pH、塩素添加量、共存アンモニア態窒素濃度、反応時間、反応温度の条件を明らかにした。

第6章では、水道水源に流入する可能性がある合計 82 種類の排水の MFP を測定し、その MFP レベルを明らかにして対策の必要性を述べるとともに、対策の一助となる情報を示した。すなわち、変異原性はほとんど検出されなかったが MFP は水道水の平均的な変異原性の 300 倍の高い値が検出されたこと、大きな MFP 負荷量となる排水が各地に存在すると考えられることなどを明らかにした。

第7章では、本研究の成果を総括した。

専門用語の解説

本論文中で用いられている専門用語のうち、Ames 変異原性試験に馴染みが薄い水道関係者に本論文の内容を正しくご理解いただくために必要と思われる専門用語について、以下に解説を加えた。用語解説は、五十音順に記載される場合が多いと思われるが、最初から一読いただく際に理解しやすいようにより基礎的な用語から順に記載した。

【バイオアッセイ】

個体生物または細胞等の生物構成物を用いて、化学物質の生物への毒性を評価する方法を指し、広義には、ラット、マウス、ウサギ等の哺乳動物を用いて評価する方法も含まれるが、狭義には、細菌や酵母、培養細胞、水棲生物を用いて簡易かつ迅速に評価する方法を指す。本研究では、日常的な水道水の安全管理方法を検討しているため、後者の定義に従うこととする。

【変異原性】

遺伝子に損傷を与えるか突然変異を誘発する毒性の総称であり、遺伝子毒性の指標の一種である。変異原性が発現した結果、奇形やがんが発生することがある。奇形を誘発する毒性を催奇性、がんを誘発する毒性を発がん性と呼ぶ。変異原性を検出する指標ごとに主な変異原性試験を分類すると、DNA 損傷性試験、染色体異常試験、点突然変異（遺伝子突然変異）試験に大別される。

【Ames 変異原性試験】

突然変異を起こした細菌数を指標とした代表的な点突然変異試験の一つであり、予め人工的に突然変異させておいた細菌と変異原性物質とを接触させ、元に戻る突然変異（復帰突然変異）が起きた細菌の数をコロニーとして計数することにより、変異原性の強度を定量的に評価することができる。

【復帰コロニー】

Ames 変異原性試験で使用した菌体が復帰突然変異を起こして形成したコロニーを指す。通常は、“revertant”の略で“rev.”と標記される。また、水試料の Ames 変異原性試験結果は、ブランク値を差し引いて試料水 1l 当たりの正味の復帰コロニー数とし

て“net rev. · l⁻¹”と表記されることが多い。

【TA98 株、TA100 株】

Salmonella typhimurium を遺伝子操作した Ames 変異原性試験に用いられる代表的な試験菌株で、TA98 株はフレームシフト型の突然変異、TA100 株は塩基対置換型の突然変異を検出することができる。無毒化されており、また、熱、紫外線にも弱いので比較的安全性が高いが、安衛法などでは試験後に滅菌が義務づけられている。

【S9mix】

代謝活性剤と補酵素の混合物を指す。Ames 変異原性試験は、細菌を用いるため、肝臓で代謝された場合に変異原性物質に変化する物質を検出することができない。このため、ラットなどのほ乳類の肝臓をホモジネートして 9,000g、10 分間の遠沈上清を代謝活性剤として添加する場合がある。添加した場合を+S9、添加していない場合を-S9 と表記する。

【プレインキュベーション法】

Ames 変異原性試験において、寒天培地（プレート）上で培養する前に、液体状で試験菌株と被検物質とを接触させて感度を向上させる方法を指す。

【陽性対照試験、陽性対照物質】

バイオアッセイを行う際、用いる生物の生理状態が安定しており、再現性のよい結果が得られることを保証するために、当該バイオアッセイで応答が得られることが明らかになっている物質を毎回同じ条件で投与し、毎回同程度の応答が得られることを確認する。この試験のことを陽性対照試験と呼び、その際に用いる物質を陽性対照物質と言う。

【4-ニトロキノリン-1-オキシド（4NQO）】

Ames 変異原性試験で用いられる代表的な陽性対照物質であり、-S9 の条件でフレームシフト型の変異と塩基対置換型の変異を引き起こす。

【陰性対照試験】

バイオアッセイを行う際、用いる生物の生理状態が安定しており、再現性のよい結

果が得られることを保証するために、溶媒（Ames 変異原性試験の場合、通常はジメチルスルホキシド、DMSO）のみの試験、すなわち陰性対照試験を行い、毎回同程度の応答が得られることを確認する。

【MR 値】

検体の Ames 変異原性試験結果が、同時に行った陰性対照試験の復帰コロニー数の何倍かを示す値で、“MR”は Mutation Ratio の略。

【2 倍則】

Ames 変異原性試験において、MR 値が 2 以上であった場合に陽性と判断する経験則であり、日本を含めた世界各国で最も広く用いられている。

【XAD4】

代表的な無極性吸着剤で、多孔質のポリスチレン樹脂であり、比較的極性の弱い物質を水中から吸着する際によく用いられる。

【XAD8】

代表的な弱極性吸着剤で、多孔質のポリアクリル酸エステル吸着剤であり、XAD4 で吸着できない弱極性物質を回収するのに広く用いられる。このため、単独で用いられるよりは、むしろ XAD4 と等量混合された XAD4/8 として用いられることが多い。

【銅フタロシアニン系吸着剤】

チョークなどの青色顔料として広く用いられる銅フタロシアニンをコットンやレーヨンなどに結合させ、吸着剤として利用した物を指す。π電子相互作用により、3 環以上の多環芳香族を選択的に吸着することができる。

【Sep-Pak Plus カートリッジ】

内容積 2ml のポリエチレン製カートリッジであり、両端がルアーロック構造になっており、テフロンチューブなどを簡単に取り付けることができる。

目 次

学位論文：変異原性による水道水の安全性管理手法に関する研究

第1章 緒論	1
1. 安全性管理の必要性和バイオアッセイの役割	1
1. 1 安全性管理の必要性	1
1. 2 世界保健機構飲料水質ガイドラインおよび水道水質基準の改正	3
1. 3 バイオアッセイの役割	11
2. バイオアッセイの種類と Ames 変異原性試験の位置づけ	14
2. 1 代表的なバイオアッセイ	14
2. 2 代表的な変異原性試験	17
2. 3 Ames 変異原性試験の位置づけ	22
3. 水試料の変異原性に関する従来の研究と課題	24
3. 1 Ames 変異原性試験結果の統計的解析	24
3. 2 水道水中変異原性物質の濃縮・回収方法	29
3. 3 水試料の変異原性の評価	37
4. 本研究の目的と構成	42
本章の引用文献	46
 第2章 Ames 変異原性試験の検出限界と定量限界の統計的解析方法の確立	57
1. はじめに	57
2. Ames 変異原性試験	59
3. 結果と考察	60
3. 1 解析方法の確立	60
3. 1. 1 検出限界の解析方法	60
3. 1. 2 信頼限界および定量限界の解析方法	61
3. 2 データの信頼性と分布型	66
3. 3 検出限界の解析	70
3. 3. 1 陰性対照試験に2枚のプレートを用いた場合の検出限界	70

3. 3. 2 陰性対照試験に用いるプレート数を4枚にすることの効果	70
3. 3. 3 検出限界の個人差	71
3. 4 信頼限界および定量限界	77
4. 本章のまとめ	80
本章で用いた記号	82
本章の引用文献	83
 第3章 水中変異原性物質の簡易で高効率な濃縮・回収方法の開発	 85
1. はじめに	85
2. 実験方法	87
2. 1 吸着剤	87
2. 2 試料水とその調整方法	89
2. 3 吸着・脱離の装置と操作方法	92
2. 4 Ames 変異原性試験	97
3. 結果と考察	98
3. 1 吸着剤の選定	98
3. 1. 1 高性能吸着樹脂と銅フタロシアニン系吸着剤との比較	98
3. 1. 2 高性能吸着樹脂と従来の吸着樹脂との比較	99
3. 2 高性能吸着樹脂の精製・コンディショニング方法	105
3. 2. 1 精製方法およびコンディショニング方法	105
3. 2. 2 精製・コンディショニングした樹脂からの溶出物の変異原性	106
3. 3 試料水調整方法の検討	111
3. 3. 1 遊離塩素除去の可否	111
3. 3. 2 残留遊離塩素と樹脂との反応物の変異原性	112
3. 3. 3 試料水の pH 調整による変異原性回収率の変化	112
3. 4 吸着・脱離条件の検討	116
3. 4. 1 通水速度による変異原性回収率の変化	116
3. 4. 2 通水可能倍率	116

目 次

3. 4. 3 脱離用ジメチルスルホキシドの必要液量と脱離力の確認	118
4. 本章のまとめ	122
本章の引用文献	125
第4章 日本における水道水の変異原性強度の解析	135
1. はじめに	135
2. 実験方法	136
2. 1 試料水の採水地点と採水方法	136
2. 2 有機物濃度等の測定	139
2. 3 Ames 変異原性の測定	140
2. 3. 1 変異原性物質の濃縮	140
2. 3. 2 Ames 変異原性試験	140
3. 結果と考察	143
3. 1 水道水の変異原性	143
3. 1. 1 変異の型	143
3. 1. 2 変異原性強度	144
3. 1. 3 地域差および年間変動	145
3. 1. 4 TOC、A ₂₆₀ 、TOX との相関	146
3. 1. 5 水源の種類との関係	147
3. 1. 6 前塩素処理との関係	148
3. 2 変異原前駆物質に関する考察	161
3. 2. 1 TOC との関係	161
3. 2. 2 芳香族性との関係	161
3. 2. 3 ハロゲン化されやすさとの関係	162
3. 2. 4 年間変動	162
4. 本章のまとめ	165
本章の引用文献	168

第5章 変異原性物質生成能による水質評価方法の開発	173
1. はじめに	173
2. 実験方法	175
2. 1 試料水	175
2. 2 塩素処理	177
2. 3 生成した変異原性物質の濃縮	178
2. 4 Ames 変異原性試験	180
3. 結果と考察	182
3. 1 変異原性物質生成能に与える塩素処理条件の影響	182
3. 1. 1 TOC 濃度の影響	182
3. 1. 2 初期 pH の影響	183
3. 1. 3 塩素添加量の影響	183
3. 1. 4 共存物質の影響	184
3. 1. 5 反応温度の影響	185
3. 1. 6 反応時間の影響	186
3. 2 測定方法の提案と水質指標としての有効性	191
3. 2. 1 測定方法の提案	191
3. 2. 2 排水等への適用例	191
3. 2. 3 浄水処理工程の評価への適用例	192
4. 本章のまとめ	197
本章の引用文献	199
 第6章 水道水源に流入する排水の変異原性物質生成能の解析	 205
1. はじめに	205
2. 実験方法	206
2. 1 試料水の採取および保存	206
2. 2 水質の測定	208
2. 2. 1 有機物濃度等	208

目 次

2. 2. 2	トリハロメタン生成能 (THMFP)	208
2. 3	変異原性物質生成能 (MFP) の測定	209
2. 3. 1	塩素処理	209
2. 3. 2	濃縮	209
2. 3. 3	Ames 変異原性試験	210
3.	結果と考察	215
3. 1	変異原性物質生成能および変異原性物質生成能負荷量のレベル解析	215
3. 1. 1	変異原性物質生成能レベル	215
3. 1. 2	変異原性物質生成能負荷量レベル	216
3. 2	発生源による特徴付け	222
3. 2. 1	変異原性物質生成能	222
3. 2. 2	変異原性物質生成能負荷量	222
3. 3	変異原前駆物質の特徴	226
3. 3. 1	TOC、COD、BOD、A260、THMFP と MFP との関係	226
3. 3. 2	排水処理による MFP の変化	227
4.	本章のまとめ	233
	本章の引用文献	235
第7章	総括	239

謝辞

公表論文リスト

図表のタイトルの一覧

Chapter 1	Introduction	1
Table 1-1	WHO guidelines for drinking-water quality	5 , 6
Table 1-2	Quality standards of drinking water in Japan (items relating to human health)	7
Table 1-3	Quality standards of drinking water in Japan (items relating to the acceptability of supplied water)	8
Table 1-4	Quality guidelines of drinking water in Japan (items relating to monitoring)	9
Table 1-5	Quality guidelines of drinking water in Japan (items relating to the comfort of water quality)	10
Fig. 1-1	Applicability of bioassay for safety management of pollutant in drinking water	13
Table 1-6	Principal character of strain used for the Ames mutagenicity assay of drinking water	21
Table 1-7	Comparison of characteristics of bioassay	23
Fig. 1-2	Configuration of this study (Study on method for safety management of drinking water by mutagenicity)	45

Chapter 2	Establishment of statistical procedures for estimating the detection limit and determination limit of the Ames <i>Salmonella</i> mutagenicity assay	57
Fig. 2-1	Procedure for estimating detection limit	63
Table 2-1	MR levels defined for estimating detection limit	64
Fig. 2-2	Procedure for estimating determination limit	65
Table 2-2	Reproducibility of the Ames assay results by the student A and a reference	68
Fig. 2-3	Examples of dose-response line	68
Table 2-3	Fitness of the Ames assay results for the normal distribution	69
Fig. 2-4	Behavior of the number of data sets toward MR level (Experimenter : A, Negative control test : duplicate plates)	73
Fig. 2-5	Estimation of detection limit by positive ratio (Experimenter : A, Negative control test : duplicate plates)	73
Fig. 2-6	Behavior of the number of data sets toward MR level (Experimenter : A, Negative control test : quadruple plates)	74
Fig. 2-7	Estimation of detection limit by positive ratio (Experimenter : A, Negative control test : quadruple plates)	74
Fig. 2-8	Behavior of the number of data sets toward MR level (Experimenter : B, Negative control test : quadruple plates)	75
Fig. 2-9	Behavior of positive ratio toward MR level (Experimenter : B, Negative control test : quadruple plates)	75
Fig. 2-10	Behavior of fluctuation ratio of sample regression slope of dose-response line obtained by students A and B toward $MR_{i,j}$	76
Table 2-4	MR ranges and power transformation functions defined for estimating determination limit	79
Table 2-5	Fitness of transformed $w_{i,k}/a_{i,k}$ on the normal distribution	79
Table 2-6	Estimation of determination limit by maximum fluctuation ratio	79

Chapet 3	Development of an efficient method for recovering mutagen form water sample	85
Table 3-1	Structures and properties of adsorbent	88
Table 3-2	Principal qualities of water sample	91
Fig. 3-1	Adsorption apparatus	95
Fig. 3-2	Desorption apparatus in case of using DMSO	96
Fig. 3-3	Desorption apparatus in case of using toluen	96
Table 3-3	Mutagenicity ratios of samples recovered by CSP800 and blue rayon for TA98±S9 and TA100+S9	102
Table 3-4	Mutagenicity of samples recovered by cartridges of CSP800 and copper phthalocyanine adsorbents connected in series	102
Table 3-5	Mutagenicity of samples recovered by cartridges of CSP800 and XAD4 connected in series (desorbed by DMSO)	103
Table 3-6	Mutagenicity of samples recovered by cartridges of CSP800 and XAD4 connected in series (desorbed by toluene)	103
Table 3-7	Mutagenicity of samples recovered by cartridges of CSP800 and XAD4/8 connected in series (desorbed by DMSO)	104
Fig. 3-4	Organic matter eluted from CSP800 by organic solvents	107
Fig. 3-5	Ethanol eluted by pure water from refined CSP800 in conditioning procedure	108
Fig. 3-6	Ethanol eluted by pure water from refined and conditioned CSP800 before use	108
Table 3-8	Influence of residual ethanol on recovery of mutagens	109
Table 3-9	Mutagenicity ratios of organic matter eluted from refined and conditioned CSP800	109
Fig. 3-7	Refining and conditioning method of Sep-Pak Plus CSP-800 cartridge	110
Fig. 3-8	Influence of chlorine reduction	114
Table 3-10	Examinations of mutagens formed by reaction between CSP800 and free chlorine	114
Fig. 3-9	Effect of pH of water sample on recovery of mutagens	115

Table 3-11 Examinations of mutagens formed by pH adjustment	115
Fig. 3-10 Influence of flow rate on recovery of mutagens	120
Fig. 3-11 Changes of mutagenicity recovered toward resin volume per unit volume of water sample	120
Table 3-12 Investigation on minimum solvent volume for desorption	121
Table 3-13 Confirmation of desorption ability of DMSO	121
Fig. 3-12 Procedure for concentration of mutagens from water sample	124

Chapter 4 Analysis of mutagenicity level of tap water in Japan	135
Table 4-1 Sampling places, waterworks and water sources	137
Table 4-2 Water treatment processes of each waterworks	138
Fig. 4-1 Procedure for concentration of mutagens from water sample	142
Fig. 4-2 Examples of dose-response line	149
Table 4-3 Type of mutagen in tap water	150
Table 4-4 Mutagenicity of tap water in 23 cities	151
Table 4-5 Monthly variations of mutagenicity of tap water in principal 4 cities	152
Fig. 4-3 Mutagenicity level of tap water in Japan	153
Table 4-6 Distribution of mutagenicity of all the samples	154
Fig. 4-4 Necessity of countermeasure for reducing mutagenicity of tap water	155
Fig. 4-5 Seasonal variation of mutagenicity of tap water in principal 4 cities	156
Fig. 4-6 Seasonal variation of mutagenicity of tap water in 23 cities	156
Fig. 4-7 Correlation between TOC and mutagenicity	157
Fig. 4-8 Correlation between A_{260} and mutagenicity	157
Fig. 4-9 Correlation between TOX and mutagenicity	158
Fig. 4-10 Relationship between TOC and mutagenicity per milligram of TOC	158
Fig. 4-11 Relationship between aromaticity of organic pollutant (A_{260} / TOC) and mutagenicity per milligram of TOC	159
Fig. 4-12 Correlation between halogenousity of organic pollutant (TOX / TOC) and mutagenicity per milligram of TOC	159
Fig. 4-13 Influence of pre-chlorination on mutagenicity per milligram of TOC	160
Fig. 4-14 Seasonal variation of mutagenicity per milligram of TOC	164

Chapter 5	Development of a method for measuring mutagen formation potential (MFP) as a novel water quality index	173
Table 5-1	Water samples used	176
Fig. 5-1	Procedure for concentration of mutagens formed	179
Table 5-2	Volume of water samples to be passed to Sep-Pak Plus CSP-800	179
Fig. 5-2	Examples of dose-response line	181
Fig. 5-3	Influence of total organic carbon concentration	187
Fig. 5-4	Influence of initial pH	187
Fig. 5-5	Influence of chlorine dose around typical conditions in water purification processes	188
Fig. 5-6	Decision of chlorine dose	188
Fig. 5-7	Percentile distribution of coexistent ammonia nitrogen concentration of various river water, wastewater and sewage diluted until TOC reached $4.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	189
Fig. 5-8	Influence of coexistent ammonia nitrogen concentration	189
Fig. 5-9	Influence of reaction temperature	190
Fig. 5-10	Influence of reaction time	190
Fig. 5-11	Chlorination procedure for measuring mutagen formation potential, MFP	194
Table 5-3	Formation of mutagen from various wastewater by chlorination	195
Fig. 5-12	Examples of evaluation of water purification efficiency by mutagenformation potential, MFP	196

Chapter 6	Analysis of mutagen formation potential of wastewater discharging into drinking water source	205
Table 6-1	Principal characteristics of landfill	207
Fig. 6-1	Chlorination procedure for measuring mutagen formation potential (MFP)	212
Fig. 6-2	Procedure for concentration of mutagens formed	213
Fig. 6-3	Examples of dose-response line	214
Fig. 6-4	Mutagen formation potential (MFP) of 65 treated wastewater and discharged wastewater samples	218
Fig. 6-5	Percentile of mutagen formation potential (MFP) for 65 treated wastewater and discharged wastewater samples	219
Fig. 6-6	Mutagen formation potential (MFP) load of 62 treated wastewater and discharged wastewater samples	220
Fig. 6-7	Percentile of mutagen formation potential (MFP) load for 62 treated wastewater and discharged wastewater samples	221
Table 6-2	Ratios of high or low MFP samples in each industry	224
Table 6-3	Ratios of high or low MFP load samples in each industry	225
Fig. 6-8	Correlation between mutagen formation potential (MFP) and TOC, COD, BOD	228
Fig. 6-9	Correlation between mutagen formation potential (MFP) and A_{260} , THMFP	229
Fig. 6-10	Biodegradability, aromaticity, trihalomethane formation potential of mutagen precursor	230
Fig. 6-11	Mutagen formation potential (MFP) reduction efficiency by general wastewater treatment	231
Table 6-4	Treatment characteristics of mutagen precursor in wastewater treatment system	232

第 1 章

緒

論

第1章 緒 論

1. 安全性管理の必要性和バイオアッセイの役割

1. 1 安全性管理の必要性

現在、世界的に見て日本における水道普及率は極めて高く、1999 年現在は 96.1%¹⁾ であり、大都市部ではほぼ 100%に到達している。また、日本の水道水は水質がよく、蛇口の水を子供から老人までがそのまま飲用できる数少ない国の一つである。しかし、近年は水質が悪化しており、様々な被害、懸念が国民に広がっている。代表的な被害の一つに、異臭味被害が挙げられる。水道水の異臭味被害人口は、近年減少傾向にあるものの、1997 年度は年間 645 万人にものぼった²⁾。異臭味被害は有害化学物質の混入を連想させたため、有害化学物質による水道水汚染への懸念が広がった。水道水中の代表的な有害物質としてトリハロメタンに関心が集まり、トリハロメタン除去能を有する浄水器の販売台数が伸び、1997 年度は年間約 332 万台に達した³⁾。浄水器の販売台数が伸びた一方で、ペットボトルなどに詰められたボトル水の販売量も伸びており、1998 年には年間約 87 万トン⁴⁾にも達した。このような一連の現象は、水道水の安全性に対する懸念、特に有害化学物質に対する懸念を反映していると考えられる。

海外では水道水中に含まれる化学物質の調査が行われ、多くの化学物質が検出された。例えば、米国環境保護庁 (United States Environmental Protection Agency, USEPA) は、1,152 種類の化学物質を検出し、この中には人や動物に腫瘍を生ずる発がん性物質が含まれていることを報告している⁵⁾。

また、USEPA の報告でも検出されていない様々な化学物質が含まれていることもほぼ確実である。個別物質の分析では全体の一部の物質しか分析できないことの例として、中西らによる水道水中の全有機ハロゲン (Total Organic Halogen, TOX) の分析例⁶⁾が挙げられる。中西らは、東京都の水道水中から 190 種類以上の有機ハロゲン化合物を検出し、検出されたすべての有機ハロゲン化合物を合計しても TOX の約 50%しか説明できないことを明らかにした。これらの有機ハロゲン化合物のうち、主な物質はクロロホルム、ジクロロブロモメタン、クロロジブロモメタン、ブロモホルム、クロロ酢酸、抱水クロラール、クロロアセトン、クロロアセトニトリルであり、クロロホ

ルムについては、国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer, IARC）の分類⁷⁾で、ヒトに対して発がん性がある可能性がある物質（ランク 2B）として分類されている。

以上のように、水道水中には発がん性物質を含む極めて多種多様な化学物質が存在している。水道水中の有害物質のうち、摂取直後に健康障害をもたらす物質（急性毒性物質）については、事故などにより多量の急性毒性物質が水道水に混入した場合などを除いてほとんど問題にならない。また、急性毒性物質が多量に含まれている場合には、味・におい・色などから経験的に飲料不適であることが判断できる場合が多い。

しかし、極微量でも長期間摂取することにより健康障害を引き起こす物質（慢性毒性物質）については、味・におい・色を感じる閾値の方が低い物質がほとんどであり、また、被害が顕在化するまでに長期間を要するので被害が甚大になる可能性があるのも、日常的な安全性管理が重要である。特に、発がん性物質や催奇性物質などの遺伝子毒性物質については、日本における 1981 年以降の死亡原因の第一位ががんである⁸⁾こと、継世代影響は深刻な被害をもたらすことから、その安全性管理が重要である。

1. 2 世界保健機構飲料水質ガイドラインおよび水道水質基準の改正

国際的にも水道水質に関する関心は高く、世界各国が水道整備を行う上で参考となるガイドラインを世界保健機構（World Health Organization, WHO）が定めている。1984年に勧告された WHO 飲料水質ガイドラインは、微生物学的性状、健康影響を有する無機物質、有機物質などに関する 44 項目の基準が定められていた。しかし、1984 年版のガイドラインは主に 1980 年以前の科学的知見に基づいて定められており、それ以降の科学的知見、特に発がん物質に関する知見の集積はめざましいことから、1992 年に改訂されて 106 項目、1998 年に再度一部改訂されて 112 項目⁹⁾になった。改訂されたガイドラインを Table 1-1 に示す。改訂されたガイドラインでは、快適・利便性に関する項目は目標値になり、健康に関わる項目についてのみガイドライン値が定められて微生物汚染と化学物質汚染による健康に関わる項目に重点が置かれた。化学物質汚染に関しては、水道水中から高い頻度で検出され、かつ、比較的高濃度で検出されることが確認されており、信頼性が高い国際機関などによるリスクアセスメントから健康影響を有する可能性がある物質群について項目に追加された。信頼性が高い国際機関として、国際化学物質安全計画（International Programme on Chemical Safety, IPCS）、IARC、FAO/WHO 合同残留農薬専門委員会（Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, JMPR）、FAO/WHO 合同食品添加物委員会（Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA）が取り上げられた。改訂されたガイドライン中には、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、テトラクロロエチレンなどの発がん性物質も数多く含まれており、発がん性についても慎重に検討されている。

WHO 飲料水質ガイドラインの改訂を受け、日本国内においても厚生省生活環境審議会を中心として水道水質基準が見直され、「今後の水道の質的向上のための方策について（第二次答申）—水質基準に関する基準のあり方—」として答申された。この答申を受け、1993 年 12 月 1 日、厚生省は「水道水に関する省令」を改訂・施行した。この改訂は、1958 年に水道法が制定されて以来の 34 年ぶりの大幅改訂になった。改訂された水道水質基準等を Tables 1-2～1-5 に示す。この改訂により、これまで 26 しかなかった水質基準項目等が 85 に増やされた¹⁰⁾。水質基準項目等は、水道水の質的向上に関する項目（水道水が有すべき性状に関する項目、快適水質項目）、水道水の安全性

向上に関する項目（健康に関する項目、監視項目）とに分類でき、水道水の安全性向上に関する項目は全部で 55 項目となっている。健康に関する WHO 飲料水質ガイドラインの項目が目標値も含めて 112 項目であるのに対して日本の水道水質基準項目等が 85 項目しかないのは、日本国内では使用されていない農薬などが除外されているためである。水道水質基準にもクロロホルム、1,2—ジクロロエタン、テトラクロロエチレンなどの発がん性物質も数多く含まれており、発がん性についても慎重に検討されている。

以上のように、世界的にも国内的にも水道水中の有害化学物質に関するガイドライン、基準項目等が制定されているが、毒性情報が不十分であったり、測定が困難であることなどによって、基準が定められていない物質に対する対策も必要である。WHO も基準が定められていない物質について言及しており、測定が可能な物質については継続的に検討するとしている。しかし、個別物質についていかに検討を重ねても水道水中のすべての化学物質を網羅できないこともまた明確である。

Table 1-1

WHO guidelines for drinking-water quality (1)

Items	Guideline value	Items	Guideline value
<i>E. Coli</i> or thermotolerant coliform bacteria	Must not be detectable in any 100 ml sample	1,1-dichloroethene	0.03 mg · l ⁻¹
Total coliform bacteria	Must not be detectable in any 100 ml sample	Carbofuran	0.007 mg · l ⁻¹
Antimony	0.005 mg · l ⁻¹ (P)	Chlordane	0.0002 mg · l ⁻¹
Arsenic	0.01 mg · l ⁻¹ (P)	Chlorotoluron	0.03 mg · l ⁻¹
Barium	0.7 mg · l ⁻¹	DDT	0.002 mg · l ⁻¹
Boron	0.5 mg · l ⁻¹ (P)	1,2-dibromo-3-chloropropane	0.001 mg · l ⁻¹
Cadmium	0.003 mg · l ⁻¹	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	0.03 mg · l ⁻¹
Chromium	0.05 mg · l ⁻¹ (P)	1,2-dichloropropane	0.04 mg · l ⁻¹ (P)
Copper	2 mg · l ⁻¹ (P)	1,3-dichloropropene	0.02 mg · l ⁻¹
Cyanide	0.07 mg · l ⁻¹	Heptachlor and heptachlorepoxyde	0.00003 mg · l ⁻¹
Fluoride	1.5 mg · l ⁻¹	Hexachlorobenzene	0.001 mg · l ⁻¹
Lead	0.01 mg · l ⁻¹	Isoproturon	0.009 mg · l ⁻¹
Manganese	0.5 mg · l ⁻¹ (P)	Lindane	0.002 mg · l ⁻¹
Mercury (total)	0.001 mg · l ⁻¹	MCPA	0.002 mg · l ⁻¹
Molybdenum	0.07 mg · l ⁻¹	Methoxychlor	0.02 mg · l ⁻¹
Nickel	0.02 mg · l ⁻¹ (P)	Metolachor	0.01 mg · l ⁻¹
Nitrate (as NO ₃ ⁻)	50 mg · l ⁻¹	Molinate	0.006 mg · l ⁻¹
Nitrite (as NO ₂ ⁻)	0.2 - 3 mg · l ⁻¹ (P)	Pendimethalin	0.02 mg · l ⁻¹
Selenium	0.01 mg · l ⁻¹	Pentachlorophenol	0.009 mg · l ⁻¹ (P)
Carbon tetrachloride	0.002 mg · l ⁻¹	Permethrin	0.02 mg · l ⁻¹
Dichloromethane	0.02 mg · l ⁻¹	Propanil	0.02 mg · l ⁻¹
1,2-dichloroethane	0.03 mg · l ⁻¹	Pyridate	0.1 mg · l ⁻¹
1,1,1-trichloroethane	2 mg · l ⁻¹ (P)	Simazine	0.002 mg · l ⁻¹
Vinyl chloride	0.005 mg · l ⁻¹	Trifluralin	0.02 mg · l ⁻¹
		2,4-DB	0.09 mg · l ⁻¹
		Dichlorprop	0.1 mg · l ⁻¹

(P) : Provisional guideline value

Table 1-1
WHO guidelines for drinking-water quality (2)

Items	Guideline value [mg · l ⁻¹]	Items	Guideline value [mg · l ⁻¹]
1,2-Dichloroethene	0.05	Fenoprop	0.009
Trichloroethene	0.07 (P)	Mecoprop	0.01
Tetrachloroethene	0.04	2,4,5-T	0.009
Benzene	0.01	Monochloramine	3
Toluene	0.7	Chlorine	5
Xylenes	0.5	Bromate	0.025 (P)
Ethylbenzene	0.3	Chlorite	0.2 (P)
Styrene	0.02	2,4,6-trichlorophenol	0.2
Benzo[a]pyrene	0.0007	Formaldehyde	0.9
Monochlorobenzene	0.3	Bromoform	0.1
1,2-Dichlorobenzene	1	Dibromochloromethane	0.1
1,4-Dichlorobenzene	0.3	Bromodichloromethane	0.06
Trichlorobenzenes (total)	0.02	Chloroform	0.2
Di(2-ethylhexyl) adipate	0.08	Dichloroacetic acid	0.05 (P)
Di(2-ethylhexyl) phthalate	0.008	Trichloroacetic acid	0.1 (P)
Acrylamide	0.0005	Chloral hydrate	0.01 (P)
Epichlorohydrin	0.0004 (P)	Dichloroacetonitrile	0.09 (P)
Hexachlorobutadiene	0.0006	Dibromoacetonitrile	0.1 (P)
Edetic acid (EDTA)	0.6	Trichloroacetonitrile	0.001 (P)
Nitrilotriacetic acid	0.2	Cyanogen chloride	0.07
Tributhyltin oxide	0.002	Uranium	0.002 (P)
Alachlor	0.02	1,2-Dibromoethane	0.0004 – 0.015 (P)
Aldicarb	0.01	Cyanazine	0.0006
Aldrin/Dieldrin	0.00003	Diquat	0.01 (P)
Atrazine	0.002	TBA	0.007
Bentazone	0.3	Microcystin-LR	0.001 (P)

(P) : Provisional guideline value

Table 1-2

Quality standards of drinking water in Japan (items relating to human health)

Item	Standard value
Standard plate count	≤ 100 in 1ml
Coliform group bacterial count	Not to be detected
Cyanide	$\leq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Mercury	$\leq 0.0005 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Lead	$\leq 0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Chromium (VI)	$\leq 0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Cadmium	$\leq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Selenium	$\leq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Arsenic	$\leq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Fluorine	$\leq 0.8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Nitrates and nitrites	$\leq 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Nitrates and nitrites	$\leq 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Trichloroethylene	$\leq 0.03 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Tetrachloroethylene	$\leq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Carbon tetrachloride	$\leq 0.002 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
1,1,2-trichloroethane	$\leq 0.006 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
1,2-dichloroethane	$\leq 0.004 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
1,1-dichloroethylene	$\leq 0.02 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
cis-1,2-dichloroethylene	$\leq 0.04 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Dichloromethane	$\leq 0.02 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Benzene	$\leq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Trihalomethanes, total	$\leq 0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Chloroform	$\leq 0.06 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Bromodichloromethane	$\leq 0.03 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Dibromochloromethane	$\leq 0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Bromoform	$\leq 0.09 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Thiram	$\leq 0.006 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Simazine	$\leq 0.003 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Thiobencarb	$\leq 0.02 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
1,3-dichloropropene	$\leq 0.002 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Table 1-3

Quality standards of drinking water in Japan (items relating to the acceptability of supplied water)

Item	Standard Value
Chloride ions	$\leq 200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Organic substances (consumption of potassium permanganate)	$\leq 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Copper	$\leq 1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Iron	$\leq 0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Manganese	$\leq 0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Zinc	$\leq 1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Sodium	$\leq 200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Calcium, magnesium, etc. (hardness)	$\leq 300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Calcium, magnesium, etc. (hardness)	$\leq 300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Total residue	$\leq 500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Phenols	$\leq 0.005 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
1,1,1-trichloroethane	$\leq 0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Methylene blue activated substance	$\leq 0.2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
pH value	$8.6 \geq, \geq 5.8$
Odor	not abnormal
Taste	not abnormal
Color	$\leq 5 \text{ degree}$
Turbidity	$\leq 2 \text{ degree}$

Table 1-4
Quality guidelines of drinking water in Japan (items relating to monitoring)

Item	Guideline value [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
<i>trans</i> -1,2-dichloroethylene	≤ 0.04
Toluene	≤ 0.6
Xylene	≤ 0.4
<i>p</i> -dichlorobenzene	≤ 0.3
1,2-dichloropropane	≤ 0.06
Diethylhexyl phthalate	≤ 0.06
Nickel	≤ 0.01
Antimony	≤ 0.002
Boron	≤ 0.2
Molybdenum	≤ 0.07
Formaldehyde	≤ 0.08
Dichloroacetic acid	≤ 0.04
Trichloroacetic acid	≤ 0.3
Dichloroacetonitrile	≤ 0.08
Chloral hydrate	≤ 0.03
Isoxathion	≤ 0.008
Diazinon	≤ 0.005
Fenitrothion	≤ 0.003
Isoprothiolane	≤ 0.04
Chlorothalonil	≤ 0.04
Propyzamide	≤ 0.008
Dichlorvos	≤ 0.01
Fenobucarb	≤ 0.02
Chlornitrofen	≤ 0.00001
Iprobenfos	≤ 0.008
EPN	≤ 0.006

Table 1-5
Quality guidelines of drinking water in Japan (items relating to the comfort of water quality)

Item	Guideline value
Manganese	$\leq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Aluminium	$\leq 0.2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Residual chlorine	\leq approximately $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
2-methylisoborneol	PAC Treatment : $\leq 0.00002 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ GAC Treatment : $\leq 0.00001 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Odor threshold (TON)	≤ 3
Free carbon dioxide	$\leq 20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Organic substances (consumption of potassium permanganate)	$\leq 3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Calcium, magnesium, etc. (hardness)	$100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \geq, \geq 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Total residue	$200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \geq, \geq 30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Turbidity	≤ 1 degree at a tap ≤ 0.1 at the entrance of a distribution facilities
Langhelier's index (corrosiveness)	approximately -1, trying to be 0
pH value	approximately 7.5

1. 3 バイオアッセイの役割

水道水中の化学物質の安全性を管理するために、毒性が明らかになっているいくつかの物質についてはガイドライン、基準が制定されている。しかし、既存のガイドライン、基準の考え方では、1) 毒性が明らかになっていない物質や測定方法が確立されていない物質は管理の対象にならない、2) 多くの物質の基準を定めると測定の負担が大きくなる、3) 複合影響の評価がほとんど行われていない、4) 未知物質については全く対処できない、などの問題点に対処できない。したがって、既存の考え方に固執していたずらに個別物質に関する基準項目を増やすのではなく、水道水中に含まれている化学物質全体の毒性の強度を評価して安全性管理を行う方法を併用することが必要である。

水道水中に含まれている化学物質全体の毒性の強度を評価して安全性管理を行う方法として、バイオアッセイによる方法が挙げられる。バイオアッセイとは、個体生物または細胞等の生物構成物を用いて、化学物質の生物への毒性を評価する方法をいい、広義には、ラット、マウス、ウサギ等の哺乳動物を用いて評価する方法も含まれるが、狭義には、細菌や酵母、培養細胞、水棲生物を用いて簡易かつ迅速に評価する方法を指す。日常的な水道水の安全性管理のためには、簡易かつ迅速に評価することが求められるため、ラット等の動物実験は対象外である。したがって、本研究では後者の定義に従うこととする。バイオアッセイの種類と個々の特徴については、第2節で述べる。

バイオアッセイは、評価対象となる化学物質が特定されていなくても毒性を評価することができるという優れた特徴を有するが、一方で、物理・化学的な測定（個別物質の濃度分析）と比較して一般的に1) 一回の測定の労力が大きい、2) 多量の検体を必要とする、3) 定量性・再現性に乏しい、4) 細菌などを用いて得た結果から人などへの正確に毒性を評価しにくい、などの問題点を有している。このため、評価の目的や対象に個別物質の濃度分析とバイオアッセイのどちらが適しているかを考え、両者の特長を活かすことが重要である。

バイオアッセイの特徴を活かした利用方法を明らかにするために、水道水中に含まれる毒性物質を安全性管理手法の適用範囲の観点から分類・整理し、Fig. 1-1 に示す。

毒性が強かつ濃度が高い、すなわち、単一物質での健康影響リスクが高い少数の既知物質については、個別物質の濃度分析を行うべきである。しかし、健康影響リスクが低いかわからない多くの既知物質については、個別測定を行うと労力が大きくなりすぎるため、バイオアッセイによりそれらの物質全体の毒性の強度を評価して安全性管理を行うことが有効である。また、健康影響リスクが高い可能性がある未知物質および測定が困難な物質の場合には、個別測定による管理ができないため、バイオアッセイによる管理以外には現在のところ方法がない。さらに、複数の物質の相乗作用、相加作用、拮抗作用などの複合影響については、個別物質の濃度分析ではほとんど評価できない。このため、複数の物質が含まれている水道水には、従来より行われているリスクが高い既知物質の個別測定と併用してバイオアッセイで評価を行うべきである。

以上のように、バイオアッセイにより水道水中に含まれている物質の毒性を総括的に評価・管理することがバイオアッセイの役割であり、従来の個別物質の濃度分析によるガイドライン、規制と併用して導入されるべきである。

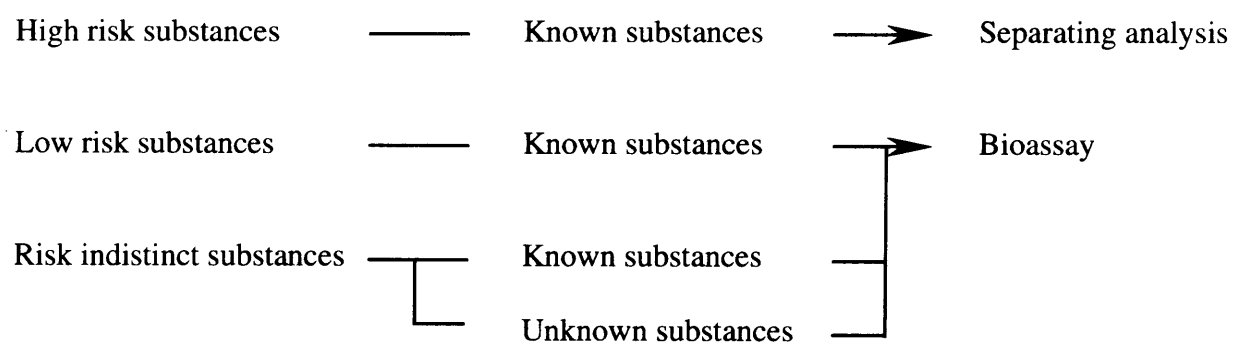


Fig. 1-1. Applicability of bioassay for safety management of pollutant in drinking water.

2. バイオアッセイの種類と Ames 変異原性試験の位置づけ

2. 1 代表的なバイオアッセイ

水試料の安全性評価・管理に用いられている主なバイオアッセイを検出する毒性の種類で分類すると、急性毒性試験、内分泌攪乱性試験、変異原性試験に大別することができる。以下に、それぞれの試験の概要と例を述べる。

1) 急性毒性試験

急性毒性とは、短時間に生物を死滅させたり増殖を阻害したり異常行動を起こす毒性の総称である。急性毒性試験には、細菌、ほ乳類培養細胞、藻類、ミジンコなどを用いる試験がある。細菌を用いる代表的な試験方法としては、Microtox 試験¹¹⁾がある。

Microtox 試験は、発光細菌懸濁液と試料とを試験管内で混合し、細菌が死滅して発光しなくなる割合を 30 分程度の短時間に測定する方法で、試験用具がキット化されて市販されている。この他に、一般細菌や硝化菌などの酸素消費量の変化を調べる呼吸阻害試験法、緑藻などの培養液に試料を加えて培養し、試料を加えない場合と増殖量を比較する藻類増殖阻害試験、ミジンコの入ったシャーレに試料を加え、ミジンコが動かなくなる（死滅する）割合を調べるミジンコ遊泳阻害試験、およびヒメダカなどの魚の入った容器に試料を加えて死滅する割合を調べる魚毒性試験などが用いられている。

急性毒性試験の一部は、試験操作が比較的簡易で試験生物の維持が容易なことなどから、すでに実用化されている方法もある。代表的な例として、USEPA の毒性削減評価 (Toxicity Reduction Evaluation, TRE) の中で、排水の安全性や排水処理装置の性能を評価する方法として採用されている例¹²⁾が挙げられる。この他にも、化学物質毒性・生態毒性欧州センター (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, ECETOC) の工場排水試験法¹³⁾、ヨーロッパ連合 (European Union, EU) 諸国の水質モニタリングが挙げられる。しかし、これらは事業所排水、環境水、水道原水を対象としたものであり、水道水は対象とされていない。水道水の急性毒性試験が行われないのは、水道水中に通常的に含まれる可能性がある急性毒性物質については基準が設けられており、また、前述のとおり、急性毒性物質が多量に含まれている場合には、味・におい・色などから感覚的に飲料不適であることが判断できる場合が多いためと考え

られる。

2) 内分泌攪乱性試験

内分泌攪乱性とは、生体内で営まれている正常なホルモン作用を傷害する毒性の総称であり、野生動物の雄性生殖器の萎縮、性徴の欠如などの悪影響として現れる。ヒトに対しては、精子数の減少、乳がんの増加などが内分泌攪乱物質の摂取と因果関係があるとの見解があるが、結論には至っていない。内分泌攪乱性は、悪影響の種類（エンドポイント）が多数あるため、内分泌攪乱性試験も様々なものが考案されている。水試料への適用例が多い内分泌攪乱性試験は、ヒト乳がん細胞由来細胞 MCF-7 の増殖試験、酵母を用いた Two Hybrid System 試験であり、女性ホルモン（エストロゲン）と同様の作用をもつ化学物質の検出、作用強度評価に用いられている試験が多い。

水環境中の内分泌攪乱物質の研究は始まったばかりであり、研究例も少なく、実用化されているバイオアッセイもない。今後の発展が望まれる。

3) 変異原性試験

変異原性とは、遺伝子に損傷を与えるか突然変異を誘発する毒性の総称であり、遺伝子毒性の指標の一種である。変異原性が発現した結果、奇形やがんが発生することがある。奇形を誘発する毒性を催奇性、がんを誘発する毒性を発がん性と呼ぶ。催奇性、発がん性は、それぞれ生殖細胞、体細胞の遺伝子に突然変異が起きてさらに異常増殖能を獲得するなど、変異原性とそれ以外の毒性の複数の毒性が作用して発現する。

これに対して変異原性は、遺伝子に突然変異が起こること自体を指すので、催奇性、発がん性が発現する前段階で発現する関係にある。変異原性を示すが発がん性や催奇性を示すことが知られていない物質や非変異原性の発がん性物質も存在する¹⁴⁾ので、変異原性試験の結果から発がん性、催奇性を評価することはできないことに留意する必要がある。しかし、多くの催奇性物質、発がん性物質は変異原性を示すと考えられており、変異原性を示すことは催奇性、発がん性を示す可能性が高いことを意味する。

非変異原性の発がん性物質の発がん作用機序については、遺伝子と直接反応しないために変異原性はないが、細胞膜などと反応することにより遺伝子と反応するようになると説明されている¹⁴⁾。

催奇性、発がん性を評価するためには動物実験が必要で、バイオアッセイでは評価

できない。このため、化学物質の毒性を評価する場合には、予め変異原性試験を行い、期間、労力等を要する動物を用いた催奇性、発がん性試験を行う対象を絞り込む（スクリーニングする）ことが有効であるとの考え方が定着している。同様に、水道水、水道原水の催奇性試験、発がん性試験を行うことは困難だが、その前段階で発現する変異原性の試験を行うことは比較的容易なため、変異原性が高い水道水、水道原水は催奇性物質、発がん性物質が含まれている可能性が高いとして監視、対策を優先的に行うことが有効と考えられる。

4) その他の毒性試験

遺伝子毒性、急性毒性、内分泌攪乱性以外に問題になる毒性として、慢性毒性が挙げられる。慢性毒性とは、化学物質に長期間曝露されることによって現れる代謝機能、生殖機能などの様々な機能に障害を起こす毒性の総称である。遺伝子毒性を慢性毒性の一種とする考え方もあるが、一般的には区別される。本研究においても、両者を区別することとする。慢性毒性を簡易・迅速に評価するバイオアッセイは現在のところ開発されておらず、水道水への適用例もない。

以上のように、水道水の急性毒性試験の必要性は低いこと、内分泌攪乱性試験は研究が始まったばかりであること、動物を用いた慢性毒性、催奇性、発がん性試験を行うのは困難であることから、水道水の安全性評価・管理に適用されている多くのバイオアッセイは変異原性試験である。水道水の変異原性を測定し、評価することは催奇性、発がん性物質が含まれている可能性が高い水道水を管理するのに有効な方法の一つと考えられる。

2. 2 代表的な変異原性試験

変異原性を検出する指標ごとに主な変異原性試験を分類すると、DNA 損傷性試験、染色体異常試験、点突然変異（遺伝子突然変異）試験に大別される。以下に、それぞれの試験の概要と代表的な試験の特徴について述べる。

1) DNA 損傷性試験

DNA 損傷性とは、DNA の塩基対に様々な損傷を与えることを指す。通常は、DNA 損傷が起きてても DNA 修復機構が働いて、DNA が損傷したまま細胞分裂が起きることはほとんどない。DNA 損傷の程度が大きくて修復が間に合わなかった場合や誤った修復がなされた場合などに、異なった DNA を持ったまま細胞が分裂して突然変異が起きる。変異原性は遺伝子に突然変異を誘発する毒性なので、遺伝子の突然変異が起きなくても検出される DNA 損傷性を変異原性に含めないとの考え方もある¹⁵⁾。しかし、遺伝子突然変異の可能性を表すので変異原性の一種と考える場合が多く、本研究では後者の考え方に沿うこととする。

DNA 損傷性試験には、細菌やほ乳類、魚類等の培養細胞を用いた試験が多い。DNA 損傷性試験を水道水の安全性評価・管理に適用した例は比較的少なく、排水、環境水、水道原水に適用されている例が多い。DNA 損傷性試験の中で適用例が多いのは、umu assay、Rec-assay およびコメットアッセイである。

umu assay は、DNA が損傷を受けることにより発現する遺伝子を指標とした試験である。DNA が損傷を受けると複製時にギャップを生じ、ギャップを埋めるために SOS 遺伝子という特殊な遺伝子が発現し、修復機構が働く。サルモネラ菌 TA1535 菌株の SOS 遺伝子にマーカーとなる遺伝子を融合させ、発現する SOS 遺伝子の量を定量的に測定できるようにしたのが umu assay ある。umu assay は、原理的に、DNA を損傷する物質すべてを検出できると考えられる。また、操作が簡易、試験期間が短いなどの利点を有するため、日本水道協会の浄水試験法で採用されているが、定量性に乏しい。

Rec-assay は、DNA 損傷を受けたままの菌体と損傷を修復した菌体との増殖能力の差を指標とした試験である。DNA 損傷を修復する機構を除去した菌体は、変異原性物質により DNA 損傷を受けると細胞分裂が著しく阻害され、増殖しにくくなる。被検試料を DNA 修復機構を持つ野生の枯草菌と修復機構を除去した枯草菌とに接触させ、

増殖曲線や生存率を比較することにより変異原性強度を評価するのが Rec-assay である。Rec-assay は、菌体の増殖を阻害する物質が含まれる場合でも、野生株の結果で補正することができるので比較的影響を受けにくい、結果の定量性にやや乏しい。

コメットアッセイとは、別名 SCG(Single-Cell Gel Electrophoresis)アッセイとも呼ばれ、スライドガラス上の寒天に有核細胞を固定し、アルカリ処理後アルカリ条件下で電気泳動を行うと、DNA 切断でアルカリ易溶出部位があると、電流の方向にそって核から DNA が移動する性質を利用し、その移動像の長さ、大きさ、形などから DNA 損傷の程度を評価する手法である。コメットアッセイは、DNA 損傷の検出感度が高く、個々の細胞単位でデータが取得でき、手法が簡易かつ短時間に行え、統計的解析も行われているが、他の DNA 損傷性試験と同様、結果の定量性にやや乏しい。

2) 染色体異常試験

染色体異常とは、DNA の塩基対が損傷を受けて遺伝子が突然変異した結果、DNA の集合体である染色体の形状に異常をきたすことを指す。染色体異常の型には、切断、転座、小核形成、ギャップ形成、環状染色体形成などがある。胃がん、直腸がん、乳がんなど、固形がんの多くで染色体異常が観察されていることや、次に述べる遺伝子突然変異は誘発しないが染色体異常は誘発する物質が存在することなどから、遺伝子突然変異試験と並んで重要な試験とされている。

染色体異常試験はほ乳類や齧歯類の初代または培養細胞を用いることが多く、細胞を長期間安定に培養することが困難なこと、染色体異常の検出・特定に熟練を要することなどの理由から、水道水の安全性評価・管理に適用した例は少ない。

3) 遺伝子突然変異試験

遺伝子突然変異とは、DNA の塩基対が損傷を受けて遺伝子が突然変異することを指し、DNA レベルで起こる突然変異であるので点突然変異とも呼ばれている。

遺伝子突然変異試験には細菌やほ乳類培養細胞を用いた試験が多く、最も代表的な試験はサルモネラ菌の一種であるネズミチフス菌 (*Salmonella thymurium*) を用いた Ames assay (Ames 変異原性試験) である。Ames 変異原性試験は、突然変異を起こした細菌数を指標とした試験であり、水道水の安全性評価・管理への適用例は多く、水道水の安全性評価・管理へのバイオアッセイの適用例の大部分を占める。

Ames 変異原性試験は、予め人工的に突然変異させておいた細菌と変異原性物質とを接触させ、元に戻る突然変異（復帰突然変異）が起きた細菌の数を計数することにより、変異原性の強度を定量的に評価することができる。すなわち、細胞分裂に必要なアミノ酸であるヒスチジンの合成酵素遺伝子を予め突然変異させておき、変異原性物質と接触させた後にヒスチジンを含まない寒天培地で培養することにより、復帰突然変異を起こしてヒスチジン合成能力を取り戻した菌のみが増殖してコロニー（復帰コロニーという）を形成する。復帰コロニー数を計数することにより、被検物質の変異原性強度を定量的に評価することができる。ヒスチジンの合成酵素遺伝子に与える変異の型が異なる菌株が開発されており、検出したい変異の型に合わせて菌株を選ぶことができるので、被検物質の変異の型を明らかにすることができる。変異の型として、DNA の塩基対の種類が入れ替わる塩基対置換型、DNA に余分な塩基対が挿入されたり欠損したりするフレームシフト型、DNA に架橋する架橋型が知られており、それぞれの型の変異を検出する菌株が開発されている。また、被検物質がサルモネラ菌の細胞膜を通過し易いように細胞外膜を欠損（*rfa* 変異）させたこと、DNA 修復遺伝子を欠損（ $\Delta uvrB$ ）させたこと、薬剤耐性因子をもつプラスミド pKM101（R-factor）を導入して被検物質の急性毒性でサルモネラ菌が死滅するのを最小限にしたことにより、変異原性の検出感度を著しく改善し、検出可能物質の範囲を広げた。水道水の安全性評価に用いられる主な菌株の名称、検出できる変異の型、pKM101 の有無を Table 1-6 に示す¹⁴⁾。TA92、TA100、TA1535 株は塩基対置換型の変異原性物質の検索に、TA94、TA98、TA1537、TA1538 株はフレームシフト型の変異原性物質の検索に用いられる。これらのうち、TA92 株と TA94 株は、架橋型の変異原性物質も同時に検出することができる。通常の場合、R-factor が導入された TA98 株と TA100 株を用いて試験を行い、比較的まれな変異である DNA 架橋型の変異を検出する必要がある場合には TA92 株と TA94 株を用いて追加試験されることが推奨されている¹⁴⁾。

遺伝子突然変異に比べて染色体異常の方が変異の程度が大きいと考えられるため、染色体異常の方が重大な変異のように思われがちである。しかし、遺伝子突然変異が原因でがん化する場合が多く報告されており¹⁴⁾、遺伝子突然変異も重要であると言える。同様に、膀胱がんなどは最も変異の度合いが小さい塩基対置換型の変異が原因で

がん化することが明らかになっており、より変異の程度が大きいフレームシフト型、架橋型の遺伝子突然変異と同様に塩基対置換型の遺伝子突然変異も重要である。

Table 1-6
Principal character of strain used for the Ames mutagenicity assay of drinking water.

Strain	Detectable type of mutation	rfa mutation	$\Delta uvrB$	R-factor
TA92	Base pair exchange and crosslink	+	+	+R
TA94	Frame shift and crosslink	+	+	+R
TA98	Frame shift	rfa	Δ	+R
TA100	Base pair exchange	rfa	Δ	+R
TA1535	Base pair exchange	rfa	Δ	+
TA1537	Frame shift	rfa	Δ	+
TA1538	Frame shift	rfa	Δ	+

+: Wild type

2. 3 Ames 変異原性試験の位置づけ

バイオアッセイを水道水の安全性評価・管理手法として採用するには、1) 世界的に認知された方法であり、同一の試験生物、方法で試験がなされ、結果の相互比較が容易にできること、2) 多くの化学物質の試験結果があり、データベース化されていること、3) 国または国際機関で化学物質のバイオアッセイとして採用されている方法であるか、あるいはそれと同等の方法であること、4) 十分な感度があること、5) 再現性や定量性に優れていること、6) 迅速に結果が得られること、7) 必要な試験生物、薬品等が安価で安定した供給が得られること、8) 適切な試料調製方法が開発されていること、9) 結果の統計的な解析方法が確立されていること、10) 浄水処理技術者、水道水質管理技術者が広く試験できるように操作方法が簡易で標準化されていることが必要である。

ここで、各変異原性試験の特徴を比較した結果を、Table 1-7 に示す。Ames 変異原性試験は、ネズミチフス菌を用いるためにヒトとの種差があるが、ヒト培養細胞を用いるより簡易性、定量性に優れるという利点を有する。本研究では、定量的な指標を用いて水道水の日常的な安全管理を行うことを目的としていることから、簡易性、定量性を優先することとし、それらに優れる Ames 変異原性試験を採用することとした。なお、化学物質の安全性評価において、Ames 変異原性試験は国内外で広く利用されており、様々なバイオアッセイの中で優先的に採用することは広く合意を得ている。

また、Ames 変異原性試験を水道水の安全性評価に適用するには、適切な試料調製方法や、結果の統計的な解析方法を確立する必要があるが、十分に確立が可能と考えられる。

Table 1-7
Comparison of characteristics of bioassay

	chromosome aberration	gene mutation	DNA repair		
	SCE ^{a)}	Ames	umu	Rec	Comet assay ^{b)}
no specific difference with human	○	×	×	×	○
standardized in nation or international organization	○	○	○	×	×
quantitative test results have been stored into data base	×	○	×	×	×
sensitivity	○	○	○	○	○
quantitativity	×	○	△	△	△
rapidity	○	○	○	○	○
simplicity	△	○	○	○	○
stable supply of test organism	○	○	○	○	○
cost of test organism	○	○	○	○	○
appropriate sample preparation method has been developed	△	△	△	△	△
statistical analysis method has been developed	△	△	△	△	○

a) sister chromatid exchange, b) single cell gel electrophoresis assay

○: yes or good, △: under developing or middle, ×: no or bad

3. 水試料の変異原性に関する従来の研究と課題

3. 1 Ames 変異原性試験結果の統計的解析

Ames 変異原性試験は、比較的再現性がよく結果の誤差範囲が小さいが、 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ 程度の確率で起こる突然変異を評価するのである一定の誤差範囲をもち、変異原性が弱い検体を試験するときなどには誤差範囲が問題になる。このため、試験結果を統計的に解析して誤差範囲を明らかにし、得られた結果が陽性に見なせるか否かを検定する方法や検出限界を求める検討などが行われている。

主な検討は、1) 試験結果の分布型を定める検討、2) 分布型を仮定し、用量作用曲線の勾配から試験結果が陽性と判断できるか否かを検定する方法の検討（用量作用曲線の勾配に基づいた検討）、3) 分布型を仮定し、ブランク試験（陰性対照試験）結果と検体試験結果との差から試験結果が陽性と判断できるか否かを検定する方法の検討（陰性対照値との差に基づいた検討）、4) 分布型を仮定しないで試験結果が陽性と判断できるか否かを検定する方法の検討（分布型を仮定しない検討）に分類できる。以下に、それぞれの主な検討結果と問題点をまとめる。

1) 試験結果の分布型を定める検討

誤差範囲を明らかにする方法は、試験結果の分布型に基づいて検定を行う方法（パラメトリック法）が基本となるため、Ames 変異原性試験結果の分布型を定める検討は比較的例が多い。Ames 変異原性試験結果への適用例としては、ポアソン分布、ガウス分布（正規分布）、パスカル分布（負の2項分布）などがある。

Ames 試験結果は、非常に低い確率で起こる事象であり、また、確率変数が離散変数なので、そのような事象によく適合するとされているポアソン分布に従うとされている^{17, 18)}。しかし、実際には様々な系統誤差（実験誤差）を含むためにポアソン分布に従わない場合があることを報告している例が多い。以下に、主な検討例を示す。

Hamada ら¹⁹⁾は、著者が所属する研究所で得た試験結果を用いてポアソン分布への適合度検定を行った結果、同じ日に行った試験結果はポアソン分布に従うが、異なる日に行った試験結果はポアソン分布に従わなかったとしている。

Margolin ら²⁰⁾は、4ヶ所の研究所から TA100-S9 の条件での陰性対照値を得て分布型を検討した結果、ポアソン分布には従わず、負の2項分布に従ったとしている。

Snee²¹⁾らは、米国国立がん研究所（National Cancer Institute, NCI）から委託を受けている 4 ヶ所の研究所から TA100、TA98、TA1535、TA1537 の試験結果を得て検討した結果、ポアソン分布には従わず、べき乗変換することにより正規分布に従ったとしている。

Kenneth ら²²⁾は、国家毒性計画（National Toxicology Program, NTP）で得た 121 種類の化学物質についての 1,905 回の試験結果を解析した結果、75%以上の試験結果がポアソン分布と負の 2 項分布の両方に適合したとしている。これは、ポアソン分布と負の 2 項分布の分布型が類似しているためと考えられる。

Chu ら²³⁾は、NCI/NTP の検討結果を紹介し、4 ヶ所の研究所から得た TA100、TA98、TA1535、TA1537、TA1538 の各菌株の合計 2,362 回の試験結果の対数をとった結果、正規分布に従ったとしている。

これらの他にも、Margolin ら²⁰⁾、Bernstein ら²⁴⁾、Zeiger ら²⁵⁾など、ポアソン分布には従わないとしている文献は多い。

以上のように、Ames 変異原性試験結果の分布型には定説がない。実験誤差を含まず、ポアソン分布に従う結果が得られる実験操作条件を明らかにしてマニュアル化することが望ましいが、信頼度の高い機関の試験結果でもポアソン分布に従わず、実験誤差を含んでいると考えられることから、通常の実験操作ではポアソン分布に従う結果を得ることは困難と考えられる。このため、通常の実験操作で得られた結果からポアソン分布以外の適切な分布型を仮定して検出限界を求めることが必要である。

2) 用量作用曲線の勾配に基づいた検討

Ames 変異原性試験を行う際、通常は 3～6 程度の用量段階を設定して用量作用直線の勾配から被検物質の変異原性強度（比活性）を求める。この勾配の分布型を仮定し、勾配が有意に 0 より大きいときは陽性と判断することができるが、検討例は少ない。

Chu²³⁾らは、この原理に基づいて Ames 変異原性試験結果が陽性に見なせるか否か検定する方法を検討している。試験結果の対数を取り正規化した後に用量作用直線の勾配の信頼区間を求めた結果、変異原性がない検体を陽性と判断する過誤（false positive error）が 20.0% 起こり、適切な方法とは言えないとしている。

一般的に、用量作用直線の勾配から結果が陽性に見なせるか否かを検定する方法は

変動係数が大きい結果でも陽性と判断でき、また、同時に比活性の信頼区間も明らかにすることができる利点を有する。しかし、適切な方法はまだ開発されておらず、また、試験結果を毎回検定しなければならず、操作が煩雑なので、日常的な水道水の安全性管理に用いるためには工夫が必要である。

3) 陰性対照値との差に基づいた検討

陰性対照値と検体試験の値との差から、試験結果が陽性と判断できるか否かを検定する方法についての検討では、提案された方法で求めた検出限界と2倍則とを比較しているものが多い。2倍則とは、検体試験の復帰コロニー数が同時に行った陰性対照試験の復帰コロニー数の2倍以上であった場合に陽性と判断する方法であり、日本を含めた世界各国で最も広く用いられている。代表的な検討例として、Snee²¹⁾ら、Hamada¹⁹⁾の検討例がある。

Snee らは、NCI から委託を受けている4ヶ所の研究所から得た試験結果をべき乗変換して正規化し、陰性対照値と検体試験の値との差を有意水準5%でt検定を行う方法を提案している。この方法により、TA100、TA98、TA1535、TA1537の各試験菌株の試験結果を検定した結果、TA1537株以外の菌株では陰性対照値より57~87%大きい値であれば陽性と判断でき、2倍則では変異原性がある検体を陰性と判断する過誤(false negative error)が起こることを述べている。

Hamada らは、所属する研究所で同一の日に得た試験結果を用いて2倍則の妥当性を検討した。WP2uvrA、TA100、TA98、TA1535、TA1537の各試験菌株の試験結果がポアソン分布に従うことを確認し、陰性対照値の2倍の値が観測される確率を求めた結果、Type I error (false negative error) が起こる確率が0~18.17%であり、TA100株については0%であったことを述べている。すなわち、2倍則は本来陽性の結果の一部を誤って陰性と判断する可能性が高く、特にTA100株についてはその可能性が高いと述べている。

また、実際の実験結果への適用は試験されておらず、2倍則の妥当性も検討されていないが、検定方法の検討例としてWeinstein¹⁷⁾の検討がある。

Weinstein らは、復帰コロニー数の平方根が正規分布に従うとし、過去の実験結果から求めた分散を用いて2標本片側t検定を行い、陽性と判断できるか検定する方法を

提案している。しかし、菌株の Lot が異なると陰性対照値が 2 倍程度異なることもあり、分散も大きく異なると考えられるため、正確に検定できない可能性が高い。また、分散がほぼ一定と見なせるかの検討も行われていない。

以上のように、2 倍則は本来陽性の結果の一部を見逃す可能性があり、特に陰性対照試験値が大きい TA100 株への 2 倍則の適用は不適切と考えられる。また、これらの検討方法は、2 倍則の妥当性を検討する際には有効であったが、日常的な水道水の安全性管理を行うためには煩雑すぎる。このため、試験結果ごとに検定するのではなく、陰性対照値との比、すなわち MR (Mutation ratio, MR) 値で判断できる方法などの簡易な判断方法が開発され、特に水道水の安全性評価に最も広く用いられている TA100 株の試験結果の適切な判断方法が確立されることが望まれる。

4) 分布型を仮定しない検討

前述のように Ames 変異原性試験結果の分布型については定説がないため、Carnes ら²⁷⁾、Chu ら²³⁾は、分布型を仮定しないノンパラメトリック法であるパーセンタイル則を用いて試験結果が陽性と判断できるか否かを検定する方法を検討している。

Carnes らは、3 年間の TA98 株の陰性対照値を集積して累積百分率 (パーセンタイル) を求め、95 パーセンタイルよりも大きい値を陽性と判断する方法を提案している。また、過去の結果を用いてパーセンタイル則と 2 倍則とを比較した結果、パーセンタイル則は false positive error が起こるが、Ames 変異原性試験は発がん性などのスクリーニング試験なので大きな問題ではなく、パーセンタイル則の方がより信頼できると述べている。Chu らも 97.5 パーセンタイル則を提案して実際の結果を解析し、同様の結論を得ている。

パーセンタイル則は、試験ごとに毎回検定する必要がなく簡易であるが、過去の蓄積された陰性対照値から検定するので、菌株などの Lot が異なり陰性対照値が大きく異なる場合には適用できず、補正方法や陰性対照値の無次元化方法、陰性対照値の安定化方法などの対策が必要である。また、パーセンタイル則などのノンパラメトリック法は一般的に差の検出力が弱く、バイオアッセイの結果のように測定数が少なく、また誤差範囲が小さくない場合には有効とは言えない。

以上、1)～4)に示したように、Ames 変異原性試験結果の分布型については定説がないが、ノンパラメトリック法も有効とは言えない。したがって、より適切な分布型を定め、日常的な水道水の安全性管理に適用できる簡易で高感度な解析方法の確立が望まれる。

3. 2 水道水中変異原性物質の濃縮・回収方法

水道水の Ames 変異原性試験を行う場合、変異原性試験の感度が十分でないので濃縮操作が必要である。このため、様々な濃縮方法が考案されており、代表的な方法には液-液抽出法、減圧濃縮法、逆浸透法、固相吸着脱離法などがある。以下に、それぞれの方法の代表的な適用例と、最も適用例が多い固相吸着脱離法とその他の方法との比較検討例を示す。

1) 液-液抽出法の適用例

液-液抽出法は、極性の低い有機溶媒への変異原性物質の分配を利用した方法で、予め試料水の pH を調整して試料水中の変異原性の解離状態を制御し、解離平衡定数の異なる変異原性物質を分離濃縮することができる。また、極性の異なる有機溶媒を用いることによっても、同様の分離濃縮ができる。さらに、抽出後に溶媒を蒸発させて濃縮するので濃縮率を高くできる。このため、比較的検討例が多い。主な検討例を以下に示す。

Coleman ら²⁸⁾は、水道水を模擬したフミン酸の塩素処理水を pH2 に調整した後、塩化メチレンおよびジエチルエーテルを用いて液-液抽出し、得られた抽出溶媒をロータリーエバポレーターで蒸発乾固した後に DMSO に溶媒転換して変異原性試験を行った。その結果、ジエチルエーテルで抽出した場合、抽出後の水相から変異原性は検出されず、溶媒相からは元の試料水を直接蒸発乾固した場合とほぼ同じ変異原性が検出されたとしている。しかし、塩化メチレンで抽出した場合、元の試料水を直接蒸発乾固した場合の約 50% の変異原性が溶媒相と水相とから検出されたため、ジエチルエーテルの方が抽出力が高いとしている。

Maruoka ら²⁹⁾は、水道水中の変異原性物質の由来を検討するため、表流水およびその塩素処理水中の変異原性物質をジエチルエーテルを用いて抽出し、得られた抽出溶媒を 45~50℃ で蒸発乾固した後、Ames 変異原性試験を行った。その結果、塩素処理水からは TA100-S9 の条件で変異原性が確認されたが、表流水からは変異原性が確認されなかったとしている。

Virtiainnen ら³⁰⁾は、塩素処理された水道水を塩酸を用いて pH1~2 に調整した後、ジエチルエーテルを用いて 24 時間液-液抽出して得られた回収物について Ames 変異原

性試験を行った。その結果、TA98-S9 の条件で最大 $12,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ 、TA100-S9 の条件で最大 $8,800 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ の変異原性を検出したとしている。

Vargas³¹⁾らは、河川水中の変異原性物質を塩化メチレンを用いて抽出した結果と濃縮せずに直接試験した結果とを比較し、液-液抽出法では揮発性成分が回収できないために変異原性が有意に低下することを示した。

Kfir ら³²⁾は、水道水中の変異原性物質をジクロロメタンで液-液抽出する方法と濃縮せずに直接試験する方法で Ames 変異原性試験を行い、TA100 で検出される変異原性は濃縮しない方法の方が高く、揮発性の変異原性物質の存在が示唆される。

この他にも、調整した汚水再生処理水³³⁾、機械すき紙製造工場排水³⁴⁾、埋立地浸出水³⁵⁻³⁷⁾、下水³⁸⁾、河川水³⁹⁾などを対象とした検討が行われ、液-液抽出法にて変異原性物質を濃縮できたとしている。

以上のように、液-液抽出法は水試料中から変異原性物質を濃縮することができるが、有害な有機溶媒を大量に使用すること、抽出溶媒を蒸発させ溶媒転換しなければならないので揮発性成分を回収できないこと、大量の試料水を長時間抽出することが困難であること、回収率を高くするためには多段抽出が必要になり煩雑であることなどの理由より、日常的な水道水の安全管理には適さない。

2) 減圧濃縮法の適用例

減圧濃縮法は、水道水を未処理のまま減圧して水分を蒸発させて濃縮する直接減圧濃縮法と、凍結させた後に凍結させたままの状態が減圧して水分を蒸発させて濃縮する凍結乾燥法がある。

丹保ら⁴⁰⁾は、フミン質類を含む泥炭地着色水を塩素処理した模擬水道水について、ロータリーエバポレーターを用いて直接減圧濃縮した結果、全有機炭素 (TOC) はほぼ全量回収でき、回収物の変異原性は TA100-S9 の条件で乾固物 $63 \mu\text{g} \cdot \text{plate}^{-1}$ の時に陽性になったとしている。

Meier ら⁴¹⁾は、水道水を模擬した試薬フミン酸の塩素処理水を凍結乾燥した結果、変異原性のほぼ全てと全有機ハロゲン (TOX) の 80% 以上が回収できたと報告している。

減圧濃縮法は、理論上、不揮発性成分は完全に回収できるが、液-液抽出法と同様

に揮発性物質が回収できないこと、濃縮倍率を高くするためには長時間を要すること、無機塩類等のバイオアッセイに用いる微生物の育成を阻害する物質も同時に濃縮されてしまうことなどの理由により、日常的な水道水の安全管理には適さない。

3) 逆浸透膜法の適用例

逆浸透法は、水分子および無機塩類を通過させ、その他の物質の通過を阻止する逆浸透膜を用いることにより、変異原性物質を濃縮する方法である。

亀井ら⁴²⁾は、フミン質類を含む泥炭地着色水を塩素処理およびオゾン処理した模擬水道水について逆浸透膜を用いて濃縮した結果、比較的良好な濃縮率を得たとしている。しかし、トリハロメタンなどの低分子化合物の回収率は50%程度であり、無機塩類の分離を十分に行えなかったとしている。また、Monarca ら⁴³⁾は、逆浸透膜を用いて水道水を濃縮した結果、Ames 変異原性は検出されなかったとしている。

逆浸透法は、大量の試料水を短時間で処理するためには大きな膜面積を有する特殊で高価な装置が必要なこと、濃縮倍率を高くするためには多段濃縮操作が必要になり煩雑なこと、無機塩類が十分に除去されないこと等の理由により、日常的な水道水の安全管理には適さない。

4) 固相吸着脱離法の適用例とその他の方法との比較

固相吸着脱離法は、疎水性の吸着樹脂に変異原性物質を吸着させ、少量の有機溶媒で脱離して濃縮する方法で、液-液抽出法と同様に予め試料水の pH を調整して解離平衡定数の異なる変異原性物質を分離濃縮することができる。また、極性の異なる樹脂、特異的な吸着を利用した吸着剤なども開発されている。主に用いられている樹脂は、フナコシ化学社製ブルーコットン、ブルーコットンなどの銅フタロシアニン系吸着剤、Rohm and Haas 社製 Amberlite XAD7、XAD8 などの弱極性樹脂、三菱化学社製 MCI ゲル CHPA25 などの陰イオン交換樹脂、Amberlite XAD2、XAD4、MCI ゲル HP21、CSP800 などの無極性樹脂などがある。様々な吸着剤が開発されていることや操作方法が比較的簡易なため、様々な濃縮方法の中で最も検討例が多い。主な適用例とその他の方法との比較検討例を以下に示す。

a) 銅フタロシアニン系吸着剤

銅フタロシアニン系吸着剤は、顔料として広く用いられているフタロシアニンと銅

との錯体が多環芳香族化合物と π 電子相互作用により特異的に吸着することに着目し、銅フタロシアニンを綿、レイヨン、キチンと結合させて水に不溶性にして吸着剤としたものである。銅フタロシアニン系吸着剤を用いた研究は河川水を対象とした研究が多く、水道水を対象とした研究は少ない。

河川水を対象とした検討では、銅フタロシアニンを結合させた綿（ブルーコットン）またはレイヨン（ブルーレイヨン）を河川の流れの中に直接置いて変異原性物質を吸着した後、メタノール-濃アンモニア溶液で脱離して変異原性を検出したとしている例⁴⁴⁻⁴⁸⁾が多い。また、Sakamoto ら⁴⁹⁾は、ブルーレイヨンを河川の流れの中に直接置く方法（懸垂法）と XAD2 用いて河川水を一定量通水する方法とを比較し、懸垂法の方が高感度であることを述べている。また、銅フタロシアニンを結合させたキチン（ブルーキチン）を用いた方法と XAD2 用いた方法とを比較し、XAD2 を用いた場合には、ブランクが高くなること、サルモネラ菌の増殖を阻害する長鎖の脂肪酸を回収してしまうことから、ブルーキチンの方が正確な値が得られたとしている。

これに対して内海ら⁵⁰⁾は、ブルーコットンでの結果と、未処理の脱脂綿を用いて同様に試験した結果とを比較し、有意の差が認められなかったとしている。Omura ら⁵¹⁾は、ブルーレイヨンを用いて埋立地浸出水中の変異原性物質を濃縮したが弱い変異原性しか検出されず、同時に行った pH2 に調整した試料水からの XAD2 による濃縮物の方が高い変異原性を示したとしている。さらに、Vartiainen ら⁵²⁾も、ブルーコットンにより高フミン質含有飲料水中の変異原性物質の濃縮を行ったが、十分に変異原性物質を回収できなかったとしている。

銅フタロシアニン系吸着剤は 3 環以上の多環芳香族化合物のみしか吸着できない欠点を有しており、全体の変異原性に対する 3 環以上の多環芳香族化合物の寄与率が非常に高い場合など、限られた場合にしか適用できない。この性質を逆に利用し、水環境中に存在するヒト食由来のヘテロサイクリックアミンの同定に適用している例⁵³⁾もある。しかし、水道水中には 3 環以上の多環変異原性物質がほとんど含まれていないと考えられ、また、XAD4 などの無極性樹脂も 3 環以上の多環芳香族化合物を吸着できると考えられることから、銅フタロシアニン系吸着剤は日常的な水道水の安全性管理には適さない。

b) 無極性樹脂、弱極性樹脂、および両者の組み合わせ

前述のように様々な極性の樹脂が開発されているが、それらのほとんどはスチレンージビニルベンゼン共重合体を骨格とし、カルボキシル基を持たせることにより極性を制御しているものが多い。それらの樹脂の中で、水試料中の変異原性物質の吸着に適用例が多い樹脂は XAD2 であり、次いで XAD8、XAD4 と XAD8 の等量混合 (XAD4/8) などの適用例が多い。

Filipic ら⁵⁴⁾、スロベニアの河川水と流入する排水の合計 11 サンプルについて変異原性を調査し、中性条件下で XAD2 により固相吸着脱離法により濃縮したサンプルからはほとんど変異原性が検出されなかったが、酸性条件下で濃縮した埋立地浸出水 1 サンプルから TA100-S9 の条件で非常に高い変異原性が検出され、下流域の河川水の変異原性に影響を与えているとしている。

Kool ら⁵⁵⁾は、オランダの 18 都市の水道水 20 サンプルについて XAD4/8 を用いて固相抽出脱離法により変異原性の調査を行い、14 検体に変異原性が認められたことを報告している。しかし、文献中の図から値を読みとり変異原性強度を算出すると、最高で 800 net rev. $\cdot l^{-1}$ 程度であり、回収率が低い可能性が高い。

Vartiainen ら³⁰⁾は、塩素処理された水道水中の変異原性物質を XAD8 を用いて吸着し、酢酸エチルを用いて脱離して Ames 変異原性試験を行った結果、TA98-S9、TA100-S9 の条件でそれぞれ最大 8,800 net rev. $\cdot l^{-1}$ 、12,000 net rev. $\cdot l^{-1}$ の変異原性を検出したとしている。

Galassi ら⁵⁶⁾は、XAD2 と XAD7 を用いて水道水中の変異原性物質を吸着し、アセトンを用いて脱離して Ames 変異原性試験と GC/MS による変異原性物質の同定を行った結果、変異原性を検出して 2 種類の変異原性物質、トリ-2-クロロエチルリン酸塩、トリ-モノクロロイソプロピルリン酸塩を同定したとしている。

以上の他に、XAD2⁵⁷⁻⁸²⁾、XAD4⁸³⁾、XAD8^{30, 84, 85)}、XAD2/8^{86, 87)}、XAD4/8⁸⁸⁻⁹¹⁾、XAD4/7⁹²⁾、活性炭^{93, 94)}、C₁₈⁹⁵⁾などを用いた研究が報告されており、いずれも変異原性物質を回収できたとしている。これらの報告の他に、樹脂同士の吸着能を比較したり、固相吸着脱離法以外の濃縮方法と比較している報告もある。主な検討例を以下に示す。

Wigilius ら⁹⁶⁾は、飲料水を用いて、XAD2 を用いた固相吸着脱離法とジクロロメタン

を用いた液-液抽出法とを比較したところ、両者とも同等の変異原性物質回収率を示したとしている。しかし、中性条件での回収は両方法とも十分に行えるが、酸性条件での回収は変異原性成分が多いので、一回の吸着または抽出では完全に行えないとしている。

Sayato ら⁹⁷⁾は、液-液抽出法、XAD2 を用いた固相吸着脱離法、凍結乾燥法の 3 つの濃縮方法を比較している。水道原水、水道水、フミン質のオゾン処理水、塩素処理水の変異原性を TA98、TA100、TA104 株を用いて試験したところ、減圧濃縮法では水道水の試験を行うのに 10,000 倍の濃縮を必要とし、簡易的な濃縮方法としては適さないこと、3 つの濃縮方法のうちでエチルエーテルを用いた液-液抽出法および XAD2 をジクロロメタンで脱離する方法が、水道原水、水道水、フミン質の塩素処理水の全から変異原性物質および不揮発性有機物質をよく回収できたとしている。特に、XAD2 をジクロロメタンで脱離する方法は、フミン質の塩素処理水中の変異原性物質を多く回収できるので、最も適しているとしている。

Ross ら⁹⁸⁾は、標準変異原性物質としてアクリジンオレンジ、2-ニトロフルオレン (2-NF)、ベンゾ[a]ピレン (B[a]P) を工場排水に標準添加して XAD2 を用いた固相吸着脱離法、凍結乾燥法、逆浸透法での回収率を比較し、XAD2 はすべての標準物質を回収できたが、他の方法は 2-NF および B[a]P を回収できなかったとしている。また、逆浸透法では TOC の 84% を回収できたが濃縮倍率は 10 倍程度しか達成できなかったことを述べている。これらのことから、XAD2 による濃縮が最も適しているとしている。

Nakamuro ら⁹⁹⁾は、淀川河川水中の変異原性物質を濃縮するのに XAD2 と XAD8 のどちらが適しているかを検討し、XAD8 の方が多くの変異原性物質を回収できること、XAD8 吸着物の脱離にジクロロメタンが適していることを明らかにしている。

Vartiainen ら⁵²⁾は、高フミン質含有飲料水を用いて、ブルーコットンによる固相吸着脱離法、3 種類の液-液抽出法、XAD4 と XAD8 の等量混合 (XAD4/8) を用いた固相吸着脱離法とを比較したところ、ブルーコットンを用いた固相吸着脱離法および液-液抽出法は十分な変異原性物質の回収が得られなかったこと、従来のジクロロメタン抽出法よりも溶媒としてジエチルエーテルを用いたほうがより高い回収率を得られる

ことなどを確認し、最も高い変異原性の回収が得られたのは XAD4/8 を用いてサンプルの pH を 1~2 にして固相吸着脱離法により濃縮した場合であるとしている。

大村ら¹⁰⁰⁾は、埋立地浸出水中の変異原性物質を回収するために、XAD2/8、CSP800/CHPA25、ブルーレイオンをそれぞれ用いた固相吸着脱離法、ジクロロメタンを用いた液—液抽出法の 4 つの方法を比較し、回収率の点からは XAD2/8、CSP800/CHPA25 の両方法が優れていたが、弱い変異原性でも検出できたのは液—液抽出法であったこと、ブルーレイオンでは変異原性物質をほとんど回収できなかったことを述べている。

Urano ら¹⁰¹⁻¹⁰³⁾は、XAD2、HP21、XAD4/8、CSP800、CHPA25 について比較検討している。XAD2、HP21、XAD4/8 を用いて水道水等を通水倍率 2,000 倍で吸着処理したところ、物質により吸着率が大きく異なり、全体的には 25~65%しか吸着できないのに対し、5 ml の CSP800 と 2 ml の CHPA25 を直列に接続して 10 l の水道水を吸着処理すると、トリハロメタンの様な低分子物質からフミン質のような大分子までの様々な物質を 80~95%吸着でき、CSP800 からの脱離液と CHPA25 からの脱離液を 1:1 の割合で混合した場合、XAD4/8 を用いた場合の 2~4 倍の強度の変異原性が得られたとしている。また、CSP800、XAD2、XAD4/8 の中で、有機物質の回収率、濃縮率が最も優れているのは CSP800 であったとしている。浦野らの方法は、脱離溶媒を蒸発濃縮することなく直接バイオアッセイに供せるので、揮発性成分も回収できる。

以上、a)、b) で述べたように、固相吸着脱離法以外の方法より、固相吸着脱離法がよいとしている報告が多い。また、銅フタロシアニン系吸着剤では変異原性物質がほとんど回収されなかったとする報告が多く、無極性樹脂や、無極性樹脂と弱極性樹脂またはイオン交換樹脂との組み合わせにより変異原性物質を回収できたとする報告が多い。しかし、それらの多くは脱離液を蒸発濃縮しているため、液—液抽出法などと同様に揮発性成分を回収できず、浦野らの方法のように脱離溶媒を蒸発濃縮しない方法の確立が望まれる。また、変異原性物質を検出できたとする報告の中には、大量の試料水を長時間かけて吸着し、大量の溶媒を用いて脱離して濃縮している例が多く、操作が煩雑であるばかりでなく、回収率も低いと考えられ、日常的な水道水の安全性

評価には適さない方法が多い。さらに、樹脂の選定、濃縮条件を体系的に検討している例はなく、各研究者がそれぞれ独自の方法で検討しているため、結果の定量的な検討や一般的な評価が行えない。今後、樹脂の選定、濃縮条件が体系的に検討され、日常的な水道水の安全性評価のための固相抽出脱離法が確立されることが望まれる。

3. 3 水試料の変異原性の評価

Ames 変異原性試験を水試料に適用した例は多く、河川水およびその塩素処理水、工場排水の評価などが世界各国より報告されている。しかし、濃縮倍率、陰性対照値、Ames 変異原性試験時の試料添加量等の情報がすべて記載されている文献は少なく、定量的な比較はできない場合が多い。さらに、回収率についての検討がなされていないので、一概に値の大小を比較することはできないが、概略を把握するために、可能な限り文献中の図表などから値を読みとり、試料水 1l あたりの正味の変異原性を算出して比較した。

1) 表流水の評価例

河川水、湖水などの表流水の変異原性調査は例が多く、日本では淀川^{46, 63, 64, 104)}、相模川⁵⁰⁾、長良川⁷⁰⁾、信濃川⁷⁴⁾など、海外では韓国⁴⁹⁾、イタリア^{57, 65, 67)}、アルゼンチン⁶⁰⁾、ブラジル⁷⁵⁾、スロベニア^{54, 78)}、イスラエル¹⁰⁵⁾、インド^{106, 107)}などの報告がある。変異原性を比較すると、変異原性がほとんど検出されなかったという報告⁷⁰⁾、200 net rev. $\cdot l^{-1}$ 程度以下という報告^{50, 54, 60, 65, 67, 74, 78, 104)}から、2,600~3,500 net rev. $\cdot l^{-1}$ (文献中の図より強度を算出した値) の高い値が検出されたとする報告⁵⁷⁾、36,000 net rev. $\cdot l^{-1}$ の極めて高い変異原性を検出している報告⁶⁴⁾まで、様々な値が報告されている。これらのうち、36,000 net rev. $\cdot l^{-1}$ の極めて高い変異原性を検出している Maruoka らの報告⁶⁴⁾だけが突出して高い値が検出されているが、調査された河川が淀川水系であり、流域に工場が多く、また、多数の下水処理場が位置して様々な汚染物質が流入していること、染色産業が盛んで多量の染料が流入している可能性があるために他の地域と異なる変異原性物質で汚染されていることなどが原因とも考えられる。しかし、その後の他の研究者の報告では 1,000 分の 1 程度の値しか検出されていないので、どちらの報告が正確なのかの確認が必要である。Maruoka ら以外の多くの報告では、表流水の変異原性は低いとする報告が多い。

汚染源についての考察では、自然由来の物質と考察している報告⁷⁰⁾や、ヒトあるいは動物の摂食・排泄に係わる有機物と深い関係があることが示唆されたとしての報告⁷⁴⁾、埋立地浸出水が影響しているとしている報告⁵⁴⁾、下水に着目した報告⁶³⁾などがある。排水の変異原性については、4) で述べる。また、季節変動についての検討では、冬

季に変異原性が高くなったとの報告⁷⁰⁾、変異原性とその他の水質指標との相関については、BOD、COD、T-N、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ と相関が高いとの報告⁷⁴⁾などがあるが、報告数が少なく、断片的である。

試料水 1l あたりの正味の変異原性として最も高い値が検出されたとする試験菌株の種類、代謝活性剤の有無については統一した見解がなく、主なものは TA98-S9^{65, 67)}、TA98+S9^{57, 63)}、TA100-S9⁵⁴⁾、TA100+S9^{60, 70)}、TA1538-S9⁶⁴⁾であり、代謝活性剤を添加すると変異原性が低下するとする報告^{74, 75)}もある。これらの違いは、濃縮方法の違いや河川水の汚染状況の違いによると考えられるが、水道水源としての表流水の安全性確保のためには、浄水工程を経た実際の水道水の変異の型および水道水中の変異原性物質の由来を明らかにした上で体系的に検討することが重要である。

2) 水道水の変異原性

水道水の変異原性は原水となる河川水・湖水と共に調査される例が多く、日本では淀川水系^{63, 93, 104)}、信濃川⁷⁴⁾、海外ではフィンランド^{30, 52)}、オランダ⁵⁵⁾、イタリア⁶⁵⁾、アメリカ⁶⁶⁾、スペイン⁷²⁾、ブラジル⁷⁵⁾などの報告がある。

変異原性を比較すると、100 net rev. $\cdot \text{l}^{-1}$ 程度⁶⁵⁾、300 net rev. $\cdot \text{l}^{-1}$ 程度⁷⁴⁾、500 net rev. $\cdot \text{l}^{-1}$ 程度以下⁷⁵⁾、620 net rev. $\cdot \text{l}^{-1}$ 程度⁶³⁾、800 net rev. $\cdot \text{l}^{-1}$ 程度⁵⁵⁾、1,300 net rev. $\cdot \text{l}^{-1}$ 程度⁹³⁾、3,500 net rev. $\cdot \text{l}^{-1}$ 程度⁷²⁾、12,000 net rev. $\cdot \text{l}^{-1}$ 程度³⁰⁾と様々な値が報告されている。これらの違いは、河川水の汚染状況の違いによるところが大きいと考えられるが、濃縮方法が不適切で回収率が低くなっている可能性も高い。また、塩素消毒がなされている水道水の変異原性と水道原水となる表流水の変異原性との比較も一部の報告でなされており、水道水の方が高い場合があるとする報告⁶⁵⁾、高いとする報告⁷⁵⁾、約 2.4 倍（文献中の陽性対照物質濃度比から算出）高いとする報告⁷⁴⁾、40 倍高いとする報告⁶³⁾などがあるが、多くの報告で塩素消毒により変異原性、特に TA100-S9 で検出される変異原性が高くなるとしている。

水道水 1l あたりの正味の変異原性として最も高い値が検出されたとする試験菌株の種類、代謝活性剤の有無については、TA100-S9^{63, 72, 93)}、TA98-S9 とする報告^{30, 43)}が多く、+S9 で検出されたとする報告はほとんどない。+S9 とする報告は、ブルーレイヨンを用いて多環芳香族のみを選択的に濃縮した報告⁴⁷⁾、および TA98+S9 で最も高い値

を得たとしているが 11 net rev. $\cdot l^{-1}$ と非常に低い報告¹⁰⁸⁾であり、水道水中のごく一部の物質についてのみ評価しているか、回収率が低くて適切な議論がなされていない報告のみである。また、一部の報告で TA98-S9 の条件で最も高くなるとされているが、同様に濃縮方法が適切でなく、一部の物質しか回収できていなかったことが考えられる。

季節変動についての検討では、増水期よりも渇水期に変異原性が高くなるとの報告^{104, 109)}、夏と冬では夏の方が変異原性が高いとの報告⁶⁶⁾などがある。後者の報告は夏と冬のどちらが渇水期かは不明だが、前者は冬の方が高いことから、気温よりも降水量の方が影響している可能性が高いが、報告数が少なく、断片的である。変異原性とその他の水質指標との相関については、COD、吸着性有機塩素化合物 (Adsorbable Organic Halogen, AOX)、マイクロトックスの結果と相関が高かったが、測定数が少なく、結論には達しなかったとする報告⁵⁴⁾や、AOX、T-N、TOC、トリハロメタン濃度との相関を検討したところ、AOX との相関が最も高いとする報告⁵⁵⁾などがある。

以上のように、塩素消毒により TA100-S9 での変異原性が高くなることが読みとれるが、いずれも変異原性物質の回収率が不明である。今後は、濃縮が適切に行われていることを確認した上で、水道水の変異原性レベルを全国的かつ定量的に評価することが望まれる。

3) 塩素処理による変異原性の変化

河川水と塩素処理された水道水の変異原性とを比較した結果、塩素消毒により TA100-S9 での変異原性が高くなることが示唆されているため、試料水を塩素処理して変異原性の変化を検討している例が多く報告されている。

河川水を塩素処理した場合の報告では、TA100-S9 での変異原性が 2 倍程度になったとする報告⁶⁰⁾、TA98-S9 での変異原性が高くなったとする報告⁶⁷⁾、TA100-S9 での変異原性が MR 値が 2 未満であった河川水を塩素処理したところ MR 値が 10~50 となったとする報告¹⁰⁴⁾などがある。湖水では TA100-S9⁶⁵⁾、泥炭地水では TA100±S9⁴⁰⁾などが高くなったとの報告がある。また、フミン質の構成によって塩素化しても変異原性が増加しない場合があるとする報告¹⁰⁵⁾もあり、試験菌株の種類、代謝活性剤の有無については必ずしも統一した見解がないが、多くの場合で TA100-S9 の条件で変異原性が高くなっている。

塩素の添加量と発現する変異原性との関係についての検討も行われているが、変異原性は塩素の添加量に依存して増加したとする報告¹¹⁰⁾、 Cl_2/TOC の比が 5 倍のときに最も高い変異原性が検出され、さらに添加比を増加されると変異原性が減少する傾向が見られたと報告⁴⁰⁾、Eq.(1-1)に従うとする報告¹¹¹⁾など統一した見解がなく、今後の体系的な検討が必要である。

$$[\text{変異原性}] = A (1 - e^{-kc}) \quad (1-1)$$

ここで、 $c = [\text{TOC}] [\text{Cl}_2]$ 、 A 、 k は定数である。

讃岐田¹⁰⁴⁾は、塩素消毒により変異原性が高くなる場合が多いこと、1) で述べたように河川水の変異原性は水道水に比べて低いことから、浄水処理工程における変異原性の消長を検討し、水道水中の変異原性物質の多くは浄水処理工程における塩素処理により生成することを確認し、変異原性生成能を提案している。しかし、讃岐田の方法は、塩素処理により生成する変異原性の最高値を測定するために塩素の添加量が $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と実際の浄水場での添加量に比べて極端に高く、生成する変異原性物質が実際に浄水場で塩素消毒された場合と異なる可能性が高い。このため、現実的な塩素処理条件で生成能を測定する方法の検討が望まれる。

4) 排水の変異原性

排水の変異原性についての検討は、表流水、水道水と比較して少ない。比較的報告例が多いのは、埋立地浸出水と下水である。

埋立地浸出水の検討例では、TA98+S9 の条件で $16,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ 、TA100+S9 で約 $8,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ の変異原性を検出した報告⁸⁶⁾、TA100-S9 の条件で非常に高い変異原性が検出されて下流域の河川水の変異原性に影響を与えているとしている報告⁵⁴⁾などがあり、高い変異原性が検出されている報告が多い。下水についても、TA98+S9 の条件で $3,600 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ の変異原性を検出している例⁶³⁾や、 $20,200 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ の高い変異原性が検出されたこと、活性汚泥などの一般的な処理では 35%しか除去されなかったこと、塩素処理により変異原性は変化しないか 40%低くなることを報告している例³⁸⁾がある。後者の例³⁸⁾では、コークス炉排水、製紙工場排水についても TA98±S9、TA100±S9 の条件で検討を行った結果も報告している。それによると、製紙工場の排水からは変異原性が検出されなかったが、コークス炉排水では TA98+S9、TA100-S9、TA100+S9 で

それぞれ 1,240,000 net rev. · l⁻¹、111,000 net rev. · l⁻¹、355,000 net rev. · l⁻¹ の高い変異原性が検出されたとしている。しかし、一次処理水の方が二時処理水よりも変異原性が低いなど、データの信頼度に乏しい。

これらの他にも石油化学プラントからの一次処理水⁸¹⁾などの報告例があるが、いずれの報告でも生成能の測定は行われていないため、ほとんど変異原性が検出されていない例があり、また、塩素処理を行うとさらに著しく高い変異原性が検出されることが考えられる。今後、適切な条件で変異原性物質生成能を測定する方法が確立され、各種排水の生成能を評価する必要がある。

以上、1)～4)に述べたように、濃縮が適切に行われていることを確認した上で水道水の変異原性を明らかにした例は少なく、断片的な情報しか明らかになっていないため、今後の検討が望まれる。また、水道水中の変異原性物質の多くは塩素処理により生成すると考えられるため、水道原水や水源に流入する排水の変異原性を測定しても有効な対策にはつながらない。このため、浄水処理条件を模擬して塩素処理することにより変異原性物質生成能を測定する方法を確立し、水道原水や水源に流入する排水などの評価・管理することが必要である。

4. 本研究の目的と構成

現在、日本の水道水は、世界的に見て最も安全な水道水の一つと言っても過言ではない。しかし、水道水中には発がん性物質を含む様々な化学物質が含まれており、それらの化学物質の安全性評価・管理が求められている。そこで本研究では、Ames 変異原性試験で評価・管理する際に必要な簡易かつ信頼性、定量性が高い結果を得るための試料調製方法、および結果の評価方法を開発し、その有効性を示すとともに、現状の安全性レベル調査を行った。さらに、汚染物質発生源等の調査方法の開発および実態調査を行い、対策の必要性や対策に有効な情報を示すことを目的とした。このため、Fig. 1-2 に示す各検討を行った。

第1章では、水道水の化学物質汚染の現状と、それに対する WHO および厚生省の対応を飲料水質ガイドラインおよび水道水質基準を基にして議論し、未規制物質に対する安全性評価・管理の必要性を述べた。また、安全性評価・管理の手法として、バイオアッセイによる総括的な安全性評価が有効であること、多くのバイオアッセイの中で Ames 変異原性試験が最も有効であり、最初に導入すべきであることを述べた。さらに、Ames 変異原性試験を用いて日常的に水道水の安全性評価・管理を行うための問題点を抽出・整理するために文献調査を行い、Ames 変異原性試験結果の統計的解析方法が確立されていないこと、水道水中の変異原性物質の適切な濃縮・回収方法が確立されていないこと、適切な方法で水道水、水道原水、排水の変異原性物質汚染実態を明らかにした例がないことを述べ、研究の必要性を述べた。

第2章では、水道水の Ames 変異原性試験結果の簡易な統計的解析方法を確立した。すなわち、差の検出力が強いパラメトリック法に着目し、Ames 変異原性試験結果の分布型の検討、2 標本 t 検定による検出限界の決定方法、用量作用直線の勾配の信頼区間から定量限界を定める方法を検討した。また、著者らのグループの過去の試験結果を用いて検出限界と定量限界を定め、水質管理者が簡易に試験結果を評価できるようにした。さらに、少ない労力で感度、精度の高い結果を得るための Ames 変異原性試験法の改善点を提案し、改善前後での検出限界を比較することによりその有効性を述べた。

第3章では、水中の変異原性物質の簡易で高効率な濃縮・回収方法を開発した。す

なわち、様々な濃縮・回収方法の中で最も適切で有効と考えられる固相吸着脱離に着目し、検討例が多い銅フタロシアニン系吸着剤、弱極性吸着剤、無極性吸着剤の中から、変異原性物質吸着能力、脱離性が優れた吸着剤を選定した。また、正確な値を安定して得るための吸着剤精製方法およびコンディショニング方法を確立した。さらに、90%以上の高い回収率を得るため、試料水 pH、還元剤添加の是非などの試料水調整方法、通水速度、通水倍率、脱離溶媒の選定、脱離溶媒の通液速度および通液量などの吸着・脱離の操作条件を検討した。

第4章では、第3章で開発した濃縮・回収方法を用いて日本の水道水の変異原性強度を解析し、汚染実態を明らかにして対策の必要性を確認するとともに、対策の一助となる情報を示した。すなわち、日本の23都道府県の各1ヶ所を選定して1年間に渡り年5回（4都市については12回）変異原性強度を測定することにより、実態を明らかにするとともに、変異原性強度が対策を必要とするレベルであるかを検討した。さらに、主な変異の型、地域差、年間変動、他の水質指標との相関などについても検討し、優先的に測定すべき変異の型、地域、測定頻度を増すべき時期、変異原性物質の特徴などを明らかにするとともに、変異原性が従来より測定されているその他の水質指標の測定結果から推定できるか、あるいは別途測定する必要があるかを検討した。

第5章では、浄水処理条件下で試料水を塩素処理することにより変異原性物質に変化する物質を変異原前駆物質と定義し、変異原性物質生成能、Mutagen Formation Potential (MFP) という新しい水質指標を提案した。また、MFP の測定方法を確立するために、浄水処理条件を模擬した一定の条件で河川水や排水などを塩素処理し、変異原前駆物質を変異原性物質に変化させるための条件を検討した。すなわち、一般的な浄水処理条件の範囲内で、塩素処理時の有機物濃度、pH、塩素添加量、共存アンモニア態窒素濃度、反応時間、反応温度の影響について検討し、安定した値が得られる範囲を明らかにした。さらに、確立した方法を用いて排水等の MFP を測定し、塩素処理する前の変異原性と比較して MFP を測定することの重要性を示す。また、浄水処理の評価例も示し、MFP の有効性を示した。

第6章では、第5章で提案して測定方法を定めた MFP を用い、水道水源に流入する可能性がある各種排水の MFP を測定してその MFP を明らかにした。すなわち、各種

工場排水、生活雑排水、埋立地浸出水、下水処理場排水、屎尿処理場排水の未処理水、および処理水または放流水の合計 82 検体の MFP を測定することにより実態を明らかにした。また、MFP に排水量を乗じた MFP 負荷量も明らかにし、規制や対策の必要性を述べるとともに、優先的に対策を施すべき排水の種類を明らかにした。さらに、MFP と有機汚濁物質濃度との相関を検討し、MFP が従来より測定されているその他の水質指標の測定結果から推定できるか、あるいは別途測定する必要があるかを検討する。また、排水処理による MFP の変化を検討し、変異原前駆物質の特徴について検討した。

第7章では、本研究の成果を総括した。

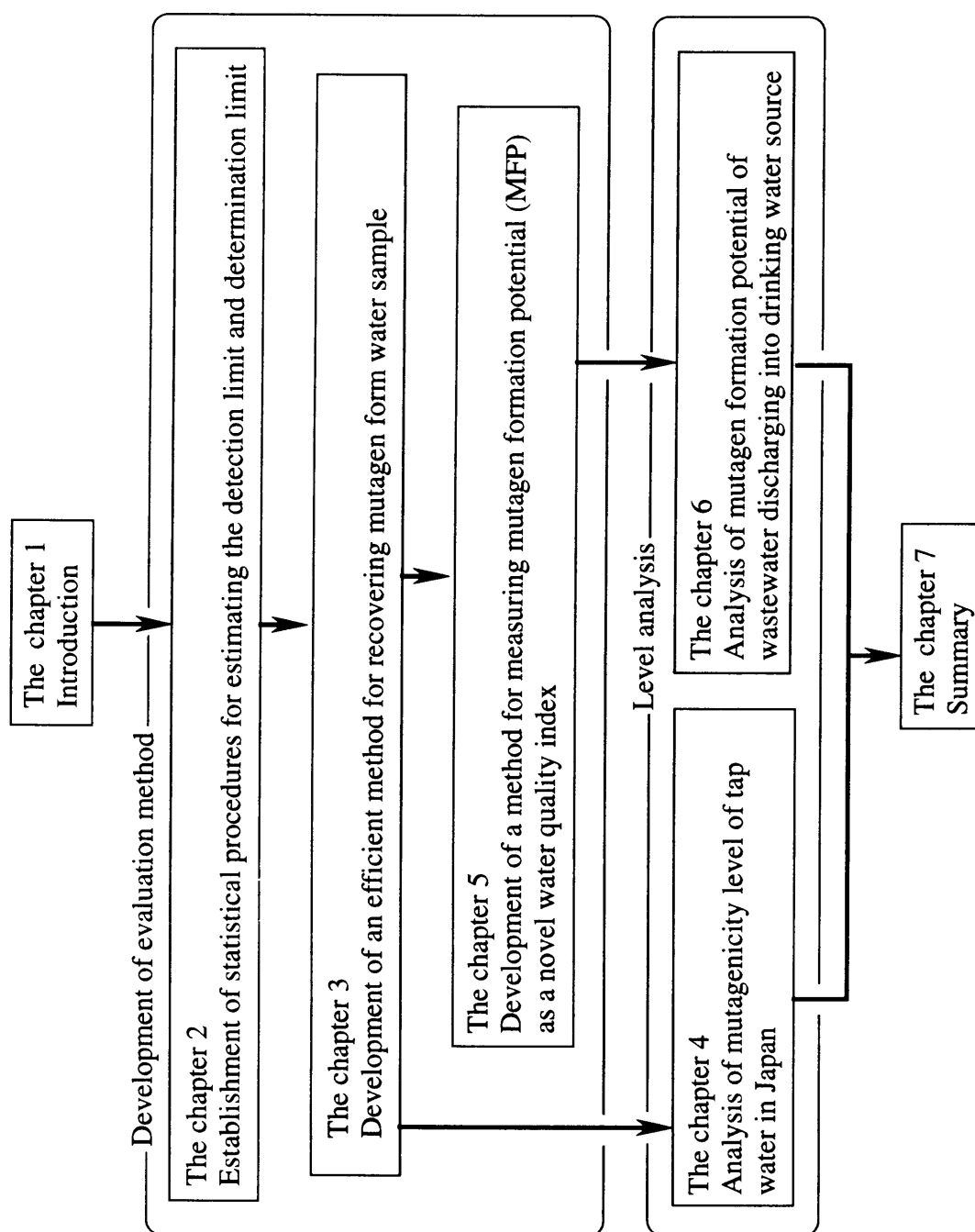


Fig. 1 -2. Configuration of this study (Study on method for safety management of drinking water by mutagenicity).

本章の引用文献

- 1) 日本水道協会 (1999) ホームページ (<http://www.mmjp.or.jp/>).
- 2) 水道技術研究センター (1999) ホームページ (<http://www.mizudb.or.jp/>).
- 3) 健康産業新聞 (1999) ホームページ (<http://www.health.co.jp/>).
- 4) 日本ミネラルウォーター協会 (1999) ホームページ (<http://wwwbeverage-j.co.jp/>).
- 5) Bull R. J. (1981) Is drinking water a significant source of human exposure to chemical carcinogens and mutagens?, *Environ. Sci. Res.*, **22**, 135-139.
- 6) 中西準子 (1990) いのちの水、読売新聞、pp.227、東京.
- 7) International agency for research on cancer (1999) Homepage (<http://193.51.164.11/>).
- 8) 豊島久真男 (1994) がんと遺伝子、化学同人、pp.149、京都.
- 9) World health organization (1998) Guidelines for drinking-water quality, WHO, pp.35, Geneva..
- 10) 辻昌 美 (1993) 水道水質に関する新たな基準の設定について、水環境学会誌、**16**(4)、235-243.
- 11) 楠井隆史 (1991) 発光細菌を用いて水の毒性を測る、水情報、11(10)、10-13.
- 12) United States of Environmental Protection Agency, Generalized methodology for conducting industrial toxicity reduction evaluations (TREs) EPA/600/288070.
- 13) 鈴木基之、内海英雄 (1998) バイオアッセイ水環境のリスク管理、講談社、pp.262、東京.
- 14) 松原 聰 (1992) がんの生物学、裳華房、pp.140、東京.
- 15) 菊池康基、津志本元、三宅幸雄 (1995) 遺伝毒性試験用語集、サイエンティスト社、pp.125、東京.
- 16) 中央労働災害防止協会 (1991) 安衛法における変異原性試験、中央労働災害防止協会、pp.173、東京.
- 17) Weinstein D. and Lewinson. T. M. (1978) A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay, *Mutation Research*, **51**, 433-434.
- 18) Stead A. G., Hasselblad V., Creason J. P. and Claxton L. (1981) Modeling the Ames test. *Mutation Research*, **85**, 13-27.

- 19) Hamada C., Wada T. and Sakamoto Y. (1994) Statistical characterization of negative control data in the Ames *Salmonella* / microsome test. *Environmental Health Perspectives Supplements*, **102**, 115–119.
- 20) Margolin B. H., Kaplan N. and Zeiger E. (1981) Statistical analysis of the Ames *Salmonella* / microsome test. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**(6), 3779–3783.
- 21) Snee R. D. and Irr J. D. (1984) A procedure for the statistical evaluation of Ames *Salmonella* assay results comparison of results among 4 laboratories, *Mutation Research*, **128**, 115–125.
- 22) Bogen K. T. (1994) Applicability of alternative model of revertant variance to Ames-test data for 121 mutagenic carcinogens, *Mutation Research*, **322**(4), 265–273.
- 23) Chu K. C., Patel K. M., Lin A. H., Tarone R. E., Linhart M. S. and Dunkel V. C. (1981) Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays, *Mutation Research*, **85**, 119–132.
- 24) Bernstein L., Kaldor J. and Pike M. (1982) An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test, *Mutation Research*, **97**, 267–281.
- 25) Zeiger E., Chhabra R. S. and Margolin B. H. (1981) *Mutation Research*, **64**, 379–389.
- 26) Myers L. E., Sexton N. H., Southernland L. I. and Wolff T. J. (1981) Regression analysis of Ames test data, *Environmental Mutagenesis*, **3**, 575–586.
- 27) Carnes B. A., Dornfeld S. S. and Perk M. J. (1985) A quantitative comparison of a percentile rule with a 2-fold rule for assessing mutagenicity in the Ames assay, *Mutation Research*, **147**, 15–21.
- 28) Coleman W. E., Munch J. W., Kaylor W. H., Streicher R. P., Ringhand H. P. and Meier J. R. (1984) Gas chromatography /mass spectroscopy analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acid, *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 9
- 29) Maruoka S. and Yamanaka S. (1980) Production of mutagenic substances by chlorination of waters, *Mutation Res.*, **79**, 381–386.
- 30) Vartiainen T. and Liimatainen A. (1986) High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland, *Mutation Research*, **169**, 29–34.

- 31) Vargas V. M. F., Guidobono R. R., Jordao C. and Henriques J. A. P. (1995) Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration / extraction procedures, *Mutation Research*, **343**, 31-52.
- 32) Kfir R., Grabow W. O. K. and Hilner C. A. (1982) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 641.
- 33) Grabow W. O. K., Burger J. S. and Hilner C. A. (1981) Comparison of liquid-liquid extraction and resin adsorption for concentrating mutagens in Ames *Salmonella*/microsome assays on water, *Environ. Contam. Toxicol.*, **27**, 442-449.
- 34) 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、用水と廃水、**31**、11、992-997.
- 35) 染谷 孝、鯉川（武藤）寿美子、立藤綾子、松藤康司、花嶋正孝 (1992) 変異原性試験による廃棄物埋立処分場浸出水中の微量汚染物質サーベイランス、水環境学会誌、**15**(4)、244-243.
- 36) 染谷 孝、立藤綾子、松藤康司、鯉川（武藤）寿美子、花嶋正孝 (1992) 廃棄物最終処理場の浸出水処理工程における変異原活性の消長、水環境学会誌、**15**(5)、321-326.
- 37) 芳倉太郎、西尾孝之、福永 勲 (1994) 海面埋立廃棄物処分場浸出余水の変異原性の特性、水処理技術、**35**(6)、1-12.
- 38) Doerger J. U., Meier J. R., Dobbs R. A., Johnson R. D. and Ankley G. T. (1992) Toxicity reduction evaluation at a municipal wastewater treatment plant using mutagenicity as an endpoint, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **22**, 384-388.
- 39) 上口 浩幸、佐々木大司 (1992) Mutagenicity test as an evaluation of water quality in drinking water、第 43 回全国水道水研究発表会講演集、787-789.
- 40) 丹保憲仁、亀井 翼、中津川 誠 (1986) 塩素及びオゾン処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性（Ⅱ）、水道協会雑誌、**56**(6)、2-11.
- 41) Meier J. R., et al. (1983) Formation of mutagens following chlorination of humic acid. A Model for Mutagen Formation during Drinking Water Treatment, *Mutation Res.*, **118**, 25-41.
- 42) 亀井 翼、丹保憲仁、田村聡志 (1985) 塩素処理及びオゾン処理によって水中のフ

- ミン質類から生成する成分の環境変異原性、水道協会雑誌、**54**(11)、25-33.
- 43) Monarca S., Meier J. R. and Bull R. J. (1983) Removal of mutagens from drinking water by granular activated carbon, *Water Res.*, **17**, 1015-1026.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) Sayoto Y., Nakamuro K., Ueno H. and Goto R. (1990) Mutagenicity of adsorbents to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water, *Mutation Research*, **242**, 313-317.
- 47) Kusamran W. R., Wakabayashi K., Oguri A., Tepsuwan A., Nagao M. and Sugimura T. (1994) Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters, *Mutation Research*, **325**(2/3), 99-104.
- 48) Otsu R., Horikawa K. and Min B. Y. (1998) Mutagenicity of river water in Korea, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**(4), 615-619.
- 49) Sakamoto H., Ohe T., Hayatsu T. and Hayatsu H. (1996) Evaluation of blue-chitin column, blue-rayon hanging, and XAD-resin column techniques for concentrating mutagens from two Japanese rivers, *Mutation Research*, **371**(1/2), 79-85.
- 50) 内海英雄、濱田 昭、早津彦哉、橋本徳蔵、相沢 靖 (1990) 河川水中変異原活性の季節・流域変動－青綿法による検討及び従来の水質汚濁指標との比較－、水質汚濁研究、**13**、227-234.
- 51) 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.
- 52) Vartinen T., Limatainen A., Jaaskelainen S. and Kaubanen P. (1987) Comparison of solvent extractions and resin adsorption for isolation of mutagenic compounds from chlorinated

- drinking water with high humus content, *Water Research*, **21**, 773–779.
- 53) 毛利紫乃、宗宮 功、小野芳朗 (1996) 都市水環境中に存在するヒト食生活由来の遺伝毒性物質のリスク評価、*水環境学会誌*、**19**(11)、847–854.
- 54) Filipic M. (1995) Mutagenicity toxicity of water extracts from the Sora river area, *Mutation Research*, **342**, 1–8.
- 55) Kool H. J., Kreijl V. C. F. and Oers V. H. (1984) Mutagenic activity in drinking water in the Netherlands. A survey and a correlation study, *Toxicological and Environment Chemistry*. **7**, 111–129.
- 56) Galassi S., Guzzella L. and Sora S. (1989) Mutagenic potential of drinking waters from surface supplies in northern Italy, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **8**, 109–116.
- 57) Guzzella L. and Sora S. (1998) Mutagenic activity of lake water samples used as drinking water resources in northern Italy, *Water Research*, **32**(6), 1733–1742.
- 58) Lopez L. C., Bassi M., Tzicas E. and Moretton J. (1998) Genotoxicity study of a leather tanney's waste waters, *Journal of Society of Leather Technologists and Chmists*. **82**(4), 159–161.
- 59) Itoh S. and Murakami H. (1995) Activities inducing chromosomal aberrations of waters treated with disinfectants and their stability, *Water Supply*, **13**(3/4), 89–94.
- 60) Lerda D. E. and Prosperi C. H. (1996) Water mutagenicity and toxicology in Rio Tercero (Cordaba, Argentina), *Water Research*, **30**(4), 819–824.
- 61) Itoh S. and Matsuoka Y. (1996) Contributions of disinfection by-products to activity inducing chromosomal aberrations of drinking water, *Water Research*, **30**(6), 1403–1410.
- 62) Magara Y., Kurosawa Y. and Hisamatu Y. (1994) Evaluation of a water purification system referring to mutagenicity, *Aqua*, **43**(5), 252–261.
- 63) 信川貴子、讃岐田 訓 (1997) 哺乳動物培養細胞の染色体異常試験による淀川水系水道水の遺伝毒性、*水環境学会誌*、**20**(11)、705–709.
- 64) Maruoka S. and Yamanaka S. (1983) Comparative studies using the Ames *Salmonella* / microsome test on mutagenicity of the XAD extract recovered from the river waters in Kyoto city, *Environmental Science Technology*, **17**(3), 177–180.

- 65) Monarca S., Ziglio G., Pasquini R., Beltramelli G., Feretti D., Donato F., Nardi G., Gervasoni M., Micheli F., Dalmiglio A. and Moretti M. (1992) Mutagenicity of drinking water obtained by different treatment procedures from two northern Italian lakes. *International Journal of Environmental Health Research*, **2**, 192-200.
- 66) Williams D. T., Nestmann E. R., Lebel G. L., Benoit F. M. and Otson R. (1982) Determination of mutagenic potential and organic contaminants of great lakes drinking water, *Chemosphere Chem. Biol. Toxicol. Environ. Probl.*, **11**(3), 263-276.
- 67) Conteiro E., Venier P., Fortunati E., Navazio G. and Levis A. G. (1992) Evaluation of mutagenic activity of organic micropollutants present in surface waters, *International Journal of Environmental and Pollution*, **2**(1/2), 87-96.
- 68) Chang E. E., Chang S-C. and Chiang P-C. (1995) Analyses of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) and mutagenicity in raw and chlorinated water, *Toxicological and Environmental Chemistry*, **52**(1/4), 177-189.
- 69) Utsumi H., Kiyoshige K., Mitade C., Han K-S., Hakoda M., Manabe H. and Hamada A. (1992) Mutagenicity and cytotoxicity of tap and raw water and their potential risk, *Water Science and Technology*, **26**(1-2), 247-254.
- 70) 長井 章、加納芳直、船坂鎌三 (1996) 長良川上流域における河川水の変異原性に関する研究、水環境学会誌、19(8)、657-663.
- 71) Kool H. J. and Kreijl C. F. V. (1984) Formation and removal of mutagenic activity during drinking water preparation, *Water Res.*, (18), 1011-1016.
- 72) Romero J., Ribo G., Ventura F., Caixach J., Moreno P. and Rivera J. (1992) Ames and sister chromatid exchange tests of organic extracts from drinking water, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**, 259-265.
- 73) Filipic M. and Toman M. J. (1996) Ecotoxicological studies using modified Ames bioassay, *Water Science and Technology*, **34**(7/8), 1-7.
- 74) 田中一浩、守田康彦、高橋敬雄 (1993) 新潟県内の水道水・河川水の変異原性について、水環境学会誌、16(9)、657-665.
- 75) Soto M. I. Z. and Martins M. T. (1992) Assessment of mutagenic activity in drinking water

- from Sao Paulo city, Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality : An International Journal*, **7**, 141–155.
- 76) Mcgeorge L. J., Louis J. B., Atherholt T. B. and Mcgerrity G. J. (1985) Mutagenicity analyses of industrial effluents: Results and considerations for integration into water pollution control programs, *Environmental Science Research*, **32**, 247–268.
- 77) Douglas G. R., Nestmann E. R., Mckague A. B., Kamra O. P., Lee E. G.–H., Ellenton J. A., Bell R., Kowbel D., Liu V. and Pooley J. (1983) Mutagenicity of pulp and paper mill effluent : A comprehensive study of complex mixtures, *Environmental Science Research*, **27**, 431–459.
- 78) Filipic M., Lovincic D., Erjavec M., Glavic D. and Planina P. (1995) Toxic and genotoxic activity of water samples from the river Ljubljana, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **55**, 237–244.
- 79) Aso S., Hayashi J., Kusakabe K., Morooka S., Sera N., Horikawa K. and Tokiwa H. (1992) Effect of preozonation on mutagenic activity generated by chlorination of humic acid dissolved in water, *Water Sci. Tech.*, **25**(11), 355–362.
- 80) 山吉孝雄、土井 均、井上嘉高、伊藤 保 (1993) 変異原活性の変動に対するオゾン・粒状活性炭効果、水道協会雑誌、**62**(7)、28–37.
- 81) Mao I. F., Chen M. L., Lan C. F., Chang Y. P. and Chang S. C. (1994) Mutagenicity determination of the wastewater emitted from petrochemical industry in Taiwan, *Water, Air and Soil Pollution*, **76**, 459–466.
- 82) Huck P. M., Anderson W. B., Savage E. A., Von Borstel R. C., Daignault S. A., Rector D. W., Lrvine G. A. and Williams D. T. (1989) Pilot scale evaluation of ozone and other drinking water disinfectants using mutagenicity testing, *Ozone Science & Engineering*, **11**, 245–269.
- 83) 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**(11)、814–821.
- 84) Tuhkanen T. A., Kainulainen T. K., Vartiainen T. K. and Kalliokoski P. J. (1994) The effect of preozonation, ozone / hydrogen peroxide treatment, and nanofiltration on the removal of

- organic matter from drinking water, *Ozone Science & Engineering*, **16**, 367–383.
- 85) Zhou S. W., Xu F. D., Li S. M., Song R. X., Qi S., Zhang Y. and Bao Y. P. (1997) Major origin of mutagenicity of chlorinated drinking water in China : Humic acid or pollutants, *The Science of the Total Environment*, **196**, 191–196.
- 86) Omura M., Inamura T. and Ishinishi N. (1992) Mutagenicity activity of the leachate of municipal solid waste landfill, *Mutation Research*, **298**, 125–129.
- 87) Demarini D. M., Abu-Shakra A., Felton C. F., Patterson K. S. and Shelton M. L. (1995) Mutation spectra in *Salmonella* of chlorinated, chloraminated, or ozonated drinking water extracts : Comparison to MX, *Environment and Molecular Mutagenesis*, **26**, 270–285.
- 88) Rehana Z., Malik A. and Ahmad M. (1995) Mutagenic activity of the Ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj, *Mutation Research*, **343**(2/3), 137–144.
- 89) Rehana Z., Malik A. and Ahmad M. (1996) Genotoxicity of Ganges water at Narora (U. P.), India. *Mutation Research*, **367**(4), 187–193.
- 90) Rao S. S., Burnison B. K., Quinn B. K., Hayes M. A. and Metcalfe C. D. (1995) Assessment of the genotoxic potential of pulp mill effluent using bacterial, fish and mammalian assays. *Chemosphere*, **31**(6), 3553–3566.
- 91) Backlund P., Kronberg L., Pensar G. and Tikkanen L. (1985) Mutagenic activity in humic water and alum flocculated humic water treated with alternative disinfectants, *The Science of the Total Environment*, **47**, 257–267.
- 92) Metcalfe C. D., Nanni M. E. and Scully N. M. (1995) Carcinogenicity and mutagenicity testing of extracts from bleached kraft mill effluent, *Chemosphere*, **30**(6), 1085–1095.
- 93) 鶴川昌弘、中村清一、西村公志、大竹 徹 (1993) 水道水の安全性の評価と制御に関する研究 (第一報) -水道水中に含まれる有機物の安全性について-、衛生化学、**39**(5)、421–439.
- 94) 橋爪 崇、横山 剛、沢田洋介、河合 敦、伊神生雄、神木照雄、木苗直秀、富田 勲 (1985) ポリエチレン多孔質中空糸膜による飲料水中変異原野吸着と吸着変異原の若干の性質、衛生化学、**31**(6)、385–390.

- 95) Ono Y., Somiya I. and Kawaguchi T. (1993) Evaluation of genotoxic potency on substances contained in night soil and its reduction performance by ozonation, *Ozone Water Wastewater Treat*, **1**, S.7.53-S.7.61.
- 96) Wigilius B., Boren H., Carlberg G. E., Grimvall A. and Moller M. (1985) A comparison of methods for concentrating mutagens in drinking water. Recovery aspects and their implications for the chemical character of major unidentified mutagens, *The Sci. Total Environ.*, **47**, 265-272.
- 97) Yasuyoshi Sayato, Katsuhiko Nakamuro and Hitoshi Ueno (1987) Studies on preconcentration methods for detecting the mutagenicity of organics in drinking water, *EISEI KAGAKU*, **33**, 328-336.
- 98) Ross W. D., Hillmam W. J., Wininger M. T., Gridley J., Lee L. F. and Hare R. J. (1981) Aqueous effluent concentration for application to biotest systems, *Environmental Science Research*, **22**, 189-199.
- 99) Nakamuro K., Ueno H. and Sayoto Y. (1992) Evaluation of mutagenicity of municipal river water concentrated using XAD resin column method, *Wat Sci Tach.*, **25**(11), 293-299.
- 100) 大村 実、鯉川寿美子、染谷 孝、稲益建夫、花嶋正孝、石西 伸 (1992) 廃棄物最終処分場の浸出水に含まれる変異原性物質の濃縮方法の比較検討、水環境学会誌、**15**(1)、52-61.
- 101) 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 the Total Environment*, **74**, 177-189.
- 102) Urano K., Haga N. and Emoto F. (1988) Method for evaluating mutagenicity of water II. Conditions for applying new sample preparation method to the Ames test, *The Science of the Total Environment*, **74**, 191-198.
- 103) 浦野紘平、芳賀伸之、江本ふで子 (1987) 水道水等の変異原性試験方法、水道協会雑誌、**57**(3)、36-48.
- 104) 讃岐田 訓 (1987) 塩素処理による変異原性の生成、水、**29**(11)、23-29.
- 105) Guttaman-Bass N., Bairey-Albuquerque M., Ulitzur S., Chartr A. and Bav-Aca C. (1987)

- Effects of chlorine and chlorine dioxide on mutagenic activity lake Kinnereth, *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 252–260.
- 106) Zehra R., Abdul M., Masood A. (1995) Genotoxicity of the Ganges water at Narora (UP.), India, *Mutation Research*, 367, 187–193.
- 107) Zehra R., Abdul M., Masood A. (1995) Mutagenic activity of the ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (UP.), India, *Mutation Research*, 343, 137–144.
- 108) 山吉孝雄、土井 均、井上嘉高、伊藤 保 (1993) 変異原活性の変動に対するオゾン・粒状活性炭処理効果、水道協会雑誌、**62(7)**、28–37.
- 109) 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.
- 110) Kronberg L. and Holmbom B. (1986) Properties of mutagenic compounds form during chlorination of humic–water, org. micropollut, *Aquatic Environ.*, 449– 454.
- 111) Vartinen T. and Limatainen A. (1988) Relations between drinking water mutagenicity and water quality parameters, *Chemosphere*, **17**, 189–202.

第 2 章

Ames変異原性試験の検出限界と 定量限界の統計的解析方法の確立

第2章 Ames 変異原性試験の検出限界と定量限界の統計的解析方法の確立

1. はじめに

第1章で詳しく述べたように、Ames 変異原性試験は、比較的再現性がよく結果の誤差範囲が小さいが、 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ 程度の確率で起こる突然変異を評価するのである一定の誤差範囲をもち、変異原性が弱い検体を試験するときなどには誤差範囲が問題になる。

このため、試験結果を統計的に解析して誤差範囲を明らかにし、得られた結果が陽性に見なせるか否かを検定する方法を提案し、検出限界を求めた検討が数多く報告されている¹⁻⁵⁾。それらの多くは、提案された方法で求めた検出限界と2倍則とを比較している。2倍則とは、検体試験の復帰コロニー数が同時に行った陰性対照試験の復帰コロニー数の2倍以上であった場合に陽性と判断する方法であり、日本を含めた世界各国で最も広く用いられている。これらの検討方法は、2倍則の妥当性を検討する際には有効であったが、日常的な水道水の安全管理を行うためには煩雑すぎるため、試験結果ごとに検定するのではなく、陰性対照値との比、すなわち MR (Mutation ratio, MR) 値で判断できる方法などの簡易な判断方法が開発され、特に水道水の安全性評価に最も広く用いられている TA100 株の試験結果の適切な判断方法が確立されることが望まれる。

Ames 変異原性試験結果を統計的に解析するためには、分布型を仮定して検定するパラメトリック法と仮定しないノンパラメトリック法とがあるが、第1章で述べたようにノンパラメトリック法は差の検定力が弱く、可能な限りパラメトリック法を用いるべきである。パラメトリック法を用いる場合、Ames 変異原性試験を行う際の各用量段階で用いるプレート数が十分に多ければ、各用量段階での復帰コロニー数の平均値および母分散を正確に求めることができるので、検体の試験結果と陰性対照値と間に有意差があるかを検定することによって、試験結果が陽性か否かを判断できる。しかし通常は、各用量段階で2または3枚の少数のプレートしか用いないので、平均値および母分散を正確に求めることができない。そこで本章では、蓄積された大量の Ames 変異原性試験結果を、代表的なパラメトリック法の一つである2標本 t 検定を用いて解析することによって、各用量段階で2枚以上のプレートを用いた場合の定量限界を

MR 値として求めるための解析方法を検討し、毎回統計処理を行うことなく試験結果が陽性に見なせるか否かを判断するための方法を確立した。

一方、Ames 変異原性試験の定量限界および得られた変異原性の信頼限界に関する研究はほとんどない。Ames 変異原性試験の試験結果が大きな誤差範囲をもつため、検体の変異原性を議論する際には、定量限界以上の結果で議論する必要がある。また、変異原性の信頼限界を明確にすることも重要である。

検体の変異原性は、用量作用関係の回帰直線の勾配から算出される。各用量作用試験で用いるプレート数が十分に多ければ、勾配の母標準誤差を正確に求めることができるので、検体の変異原活性値の信頼限界を正確に求めることができる。しかし、各用量作用試験で用いる通常のプレート数は、多い場合でも 5 段階の用量段階でそれぞれ 3 枚ずつ、すなわち 15 枚程度であり、十分に正確な標準誤差を求められない。そこで本章では、検出限界の解析方法に加え、蓄積された大量の用量作用試験の結果を解析することによって定量限界および変異原性の 95% 信頼限界を求めるための解析方法を確立した。本方法を用いると、毎回定まった用量段階で試験する場合には、蓄積された試験結果を用いて一度定量限界および変異原性の信頼限界を求めておけば、毎回統計処理を行うことなくそれらを判断することができる。

さらに、水道水、塩素処理された河川水および排水の変異原性を、水道水の安全性評価に最も広く用いられている TA100-S9 の試験条件で試験した 60 回の Ames 変異原性試験結果を例に取り、検出限界、定量限界、信頼限界を実際に求めた。

2. Ames 変異原性試験

Ames 変異原性試験は、労働省のガイドブック⁶⁾を基にしたプレインキュベーション法で行った。菌株は、国立公衆衛生院から提供を受けた TA100 株を用いた。これを、Difco Laboratories 社のニュートリエントブロスを用いて 37℃で 9±1 時間前培養し、菌懸濁液を得た。菌懸濁液 100 μ l に、リン酸緩衝液 500 μ l とジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒とした検体液 100 μ l とを加えて 37℃で 20 分間プレインキュベーションした後に、ソフトアガー 2ml を加えてよく混合し、Difco Laboratories 社の Bacto Agar を用いて予め作成しておいたプレート上に添加した。その際、用量作用関係を確認するため、検液の用量が 2 分の 1 になるように 50 μ l \cdot plate⁻¹ の検液と等体積の DMSO を添加した試験も同時に行った。添加後、37℃で 48 時間培養して復帰コロニーを形成させ、オリンパス社製コロニーカウンター OL-502A を用いて計数した。

すべての試験において、プレート上に植菌した菌体数、菌体の活性、プレートの含水率、ヒスチジンおよびビオチンの濃度を一定に保った。同一の用量段階でそれぞれ 2 枚のプレートを用いたが、DMSO のみを用いた陰性対照試験は 4 枚のプレートを用いて行った。また、陽性対照物質である 4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO) の DMSO 溶液を用いた陽性対照試験を毎回行い、菌体の活性を確認した。

3. 結果と考察

3. 1 解析方法の確立

3. 1. 1 検出限界の解析方法

確立した解析方法を Fig. 2-1 に示す。すなわち、合計 l 回行った Ames 変異原性試験の結果について、まず、 i 回目の Ames 変異原性試験における陰性対照値を、陰性対照試験に用いた 2 または 4 プレーットの復帰コロニー数の平均値 \bar{x}_{Si} ($i = 1, 2, 3, \dots, l$) として算出する。次に、 i 回目の Ames 変異原性試験において合計 m 回行った陰性対照試験以外の試験（検体試験）に用いた 2 プレーットの復帰コロニー数の平均値 $\bar{x}_{Di,j}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; j = 1, 2, 3, \dots, m$) を求める。また、 \bar{x}_{Si} と $\bar{x}_{Di,j}$ との組み合わせ（データセット）について、それぞれ MR 値 $MR_{i,j}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; j = 1, 2, 3, \dots, m$) を Eq. 2-1 より求める。なお、 $MR_{i,j}$ が 0.95 以下の場合には陽性とは考えられないし、2.05 より大きい場合には明らかに陽性と考えられるので、 $MR_{i,j}$ が 0.95 より大きく 2.05 未満のデータセットについて解析することとした。

$$MR_{i,j} = \frac{\bar{x}_{Di,j}}{\bar{x}_{Si}} \quad i = 1, 2, 3, \dots, l; j = 1, 2, 3, \dots, m \quad (2-1)$$

\bar{x}_{Si} と $\bar{x}_{Di,j}$ との有意差を、Eq. 2-2 に示した 2 標本 t 検定を用いて、有意水準 0.05 で検定する。

$$t_{i,j} = \frac{\bar{x}_{Di,j} - \bar{x}_{Si}}{\sqrt{\frac{s_{Si}^2(n_S - 1) + s_{Di,j}^2(n_D - 1)}{n_S + n_D - 2} \sqrt{\frac{1}{n_S} + \frac{1}{n_D}}}} \quad i = 1, 2, 3, \dots, l; j = 1, 2, 3, \dots, m \quad (2-2)$$

ここで、 t は統計量、 s_{Si}^2 は陰性対照 2 または 4 プレーットの復帰コロニー数の標本分散、 $s_{Di,j}^2$ は検体試験に用いた 2 プレーットの復帰コロニー数の標本分散、 n_S は陰性対照試験における繰返し数（プレート数）、 n_D は検体試験における繰返し数（プレート数）であり、自由度は $n_S + n_D - 2$ である。2 標本 t 検定を行う際は、検定される母集団の分散が等しくなければならないが、本章では検定に用いるユニット数（ \bar{x}_{Si} と $\bar{x}_{Di,j}$ を求めた合計プレート数）が 4 または 6 と非常に少ないので、たとえ x_{Si} と $x_{Di,j}$ の分散に多少の差があっても有意な差とは考えにくい。したがって、2 標本間の等分散性は保たれていると考えることができる。また、 $\bar{x}_{Di,j}$ が常に \bar{x}_{Si} 以上なので両側確率で検定する必

要がなく、片側確率で検定することとした。検定により、 \bar{x}_{Si} と $\bar{x}_{Di,j}$ の間に有意水準 0.05 で有意差が認められた場合に、陽性と判断した。

検定した全てのデータセットを、 MR_{ij} の大きさにより、Table 2-1 のように設定した 0.1 間隔の MR レベルに分類する。MR レベルごとに、陽性と判断されたデータセット数 Np と判断されなかったデータセット数 Nn とを求め、全データセット数 $Np + Nn$ に対する陽性と判断されたデータセット数の割合（陽性率） Rp を Eq. 2-3 により求める。 Rp が 0.95 以上になる MR 値を検出限界とする。

$$Rp = \frac{Np}{Np + Nn} \quad (2-3)$$

3. 1. 2 信頼限界および定量限界の解析方法

確立した解析方法を Fig. 2-2 に示す。すなわち、合計 l 回行った Ames 変異原性試験の結果について、 i 回目の Ames 変異原性試験での陰性対照値を、陰性対照試験に用いた 2 または 4 プレーットの復帰コロニー数の平均値 \bar{x}_{Si} ($i = 1, 2, 3, \dots, l$) として算出する。また、 k 組目の用量作用試験においての最大用量における 2 プレーットの復帰コロニー数の平均値 $\bar{x}_{Di,k}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p$) を求め、Eq. 2-4 より MR 値 $MR_{i,k}$ を求める。

$$MR_{i,k} = \frac{\bar{x}_{Di,k}}{\bar{x}_{Si}} \quad i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p \quad (2-4)$$

k 組目の用量作用試験の回帰直線（用量作用直線）の勾配 $a_{i,k}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p$) を最小二乗法により求め、その標準誤差 $sa_{i,k}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p$) を Eq. 2-5 により求める。

$$sa_{i,k} = \frac{\sqrt{\frac{Syy - a_{i,k} \times Sxy}{n_R - 2}}}{\sqrt{Sxx}} \quad i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p \quad (2-5)$$

ここで、 Syy は復帰コロニー数の偏差平方和、 Sxx は検体添加量の偏差平方和、 Sxy は偏差積和、 n_R は用量作用試験に用いられた全プレート数、自由度は $n_R - 2$ である。 $a_{i,k}$ の変動幅 $w_{i,k}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p$) を Eq. 2-6 の様に定義した。

$$w_{i,k} = t_{0.32} \times sa_{i,k} \quad i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p \quad (2-6)$$

ここで $t_{0.32}$ は、自由度 n_R-2 および有意水準 0.32 における統計量である。有意水準を 0.32 としたのは、「平均値±標準偏差」が平均値の 68%信頼区間に対応するためである。このため、用量作用関係から求めた回帰直線の勾配の 68%信頼区間は、 $a_{i,k} \pm t_{0.32} \times sa_{i,k}$ となる。これは、 $a_{i,k}$ の変動率 $w_{i,k}/a_{i,k}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p$) を用いることにより、 $a_{i,k} \pm w_{i,k}/a_{i,k} \times a_{i,k}$ となる。

求めた全ての $w_{i,k}/a_{i,k}$ を、 $MR_{i,k}$ の大きさにより、予め設定した設定した MR レンジに分類する。それぞれの MR レンジは、 $w_{i,k}/a_{i,k}$ の最大変動率 $(w_{i,k}/a_{i,k})_{\max}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p$) が正確に求められるように、各レンジに分類される $w_{i,k}/a_{i,k}$ の数が 48 個以上になるように設定する。同一の MR レンジに分類された $w_{i,k}/a_{i,k}$ を一つの母集団と見なし、その分布型が正規分布となるように $w_{i,k}/a_{i,k}$ の値を変換する。変換関数は、変換前の値の分布型から経験的に選定する⁷⁾。また、その関数の変数は、試行錯誤方により求める⁷⁾。

変換された $w_{i,k}/a_{i,k}$ の 90%信頼区間を、MR レンジごとに Eq. 2-7 により求める。

$$w_{i,k}/a_{i,k} = \delta \pm z \times st \quad i = 1, 2, 3, \dots, l; k = 1, 2, 3, \dots, p \quad (2-7)$$

ここで、 δ は変換された $w_{i,k}/a_{i,k}$ の平均値、 st は変換された $w_{i,k}/a_{i,k}$ の母標準偏差、 z は標準正規変数である。 z 値は、90%信頼区間を算出できるように 1.64 とした。大小 2 つの信頼限界が算出されるが、値の小さな方、すなわち $\delta - 1.64st$ は正確な $a_{i,k}$ を与えるので、値の大きな方、すなわち $\delta + 1.64st$ のみに着目した。 $\delta + 1.64st$ のみに着目することにより、 $w_{i,k}/a_{i,k}$ の 95%を包括できる最大変動率 $(w_{i,k}/a_{i,k})_{\max}$ を求めることができる。すなわち、Ames 変異原性試験により求められた変異原性の値の 68%信頼区間は $a_{i,k} \pm w_{i,k}$ であり、 $w_{i,k}$ の 95%信頼限界は $(w_{i,k}/a_{i,k})_{\max} \times a_{i,k}$ である。このようにして求めた $(w_{i,k}/a_{i,k})_{\max}$ が十分に小さくなる MR レンジの中央値を定量限界とした。

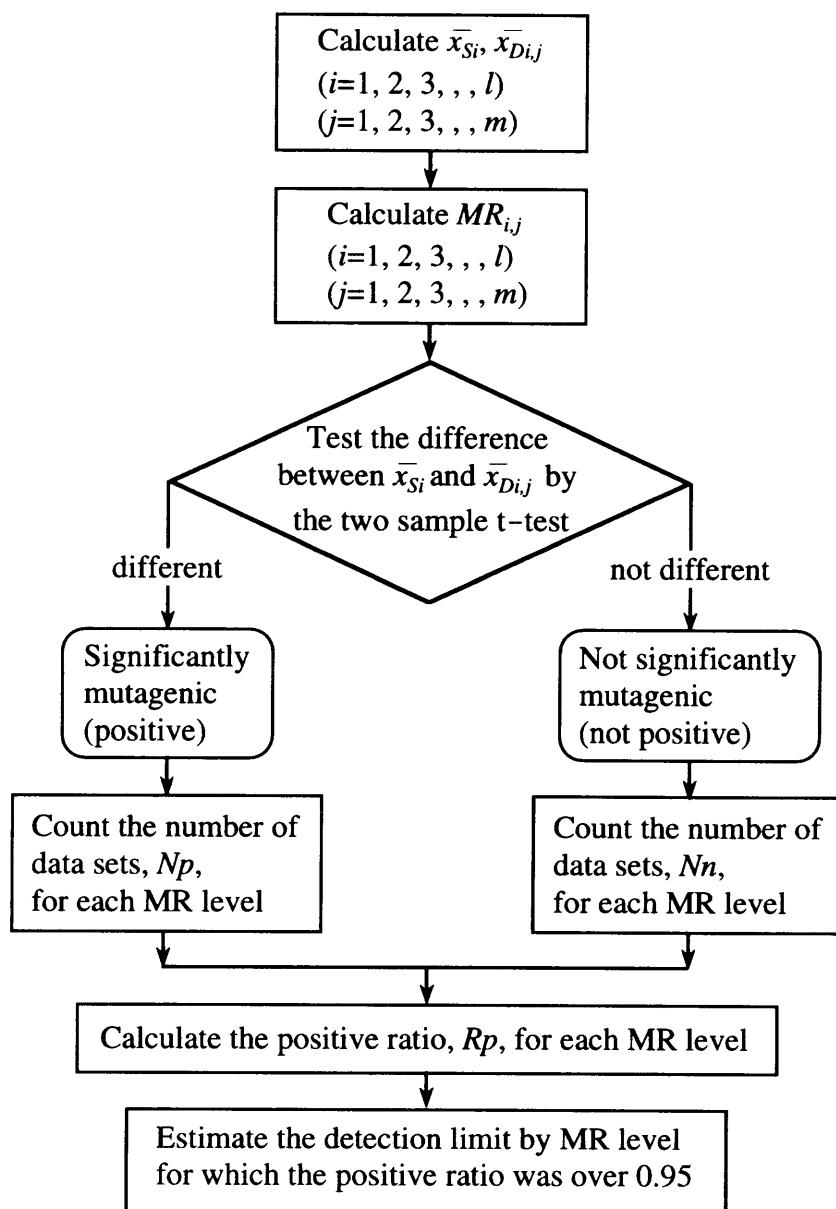


Fig. 2-1. Procedure for estimating detection limit.

Table 2-1
MR levels defined for estimating detection limit

MR level	Range of MR_{ij}
1.0	$0.95 \leq MR_{ij} < 1.05$
1.1	$1.05 \leq MR_{ij} < 1.15$
1.2	$1.15 \leq MR_{ij} < 1.25$
1.3	$1.25 \leq MR_{ij} < 1.35$
1.4	$1.35 \leq MR_{ij} < 1.45$
1.5	$1.45 \leq MR_{ij} < 1.55$
1.6	$1.55 \leq MR_{ij} < 1.65$
1.7	$1.65 \leq MR_{ij} < 1.75$
1.8	$1.75 \leq MR_{ij} < 1.85$
1.9	$1.85 \leq MR_{ij} < 1.95$
2.0	$1.95 \leq MR_{ij} < 2.05$

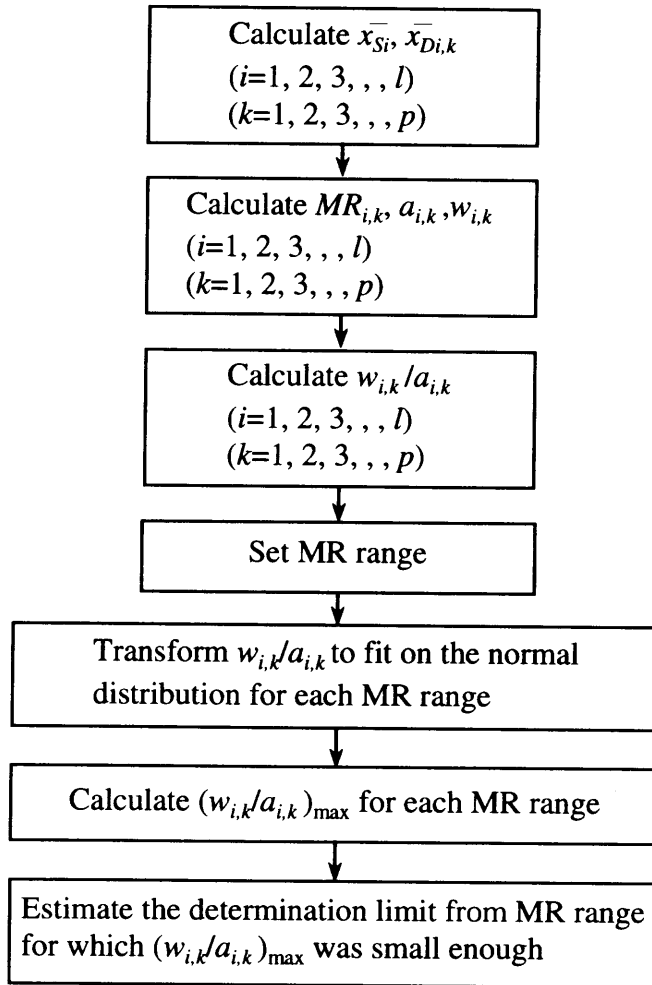


Fig. 2-2. Procedure for estimating determination limit.

3. 2 データの信頼性と分布型

解析に用いた Ames 変異原性試験結果は、横浜国立大学で 1 年間以上訓練された実験者 A、B が 1990～1995 年に行った試験結果である。実験者 A が同一の検体について 45 枚のプレートを用いて行った試験結果の分散と、同様にして他機関で 50 枚のプレートを用いて行った試験結果⁹⁾の分散とを比較して Table 2-2 に示す。両者の分散に大きな差はなく、他の研究機関と同等の再現性が得られる試験が行われていることが確認された。

実験者 A は合計 37 回 ($l = 37$)、実験者 B は合計 23 回 ($l = 23$) の Ames 変異原性試験を行い、得られた結果をすべて解析に用いた。すべての試験を通して、陰性対照値は 101 から 162 rev. · plate⁻¹、比活性は 8,900 から 11,000 net rev. · (ug-4NQO)⁻¹ の範囲であり、菌体の活性は安定していた。得られた用量作用直線は、Fig. 2-3 に例を示すようにすべて直線性が良く、回帰直線の勾配から変異原性を算出するのに問題はなかった。以上のことから、本章で用いた試験結果は十分な信頼性を有すると考えられる。

次に、同一の検体を Ames 変異原性試験により試験した結果の分布型を検討するために、45 枚または 47 枚のプレートを用いて実験者 A が三種類の検体の試験を行い、3 つの母集団を得た。得られた母集団の復帰コロニー数の平均値は、それぞれ 127、347、591 rev. · plate⁻¹ であった。それぞれの母集団の分布型を正規分布と見なせるか否かを、 χ^2 検定を用いて有意水準 0.05 で検定して検討した。その結果、Table 2-3 に示すようにすべての母集団において $\chi^2 < \chi_{\alpha}^2$ であり、正規分布と見なせないことが否定された。このため、母集団が正規分布に従うことを仮定した 2 標本 t 検定による解析が可能であることが明らかになった。

Ames 変異原性試験で同一の検体を試験した結果の分布型は、第 1 章で詳細に述べたように、二項分布に従うという報告⁸⁾やポアソン分布に従うという報告^{9, 10)}、ポアソン分布に従わないという報告¹¹⁻¹⁵⁾などがあり、結論に至っていない。Ames 変異原性試験は、プレート上に植菌された約 10^8 個の菌体のうちの 5×10^0 から 5×10^2 個程度の菌体のみを突然変異させる試験であり、このように確率が非常に低い事象の典型的な分布型であるポアソン分布を Ames 変異原性試験結果の分布型として仮定するのは妥当である。しかし、ポアソン分布は母集団の平均値が大きくなると正規分布とほぼ同型に

なるので、本章の TA100 株を用いた結果のように、通常陰性対照値が $100 \text{ rev.} \cdot \text{plate}^{-1}$ 以上の場合は、より解析が容易な正規分布として取り扱うことができると考えられる。

Table 2-2

Reproducibility of the Ames assay results by the student A and a reference

Student	Mean [rev. · plate ⁻¹]	Variance [rev. · plate ⁻¹]	Number of recurrence [plate]
Student A ^{a)}	127	117	45
Hamada et al. ^{b)}	141	128	50

a) The present study

b) Hamada et al., 1994

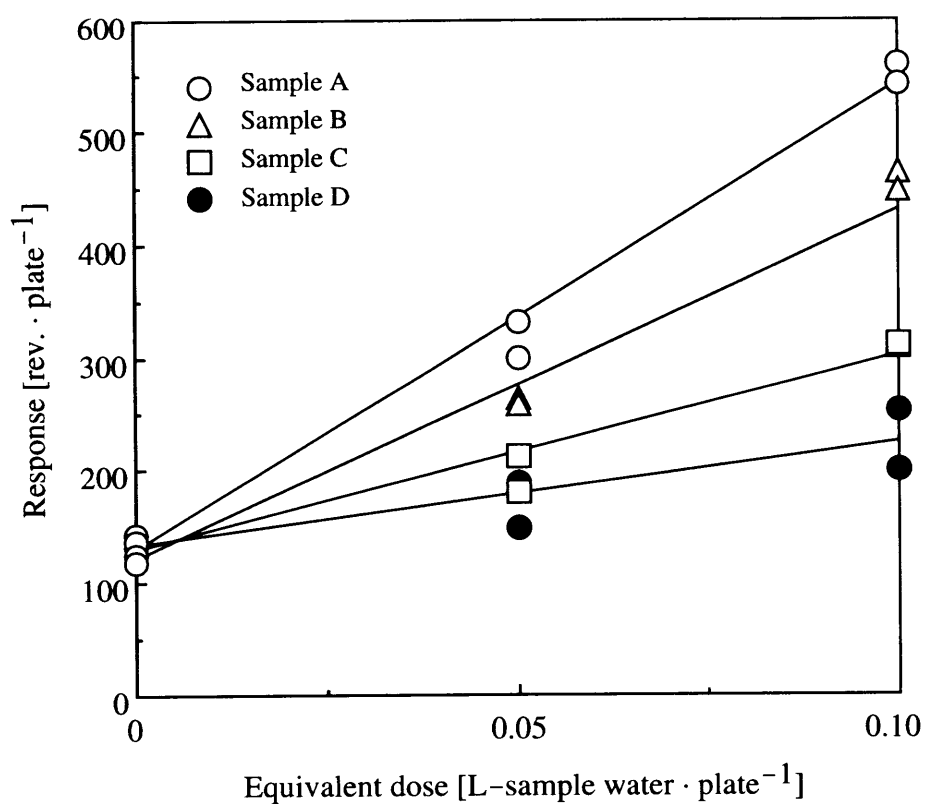


Fig. 2-3. Examples of dose-response line.

Table 2-3
Fitness of the Ames assay results for the normal distribution

Mean revertant colonies [rev. · plate ⁻¹]	χ^2	Number of recurrence [plate]
127	3.59	45
347	4.56	47
591	3.59	47

Contingency number is 5 and χ_{α}^2 is 5.99.

3. 3 検出限界の解析

3. 3. 1 陰性対照試験に2枚のプレートを用いた場合の検出限界

陰性対照試験に2枚のプレートを用いた場合の検出限界を実験者 A の試験結果を用いて検討した。陰性対照試験は4枚のプレートを用いて行ったが、4枚の結果から2枚分の結果のみを無作為に抽出して解析に用いた。実験者 A の試験結果のうち、 MR_{ij} が 0.95 から 2.05 の範囲内のデータセットは 2419 セットであり、そのすべてを解析に用いた。

Np 、 Nn および両者の合計数 $Np+Nn$ を求め、MR レベルごとに Fig. 2-4 に示す。各 MR レベルで 120 から 301 個のデータセットがあり、十分に正確な Rp を求められると考えられる。MR レベルが同じでも陽性と判断されたデータセットと判断されなかったデータセットがあった。MR レベルが 1.5 以下では、MR レベルが大きくなるにつれて Nn が減少し Np が増加したが、MR レベルが 1.6 以上では $Np+Nn$ が減少したために Np も減少した。そこで、MR レベルごとに Rp を算出し、Fig. 2-5 に示す。MR レベルが 1.6 では 94.7% のデータセットが陽性と判断され、MR レベルが 1.7 以上では 95% 以上のデータセットが陽性と判断された。このため、陰性対照試験に2枚のプレートを用い、TA100 株を用いて行った実験者 A の試験結果に対しては、検出限界を MR 値で 1.7 と判断できた。

前述のように、Ames 変異原性試験の検出限界を MR 値で 2 とする 2 倍則が広く用いられているが、TA100 株を用いた試験結果に対して 2 倍則を適用すると、陽性の結果を陰性と判断する確率が高いとの報告^{3, 5)}がある。本章でも、陰性対照試験に2枚のプレートを用いた場合の検出限界について、同様の結論が得られた。ただし TA98 株等の陰性対照値の小さい菌株を用いた試験結果に対しては、検出限界は 1.7 より大きくなると考えられる。

3. 3. 2 陰性対照試験に用いるプレート数を4枚にすることの効果

陰性対照試験に4枚のプレートを用いた場合の検出限界を実験者 A の試験結果を用いて同様に検討した。実験者 A の試験結果のうち、 MR_{ij} が 0.95 から 2.05 の範囲内のデータセットは 2491 セットであり、そのすべてを解析に用いた。

Np 、 Nn および $Np+Nn$ を求め、MR レベルごとに Fig. 2-6 に示す。各 MR レベルで 119 から 311 個のデータセットがあり、十分に正確な Rp を求められると考えられる。陰性対照試験に 2 枚のプレートを用いた場合と同様に、MR レベルが大きくなるにつれて Nn が減少し、 Np が増加したが、2 枚のプレートを用いた場合と比較して明らかに急激に Nn が減少し、 Np が増加した。MR レベルごとに Rp を算出して Fig. 2-7 に示したところ、MR レベルが 1.3 では 94.9% のデータセットが陽性と判断され、1.4 以上では 95% 以上のデータセットが陽性と判断された。このため、陰性対照試験に 4 枚のプレートを用い、TA100 株を用いて行った実験者 A の試験結果に対しては、検出限界を MR 値で 1.4 と判断できた。陰性対照試験に 2 枚のプレートを用いた場合と比較して検出限界が 0.82 倍になったことから、陰性対照試験に用いるプレート数を 2 枚から 4 枚に増やすことは Ames 変異原性試験を高感度化するのに有効であり、非常に簡易で優れた方法であることが明らかになった。検出限界が低くなったのは、母集団の平均値と分散を算出するためのユニット数（プレートの枚数）が増えたために、差の検出力が強くなったためと考えられる。検出限界が MR 値で 1.4 であれば十分に低く、陰性対照試験に用いるプレート数をさらに増やす必要はないと判断した。ただし、TA98 株等の陰性対照値の小さい菌株を用いる試験で、検出限界を TA100 株のそれと同程度に低くするために、陰性対照試験に用いるプレート数をさらに増やす必要があると考えられる。

3. 3. 3 検出限界の個人差

実験者 B の試験結果を用いて、陰性対照試験に 4 枚のプレートを用いた場合の検出限界を同様にして求めた。実験者 B の試験結果のうち、 MR_{ij} が 0.95 から 2.05 の範囲内のデータセットは 1238 セットであり、そのすべてを解析に用いた。

Np 、 Nn および $Np+Nn$ を求め、MR レベルごとに Fig. 2-8 に示す。各 MR レベルで 74 から 140 個のデータセットがあり、十分に正確な Rp を求められると考えられる。MR レベルごとに Rp を算出して Fig. 2-9 に示したところ、MR レベルが 1.4 以上では 95% 以上のデータセットが陽性と判断され、実験者 A の試験結果の場合と同じ検出限界が得られた。これは、実験者 A と B の熟練度に差がないことを示していると考えられる。

そこで、両者の試験結果について、Eq. 2-4 から Eq. 2-7 を用いて用量作用直線の勾配の変動率 $w_{i,k}/a_{i,k}$ を求め、 $MR_{i,k}$ との関係を図 2-10 に示す。 $MR_{i,k}$ と $w_{i,k}/a_{i,k}$ との関係は実験者間でよく一致し、両者の熟練度には差がないことが確認された。

両者の間で検出限界の個人差が無視できたことから、Table 2-2 に示した分散と同程度の分散となる試験結果が得られる実験者の検出限界には個人差がほとんどなく、本章で例を示した検出限界と同程度になると考えられる。ただし、正確な検出限界は実験者ごとに求める必要がある。また、実験者の熟練度が同じであっても、陰性対照値が 101 から 162 rev. \cdot plate⁻¹ の範囲から大きく逸脱している場合には、検出限界も異なると考えられる。

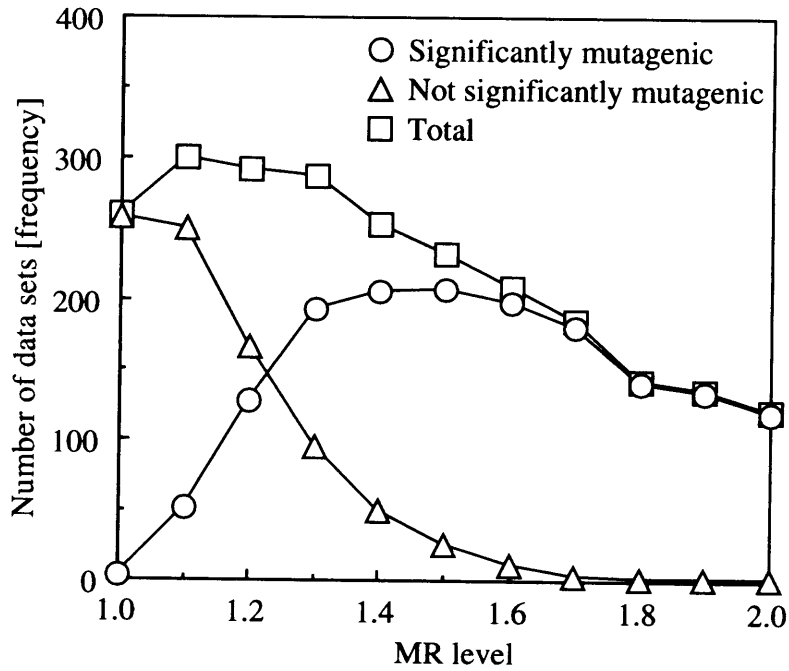


Fig. 2-4. Behavior of the number of data sets toward MR level (Experimenter : A, Negative control test : duplicate plates).

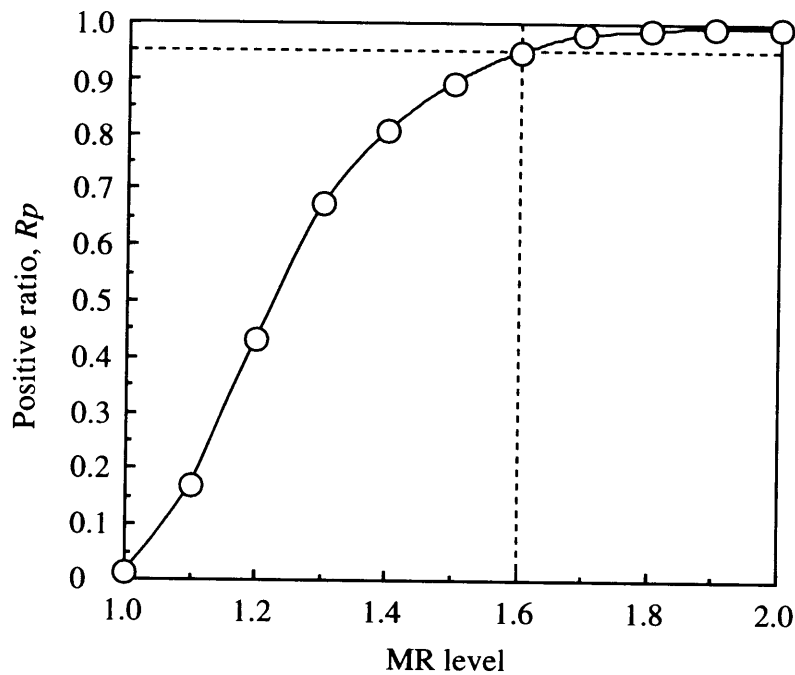


Fig. 2-5. Estimation of detection limit by positive ratio (Experimenter : A, Negative control test : duplicate plates).

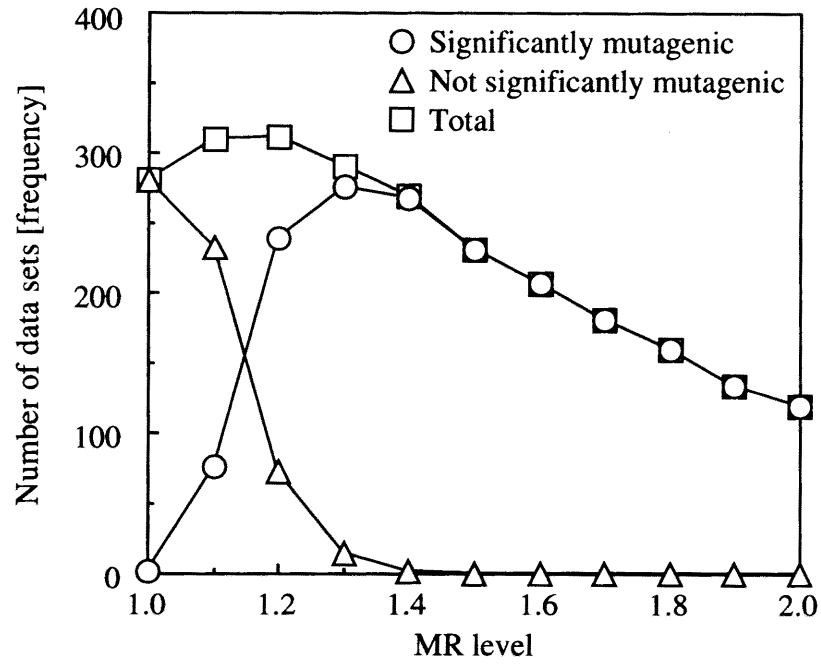


Fig. 2-6. Behavior of the number of data sets toward MR level (Experimenter : A, Negative control test : quadruple plates).

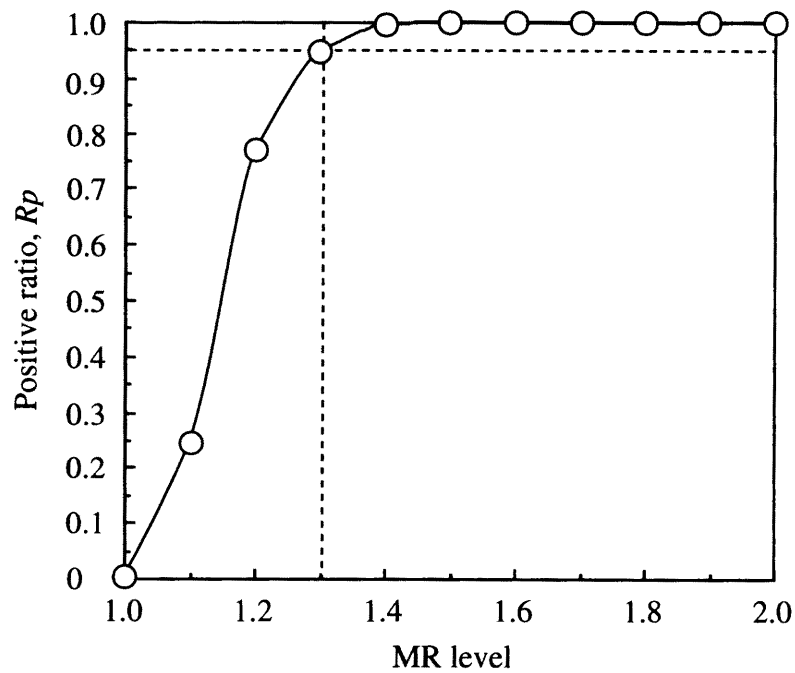


Fig. 2-7. Estimation of detection limit by positive ratio (Experimenter : A, Negative control test : quadruple plates).

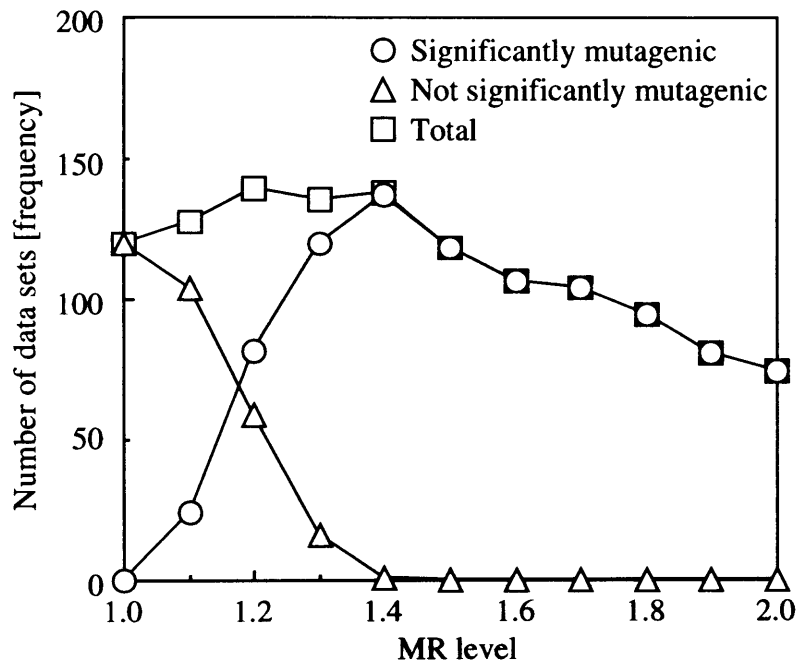


Fig. 2-8. Behavior of the number of data sets toward MR level (Experimenter : B, Negative control test : quadruple plates).

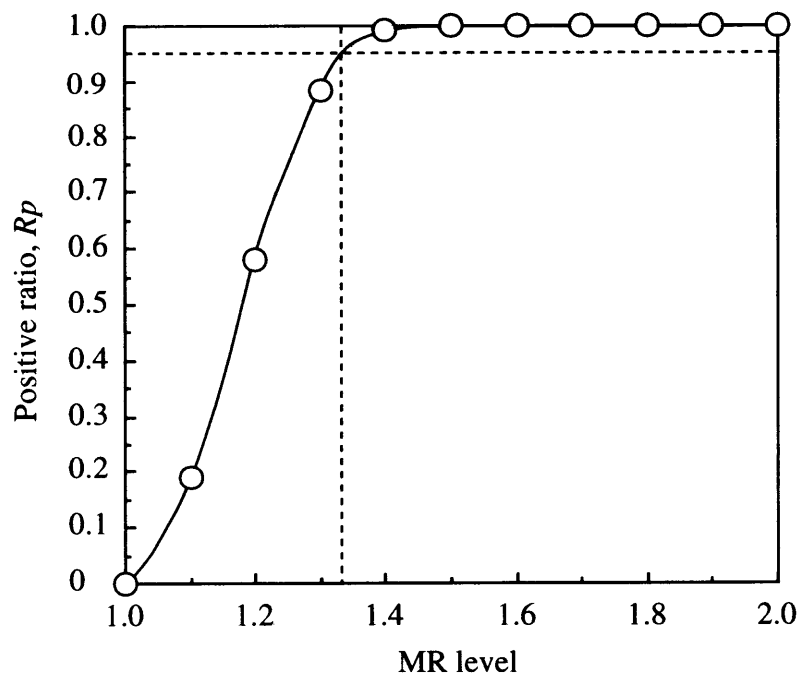


Fig. 2-9. Behavior of positive ratio toward MR level (Experimenter : B, Negative control test : quadruple plates).

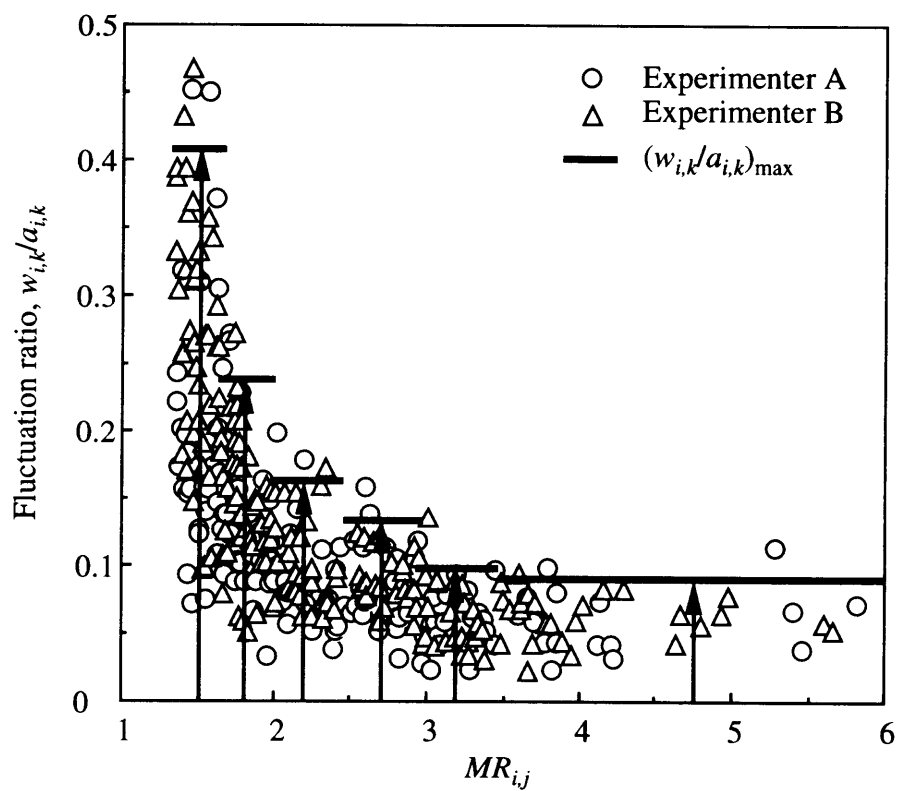


Fig. 2-10. Behavior of fluctuation ratio of sample regression slope of dose-response line obtained by Experimenters A and B toward $MR_{i,j}$.

3. 4 信頼限界および定量限界

用量作用試験の実験条件を、Fig. 2-3 に例を示すように設定した場合、すなわち以下のように設定した場合の信頼限界および定量限界を求めた。

- 1) 陰性対照試験に4枚のプレートを用いる
- 2) 陰性対照段階を含めて3段階の用量段階を設定して用量作用試験を行う
- 3) 用量段階を等間隔（公差一定）に設定する
- 4) それぞれの検体試験で2枚のプレートを用いる

実験者 A と B の熟練度の個人差が無視できたので、両者ともに最近5回の Ames 変異原性試験結果を統合して一つの母集団と見なし、解析した。母集団の用量作用直線の本数は361本、すなわち Eq. 2-4 から Eq. 2-7 における p 値は361であった。

Fig. 2-10 に示したように、 $w_{i,k}/a_{i,k}$ は $MR_{i,k}$ が増加するに従って明らかに減少し、MR 値が大きい試験結果ほど定量性がよいことが確認された。信頼限界 $(w_{i,k}/a_{i,k})_{\max}$ を求めるために、Table 2-4 に示すように MR レンジを設定し、MR レンジごとに異なった関数で $w_{i,k}/a_{i,k}$ をべき乗変換して $w_{i,k}/a_{i,k}$ の分布型が各 MR レンジ内で正規分布と見なせるようにした。この際、厳密には同一の変換関数で変換するべきであるが、Table 2-4 に示す変換関数で変換した $w_{i,k}/a_{i,k}$ が各 MR レンジ内で正規分布に従うと見なせるか否かを χ^2 検定を用いて検定した結果、Table 2-5 に示すようにすべての MR レンジにおいて χ^2 が χ^2_{α} より小さくなり、正規分布に従うと見なせることが確認されたため、Table 2-4 に示す変換関数で変換して解析することとした。

変換後の $w_{i,k}/a_{i,k}$ の信頼限界を MR レンジごとに求め、Table 2-6 および Fig. 2-10 に示す。MR レンジが高くなるに従って信頼限界が低くなり、定量性が向上することが確認された。1.7 から 1.9 の範囲の MR レンジ以下では MR レンジが高くなるに従って信頼限界が急激に小さくなるが、2.0 から 2.4 の範囲の MR レンジ以上では信頼限界の減少の程度が小さくなり、定量性の著しい向上は認められなかった。このため、2.0 から 2.4 の範囲の MR レンジの中央値である MR 値 2.2 を定量限界とした。

用量作用試験の用量段階数を増やしたり、各用量段階で用いるプレート数を増やすことによって、信頼限界および定量限界を低くすることはできると考えられるが、そのためには手間と時間を必要とするので、これ以上用量段階数を増やしたり、各用量

段階で用いるプレート数を増やす必要はないと判断した。また、多くの実験結果の $w_{i,k}/a_{i,k}$ が Table 2-6 および Fig. 2-10 に示した値より大きくなる場合は、何らかの実験ミスや試験操作の熟練不足が予想される。

Table 2-4

MR ranges and power transformation functions defined for estimating determination limit

MR range	Range of MR_{ij}	Number of $w_{i,k}/a_{i,k}$ [frequency]	Function
1.4 - 1.6	$1.35 \leq MR_{ij} < 1.65$	73	$\sqrt{x+5}$
1.7 - 1.9	$1.65 \leq MR_{ij} < 1.95$	68	$\sqrt{x-3}$
2.0 - 2.4	$1.95 \leq MR_{ij} < 2.45$	72	$\sqrt{x-3}$
2.5 - 2.9	$2.45 \leq MR_{ij} < 2.95$	48	$\sqrt{x-3}$
3.0 - 3.4	$2.95 \leq MR_{ij} < 3.45$	48	$\sqrt{x+1}$
3.5 - 6.0	$3.45 \leq MR_{ij} < 6.05$	52	$\sqrt{x+30}$

Table 2-5

Fitness of transformed $w_{i,k}/a_{i,k}$ on the normal distribution

MR range	χ^2
1.4 - 1.6	2.70
1.7 - 1.9	0.20
2.0 - 2.4	3.16
2.5 - 2.9	4.05
3.0 - 3.4	2.65
3.5 - 6.0	0.74

Contingency number is 6 and χ_{α}^2 is 7.82.

Table 2-6

Estimation of determination limit by maximum fluctuation ratio

MR range	$(w_{i,k}/a_{i,k})_{\max}$
1.4 - 1.6	0.41
1.7 - 1.9	0.24
2.0 - 2.4	0.17
2.5 - 2.9	0.14
3.0 - 3.4	0.10
3.5 - 6.0	0.092

4. 本章のまとめ

本章では、Ames 変異原性試験の検出限界と定量限界、変異原性の信頼限界を統計的に求める方法を確立し、Fig. 2-1 および Fig. 2-2 に示した。本章で確立した検出限界、定量限界、信頼限界の統計的解析方法は、以下のような特徴を有する。

- 1) 検出限界、定量限界、信頼限界を MR 値で評価できる
- 2) 用量作用試験における陰性対照段階および用量段階で使用するプレートが 2 枚以上の少数でよい。
- 3) 定量限界、信頼限界を求める際、陰性対照段階を含めて 3 段階以上の少数の用量段階を設定すればよい。
- 4) 求められた検出限界が用量段階の設定条件の影響を受けない。
- 5) 求められた検出限界、信頼限界、定量限界が陰性対照値の影響を受けない。
- 6) 求められた検出限界、信頼限界、定量限界が菌株の Lot が変わっても影響を受けない。

これらの特徴をすべて有する方法の報告例はなく、従来の方法と比較して本法が適用範囲が広く、また、簡易であり、日常的な水道水の安全管理を行うのに適している。

さらに、水道水などの塩素処理された試料水から強い変異原性が検出される条件である TA100-S9 を例にとり、過去 60 回の Ames 変異原性試験結果のデータを用いて検出限界、信頼限界、定量限界を実際に求め、以下の結論を得た。

- 1) TA100 株を用いた場合、同一サンプルについて反復試験した Ames 変異原性試験結果の分布型は、解析が容易な正規分布として取り扱うことができる。
- 2) 陰性対照試験に 2 枚のプレートを用いた場合の検出限界は、MR 値で 1.7 と判断できた。このため、広く用いられている 2 倍則を TA100 株を用いた試験結果に適用するのは不適切と考えられる。
- 3) 陰性対照試験に 4 枚のプレートを用いた場合の検出限界は、MR 値で 1.4 と判断できた。通常の試験より 2 枚多い 4 枚のプレートを用いることにより、Ames 変異原性試験を非常に簡易に高感度化できることが明らかになった。
- 4) Table 2-2 に示した分散と同程度の分散となる試験結果が得られる実験者の検出限

界は、本章で例を示した検出限界と同程度になると考えられる。ただし、陰性対照値が 101 から $162 \text{ rev.} \cdot \text{plate}^{-1}$ の範囲から大きく逸脱している場合には、検出限界も異なると考えられる。

5) 用量作用試験の実験条件を以下のように設定した場合の信頼限界および定量限界を求めた。

- a) 陰性対照試験に 4 枚のプレートを用いる。
- b) 陰性対照段階を含めて 3 段階の用量段階を設定して用量作用試験を行う。
- c) 用量段階を等間隔（公差一定）に設定する。
- d) それぞれの検体試験で 2 枚のプレートを用いる。

信頼限界は試験結果の MR 値に依存し、MR レベルごとに Table 2-6 に示した値が得られた。定量限界は、定量性の著しい向上が認められなくなる MR 値である 2.2 と判断された。

本章で用いた記号

単位

a	: 用量作用直線の勾配	[rev. · dose ⁻¹]
MR	: MR 値	[-]
n	: プレーットの枚数	[plate]
Nn	: 陽性と判断されなかったデータセット数	[data set]
Np	: 陽性と判断されたデータセット数	[data set]
Rp	: 陽性率	[-]
s	: 母標準偏差	[rev. · plate ⁻¹]
sa	: 用量作用直線の勾配 (a) の標準誤差	[rev. · dose ⁻¹]
st	: べき乗変換された $w_{i,k}/a_{i,k}$ の母標準偏差	[-]
t	: 統計量	[-]
w	: 用量作用直線の勾配 (a) の変動幅	[rev. · dose ⁻¹]
\bar{x}	: プレーットあたりの復帰コロニー数の平均値	[rev. · plate ⁻¹]
z	: 標準正規変数	[-]
δ	: べき乗変換された $w_{i,k}/a_{i,k}$ の母回帰係数の平均値	[-]
k	: 分割数	[-]
χ^2	: 統計量	[-]

添字

D	: 検体試験
i	: i 番目の Ames 変異原性試験
j	: j 組目の検体試験
k	: k 番目の用量作用試験
R	: 用量作用試験
S	: 陰性対照試験

本章の引用文献

- 1) Weinstein D. and Lewinson. T. M. (1978) A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay, *Mutation Research*, **51**, 433-434.
- 2) Chu K. C., Patel K. M., Lin A. H., Tarone R. E., Linhart M. S. and Dunkel V. C. (1981) Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays, *Mutation Research*, **85**, 119-132.
- 3) Snee R. D. and Irr J. D. (1984) A procedure for the statistical evaluation of Ames *Salmonella* assay results comparison of results among 4 laboratories, *Mutation Research*, **128**, 115-125.
- 4) Carnes B. A., Dornfeld S. S. and Perk M. J. (1985) A quantitative comparison of a percentile rule with a 2-fold rule for assessing mutagenicity in the Ames assay, *Mutation Research*, **147**, 15-21.
- 5) Hamada C., Wada T. and Sakamoto Y. (1994) Statistical characterization of negative control data in the Ames *Salmonella* / microsome test. *Environmental Health Perspectives Supplements*, **102**, 115-119.
- 6) 労働省化学物質調査課 (1991) 安衛法における変異原性試験、中央労働災害防止協会、pp. 173、東京.
- 7) 市原清志 (1991) バイオサイエンスの統計学、南江堂、pp.378、東京.
- 8) Margolin B. H., Kaplan N. and Zeiger E. (1981) Statistical analysis of the Ames *Salmonella* / microsome test. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**(6), 3779-3783.
- 9) Weinstein D. and Lewinson. T. M. (1978) A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay, *Mutation Research*, **51**, 433-434.
- 10) Stead A. G., Hasselblad V., Creason J. P. and Claxton L. (1981) Modeling the Ames test. *Mutation Research*, **85**, 13-27.
- 11) Snee R. D. and Irr J. D. (1984) A procedure for the statistical evaluation of Ames *Salmonella* assay results comparison of results among 4 laboratories, *Mutation Research*, **128**, 115-125.
- 12) Bogen K. T. (1994) Applicability of alternative model of revertant variance to Ames-test

- date for 121 mutagenic carcinogens, *Mutation Research*, **322**(4), 265–273.
- 13) Chu K. C., Patel K. M., Lin A. H., Tarone R. E., Linhart M. S. and Dunkel V. C. (1981) Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays, *Mutation Research*, **85**, 119–132.
- 14) Bernstein L., Kaldor J. and Pike M. (1982) An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test, *Mutation Research*, **97**, 267–281.
- 15) Zeiger E., Chhabra R. S. and Margolin B. H. (1981) *Mutation Research*, **64**, 379–389.

第 3 章

水中変異原性物質の簡易で 高効率な濃縮・回収方法の開発

第3章 水中変異原性物質の簡易で高効率な濃縮・回収方法の開発

1. はじめに

Ames 変異原性試験法を水道水や環境水、排水等に適用するためには、水中の変異原性物質が微量であるため、これを濃縮・回収して試験しなければならない。第1章で述べたように、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、中でも水道水、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¹⁻³⁰⁾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。また、大量の試料水を長時間かけて濃縮している例が多く、日常的な水道水の安全管理に適した方法は確立されていない。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、第1章で述べたように、液-液抽出法^{9, 31-41)}、減圧濃縮法^{5, 42)}、逆浸透法^{43, 44)}、吸着脱離法⁴⁵⁻⁸⁴⁾などが報告されている。しかし、液-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 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。

浦野等⁵³⁻⁵⁵⁾は、pH 未調整（約 pH7）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、XAD2、XAD4、XAD4/8 および高性能吸着樹脂である 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、CSP800 などの多孔質ポリスチレン樹脂を用いる場合、pH を約 2 に調整した方がよいとの報告^{11, 35, 60, 85, 86)}や、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) -フラノンが pH7 では不安定であるが pH2 では安定であることが報告された⁶³⁾。このため、pH2 における吸着脱離法に最適な樹脂を改めて選定することが必要になった。

また、選定された樹脂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。前述のように、通水時の試料水の pH を約 2 に調整した方がよいとの報告があるが、最適 pH についての詳細な報告はない。また従来は、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還元消去してから吸着剤に通水している例が多いが、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⁶³⁾がある。通水速度については、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⁸⁷⁾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、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。脱離についても、浦野等⁵³⁻⁵⁵⁾は、脱離溶媒として溶媒転換せずに Ames 変異原性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 (2ml) 用いてきたが、等体積で十分であることの確認のほかに、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が確認されていない。

そこで本章では、まず、pH を 2 に調整した水道水中の変異原性物質を濃縮・回収するために適した吸着剤を選定し、その吸着剤の精製・コンディショニング方法を検討した。次に、その吸着剤を用いて適切かつ効率的に濃縮・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、脱離に必要な DMSO の液量および DMSO の変異原性物質脱離力の確認などについて検討した。

2. 実験方法

2. 1 吸着剤

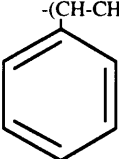
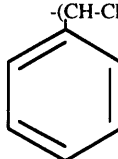
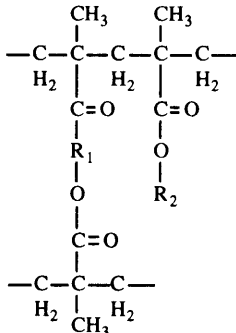
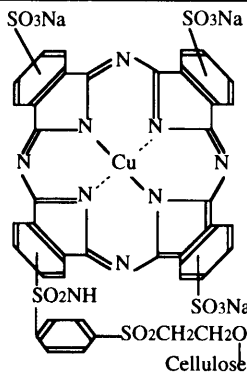
吸着剤には、本研究の成果を基にして製造された三菱化学製の高性能吸着樹脂である CSP800 を日本ウォーターズリミテッドがカートリッジに充填して Sep-Pak Plus CSP-800 として販売しているもの、および比較用に、フナコシ製ブルーコットンとブルーレイヨン、Rohm and Haas 製のアーバンライト XAD4 および XAD8 を用いた。これらの吸着剤の化学構造および物性値を Table 3-1 に示す。なお、XAD4 と類似の吸着剤である XAD2 は、XAD4 より内部表面積が小さく吸着容量も小さいことがすでに明らかにされている⁵³⁻⁵⁵⁾ので、本研究では使用しなかった。

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弱極性のポリアクリル酸エステル樹脂である。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 2 ml 容量の Sep-Pak Plus 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 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 カートリッジに 0.35g を圧密化して充填して用いた。

CSP800 と XAD4 は、5 個直列に接続し、酢酸エチルを $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通液した後、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を $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 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 $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で、235 nm の吸光度が 10 mm セルで 0.01 以下となるまで通液した後、純水を $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 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^{56, 59)}ので行わなかった。

Table 3-1
Structures and properties of adsorbent

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	$-(\text{CH}-\text{CH}_2)_n-$ 	$-(\text{CH}-\text{CH}_2)_n-$ 		
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 20 nm in diameter

2. 2 試料水とその調整方法

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、水栓を開いてしばらく水を流した後、共洗いを行ってから 20 l のポリタンクに満水に採取し、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。

これらの水道水の水質を Table 3-2 に示す。なお、有機物質の総括的濃度は、260 nm 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 50 mm 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、三菱化学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。

これらの試料水は、吸着濃縮直前に遊離塩素を還元消去せずに約 5 規定の硫酸をゆっくりと攪拌しながら添加し、 $\text{pH } 2.0 \pm 0.1$ に調整して用いた。

残留遊離塩素消去の影響について検討する際には、試料水に亜硫酸ナトリウム水溶液を添加して吸着濃縮し、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 Eq. 3-1 および Eq. 3-2 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 $X \text{ [mg} \cdot \text{l}^{-1}]$ の試料水 $V \text{ [l]}$ 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 Eq. 3-3 で与えられる $A \text{ [mg]}$ だけ添加すればよい。



$$A = 3.55 n V X \quad (3-3)$$

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、 $n = 1$ で添加した場合には、計算量を添加した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

Eq. 3-3 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、常に新しい試薬を用いた。

試料水の最適 pH を検討する際には、試料水の pH を 5.0 ± 0.1 、 3.0 ± 0.1 、 2.0 ± 0.1 、または 1.0 ± 0.1 に調整し、Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジに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不可逆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 2.0 ± 0.1 に調整して室温で 17 時間放置した後に、5 規定の水酸化ナトリウム水溶液を添加して再び $\text{pH} 7.0 \pm 0.1$ に戻した試料水、 $\text{pH} 2.0 \pm 0.1$ に調整して 17 時間放置した試料水、pH 未調整 ($\text{pH} 7.1$) の試料水を 17 時間放置した試料水について、それぞれの試料水の回収物の変異原性を比較した。

Table 3-2
Principal qualities of water sample

Sample	A ₂₆₀ [50 mm ⁻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
T5	0.101	2.22	—	0.40
T6	0.095	—	0.235	0.65
T7	0.033	—	0.310	0.90
T8	0.083	1.81	0.271	0.26
T9	0.087	2.24	—	0.40
T10	0.078	3.78	0.202	0.28
T11	0.119	1.88	0.250	0.77
T12	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

2. 3 吸着・脱離の装置と操作方法

変異原性物質の吸着に用いた吸着装置を Fig. 3-1 に示す。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。通水用ポンプは、Cole-Parmer Instrument 製の MASTERFLEX MODEL 70 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）を用いた。

標準的な吸着操作は、Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジに $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\text{SV} = 1,500 \text{ h}^{-1}$) で 1 または 2 l（通水倍率 = 500 または 1,000 倍）通水して行った。その際、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 とその他の吸着剤と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て通水順序を変えて通水し、それぞれのカートリッジで回収された変異原性を調べた。

残留遊離塩素除去の影響について検討する際には、亜硫酸ナトリウム水溶液を添加した試料水を Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジに 2~4 l（通水倍率 = 1,000~2,000 倍）を通水して吸着濃縮し、変異原性の変化を調べた。

試料水の最適 pH を検討する際には、pH 調整した試料水を Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジに 4 l（通水倍率 = 2,000 倍）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、2. 2 で示したように調整した試料水を 4 l 通水し、回収物の変異原性を比較した。

通水速度の影響を検討する際には、Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジに 1 から 4 l（通水倍率 = 500~2,000 倍）の試料水を 8 から $80 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\text{SV} = 240 \sim 2,400 \text{ h}^{-1}$) で通水し、回収された変異原性の変化を調べた。

Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジへの通水可能倍率を検討する際には、カートリッジを 5~7 個直列に接続して 2~8 l（通水倍率 = 240~4,000 倍）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た。すなわち、Sep-Pak Plus 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、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。

CSP800、XAD4、XAD4/8 からの変異原性物質の脱離は、Fig. 3-2 に示したガラス製 20 ml 注射筒付きの Harvard Apparatus 製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、流出液を水を入れたガラス容器に受け、滴下液面の変化で DMSO が流出し初めたことが確認されてからネジ口瓶に 2 ml を採取して行った。

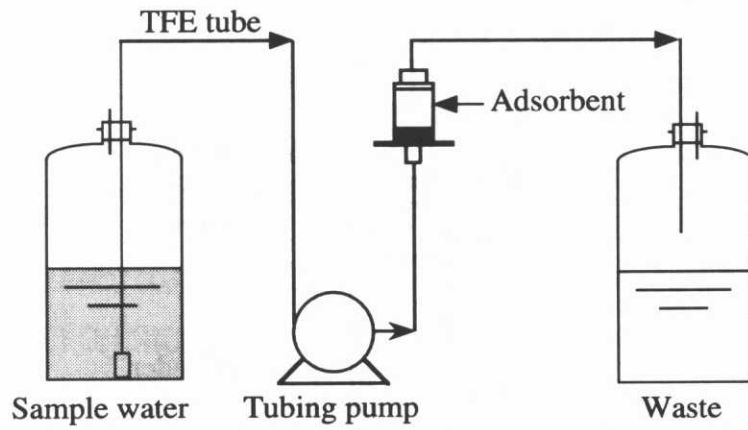
脱離に必要な DMSO の液量を確認する際には、Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジに試料水を通水して変異原性物質を吸着させた後に DMSO で脱離し、0～2 ml、2～3 ml および 3～4 ml の液を採取して脱離された変異原性を調べた。

DMSO の脱離能力を確認する際には、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、まず、4 l の試料水を通水して変異原性物質を吸着させた Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジに 2 ml の DMSO を通液して脱離して DMSO 画分を得た。次に、Fig. 3-3 に示したコンセンレーターを用いて $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で 120 ml のトルエンを吸着時と逆方向から通液して十分に脱離した。得られたトルエンを東京理化機器製 N-11 型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 2 ml の DMSO に再溶解してトルエン画分を得て、それぞれの画分の変異原性を調べた。

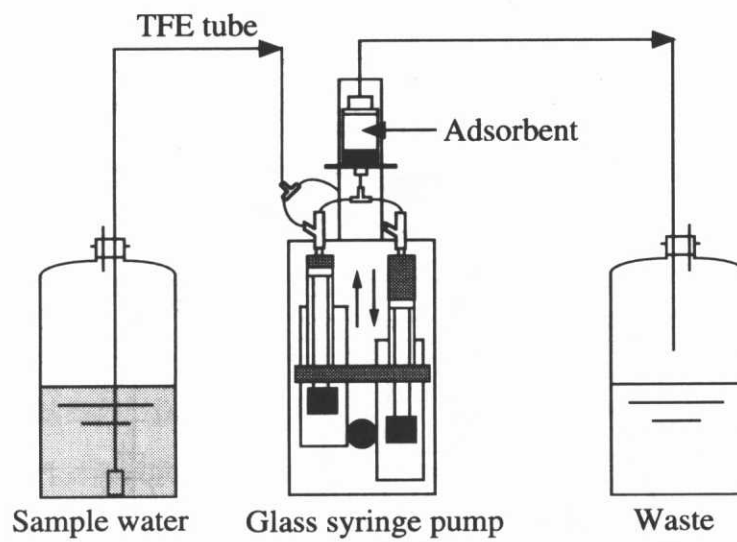
銅フタロシアニン系吸着剤の脱離は、まず、吸着の終わった銅フタロシアニン系吸着を純水で 2 回洗浄し、ろ紙で十分に水分を取り除いた後、300 ml 共栓付きフラスコ中に 50 : 1 メタノール-アンモニア溶液 100 ml に入れて 30 分間振盪抽出した。抽出液を 300 ml ナス型フラスコに移し、再び同様の脱離操作を行い、この抽出液も同じナス型フラスコに移した。次に抽出液の入ったナス型フラスコを約 20℃のウォーターバスに入れ、ヤマト科学製 WP-11 型アスピレータで吸引し、減圧濃縮した。抽出液が濃縮されて数 ml となったところで試験管に移し、さらに濃縮して乾固した。再度ナス型フラス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 2.5 ml の DMSO を加えて再溶解した。

これらの濃縮液は、孔径 0.45 μm 、直径 25 mm の再生セルロース製メンブレンフィルターでろ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。

CSP800 の精製とコンディショニングの条件を決める際には、Sep-Pak Plus 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 $10\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で通液し、高速液体クロマトグラフ用の日本分光製 UVIDEC100-III 型 UV 検出器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 260 nm 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 235 nm 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 $10\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 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。その際、密度差による混合を防ぐため上向流で通液した。



(a) Masterflex



(b) Concentrator

Fig. 3-1. Adsorption apparatus.

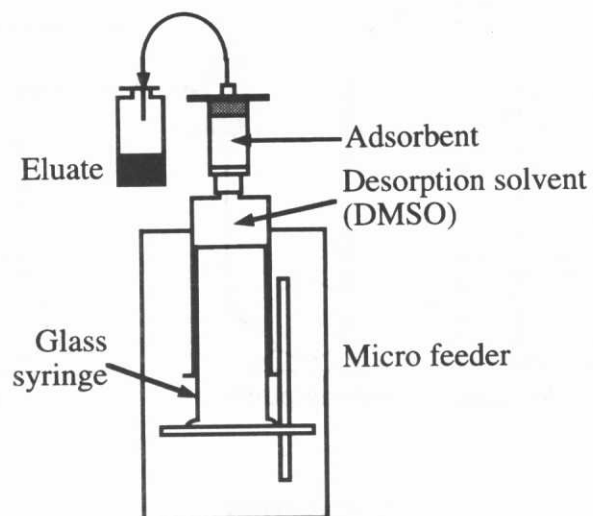


Fig. 3-2. Desorption apparatus in case of using DMSO.

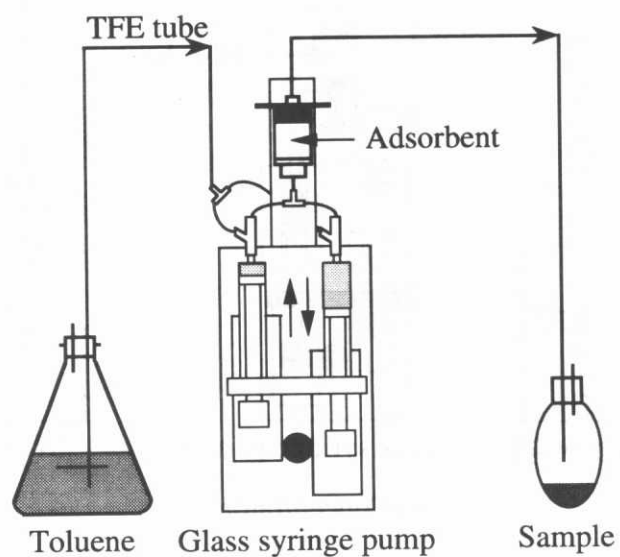


Fig. 3-3. Desorption apparatus in case of using toluene.

2. 4 Ames 変異原性試験

Ames 変異原性試験は、労働省のガイドブック⁸⁸⁾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 株と TA100 株を用いた。すなわち、TA98 または TA100 を Difco Laboratories 社のニュートリエントブロスを用いて 37℃で 9±1 時間前培養した液 100 μl に、リン酸緩衝液または S9mix 液 500 μl と 2. 3 で濃縮して得た DMSO 溶液 100 μl とを加え、37℃で 20 分間プレインキュベーションした後に、ソフトアガー 2 ml を加えて混合した。これを、Difco Laboratories 社の Bacto Agar を用いて予め作成しておいたプレート上に添加した。その際、用量作用関係を確認するため、検液の用量（添加量）が 25~100 $\mu\text{l} \cdot \text{plate}^{-1}$ の範囲で 2~3 段階となるだけ添加した。添加後、均一に広げて 37℃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 1 l あたりに換算して表示した。すなわち、1 試料あたり 3~4 段階の添加量で各 2 枚のプレートを用いて試験し、添加量 0 である陰性対照試験は 4 枚のプレートの自然復帰コロニー数の平均値 R_0 [$\text{rev.} \cdot \text{plate}^{-1}$]と、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 $\cdot \text{plate}^{-1}$]の 2 枚のプレートの復帰コロニー数の平均値 R_m [$\text{rev.} \cdot \text{plate}^{-1}$]とから、Eq. 3-4 によって 1 l あたりの正味の変異原性 R [$\text{net rev.} \cdot (l\text{-試料水})^{-1}$]を求めた。

$$R = (R_m - R_0) / D_m \quad (3-4)$$

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_0 で表し、第2章で明らかにしたように、MR 値<1.4 で明確な変異原性が認められないと判断した⁸⁹⁾。

3. 結果と考察

3. 1 吸着剤の選定

3. 1. 1 高性能吸着樹脂と銅フタロシアニン系吸着剤との比較

高性能吸着樹脂である CSP800 と銅フタロシアニン系吸着剤のブルーレイオンおよびブルーコットンを順序を変えて直列に接続し、試料水を 1 l 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 Tables 3-3、Table 3-4 に示す。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、pH の吸着に対する影響は小さいことがすでに明らかになっている⁸⁾ので、本実験は試料水の pH を 2 に調整して行った。

Table 3-3 に示したように、TA98±S9 および TA100+S9 の条件では CSP800 画分とブルーレイオン画分のいずれについても MR 値が 1.4 未満となり、明確な変異原性は認められなかった。しかし、Table 3-4 に示したように、TA100-S9 の条件では、CSP800 をブルーレイオンまたはブルーコッ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 MR 値が 2.5~3.5 となり強い変異原性が検出されたが、ブルーレイオンまたはブルーコットンの画分の MR 値は 0.7~1.2 となり、明確な変異原性は認められなかった。

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、3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-*b*]インドール (Trp-P-1)、2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-*f*]キノリン (IQ)、ベンゾ[a]ピレン (B[a]P) などの+S9 の条件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⁹⁰⁾。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、水道水中の変異原性物質の回収にはブルーレイオン、ブルーコットンよりも高性能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. 1. 2 高性能吸着樹脂と従来の吸着樹脂との比較

高性能吸着樹脂である CSP800 と従来からある XAD4 を順序を変えて直列に接続して試料水を 1 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 3-5 に示す。なお、Tables 3-3 に例を示したように、本章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 の条件では明確な変異原性が認められなかった。また、第 1 章で詳しく述べたように、水道水のように塩素処理された水試料からは TA100-S9 の条件で最も強い変異原性が検出される場合が多いことがすでに明らかになっている。このため、本章のこれ以降の検討では、特記なき場合は TA100-S9 の条件のみで試験した。

CSP800 から先に通水した場合には、CSP800 画分からは MR 値で 3.1 の高い変異原性が検出されたが、XAD4 画分からは明確な変異原性は認められなかった。これに対して、XAD4 から先に通水した場合には、XAD4 画分より CSP800 画分の方が高い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 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 では脱離速度が遅く、2 ml の DMSO で十分に脱離できていないことが原因と考えられる。しかし、脱離溶媒 (DMSO) の流速を現在の $0.15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ より遅くしても境膜拡散律速になり脱離効率が向上しないと考えられること、DMSO の通液量を増やすと濃縮倍率が下がり変異原性が検出限界以下 (N.D.) になる可能性がある。そこで、試料水 T4 を 2 l 通水して同様の実験を行い、XAD4 は 120 ml 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。その結果、Table 3-6 に示すように、この場合も CSP800 から先に通水した場合は XAD4 画分からは MR 値 1.4 の非常の弱い変異原性しか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た。また、両画分の復帰コロニー数の合計が、通水順序を変えてもほぼ一致した。

これらの結果から、XAD4 より CSP800 の方が変異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表面特性は同じであり、同様の物質を吸着でき、また、内部表面積と充填密度から 1 m l あたりの面積を求めると、XAD4 の方が 1.1 倍とやや大きく、表面積の観点からは XAD4 の方が若干優れている。しかし、粒径が XAD4 の $0.297\sim 0.840\text{ mm}$ に対して CSP800 は $0.149\sim 0.250\text{ mm}$ であり、平均粒径を比較すると 2.8 倍も XAD4 の方が大きく、XAD4 の方が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。吸着速度が Boyd の法則に従い吸着剤粒子径の 2 乗に反比例すると仮定すると、XAD4 で CSP800 と同様の回収率を得るためには 8.1 倍の接触時間で通水する必要がある。本研究は迅速な濃縮を目的としており、しかも pH2 とすると試料水の変異原性が経時変化するとの報告がある⁸⁷⁾ので、可能な限り迅速に濃縮・回収しなければならず、XAD4 を用いて長時間をかけて濃縮・回収するのは適当ではない。CSP800 を用いる場合には、 $50\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で通水できるので樹脂体積 2 ml の 500 倍から 1,000 倍、すなわち $1\sim 2\text{ l}$ を通水するのに従来法より著しく短時間の 20~40 min ですむ。

また、脱離についても同様に脱離速度が Boyd の法則に従い吸着剤粒子径の 2 乗に反比例すると仮定すると、XAD4 で CSP800 と同様の脱離率を得るためには、8.1 分の 1 の通液速度にする必要がある。本研究で提案している CSP800 への脱離液の通液速度、すなわち $0.15\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ が脱離率 100% を達成する最高速度と仮定すると、XAD4 で同様の回収率を得るためには通液速度を $0.019\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ として通液する必要がある。しかし、この通液速度では律速過程が境膜拡散過程に移行する可能性が高く、通液量をさらに多くする必要があるために濃縮率を上げることができないと考えられる。これらのことが CSP800 が優れている原因と考えられる。

なお、これらの結果に加えて変異原性物質の総括的な見かけの吸着等温線を求めれば見かけの粒内拡散係数を求めることもできるが、成分の組成比によって見かけの値が大きく異なると考えられるため、検討を行わなかった。

同様に、高性能吸着樹脂である CSP800 と、従来からある XAD4 と XAD8 とを等量混合した XAD4/8 と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 3-7 に示す。

なお、XAD4/8 で回収される物質も TA98±S9 および TA100+S9 の条件では MR 値が 1.4 未満になり、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 の条件で変異原性を示す物質は検出限界以下であった。

TA100-S9 の条件では、XAD4 のみの場合と同様に、CSP800 から先に通水した場合は、CSP800 画分の MR 値は 2.6 となり高い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は認められなかった。また、XAD4/8 から先に通水した場合にも、CSP800 画分のみに明確な変異原性が検出された。

3. 1. 2 で示したように、XAD4 は、回収率は低いものの TA100-S9 の条件で検出される変異原性物質を一部回収できることから、XAD4/8 画分にも変異原性物質が回収されていると考えられる。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 未満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 の条件で検出される水道水中の変異原性物質の中で、XAD4 では回収されずに XAD8 で回収される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。

Table 3-3
Mutagenicity ratios of samples recovered by CSP800 and blue rayon for TA98±S9 and TA100+S9

Strain and presence 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) the values at maximum dose (100 μ l-eluate \cdot plate⁻¹)

2) 1 l of sample water T1 was passed through each cartridge and finally concentrated to 2 ml DMSO

Table 3-4
Mutagenicity of samples recovered by cartridges of CSP800 and copper phthalocyanine adsorbents connected in series

Flow order	CSP800 → Blue rayon	Blue rayon → CSP800
Fraction	CSP800 Blue rayon	Blue rayon CSP800
Mutagenicity ¹⁾²⁾ [net rev. \cdot l ⁻¹]	5,400 N.D. ⁴⁾	N.D. ⁴⁾ 6,500
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
Mutagenicity ¹⁾⁵⁾ [net rev. \cdot l ⁻¹]	7,900 N.D. ⁴⁾	N.D. ⁴⁾ 8,600
Mutagenicity ratio ³⁾	3.3 1.0	1.2 3.5

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

3) at maximum dose (100 μ l-eluate \cdot plate⁻¹), 4) N.D.<1,400 net rev. \cdot l⁻¹,

5) sample water : T2

Table 3-5

Mutagenicity of samples recovered by cartridges of CSP800 and XAD4 connected in series (desorbed by DMSO)

Flow order	CSP800 → XAD4		XAD4 → CSP800	
Fraction	CSP800	XAD4	XAD4	CSP800
Mutagenicity ¹⁾²⁾ [net rev. · l ⁻¹]	7,300	N.D. ⁴⁾	2,100	2,800
Mutagenicity ratio ³⁾	3.1	1.1	1.6	1.8

- 1) TA100-S9 , 2) sample water : T2,
 3) at maximum dose (100 µl-eluate · plate⁻¹),
 4) N.D.<1,400 net rev. · l⁻¹

Table 3-6

Mutagenicity of samples recovered by cartridges of CSP800 and XAD4 connected in series (desorbed by toluene)

Flow order	CSP800 → XAD4		XAD4 → CSP800	
Fraction	CSP800	XAD4	XAD4	CSP800
Mutagenicity ¹⁾²⁾ [net rev. · l ⁻¹]	3,500	490	1,300	2,200
Mutagenicity ratio ³⁾	3.8	1.4	2.1	2.8

- 1) TA100-S9 , 2) sample water : T3,
 3) at maximum dose (100 µl-eluate · plate⁻¹)

Table 3-7
Mutagenicity of samples recovered by cartridges of CSP800 and XAD4/8
connected in series (desorbed by DMSO)

Flow order	CSP800 → XAD4/8		XAD4/8 → CSP800	
Fraction	CSP800	XAD4/8	XAD4/8	CSP800
Mutagenicity ¹⁾²⁾ [net rev. · l ⁻¹]	2,500	N.D. ⁴⁾	N.D. ⁴⁾	1,900
Mutagenicity ratio ³⁾	2.6	1.0	1.3	2.2

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

3) at maximum dose (100 µl-eluate · plate⁻¹),

4) N.D.<610 net rev. · l⁻¹

3. 2 高性能吸着樹脂の精製・コンディショニング方法

3. 2. 1 精製方法およびコンディショニング方法

高性能吸着樹脂である CSP800 が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が、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あると考えられる。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. 3-4 に示す。 $1,280 \text{ ml}$ 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、精製した結果も併せて Fig. 3-4 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置換する必要があるため、水と相互溶解するエタノールを用いて $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の下向流でさらに精製を行った結果、Fig. 3-4 に示したように 200 ml 通液することにより、 A_{235} が検出下限界の $0.001 \cdot 10 \text{ mm}^{-1}$ 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、短時間に十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。

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 $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通水し、溶媒転換した結果を Fig.3-5 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 $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通水した結果を Fig. 3-6 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あると考えられるが、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⁹⁾。

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 TOC が $204 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ および純水と同等の $0.50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 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 3-8 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 $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 程度になるまで純水で置換すれば十分であると考えらる。

3. 2. 2 精製・コンディショニングした樹脂からの溶出物の変異原性

以上のように精製・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。そこで精製、コンディショニングし終えた状態の CSP800 に DMSO を $0.15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で通液し、その脱離液 2 ml を変異原性試験した結果を Table 3-9 に示す。TA98 \pm S9、TA100 \pm S9 の条件でいずれも MR 値が $0.8 \sim 1.2$ で 1.4 未満であり、明確な変異原性は認められなかった。

これより、Fig. 3-7 に示した方法で精製、コンディショニングした Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジを用いれば、吸着した変異原性物質を DMSO を用いて脱離する際に CSP800 カートリッジから溶出する変異原性物質は無視できることが明らかになった。

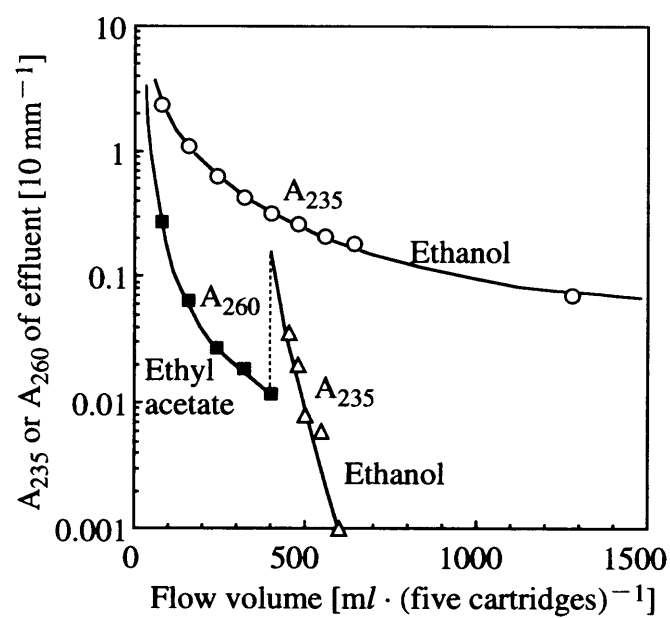


Fig. 3-4. Organic matter eluted from CSP800 by organic solvents.

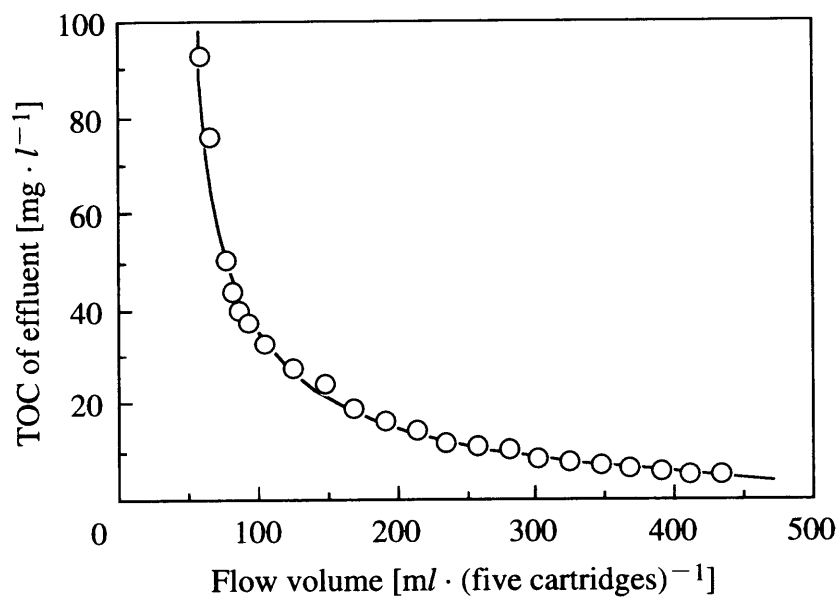


Fig. 3-5. Ethanol eluted by pure water from refined CSP800 in conditioning procedure.

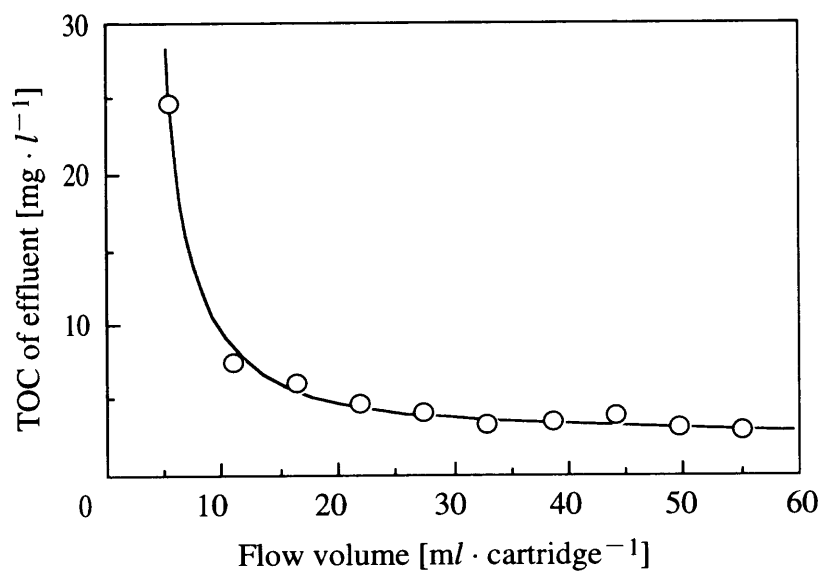


Fig. 3-6. Ethanol eluted by pure water from refined and conditioned CSP800 before use.

Table 3-8
Influence of residual ethanol on recovery
of mutagens

Residual ethanol [mg-C · l ⁻¹]	Mutagenicity ¹⁾²⁾ [net rev. · l ⁻¹]
204	2,500
0.1	2,100

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

Table 3-9
Mutagenicity ratios of organic matter eluted
from refined and conditioned CSP800

Strain and presence 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 2 ml DMSO

2) at maximum dose (100 µl-eluate · plate⁻¹)

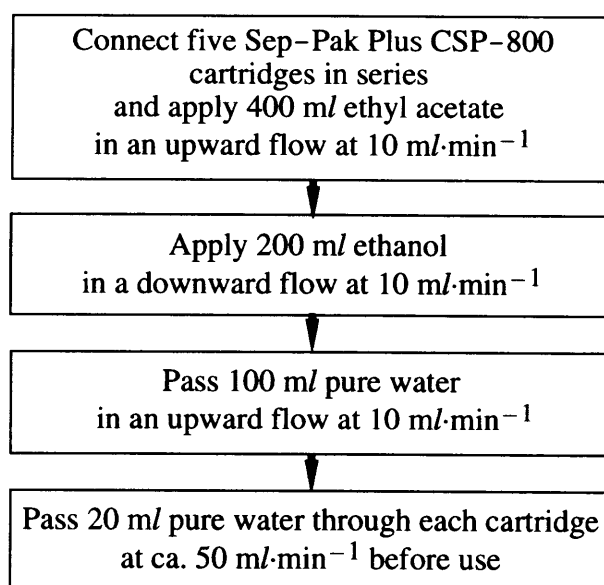


Fig. 3-7. Refining and conditioning method of Sep-Pak Plus CSP-800 cartridge.

3. 3 試料水調整方法の検討

3. 3. 1 遊離塩素除去の可否

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と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消去していた⁵³⁻⁵⁵⁾。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⁶³⁾があり、MX などの変異原性物質が亜硫酸ナトリウムなどの求核試薬と反応して還元型の変異原性が弱い物質に変化すると理解されている。

そこで、亜硫酸ナトリウムを添加して残留遊離塩素を消去した場合の影響を検討した結果を Fig. 3-8 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、水道水中には亜硫酸ナトリウムを添加すると変異原性が低下する物質が含まれていることが確認された。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反応速度が速く、優先的に反応する物質が含まれていると考えられる。しかし、第1章および第5章で述べたように、水道水中の変異原性物質の大部分が塩素処理時に生成することから、遊離塩素より酸化力が強い変異原性物質が含まれているとは考えにくく、反応速度が速い物質が含まれていると考えられる。今後、亜硫酸ナトリウム添加量と遊離塩素減少量との両論関係など、詳細な検討が必要である。

また、添加量が 1~10 当量の範囲では無添加のときの約 2 分の 1 の変異原性であり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反応速度が速く、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。

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かになった。

3. 3. 2 残留遊離塩素と樹脂との反応物の変異原性

遊離塩素が残留している試料水を CSP800 カートリッジに通水すると、遊離塩素と CSP800 樹脂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がある。そこで、イオン交換処理後に活性炭処理した純水に塩素として $32 \text{ mg-Cl} \cdot \text{l}^{-1}$ 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 CSP-800 カートリッジに通水倍率 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。その結果、Table 3-10 に示すように、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 未満になり、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、Fig. 3-7 に示した方法で精製・コンディショニングした Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジを用いれば、遊離塩素が残留したままの水道水を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。

3. 3. 3 試料水の pH 調整による変異原性回収率の変化

CSP800 はポリスチレンであるので疎水性が強く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、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. 3-9 に示す。pH が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 pH2 に調整するときの約 10 倍の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る。

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→2→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 3-11 に示す。pH2 では明らかに変異原性が高く、pH7 と pH7→2→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こり、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。

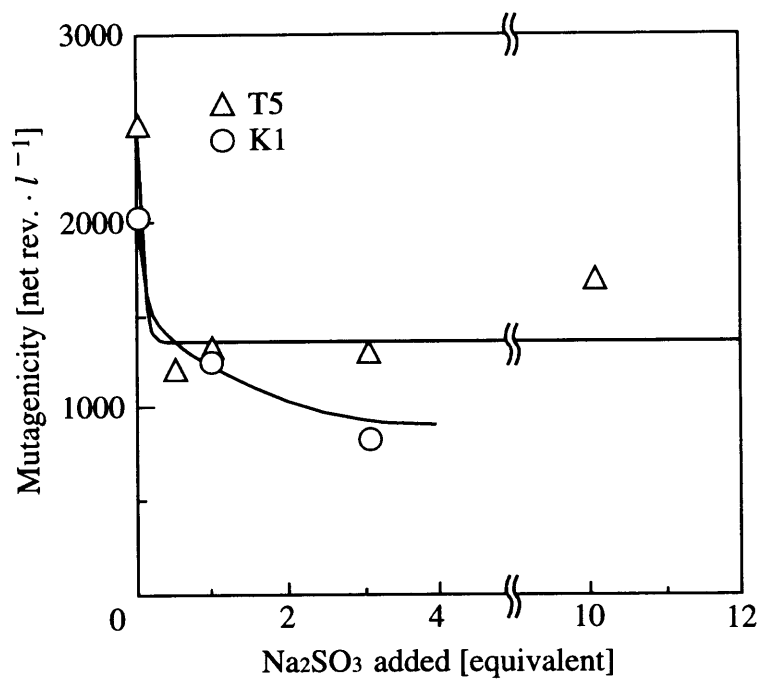


Fig. 3-8. Influence of chlorine reduction.

Table 3-10

Examinations of mutagens formed by reaction between CSP800 and free chlorine

Strain and presence 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) the values of mutagenicity ratio at maximum dose
(100 μ l-eluate · plate⁻¹)

2) 4 l of sodium hypochlorite solution was passed through Sep-Pak Plus CSP-800 and organic matter formed was desorbed by 2 ml DMSO

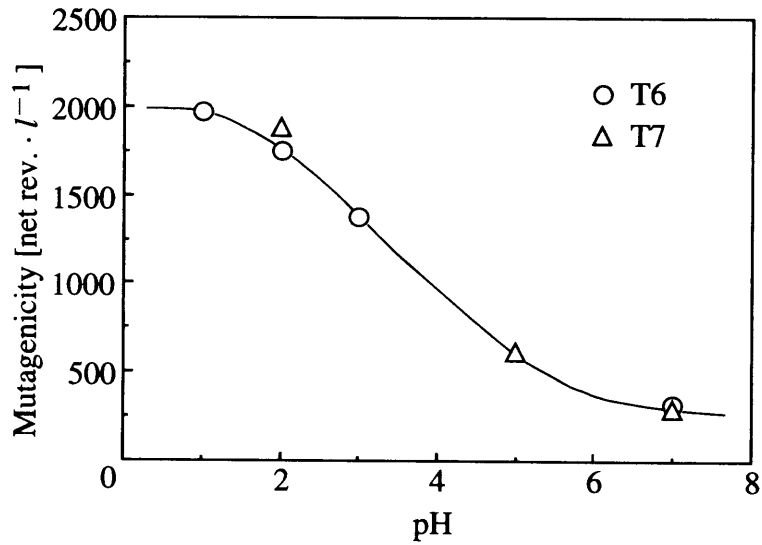


Fig. 3-9. Effect of pH of water sample on recovery of mutagens.

Table 3-11
Examinations of mutagens formed
by pH adjustment

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

1) water sample : T7

2) at maximum dose

(100 μ l-eluate · plate⁻¹)

3. 4 吸着・脱離条件の検討

3. 4. 1 通水速度による変異原性回収率の変化

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⁸⁷⁾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、通水速度の影響について検討した結果を Fig. 3-10 に示す。流速 $8\sim 80\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 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。3. 1. 2で述べたように、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 乗に比例すると考えられる。本研究で用いた CSP800 は、従来の XAD4 に比べて平均粒径が約 2.8 分の 1 であり、CSP800 は XAD4 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、3. 1. 2で示したように、従来の XAD4 より CSP800 の方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. 2 通水可能倍率

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、回収率が低くなっ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 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て通水倍率の影響を検討した結果を Fig. 3-11 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 rev. \cdot l⁻¹、および 2,800 net rev. \cdot l⁻¹ の汚染度の高い試料水の場合でも、いずれも試料水 1 l 当り 1 ml の樹脂で約 90% 以上の回収率が得られた。これに対して、100% 回収時の変異原性が約 21,800 net rev. \cdot l⁻¹ および約 11,600 net rev. \cdot l⁻¹ と著しく高い試料水 T11 および T10 の場合には、試料水 1 l 当り 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、5,000 net rev. \cdot l⁻¹ と 11,600 net rev. \cdot l⁻¹ との中間値である変異原性が 8,000 net rev. \cdot l⁻¹ 程度以上の試料水については、通水倍率を 500 倍にすれば変異原性物質を約 90% 以上回収できると考えられる。

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 T6 を 500 倍に濃縮すると、約 21,800 net rev. \cdot 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、1,000~2,000 net rev. \cdot 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、プレートへの最大 DMSO 添加量である 100 μ l が試料水換算で 0.05 l \cdot plate⁻¹ 添加に相当するので、50~100 net rev. \cdot 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 1.5~2.0 程度となり、定量限界値以下になってしまう。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 添加することにすれば、100~200 net rev. \cdot plate⁻¹ 程度の復帰コロニーが得られることになり、MR 値が 2.0~3.0 程度になるのではほぼ定量評価できる。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 CSP-800 カートリッジに 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 1.5 mg \cdot l⁻¹

以上、トリハロメタン (THM) が $50 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上、または全有機ハロゲン (TOX) が $150 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上になることが多く、約 $8,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ 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 CSP-800 カートリッジを 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. 4. 3 脱離用ジメチルスルホキシドの必要液量と脱離力の確認

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、Sep-Pak Plus CSP-800 カートリッジ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 3-12 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、プレートへの最大添加量である $100 \mu\text{l}$ でも MR 値がすべて 1.4 未満となり、明確な変異原性が検出されなかった。とくに試料水 T11 の場合は、0~2 ml の画分の MR 値が 11.8 ($21,800 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$) と非常に高い変異原性が検出されているにもかかわらず、2~3 ml では MR 値が 1.4 未満で 2 ml の DMSO ですべて脱離できていた。前述したように、変異原性が著しく高い試料水では通水倍率を 500 倍にすることにしたので、通常はこれほど多くの変異原性物質を吸着することはない。したがって、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、CSP800 樹脂からのトリハロメタンの脱離に樹脂体積の 1.5 倍量の DMSO が必要であることがすでに明らかになっていること⁵³⁻⁵⁵⁾から、1 ml では不十分であると言える。

つぎに、DMSO の脱離力を確認するために、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、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、トルエンで十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。その結果、Table 3-13 に示すように、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 T12 を 1,000 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 1.2 以下 (net で 0.2 相当以下) 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 24 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。

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 通液する必要があり、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、通液速度を遅くすれば、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、脱離用の DMSO の通液速度は $0.15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 程度で良いと考えられる。

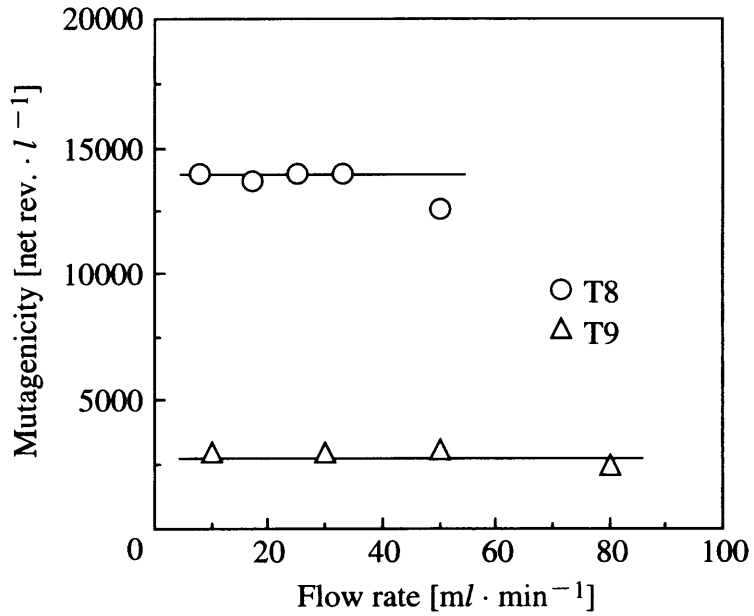


Fig. 3-10. Influence of flow rate on recovery of mutagens.

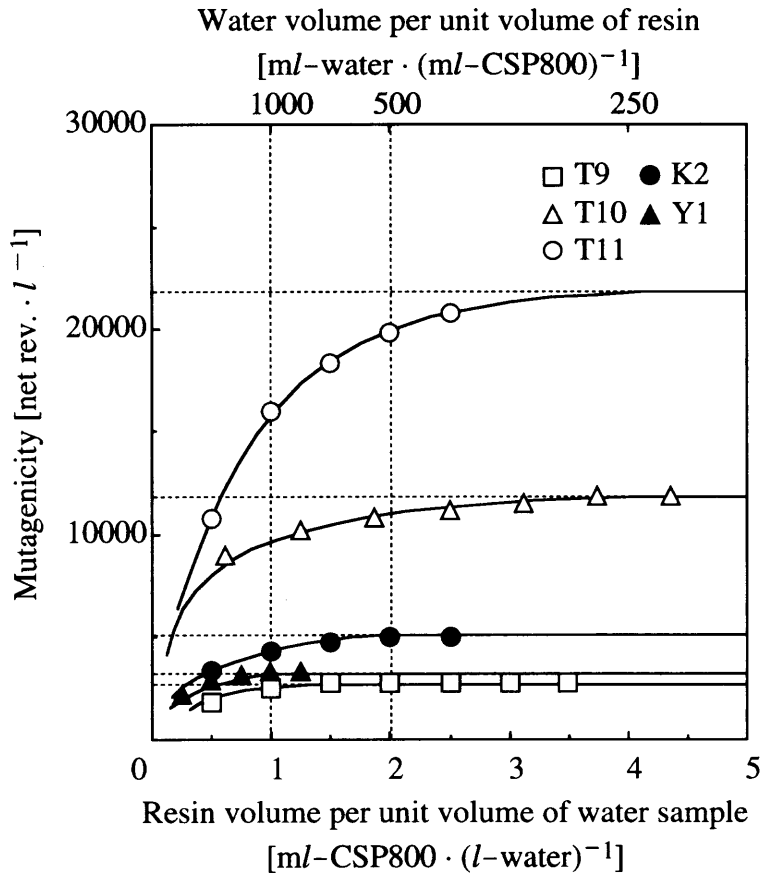


Fig. 3-11. Changes of mutagenicity recovered toward resin volume per unit volume of water sample.

Table 3-12
Investigation on minimum solvent volume for desorption

Fraction [ml-eluate]	Water sample ¹⁾		
	K1	Y2	T11
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) the values of mutagenicity ratio at maximum dose
(100 μ l-eluate \cdot plate⁻¹)

Table 3-13
Confirmation of desorption ability of DMSO

Strain and presence 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) the values of mutagenicity ratio at maximum dose
(100 μ l-eluate \cdot plate⁻¹)

2) 4 l of water sample T11 was passed through
Sep-Pak Plus CSP-800

3) desorbed by 2 ml DMSO

4) desorbed by 120 ml toluene after desorption
by 2 ml DMSO

4. 本章のまとめ

本章では、水道水等の水試料の変異原性を評価するために必要な変異原性物質の濃縮・回収方法について、大量の試料水を一度に処理でき、簡易で最も実用的である固相吸着脱離法に着目して吸着剤の選定および選定された吸着剤に対する最適な吸着・脱離条件について詳細な検討を行い、以下の結論を得た。

- 1) 銅フタロシアニン系吸着剤であるブルーレイヨンおよびブルーコットンを用いて 1,000 倍に濃縮しても、水道水中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) 多孔質ポリスチレン樹脂である XAD4 と、同じ多孔質ポリスチレン樹脂であり XAD4 より内部表面積がやや大きく粒径が 2.8 分の 1 の 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 とを併用 (XAD4/8) して用いた場合、1,000 倍に濃縮しても変異原性物質はわずかしき回収できず、CSP800 より性能が大幅に低かった。
- 4) Sep-Pak Plus CSP-800 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 400 ml 通液した後、エタノールを約 $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の下向流で 200 ml 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 100 ml 通水して保存し、使用のつど、1 本ずつ純水を約 $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の上向流で約 20 ml 通水すれば、CSP800 の不純物を十分に取り除き、精製・コンディショニングでできることが確認された。
- 5) 試料水中の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約 2 分の 1 に低下した。また、残留塩素が存在する試料水を精製・コンディショニングした CSP800 に通水しても、CSP800 樹脂または CSP800 樹脂中の不純物から変異原性物質が生成しないことが確認された。
- 6) 試料水の pH が低い方が変異原性物質の回収率が高く、遊離塩素が存在するまま pH を 2 ± 0.1 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る。

- 7) 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る。
- 8) 通水倍率は、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。
- 9) 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. 3-12 に示す。この方法を用いれば、変異原性を測定するのに必要な試料水量が 1~2 l の少量ですみ、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・回収することができ、水道水等の変異原性を迅速に高感度で測定できる。

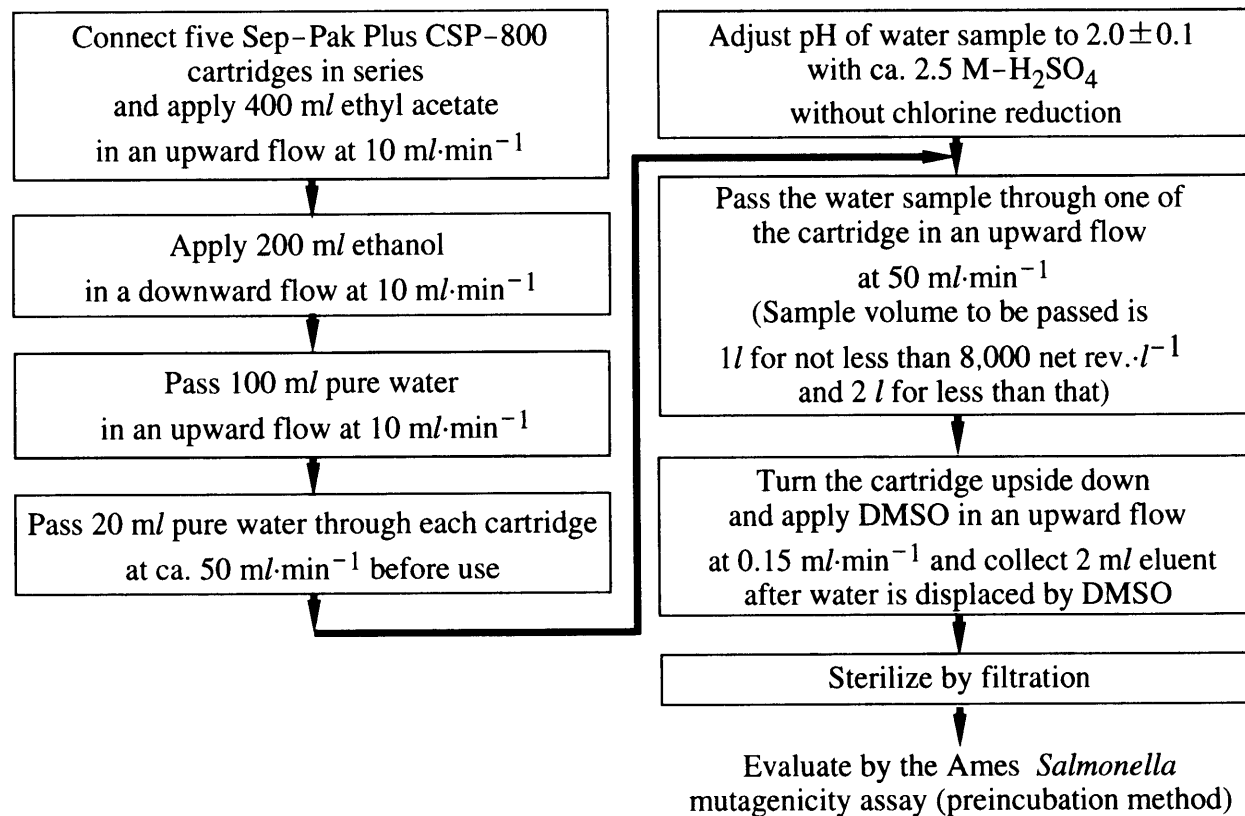


Fig. 3-12. Procedure for concentration of mutagens from water sample.

本章の引用文献

- 1) Williams D. T., Nestmann E. R., Lebel G. L., Benoit F. M. and Otson R. (1982) Determination of mutagenic potential and organic contaminants of great lakes drinking water, *Chemosphere Chem. Biol. Toxicol. Environ. Probl.*, **11**(3), 263–276.
- 2) Maruoka S. and Yamanaka S. (1983) Comparative studies using the Ames *Salmonella* / microsome test on mutagenicity of the XAD extract recovered from the river waters in Kyoto city, *Environmental Science Technology*, **17**(3), 177–180.
- 3) Kool H. J., Kreijl V. C. F. and Oers V. H. (1984) Mutagenic activity in drinking water in the Netherlands. A survey and a correlation study, *Toxicological and Environment Chemistry*, **7**, 111–129.
- 4) Vartiainen T. and Liimatainen A. (1986) High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland, *Mutation Research*, **169**, 29–34.
- 5) 丹保憲仁、亀井 翼、中津川 誠 (1986) 塩素及びオゾン処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性 (Ⅱ)、水道協会雑誌、**56**(6)、2–11.
- 6) Kronberg L. and Holmbom B. (1986) Properties of mutagenic compounds form during chlorination of humic–water, org. micropollut, *Aquatic Environ.*, 449– 454.
- 7) Guttaman–Bass N., Bairey–Albuquerque M., Ulitzur S., Chartr A. and Bav–Aca C. (1987) Effects of chlorine and chlorine dioxide on mutagenic activity lake Kinnereth, *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 252–260.
- 8) 讃岐田 訓 (1987) 塩素処理による変異原性の生成、水、29(11)、23–29.
- 9) Vartinen T., Limatainen A., Jaaskelainen S. and Kaubanen P. (1987) Comparison of solvent extractions and resin adsorption for isolation of mutagenic compounds from chlorinated drinking water with high humus content, *Water Research*, **21**, 773–779.
- 10) Vartinen T. and Limatainen A. (1988) Relations between drinking water mutagenicity and water quality parameters, *Chemosphere*, **17**, 189–202.
- 11) 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.
- 12) Sayoto Y., Nakamuro K., Ueno H. and Goto R. (1990) Mutagenicity of adsorbents to a

- copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water, *Mutation Research*, **242**, 313-317.
- 13) 内海英雄、濱田 昭、早津彦哉、橋本徳蔵、相沢 靖 (1990) 河川水中変異原活性の季節・流域変動－青綿法による検討及び従来の水質汚濁指標との比較－、水質汚濁研究、**13**、227-234.
- 14) Soto M. I. Z. and Martins M. T. (1992) Assessment of mutagenic activity in drinking water from Sao Paulo city, Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality : An International Journal*, **7**, 141-155.
- 15) Conteiro E., Venier P., Fortunati E., Navazio G. and Levis A. G. (1992) Evaluation of mutagenic activity of organic micropollutants present in surface waters, *International Journal of Environmental and Pollution*, **2**(1/2), 87-96.
- 16) Monarca S., Ziglio G., Pasquini R., Beltramelli G., Feretti D., Donato F., Nardi G., Gervasoni M., Micheli F., Dalmiglio A. and Moretti M. (1992) Mutagenicity of drinking water obtained by different treatment procedures from two northern Italian lakes. *International Journal of Environmental Health Research*, **2**, 192-200.
- 17) Romero J., Ribo G., Ventura F., Caixach J., Moreno P. and Rivera J. (1992) Ames and sister chromatid exchange tests of organic extracts from drinking water, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**, 259-265.
- 18) 鶴川昌弘、中村清一、西村公志、大竹 徹 (1993) 水道水の安全性の評価と制御に関する研究（第一報）－水道水中に含まれる有機物の安全性について－、衛生化学、**39**(5)、421-439.
- 19) 田中一浩、守田康彦、高橋敬雄 (1993) 新潟県内の水道水・河川水の変異原性について、水環境学会誌、**16**(9)、657-665.
- 20) 山吉孝雄、土井 均、井上嘉高、伊藤 保 (1993) 変異原活性の変動に対するオゾン・粒状活性炭処理効果、水道協会雑誌、**62**(7)、28-37.
- 21) Kusamran W. R., Wakabayashi K., Oguri A., Tepsuwan A., Nagao M. and Sugimura T. (1994) Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters, *Mutation Research*, **325**(2/3), 99-104.

- 22) Filipic M. (1995) Mutagenicity toxicity of water extracts from the Sora river area, *Mutation Research*, **342**, 1-8.
- 23) Filipic M., Lovincic D., Erjavec M., Glavic D. and Planina P. (1995) Toxic and genotoxic activity of water samples from the river Ljubljana, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **55**, 237-244.
- 24) Zehra R., Abdul M., Masood A. (1995) Genotoxicity of the Ganges water at Narora (U.P.), India, *Mutation Research*, **367**, 187-193.
- 25) Zehra R., Abdul M., Masood A. (1995) Mutagenic activity of the ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P.), India, , *Mutation Research*, **343**, 137-144.
- 26) Lerda D. E. and Prosperi C. H. (1996) Water mutagenicity and toxicology in Rio Tercero (Cordoba, Argentina), *Water Research*, **30**(4), 819-824.
- 27) 長井 章、加納芳直、船坂鍬三 (1996) 長良川上流域における河川水の変異原性に関する研究、水環境学会誌、19(8)、657-663.
- 28) Sakamoto H., Ohe T., Hayatsu T. and Hayatsu H. (1996) Evaluation of blue-chitin column, blue-rayon hanging, and XAD-resin column techniques for concentrating mutagens from two Japanese rivers, *Mutation Research*, **371**(1/2), 79-85.
- 29) 信川貴子、讀岐田 訓 (1997) 哺乳動物培養細胞の染色体異常試験による淀川水系水道水の遺伝毒性、水環境学会誌、20(11)、705-709.
- 30) Guzzella L. and Sora S. (1998) Mutagenic activity of lake water samples used as drinking water resources in northern Italy, *Water Research*, **32**(6), 1733-1742.
- 31) Maruoka S. and Yamanaka S. (1980) Production of mutagenic substances by chlorination of waters, *Mutation Res.*, **79**, 381-386.
- 32) Grabow W. O. K., Burger J. S. and Hilner C. A. (1981) Comparison of liquid-liquid extraction and resin adsorption for concentrating mutagens in Ames *Salmonella*/microsome assays on water, *Environ. Contam. Toxicol.*, **27**, 442-449.
- 33) Kfir R., Grabow W. O. K. and Hilner C. A. (1982) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 641.

- 34) Coleman W. E., Munch J. W., Kaylor W. H., Streicher R. P., Ringhand H. P. and Meier J. R. (1984) Gas chromatography /mass spectroscopy analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acid, *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 9
- 35) 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、用水と廃水、**31**、11、992-997.
- 36) 染谷 孝、鯉川（武藤）寿美子、立藤綾子、松藤康司、花嶋正孝 (1992) 変異原性試験による廃棄物埋立処分場浸出水中の微量汚染物質サーベイランス、水環境学会誌、**15**(4)、244-243.
- 37) 染谷 孝、立藤綾子、松藤康司、鯉川（武藤）寿美子、花嶋正孝 (1992) 廃棄物最終処理場の浸出水処理工程における変異原活性の消長、水環境学会誌、**15**(5)、321-326.
- 38) Doerger J. U., Meier J. R., Dobbs R. A., Johnson R. D. and Ankley G. T. (1992) Toxicity reduction evaluation at a municipal wastewater treatment plant using mutagenicity as an endpoint, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **22**, 384-388.
- 39) 上口 浩幸、佐々木大司 (1992) Mutagenicity test as an evaluation of water quality in drinking water、第43回全国水道水研究発表会講演集、787-789.
- 40) 芳倉太郎、西尾孝之、福永 勲 (1994) 海面埋立廃棄物処分場浸出余水の変異原性の特性、水処理技術、**35**(6)、1-12.
- 41) Vargas V. M. F., Guidobono R. R., Jordao C. and Henriques J. A. P. (1995) Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration / extraction procedures, *Mutation Research*, **343**, 31-52.
- 42) Meier J. R., et al. (1983) Formation of mutagens following chlorination of humic acid. A Model for Mutagen Formation during Drinking Water Treatment, *Mutation Res.*, **118**, 25-41.
- 43) 亀井 翼、丹保憲仁、田村聡志 (1985) 塩素処理及びオゾン処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性、水道協会雑誌、**54**(11)、25-33.
- 44) Monarca S., Meier J. R. and Bull R. J. (1983) Removal of mutagens from drinking water by granular activated carbon, *Water Res.*, **17**, 1015-1026.

- 45) Ross W. D., Hillmam W. J., Wininger M. T., Gridley J., Lee L. F. and Hare R. J. (1981) Aqueous effluent concentration for application to biotest systems, *Environmental Science Research*, **22**, 189-199.
- 46) Douglas G. R., Nestmann E. R., Mckague A. B., Kamra O. P., Lee E. G.-H., Ellenton J. A., Bell R., Kowbel D., Liu V. and Pooley J. (1983) Mutagenicity of pulp and paper mill effluent : A comprehensive study of complex mixtures, *Environmental Science Research*, **27**, 431-459.
- 47) Kool H. J. and Kreijl C. F. V. (1984) Formation and removal of mutagenic activity during drinking water preparation, *Water Res.*, (18), 1011-1016.
- 48) 橋爪 崇、横山 剛、沢田洋介、河合 敦、伊神生雄、神木照雄、木苗直秀、富田 勲 (1985) ポリエチレン多孔質中空糸膜による飲料水中変異原野吸着と吸着変異原の若干の性質、*衛生化学*, **31**(6)、385-390.
- 49) Mcgeoge L. J., Louis J. B., Atherholt T. B. and McGerrity G. J. (1985) Mutagenicity analyses of industrial effluents: Results and considerations for integration into water pollution control programs, *Environmental Science Research*, **32**, 247-268.
- 50) Wigilius B., Boren H., Carlberg G. E., Grimvall A. and Moller M. (1985) A comparison of methods for concentrating mutagens in drinking water. Recovery aspects and their implications for the chemical character of major unidentified mutagens, *The Sci. Total Environ.*, **47**, 265-272.
- 51) Backlund P., Kronberg L., Pensar G. and Tikkanen L. (1985) Mutagenic activity in humic water and alum flocculated humic water treated with alternative disinfectants, *The Science of the Total Environment*, **47**, 257-267.
- 52) Yasuyoshi Sayato, Katsuhiko Nakamuro and Hitoshi Ueno (1987) Studies on preconcentration methods for detecting the mutagenicity of organics in drinking water, *EISEI KAGAKU*, **33**, 328-336.
- 53) 浦野紘平、芳賀伸之、江本ふで子 (1987) 水道水等の変異原性試験方法、水道協会雑誌、**57**(3)、36-48.
- 54) 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 the Total Environment*, **74**, 177-189.
- 55) Urano K., Haga N. and Emoto F. (1988) Method for evaluating mutagenicity of water II . Conditions for applying new sample preparation method to the Ames test, *The Science of the Total Environment*, **74**, 191-198.
- 56) 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.
- 57) Galassi S., Guzzella L. and Sora S. (1989) Mutagenic potential of drinking waters from surface supplies in northern Italy, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **8**, 109-116.
- 58) Huck P. M., Anderson W. B., Savage E. A., Von Borstel R. C., Daignault S. A., Rector D. W., Lrvine G. A. and Williams D. T. (1989) Pilot scale evaluation of ozone and other drinking water disinfectants using mutagenicity testing, *Ozone Science & Engineering*, **11**, 245-269.
- 59) 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.
- 60) 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.
- 61) Nakamuro K., Ueno H. and Sayoto Y. (1992) Evaluation of mutagenicity of municipal river water concentrated using XAD resin column method, *Wat Sci Tach.*, **25**(11), 293-299.
- 62) 大村 実、鯉川寿美子、染谷 孝、稲益建夫、花嶋正孝、石西 伸 (1992) 廃棄物最終処分場の浸出水に含まれる変異原性物質の濃縮方法の比較検討、水環境学会誌、**15**(1)、52-61.
- 63) 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**(11)、814-821.
- 64) Utsumi H., Kiyoshige K., Mitade C., Han K-S., Hakoda M., Manabe H. and Hamada A.

- (1992) Mutagenicity and cytotoxicity of tap and raw water and their potential risk, *Water Science and Technology*, **26**(1-2), 247-254.
- 65) Aso S., Hayashi J., Kusakabe K., Morooka S., Sera N., Horikawa K. and Tokiwa H. (1992) Effect of preozonation on mutagenic activity generated by chlorination of humic acid dissolved in water, *Water Sci. Tech.*, **25**(11), 355-362.
- 66) Omura M., Inamura T. and Ishinishi N. (1992) Mutagenicity activity of the leachate of municipal solid waste landfill, *Mutation Research*, **298**, 125-129.
- 67) Ono Y., Somiya I. and Kawaguchi T. (1993) Evaluation of genotoxic potency on substances contained in night soil and its reduction performance by ozonation, *Ozone Water Wastewater Treat.*, **1**, S.7.53-S.7.61.
- 68) 山吉孝雄、土井 均、井上嘉高、伊藤 保 (1993) 変異原活性の変動に対するオゾン・粒状活性炭効果、水道協会雑誌、**62**(7)、28-37.
- 69) Mao I. F., Chen M. L., Lan C. F., Chang Y. P. and Chang S. C. (1994) Mutagenicity determination of the wastewater emitted from petrochemical industry in Taiwan, *Water, Air and Soil Pollution*, **76**, 459-466.
- 70) Magara Y., Kurosawa Y. and Hisamatu Y. (1994) Evaluation of a water purification system referring to mutagenicity, *Aqua*, **43**(5), 252-261.
- 71) Tuhkanen T. A., Kainulainen T. K., Vartiainen T. K. and Kalliokoski P. J. (1994) The effect of preozonation, ozone / hydrogen peroxide treatment, and nanofiltration on the removal of organic matter from drinking water, *Ozone Science & Engineering*, **16**, 367-383.
- 72) Chang E. E., Chang S-C. and Chiang P-C. (1995) Analyses of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) and mutagenicity in raw and chlorinated water, *Toxicological and Environmental Chemistry*, **52**(1/4), 177-189.
- 73) Itoh S. and Murakami H. (1995) Activities inducing chromosomal aberrations of waters treated with disinfectants and their stability, *Water Supply*, **13**(3/4), 89-94.
- 74) Demarini D. M., Abu-Shakra A., Felton C. F., Patterson K. S. and Shelton M. L. (1995) Mutation spectra in *Salmonella* of chlorinated, chloraminated, or ozonated drinking water extracts : Comparison to MX, *Environment and Molecular Mutagenesis*, **26**, 270-285.

- 75) Rehana Z., Malik A. and Ahmad M. (1995) Mutagenic activity of the Ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj, *Mutation Research*, **343**(2/3), 137–144.
- 76) Rao S. S., Burnison B. K., Quinn B. K., Hayes M. A. and Metcalfe C. D. (1995) Assessment of the genotoxic potential of pulp mill effluent using bacterial, fish and mammalian assays. *Chemosphere*, **31**(6), 3553–3566.
- 77) Metcalfe C. D., Nanni M. E. and Scully N. M. (1995) Carcinogenicity and mutagenicity testing of extracts from bleached kraft mill effluent, *Chemosphere*, **30**(6), 1085–1095.
- 78) Rehana Z., Malik A. and Ahmad M. (1996) Genotoxicity of Ganges water at Narora (U. P.), India. *Mutation Research*, **367**(4), 187–193.
- 79) Itoh S. and Matsuoka Y. (1996) Contributions of disinfection by-products to activity inducing chromosomal aberrations of drinking water, *Water Research*, **30**(6), 1403–1410.
- 80) 毛利紫乃、宗宮 功、小野芳朗 (1996) 都市水環境中に存在するヒト食生活由来の遺伝毒性物質のリスク評価、水環境学会誌、**19**(11)、847–854.
- 81) Filipic M. and Toman M. J. (1996) Ecotoxicological studies using modified Ames bioassay, *Water Science and Technology*, **34**(7/8), 1–7.
- 82) Zhou S. W., Xu F. D., Li S. M., Song R. X., Qi S., Zhang Y. and Bao Y. P. (1997) Major origin of mutagenicity of chlorinated drinking water in China : Humic acid or pollutants, *The Science of the Total Environment*, **196**, 191–196.
- 83) Otsu R., Horikawa K. and Min B. Y. (1998) Mutagenicity of river water in Korea, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**(4), 615–619.
- 84) Lopez L. C., Bassi M., Tzicas E. and Moretton J. (1998) Genotoxicity study of a leather tanney's waste waters, *Journal of Society of Leather Technologists and Chmists.* **82**(4), 159–161.
- 85) 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.
- 86) Ringhand H. P., Meier J. R., Kopfler F. C., Schenck K. K., Kaylor W. H. and Mitchell D. E. (1986) Importance of sample pH on the recovery of mutagenicity from drinking water by

XAD resins, *National Meeting, American Chemical Society, Div. Environ. Chem., Anaheim, California, 1986*, 293–295.

- 87) 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.
- 88) 労働省化学物質調査課 (1991) 安衛法における変異原性試験、中央労働災害防止協会、pp. 173、東京.
- 89) Takanashi H., Urano K. (1998) Statistical procedures for estimating the detection limit and determination limit of the Ames *Salmonella* mutagenicity assay, *The Science of the Total Environment*, **221**, 31–42.
- 90) 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.
- 91) 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.

第 4 章

日本における水道水の 変異原性強度の解析

第4章 日本における水道水の変異原性強度の解析

1. はじめに

第1章で述べたように、水道水中に存在する多種多量の化学物質の安全性を Ames 変異原性などの総括的な遺伝子毒性指標により評価し、管理する必要がある。しかし、日本においては、Ames 変異原性などを水質評価に取り入れて水質の監視、規制を行っている例はなく、1992 年 12 月に 15 年ぶりに改正された水道水質基準¹⁾にも採用されていない。このため、日本の水道水が多種多量の化学物質により複合汚染されている実態を明らかにし、遺伝子毒性に対する規制や対策等を実施することの必要性を示す必要がある。しかし、一部の先進的な浄水場での変異原性の測定例²⁻⁵⁾や、限られた地域における水道水の変異原性測定例⁶⁻¹⁶⁾はあるものの、それらは断片的であり、また、測定方法や評価方法が統一されていないために相互比較ができないので、日本全体の水道水の変異原性強度（汚染実態）を明らかにするには至っていない。また、それらの研究で用いられた変異原性物質の濃縮・回収方法が第3章で開発された方法^{17, 18)}と比較して変異原性物質の回収率、濃縮率の点において著しく劣ると考えられる場合や回収率が不明な場合が多く、十分に定量的な結果を得るには至っていない。

そこで本章では、比較的簡易で高精度であり、適用例も多く比較検討し易い Ames 変異原性試験に着目し、日本の水道水の変異原性強度の本格的な実態調査を行って日本の水道水の変異原性レベルを明らかにすることにより、規制や自主管理等の必要性を示した。また、変異原性強度を解析し、水道水中の変異原性物質の変異の型、水源の種類との関係などを考察して、規制や対策等の実施の一助とした。

2. 実験方法

2. 1 試料水の採水地点と採水方法

採水地点は、水道水の変異原性レベルの実態を知るために、日本全国の各地域を網羅するように23都道府県の各1カ所を選び、1992年12月、93年2月、5月、8月、10月に採水した。採水地点とその地点の水道水源をTable 4-1に、その地点に給水している浄水場での浄水処理方法をTable 4-2に示す。ただし、これらは平成3年度の水道統計¹⁹⁾に記されているものであり、採水時に多少変更されている可能性がある。また、複数の浄水場の水道水を混合している場合は、寄与率が大きい浄水場の原水の種類を示した。これらの採水地点のうち、汚染が進んでいると予想された東京都墨田区、千葉県旭市、大阪府大阪市、および汚染度が平均的と予想された神奈川県横浜市の4都市では変異原性の経月変化を調査するために毎月採水した。

試料水は、実際の家庭や大学などで飲料水として用いられている蛇口から採取した。採水方法は、水栓を開いて水道水を3分程度流して管内に長時間滞在していたたまり水を排水した後、採水容器を共洗いしてから5lまたは20lのポリ容器に満水にして採取することとした。試料水は、採取後、可能な限り早く濃縮を行ったが、すぐに濃縮できない場合には5℃に冷却して保存した。

なお、ポリ容器からの変異原性物質の溶出を確認するために、ポリ容器に純水を入れて24時間放置して1,000倍に濃縮し、TA100-S9の条件で変異原性が検出されないことをあらかじめ確認した。

Table 4-1
Sampling places, waterworks and water sources¹⁾

Pref.	City	Water source	Raw water
Hokkaido	Sapporo city	Toyohira river	Surface
Miyagi	Sendai city	Kamafusa dam	Dam
Yamagata	Sakata city	Mogami river	Surface
Ibaraki	Tsukuba city	Kasumigaura lake	Lake
Tochigi	Utsunomiya city	Oya river	Surface
Saitama	Urawa city	Arakawa river	Dam effluent
Chiba	Asahi city	Kurobe river	Dam effluent + dam
Tokyo	Sumida ward	Edo river	Surface
Kanagawa	Yokohama city	Sagami lake system	Dam effluent
Niigata	Niigata city	Shinano river	Surface
Ishikawa	Kanazawa city	Uchikawa dam	Dam effluent
Yamanashi	Kofu city	Arakawa river system	Surface + dam effluent
Nagano	Nagano city	Kawai well	Deep well
Gifu	Gifu city	Iwanoda well	Deep well
Shizuoka	Shizuoka city	Makigaya well	Deep well
Aichi	Nagoya city	Kiso river	Surface
Osaka	Osaka city	Yodo river	Surface
Hyogo	Amagasaki city	Yodo river	Surface
Shimane	Matsue city	Senbon + Otani reservoir	Dam
Hiroshima	Hiroshima city	Maehayase water intake	Surface
Ehime ¹⁾	Matsuyama city	Ishitegawa dam	Dam effluent
Kochi	Kochi city	Kagami river	Infiltration
Fukuoka	Kitakyushu city	Estuary weir + Tonda reservoir	Surface + dam
Fukuoka ¹⁾	Fukuoka city	Koishiwara river + Nakagawa river	Dam effluent + surface
Kagoshima	Kagoshima city	Koutsuki river	Surface

1) Sampling time was once.

Table 4-2
Water treatment processes of each waterworks¹⁷⁾

City	Rapid filtration	Slow filtration	Pre- chlorination	Intermediate- chlorination	Post- chlorination ¹⁾	Iron & manganese removal	Powdered activated carbon	Granular activated carbon	Ozone	Biological oxidation
Sapporo city	O			O	O	O				
Sendai city	O		O		O					
Sakata city	O		O	O						
Tsukuba city	O				O	O		O		O
Utsunomiya city		O			O					
Urawa city	O		O	O	O					
Asashi city	O		O	O	O					
Sumida ward	O		O	O			O	Δ	Δ	
Yokohama city	O			O	O	O				
Niigata city	O			O						
Kanazawa city	O			O	O					
Kofu city	O		O		O					
Nagano city					O					
Gifu city					O					
Shizuoka city					O					
Nagoya city	O			O						
Osaka city	O		O	O	O		O			
Amagasaki city	O		O		O		O	Δ	Δ	
Matsue city		O			O		O			
Hiroshima city		O								
Matsumoto city	O		O		O					
Kochi city	O	O	O		O					
Kitakyusyu city	O		O	O	O		O			
Fukuoka city	O		O	O	O					
Kagoshima city					O					

Δ : Partial treatment, 1) Including only disinfection

2. 2 有機物濃度等の測定

試料水の水質指標として、以下の項目について測定した。

1) 全有機炭素 (TOC) 濃度の測定

水中有機物の総濃度として、TOC 濃度を島津製作所製の 2 チャンネル全有機炭素計 TOC-5000 型を用いて測定した。

2) 紫外吸光度の測定

フミン質などの芳香族性の水中有機物質濃度の指標として、260 nm の吸光度 A_{260} を日本分光製の可視紫外分光光度計 UVIDEC-430 型または島津製作所製の可視紫外分光光度計 UV1200 型と光路長 50 mm の石英セルを用いて測定した。また、一部の試料水については水中有機物の特徴を調べるために 200 nm から 300 nm までの吸光スペクトルも測定した。

3) 全有機ハロゲン (TOX) 濃度の測定

水中有機塩素化合物の総濃度として、TOX 濃度を三菱化学製の全有機ハロゲン分析装置 TOX-10 型を用いて測定した。

4) その他の水質

遊離塩素濃度を HACH 製のデジタル直読水質分析器 DR/3000 で測定した。また、試料水の pH 調整のため、pH を東亜電波製の HM-10 型 pH メータで測定した。

2. 3 Ames 変異原性の測定

2. 3. 1 変異原性物質の濃縮

水道水の変異原性を測定するためには、変異原性物質を濃縮する必要がある。本章では、第3章で開発した、簡易で、濃縮率、回収率とも高くできる Sep-Pak Plus CSP-800 を用いた固相吸着脱離法^{17,18)}によって濃縮を行なった。この濃縮方法のフローをFig. 4-1 に示す。すなわち、多孔質疎水性樹脂 (CSP800) を充填した内容積 2 ml のカートリッジである日本 Waters 社製 Sep-Pak Plus CSP-800 をあらかじめ精製・コンディショニングしておき、残留遊離塩素を消去しないまま約 2.5 M の硫酸を用いて pH を 2 に調整した試料水 2 l を $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で通水して変異原性物質を吸着した。

変異原性物質を吸着した各カートリッジに、カートリッジ内に試料水を残した状態で通水方向と逆方向から上向流、 $0.15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ でジメチルスルホキシド (以下、DMSO) を通液し、変異原性物質を脱離した。脱離液は、カートリッジから DMSO が流出しはじめてから 2 ml を採取した。すぐに Ames 変異原性試験できない場合は、採取した脱離液を -20°C 以下で保存した。

第3章で示したように、以上の方法によって試料水中の変異原活性の 90% 以上が回収・濃縮されることがすでに明らかになっている^{17,18)}。

2. 3. 2 Ames 変異原性試験

Ames 変異原性試験は、労働省のガイドブック²⁰⁾を基にしてプレーンキューベーション法で行った。初めは TA98 株と TA100 株の菌株を用い、代謝活性化物質 S9mix を添加した条件としない条件の 4 条件について検討した。しかし、日本の水道水が示す最も強い変異の型が明らかになってからは、その型の変異原性物質を検出できる条件のみで詳細調査を行った。菌株は国立公衆衛生院地域環境衛生学部より提供を受け、S9mix にはオリエンタル酵母製のフェノバルビタールおよび 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、4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO) を用いた。

Ames 変異原性試験は、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 2 枚のプレートを用いて行った。また、菌体の活性を確認するために、検液の添加

量 $[100 \mu\text{l} \cdot \text{plate}^{-1}]$ と同量の DMSO のみを添加した 4 枚のプレートを用いた陰性対照試験と、4NQO を $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{plate}^{-1}$ 添加した 2 枚のプレートを用いた陽性対照試験を毎回行った。各試験での復帰コロニー数はオリンパス社製コロニーカウンタ OL-502A 型を用いて計数した。これらの結果から試料水換算の検液添加量と復帰コロニー数との関係を描き、回帰直線の勾配を最小二乗法で求め、濃縮前の試料水 1 l あたりに換算した正味の復帰コロニー数 $[\text{net rev.} \cdot (\text{l-試料水})^{-1}]$ として変異原性の強度を表示した。なお、第 2 章で明らかにしたとおり、本章の研究のように 4 枚のプレートでの陰性対照試験と 2 枚のプレートでの検体試験を行った場合には、陰性対照値の 1.4 倍以上の値が得られなければ陽性と判断できないので、MR 値が 1.4 未満の場合には N.D.と表示した。また、試験結果が N.D.になる変異原性の上限を Eq. 4-1 より求め、試験全体の検出限界（以下、検出限界）とした²¹⁾。

$$\text{試験全体の検出限界値} = \frac{1.4 \times R_0 - R_0}{D_m} \quad (4-1)$$

ただし、 R_0 は陰性対照試験の 4 枚のプレートの復帰コロニー数の平均値 $[\text{rev.} \cdot \text{plate}^{-1}]$ 、 D_m は 1 プレートあたりの試料水換算最大添加量 $[\text{l-試料水} \cdot \text{plate}^{-1}]$ である。

本章の研究全体での陰性対照試験の 4 枚のプレートの平均値は $104 \sim 199 \text{ rev.} \cdot \text{plate}^{-1}$ であった。その変動係数は 12%以下であり、ほぼ一定であった。また、陽性対照試験の 2 枚のプレートの平均値は $8,900 \sim 11,000 \text{ net rev.} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ であり、大きな変化はなかった。これらのことから、本章の研究における菌体の活性、ヒスチジン・ビオチン溶液の濃度、菌懸濁液調製条件などの復帰コロニー数に影響を与える因子は一定に保たれており、復帰コロニー数同士を比較できることが確認された。

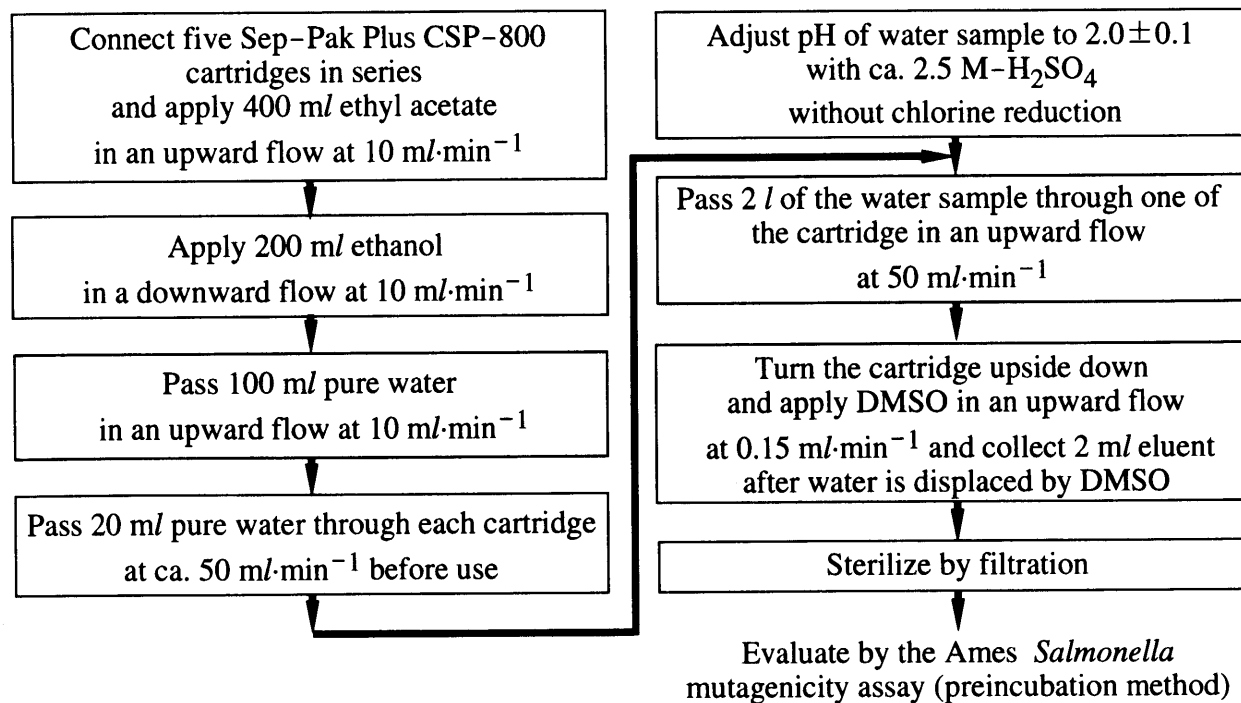


Fig. 4-1. Procedure for concentration of mutagens from water sample.

3. 結果と考察

3. 1 水道水の変異原性

3. 1. 1 変異の型

日本の水道水が示す最も強い変異の型を明らかにするために、それぞれ採水時期が異なる 14 箇所の水道水の Ames 変異原性を TA98±S9、TA100±S9 の条件で測定した。試料水換算の検液添加量と復帰コロニー数との関係は、Fig. 4-2 に例を示すように、いずれの場合も水道水換算で 0.1 l の用量までは良い直線関係が得られた。そこで、このような回帰直線の勾配から試料水 1 l あたりの変異原性を求めた。その結果、Table 4-3 に示すように、いずれの水道水でも TA100-S9 での値が最も高く、TA98±S9、TA100+S9 での値は TA100-S9 の値に比べて 5 分の 1 以下であった。特に、+S9 での値はすべて N.D. であり、代謝活性化されると変異原性が弱くなることが明らかになった。

第 1 章で述べたように、水道水 1 l あたりの正味の変異原性として最も高い値が検出されたとする試験菌株の種類、代謝活性剤の有無については、TA100-S9^{15, 16, 22)}、TA98-S9 とする報告^{23, 24)}が多く、+S9 で試料水 1 リットルあたりの変異原性が最も高くなったとする報告はほとんどない。+S9 とする報告は、ブルーレイオンを用いて多環芳香族のみを選択的に濃縮した報告²⁵⁾、および TA98+S9 で最も高い値を得たとしているが 11 net rev. · l⁻¹ と非常に低い報告³⁾であり、水道水中のごく一部の物質についてのみ評価しているか、回収率が低くて適切な議論がなされていない報告のみである。また、一部の報告で TA98-S9 の条件で最も高くなるとされているが、同様に濃縮方法が適切でなく、一部の物質しか回収できていなかったことが考えられる。

これらのことより、日本の水道水の変異原性に対する塩基対置換型の直接変異原性物質の寄与率が高いこと、また、間接変異原性物質はほとんど含まれていないことが明らかになった。すなわち、日本の水道水の変異原性を評価・管理する場合、TA100-S9 の条件で試験すればよく、TA98±S9、TA100+S9 の条件は必要に応じて行えばよいことが明らかになった。このため、以後の検討では、TA100-S9 の条件のみで試験することにした。

3. 1. 2 変異原性強度

回帰直線の勾配から試料水 1 l あたりの変異原性を求め、Table 4-4、Table 4-5 および Fig. 4-3 にまとめて示す。最低値は Eq. 4-1 より求めた検出限界 (490~780 net rev. · l⁻¹) 以下 (N.D.) であるのに対して最高値は 9,200 net rev. · l⁻¹ であり、最低値を検出限界値の 2 分の 1 とみなすと最高値は最低値の約 30 倍高い値であった。なお、これ以降、N.D.であったデータは検出限界値の 2 分の 1 として取り扱った。

また、Table 4-4 に示した全国 23 都市についての 108 回の測定結果の累積度数分布を Table 4-6 に示す。ただし、松山市と福岡市は 1 回しか測定しなかったのを除外した。3,000 net rev. · l⁻¹ 以下が 76% を占めており、墨田区、旭市、浦和市、大阪市、尼崎市、北九州市などの水源汚染の進んだ地域で 3,000 net rev. · l⁻¹ 以上の場合が多かった。本章の研究での採水地域は厳密な基準で選んだわけではなく、やや汚染の進んだ地域を多く選んでいるので、Table 4-6 の結果は全国的な水道水の変異原性の分布よりやや高い方にずれていると考えられる。すなわち、3,000 net rev. · l⁻¹ 以上となる地域は全国の水道水のうちで少なくとも 4 分の 1 以下であると考えられる。

変異原性試験の結果を発がんリスクに換算して論じることには問題が多いが、現状の水道水の変異原性強度が対策を施すべきレベルか否かを検討するために、陽性対照物質として用いた 4NQO と、ユニットリスク²⁶⁾または実質安全量 (Virtual Safe Dose, VSD)²⁷⁾が明らかになっており、かつ TA100-S9 の条件で陽性となるベンジルクロリド、スチレンオキシド、エピクロロヒドリン、キャプタンの 4 物質を用いて生涯発がんリスクに換算して考察した。換算は、Eq. 4-2 または Eq. 4-3 に従い、発がん物質の摂取量と生涯発がんリスクが正比例すると仮定して行った。

$$E = \frac{UR \times m}{a} \quad (4-2)$$

$$E = \frac{D \times m}{a} \times \frac{10^{-5}}{VSD} \quad (4-3)$$

ここで、E は生涯発がんリスク[-]、UR はユニットリスク[(μg · l⁻¹)⁻¹]、m は水道水の変異原性[net rev. · l⁻¹]、a は換算に用いる物質の比活性 [net rev. · μg⁻¹]、D は一日当たりの水道水摂取量[l · d⁻¹]、VSD は実質安全量[μg · d⁻¹]である。

水道水を1日2 l²⁸⁾飲料する ($D=2 \text{ l} \cdot \text{d}^{-1}$) と仮定して生涯発がんリスクを算出した結果を Fig. 4-4 に示す。例えば、水道水の変異原性が $3,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ の場合、生涯発がんリスクは 9.2×10^{-6} から 2.0×10^{-2} と算出され、生涯発がんリスクが最も低く算出されるキャプタンでも 9.2×10^{-6} と WHO ができる限り対策を施した方がよいとしているリスクレベルの 10^{-5} に近い値となった。したがって、他の物質を用いて換算を行っても 10^{-5} を超える場合が多く、 $3,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ の水道水は生涯発がんリスクが 10^{-5} を超える可能性が高いと考えられる。

なお、水道水質基準の設定リスクも 10^{-5} であるが、水道水質基準の設定リスクが個々の物質に対してそれぞれ設定されているのに対して、バイオアッセイの結果から求めたリスクは水中から回収されたすべての物質の総合リスクとなり、リスクを算出する際の対象物質数に違いがある。このため、バイオアッセイの結果から求めたリスクは水道水質基準の設定リスクより高くてもよいとの指摘がある。しかし、水道水質基準は、安全係数を用いることによって複数の物質のリスクを積算しても 10^{-5} を超えないように考慮されて設定されている。すなわち、水道水質基準も、水道水中に含まれるすべての化学物質の総合リスクが 10^{-5} を超えないように設定されていると考えられる。このため、バイオアッセイの結果から求めたリスクが水道水質基準の設定リスクより高くてもよいとは考えにくい。

バイオアッセイで得られた値から発がんリスクを明確に断言することは不可能だが、同一の試験系で発がんに関するリスクを相対的に比較することは可能である。また、発がん性との関係は不明確でも水道水の変異原性が高いことは明らかに好ましくないことである。したがって、まず、少なくとも他の地域より明確に高い変異原性の水道水を供給している地域から優先的に水源の水質保全対策や高度浄水処理などの対策を講じて、日本全体の水道水の変異原性レベルを低減していくことが望ましい。例えば、本研究での調査結果で全体の4分の1以下であった $3,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ を越えるような地域から順次、水質を改善することが考えられる。

3. 1. 3 地域差および年間変動

各地域の変異原性の年間平均値を算出し、Table 4-4 に示した。各地域の年間平均値

は 290~4,400 net rev. · l⁻¹ であり、最も変異原性が低い地域と高い地域とでは約 15 倍の差があった。すなわち、単純に考えれば、現在の水道水質基準に適合している水道水でも遺伝子障害の危険性が地域によって 15 倍異なることになり、個別有害物濃度による水質管理に加えて、変異原性による水質管理を行う必要性が示された。

次に、各地域の変異原性強度の最低値分の最高値、すなわち年間変動率を算出した。すべての測定値が N.D. だった地点を除いて、年間変動率は 1.4~4.7 であり、年間 5 回測定した地域の平均年間変動率は 2.7、年間 12 回測定した 4 都市では 3.9 であった。

また、Table 4-4 に示したように、12 月は 3,000 net rev. · l⁻¹ 以上が 4 カ所、2 月は 7 カ所、5 月は 9 カ所、8 月は 2 カ所、10 月は 4 カ所であり、2 月と 5 月には 3,000 net rev. · l⁻¹ 以上になった地域が多かった。さらに、Table 4-4 および Table 4-5 に示した測定結果から、変異原性の経月変化を Fig. 4-5 および Fig. 4-6 に示す。変異原性は、1 月から 5 月にかけては高いのに対し、6 月から 12 月にかけては低く、どの地域でもほぼ 4,000 net rev. · l⁻¹ 以下で低いことが認められた。なお、1993 年は冷夏・長雨であったが、過去の研究¹²⁾においても冬期に変異原性が高く、夏期に低いという傾向が認められた。したがって、水道水の変異原性は、冬期から春期にかけて高くなり、夏期から秋期にかけて低くなる傾向があるといえる。この原因については、3. 2. 4 でさらに検討する。

以上より、個別有害物濃度による水質管理に加えて、1 年に数回以上は変異原性を測定し、管理する必要があると考えられる。特に、変異原性が極端に高くなることがある冬期から春期にかけては重点的に監視し、対策をとる必要があると考えられる。

3. 1. 4 TOC、A₂₆₀、TOX との相関

全ての測定結果について、有機物の総濃度を表す TOC、フミン質などの芳香族構造を分子内に含む有機物の濃度に対応する A₂₆₀、有機ハロゲン化合物の総濃度を表す TOX と変異原性との相関をそれぞれ Fig. 4-7 から Fig. 4-9 に示す。いずれも水質値が高いと変異原性が高いという右上がりの傾向が認められたものの相関係数は小さく、従来水質値から変異原性の強度を推算することはできなかった。すなわち、同じ水質値でも変異原性には約 10 倍もの大きな差があり、これらの一般的な水質値とは別に変異原性を測定して水質の評価と管理を行うことが必要であるといえる。なお、TOX との

相関係数がやや大きく、変異原性は塩素処理で生成する有機ハロゲン化合物と関係があることが示唆された。また、これらの関係から、TOC が約 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 未満、50 mm セルでの A_{260} が $0.03 \cdot 50 \text{ mm}^{-1}$ 未満、または TOX が $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 未満の良質の水道では変異原性が $3,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ を越える可能性は少ないことが明らかになった。

3. 1. 5 水源の種類との関係

水源の種類を、水道統計¹⁹⁾をもとにして表流水、ダム水または湖沼水（以下ダム水等）、表流水・ダム水混合（以下混合水）、深井戸水または伏流水（以下地下水等）の4種類に分類した。水源の種類ごとに、TOC、 A_{260} 、TOX と水道水の変異原性との相関関係をプロットし、それぞれ Fig. 4-7 から Fig. 4-9 に示す。

地下水等を水源としている地域の水道水は、変異原性、TOC、 A_{260} 、TOX のいずれの値も低かった。しかし、その他の種類の水源を用いている地域では、地下水等を水源としている地域の水道水に比べて変異原性、TOC、 A_{260} 、TOX のいずれの値も高かった。これらのことより、地下水などように、少量の自然由来の有機物が含まれているだけで人間活動由来の有機物がほとんど含まれない原水中には変異原前駆物質がほとんど含まれないこと、および表流水などの中に含まれる人間活動由来の有機物中には変異原前駆物質が多く含まれていることが示唆された。

また、地下水等以外の種類の水源を用いている地域では各水質値が広範囲に分布しており、水源の種類と変異原性との明確な関係は認められなかった。このため、水道水中の有機物の特徴から水源の種類と変異原性との関係を考察した。TOC あたりの変異原性と TOC、 A_{260}/TOC 、 TOX/TOC との関係を水源の種類ごとにプロットし、Fig. 4-10 から Fig. 4-12 に示す。TOC あたりの変異原性、 A_{260}/TOC 、 TOX/TOC を算出するにあたり、TOC が $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下の場合は、TOC の測定精度が低いために計算から除いた。地下水等では、TOC が $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下の場合が多いためにプロットが3点しかないが、TOC あたりの変異原性および TOX/TOC が小さく、地下水中に含まれる有機物が変異原性物質および有機ハロゲン化合物を生成しにくいことが明らかになった。このことから、人間活動由来の有機物が水道水源に混入することが水道水の変異原性を高くし、水道水の変異原性と相関関係が強い TOX 濃度を高くする原因になっているこ

とが、再度示唆された。しかし、地下水等以外の種類の水源を用いている地域では各水質値が広範囲に分布しており、水中の有機物の特徴からも水源の種類と変異原性との明確な関係は認められなかった。

3. 1. 6 前塩素処理との関係

これまでの研究により、変異原性物質が主に塩素処理によって生成することが明らかになっている^{8, 12, 31-38)}。浄水処理における塩素処理法には、前塩素処理、中塩素処理、後塩素処理（消毒のみを含む）の3種類がある。今回採取した水道水の浄水処理方法は Table 4-2 に示したとおりであり、様々な浄水処理方法が採用されている。前塩素処理を行うと、分子量の大きな有機物も塩素処理される。これに対して、凝集沈澱処理後の中塩素処理や後塩素処理では、凝集沈澱処理で分子量の大きい有機物が除去されるため、比較的分子量の小さい有機物しか塩素処理されない。そこで、前塩素処理を行っているか否かに分けて TOC と TOC あたりの変異原性との関係を調べて Fig. 4-13 に示す。

全体的に前塩素処理をしていない場合の方が TOC が低くなっている。これは、原水の有機物濃度が低く、水質のよい地域では前塩素処理をしていないことを示している。逆に、TOC が $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上で前塩素処理していない場合は少なく、TOC が高いわりに変異原性の低い特異な性質を示すつくば市の水道水を除くと、4 地域しかなかった。このため、TOC が $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上の場合での前塩素処理の影響については不明であった。TOC が $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下の場合については、前塩素処理を行っている方がやや TOC あたりの変異原性が高い水が多いものの、明確な差はなかった。すなわち、凝集沈澱処理で除去される分子量の大きい有機物からも、除去されない分子量の小さい有機物からも変異原性物質が生成することが示唆された。

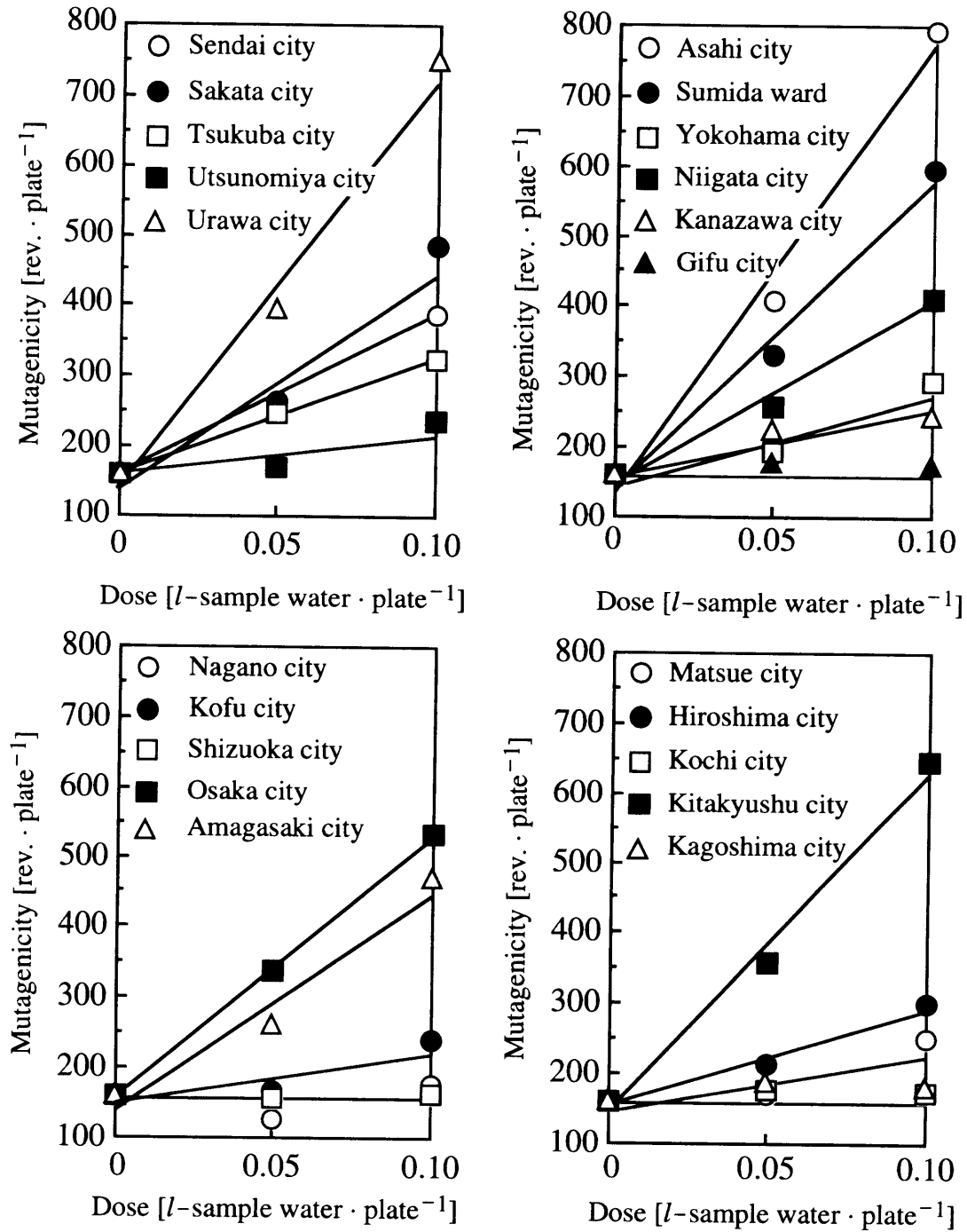


Fig. 4-2. Examples of dose-response line (Feb., 93).

Table 4-3
Type of mutagen in tap water

Sampling point	TA98-S9 ¹⁾ [net rev. · l ⁻¹]	TA98+S9 ²⁾ [net rev. · l ⁻¹]	TA100-S9 [net rev. · l ⁻¹]	TA100+S9 ³⁾ [net rev. · l ⁻¹]
Tochigi (May, '93)	290	N.D.	2,000	N.D.
Saitama (Oct, '93)	250	N.D.	2,800	N.D.
Chiba (Mar, '93)	290	N.D.	9,100	N.D.
Tokyo (Sep, '93)	370	N.D.	2,800	N.D.
Kanagawa (Jan, '93)	170	N.D.	900	N.D.
Niigata (May, '93)	120	N.D.	3,600	N.D.
Ishikawa (Aug, '93)	N.D.	N.D.	1,100	N.D.
Yamanashi (Aug, '93)	380	N.D.	2,600	N.D.
Osaka (Apr, '93)	270	N.D.	6,500	N.D.
Hyogo (Feb, '93)	270	N.D.	3,100	N.D.
Hiroshima (Aug, '93)	N.D.	N.D.	840	N.D.
Kochi (May, '93)	N.D.	N.D.	910	N.D.
Fukuoka (Feb, '93)	280	N.D.	4,900	N.D.
Kagoshima (Dec, '93)	130	N.D.	800	N.D.

1) TA98-S9 : N.D. < 110 net rev. · l⁻¹

2) TA98+S9 : N.D. < 340 net rev. · l⁻¹

3) TA100+S9 : N.D. < 420 net rev. · l⁻¹

Table 4-4
Mutagenicity of tap water in 23 cities

City	Mutagenicity [net rev. · l ⁻¹]					Mean ¹⁾
	Dec 92	Feb 93	May	Aug	Oct	
Sapporo city	1,300	—	1,100	2,600	2,400	1,900
Sendai city	—	2,300	2,300	1,900	2,700	2,300
Sakata city	2,200	3,200	3,600	2,700	3,600	3,100
Tsukuba city	1,500	1,600	1,600	530	2,500	1,500
Utsunomiya city	1,400	750	2,000	1,500	1,200	1,400
Urawa city	3,300	5,900	7,800	2,300	2,800	4,400
Asahi city	4,300	6,300	2,300	3,700	2,500	3,800
Sumida ward	2,600	4,400	3,500	3,000	3,300	3,400
Yokohama city	1,500	1,300	3,200	930	1,300	1,700
Niigata city	2,000	2,500	3,600	1,900	3,000	2,600
Kanazawa city	N.D.	800	1,400	1,100	770	900
Kofu city	1,600	820	2,700	2,600	1,700	1,900
Nagano city	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	620	360
Gifu city	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	290
Shizuoka city	N.D.	N.D.	—	—	N.D.	330
Nagoya city	1,900	—	3,200	1,400	1,600	2,000
Osaka city	4,700	3,700	6,400	2,000	2,600	3,900
Amagasaki city	3,300	3,100	3,700	2,000	2,600	2,900
Matsue city	1,200	910	2,500	—	1,400	1,500
Hiroshima city	1,600	1,400	2,200	840	1,000	1,400
Matsuyama city	1,000	—	—	—	—	—
Kochi city	N.D.	N.D.	910	700	N.D.	520
Kitakyushu city	—	4,900	6,400	2,300	3,100	4,200
Fukuoka city	1,000	—	—	—	—	—
Kagoshima city	800	N.D.	N.D.	500	870	550
N.D.	<780	<640	<490	<470	<530	—

1) N.D. data were assumed to be the half value of the detection limit.

Table 4-5
Monthly variations of mutagenicity of tap water in principal 4 cities

City	Mutagenicity [net rev. $\cdot l^{-1}$]											
	Dec 92	Jan 93	Feb	Mar	Apl	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov
Sumida ward	2,600	2,300	4,400	4,600	5,300	3,500	1,600	2,900	3,000	2,700	3,300	2,200
Osaka city	4,700	5,500	3,700	7,300	6,500	6,400	3,000	2,300	2,000	2,100	2,600	3,600
Asahi city	4,300	3,900	6,300	9,200	4,500	2,300	4,800	3,900	3,700	2,200	2,500	—
Yokohama city	1,500	780	1,300	1,600	2,400	3,200	2,400	1,800	930	750	1,300	1,100
N.D.	<780	<660	<640	<800	<800	<490	<480	<430	<470	<500	<530	<530

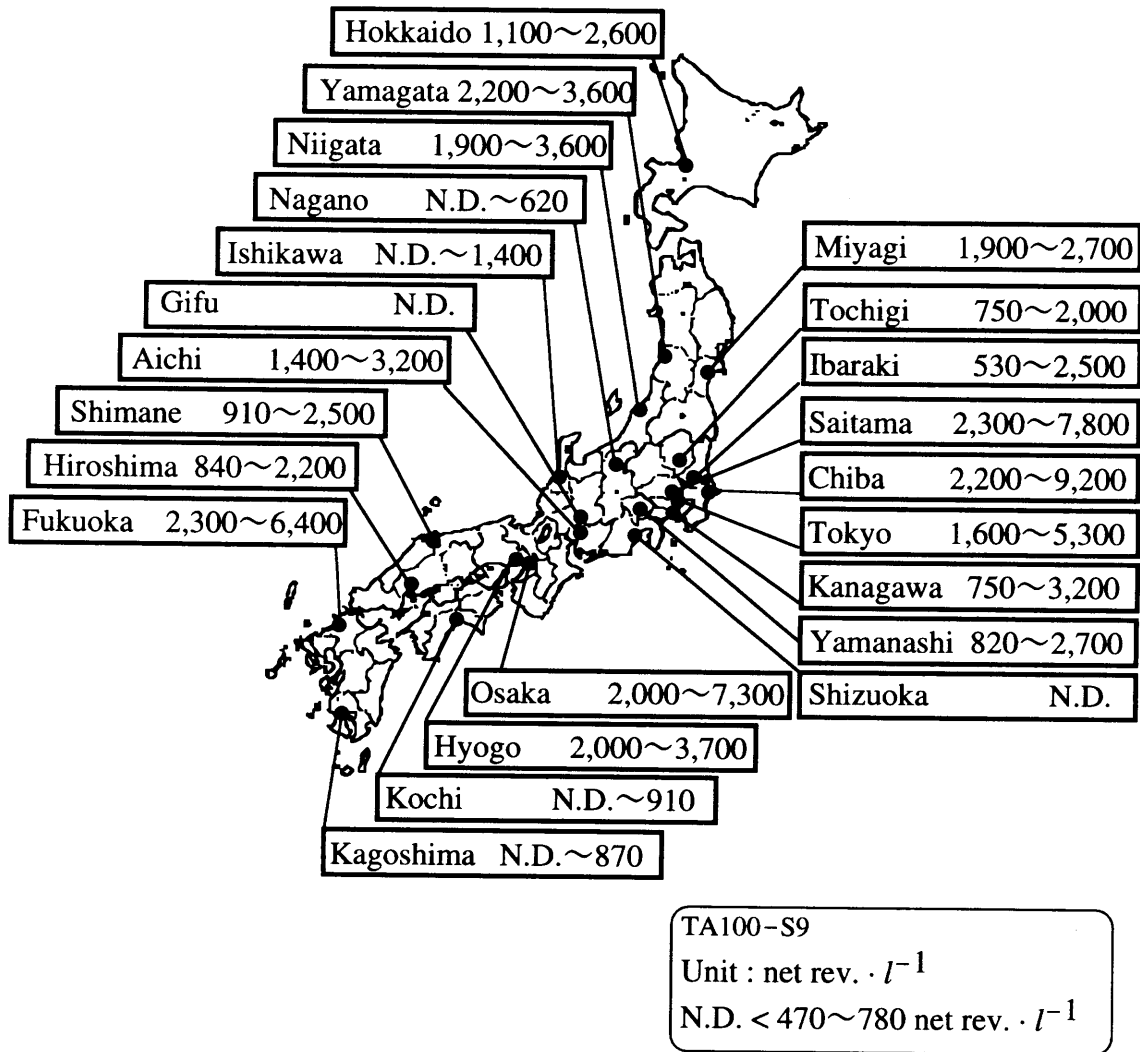


Fig. 4-3. Mutagenicity level of tap water in Japan (Dec,'92 \sim Oct, '93).

Table 4-6
Distribution of mutagenicity of all the samples

Mutagenicity level [net rev · l ⁻¹]	Detection frequency	Detection ratio [%]	Percentile
N.D.	18	17	17
~1,000	14	13	30
1,001~2,000	25	23	53
2,001~3,000	25	23	76
3,001~4,000	17	16	92
4,001~5,000	4	4	95
5,000~	5	5	100
Total	108		

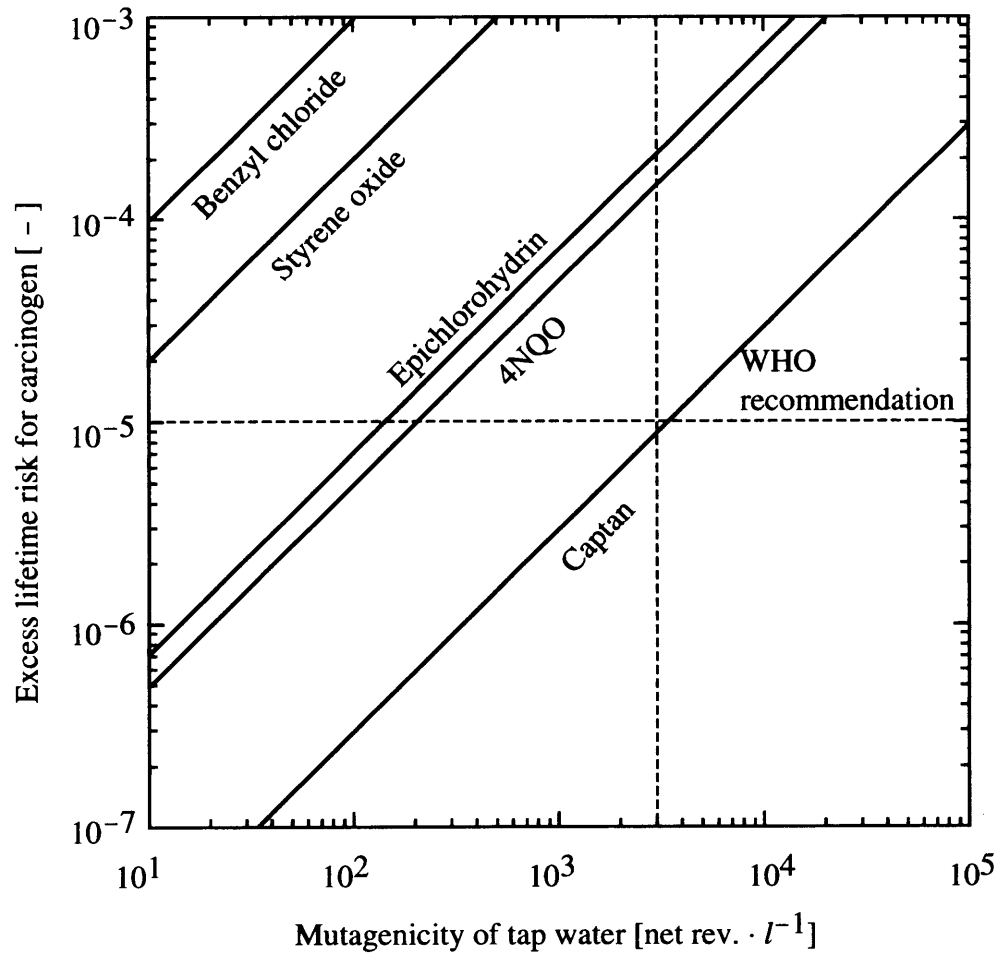


Fig. 4-4 Necessity of countermeasure for reducing mutagenicity of tap water

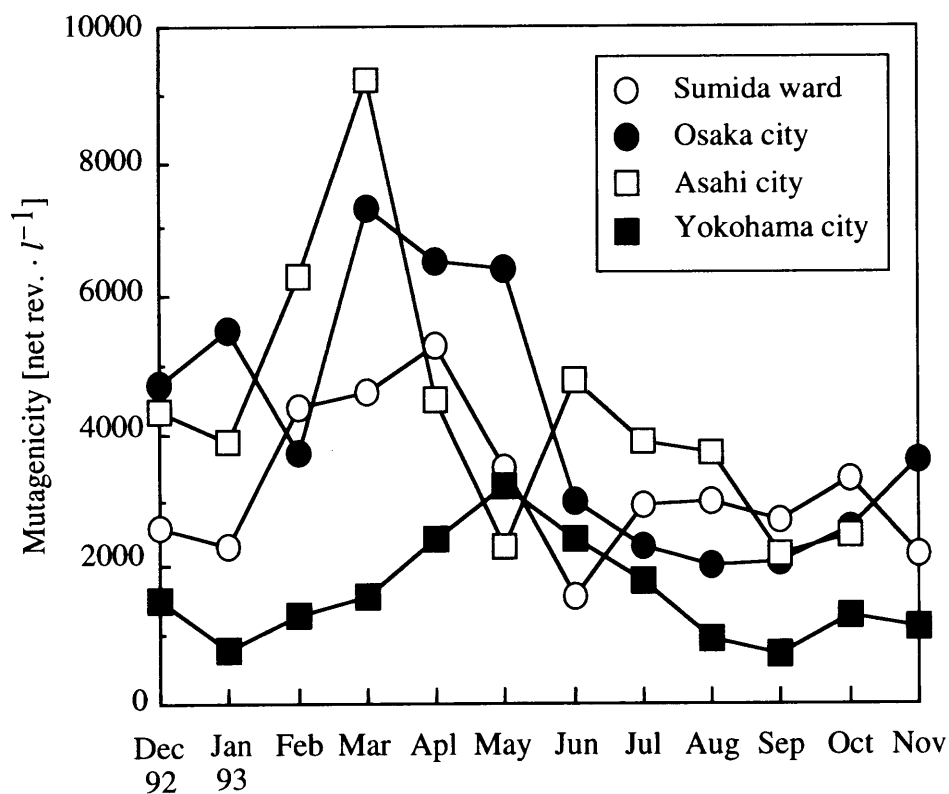


Fig. 4-5. Seasonal variation of mutagenicity of tap water in principal 4 cities.

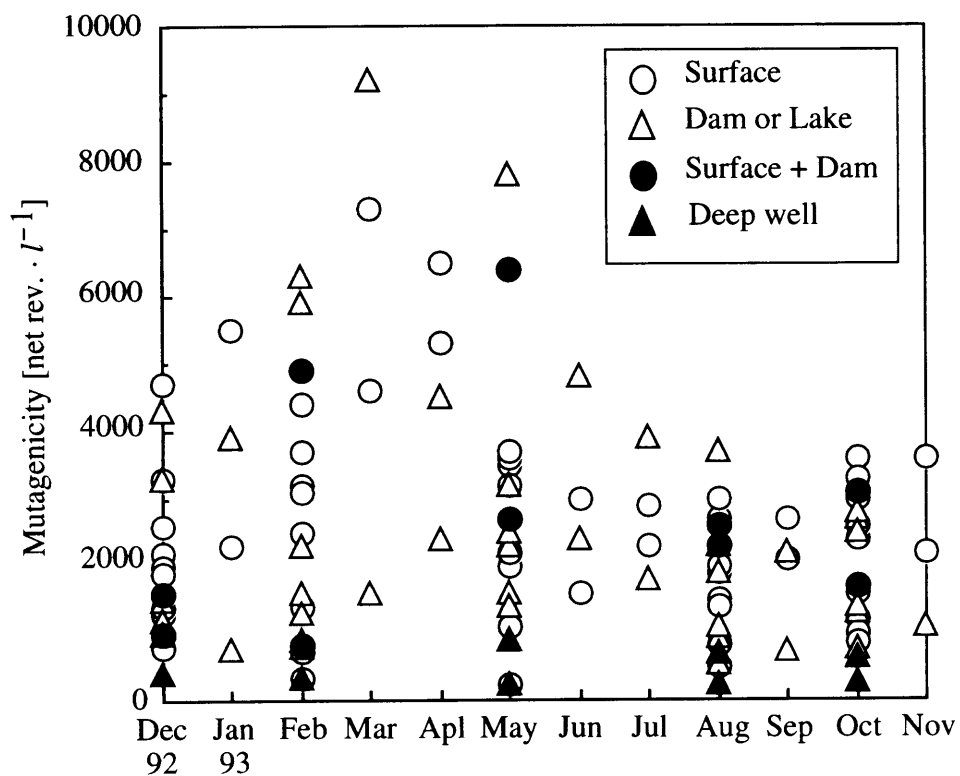


Fig. 4-6. Seasonal variation of mutagenicity of tap water in 23 cities (N.D. data were plotted at the half value of the detection limit).

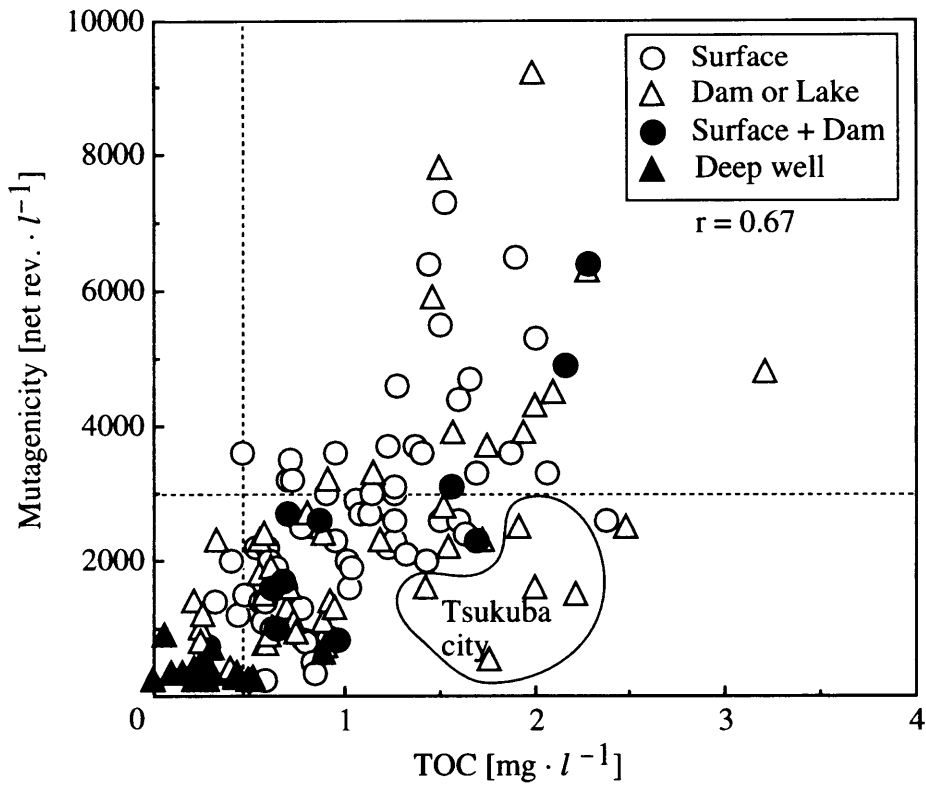


Fig. 4-7. Correlation between TOC and mutagenicity (N.D. data were plotted at the half value of the detection limit).

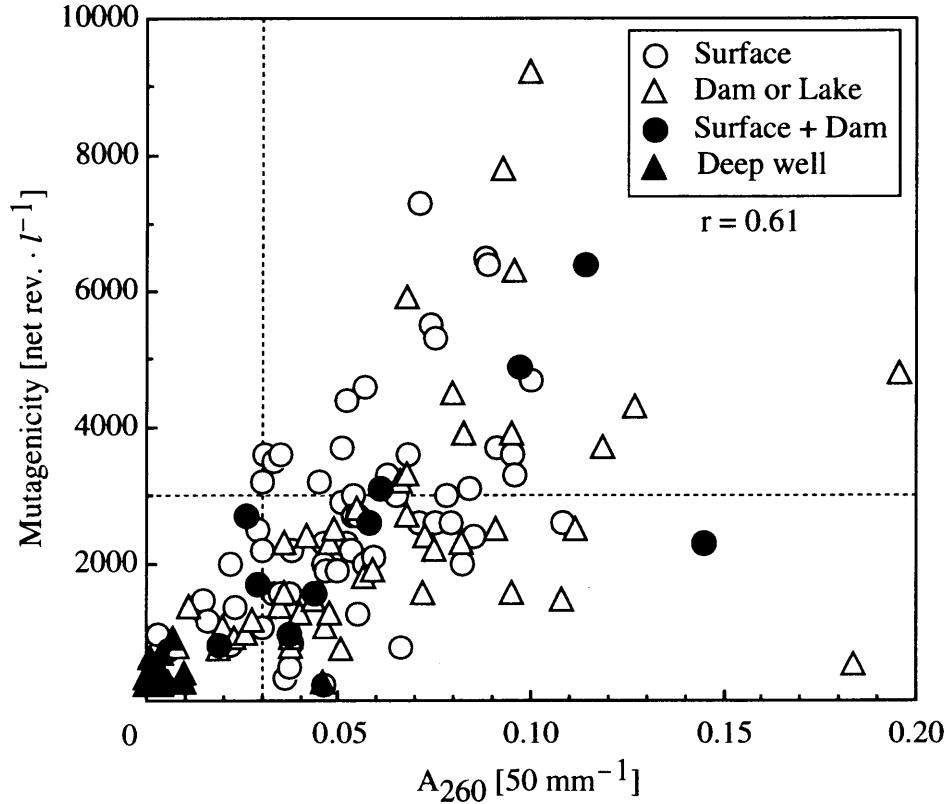


Fig. 4-8. Correlation between A_{260} and mutagenicity (N.D. data were plotted at the half value of the detection limit).

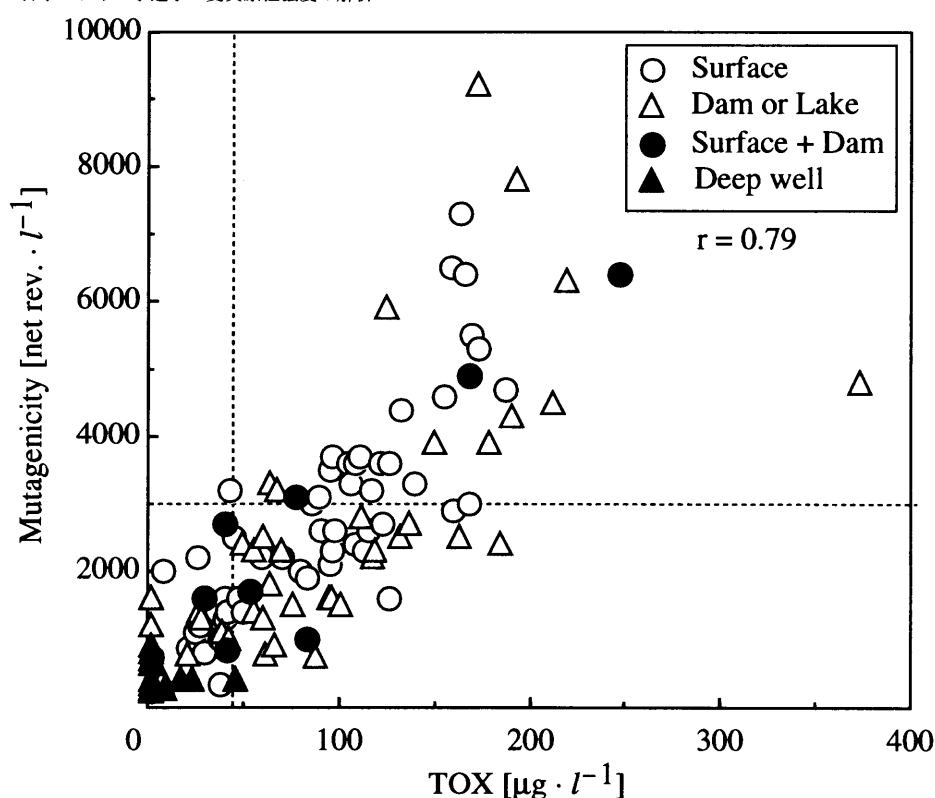


Fig. 4-9. Correlation between TOX and mutagenicity (N.D. data were plotted at the half value of the detection limit).

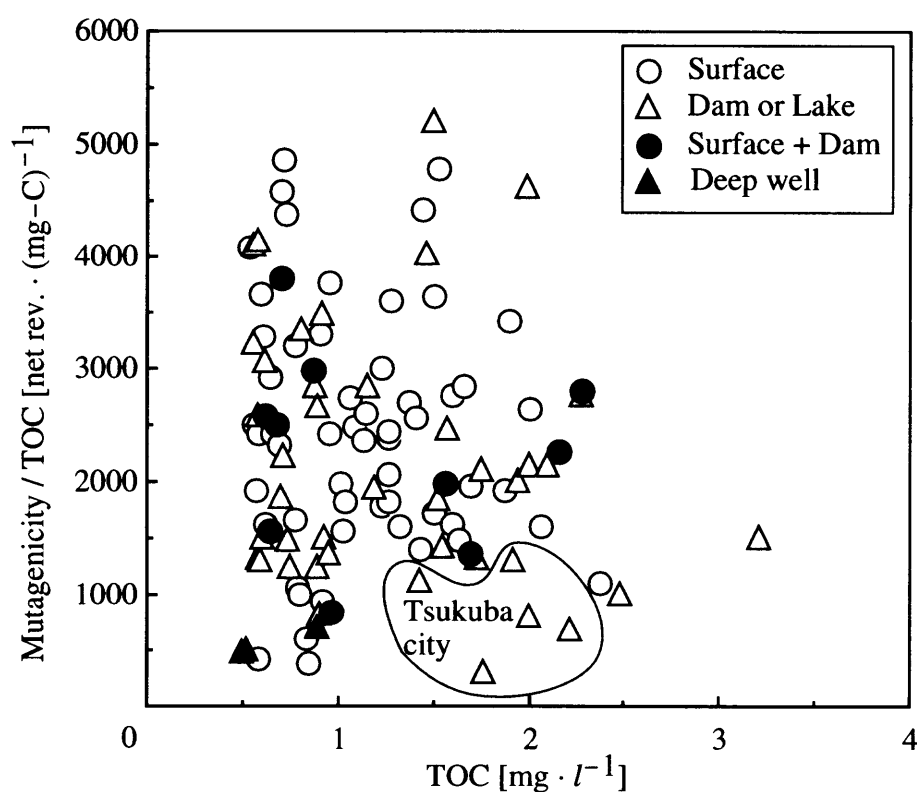


Fig. 4-10. Relationship between TOC and mutagenicity per milligram of TOC (N.D. data were assumed to be the half value of the detection limit. Data less than $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of TOC were omitted).

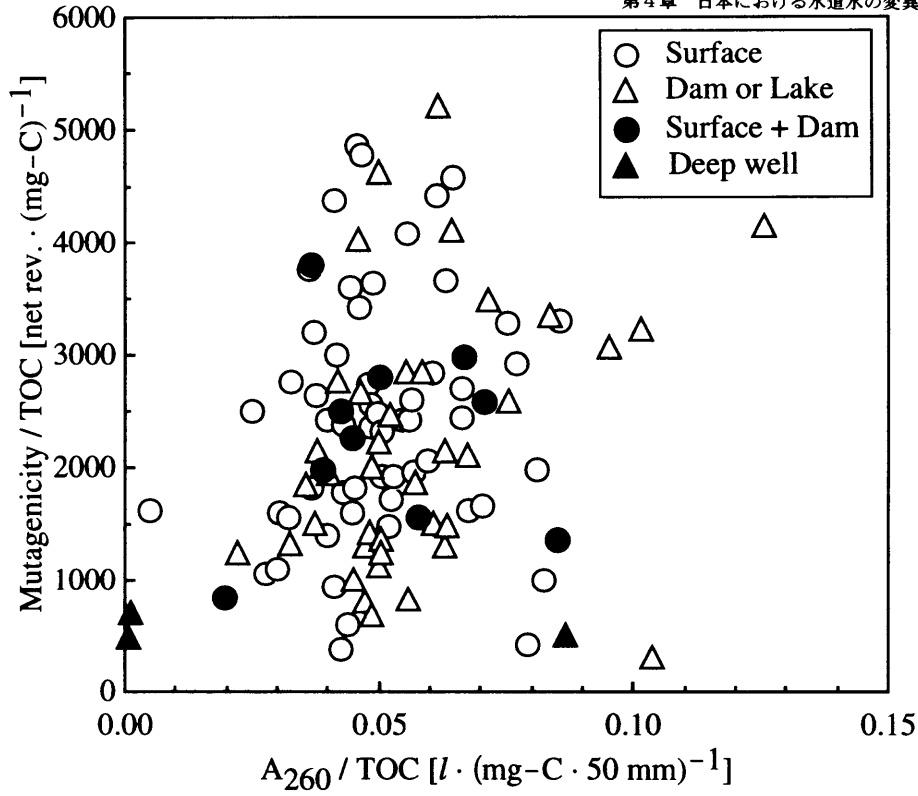


Fig. 4-11. Relationship between aromaticity of organic pollutant (A_{260} / TOC) and mutagenicity per milligram of TOC (N.D. data were assumed to be the half value of the detection limit. Data less than $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of TOC were omitted).

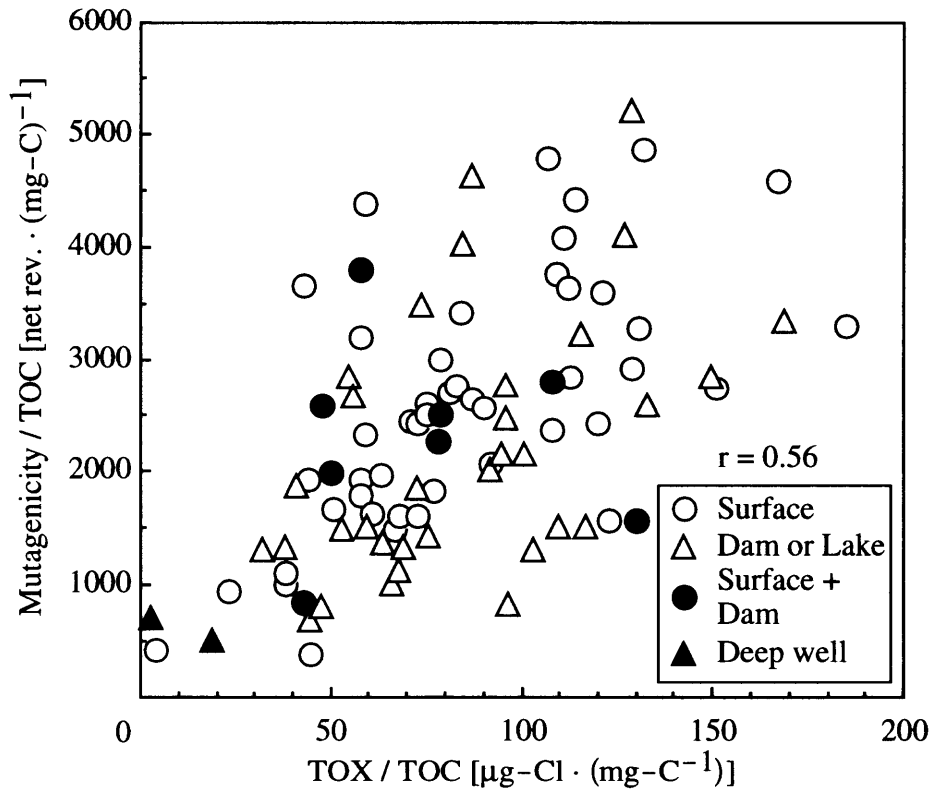


Fig. 4-12. Correlation between halogenousity of organic pollutant (TOX / TOC) and mutagenicity per milligram of TOC (N.D. data were assumed to be the half value of the detection limit. Data less than $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of TOC were omitted).

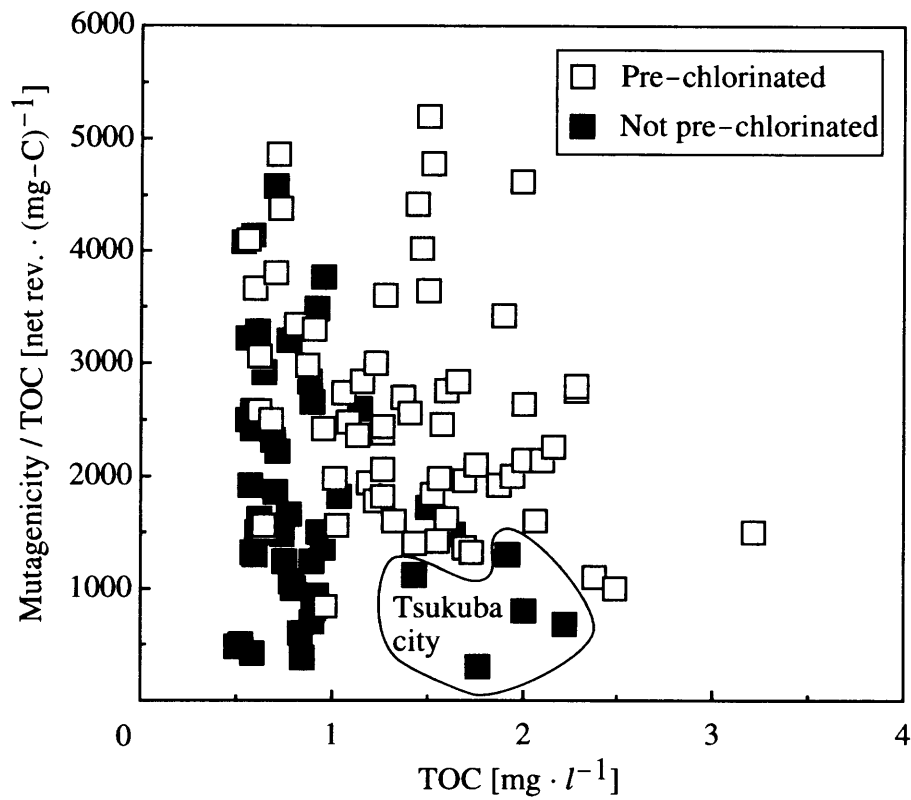


Fig. 4-13. Influence of pre-chlorination on mutagenicity per milligram of TOC (N.D. data were assumed to be the half value of the detection limit. Data less than $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of TOC were omitted).

3. 2 変異原前駆物質に関する考察

3. 2. 1 TOC との関係

変異原性は、水源の種類、季節、浄水処理方法などが異なる多くの水道水で認められること、および塩素処理されることによって著しく増加することから、一般的な有機汚染物質の中のある化学構造を持つ部分が塩素と反応して変異原性物質を生成し、生成する変異原性物質の種類は各水道水で大きくは異ならないものと考えられる。このため、TOC あたりの変異原性強度は、有機汚染物質のうちで塩素と反応して変異原性物質となる前駆物質の割合を表すと考えられる。そこで、TOC、すなわち、水源の有機物質による汚染レベルと TOC あたりの変異原性との関係を調べて Fig. 4-10 に示す。ただし、TOC あたりの変異原性の値は、TOC の測定精度がやや低い $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下の場合を除いて求めた。

TOC あたりの変異原性は 300 から $5,200 \text{ net rev.} \cdot (\text{mg-C})^{-1}$ と極めて大きな幅があり、有機汚染物質の質的違いが大きいことが明らかになった。しかし、TOC との間には明確な関係は認められなかった。すなわち、有機汚染物質濃度の高低によって原水の変異原前駆物質の割合に大きな差は認められず、有機汚染物質の発生源や季節あるいは天候などによる有機汚染物質の質的变化、または浄水処理方法の違いによる影響の方が大きいことが示唆された。

また、各地域での年 5 回の TOC あたりの変異原性の平均値を算出したところ $670 \sim 3,500 \text{ net rev.} \cdot (\text{mg-C})^{-1}$ であり、最も高い地域と低い地域とで約 5 倍の差があった。この差は 3. 2. 4 で述べる、同一地域での年間変動率の平均値の約 3 倍よりも大きい。すなわち、原水の TOC 中の変異原前駆物質の割合は、季節による変動より地域による差の方が大きいことが明らかになった。

3. 2. 2 芳香族性との関係

TOC あたりの A_{260} (A_{260}/TOC) は、有機物中に芳香族構造を多く含むフミン質が占める割合の大略を表すと考えられ、塩素処理によって生成するトリハロメタン量は、この値と関係があるという報告がある³⁷⁾。そこで、 A_{260}/TOC と TOC あたりの変異原性との関係を Fig. 4-11 に示す。 A_{260}/TOC は $0.03 \sim 0.09 \text{ l} \cdot (\text{mg-C} \cdot 50 \text{ mm})^{-1}$ に集中して

おり、TOC あたりの変異原性とは明確な関係は認められなかった。すなわち、水中有機物質のうち、芳香族性の高いフミン質の占める割合によっても変異原性の生成しやすさに特徴は認められなかった。なお、 A_{260}/TOC が $0.03 \text{ l} \cdot (\text{mg-C} \cdot 50 \text{ mm})^{-1}$ 以下で、芳香族性の有機物がほとんどない場合には変異原性物質が生成しにくいことが示された。さらに、TOC あたりの A_{260} だけでなく、TOC あたりの 200~300 nm の吸光スペクトルと TOC あたりの変異原性との関係を調べたが、明確な関係は認められなかった。

3. 2. 3 ハロゲン化されやすさとの関係

TOC あたりの TOX (TOX/TOC) は、有機物のハロゲン化されやすさを表すと考えられる。そこで、TOX/TOC と TOC あたりの変異原性との関係を調べて Fig. 4-12 に示す。全体に右上がりの傾向は認められたものの、相関係数は小さく、TOX/TOC が同じ水道水でも TOC あたりの変異原性には約 5 倍の差があった。

前述のように、水道水中の主な変異原性物質は有機汚染物質と塩素との反応によって生成することが明らかになっているが、TOX/TOC が同じ水道水でも TOC あたりの変異原性が約 5 倍異なることから、様々なハロゲン化反応のうちの一部の反応が変異原性物質の生成に関係していると考えられる。すなわち、有機汚染物質と塩素とを反応されると様々な反応が起こるが、そのうちで一般的な有機汚染物質のある特定の化学構造をもつ有機物と塩素との特定のハロゲン化反応または酸化反応によって変異原性物質が生成していることを示唆している。

3. 2. 4 年間変動

変異原性の値の年間変動については、3. 1. 2 ですでに述べたとおり、冬期から春期にかけて高く、夏期から秋期にかけて低くなる傾向が認められた。そこで、TOC あたりの変異原性の年間変動を調べて Fig. 4-14 に示す。ただし、地下水等は年間変動が小さかったので除いた。TOC あたりの変異原性は、2 月から 6 月にかけて高く、その他の月は低く、変異原性の年間変動の傾向と一致した。なお、各地域での TOC あたりの変異原性の年間変動率（最高値／最低値）を算出し、その平均値を求めたところ約 3 であり、変異原性の年間変動率の平均値と同程度であった。すなわち、水道水の

変異原性の季節変動は、原水の TOC より原水の TOC 中の変異原前駆物質の割合の変動によると考えられる。なお、水温が特に高い夏期には TOC あたりの変異原性が低く、 $3,000 \text{ net rev.} \cdot (\text{mg-C})^{-1}$ を越えることはほとんどなかったが、逆に水温が低い冬期には少し暖かい春期より低いことがあり、変異原前駆物質の割合が水温のみに影響されているわけではないことが示された。これらの理由については、今後検討する必要がある。

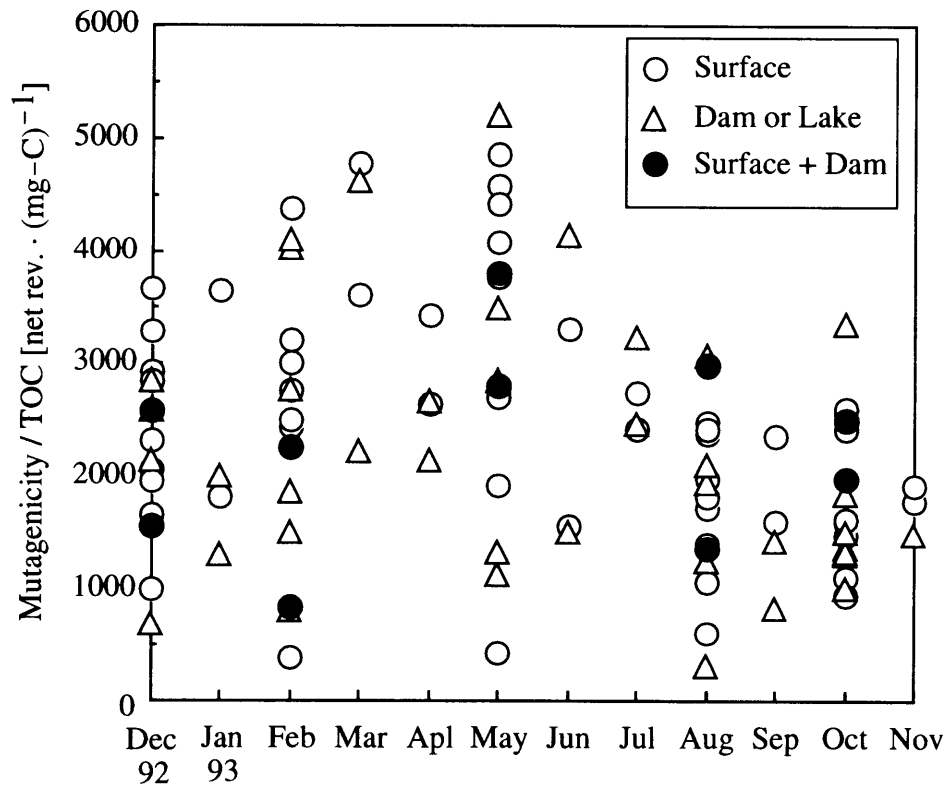


Fig. 4-14. Seasonal variation of mutagenicity per milligram of TOC (N.D. data were assumed to be the half value of the detection limit. Data less than 0.5 mg · l⁻¹ of TOC were omitted).

4. 本章のまとめ

水道水源の汚染の進行と水道水の安全性に対する要求の高まりによって、15 年ぶりに水道水基準が改訂された。しかし、個別の有害物濃度による基準のみでは多成分による複合作用や未知物質の安全性には対応できない。そこで本章では、水道水の安全性を総括的に評価する方法として、Ames 変異原性試験の適用を提案し、その有用性を明らかにした。すなわち、第3章で開発した水道水中変異原性物質の簡便で高効率な濃縮・回収方法を用いて、全国 23 都市の水道水の変異原性を TA100-S9 の条件で1年間にわたって調査し、以下の結論を得た。

- 1) 日本の水道水の変異原性に対する塩基対置換型の直接変異原性物質の寄与率が高く、特に間接変異原性物質はほとんど含まれていないことが明らかになった。
このことから、日本の水道水の変異原性を評価・管理する場合、TA100-S9 の条件で試験すればよく、TA98±S9、TA100+S9 の条件は特に必要と考えられる場合のみ行えばよいことが明らかになった。
- 2) 23 都市の水道水の変異原性レベルは、検出限界（約 500 net rev. · l⁻¹）以下から 9,200 net rev. · l⁻¹ まで、約 30 倍の幅があった。また、各都市の水道水の変異原性の年間平均値を求めたところ 290~4,400 net rev. · l⁻¹ であり、最も変異原性の低い地域と高い地域とで約 15 倍の差があった。これは遺伝子に対する障害の危険性が年平均で約 15 倍異なることを意味し、変異原性を測定して水質管理を行う必要があることが示された。
- 3) 他の地域より明らかに変異原性が高い地域、例えば全国の 4 分の 1 以下（本研究で採用している高回収率濃縮法で測定したときに 3,000 net rev. · l⁻¹ 以上）になる地域では、水源の保全や高度浄水処理の導入などの対策を進めることが望まれる。
- 4) 水道水の変異原性の年間変動率（最大値／最小値）の平均値は約 3 であった。
また、冬期から春期にかけて高く、夏期から秋期にかけて低い傾向があることが明らかになった。このため、定期的な変異原性の測定が必要であり、とくに冬期から春期の水質管理が重要であることが示された。

- 5) TOC、 A_{260} 、TOX などの従来の水質値と変異原性とは弱い正の相関があるものの相関係数が小さく、これらの水質値から変異原性の強さを推算することはできなかった。したがって、一般的な水質測定とは別に変異原性を測定して水質管理を行う必要があると考えられた。なお、TOX との相関係数がやや大きく、有機物と塩素との反応が変異原性に関与していることが示唆された。また、TOC が約 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 未満または 50 mm セルでの A_{260} が $0.03 \cdot 50 \text{ mm}^{-1}$ 未満、または TOX が $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 未満の良質の水道水では、変異原性が $3,000 \text{ net rev.} \cdot \text{l}^{-1}$ を越える可能性は少ないことが明らかにされた。
- 6) 深井戸水または伏流水を水源としている地域では、変異原性が低く、TOC、 A_{260} 、TOX、および TOC あたりの変異原性のいずれも低かった。しかし、表流水、ダム水、湖沼水、表流水とダム水の混合水を水源としている地域では、変異原性、TOC、 A_{260} 、TOX、TOC あたりの変異原性のいずれも広範囲に分布しており、これらの水源の間には明確な差は認められなかった。
- 7) TOC あたりの変異原性と TOC、芳香族性 (A_{260}/TOC) や紫外吸光スペクトルおよびハロゲン化されやすさ (TOX/TOC) とは明確な関係は認められなかった。
- 8) 前塩素処理によって TOC あたりの変異原性がやや高くなる傾向はあったものの、明確な相違は認められなかった。すなわち、変異原性物質は、凝集沈澱で除去される分子量の大きな有機物からも、除去されない分子量の小さな物質からもほぼ同程度に生成することが示された。
- 9) TOC あたりの変異原性も冬期から春期に高く、夏期から秋期に低くなり、変異原性の季節変動が TOC の変動よりも、原水の TOC 中の変異原前駆物質の割合の変動によると考えられた。
- 10) TOC あたりの変異原性の地域差は約 5 倍あり、同一地域での季節による変動率の約 3 倍より大きく、季節より地域による変異原前駆物質量の差が水道水の変異原性に大きく影響していることが示された。

以上のように、水道水の変異原性がかなり高い地域があり、季節によって変化することが明らかになり、変異原性による定期的な水質評価・管理が必要であることが確

認された。また、TOC あたりの変異原性を指標にして変異原前駆物質の特性を明らかにした。しかし、本章では、前駆物質や変異原性物質そのものについては明らかにされていない。さらに変異原前駆物質および生成した変異原性物質の分離・定量方法を確立し、変異原前駆物質の発生源を特定したり、浄水方法を変えた場合の変異原前駆物質および変異原性物質の変化を明らかにする必要がある。

本章の引用文献

- 1) 辻昌 美 (1993) 水道水質に関する新たな基準の設定について、水環境学会誌、**16**(4)、235-243.
- 2) 上口 浩幸、佐々木大司 (1992) Mutagenicity test as an evaluation of water quality in drinking water、第43回全国水道水研究発表会講演集、787-789.
- 3) 山吉孝雄、土井 均、井上嘉高、伊藤 保 (1993) 変異原活性の変動に対するオゾン・粒状活性炭効果、水道協会雑誌、**62**(7)、28-37.
- 4) 上口 浩幸、高橋克行 (1997) 塩素処理副生成物の加水分解等の影響、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績、40-45.
- 5) 葛岡勝悦、浦山 清、加藤謙一、阿部時男、高橋美保、大金仁一、助野典義 (1998) 水道水の変異原性、宮城県保健環境センター年報、16、59-67.
- 6) 橋爪 崇、横山 剛、沢田洋介、河合 敦、伊神生雄、神木照雄、木苗直秀、富田 勲 (1985) ポリエチレン多孔質中空糸膜による飲料水中変異原野吸着と吸着変異原の若干の性質、衛生化学、**31**(6)、385-390.
- 7) Sayato Y., Nakamuro K. and Ueno H. (1987) Studies on preconcentration methods for detecting the mutagenicity of organics in drinking water, *EISEI KAGAKU*, **33**, 328-336.
- 8) 讃岐田 訓 (1987) 塩素処理による変異原性の生成、水、29(11)、23-29.
- 9) 浦野紘平、芳賀伸之、江本ふで子 (1987) 水道水等の変異原性試験方法、水道協会雑誌、57(3)、36-48.
- 10) 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 the Total Environment*, **74**, 177-189.
- 11) Urano K., Haga N. and Emoto F. (1988) Method for evaluating mutagenicity of water II. Conditions for applying new sample preparation method to the Ames test, *The Science of the Total Environment*, **74**, 191-198.
- 12) 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.
- 13) Kinae N. (1991) MX and mutagenicity levels in the tap water in Japan in 1990, *Water*

Report, 1(3), 12.

- 14) 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**(11)、814-821.
- 15) 鶴川昌弘、中村清一、西村公志、大竹 徹 (1993) 水道水の安全性の評価と制御に関する研究 (第一報) -水道水中に含まれる有機物の安全性について-、衛生化学、**39**(5)、421-439.
- 16) 信川貴子、讃岐田 訓 (1997) 哺乳動物培養細胞の染色体異常試験による淀川水系水道水の遺伝毒性、水環境学会誌、**20**(11)、705-709.
- 17) 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の吸着剤、水環境学会誌、**17**, 451-460.
- 18) 浦野紘平、高梨啓和、金澤伸浩、岡部文枝、藤江幸一 (1994) 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、水環境学会誌、**17**、461-469.
- 19) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課、平成3年度水道統計水質編第7 4-2号、380pp、日本水道協会、1991、東京.
- 20) 労働省化学物質調査課 (1991) 安衛法における変異原性試験、中央労働災害防止協会、pp. 173、東京.
- 21) Takanashi H., Urano K. (1998) Statistical procedures for estimating the detection limit and determination limit of the Ames *Salmonella* mutagenicity assay, *The Science of the Total Environment*, **221**, 31-42.
- 22) Romero J., Ribo G., Ventura F., Caixach J., Moreno P. and Rivera J. (1992) Ames and sister chromatid exchange tests of organic extracts from drinking water, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**, 259-265.
- 23) Vartiainen T. and Liimatainen A. (1986) High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland, *Mutation Research*, **169**, 29-34.
- 24) Monarca S., Meier J. R. and Bull R. J. (1983) Removal of mutagens from drinking water by granular activated carbon, *Water Res.*, **17**, 1015-1026.
- 25) Kusamran W. R., Wakabayashi K., Oguri A., Tepsuwan A., Nagao M. and Sugimura T.

- (1994) Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters, *Mutation Research*, **325**(2/3), 99-104.
- 26) 真柄泰基、赤澤 寛、橋本徳蔵、森田亮吉、大澤英治 (1994) 水道水質ハンドブック、日本水道新聞社、398pp、東京.
- 27) 安藤正典 (1981) 用語の知識 変異原性、水道協会雑誌、67-70.
- 28) World health organization (1984) Guidelines for Drinking-Water Quality, Vol. 1, Recommendations, Geneva.
- 29) Kool H. J., Hrubec J. (1986) The influence of an ozone, chlorine and chlorine dioxide treatment on mutagenic activity in (drinking) water, *Ozone Science & Engineering*, **8**, 217-234.
- 30) 丹保憲仁、亀井 翼、中津川 誠 (1986) 塩素及びオゾン処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性 (Ⅱ)、水道協会雑誌、**56**(6)、2-11.
- 31) Kronberg L. and Holmbom B. (1986) Properties of mutagenic compounds form during chlorination of humic-water, org. micropollut, *Aquatic Environ.*, 449- 454.
- 32) Vartinen T. and Limatainen A. (1988) Relations between drinking water mutagenicity and water quality parameters, *Chemosphere*, **17**, 189-202.32) Noot D. K., Anderson W. B., Daignault S. A., Williams D. T. and Huck P. M. (1989) Evaluating treatment processes with the Ames mutagenicity assay, *Journal of American Water Works Association*, **81**(9), 87-102.
- 33) Huck P. M., Anderson W. B., Savage E. A., Borstel V. R. C., Daignault S. A., Rector D. W., Irvine G. A. and Williams D. T. (1989) Pilot scale evaluation of ozone and other drinking water disinfectants using mutagenicity testing, *Ozone Science & Engineering*, **11**, 245-269.
- 34) Monarca S., Ziglio G., Pasquini R., Beltramelli G., Feretti D., Donato F., Nardi G., Gervasoni M., Micheli F., Dalmiglio A. and Moretti M. (1992) Mutagenicity of drinking water obtained by different treatment procedures from two northern Italian lakes. *International Journal of Environmental Health Research*, **2**, 192-200.
- 35) Contei E., Venier P., Fortunati E., Navazio G. and Levis A. G. (1992) Evaluation of mutagenic activity of organic micropollutants present in surface waters, *International*

Journal of Environmental and Pollution, **2**(1/2), 87-96.

- 36) Lerda D. E. and Prosperi C. H. (1996) Water mutagenicity and toxicology in Rio Tercero (Cordoba, Argentina), *Water Research*, **30**(4), 819-824.
- 37) 丹保憲仁、提 行彦 (1982) トリハロメタン生成能に関する研究 (I) -有機成分の紫外外部吸収とトリハロメタン生成能-, 水道協会雑誌、**51**(7)、21-32.

