

多摩川水系の変異原性調査

1988年

浦野 紘平

横浜国立大学工学部物質工学科教授

目 次

1 緒 言	1
1-1 はじめに	1
1-2 変異原性(突然変異原性)	2
1-3 変異原性試験の概要	3
1-4 Ames法変異原性試験	3
2 従来の研究と本研究の目的	5
2-1 従来の中に変異原物質の濃縮方法	5
2-2 従来の変異原性試験の評価方法	6
2-3 従来の水の変異原性試験結果例	7
2-4 当研究室で今までに得られている研究成果と本研究の目的	8
2-4-1 吸着濃縮方法	8
2-4-2 変異原性試験の評価方法	9
2-4-3 本研究の目的	10
3 実 験	10
3-1 試 料	10
3-1-1 吸着剤	10
3-1-2 試料水	12
3-2 有機物質濃度の測定	14
3-2-1 試料水の保存	14
3-2-2 260 nmでの吸光度(A ₂₆₀)の測定	14
3-2-3 全有機炭素(TOC)濃度の測定	14
3-2-4 トリハロメタン(THM)濃度の測定	14
3-2-5 全有機ハロゲン濃度(TOX)の測定	15
3-3 吸着濃縮方法	16
3-3-1 装 置	16
3-3-2 条 件	16

3-4	変異原性試験方法	18
3-4-1	減菌	18
3-4-2	試薬及び溶液の保存	18
3-4-3	最小グルコース寒天平板培地の作製	19
3-4-4	テスト菌株の前培養	19
3-4-5	テスト菌株の保存	20
3-4-6	S9 Mixの調整	20
3-4-7	トップアガールの調整	20
3-4-8	試験実施	21
3-5	生菌数試験方法	21
3-6	試験の安全及び衛生	21
4	結果及び考察	23
4-1	新しい吸着濃縮法の確認	23
4-1-1	脱離速度の検討	23
4-1-2	変異原性試験による従来法との比較	24
4-2	水の変異原性試験の最適条件の決定	25
4-2-1	最適条件の決定法	25
4-2-2	多摩川河川水の濃縮液最適添加量	26
4-2-3	多摩川河川水の塩素処理水の濃縮液最適添加量	27
4-2-4	水道水の濃縮液最適添加量	27
4-3	水の変異原性の評価	53
4-3-1	河川水の変異原性	53
4-3-2	塩素処理水の変異原性	55
4-3-3	オゾン処理水及び活性炭処理水の変異原性	57
4-3-4	水道水の変異原性	58
4-4	致死作用と生菌数試験	59
5	結言	63
6	参考文献	66

1 緒 言

1-1 はじめに

地球上には現在、天然のもの合成のものを合わせ約400万種の化学物質があり、さらにわが国において新規に製造されるか、もしくは輸入される化学物質は、製造中間体も含めると年間約3,000種になると言われている。これらの物質は近代産業の急激な拡大に関与してきたが、その安全性の正当な評価がされず、生産、消費、廃棄されてきたものも少なくない。我々の地球の環境、生態系に新たに出現した大量の化学物質による環境破壊や環境汚染は、人類史上かつてない急激かつ広範囲なものとなっている。例えば、南極のクジラ、ペンギンにさえもPCBなどの難分解物質が蓄積され、また大気中に放出されたフロンガスにより、オゾン層が破壊されている。

ところで種々の化学物質の物理的、化学的情報は、ある程度蓄積されてきているが、それらの生物への影響は、未だ解明されていないものがほとんどである。一部の重金属などについての生物への影響が明らかにされているが、一般に種々の物質が人体に摂取された場合の影響、特に分子細胞レベルの安全性は不明な点が多い。しかし、化学物質の人体(生物)への影響評価は非常に重要なことであり、今後さらに明らかにされていかねばならない。

人体に対する悪影響、すなわち毒性評価は、直接人体で行なうことができないので、微生物や小動物に対して適用した試験結果をもとに、人体への危険率を類推し、化学物質の人体への安全性評価を行うのが一般的である。

毒性は、一般毒性と特殊毒性に分けられ、一般毒性には、急性毒性と慢性毒性があり、特殊毒性には、アレルギー性、催奇形性、変異原性、発ガン性などがある。

変異原性とは、化学物質等が細胞の持つDNAに作用して、その塩基配列に損傷を引き起こし、細胞の機能を変化させる性質を言う。また発ガン性の機構は完全に解明されていないが、発ガンの過程の中に突然変異と共通の部分が存在すると考えられている。そこで長期間にわたって行われる発ガン性試験の前に、短期間で容易に行えるスクリーニング試験として、変異原性試験を行うことが有効であると言われている。

米国ニューオリンズ市の水道水中より世界ではじめて発ガン性物質が検出されて以来、水道水の人体への影響が注目されてきた。これは様々な合成化合物が水源に入ってくること及び浄水処理工程において投入される塩素が水中の有機物質(フミン質など)を塩素化し、変異原性物質を生成していること¹⁾によるものがわかってきた。現在用いられている汚染物質指標では、主に水中に存在する物質を個別に定量しているが、個別定量だけでは、水の人体などの生物への総合的安全性評価は不可能である。

そこで本研究では、多摩川水系の水及びそれに塩素またはオゾンを加えた水の変異原性がどの程度あるかを調べ、多摩川水系の水の水産用水、レクリエーション用水及び水道水などとして利用する場合の遺伝毒性的な視点からの安全性を総括的に評価する方法を確立することを目的とした。

1-2 変異原性(突然変異原性)²⁾³⁾

我々の細胞内の遺伝子の本体、すなわち遺伝情報の担い手は、細胞核にある染色体中に存在するDNAである。DNAとは、塩基-糖(デオキシリボース)-リン酸から成る単位物質(ヌクレオチド)の縮重したポリヌクレオチドの鎖が2本あり、それらがらせん状にからまっているものである。2本の鎖は、ヌクレオチド中の4つの塩基すなわち、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)におけるA-T, G-C, の相補的な水素結合により結ばれている。このためDNAはかなり安定な物質である。このポリヌクレオチド中の塩基配列が遺伝情報の根源であり、DNAは生命現象に深くかかわっている極めて重要な物質である。現在、DNA上の塩基配列が自然に変化する場合があることも明らかにされているが、放射線や化学物質などでも、DNA上の塩基配列に乱れを引き起こし、生物のもつ形質を変えていく場合がある。

DNAに生じた塩基配列などの損傷が多大であれば、その細胞は死にいたる。しかし正常細胞では、損傷程度がわずかであれば除去修復や組換え修復と呼ばれる修復機構により、正常なDNAに修復される。ところが修復機能の欠損あるいは他の原因によって修復に誤りを起こし、修復ミスを生じてしまうことがある。この場合、損傷したDNAによりアミノ酸配列の乱れたタンパク質が合成され、細胞の機能は変化する。この様な誤ったDNAを複製し娘細胞ができてしまい、図1-1に示すように誤ったDNAが継代されていく。このことを突然変異と言い、化学物質などの突然変異を起こす性質を変異原性、変異原性を有する化学物質などを変異原性物質と言う。

突然変異(広義)とは、細胞の核や細胞質になんらかの変化を起こすもののすべての総称である。それらの変異に対して変異原性試験も種々ある。DNA上に生ずる塩基配列の乱れを起こす変異にも、種々のものが知られているが、水の変異原性を調べる場合の突然変異(狭義)は、その代表的なものである遺伝子の核酸レベルでの点突然変異を指す場合が多い。点突然変異には、図1-2に示すように塩基対置換型とフレームシフト型がある。塩基対置換型は、DNA上の塩基が他の塩基に変化することであり、フレームシフト型は、塩基配列上で塩基が引き抜かれたり、挿入されたりして配列がずれてしまうことである。

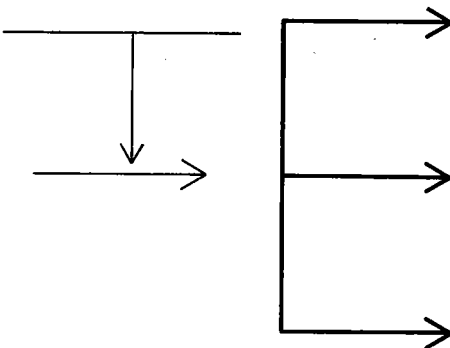


図1-1 突然変異の機構

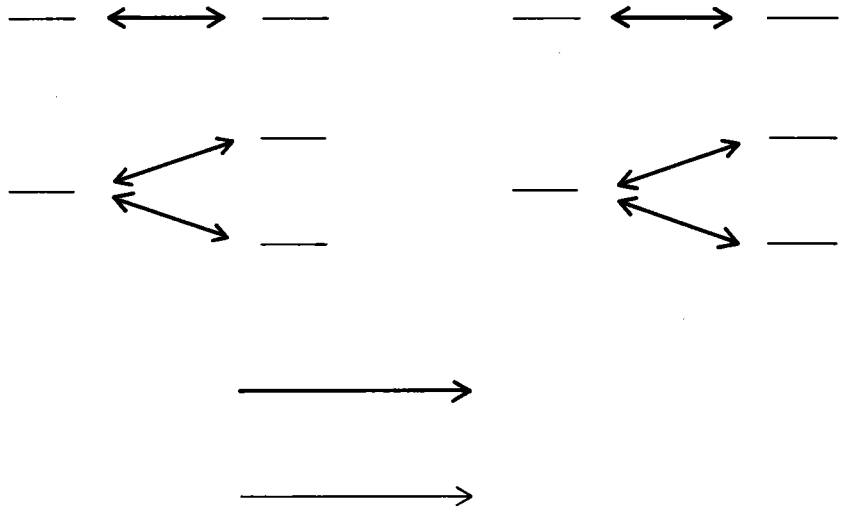


図 1-2 点突然変異

1-3 変異原性試験の概要^{3) 4) 5)}

変異原性を検定する試験を変異原性試験と言うが、米国のTSCA(毒物規制法)には、環境中の有害性化学物質を規制するため、特に生化学的試験方法として、次のような変異原性試験が定められている。

- (1) 微生物やほ乳動物培養細胞などを用いる遺伝子突然変異試験
- (2) 昆虫や小動物などを用いる染色体異常試験
- (3) 微生物やほ乳動物などを用いるDNA修復試験

ここで(1)の遺伝子突然変異試験は、遺伝子の突然変異により、元の細胞とは異なる細胞が生じることを利用するものである。(2)の染色体異常試験は、細胞分裂の際に起こる染色体異常を観察するものである。(3)のDNA修復試験は、細胞のDNA損傷を指標とするものである。(2)及び(3)は、(1)のように遺伝子の変化を見ているわけではなく、もっと広範囲の変化を対象としている。

また用いる生物を大別すると(A)微生物、(B)培養細胞、(C)昆虫、(D)実験動物、となる。このうち(A)の微生物を用いる方法は、DNAの損傷の機構や修復の機構についての研究が進んでおり、また高等生物に比べて取扱が簡単であり、費用が安価であるなどの利点があるため非常に多く行われている。現在、変異原性試験として世界的に最も広く用いられている方法は、(1)の遺伝子突然変異試験で(A)の微生物を用いるAmes法である。この方法は、米国のAmesらが開発した特殊なサルモネラ菌の復帰突然変異を利用するものであり、本研究においてもAmes法を用いて変異原性試験を行うこととした。

1-4 Ames法変異原性試験³⁾

この方法の特徴は、Amesらが開発した特殊なサルモネラ菌にある。サルモネラ菌については、従来よ

リアミノ酸の一種であるヒスチジンの合成機構に関する研究が進んでおり、カリフォルニア大Ames教授らが開発したサルモネラ菌は、ヒスチジンの合成酵素に関するDNAに突然変異が生じた菌株で、ヒスチジンを自力では合成できず、培地にヒスチジンがないと生育できないヒスチジン要求性(His⁻)となっている。Ames法変異原性試験は、このHis⁻菌株からヒスチジン非要求性(His⁺)菌株への突然変異、すなわち復帰突然変異を用いて、変異原性の有無及び強さを調べるものである。

菌株はSalmonella typhimurium LT2から由来したもので、表1に示すような特性を備えている。なお野生型の性質は表中で+で示してある。TA100, TA1535, TA92は塩基対置換型, TA98, TA1538, TA94はフレームシフト型の突然変異が生じた菌株で、それぞれ塩素置換型, フレームシフト型の変異原性物質の検索に用いる。TA92, TA94はDNA鎖間に橋を架ける型の変異原性物質(例えばマイトマイシンCなど)の検索に用いる。

表1 サルモネラ・テスト菌株の特性

ヒスチジン合成系の変異		膜変異(LST) rfa	DNA損傷修復 機構の変異	薬剤耐性因子 R-factor プラスミドの有無
His G46	His D3052			
TA1535	TA1538	+ rfa	△ uvr B	-R
TA 100	TA 98	+ rfa	△ uvr B	+R
TA 92	TA 94	+	+	+R

+ : 野生型(変異なし)
△ : 欠損

本来、サルモネラ菌をはじめグラム陰性細菌は、リポ多糖類からなる細胞壁のために物質の透過性が悪いが、膜変異のrfaにより細胞壁のリポ多糖類を欠損しており分子量の大きな化学物質も細胞内への透過性がよく、またDNA損傷修復機構については、uvrB遺伝子が欠損している紫外線感受性の変異株菌であり、変異原物質に対する感度が高められている。この欠損と同時にビオチン合成の遺伝子も失っており、ビオチン要求性となっている。さらに、TA100, TA98では、薬剤耐性因子R-factorプラスミドであるR因子pKM101の導入によって、著しく感度が高められている。一般のスクリーニングでは、まずTA100, TA98で変異原性試験を行う。

実際には、まずサルモネラ菌(His⁻)と化学物質(検体)を接触させて、ヒスチジンのほとんど入っていない寒天培地プレート上で、一定時間培養する。培養した結果、検体に変異原性があれば、His⁻菌株に復帰突然変異が起こり、His⁺菌株となりヒスチジンがなくても、プレート上で増殖して菌の集落(コロニー)が出現する。変異原性がなければ、His⁻菌株の復帰突然変異は起こらず、コロニーの出現はわずかしみられない。そしてプレート上に出現したコロニーの数を計測し、変異原性を求める。

また、多くの化学物質は生体内で代謝活性化された後、DNAと反応して変異原性を示すとされている。

サルモネラ菌には、この代謝活性化の作用を欠くものが多い。そこで、サルモネラ菌に代謝活性化を与えて、代謝物の変異原性を調べるために、S 9 Mix (ラットなどの哺乳動物の腹腔内にフェノバルビタールなどの薬物を投与して、代謝酵素系を誘導した肝ホモジネートの上清分画 (S 9) に補助因子を添加したもの) を加えた代謝活性化法が合わせて行われている。なお本研究でも、この代謝活性化法 (+S 9) も行った。

2 従来の研究と本研究の目的

2-1 従来の水中変異原性物質の濃縮方法

水の変異原性試験を行う場合、直接試料水を用いて試験を行っても変異原性が確認されない場合が多い。これは試料水中の変異原性物質濃度が低いためである。したがって、水の中の変異原性物質の濃縮方法の確立が変異原性試験を行う前に必要不可欠となる。

そこで従来の研究者の濃縮方法をみると、液-液抽出法、逆浸透法、減圧濃縮法、吸着法及びそれらを組み合わせたものに分けられる。

W.O.K.Grabowら⁶⁾は、汚水再生処理水、水道水、河川水をジクロロメタン (DCM) を用いて、中性、酸性、塩基性で抽出した後、DCMを蒸発させて濃縮する液-液抽出法とAmberlite XAD 2とXAD 7を直列に接続して試料水を通し、アセトンで脱離した後、アセトンを蒸発させて濃縮する吸着法とを比較している。変異原性試験の結果、液-液抽出法の方が、変異原性物質をよく回収できたと述べている。しかし、どちらの方法でも揮発性物質、極性有機物質、無機物はあまり回収されないとしている。

B.J.Dutkaら⁷⁾は、ジメチルスルフォキシド (DMSO) を用いて、中性、酸性、塩基性で抽出する液-液抽出法、試料水をロータリーエバポレーターで直接蒸発させ濃縮する減圧濃縮法、メンブレンフィルターに試料水あるいは10倍に減圧濃縮した試料水を通し、ろ過されなかったものをDMSOに溶かすろ過法、Amberlite XAD 2とXAD 7を用いて、吸着脱離した後、蒸発させ、残留物をDMSOに溶かす吸着法の4つの方法を比較している。変異原性試験の結果、以上の方法を単独で使用するのは不十分であるが、強いてあげるならろ過法がよいとしている。

T.Vartiainenら⁸⁾は、Amberlite XAD 4とXAD 8の混合吸着法と3種類の液-液抽出法 (DCMを用いた液-液抽出など) について、高フミン質含有飲料水中の変異原性物質の濃縮性について比較を行った。その結果、変異原性物質の回収率が最も高かったのは、XAD樹脂を用い試料水のpHを1~2にしたものを濃縮した場合であるとした。

B.Wigilisら⁹⁾は、飲料水中変異原性物質回収の比較を行った結果、Amberlite XAD 2樹脂吸着法及びDCM抽出法は、どちらも同等の濃縮特性があること、中性物質の回収は両方法とも充分に行えるが酸性物質の回収は1回の吸着または抽出では完全に行えないこと、パージグ法では変異原性物質の回収は行えないことを示した。

一般に液-液抽出法は、抽出率が低く、濃縮率をあげるために抽出溶媒を蒸発させるので、揮発性成分が

全く回収できない。逆浸透法は、操作は簡単であるが、多量の試料水を濃縮するには大型の装置が必要となり、濃縮率を上げることが難しく、トリハロメタン（THM）の様な極性低分子物質の回収率は低い。減圧濃縮法は、濃縮時に揮発性成分が揮発してしまい回収できず、無機物質濃度が高くなり、直接変異原性試験に用いるのは不向きである。また従来の吸着濃縮方法では、ほとんどがAmberlite XAD 2・4・8などの活性基をもたない樹脂を用いており吸着剤の吸着性能が低く、脱離の際には多量の溶媒を必要とするので濃縮率が悪く、脱離液を再度減圧濃縮法などで濃縮せねばならないので回収率が低くなる。

さらに特殊な濃縮法として次のようなものが提案されている。内海ら¹⁰⁾は、銅フタロシアニンを結合させた綿（青綿）を環境水中に浸すことにより、サルモネラ菌TA98に対し陽性である平面構造を持った多環芳香族を選択的に吸着できるとしている。この方法は、環境中より直接変異原性物質を採取できる反面、特定化合物のみしか回収できない欠点を有している。

上述のように従来の濃縮方法では、いずれも水中有機物質の回収率が低く、その濃縮液を変異原性試験に用いて試料水の総括的かつ定量的に変異原性を評価することは、不適當と言える。したがって、従来の方法の欠点を補った新しい方法を確立しなければ、定量的な水の変異原性を評価することができない。

2-2 従来の変異原性試験の評価方法²⁾³⁾

従来の水の変異原性試験の評価方法には、自然復帰コロニー数（陰性対照）の2倍以上の復帰コロニー数となるか否かで、陽性または陰性と判断するもの、すなわち突然変異比値（MR）において

$$MR = \frac{\text{復帰コロニー数}}{\text{自然復帰コロニー数}} \geq 2$$

の場合に、変異原性がある（陽性である）と評価するものである。

また単に試料水当りの復帰コロニー数で変異原性を評価し、コロニー数の比較により変異原性の強さを論じているものも多い。

一方最近、検体液による菌の致死作用が問題となってきた。これに対してAmes法試験の最終培養の段階でニュートリエントブロス含有培地で培養して生存している菌数を求め、次式に従い誘発突然変異頻度（IMF）を求めることも提案されている。

$$IMF = \frac{\text{復帰コロニー数} - \text{自然復帰コロニー数}}{\text{生菌数}}$$

しかし、これらの評価ではいずれも、試験毎に異なる菌の活性の影響によって、他の試験者及び異なった時に行った試験でのデータと比較を行うことができない。他のデータと変異原性の強さを比較するには、データを一般化して定量的に表す必要がある。つまり、単位試料水あたりの標準変異原性物質換算量で表すことなどが必要である。

2-3 従来の水の変異原性試験結果例

従来の水の変異原性試験には、大別して2つの方向がある。まず第1のものとしては試料水の濃縮を定性的に細かく行うものである。すなわち濃縮液を種々のクロマトグラフィーなどを用いて分画し、各分画について変異原性試験を行い、これにより変異原性の原因物質のグループもしくは原因物質そのものを同定し、変異原性の原因追求を行うものである。もうひとつは、濃縮液をそのまま変異原性試験に用い、試料の総合的な変異原性を定量的に求めようとするものである。

しかし前者では、濃縮液の分離に時間及び労力がかかる割には、揮発性物質は得られないなど、一部の物質しか回収できず、また分画の正確さなどに問題がある。また分画された物質の変異原性の和から試料全体の變異原性を評価することは、試料水中の種々の物質の相互作用を考慮すると無理があるとも言える。また後者においても、変異原性物質の回収率が低いと試料の変異原性を定量的に評価できない。

水道水及び河川水には、変異原性があるという報告がいくつかある。水道水は、浄水処理工程、特に塩素処理の段階で生成される有機ハロゲン化合物に変異原性があると考えられている。また河川水では、家庭排水及び産業排水による汚染物質の中に變異原性物質があると考えられている。

T. Vartiainen ら¹¹⁾は、フィンランド東方クオピオの水道水からの抽出物が非常に高い變異原性を示したと報告している。クオピオの水道水はフミン質を非常に多く含んだ湖水を原水としており、また水処理プロセスには2回の塩素処理工程があり、フミン質と塩素との反応による變異原性物質の生成を示唆した。

このような自然界の非汚染物質である土壌中フミン質を含んだ水を塩素処理する場合、フミン質が塩素と反応して變異原性物質を生成すると言われているが、T. Sato ら¹²⁾の研究によると、フミン質と塩素との反応では添加塩素濃度の増加にともない變異原性物質生成量も増加することが示されている。

S. Maruoka ら¹³⁾は、京都市西高瀬川の河川水を液-液抽出により濃縮し、さらに薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離し、それぞれ變異原性試験を行ったところ、数種の変異原性物質のグループの存在を確認した。さらに同じS. Maruoka ら¹⁴⁾は同河川の水を無極性樹脂Amberlite XAD2で濃縮し、さらにTLCにより分離して變異原性試験を行った。ここで變異原性が高く現れた分画については、さらに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離し、變異原性試験を行ったところ、6つの変異原性物質のグループが現れたことを報告している。すなわち西高瀬川の河川水には少なくとも6種類以上の変異原性物質が存在することが確認されたとしている。

また、河川水の変異原性の特殊なものとして、河川の底質を調べたものがある。安部ら¹⁵⁾は、神奈川県内の4つの河川の底質(底泥)の変異原性を調べた。まず低質をジクロロメタン、エタノールで超音波抽出し、變異原性試験を行ったところ、ほとんどの試料で菌株に対する致死作用が現れた。そこで活性銅カラムやHPLCによる致死作用分画の除去を行ったところ、致死作用は認められなくなり、各試料とも變異原性を示したとしている。

各種の浄水処理行程における變異原性の変化についても種々のも種々の研究報告がある。

N.G. Bassら¹⁶⁾によると、イスラエル・キネス湖の水及びその中のフミン酸の水溶液を塩素処理、二酸化塩素処理したものの変異原性を調べたところ、塩素処理では変異原性を増加させる場合が多いが、二酸化塩素処理では明らかに変異原性を減少させたとしている。

また、P. Backlundら¹⁷⁾によると塩素処理では変異原性を増加させ、オゾン処理及び二酸化塩素処理では、塩素処理のような変異原性の増加はなく、それらの処理を適切に組み合わせることによって、塩素処理による変異原性をほとんどなくす水処理が行えることを示唆した。

活性炭処理による変異原性物質の除去については、C. Loperら¹⁸⁾が、浄水場での原水、塩素処理水及び粒状活性炭(GAC)処理水などについて変異原性試験を行った。それによると、塩素処理によって急激に増加した変異原性が、活性炭処理後には減少し、再度塩素処理を行った場合でも変異原性はなかったとした。

このように各種の浄水処理を適切に組み合わせることによって、安全な飲料水をつくる浄水処理方法を検討できることが示されたので、簡易で定量的な変異原性試験方法を確立し、水の安全性の指標として活用することが求められている。

2-4 当研究室で今までに得られている研究成果と本研究の目的

2-4-1 吸着濃縮方法

従来の吸着濃縮方法を改善するため、以下のような方法が考案された。まず吸着率を高くするために、吸着容量が大きく粒径の小さな無極性吸着樹脂(MCI GEL CSP 800)を選定し、少量の樹脂を用いた小さな装置で短時間で吸着が行われるようにした。また、従来使用されてきた無極性樹脂では、吸着されにくかったイオン性物質を吸着するために、粒径の小さな強塩基性陰イオン交換樹脂(MCI GEL CHPA 25)を追加し、2段の直列カラムにすることによって、従来の樹脂を用いた吸着方法よりも水中微量汚染物質の吸着率を著しく高めた。また、ほぼ密閉系で吸着が行えるようにし、揮発性物質の回収を可能にした。粒径の小さい樹脂を使用することによって、吸着速度を早くするだけでなく脱離速度をも速くし、極少量の脱離溶媒での脱離を可能にし、濃縮率を高めた。

試料水のpHは低いほど、変異原性物質の回収がよく行えるという報告もあるが、通常の水のpHを大きく変えると試料水中の有機物質などが化学変化を起し、変異原性を含めた種々の性質に変化をきたす可能性がある。そこでpH 5に試料を調整して吸着を行うこととした。

脱離溶媒には、無極性樹脂CSP 800の場合は、Ames試験の溶媒として最も多く用いられているジメチルスルホキシド(DMSO)を用いることとした。陰イオン交換樹脂CHPA 25の場合は、硝酸イオンまたは塩化物イオンの陰イオン交換性が他のイオンより高いことを確認し、脱離溶媒には4N-硝酸ナトリウム水溶液または4N-塩化ナトリウム水溶液を用いることとした。

試料水10ℓあたりの使用吸着剤量は、試料水中の有機物質をほぼ完全に吸着できる量としてCSP 800を5ml、CHPA 25を2mlとした。

吸着の際の流量については、無極性樹脂を用いた従来の研究者の平均的な値である空間速度(SV=約

120/h)と同じにした。すなわち通水速度は約600ml/hとし、通水時間は約16時間40分となり、多くの試験研究室の勤務終了時間17:00前に吸着装置をセットし、翌朝の9時過ぎに吸着が完了するので、夜間を利用して吸着が行える。これにより時間の有効利用と数多くのサンプルをいくつか平行して処理することが可能となった。

このように小型の2段カラムの吸着装置に10ℓという少量の水を約17時間と言う短時間で吸着処理を行った結果、従来の濃縮方法に比べて非常に高い回収率及び濃縮率が得られた。すなわち、CSP800+CHPA25の2段カラムによる吸着率は、トリハロメタン(THM)で95%、全有機ハロゲン(TOX)で78%、260nm吸光度(A₂₆₀)で88%となった。つまり性質の異なるさまざまな有機物質を、約80%以上吸着できることが認められた。これに対して、従来の研究で用いられていたAmberlite XADシリーズの樹脂では、全体的に25~65%の吸着率にしかならなかった。脱離率も考慮にいたした回収率でも、CSP800+CHPA25は他の樹脂に比べて、約2倍となることが認められた。これらのことより、水の変異原性を定量的に評価するために有効で簡便な濃縮方法が確立されたといえる。

2-4-2 変異原性試験の評価方法

従来の研究者の変異原性試験結果の発表は、単に生成したコロニー数を提示したり、自然復帰コロニー数の2倍以上の復帰コロニー数が認められた時を陽性(変異原性がある)と判断するような方法がなされるのみであった。しかし、菌の活性が一定でないので、これらの結果からは水の安全性を一般的、また定量的に評価することはできない。

そこで以下のような方法を考案した。強い変異原性が認められている陽性対照物質溶液を検体液として用いた変異原性試験(陽性対照試験)と検体液の溶媒(ブランク)を用いた変異原性試験(陰性対照試験)を併せて行い、サンプルの変異原性試験結果(コロニー数)を陽性対照物質濃度に換算することにより、試験時毎に異なる菌の活性に左右されずに、水の変異原性を定量的に評価できるようにした。すなわち、菌の活性を示す値として、陽性対照物質の比活性(コロニー数/μg-陽性対照物質)を次式で求めた。

$$\text{比活性} = \frac{(\text{陽性対照コロニー数}) - (\text{陰性対照コロニー数})}{(\text{プレートあたりの陽性対照物質添加量: } \mu\text{g})} \quad (1)$$

この比活性を用いて、陽性対照物質換算濃度(μg-陽性対照物質/ℓ-試料水):Cを次式で求めて変異原性の強さを評価した。

$$C = \frac{(\text{サンプルのコロニー数}) - (\text{陰性対照コロニー数})}{(\text{比活性}) \times (\text{プレートあたりの試料水添加量: } \ell)} \quad (2)$$

なお、変異原性に用いる検体液の溶媒(陰性対照)としては、DMSOと4N-硝酸ナトリウムを1:1で混合したものを1mlまで用いても菌株の活性に大きな影響を及ぼさずに変異原性試験を行えることを

確認した。また、本方法で使用する精製した吸着樹脂本体からは、変異原性物質は溶出されないことも確認した。

2-4-3 本研究の目的

本研究では、新しく開発された樹脂を使用した水中微量有機物回収のための吸着濃縮法を用いて、多摩川の河川水及びその処理水の変異原性を定量的に評価することを目的とした。

具体的には、水の変異原性試験を行うための検体液調製方法として、小型な装置でかつ短時間で水中の有機物質を濃縮回収可能な方法として考案された吸着濃縮法の改良の余地のある部分の検討をし、充実をはかった。また確認の意味で、新しく使用した樹脂吸着剤と従来で使用されている樹脂吸着剤の吸着性能を実際の変異原性試験により比較した。

また、濃縮検体液の添加量が多すぎると、サルモネラ菌株に対して致死作用がある可能性が指摘されているので、回収濃縮液添加量とコロニー数の関係を調べることで直線的なDose-Responseがえられる範囲を確認し、またその際の生存している菌数を調べ(生菌数試験)、河川水等の変異原性試験の最適濃縮液添加条件を求めた。

さらに、最適条件で多摩川河川水及び河川水を塩素処理やオゾン処理等の処理をした水及び水道水を吸着濃縮して、それぞれの変異原性を調べ、現在使用されている汚染物質指標との関係を含めて多摩川の水を水道水などとして利用する上での遺伝毒性的な視点からの安全性を総合的に評価することを目的とした。

3 実験²⁾

3-1 試料

3-1-1 吸着剤

変異原性試験の検体液を得るための吸着濃縮には、無極性樹脂CSP800及び強塩基性陰イオン交換樹脂CHPA25を用いた。また従来研究者の用いてきた無極性樹脂XAD2、XAD4、弱極性樹脂XAD8も比較のため用いた。なお、この5種類の吸着樹脂の化学構造や物性などを表2に示した。

市販の吸着樹脂には、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、必ず精製してから用いなければならない。そこで無極性樹脂及び弱極性樹脂の精製のための洗浄方法を表3に、強塩基性陰イオン交換樹脂の洗浄方法を表4に示した。

樹脂はそれぞれカラムに充填し、上向流で洗浄した。エタノール洗浄の段階における、流出液の220 nmでの吸光度(A_{220})が、10 mm石英セルで0.1以下になったら、次の段階に移った。

精製した樹脂は、使用するまで湿潤状態で保存した。また一度使用した樹脂は廃棄し、常に新しいものを使用した。

表2 使用樹脂の物性

吸着剤	Amberlite XAD 2	Amberlite XAD 4	Amberlite XAD 8	MCI GEL CSP 800	MCI GEL CHP A 25
型	多孔質無極性樹脂	多孔質無極性樹脂	多孔質弱極性樹脂	多孔質無極性樹脂	多孔質強塩基性 陰イオン交換樹脂
化学構造	$\left\langle \text{CH}_2 - \text{CH} \right\rangle_n$	$\left\langle \text{CH}_2 - \text{CH} \right\rangle_n$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ -\text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \\ \quad \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{R} \quad \text{O} \quad \text{R}_1 \\ \quad \quad \\ \text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \\ -\text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\left\langle \text{CH}_2 - \text{CH} \right\rangle_n$	$\left\langle \text{CH}_2 - \text{CH} \right\rangle_n$
内部表面積 (m^2/g)	143	635	307	711	767
湿潤充填密度 (dry換算 g/cm^3)	0.37	0.31	0.29	0.25	0.31
孔径 (μm)	297~840	297~840	297~840	149~250	149~250
直径 20 nm 以下の 細孔容積 (cm^3/g)	0.26	1.07	0.44	1.33	1.01

表3 無極性樹脂及び弱極性樹脂の洗浄方法

順番	溶 液	空間速度 (SV)	時間
1	エタノール	10/h	
2	純水：蒸留水活性炭処理水	10/h	4 h

表4 強塩基性イオン交換樹脂の洗浄方法

順番	溶 液	空間速度 (SV)	時間
1	エタノール	10/h	
2	5%塩化ナトリウム水溶液	10/h	2 h
3	純水：蒸留水活性炭処理水	10/h	2 h

3-1-2 試料水

(1) 河川水

本研究では、首都圏の水がめの一つであり東京都と神奈川県の間を流れている。多摩川水系の図2に示す地点での河川水等を用いた。

採水にはバケツを用い、ステンレス製の金網付のじょうごを用いて、試料水中のゴミ、砂などを取り除きながら、共洗いしたプラスチック容器(10ℓまたは20ℓ)に泡立てないように採水した。有機物質濃度測定用の試料水の保存をした後、硫酸でpH5に調整して吸着用試料水とした。

(2) 塩素処理水

塩素処理水として、(1)の河川水のいくつかを原水とし、塩素処理を行った試料水を用いた。まず原水の全有機炭素(TOC)濃度を測定し、TOCが2.5mg/ℓ未満の場合には有効塩素濃度10mg/ℓ、TOCが2.5mg/ℓ以上の場合には有効塩素濃度20mg/ℓとなるように次亜塩素酸ナトリウムを添加した。これを24h暗所で放置した。そして、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を有効塩素濃度10mg/ℓあたり0.1ml/ℓ添加して、残留塩素を消去し、有機物質濃度測定用の試料水の保存をした後、硫酸でpH5に調整して吸着用試料水とした。

また、塩素添加量の影響を調べるため一部の河川水については、50mg/ℓ並びに200mg/ℓの塩素を添加して同様に処理した試料水を用いた。

(3) オゾン処理水及び活性炭処理水

オゾン処理水として、(1)の河川水のうち、羽村取水堰の水と是政橋の水に2.0mg/ℓのオゾンを加えた試料水及びそれらを粒状活性炭を詰めたカラムに接触時間30分で流した水を試料水とした。

(4) 水道水

採水是水栓を開いてしばらく水を流し、共洗いしたプラスチック容器(10ℓまたは20ℓ)に泡立てないように採取した。そして、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を添加して、残留塩素を消去し、有機物質濃度測定用の試料水の保存をした後、硫酸でpH5に調整して吸着用試料水とした。なお、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液の添加量は水質が比較的良好な水道水の場合0.05ml/ℓ、その他の水道水では0.2ml/ℓとした。

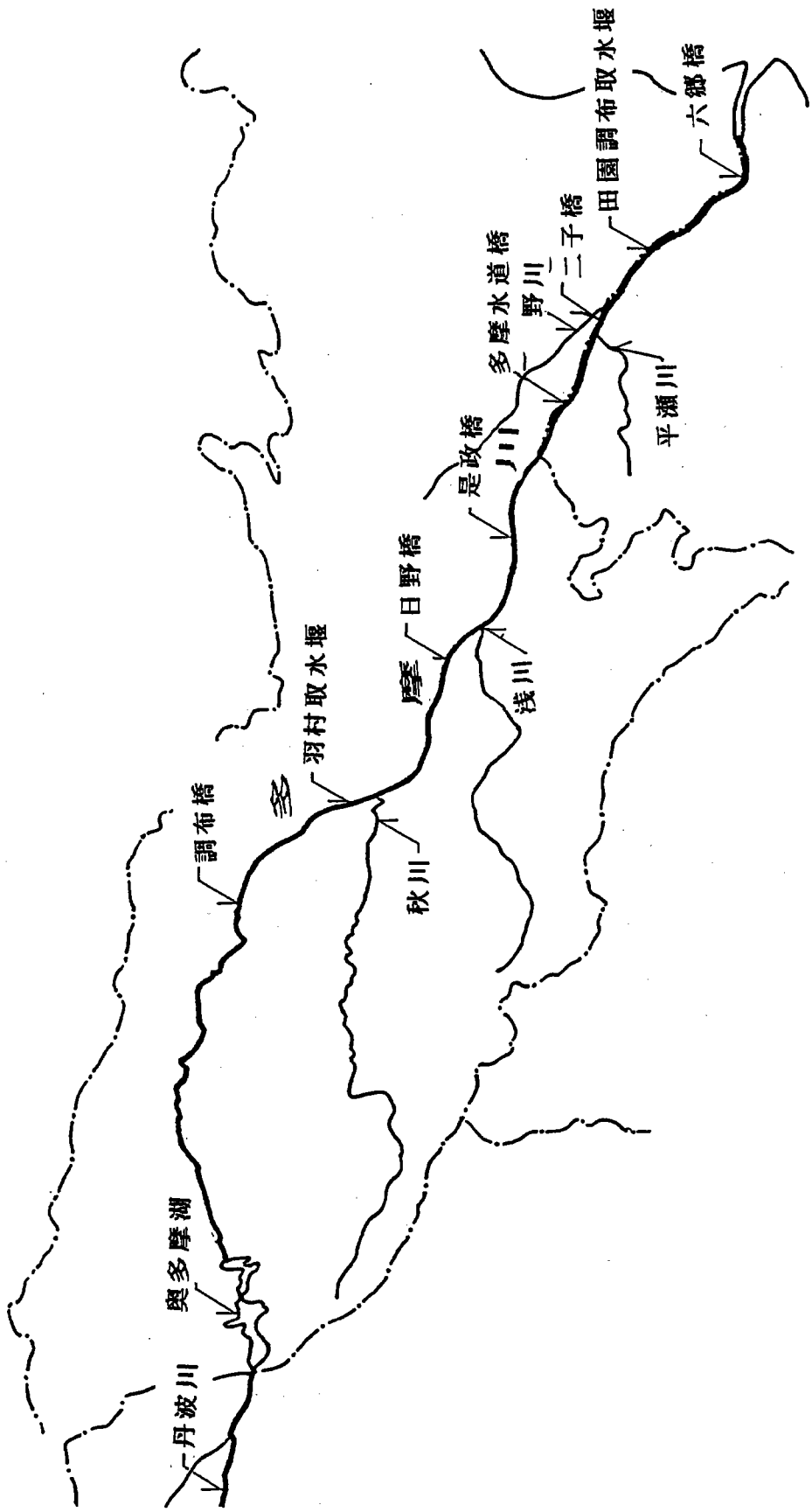


图2 採水地点

3-2 有機物質濃度の測定

3-2-1 試料水の保存

本研究では、種々の有機物を含み、かつそれらの量が数 mg/l 程度の低濃度の水を扱った。そのため水中の様々な有機物質を高感度に測定する必要があった。

なお測定を試料水採水時に行えない場合は、試料水をバイアル瓶に採取し、約 $5^{\circ}C$ の冷蔵庫に保存して、測定時に取り出した。すなわちトリハロメタン (THM) 濃度の測定用、並びに全有機ハロゲン濃度 (TOX) 測定用では、容量が 120 ml のバイアル瓶に 100 ml の試料水を入れ、(1+10)リン酸水溶液を $0.5\text{ ml}/100\text{ ml}$ 添加し、ただちにテフロンシート、ゴム栓及びアルミキャップにより密閉した。

なおリン酸を添加したのは、試料水を酸性にしTHM及びTOXの生成反応を停止させるためである。

3-2-2 260 nmでの吸光度(A_{260})の測定

有機物質の多くは短波長の紫外線を吸収するが、短波長では炭酸イオンや硝酸イオンなどの無機物質の影響を大きく受ける。そこで本研究では、無機物質の影響が少なく、不飽和結合を持つ大部分の有機物質が吸収を示す 260 nm の吸光度(A_{260})を大分子有機物質の濃度の指標として測定した。¹⁹⁾ 測定装置には、日本分光製可視紫外分光光度計UV IDEC-430型を用いた。また有機物質濃度が低いため、 50 mm の石英セルを使用した。

3-2-3 全有機炭素(TOC)濃度の測定

水中有機物質の総合的な指標の一つとして、全有機炭素(TOC)濃度を測定した。測定装置には、島津製作所製の2チャンネル非分散赤外線ガス分析方式の実験室用全有機炭素計TOC-500型を用いた。測定は全炭素(TC)と無機炭素(IC)について行い、その差よりTOCを求めた。なお測定条件は表5に示す通りとした。

3-2-4 トリハロメタン(THM)濃度の測定

トリハロメタン(THM)とは、クロロホルム(CHCl_3)、ジクロロプロモメタン(CHCl_2Br)、ジブロモクロロメタン(CHBr_2Cl)及びプロモホルム(CHBr_3)の総称であり、本研究では低分子有機化合物濃度の指標として測定した。THMの測定はヘッドスペース法により行い、測定装置には柳本製作所製の非放射線源式電子捕獲型検出器(ECD-N)付ガスクロマトグラフG2800EN型を用いた。

²⁰⁾ガスクロマトグラフの測定条件を表6に示した。ヘッドスペース法による測定では、バイアル瓶に一定量の試料水を入れたものを $20^{\circ}C$ のインキュベーターに入れ、測定時にマイクロシリンジを用いて、バイアル瓶の気相部分を一定量採取して、ガスクロマトグラフで分析した。なお長時間保存する場合には、約 $5^{\circ}C$ の冷蔵庫に保存し、測定する2時間前に $20^{\circ}C$ のインキュベーターに移した。また試料水には全有機ハロゲン濃度(TOX)測定用のものと共通であるので、TOX測定前のバイアル瓶の気相部分を用いて

表5 TOC計の測定条件

Gas	高純度乾燥空気	150 ml/min
試料注入量	20 μ l	
TC	680 $^{\circ}$ C	酸化触媒
IC	150 $^{\circ}$ C	IC反応剤

表6 ガスクロマトグラフの測定条件

カラムの長さ	ガラス3 m
充填剤	20% Silicone DC-550, Chromosorb W-AW
試料注入量	100 μ l
温度	カラム90 $^{\circ}$ C, 注入口130 $^{\circ}$ C, 検出器250 $^{\circ}$ C
Discharge Gas	純ヘリウムガス185 ml/min (0.95 kg/cm ²)
Carrier Gas	純ヘリウムガス198 ml/min (1.00 kg/cm ²)

表7 TOX計の測定条件

吸 着	
活性炭カラム	Diahope DACP 30 mg \times 2
通水	3.3 ml/min 20 ml
無機ハロゲンの除去	NH ₄ NO ₃ (6.5 g/l), 3.3 ml/min, 2 ml \times 2回
燃 焼 ・ 分 解	
温度	800 $^{\circ}$ C~850 $^{\circ}$ C
Gas	O ₂ : 200 ml/min Ar: 250 ml/min

THM濃度を測定し、その直後に残った試料水を用いてTOXを測定した場合もあった。THMの定量は、同時に上述4物質の標準液で測定した検量線によって行い、4種類の物質の濃度を合計して、THM濃度とした。

3-2-5 全有機ハロゲン濃度(TOX)の測定

水中有機物質の総括的な指標の一つとして、全有機ハロゲン濃度(TOX)を測定した。測定装置には、三菱化成製全有機ハロゲン分析装置TOX-10型を用いた。この装置では、特殊な活性炭に試料水中のハロゲン化物を吸着させ、そのうちの無機ハロゲンを硝酸アンモニウム水溶液で除去した後、その活性炭を800 $^{\circ}$ C以上で燃焼分解させ、発生したハロゲン化水素を電量滴定により定量し、塩素量に換算してTOXを求め

るものである。²¹⁾なお測定条件は表7に示す通りとした。また測定を行う試料水はバイアル瓶に採取したものを、約5℃の冷蔵庫に保存しておいた。

3-3 吸着濃縮方法

3-3-1 装置

吸着装置を図3、脱離装置を図4に示した。カラムは内径9.8mmのガラス管の片側を細くしたものを用い、下部よりガラスウール、吸着樹脂、ガラスウールを充填し、ふたとして同様なガラス管の短いものにガラスウールをつめ、テフロンチューブで接続したものをを用いた。プレカラムは、気泡及びSSを取り除くために、樹脂カラムの前に取り付けたもので、内径1.3mmのガラス管で中にガラスウールを充填した。

吸着は、東京理化工機製ペリスタポンプMP-3型を用いて、試料水を上向流で通して行った。通水用チューブには、主として、2×3mmテフロンチューブを使用した。接続部およびペリスタポンプ部には、3×5mmシリコンチューブを使用した。また試料水容器より確実に試料水を吸い出すために、テフロンチューブの先にガラス管を接続し、ガラス管の先が常に液面下にあるようにした。試料水が河川水の場合は砂などを吸い込まないように、ガラス管の先を閉じ、途中に穴を開けたものを用い、容器の底より2cm位の所より試料水を吸い出した。

脱離は、アトー製ペリスタポンプSL-1211L型を用いて、脱離溶媒を各カラムに下向流で通して行った。脱離溶媒通液用チューブには、主として、2×3mmテフロンチューブを使用した。接続部及びポンプ部には、3×5mmシリコンチューブを使用した。

試料水容器及び流出水容器あるいは脱離液の採取容器は、揮発性成分の揮散を少なくするために、すべてほぼ密閉系となるように、キャピラリーなどで外気と接続させた。

なお脱離後すぐに変異原性試験を行わない場合には、脱離液を-10℃前後の冷凍庫で保存し、試験前に解凍して用いた。

3-3-2 条件

試料水10ℓあたり使用吸着樹脂量は、CSP800を5ml、CHPA25を2mlとした。これに試料水10ℓを3-2-1に述べたような装置を用いて通水した。流量については、無極性樹脂を用いた従来の研究者の平均的な値である空間速度(CSP800についてSV=120/h)とほぼ同じにし、通水速度は約600ml/hとした。そして試料水はpH5に調整して吸着を行った。

脱離には、無極性樹脂CSP800の場合は、ジメチルストホキンド(DMSO)をSV=2/hすなわち、樹脂5mlの場合10ml/hで通し、また陰イオン交換樹脂CHPA25の場合は、4N-硝酸ナトリウム水溶液をSV=2/hまたはSV=5/hすなわち、樹脂2mlで4ml/hまたは10ml/hで通して、脱離率を比較した。

また脱離液は、カラム中の樹脂充填部の空隙率を0.5とみなし、またその他の非充填部の体積を考慮し、

CSP 800では通液後5 mlから、そしてCHPA 25では通液後2 ml後からの、それぞれ5 mlを採取した。

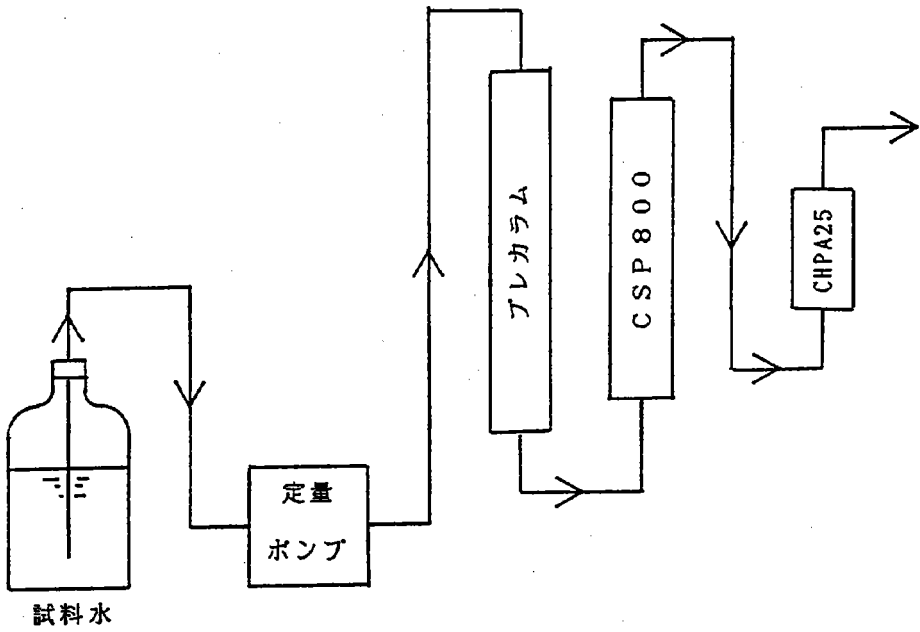


図3 吸着装置

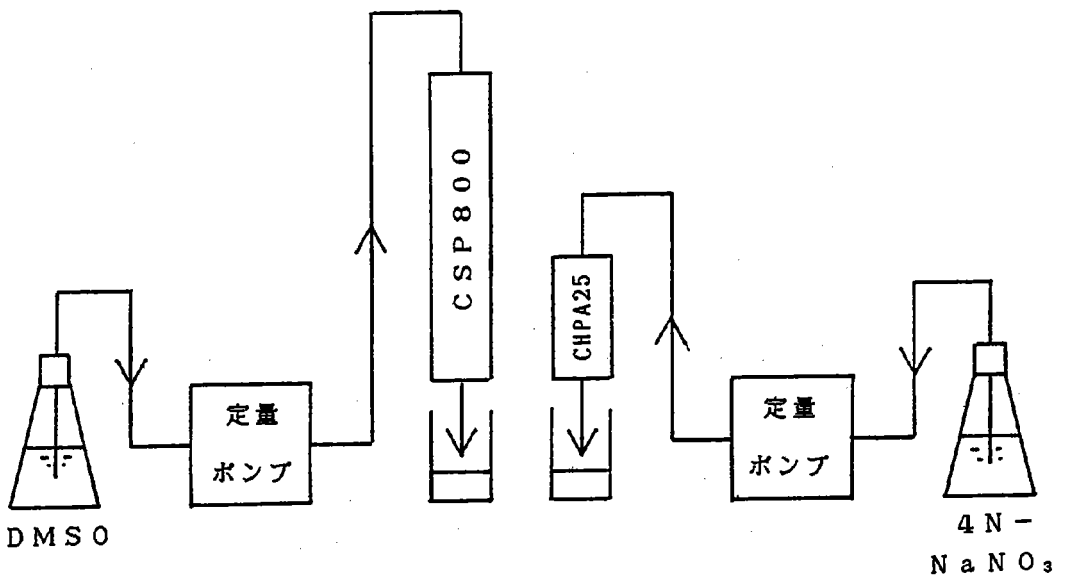


図4 脱離装置

3-4 Ames 法変異原性試験方法

3-4-1 滅菌

試験に使用する器具（アルミキャップ付き短試験管など）、試薬溶液、蒸留水のうちで、雑菌の混入の恐れのあるものは、すべて滅菌処理を施した。熱的に不安定な溶液には戸過滅菌を、それ以外は、高圧蒸気滅菌器（オートクレーブ）により滅菌した。

戸過滅菌は、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ 、直径 24mm のメンブレンフィルターを装着したテフロン製のフィルターホルダーを高圧蒸気滅菌処理した後、試薬溶液を入れた滅菌済み注射器をフィルターホルダーに取り付け、徐々に加圧し、戸過滅菌した。なお試薬溶液が水溶液の場合は、ニトロセルロース製のフィルターを、ジメチルスルホキシド（DMSO）溶液の場合は、再生セルロース製のフィルターと使い分けた。これは、ニトロセルロース製のものがDMSOに溶けてしまうからである。

高圧蒸気滅菌は、オートクレーブを用いて、2気圧、 120°C で15分間行った。なお、容器はゆるめにスクリューキャップをするか、通気性のあるスポンジ状シリコン栓をし、栓のできない容器、器具は、アルミホイルに包んで滅菌した。

菌の接種や戸過滅菌、最少グルコース入り寒天平板培地の製作は、雑菌などに汚染されないように、雑菌灯を備え、フィルターを通した清浄な空気で、陽圧のエアーカーテンを形成できるクリーンベンチ内で行った。

3-4-2 試薬及び溶液の保存

試験で使用する溶液のうち、Vogel-Bonner 最少培地Eの10倍濃度の原液、 0.1M ナトリウムリン酸緩衝液（ $\text{pH} 7.4$ ）、培養液、ヒスチジン・ビオチン溶液は、数回使用分まとめて調整した。

Vogel-Bonner 最少培地Eの10倍濃度の原液は、最少グルコース寒天平板培地の製作時に使用した。その組成を表8に示した。各成分を1~4の順に蒸留水に溶解し、前のものが完全に溶解してから次のものを加えた。そうしない場合には、白色沈澱を析出することがある。使用時には10倍に希釈するが、希釈後の pH が7であることを原液調整時に確認した。

0.1M リン酸ナトリウム緩衝液は、試験実施時に使用するもので、 0.1M リン酸水素2ナトリウム水

表8 Vogel-Bonner 最少培地Eの10倍濃度の組成

順 番	成 分	濃度 (g/l)
1	硫酸マグネシウム・7水塩	2
2	クエン酸・1水塩	20
3	リン酸水素2カリウム・無水塩	100
4	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水塩	35

溶液に、0.1 Mーリン酸二水素ナトリウム水溶液を加えて、pH 7.4 となるように調整した。

培養液は、菌の前培養時に使用するもので、蒸留水 100 ml に Oxoid 製のニュートリエントブロス 1.3 g (1.3 g 中に塩化ナトリウム 0.5 g を含む) の割合で調製した。

上記の 3 種類の溶液は高圧蒸気滅菌後、約 5℃ の冷蔵庫に保存し、使用直前に再び滅菌処理した。

ヒスチジン・ピオチン溶液は、0.1 mM の Lーヒスチジン水溶液と 0.1 mM の Dーピオチン水溶液を等量づつ混合し、汙過滅菌したものを 10 ml づつ採り、約 5℃ の冷蔵庫で保存した。

また、試験で用いた試薬はいずれも特級を用いた。このうち不安定な Lーヒスチジン、Dーピオチン及び標準変異原性物質である 4ーニトロキノリンー1ーオキシド (4NQO) と 2ーアミノアントラセン (2AA) は、約ー10℃ の冷蔵庫で保存し、S 9 Mix の調製時に用いた S 9 分画は、オリエンタル酵母製のものを用いー80℃ 以下の超低温槽で、また S 9 Mix 用 cofactor は、同じくオリエンタル酵母製のを約 5℃ の冷蔵庫で保存して用いた。

3-4-3 最少グルコース寒天平板培地の作製

最少グルコース寒天平板培地 (以下“プレート” という) は、菌の培養に必要な最少限の無機塩類とグルコースを含むものである。

プレートの作製 (1000 ml 分) は、蒸留水 100 ml を入れた三角フラスコに Vogel-Bonner 最少培地 E の 10 倍濃度の原液 100 ml を加えたもの、また蒸留水 100 ml を入れた三角フラスコにグルコース 20 g を加えたもの、および蒸留水 700 ml を入れた三角フラスコに Difco 製 Bacto Agar 15 g を入れたものを、それぞれ高圧蒸気滅菌し、約 60℃ まで放冷した後、3 つの溶液を混合し、約 30 ml ずつ滅菌シャーレ (直径 90 mm) に分注した。水平面上に放置し冷却固化させた後、シャーレの上下を転倒させて室温で 1~2 日間放置して余分の水分を蒸発させてから試験に使用した。

なお糖や寒天は、アンモニウム塩と混合して加温すると着色し、場合によっては変異原物質を生成するので、別々に滅菌して温度が下がってから混合した。またエチレンオキシドを用いて滅菌したシャーレは、エチレンオキシド自体が塩基対置換型の変異原物質なので、TA 100 などの株菌のコロニー数が増えることがあるので使用せず、ガンマ線で滅菌したシャーレを用いた。

3-4-4 テスト菌株の前培養

3-4-2 で調製した培養液を 5 ml ずつ、通気性のあるスポンジ状シリコン栓付培養瓶に分注し、高圧蒸気滅菌を行い、クリーンベンチ内で放冷した。3-4-5 の菌懸濁液を分注凍結した株菌を、解凍して培養液に接種した。なお接種量は、培養液 5 ml あたり 10 μ l とした。これを振とう培養恒温槽により、37℃ で約 15 時間振とう培養して菌懸濁液を得た。なお菌懸濁液は、使用するまで氷水中に保存した。またこの菌懸濁液は試験毎に新しく培養したものをを用い、解凍した株菌は殺菌して廃棄した。

本研究のAmes法変異原性試験では、サルモネラ菌株TA98およびTA100を用いた。最初の株菌は、国立公衆衛生院地域環境衛生学部より分けていただいた。

3-4-5 テスト菌株の保存

凍結保存した株菌が数本になった際には株菌を増やして保存した。テスト菌株の前培養と同様に培養したテスト菌株の菌懸濁液8mlにジメチルスルホキシド(DMSO)を0.7mlの割合で加えて混合し、ガンマ線滅菌済プラスチック製小試料瓶に0.5mlずつ分注し、ドライアイスアセトンで凍結後、超低温槽に入れ、使用時まで-80℃で凍結保存した。凍結保存している菌懸濁液は、解凍しないように注意した。

3-4-6 S9 Mixの調製

使用の都度、表9の組成のようなS9 Mixを調製した。すなわち、S9 Mix 10mlを調整する場合、S9 Mix用 cofactor (10ml用)に滅菌済みの蒸留水9mlを加えて溶解し、ろ過滅菌を行った後、S9分画1mlを加えて行った。S9 Mixは、できるだけ使用直前に調製し、使用するまで氷水中に保存した。残ったS9 MixおよびS9分画は、廃棄処分にした。

表9 S9 Mixの組成(S9 Mix 1mlあたり)

順 番	成 分	量 (ml)
1	S9分画	0.1
2	0.4 M 塩化マグネシウム水溶液	0.02
3	1.65 M 塩化カリウム水溶液	0.02
4	1 M グルコース-6-リン酸水溶液	0.005
5	0.1 M NADPH水溶液	0.04
6	0.1 M NADH水溶液	0.04
7	0.2 M ナトリウム-リン酸緩衝溶液	0.5
8	蒸留水	0.275

NADPH:還元型ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチドリオン酸

NADH:還元型ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチド

3-4-7 トップアガーの調製

トップアガーは、菌及び検体をプレート上に均一に広げたための寒天液である。この調製は、Difco製Bacto Agar 0.8wt%(夏期0.9wt%)及び塩化ナトリウム0.5wt%を含む水溶液を高圧蒸気滅菌処理したものと、L-ヒスチジン0.5mM、D-ビオチン0.5mMの割合の水溶液をろ過滅菌したものを10:1の割合で混合した。なお、このとき使用した蒸留水はどちらも高圧蒸気滅菌処理したものである。調製したトップアガーは固まらないように、約45℃のウォーターバスで保温して使用した。

3-4-8 試験実施

試験方法の概略を図5に示した。アルミキャップ付き短試験管に検体液1.0 ml, 代謝活性化を行わない場合(-S9と呼ぶ)には, 0.1 M-ナトリウムリン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 ml, また代謝活性化を行う場合(+S9と呼ぶ)には, S9 Mixを0.5 ml加えた。これらに菌懸濁液0.1 mlを加え, タッチミキサーを用いてよく混合した後, トップアガー2.0 mlを加えて, 更に混合し, プレート上に注いで一様に広げた。なお, 1検体, 1条件につきこのような操作を2回ずつ行った。

同時に, 陰性対照試験及び陽性対照試験を行った。陰性対照としては, それぞれの脱離溶媒であるDM SOと4 N-硝酸ナトリウム水溶液の同量の混合溶液1 mlを検体液とし, 陽性対照としては, S9 Mixを加えない場合(-S9)には4 NQO, S9 Mixを加える場合(+S9)には2 AAを陰性対照の混合液に溶解して用いた。このときの陽性対照物質濃度は主に, 4 NQOの場合, TA 98で0.5 µg/プレート, TA 100で0.05 µg/プレート, 2 AAの場合, TA 98で0.15 µg/プレート, TA 100で0.15 µg/プレートとした。

菌及び検体を含むトップアガーが固化した後, 37℃のインキュベーターで培養し, 約48時間後に, 復帰突然変異により増殖したプレート上のコロニー数を数えて変異原性の強さを評価した。

3-5 生菌数試験方法

生菌数試験方法とは, Ames法変異原性試験において37℃, 48時間後に生存している菌数を調べるものであり, サンプルの菌数に対する致死作用を求めるとされている。

実際の操作では, 培地(プレート)及び用いる菌懸濁液以外はAmes法変異原性試験と同じ操作を行った。

まず培地(プレート)は, 最少グルコース寒天平板培地ではなく, Oxoid製のニュートリエントブロス25 g/l, 寒天15 g/lの割合の溶液を用いて, 最少グルコース寒天平板培地の作製と同様な操作で培地を作成した。

このニュートリエントブロス培地を用いることにより, 培地上に生存している菌は復帰突然変異の有無にかかわらずコロニーとなって出現する。実際のAmes法変異原性試験においては, 10^8 個程の菌をプレートに投入しているので, このすべてがコロニーとなってしまえばカウントが困難である。そこで前培養した菌懸濁液を0.1 M-ナトリウムリン酸緩衝液(pH 7.4)により 10^5 希釈したものを用いて試験を行った。これにより1枚のニュートリエントブロス培地あたり, 1000個程度の菌が投入されることになり, カウントできるようになる。

3-6 試験の安全及び衛生

試験に用いるサルモネラ菌は病原菌であるため, 試験終了後, 生菌が付着している容器や器具は直ちに高圧蒸気滅菌を行なった。また, そうでないものについては, 0.5%クレゾール石鹼液で消毒した。とく

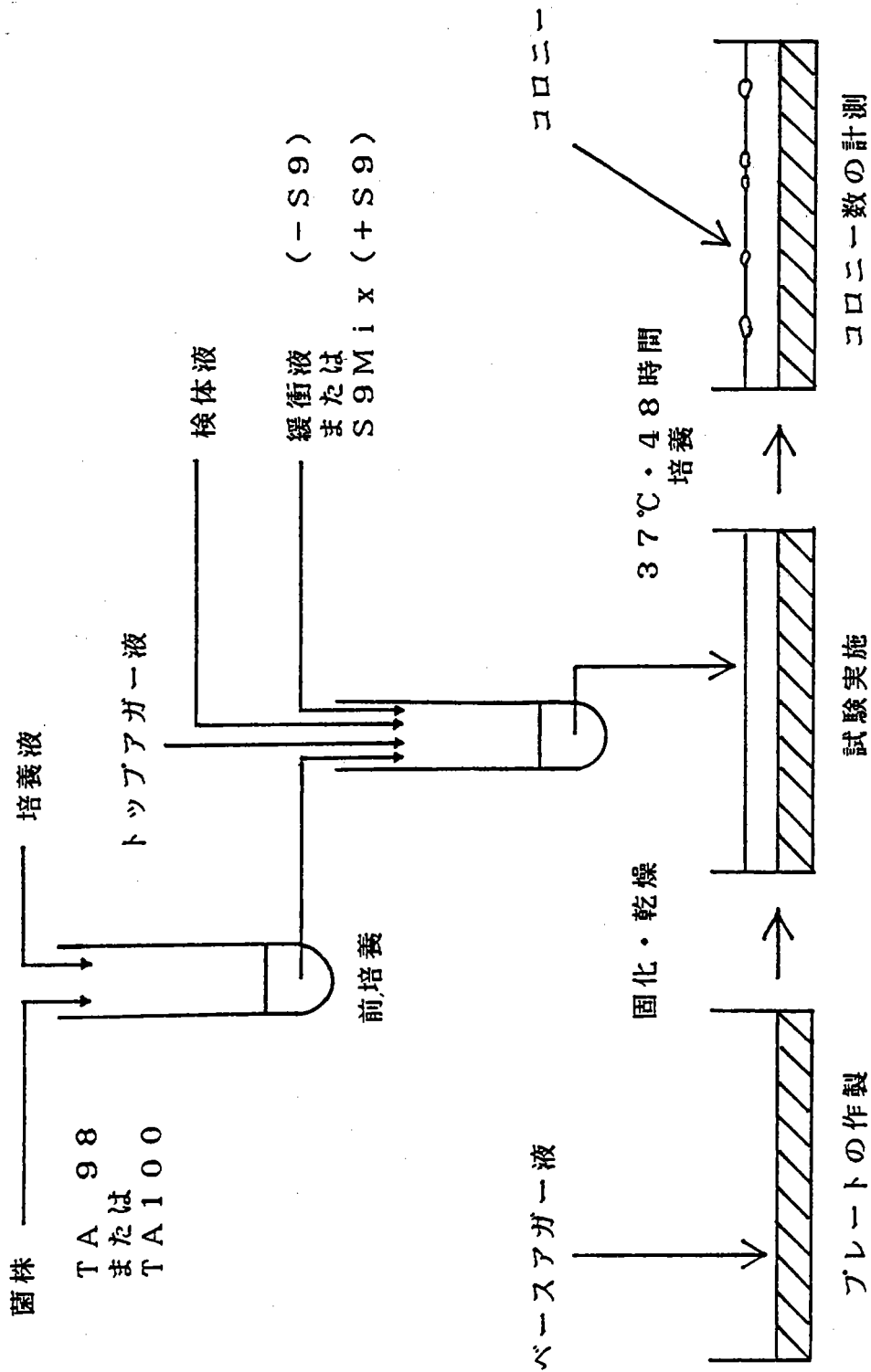


図5 Ames法変異原性試験の概略

にサルモネラ菌が増殖したシャーレは、滅菌後に焼却処分した。また、実験者の手指、実験台なども、試験終了後、直ちに、0.5%クレゾール石鹼液で消毒した。

陽性対照物質は、実験動物などに対し、がん原性が明らかな物質である。そこで、陽性対照液を扱ったメスピペット及び試験管は、アルコールで洗浄した後、超音波洗浄し、蒸留水で洗浄した。残った陽性対照液や洗浄アルコールは、活性炭の入ったポリ容器に捨て、吸着後、焼却処分した。

菌株や陽性対照物質は人体に悪影響を及ぼすので、以上のように実験者の健康障害や一般環境への汚染には充分注意した。

4 結果及び考察

4-1 新しい吸着濃縮方法の確認

4-1-1 脱離速度の検討

今までは、吸着濃縮の際の脱離を無極性樹脂CSP800、陰イオン交換樹脂CHPA25ともに、空間速度(SV) = 2/hでおこなっていた。すなわち試料水10ℓあたり、CSP800では樹脂量が5mlなのでDMSOの流量を10ml/h、CHPA25では樹脂量が2mlなので4N-硝酸ナトリウム水溶液の流量を4ml/hとしていたが、これではCHPA25の脱離時間がCSP800に比べ2倍以上かかってしまい、時間を有効に利用ができない。そこでCHPA25の場合にSV = 5/h、すなわち流量を10ml/hとした際の影響を、従来の条件(4ml/h)と比べた。吸着装置を2系統用意し、同じサンプルを同条件で吸着させ、CHPA25の脱離速度をそれぞれ10ml/hと4ml/hで脱離し、その脱離液のA₂₆₀を比較した。

なお脱離液は、従来と同様に通液後2mlからの5mlを採取したが、その前後の脱離液についてもA₂₆₀を測定した。

CHPA25の脱離速度と脱離液のA₂₆₀の関係を表10に示す。検体液として用いる本採取分(2~7ml)については、脱離速度を早くした場合の方が高い値、すなわち高濃度の脱離液が得られた。これは従来の脱離速度においては本採取分の2~7mlでは脱離が完了せず、7ml後にも濃縮液が出ているためである。一般には速度が遅いほど、脱離が早く完了するものだが、SV = 2/hつまり4ml/hでは速度が遅すぎるため、カラム内で逆拡散や対流がおきてしまい、また気泡の混入による影響が多く出る可能性があることなどにより、少量の脱離液では、うまく脱離が行われなかったためと考えられる。

表10 脱離速度によるA₂₆₀の変化

	0 ml ~ 2 ml	2 ml ~ 7 ml	7 ml ~ 13 ml
4 ml/h (SV = 2/h)	N. D.	0.249	0.099
10 ml/h (SV = 5/h)	N. D.	0.472	N. D.

※ 500倍希釈による測定値

この結果より、CHPA 25の脱離速度をSV=5/hとした方がよいことが判明した。これにより、脱離所用時間は、CSP 800とCHP 25で同じになり、試料の濃縮を効率的に行えるようになった。

4-1-2 変異原性試験による従来法との比較

試料水として水道水を用い、従来の樹脂としてのXAD 4/8と本研究でのCSP 800+CHPA 25とでそれぞれ同条件で吸着濃縮し、変異原性試験を行った結果を表11、表12に示す。なお、表11の水道水は東京都世田谷区で採水したもの（東京都砧浄水場系）で、表12の水道水は神奈川県藤沢市で採水したもの（神奈川県寒川、広域水道企業団伊勢原浄水場混合系）である。また表11、表12より、陽性対照物質換算濃度を求めたものを表13、表14に示す。なお表中でN.D.とあるのは復帰コロニー数が、陰性対照試験での自然復帰コロニー数の1.3倍を超えず、有意な復帰コロニー数の差があるといえないものである。

表11 変異原性試験での樹脂性能の比較（水道水・東京A1）
（コロニー数/plate）

	TA 9 8		TA 1 0 0	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰 性 対 照	4 0	5 2	8 6	8 2
陽 性 対 照	3 3 9	3 6 2	1 5 2	6 2 2
CSP 800+CHPA 25 試料水換算 0.5 ℓ	5 4	9 9	1 8 3	1 3 8
CSP 800+CHPA 25 試料水換算 1.0 ℓ	6 6	7 8	1 3 6	1 4 6
XAD 4/8 試料水換算 0.5 ℓ	5 4	7 0	9 6	8 3
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.2 5	0.0 2 5	0.5

表12 変異原性試験での樹脂性能の比較（水道水・神奈川）
（コロニー数/plate）

	TA 9 8		TA 1 0 0	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰 性 対 照	2 4	4 8	5 7	7 0
陽 性 対 照	3 1 0	3 6 3	2 4 1	7 8 0
CSP 800+CHPA 25 試料水換算 0.5 ℓ	6 5	5 5	1 8 0	1 2 3
CSP 800+CHPA 25 試料水換算 1.0 ℓ	9 1	7 5	3 8 0	1 7 7
XAD 4/8 試料水換算 0.5 ℓ	5 7	6 2	2 0 5	1 2 6
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.2 5	0.0 5	0.5

表13 変異原性試験結果(水道水・東京A1)

(μg-陽性対照物質/ℓ-試料水)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
CSP800+CHPA25 試料水換算0.5ℓ	0.047	0.076	0.073	0.104
CSP800+CHPA25 試料水換算1.0ℓ	0.024	0.021	0.019	0.059
XAD4/8 試料水換算0.5ℓ	0.047	0.029	N.D.	N.D.

表14 変異原性試験結果(水道水・神奈川)

(μg-陽性対照物質/ℓ-試料水)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
CSP800+CHPA25 試料水換算0.5ℓ	0.143	N.D.	0.067	0.075
CSP800+CHPA25 試料水換算1.0ℓ	0.117	0.021	0.088	0.075
XAD4/8 試料水換算0.5ℓ	0.115	N.D.	0.080	0.079

表13, 表14における試料水0.5ℓ添加のCSP800+CHPA25とXAD4/8の結果を比較すると、東京都の水道水では従来法より本方法が高い変異原性を示していることがわかる。しかし、神奈川県の水道水ではあまり差がみられなかった。このことより、変異原性の低い試料の場合はあまり差がないが、一般的に本方法が従来法よりもすぐれていると考えられる。

また、表13では、CSP800+CHPA25の試料水添加量の違いにより、陽性対照物質換算濃度が異なっている。これは、試料水1ℓ分を添加することで検体液の濃度が高く成り過ぎたために菌の致死作用を起こしてしまい、試料水1ℓ分添加では低い変異原性結果がでてしまったためと考えられる。

4-2 水の変異原性試験の最適条件の決定

4-2-1 最適条件の決定法

本来、Ames法変異原性試験により変異原性を求める場合には、検体液濃度(プレートあたりの濃縮液量)を変化させて変異原性試験を行い、検体液濃度と復帰コロニー数の関係(Dose-Response)が直線となっていることが必要とされている。すなわち、検体液濃度の増加に1次比例して、復帰コロニー数が多くなっていくことが必要である。

Ames法試験変異原性試験では、検体の毒物質による菌株への致死作用により変異菌株が少なくなることが指摘されている。すなわち、一般的に検体液濃度が低い場合には、検体液濃度と復帰コロニー数の直線関係がとれているが、検体液濃度が高くなると遺伝子への突然変異が強くなりすぎ、菌株が不活性に

なるかもしくは死んでしまうことによって復帰コロニー数が少なくなるとされている。しかし、菌株に対する毒性いわゆる致死作用がある物質の場合、変異原性の強さと致死作用（毒性）の強さによって、検体液濃度がきわめて低くても復帰コロニーが認められない場合や、ある程度の濃縮液濃度までは復帰コロニーが認められるが、それ以上になると復帰コロニーが認められなくなる場合などがある。

活性銅カラムやHPLCなどを用いた致死作用成分の除去¹⁵⁾も、行われている。しかし、この場合に変異原性物質も除去されてしまう可能性がある。また、それらの操作には多大な労力や試料水が必要になり、簡易で安価な癌原物質の予備スクリーニングとして高い普及率を示している現行のAmes法変異原性試験にはなじまないと考えられる。また、本研究では水の安全性を総括的に評価することを目的としているので、本研究では得られた濃縮液中の成分を細かく分離することは行わないこととした。

各種の水の変異原性をモニタリングする場合を考えると、一つ一つの試料水につき、それぞれ検体液濃度（プレートあたりの濃縮液量）を変化させて変異原性試験を行い、変異原性を求めるには、多量の濃縮液が必要になり、もとの試料水量及び吸着樹脂量も多量に必要なことになる。また操作も多くなることより、多数の試料を同時にモニタリングしにくくなる。また本方法は少量の樹脂及び試料水を用い、小型な装置で濃縮を行うことを特徴とするものであるが、その特徴も失われてしまう。

そこで経済的、時間的及び作業行程の簡略化を考慮した際、試料水の種類ごとに、濃縮液添加最適条件を決定することが望ましいと考えられた。

濃縮液添加最適条件の決定には、各種の水について、汚染度の異なる数カ所の代表的な試料水を用いて、検体液濃度（プレートあたりの濃縮液量）を変化させ変異原性試験を行い、直線的なDose-Responseのとれる範囲を求めた。直線的なDose-Responseがとれている場合に、変異原性を陽性対照物質濃度で評価すると、すべて同一の値となるわけであるが、誤差を少なくするためには検体液濃度の高いところで変異原性を評価すべきである。そこで、試料の種類ごとに大部分の試料水でもほぼ直線なDose-Responseのとれる範囲での最大濃縮液添加量を最適添加量とした。

なお、今回求めた濃縮液添加最適条件は、あくまで一般的な水を用いる場合の値であるので、特に汚染物質濃度が高かったり、特殊な成分が含まれている水については、あてはまらない場合があると考えられる。また、今回求めた濃縮液最適添加量で、高い変異原性があると判断されたものなどでは、より正確な評価をするために直線的なDose-Responseのとれていることを確認し、致死作用の状況も考慮し、また他の種類の菌株を用いたり、他の変異原性試験方法（Rec-Assay法²²⁾など）を組み合わせ、一層詳しい変異原性を評価することが必要である。

4-2-2 多摩川河川水の濃縮液最適添加量

河川水の濃縮液添加量を変化させて変異原性試験を行った結果の例を表15～表21に示す。なお、添加量はもとの試料水量に換算して表示してある。また、換算した試料水量と復帰コロニー数の関係を図6～図12に示す。図よりTA98の場合、0.4ℓ相当付近よりコロニー数の落込みがみられることがやや

多く、TA100の場合も0.3ℓ相当付近よりコロニー数の落込みがみられることがあった。しかし、全体的にコロニー数の落込みがはじまる一般的な添加量を特定できなかった。これは使用した河川水の汚染度がかかなり異なり、様々な汚染物質が含まれているためと考えられ、河川水については最適添加量を決定するには、今後さらに水質毎に分類して検討する必要があるといえる。

4-2-3 多摩川河川水の塩素処理水の濃縮液最適添加量

塩素処理水の濃縮液添加量を変化させて変異原性試験を行った結果の例を表22～表28に示す。なお、添加量はもとの試料水量に換算して表示してある。また、換算した試料水量と復帰コロニー数の関係を図13～図19に示す。それぞれの図より0.3ℓ相当付近からコロニー数の落込みがみられることが多く、菌株への致死作用が現れている。これより塩素処理水の場合の濃縮液添加量の最適条件は0.3ℓ相当が妥当と考えられる。

4-2-4 水道水の濃縮液最適添加量

水道水の濃縮液添加量を変化させて変異原性試験を行った結果の例を表29～表31に示す。なお、添加量はもとの試料水量に換算して表示してある。また、換算した試料水量と復帰コロニー数の関係を図20～図22に示す。それぞれの図より0.7ℓ相当付近よりコロニー数の落込みがみられることが多く、菌株への致死作用が現れている。これより水道水の場合の濃縮液添加量の最適条件は0.6ℓ相当が妥当と考えられる。

表15 変異原性試験結果(多摩川河川水・調布橋)

(コロニー数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陽性対照	13	33	108	119
陰性対照	275	347	256	405
試料水換算添加量 0.1ℓ	13	33	135	139
試料水換算添加量 0.3ℓ	21	28	112	131
試料水換算添加量 0.6ℓ	32	27	120	140
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 1.15 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 0.088
 THM : 0 μg/ℓ
 TOX : 4 μg/ℓ

表 16 変異原性試験結果 (多摩川河川水・羽村取水堰 3)

(□ = -数 / plate)

	TA 98		TA 100	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰性対照	13	27	100	103
陽性対照	286	337	269	414
試料水換算添加量 0.1 l	19	32	96	99
試料水換算添加量 0.3 l	24	39	94	111
試料水換算添加量 0.6 l	17	35	90	106
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 1.25 mg/l
 A₂₆₀ : 0.079
 THM : 0 μg/l
 TOX : 0 μg/l

表 17 変異原性試験結果 (多摩川河川水・日野橋)

(□ = -数 / plate)

	TA 98		TA 100	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰性対照	25	32	100	108
陽性対照	308	249	307	249
試料水換算添加量 0.1 l	26	46	113	127
試料水換算添加量 0.3 l	24	51	114	128
試料水換算添加量 0.6 l	37	55	114	144
試料水換算添加量 1.0 l	49	76	129	143
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 7.00 mg/l
 A₂₆₀ : 1.329
 THM : 0 μg/l
 TOX : 20 μg/l

表 18 変異原性試験結果(多摩川河川水・是政橋3)

(コロニ-数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	17	27	102	113
陽性対照	368	386	434	478
試料水換算添加量 0.1 l	27	40	109	125
試料水換算添加量 0.3 l	43	57	115	106
試料水換算添加量 0.6 l	50	78	122	131
試料水換算添加量 1.0 l	64	65	120	117
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.2	0.05	0.2

試料水の水質 TOC : 8.15 mg/l
 A₂₆₀ : 0.549
 THM : 0 μg/l
 TOX : 30 μg/l

表 19 変異原性試験結果(多摩川河川水・二子橋3)

(コロニ-数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	19	32	120	112
陽性対照	409	356	393	412
試料水換算添加量 0.06 l	26	32	137	142
試料水換算添加量 0.13 l	29	38	153	136
試料水換算添加量 0.19 l	23	32	109	134
試料水換算添加量 0.25 l	43	53	112	131
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 4.90 mg/l
 A₂₆₀ : 0.565
 THM : 0 μg/l
 TOX : 5 μg/l

表 20 変異原性試験結果(多摩川河川水・二子橋4)

(コロ=数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	14	23	114	115
陽性対照	304	330	278	390
試料水換算添加量 0.1ℓ	18	29	111	130
試料水換算添加量 0.3ℓ	27	38	104	130
試料水換算添加量 0.6ℓ	27	45	88	119
陽性対照物質添加量(μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 6.90 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 0.491
 THM : 0 μg/ℓ
 TOX : 25 μg/ℓ

表 21 変異原性試験結果(多摩川河川水・野毛)

(コロ=数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	32	51	100	89
陽性対照	294	308	257	329
試料水換算添加量 0.1ℓ	49	66	103	128
試料水換算添加量 0.2ℓ	41	64	120	103
試料水換算添加量 0.3ℓ	40	77	115	110
試料水換算添加量 0.6ℓ	33	84	109	104
陽性対照物質添加量(μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 6.45 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 0.238
 THM : 0 μg/ℓ
 TOX : 0 μg/ℓ

表 22 変異原性試験結果(塩素処理水・調布橋)

(コロニー数/plate)

	TA 98		TA 100	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰性対照	13	33	108	119
陽性対照	275	347	256	405
試料水換算添加量 0.1 ℓ	20	39	125	125
試料水換算添加量 0.3 ℓ	26	47	145	134
試料水換算添加量 0.6 ℓ	36	40	153	124
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 1.10 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 0.069
 THM : 19.4 μg/ℓ
 TOX : 127 μg/ℓ

表 23 変異原性試験結果(塩素処理水・羽村取水堰3)

(コロニー数/plate)

	TA 98		TA 100	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰性対照	13	27	100	103
陽性対照	286	337	269	414
試料水換算添加量 0.1 ℓ	13	30	110	97
試料水換算添加量 0.3 ℓ	20	31	90	103
試料水換算添加量 0.6 ℓ	15	32	113	111
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 1.05 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 0.057
 THM : 20.2 μg/ℓ
 TOX : 77 μg/ℓ

表 24 変異原性試験結果 (塩素処理水・日野橋)

(コロニ-数/plate)

	TA 9 8		TA 1 0 0	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰 性 対 照	2 5	3 2	1 0 0	1 0 8
陽 性 対 照	3 0 8	2 4 9	3 0 7	2 4 9
試料水換算添加量 0.0 9 ℓ	3 0	3 8	1 2 7	1 1 9
試料水換算添加量 0.2 7 ℓ	3 6	3 6	1 5 7	1 4 4
試料水換算添加量 0.5 4 ℓ	5 2	5 5	2 0 1	1 5 3
試料水換算添加量 0.9 0 ℓ	5 3	6 5	2 2 1	2 2 0
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.1 5	0.0 5	0.1 5

試料水の水質 TOC : 5.9 0 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 1.1 0 6
 THM : 3 3.1 μg/ℓ
 TOX : 2 0 2 μg/ℓ

表 25 変異原性試験結果 (塩素処理水・是政橋 3)

(コロニ-数/plate)

	TA 9 8		TA 1 0 0	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰 性 対 照	1 7	2 7	1 0 2	1 1 3
陽 性 対 照	3 6 8	3 8 6	4 3 4	4 7 8
試料水換算添加量 0.1 ℓ	2 5	3 2	1 1 6	1 2 4
試料水換算添加量 0.3 ℓ	4 8	5 7	1 4 0	1 5 3
試料水換算添加量 0.6 ℓ	6 6	6 7	1 4 4	1 7 2
試料水換算添加量 1.0 ℓ	8 9	1 0 8	1 7 5	1 9 5
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.2	0.0 5	0.2

試料水の水質 TOC : 7.2 5 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 0.5 2 7
 THM : 1 9.3 μg/ℓ
 TOX : 1 3 2 μg/ℓ

表 26 変異原性試験結果(塩素処理水・二子橋3)

(コロニ-数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	19	32	120	112
陽性対照	409	356	393	412
試料水換算添加量 0.06ℓ	23	36	112	141
試料水換算添加量 0.13ℓ	25	33	143	146
試料水換算添加量 0.19ℓ	29	32	161	155
試料水換算添加量 0.25ℓ	27	39	154	165
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 4.40 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 0.509
 THM : 26.0 μg/ℓ
 TOX : 222 μg/ℓ

表 27 変異原性試験結果(塩素処理水・二子橋4)

(コロニ-数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	14	23	114	115
陽性対照	304	330	278	390
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15
試料水換算添加量 0.1ℓ	25	24	105	149
試料水換算添加量 0.3ℓ	33	35	104	140
試料水換算添加量 0.6ℓ	33	51	105	135
陽性対照物質添加量 (μg/plate)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 6.50 mg/ℓ
 A₂₆₀ : 0.443
 THM : 12.2 μg/ℓ
 TOX : 102 μg/ℓ

表 28 変異原性試験結果(塩素処理水・六郷橋)

(コロニ数/plate)

	TA 98		TA 100	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰性対照	41	49	133	120
陽性対照	331	370	412	417
試料水換算添加量 0.06 l	29	40	129	119
試料水換算添加量 0.13 l	40	50	105	124
試料水換算添加量 0.19 l	23	34	110	128
試料水換算添加量 0.25 l	48	47	90	96
陽性対照物質添加量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 6.10 mg/l

A₂₆₀ : 0.703THM : 2.09 $\mu\text{g}/\text{l}$ TOX : 194 $\mu\text{g}/\text{l}$

表 29 変異原性試験結果(水道水・東京A2)

(コロニ数/plate)

	TA 98		TA 100	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
陰性対照	17	27	99	75
陽性対照	288	531	278	677
試料水換算添加量 0.25 l	21	34	121	97
試料水換算添加量 0.50 l	23	29	136	123
試料水換算添加量 0.75 l	32	35	128	130
試料水換算添加量 1.00 l	14	27	106	94
陽性対照物質添加量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.5	0.25	0.05	0.5

試料水の水質 TOC : 0.78 mg/l

A₂₆₀ : 0.061

表 30 変異原性試験結果(水道水・東京B)

(コロニ-数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	18	36	90	95
陽性対照	249	294	233	319
試料水換算添加量 0.25 l	23	40	118	107
試料水換算添加量 0.50 l	35	48	244	135
試料水換算添加量 0.75 l	46	49	283	186
試料水換算添加量 1.00 l	49	32	309	207
陽性対照物質添加量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.5	0.1	0.05	0.1

試料水の水質 TOC : 2.17 mg/l

A₂₆₀ : 0.070THM : 24.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ TOX : 141 $\mu\text{g}/\text{l}$

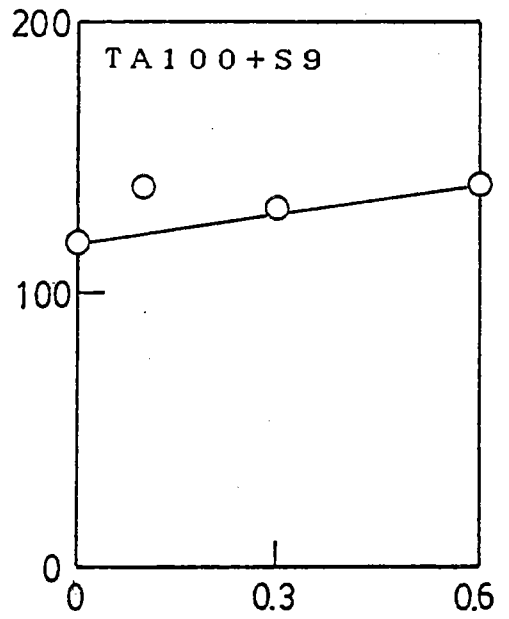
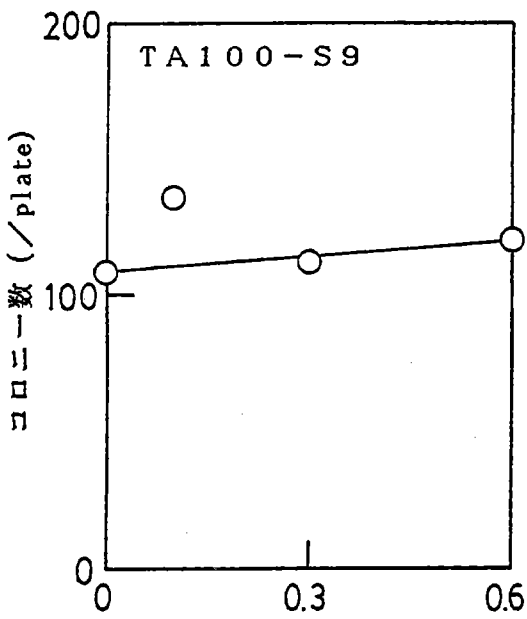
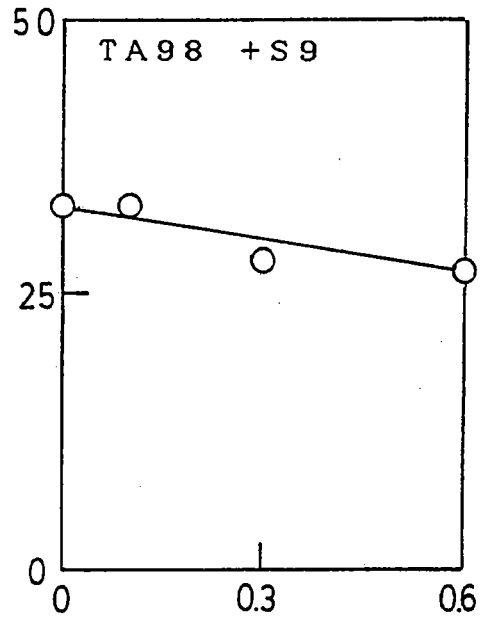
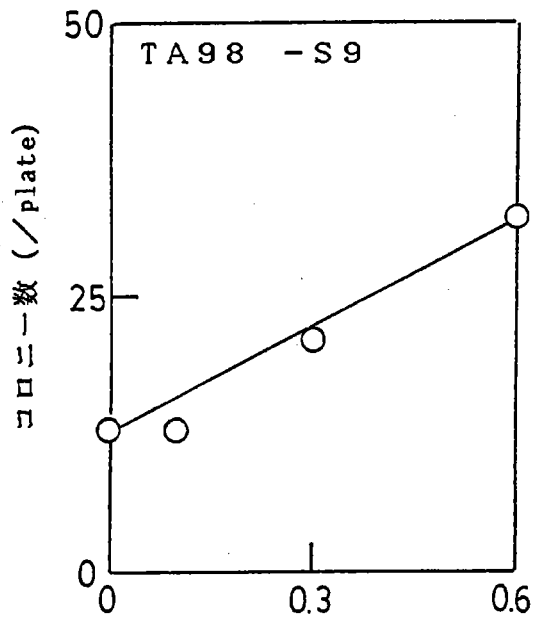
表 31 変異原性試験結果(水道水・千葉)

(コロニ-数/plate)

	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	21	32	94	98
陽性対照	289	352	280	369
試料水換算添加量 0.25 l	37	49	139	123
試料水換算添加量 0.50 l	45	38	176	141
試料水換算添加量 0.75 l	44	47	207	123
試料水換算添加量 1.00 l	54	47	236	124
陽性対照物質添加量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.5	0.15	0.05	0.15

試料水の水質 TOC : 2.30 mg/l

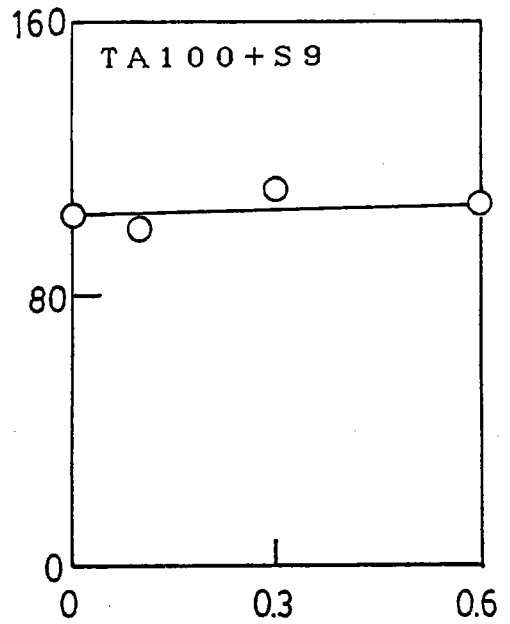
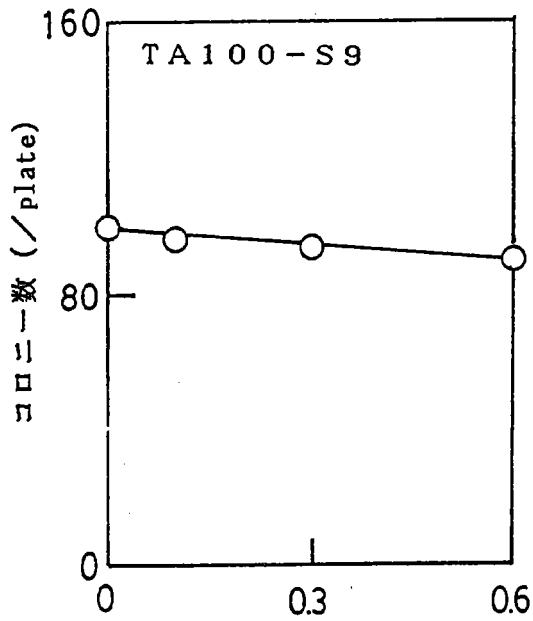
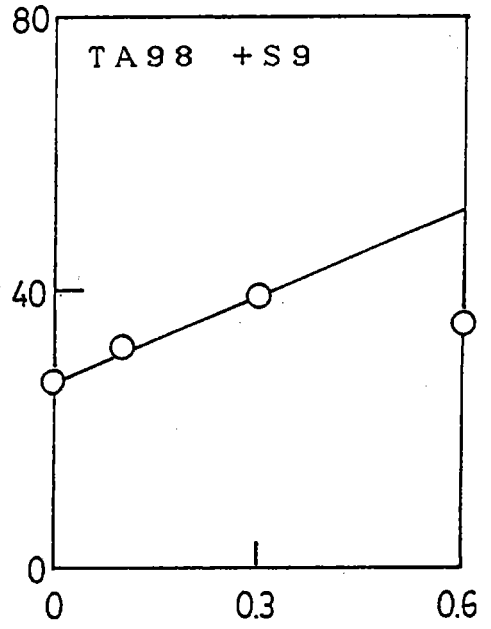
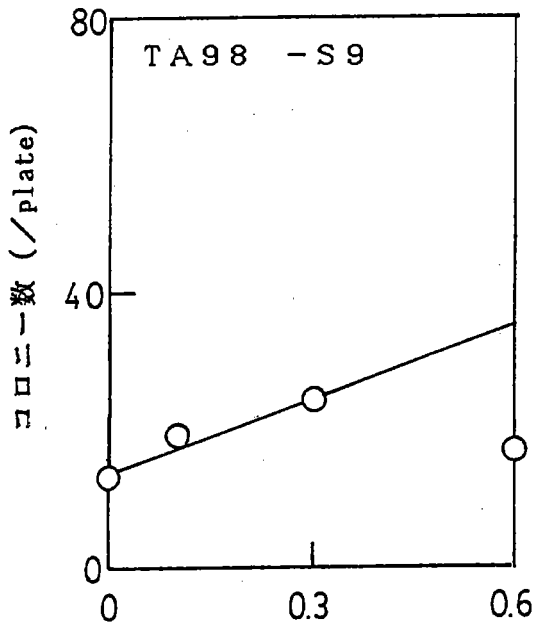
A₂₆₀ : 0.119THM : 56.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ TOX : 173 $\mu\text{g}/\text{l}$



添加量 (g)

添加量 (g)

図6 濃縮液最適添加量の検討(多摩川河水・調布橋)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (l)

添加量 (l)

図7 濃縮液最適添加量の検討(多摩川河川水・羽村取水堰3)
 ※添加量はもとの試料水量換算

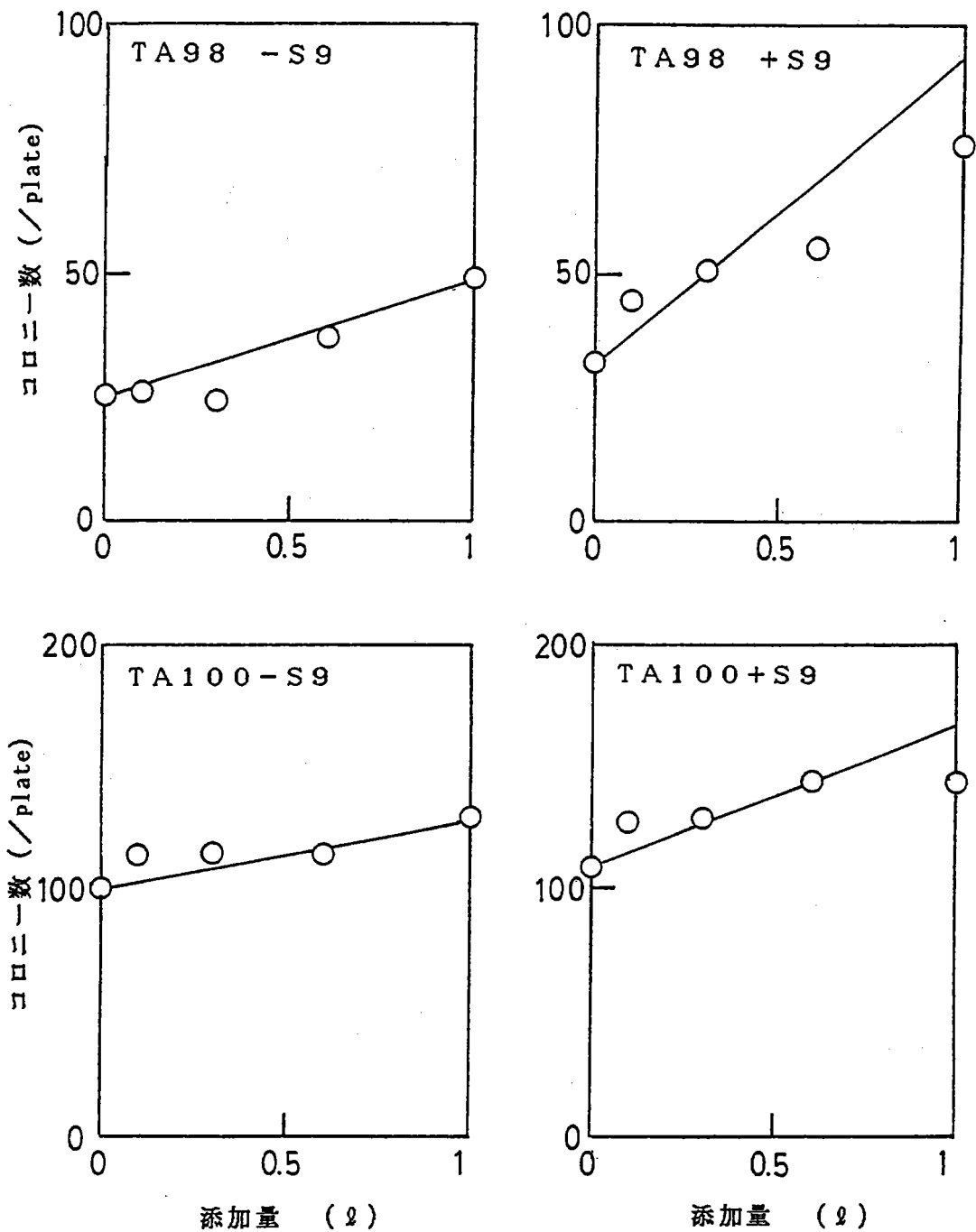
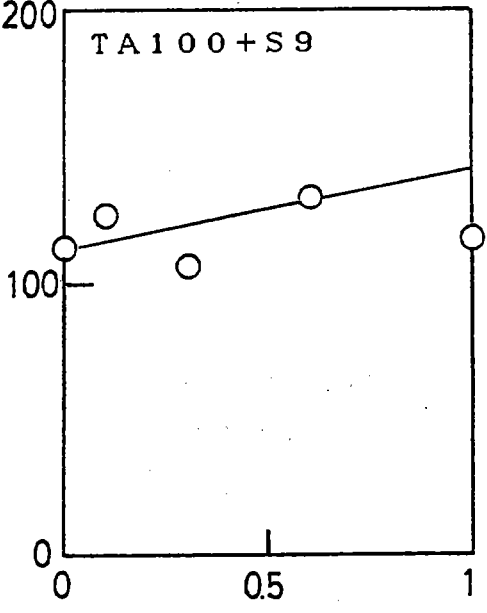
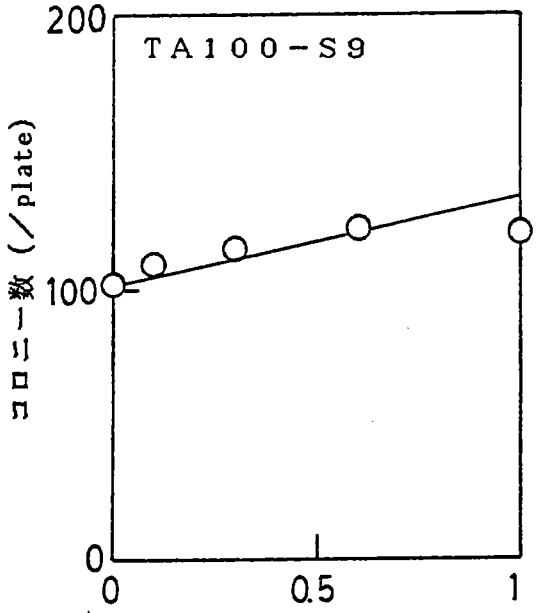
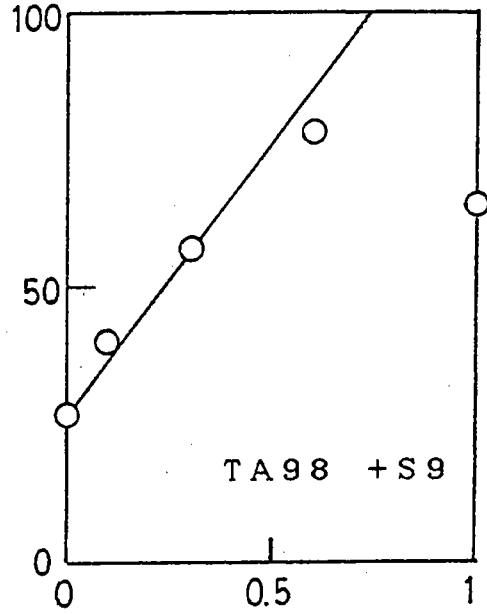
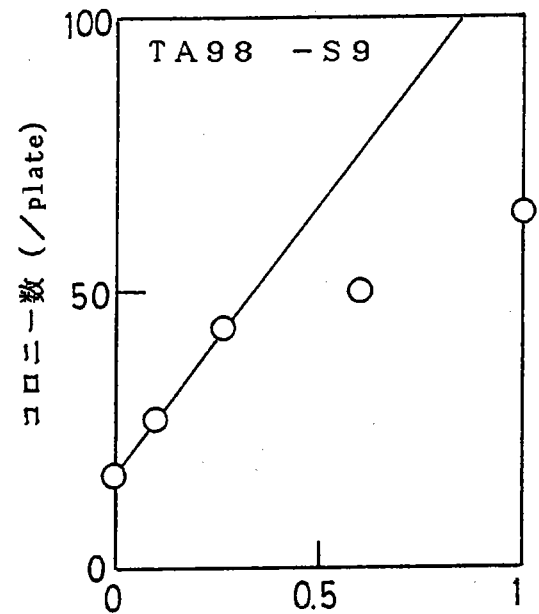


図8 濃縮液最適添加量の検討(多摩川河水・日野橋)
 ※添加量はもとの試料水量換算

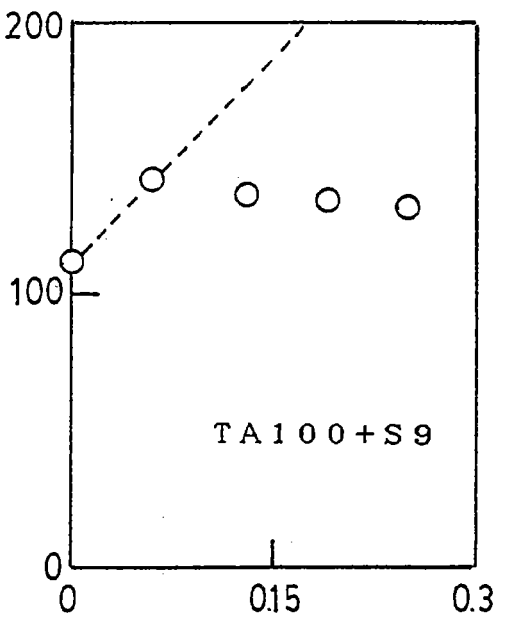
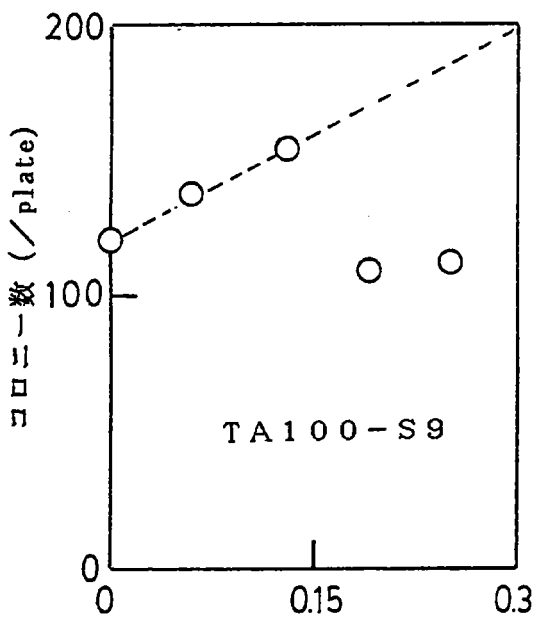
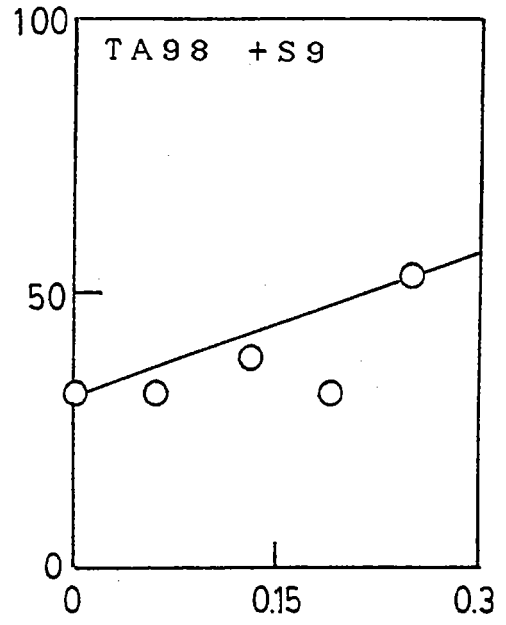
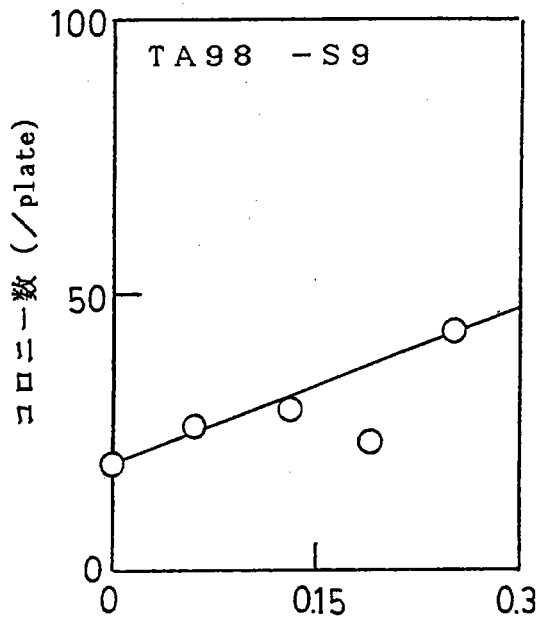


添加量 (g)

添加量 (g)

図9 濃縮液最適添加量の検討(多摩川河水・是政橋3)

※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (g)

添加量 (g)

図10 濃縮液最適添加量の検討(多摩川河水・二子橋3)
 ※添加量はもとの試料水量換算

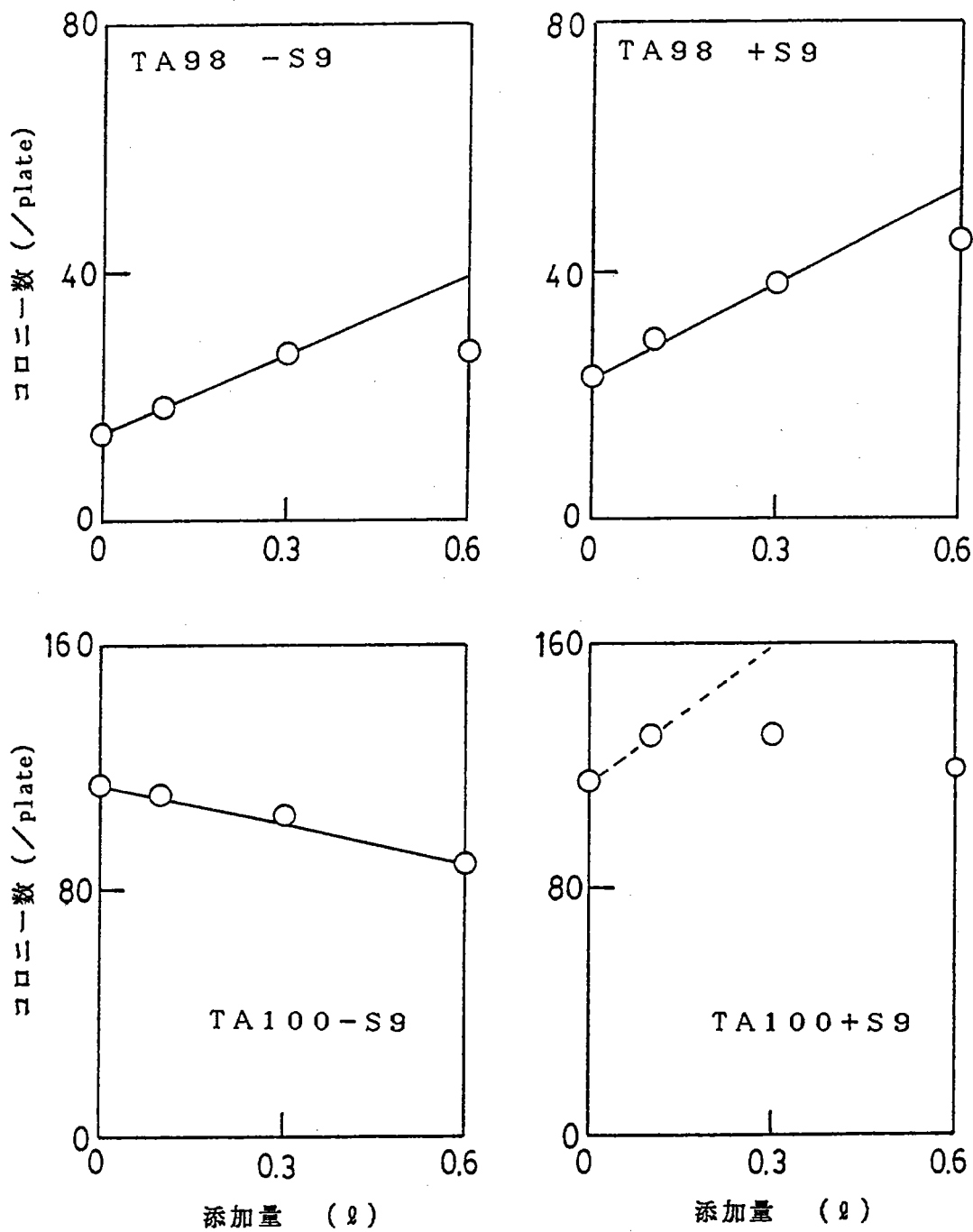
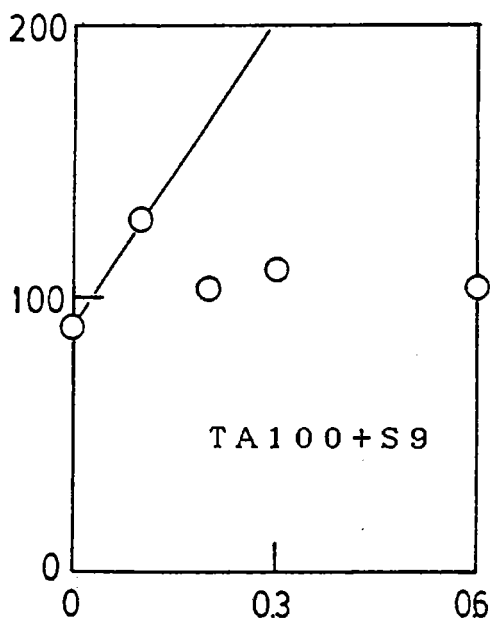
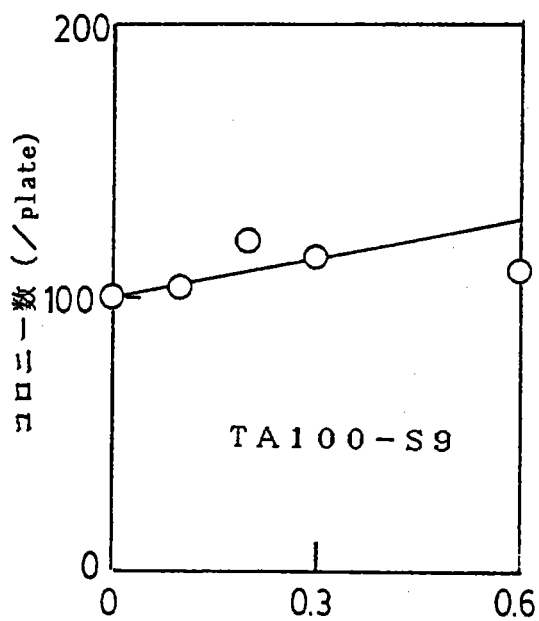
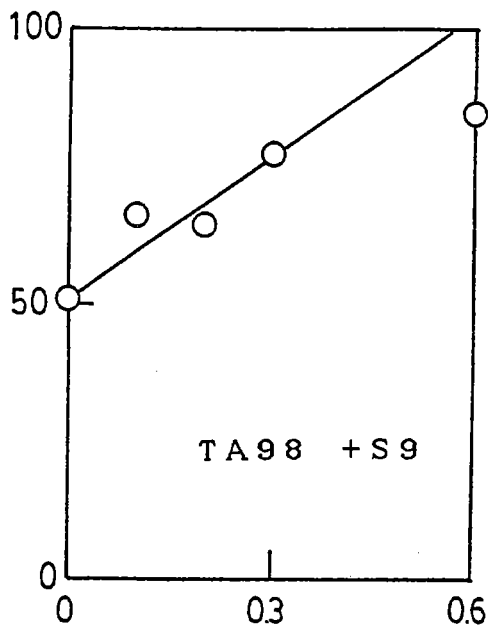
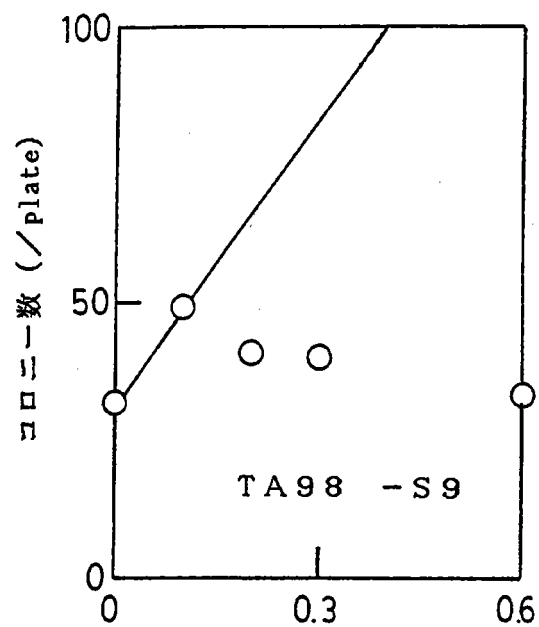


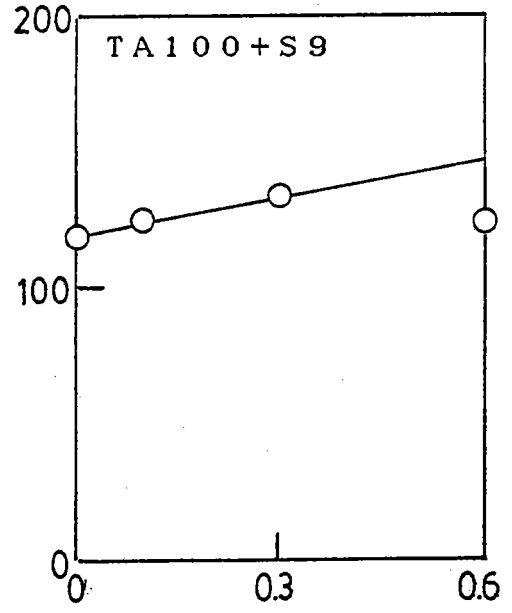
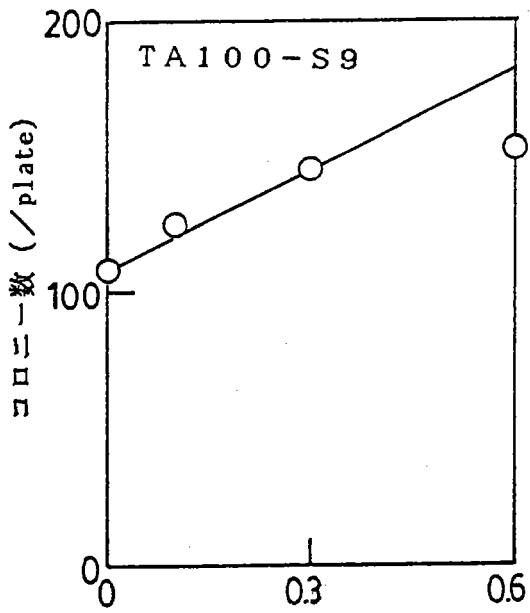
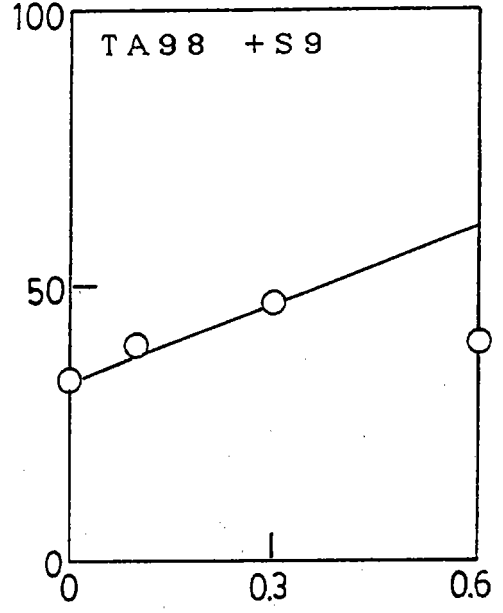
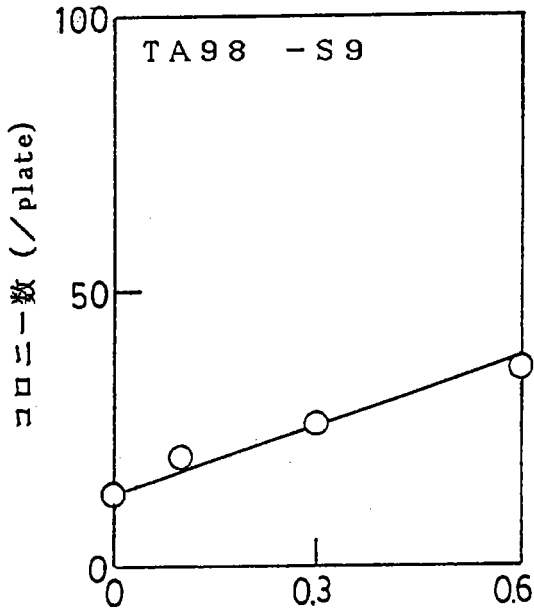
図11 濃縮液最適添加量の検討(多摩川河川水・二子橋4)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (l)

添加量 (l)

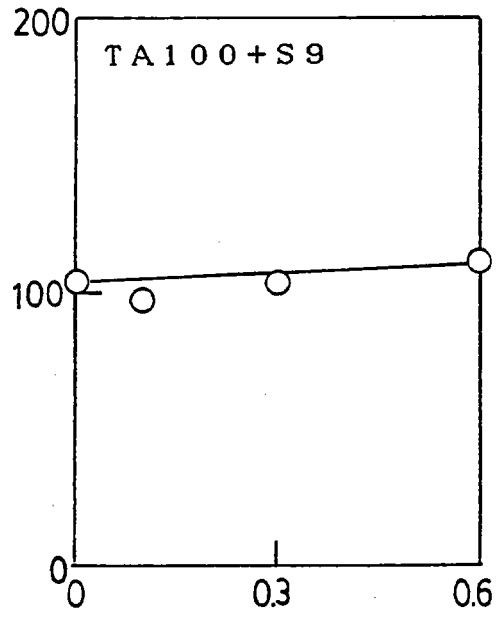
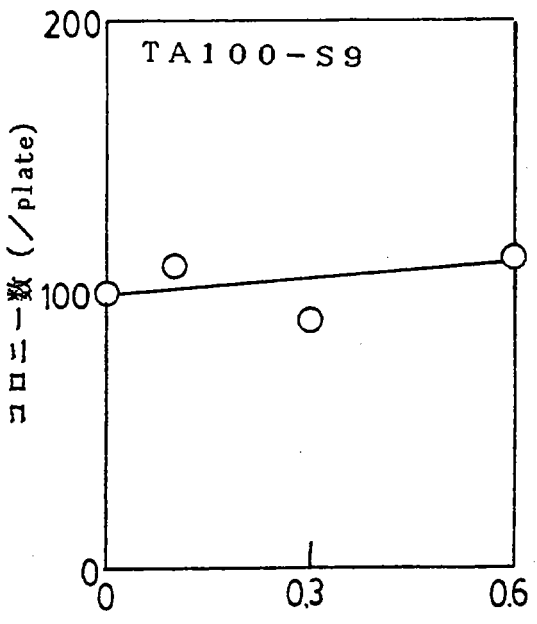
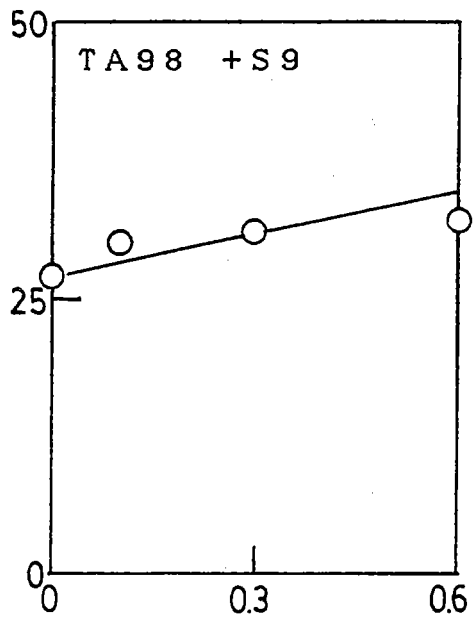
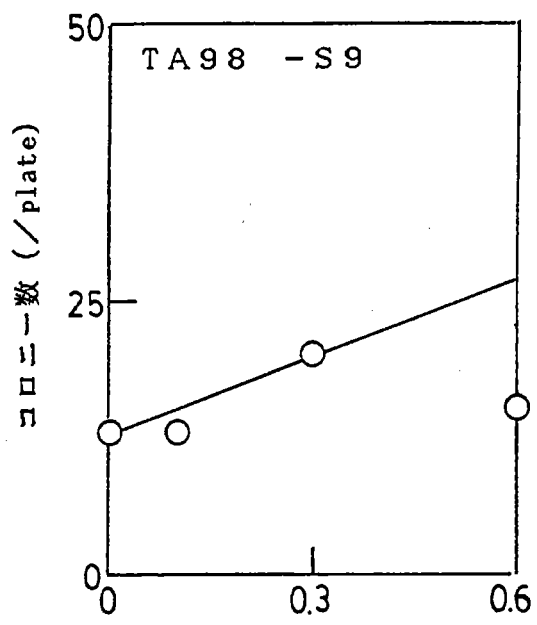
図12 濃縮液最適添加量の検討(多摩川河水・野毛)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (ℓ)

添加量 (ℓ)

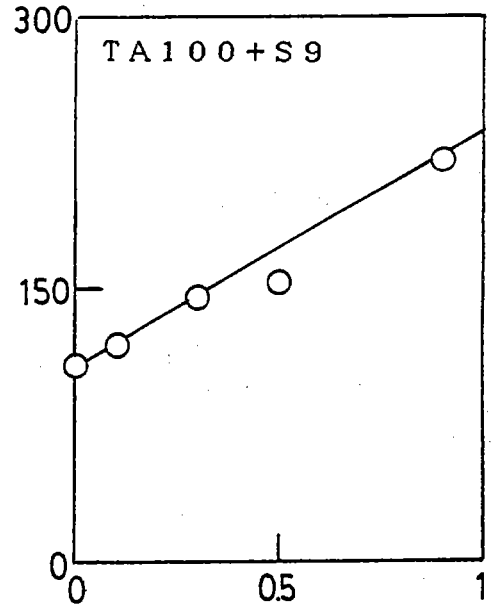
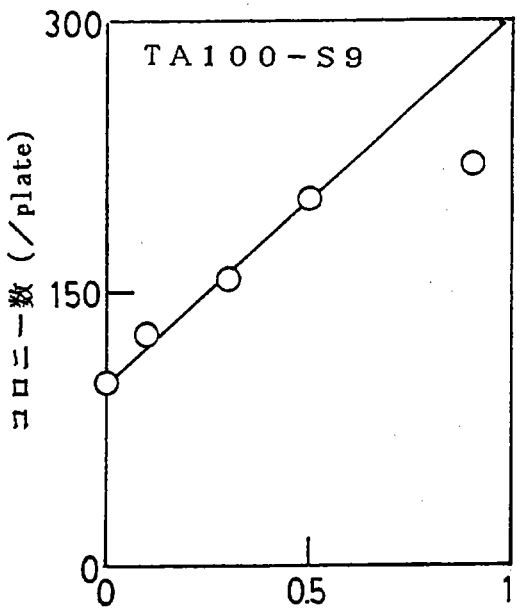
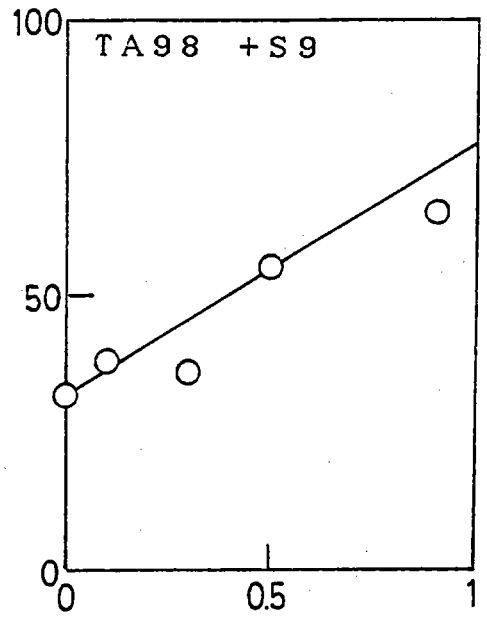
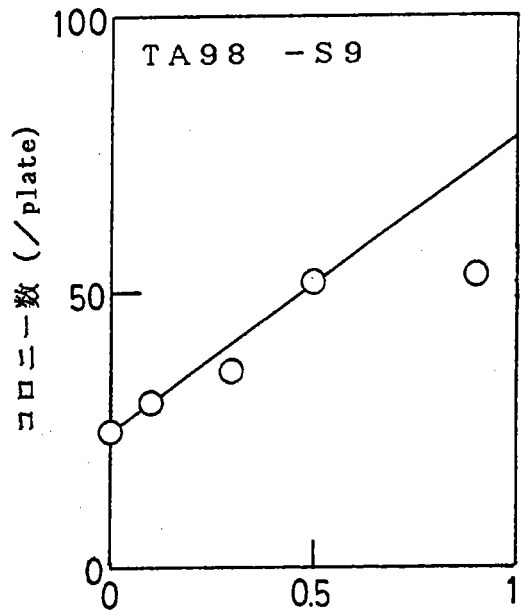
図13 濃縮液最適添加量の検討(塩素処理水・調布橋)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (g)

添加量 (g)

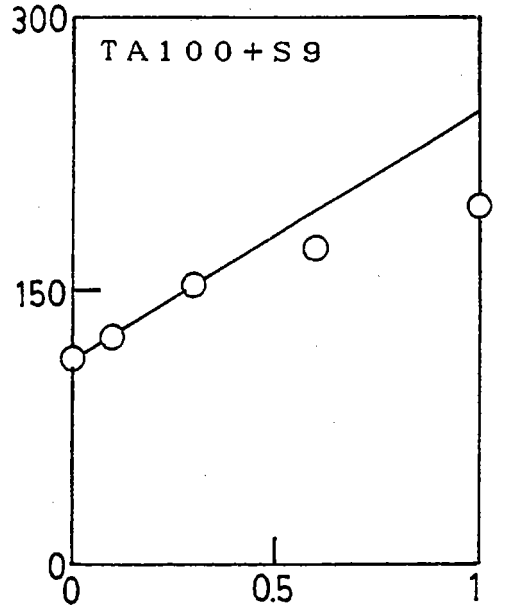
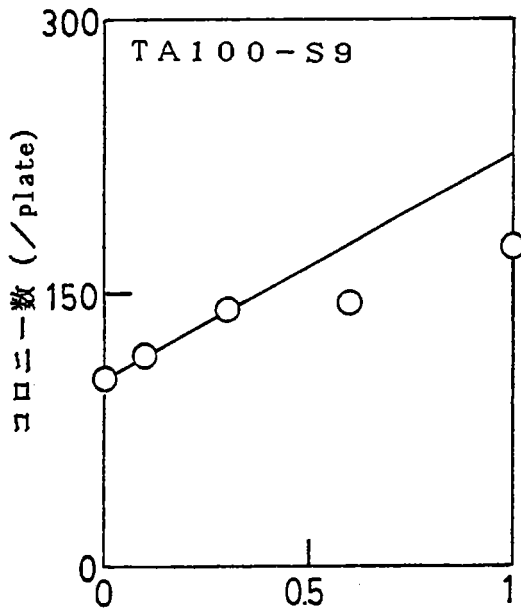
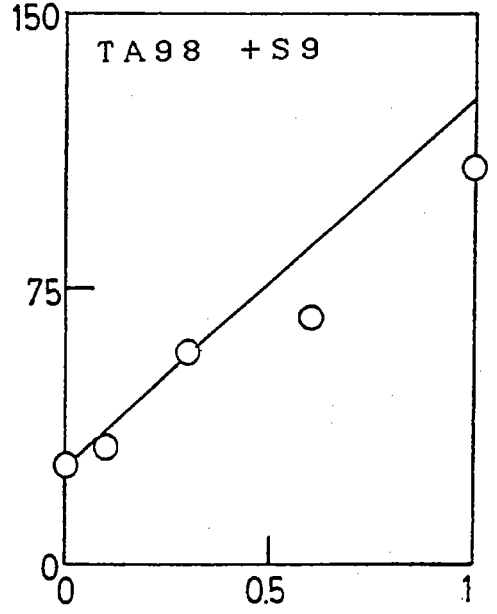
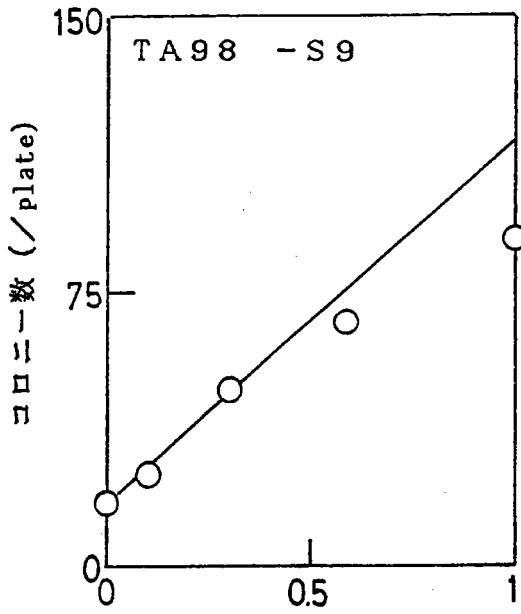
図14 濃縮液最適添加量の検討(塩素処理水・羽村取水堰3)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (ℓ)

添加量 (ℓ)

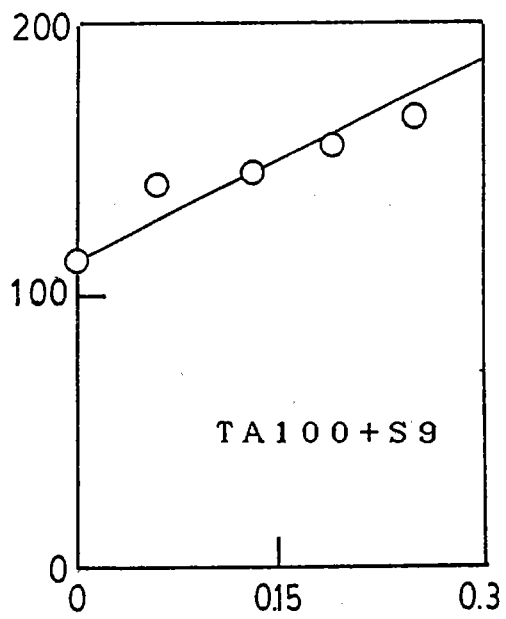
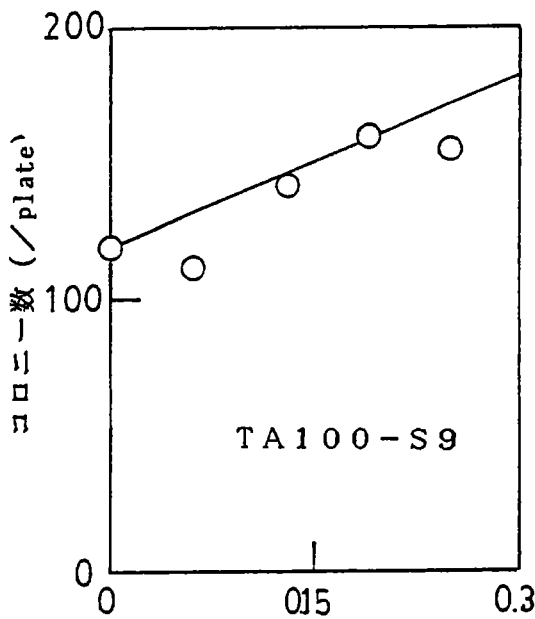
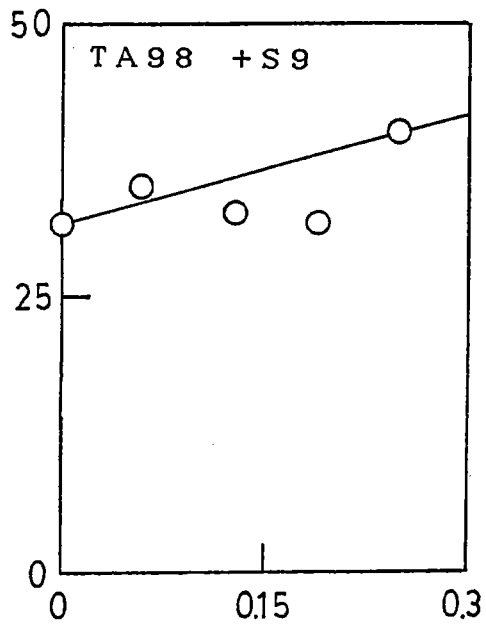
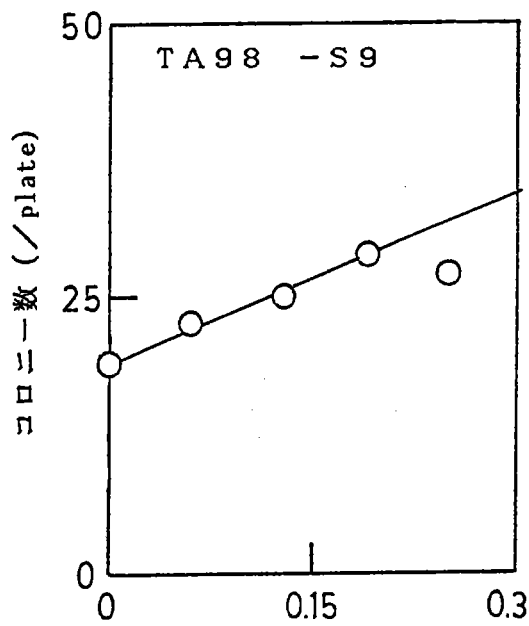
図15 濃縮液最適添加量の検討(塩素処理水・日野橋)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (ℓ)

添加量 (ℓ)

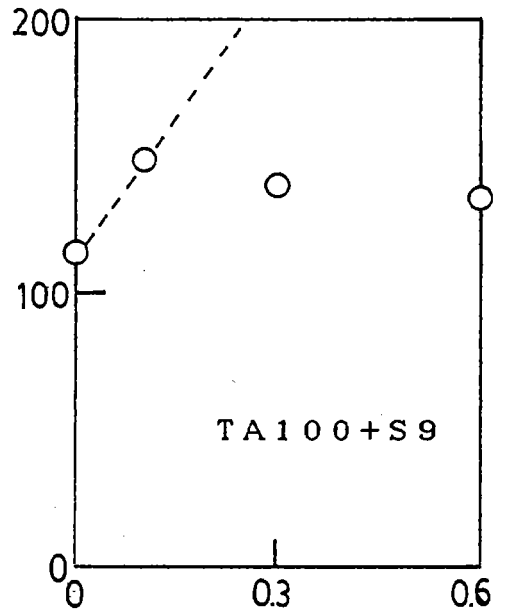
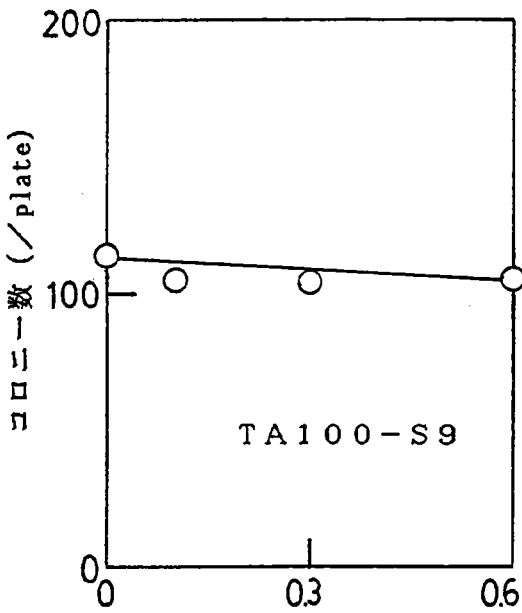
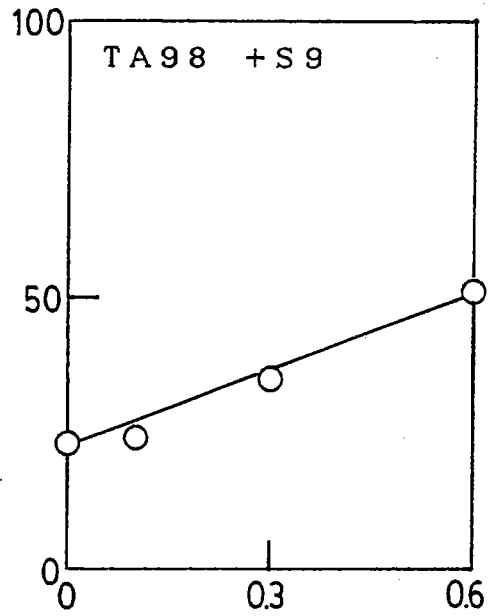
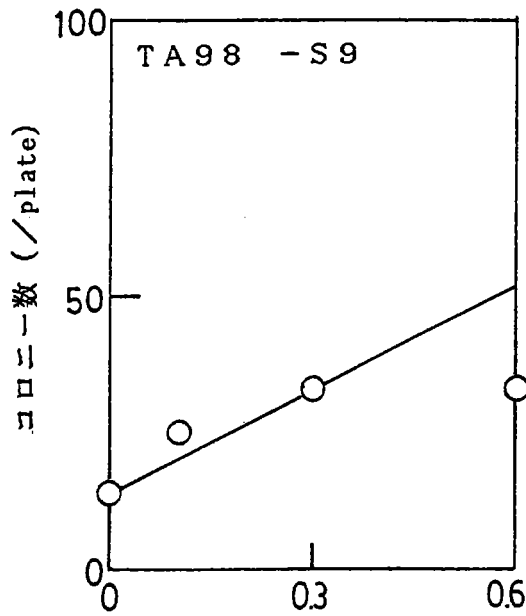
図16 濃縮液最適添加量の検討(塩素処理水・是政橋3)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (l)

添加量 (l)

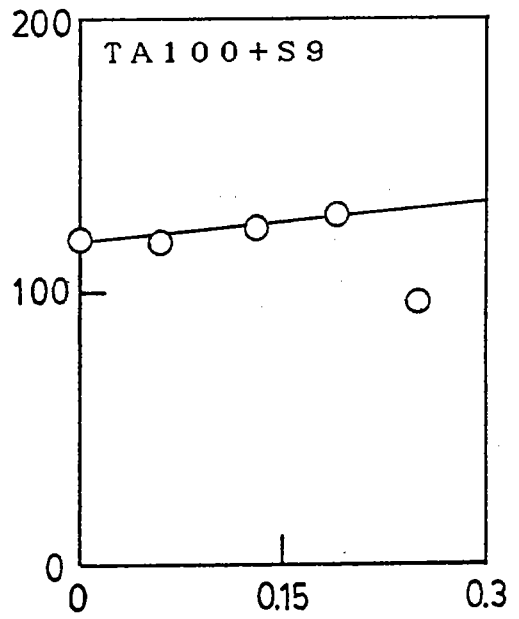
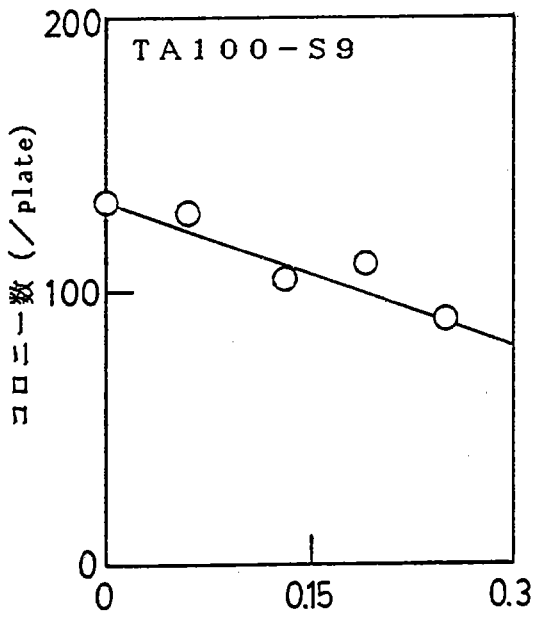
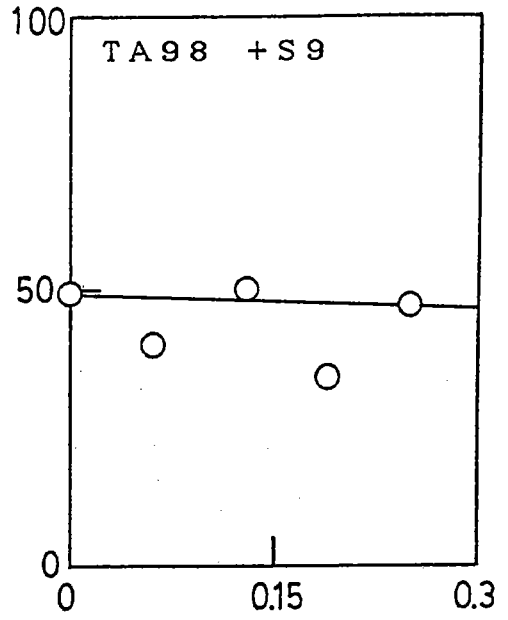
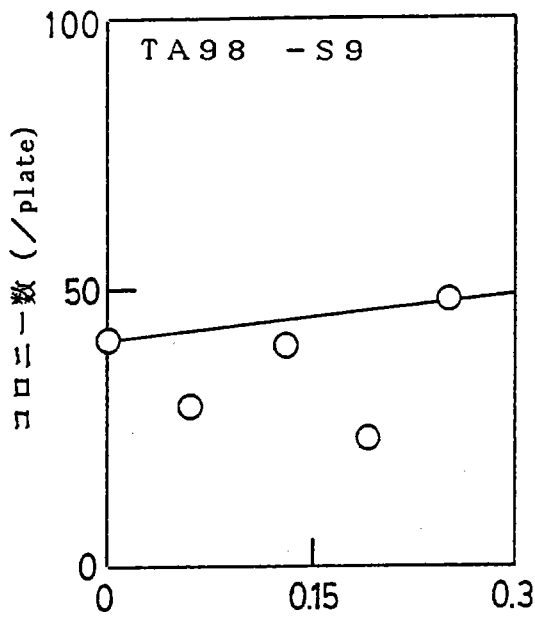
図17 濃縮液最適添加量の検討(塩素処理水・二子橋3)
※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (l)

添加量 (l)

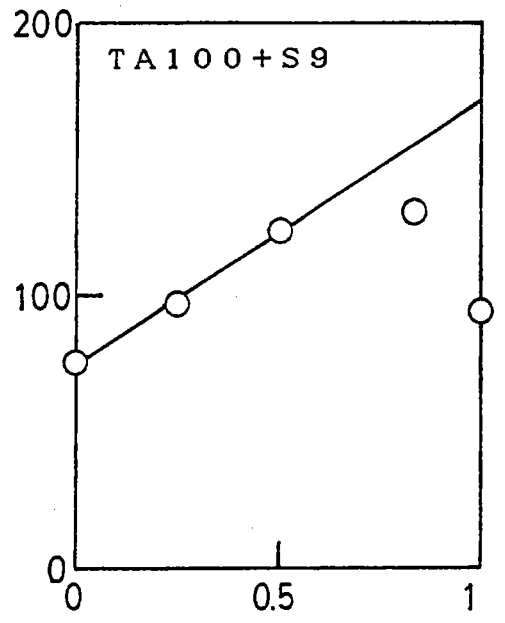
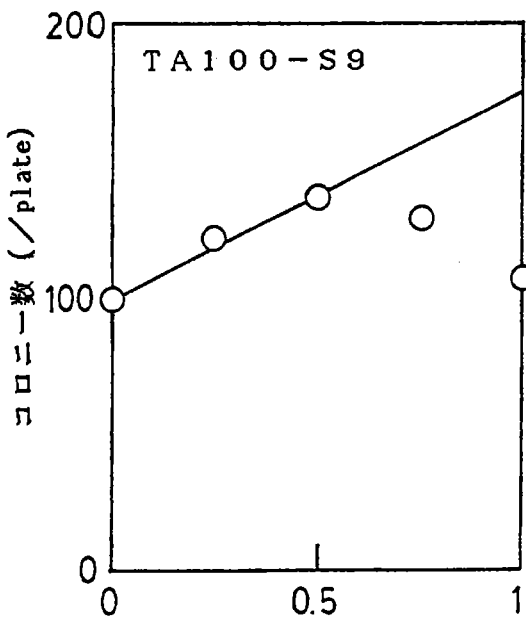
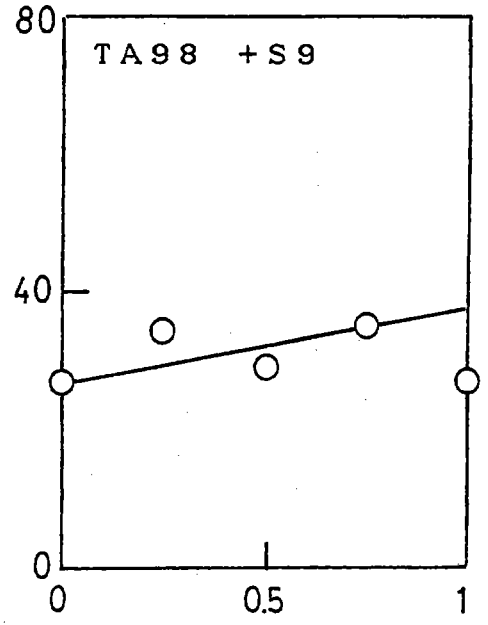
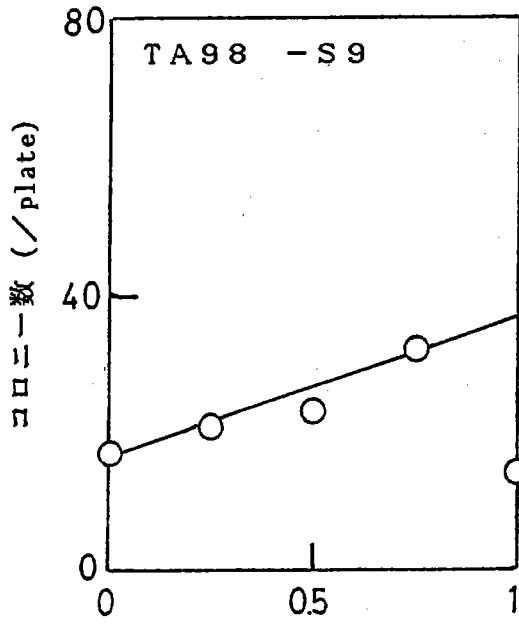
図18 濃縮液最適添加量の検討(塩素処理水・二子橋4)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (ℓ)

添加量 (ℓ)

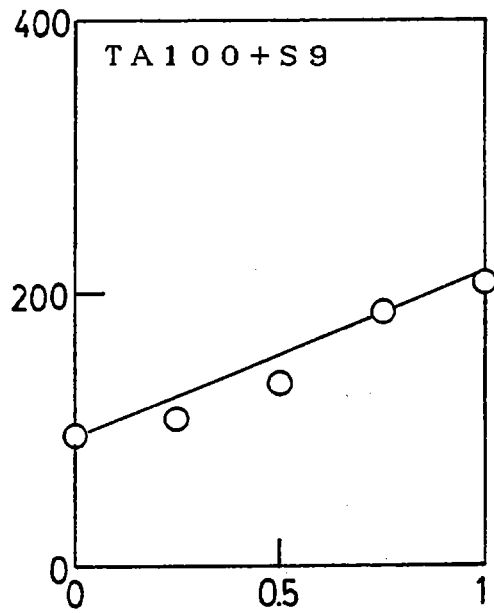
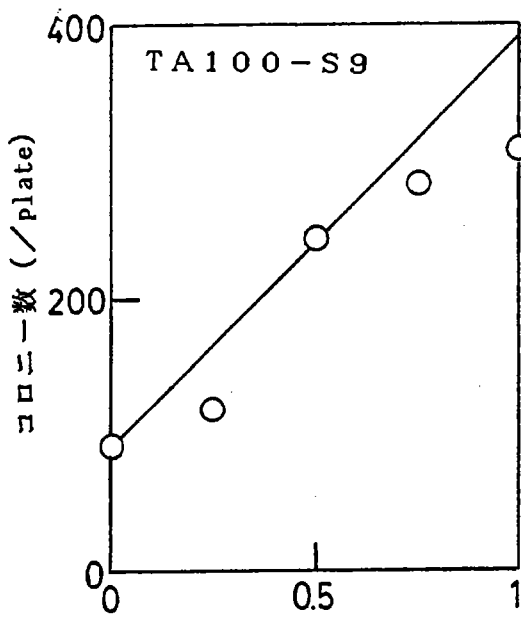
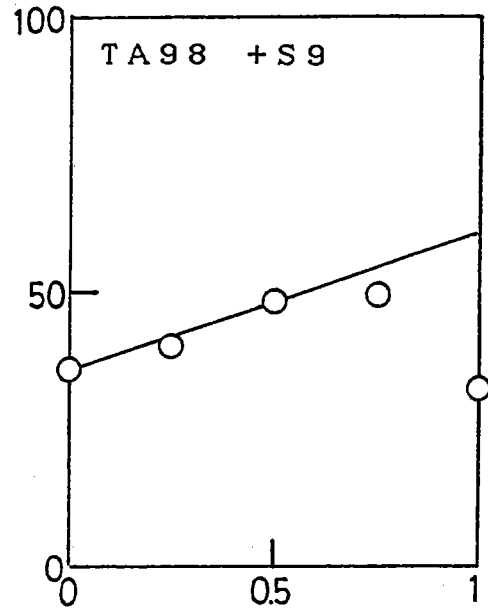
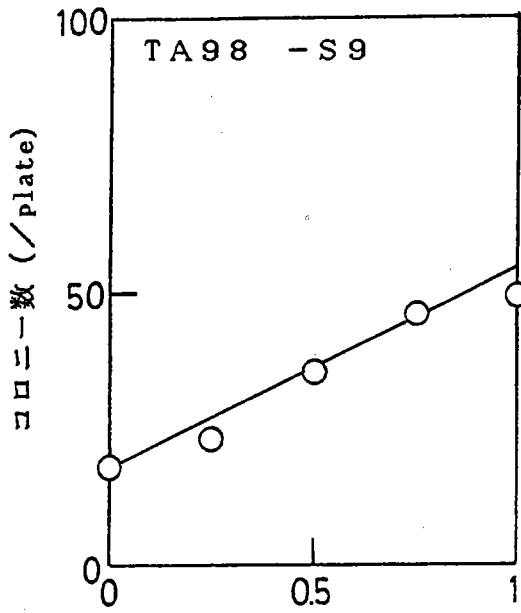
図19 濃縮液最適添加量の検討(塩素処理水・六郷橋)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (ℓ)

添加量 (ℓ)

図20 濃縮液最適添加量の検討(水道水・東京A2)
 ※添加量はもとの試料水量換算



添加量 (ℓ)

添加量 (ℓ)

図 21 濃縮液最適添加量の検討 (水道水・東京B)

※添加量はもとの試料水量換算

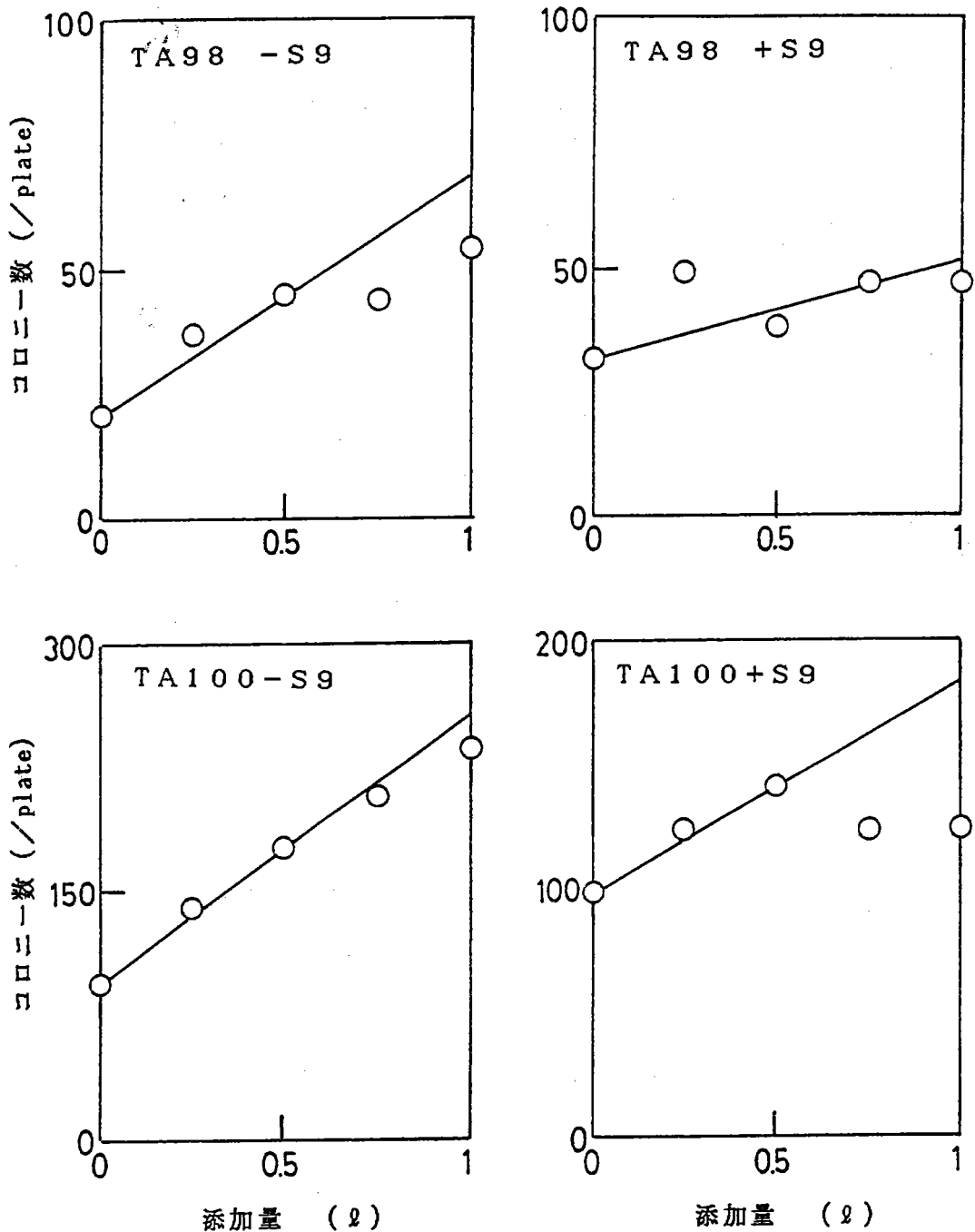


図 22 濃縮液最適添加量の検討 (水道水・千葉)
 ※添加量はもとの試料水量換算

4-3 水の変異原性の評価

4-3-1 河川水の原異原性

今回、変異原性試験に用いた多摩川河川水の各種の水質を表32-1～表32-2に示す。

また、河川水の変異原性を陽性対照物質換算濃度で表した結果を表33-1～表33-3に示す。なお、表中でN・D.とあるのは復帰コロニー数が、陰性対照試験での自然復帰コロニー数の1.3倍を超えず、有意な復帰コロニー数の差があるといえないものである。また()の値は、試料水換算0.3ℓ相当以上で、1.3倍以上の有意な復帰コロニー数が認められたが、その結果から1ℓ相当でのコロニー数に換算した場合、自然復帰コロニー数の2倍を超えず、強い変異原性があるとはいえないものである。

昭和61年度に行った試験では、濃縮液を試料水換算で1.0ℓ添加したので致死作用がみられる場合が多く、N・D.となっている水が多い。

これに対して、試料水換算で0.3ℓ添加した結果では、TA98の-S9、+S9ともに多摩川のほとんど全流域で変異原性が検出されたが、TA100の-S9では全ての試料水で変異原性が検出されず、+S9でも一部を除いて変異原性が検出されなかった。

本研究での多摩川河川水の結果のうち、TA98について変異原性が検出されたものの大部分は濃縮液添加量、試料水換算0.3ℓ相当以上で致死作用が起こっていたが、野毛のTA98+S9では試料水換算0.1ℓ相当でも致死作用の起こっている可能性が高い(図12)、また

表32-1 試料水の水質(多摩川河川水)

採水地点	BOD (mg/ℓ)	TOC (mg/ℓ)	A ₂₆₀ (1/50mm)
六郷橋 1	4.1	12.8	0.411
六郷橋 2	3.8	12.0	0.397
田園調布 取水堰 1	5.2	10.8	0.363
田園調布 取水堰 2	6.3	13.2	0.382
二子橋 1	7.9	15.6	0.406
二子橋 2	6.3	13.4	0.417
多摩 水道橋 1	7.1	10.8	0.314
多摩 水道橋 2	7.9	9.7	0.301
是政橋 1	3.6	9.9	0.291
是政橋 2	4.9	8.1	0.204
日野橋 1	2.8	5.6	0.180
日野橋 2	3.9	7.6	0.293
羽村 取水堰 1	1.8	1.6	0.078
羽村 取水堰 2	1.6	2.3	0.082
調布橋 1	1.6	2.6	0.117
調布橋 2	1.7	2.1	0.138
奥多摩湖 1	1.4	3.2	0.168
奥多摩湖 2	1.3	3.0	0.153
丹波川 1	1.1	1.6	0.077
丹波川 2	1.2	2.1	0.082
野川	15.4	13.2	0.698
平瀬川	18.2	16.7	0.782
浅川	2.6	7.8	0.347
秋川	2.1	4.4	0.062

0.1ℓ相当の復帰コロニー数が陰性対照試験での自然復帰コロニー数と有意な差があると考え、その値よ

り陽性対照物質換算濃度を求めたため、他の試料水に比べ高い値となった。

また、TA98での変異原性と水質の関係では、さほどの相関は得られなかったが、+S9のほかにも-S9でも、上流の水質の良いところほど変異原性は低く、水質の悪くなる下流ほど変異原性が高くなる傾向がみられた。

TA100については、変異原性が検出されないことが多かったが、多摩川と同様に汚染の進んだ河川である淀川の河川水についても、TA100-S9では変異原性がほとんどないという報告²³⁾がある。これより本研究で用いた多摩川の河川水には、TA100の変異原性物質が存在していない可能性もある。しかし、多摩川のような汚染の進んだ河川には、種々の汚染物質が存在すると考えられ、TA98で変異原性が検出されたことから、特に下流においては変異原性物質が全く存在していないとは考え難い。例えば、野毛や二子橋のTA100+S9でも試料水換算0.1ℓ相当で致死作用がおこなっているとみえる。(図11, 図12)さらに二子橋のTA100-S9で

表32-2 試料水の水質(多摩川河川水)

採水地点	TOC (mg/ℓ)	A ₂₆₀ (1/50mm)	THM (μg/ℓ)	TOX (μg/ℓ)
調布橋 3	1.15	0.088	0	4
羽村取水堰 3	1.25	0.079	0	0
日野橋	7.00	1.329	0	20
是政橋 3	8.15	0.549	0	30
二子橋 3	4.90	0.565	0	5
二子橋 4	6.90	0.491	0	25
野毛	6.45	0.238	0	0

表33-1 変異原性試験結果(多摩川河川水)
(μg-陽性対照物質/ℓ-試料水)

採水地点	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
六郷橋	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
田園調布取水堰 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
二子橋 1	N.D.	0.02	N.D.	N.D.
二子橋 2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
多摩水道橋	N.D.	0.02	N.D.	N.D.
是政橋 1	0.04	0.14	0.04	N.D.
是政橋 2	0.04	0.12	0.04	0.02
日野橋 1	0.02	N.D.	N.D.	N.D.
日野橋 2	0.02	0.02	N.D.	N.D.
羽村取水堰 1	0.02	0.00	N.D.	N.D.
羽村取水堰 2	0.02	0.02	N.D.	N.D.
調布橋 1	0.02	0.03	N.D.	N.D.
奥多摩湖 1	N.D.	0.06	N.D.	N.D.
奥多摩湖 2	0.02	0.04	N.D.	0.02

濃縮液添加量：試料水換算 1.0 ℓ

は、濃縮液添加量が増加するとともに復帰コロニー数も減少している。これは、菌株（TA100）に対する強い致死作用物質が存在している可能性を示している。すなわち変異原性物質が存在しているのに、変異原性が検出されなかったとも考えられる。

表 33-2 変異原性試験結果（多摩川支川水）
（ μg —陽性対照物質/ ℓ —試料水）

採水地点	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
丹波川	N.D.	0.02	N.D.	N.D.
野川	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
平瀬川	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
浅川 1	0.08	0.16	0.02	0.02
浅川 2	0.06	0.16	0.02	0.04
秋川 1	N.D.	0.02	N.D.	N.D.
秋川 2	N.D.	0.02	N.D.	N.D.

濃縮液添加量：試料水換算 1.0 ℓ

表 33-3 変異原性試験結果（多摩川河川水）
（ μg —陽性対照物質/ ℓ —試料水）

採水地点	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
調布橋	0.060	N.D.	N.D.	N.D.
羽村取水堰 3	0.067	0.019	N.D.	N.D.
日野橋	(0.042)	0.046	N.D.	(0.064)
是政橋 3	0.123	0.056	N.D.	N.D.
二子橋 3	0.123	0.039	N.D.	N.D.
二子橋 4	0.075	0.024	N.D.	N.D.
野毛	0.324	0.051	N.D.	0.024

濃縮液添加量：試料水換算 0.3 ℓ

4-3-2 塩素処理水の変異原性

今回、変異原性試験に用いた塩素処理水の各種の水質を表 34 に示す。

また、変異原性を陽性対照物質換算濃度で表した結果を表 35 に示す。なお表中で N.D. とあるのは復帰コロニー数が、陰性対照試験での自然復帰コロニー数の 1.3 倍を超えず、有意な復帰コロニー数の差

表 34 試料水の水質（塩素処理水）

採水地点	TOC (mg/l)	A 260	THM ($\mu\text{g}/\text{l}$)	TOX ($\mu\text{g}/\text{l}$)
調布橋 3	1.10	0.069	19.4	127
羽村取水堰 3	1.05	0.057	20.2	77
日野橋	5.90	1.106	33.1	202
是政橋 3	7.25	0.527	19.3	132
二子橋 3	4.40	0.509	26.0	222
二子橋 4	6.50	0.443	12.2	102
六郷橋	6.10	0.703	20.9	194

表 35 変異原性試験結果（塩素処理水）

(μg - 陽性対照物質/l - 試料水)

採水地点	TA 9 8		TA 1 0 0	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
調布橋 3	0.083	0.022	0.042	N.D.
羽村取水堰 3	0.043	N.D.	N.D.	N.D.
日野橋	0.088	0.029	0.046	0.128
是政橋 3	0.147	0.056	0.019	0.073
二子橋 3	0.067	N.D.	0.040	0.131
二子橋 4	0.109	0.023	N.D.	N.D.
六郷橋	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

があるといえないものである。

4-3-1で述べたように河川水では、TA 9 8の変異原性は検出され、TA 1 0 0の変異原性は-S 9、+S 9ともにほとんど検出されなかったが、塩素処理水ではTA 1 0 0においても変異原性が検出された。またTA 9 8については、+S 9で河川水より、若干減少気味であった。TA 1 0 0で変異原性がみられたのは、塩素処理により変異原性物質が生成されてきたことのほかに、河川水中に存在したTA 1 0 0に対する致死作用物質が塩素処理によって分解または化学変化をおこし、無害化されたことが考えられる。

六郷橋のTA 1 0 0-S 9では、二子橋の河川水の場合と同様に、濃縮液添加量が増加するとともに復

帰コロニー数が減少しており（図19）、致死作用物質の影響があると考えられた。すなわち、汚染の進んだ河川水及びその塩素処理水中には致死作用物質が含まれている可能性が高い。このことは塩素処理によって致死作用物質の影響が少なくなることもあるが、難分解物質が蓄積された下流の河川水では塩素処理を行っても、致死作用物質が残ることを示している。

従来より、塩素処理により変異原性が増加するという報告が数多くあり、淀川水系の河川水では、塩素処理（200 mg/lの塩素添加）によって原水の最高170倍の変異原性が検出されたという報告²³⁾がある。本研究での塩素処理水では、そのような高い変異原性は検出されなかった。淀川水系と多摩川水系は、どちらも同程度に汚染の進んだ河川と考えられるので、両結果の違いは本研究の場合、水道水の浄水処理工程の前塩素処理に近い条件の塩素添加（最高で20 mg/l）を行ったためと考えられた。そこで、淀川水系の結果と比較するため、二子橋の河川水について塩素添加量を変化させた試験（塩素添加量50 mg/l及び200 mg/l）もあわせて行ったが、20 mg/l添加の場合と有意な差はなかった。今後さらに淀川水系に近い多摩川中流域での河川水について同様の検討を行って、塩素添加量及び河川の水質の影響を明らかにする必要がある。

後述するように、水道水の変異原性（表37）では、TA98+S9以外で変異原性が検出されることが多かったが、河川水の変異原性（表33）では、TA100については、ほとんど変異原性が検出されず、おもにTA98で検出されることが多かった。また河川水の塩素処理水の変異原性（表35）では、河川水で検出されなかったTA100において、変異原性が検出される傾向があった。これにより、水道水の浄水工程では、TA100の変異原性を増し、TA98+S9の変異原性を減少させる、傾向があるとも考えられる。しかし、水道水の浄水工程には、今回行った塩素処理のほか凝集沈澱処理、砂濾過、オゾン処理、活性炭処理などがあり、実際にはそれらの処理がいくつか組合せて行われている。今回の塩素処理はその一部に過ぎず、水道の浄水工程による変異原性の変化は、塩素処理以外のいくつかの工程についても、さらにデータを蓄積してから判断すべきと考えられる。

4-3-3 オゾン処理水及び活性炭処理水の変異原性

今回、変異原性試験に用いたオゾン処理水と活性炭処理水の水質を表36に示す。

また、変異原性を陽性対象物質換算濃度で表した結果を表37に示す。なお、表中でN.D.とあるのは復帰コロニー数が、陰性対象試験での自然復帰コロニー数の1.3倍をこえず、有意な復帰コロニー数があるといえないものである。

水質のよい羽村取水堰の水はもともと変異原

表36 試料水の水質(オゾン処理水と活性炭処理水)

採水地点	O ₃ 添加量 (mg/l)	TOC (mg/l)	A ₂₆₀ (1/50mm)
羽村取水堰 オゾン処理	2.0	1.15	0.021
羽村取水堰 活性炭処理	2.0	0.25	0.017
是政橋 3 オゾン処理	2.1	7.80	0.163
是政橋 3 活性炭処理	2.1	2.25	0.082

性が低い、オゾン処理によって、変異原性がほとんど変わらないかやや増加する傾向があった。これに対して、有機汚染物質濃度の高い是政橋の水をオゾン処理した場合には、変異原性が明らかに減少した。これは、オゾン処理によって新しい変異原物質が多少できるが、もともとあった変異原物質を分解する効果もあることを示している。

また、活性炭処理を行った水はほとんど変異原性が認められなかった。すなわち、活性炭は変異原性物質を確実に除去することが示された。

4-3-4 水道水の変異原性

今回、変異原性試験に用いた水道水の各種の水質を表38に示す。表中の、東京A1及び東京A2の水道水は、ともに東京都世田谷区の同一地点で採水したものの（東京都砧浄水場系）で多摩川水系の水を原水としたものであるが、サンプリングを行った日時が異なる別の試料水である。また神奈川の水道水は、神奈川県藤沢市で採水したもの

（神奈川県寒川、広域企業団伊勢原浄水場混合系）である。東京Bの水道水は、東京都江戸川区で採水したもの（東京都金町浄水場系）である。そして、千葉の水道水は、千葉県東庄町で採水したもの（千葉県東総広域水道事業団笹川浄水場系）である。

表37 変異原性試験結果（オゾン処理水と活性炭処理水）
（ μg -陽性対照物質/ ℓ -試料水）

	T A 9 8		T A 1 0 0	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
羽村取水堰3 オゾン処理	0.086	0.02	N.D.	N.D.
羽村取水堰3 活性炭処理	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
是政橋3 オゾン処理	0.085	0.040	N.D.	N.D.
是政橋3 活性炭処理	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

表38 試料水の水質（水道水）

採水地点	TOC (mg/ℓ)	A 260	THM ($\mu\text{g}/\ell$)	TOX ($\mu\text{g}/\ell$)
東京 A 1	1.66	0.036	-	-
神 奈 川	1.86	0.043	-	-
東京 A 2	0.78	0.061	-	-
東 京 B	2.17	0.070	24.0	141
千 葉	2.30	0.119	56.5	173

表39 変異原性試験結果（水道水）
（ μg -陽性対照物質/ ℓ -試料水）

採水地点	T A 9 8		T A 1 0 0	
	-S 9	+S 9	-S 9	+S 9
東京 A 1 (世田谷区)	(0.047)	0.076	0.073	0.104
神 奈 川 (藤 沢 市)	0.143	(0.021)	0.088	0.075
東京 A 2 (世田谷区)	0.037	N.D.	(0.021)	0.080
東 京 B (江戸川区)	0.081	(0.009)	0.108	0.054
千 葉 (東 庄 町)	0.090	(0.009)	0.044	(0.048)

水道水の変異原性を陽性対照物質換算濃度で表した結果を表39に示す。なお、表中でN・D.とあるのは復帰コロニー数が、陰性対照試験での自然復帰コロニー数の1.3倍を超えず、有意な復帰コロニー数の差があるといえないものである。また()の値は、試料水換算0.3ℓ相当以上で、1.3倍以上の有意な復帰コロニー数が認められたが、その結果から1ℓ相当でのコロニー数に換算した場合、自然復帰コロニー数の2倍を超えず、強い変異原性があるとはいえないものである。なお、同程度の変異原性(強いといえない変異原性)のもので、試料水換算0.3ℓ相当以下で致死作用がみられる場合には、N・D.となる。

東京Bと千葉の水道水では、全ての水質測定項目で千葉の水道水が高い値となっていた。すなわち、従来の水質測定で、この二つの水道水を評価すると、千葉の水道水の方が汚染の進んだものとなる。ところが変異原性については、千葉の水道水はTA98-S9で東京Bの変異原性を上回るだけであった。このことより、従来の水質では表せない因子が、特にTA100の変異原性に関係していると考えられ、水道水の安全性を考慮していく場合には、従来の水質指標以外の新しい指標として、変異原性を用いることが、良いと考えられる。

また東京A1及び東京A2は、同一地点で採水したもののだが、東京A2ではTA98+S9では変異原性が検出されなかったが、東京A1では高い変異原性が示された。また、TA100でも高い変異原性が検出された。水道水の水質は常に変化しているものであり、変異原性も同様である。東京A1のTA98の値は、ほかの水道水の値に比べて相当高いので、原水に異常な汚染があったことも考えられる。従って河川水を原水とする水道水の安全性を考える場合は、他の水質と同様に変異原性についても、ある程度以上の頻度でモニタリングしていく必要があると考えられる。

4-4 致死作用と生菌数試験

Ames法変異原性試験では、検体の毒性物質による菌株への致死作用により、変異菌株が少なくなることが指摘されており、本研究においても、濃縮液添加量試料水換算1ℓ以下においても致死作用による復帰コロニー数の落込みがみられた場合が多かった。

そこで、致死作用による影響を確認し、復帰コロニーを生存率で補正することが可能であるかどうかを調べるため、今回変異原性試験を行った試料水のうちいくつかについて、3-5のような方法でプレート上の全生菌数を測定する生菌試験を行った。

今回行った生菌数試験例を表40、表41、また図23、図24に示す。図23(図24)並びに図12(図22)より、生存数が減っている場合でも実際は直線的なDose-Responseがとれている場合や、生存数は変化していない場合でも復帰コロニー数の落込みがみられる場合もあった。これより、本研究の生菌数試験では、復帰コロニーを菌株の生存率で補正することはできないと考えられた。

TA98-S9で陽性対照物質4NQO(0.5 μ g/plate)の生菌数試験を行ったところ表39のようになりほとんど生存できないという結果となった。もし、この結果が正しいとすると、4NQOを陽性対

照物質として0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 用いることは不適當となってしまう。ところが4 N Q Oを陽性対照物質として1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 用いるとする指針もあり²⁾、1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ まではDose-Responseがとれると思われ、また0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ までの直線的なDose-Responseが実際にとれていることも確認した。

以上のことより、今回用いた一般的な生菌数試験方法では、正確な生菌数を求められないものと考えられた。その理由としては、今回の生菌数試験方法では、変異原性試験に比べて菌懸濁液を約 10^5 倍に希釈したが、プレート当りの検体はそのままとした。このため、プレートあたりの検体と菌数の比が変異原性試験の場合と異なってしまい、実際の変異原性試験の際の生菌数を求められなかったものと考えられる。

表 40 生菌数試験結果(多摩川河川水・野毛)

(コロニ-数/plate)

採水地点	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	1200	1158	600	615
試料水換算添加量0.1 ℓ	1126	1230	554	629
試料水換算添加量0.2 ℓ	1088	1249	439	660
試料水換算添加量0.3 ℓ	893	1233	272	701
試料水換算添加量0.6 ℓ	29	1004	33	547

菌懸濁液 1/15625 希釈

表 41 生菌数試験結果(水道水・千葉)

(コロニ-数/plate)

採水地点	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
陰性対照	1435	1449	-	-
陽性対照	90	1445	-	-
試料水換算添加量0.25 ℓ	1460	1464	-	-
試料水換算添加量0.50 ℓ	1380	1442	-	-
試料水換算添加量0.75 ℓ	1421	1464	-	-
試料水換算添加量1.0 ℓ	1132	1059	-	-
陽性対照物質添加量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.5	0.15	-	-

菌懸濁液 1/12500 希釈

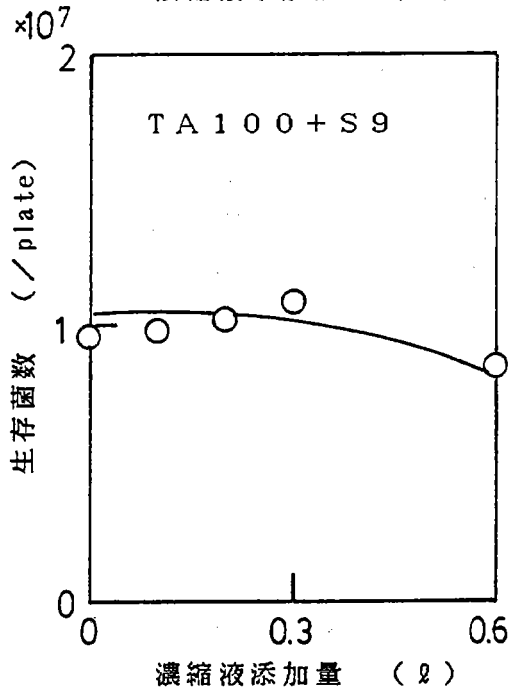
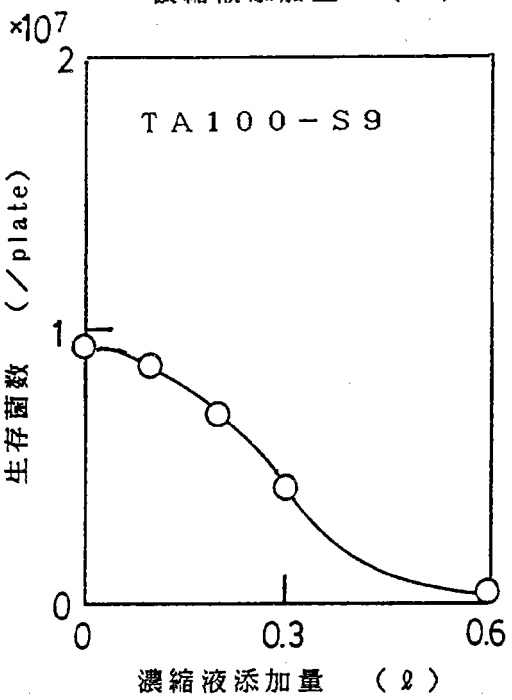
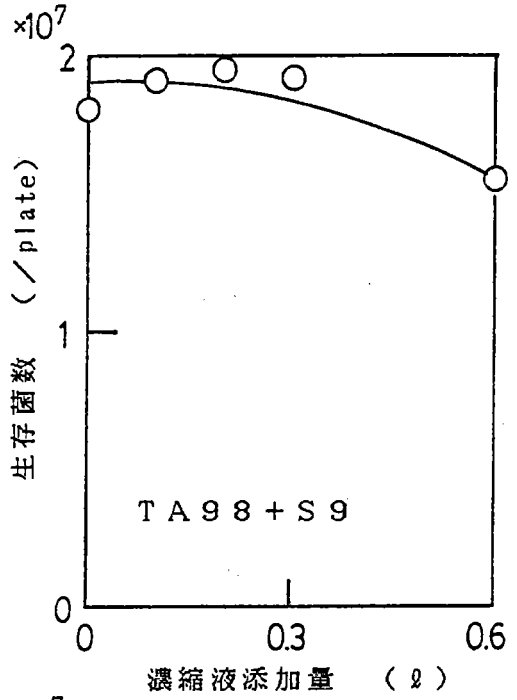
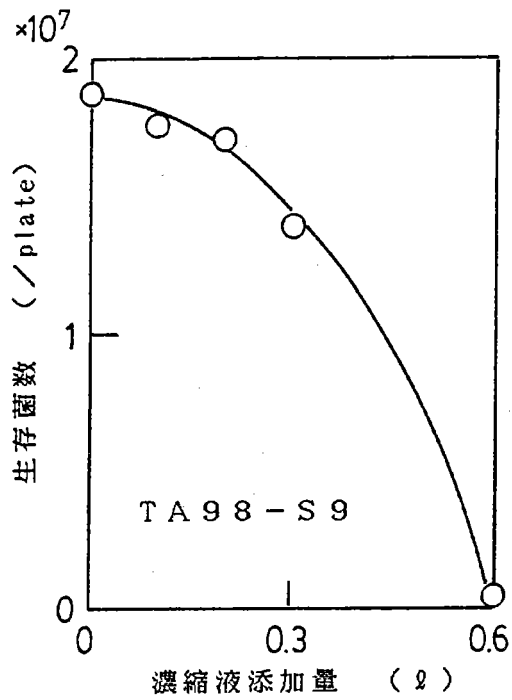


図 23 致死作用による生存菌数の変化例(多摩川河川水・野毛)
 ※濃縮液添加量はもとの試料水量換算

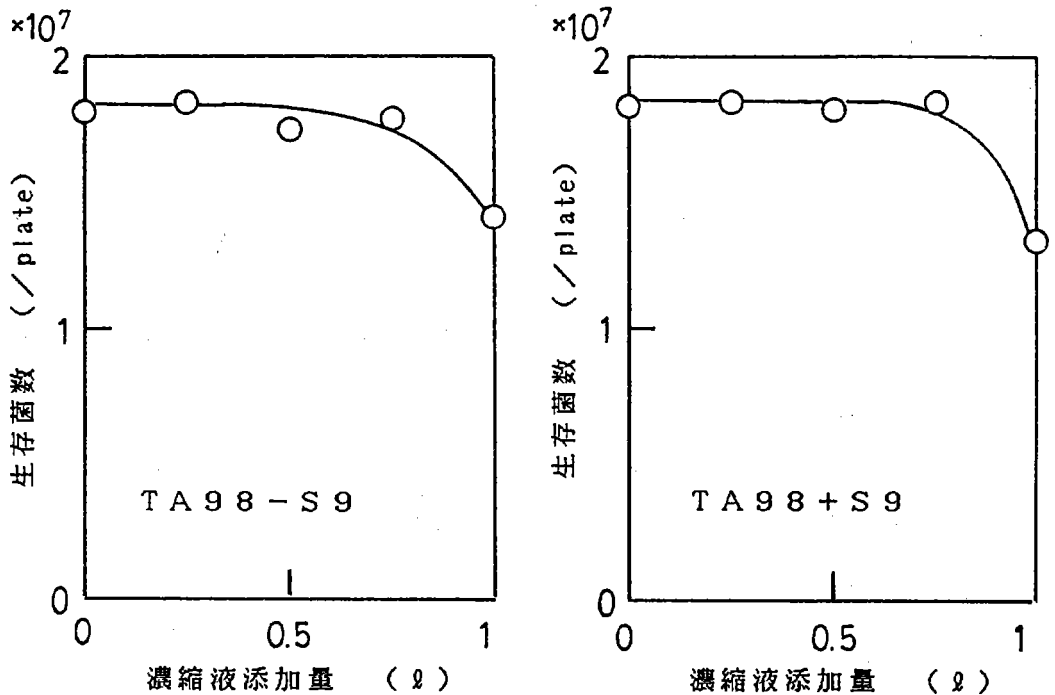


図24 致死作用による生存菌数の変化例(水道水・千葉)
 ※濃縮液添加量はもとの試料水量換算

今後、生菌数試験を行う場合には、まず検体も菌株と同様に希釈して生菌数を求めることが考えられる。この方法では検体と菌株の比は実際の変異原性試験と同じになるが、どちらも希釈されていることで両者の接触及び突然変異(致死作用)の機会が少なくなることが考えられる。すなわち、この方法でも致死作用を残存菌数による生存率で補正できないと考えられる。

また、検体と菌懸濁液を混合してから希釈して生菌数を求めることも考えられる。この場合にも、混合してから希釈するまでの間に両者の接触及び突然変異(致死作用)が有効に行なわれなければ、前者の場合と同じになってしまう。

Ames法変異原性試験では、菌株と検体の接触時間と突然変異の時期が、明確にされていない。菌株と検体の接触及び突然変異は、菌懸濁液と検体を混合してからトップアガーでプレートに固めるまでの間で起こっていると考えられるが、その時間などの条件が明確でなく、それ以外にも、プレート上でも突然変異が起こっていると考えられるが、それらの比率は不明である。

菌株と検体の接触時間を一応限っている Ames 法変異原性試験方法として、ブレインキューベーション法がある。(ブレインキューベーション法に対して、今回行った変異原性試験法はプレート法と言われている。2))この方法では、菌懸濁液と検体を混合してから最終培養の前に37℃で20 minまたは30℃で30 min ブレインキューベーションするものである。この方法でも、ブレインキューベーションの間だけで、

菌株が検体と接触して突然変異なり致死作用を受けるのではなく、やはりプレート上でも検体の影響を受けていると考えられるが、プレート上での検体の影響はプレート法(今回の変異原性試験方法)の場合よりも少ないと考えられる。

ブレインキュベーション法では、プレート法に比べて菌株と検体の接触が増し、突然変異が起り易くなると考えられる。そのため変異原性試験の感度は高くなり、プレート法では検出できなかったものも検出できるようになると考えられる。しかし、陽性対照試験の復帰コロニー数も多くなるので、陽性対照物質換算濃度はプレート法と大差なくなるものと考えられる。

ブレインキュベーション法での生菌数試験を行う場合、ブレインキュベーション後の菌懸濁液と検体の混合液を、 10^5 希釈して生菌数を求める。この場合プレート法よりも、正確な生菌数を求められると思われる。

菌株と検体の接触時間をさらに明確にしている方法もある。抗菌性を有する物質の変異原性を求める場合、ブレインキュベーションの後、菌懸濁液と検体の混合液を遠心分離し、菌株だけを集めてプレート上での検体の影響を少なくし、変異原性試験する方法もある。²⁾ さらに、殺菌剤などの強い抗菌性のある物質では、遠心分離のほかに遠心洗菌を行い、菌株についている検体を洗い落とす方法で、今までは致死作用のために検出できなかった変異原性を検出できるようになったという報告もある。²⁴⁾

従って、致死作用のある検体の変異原性を試験する場合は、菌株と検体の接触時間を明確にした方がよいと考えられる。また接触時間を明確にした場合の方が試験の際の生菌数を正確に求められる可能性が高いと考えられる。そこで、今後は変異原性試験をブレインキュベーション法で行い、あわせて生菌数を正確に求められる場合には、生菌数により致死作用の確認を行ってみる必要があろう。

5 結 言

本研究では、水の変異原性試験を行うにあたり、当研究室で新しく開発された2種類の吸着樹脂を用いる吸着濃縮方法を改良し、水中微量有機物を能率よく濃縮回収できるようにし、この新しい樹脂の性能を確認した。さらに、多摩川水系の水、その塩素処理水及び水道水の濃縮液の添加量を変えてAmes法変異原性試験を行い、最適添加量を検討した上で、多摩川の上流から下流までの10地点での河川水及びそれらのうちの代表的な水の塩素処理水、オゾン処理水、活性炭処理水、並びに多摩川などを水源とする実際の水道水について変異原性を定量的に評価し、以下の結論を得た。

- (1) 本研究で用いた樹脂による水中微量有機物の濃縮回収方法において、従来空間速度(SV) = 2/hでおこなっていた陰イオン交換樹脂CHPA25の脱離速度はSV = 5/hとした方がよいことが確認された。このことにより、脱離所用時間は、CSP800とCHPA25で同じになり、試料の濃縮を能率的に行えるようになった。
- (2) 従来、主に用いられていた樹脂(XAD4/8)と、本研究で用いた新しく開発された樹脂(CSP800+CHPA25)の水中変異原性物質回収性能を、水道水を試料水として変異原性試験を行って

比較したところ、変異原性の低い試料の場合はあまり差がなかったが、一般的に本方法の樹脂が従来法のものよりもすぐれていることが確認された。

- (3) 各種の水の変異原性試験を行ったところ、濃縮液添加量を試料水 1 ℓ相当とすると、水道水、河川水及びその塩素処理水のすべてで、致死作用のある場合が多いことが確認された。
- (4) 変異原性試験では、それぞれの試料で検体液濃度（プレートあたりの濃縮液量）を変化させて、変異原性を求めるべきであるが、各種の水の変異原性をモニタリングする場合の経済的、時間的及び労力的な条件を考慮した際、試料水の種類ごとに、濃縮液添加最適条件を決定することが望ましいと考えられた。
- (5) 河川水の濃縮液添加量を変化させて変異原性試験を行った結果、コロニー数の落込みがはじまる一般的な濃縮液添加量を特定できなかったため、河川水の濃縮液添加最適条件は決定できなかった。これは使用した河川水の汚染度がかなり異なり、様々な汚染物質が含まれているためと考えられ、河川水については今後さらに水質毎に分類して、最適添加量を検討する必要があると考えられた。
- (6) 塩素処理水の濃縮液添加量を変化させて変異原性試験を行った結果、試料水換算 0.4 ℓ相当付近からコロニー数の落込みがみられることが多かったことより、塩素処理水の場合の濃縮液添加量の最適条件は 0.3 ℓ相当が妥当と考えられた。
- (7) 水道水の濃縮液添加量を変化させて変異原性試験を行った結果、試料水換算 0.7 ℓ相当の濃縮液添加量でコロニー数の落込みがはじまることが多かったことより、水道水の場合の濃縮液添加量の最適条件は試料水換算 0.6 ℓ相当が妥当と考えられた。
- (8) 多摩川河川水の変異原性については、T A 9 8 では - S 9 , + S 9 ともにほとんど全流域で変異原性が検出されたが、T A 1 0 0 では - S 9 でほとんどの試料水で変異原性が検出されず、+ S 9 でも一部を除いて変異原性が検出されなかった。
- (9) 多摩川河川水の T A 9 8 について変異原性が検出された水の大部分は濃縮液添加量が試料水換算 0.3 ℓ相当以上になると致死作用が起っていたが、一部では試料水換算 0.1 ℓ相当でも致死作用の起っている可能性が高いものもみられた。
- (10) 多摩川河川水の T A 9 8 での変異原性と水質の関係では、+ S 9 でも - S 9 でも、上流の水質の良いところほど変異原性は低く、水質の悪くなる下流ほど変異原性が高くなる傾向がみられた。
- (11) 多摩川河川水の T A 1 0 0 については、変異原性が検出されないことが多かったが、T A 1 0 0 の変異原性物質が存在していない可能性と同時に、T A 1 0 0 に対する強い致死作用物質が存在している、すなわち変異原性物質が存在しているのに、変異原性が検出されなかったとも考えられる。今後は、致死作用の影響を生菌数試験などで確認し、変異原性物質がない河川水なのか、致死作用のある物質により変異原性がみられなくなっているのか判別できる詳しい変異原性試験が必要と考えられる。
- (12) 多摩川河川水では、T A 9 8 の変異原性は検出され、T A 1 0 0 の変異原性は - S 9 , + S 9 ともに

ほとんど検出されなかったのに対して、多摩川河川水の塩素処理水ではT A 1 0 0においても変異原性が検出された。またT A 9 8については、+ S 9で河川水より、その塩素処理水のほうが若干減少気味であった。

- (13) 多摩川河川水の塩素処理水でT A 1 0 0で変異原性がみられたのは、塩素処理により変異原性物質が生成されてきたことのほかに、河川水中に存在していたT A 1 0 0に対する致死作用物質が塩素処理によって分解または化学変化をおこし、無害化されたことも考えられた。
- (14) 汚染の進んだ多摩川下流の河川水及びその塩素処理水中には致死作用物質が含まれている可能性が高く、塩素処理によって致死作用物質の影響が少なくなることもあるが、塩素処理を行っても、致死作用物質が残ることもあると考えられた。
- (15) 淀川水系の河川水では、塩素処理(2 0 0 mg / l の塩素添加) によって原水の最高1 7 0 倍の変異原性が検出されたという報告があるので、多摩川河川水について塩素添加量を変化させた試験(塩素添加量5 0 mg / l 及び2 0 0 mg / l) を行ったが、2 0 mg / l 添加の場合と有意な差はなかった。今後さらに淀川水系に近い多摩川中流域での河川水について同様の検討を行って、塩素添加量及び河川の水質の影響を明らかにする必要と考えられた。
- (16) 水道水の変異原性では、T A 9 8 + S 9以外で変異原性が検出されることが多く、河川水の変異原性では、T A 1 0 0では、ほとんど変異原性が検出されず、T A 9 8ではよく検出された。また河川水の塩素処理水の変異原性では、河川水で検出されなかったT A 1 0 0で、変異原性が検出される傾向があった。これより、水道水の浄水工程での塩素処理は、T A 1 0 0の変異原性を増し、T A 9 8 + S 9の変異原性を減少させる傾向があると考えられた。
- (17) オゾン処理は、有機物質濃度が低い場合には若干変異原性を増加させることもあるが、有機汚濁物質濃度が高い場合には変異原性を減少させた。
- (18) 活性炭処理は、変異原性を確実に減少させた。従って、ある程度以上の変異原性がある水を飲料にするときには、活性炭処理を行うことが望ましい。
- (19) 水道水の変異原性について、従来の水質測定では汚染度の高い水道水で、変異原性が低くなる場合があり、特にT A 1 0 0の変異原性には、従来の水質では表せない因子が関係していると考えられた。従って、河川水を原水とする水道水の安全性を考慮していく場合には、従来の水質指標以外の新しい評価として、変異原性による評価を併用すべきと考えられた。また、他の水質と同様に変異原性についても、ある程度以上の頻度でモニタリングしていく必要があると考えられた。
- (20) 一般的な生菌数試験方法では、変異原性試験に比べて菌懸濁液を約 10^5 倍に希釈したが、プレート当りの検体はそのままとした。このため、プレートあたりの検体と菌数の比が変異原性試験の場合と異なっており、実際の変異原性試験の際の生菌数を求められなかったと考えられた。
- (21) Ames法変異原性試験では、菌株と検体の接触時間を明確にした方が、試験の際の生菌数を正確に求められる可能性が高いと考えられ、菌株と検体の接触時間を定めている、ブレインキューブレーション法で

は、今回のプレート法に比べて菌株と検体の接触が増し、変異原性試験の感度は高くなり、プレート法では検出できなかったのも検出できるようになると考えられる。そこで、今後は変異原性試験をプレインキュベーション法で行い、さらに生菌数試験について、検討してみる必要があると考えられた。

今後、樹脂で吸着できずに流出した有機物質を減圧濃縮して、その変異原性を調べる点、また、変異原性試験をプレインキュベーション法で行い、さらに生菌数試験について検討を行う点、そして河川水の変異原性については、変異原性物質がないのか、致死作用のある物質により変異原性がみられなくなっているのかを明らかにするため、致死作用の影響を生菌数試験などで確認する点、水質毎に分類するなどして最適添加量を決定する点、塩素処理水については、塩素添加量及び河川の水質と変異原性との関係を明らかにする点などについて研究がさらに進められることが必要であり、本研究の結果をもとにこれらの研究が発展し、多摩川河川水の変異原性が、一層容易かつ定量的に評価され、多摩川水系をより安全な清流としていくために、役立つよう期待する。

6 参 考 文 献

- 1) 丹保憲仁, 亀井翼, 中沖川誠: 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変異原性(2), 水道協会雑誌, 56(6), 2~11 (1987)
- 2) 内海英雄, 浜田昭: 安全性評価を指向した新しい水質指標, 水質汚濁研究, 10(2), 86~90 (1987)
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック (1986) 中央災害防止協会
- 5) 梅田誠: 変異原性試験法, 水質汚濁研究, 7(7), 426~430 (1984)
- 6) W.O.K.Grabow, J.S.Burger, C.A.Hilner: Comparison of liquid-liquid extraction and resin adsorption for concentrating mutagens in Ames salmonella/microsome assays on water, Bull. Environm. Contam. Toxicol, 27, 442~449 (1981)
- 7) B.J.Dutka, A.Jova, J.Brechin: Evaluation of four concentration/extraction procedures on waters and effluents collected for use with the salmonella typhimurium screening procedure for mutagens, Bull. Environm. Contam. Toxicol, 27, 758~764 (1981)
- 8) T.Vartinen, A.Limatainen, S.Jaaskelainen and P.Kaubanen: Comparison of solvent extractions and resin adsorption for isolation of mutagenic compounds from chlorinated drinking water with high humus content, Water Res., 21(7), 773~779 (1987)
- 9) B.Wigilins, H.Bor n, G.E.Carberg, A.Grimvaih and M.Mller: A comparison of methods for concentrating mutages in drinking water-recovery aspects and their implications for the chemical character of major unidentified mutagens, Sic. Total Environ., 47, 265~272 (1985)

- 10) 内海英雄, 浜田昭, 早津彦哉: 河川水中の変異原性活性の流域及び季節変動, 第19回日本水質汚濁学会講演集, P201 (1985)
- 11) T.Vartinen and A.Limatainen: High level of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland, *Mut. Res.*, 169, 29~34 (1986)
- 12) T.sato, M.Mukaida, Y.Ose, H.Nagase and T.Ishikawa: Mutagenicity of chlorinated products from soil humic substances, *Sic. Total Environ.*, 46, 229~241 (1985)
- 13) S.Maruoka and S.Yamanaka and Y.Yamamoto: Mutagenicity activity in organic concentrate from Nisitakase River water in Kyoto City, and its fractions separated by using liquid-liquid fractionation and thin layer chromatography, *Water Res.*, 19, 249~256 (1985)
- 14) Shoji Maruoka, Shinichi Yamanaka and Yukitako Yamamoto: Isolation of mutagenic components by High-Performance Liquid Chromatography from XAD extract of water from Nisitakase River, Kyoto City, Japan, *Sic. Total Environ.*, 57, 29~38 (1985)
- 15) 安部明美, 杉山英俊, 井口潔, 久松由東, 西村哲治, 松下秀鶴: 河川底質の変異原性をモニタリングするための基礎的検討(1) - 致死作用の除去について -, *水質汚濁研究*, 10(2), 123~129 (1987)
- 16) N.Guttman-Bass, M Bairey-Albuquerque, Shimon Ulitzur, A.Chartrand and C.Bav-Aca: Effects of chlorine and chlorine dioxide on mutagenic activity of Lake Kinnereth, *Env, Sci. Technol.*, 21(3), 252~260 (1987)
- 17) P.Backlund, L Kronberg, G.Penser and L.Tikkanen: Mutagenic activity in humic water and alum flocculated humic water treated with alternative disinfectants, *Sic. Total Environ.*, 47, 257~264 (1985)
- 18) John C.Loper, M.Wilson Tabor, Laura Rosenblum and Jack Demarco: Continuous removal of both mutagenic and mutagen-forming potential by an Experimental Full-Scale Granular Activated Carbon treatment system, *Env.Sci.Technol.*, 19(4), 333~339 (1987)
- 19) 浦野紘平, 川本克也, 林幸司: 紫外吸光度による水中有機物質の特徴づけ方法, *水質汚濁研究*, 4(1), 43~50 (1981)
- 20) 浦野紘平, 武政隆夫: 塩素処理におけるトリハロメタン生成の速度, *水道協会雑誌*, 596, 27~37 (1984)
- 21) 浦野紘平, 岩瀬葉子: 全有機ハロゲン(TOX)生成能の測定による低濃度有機汚濁物質量の評価方法, *工業用水*, 302, 41~49 (1984)

- 22) 奥山秀樹, 丹保憲仁: 塩素処理により生成する変異原性のRec-Assayによる検討, 水質汚濁研究, 10(4), 251~259 (1987)
- 23) 讃岐田訓: 塩素処理による変異原性の形成, 水, 29 (11), 23~29 (1987)
- 24) 吉川邦衛, 富田昌明, 松阪玲子, 安永勝昭: 抗菌性を有する化学物質の変異原性検出法の開発, Mitsubishi Chemical R&D Review, 1(1), 90~99 (1987)