

水道水の配水過程におけるMXの指標性に関する研究

課題番号 14350288

平成14年度～平成15年度 科学研究補助金
(基盤研究(B)(2)一般) 研究成果報告書



平成16年3月

研究代表者 伊藤 禎彦
(京都大学大学院工学研究科教授)

目次

はしがき	1
研究組織	2
研究経費	2
研究発表	2
研究成果	
第1章 序論	4
第1節 研究の背景	4
第2節 本研究の目的	5
第3節 本研究の構成	6
第2章 文献考察	8
第1節 本研究で用いるバイオアッセイについて	8
第2節 既往の研究に関する文献考察	10
第3節 MXについて	11
第3章 MXの測定法に関する検討	17
第1節 本章の目的	17
第2節 誘導体化法に関する検討	17
第3節 ガスクロマトグラフへの注入法に関する検討	18
第4節 結語	21
第4章 水中でのMXの特性に関する実験	23
第1節 本章の目的	23
第2節 水中でのMXの安定性に関する実験	23
第3節 塩素との反応によるMXの変化特性に関する実験	26
第4節 考察	39
第5節 結語	41

第5章	バイオアッセイからみた配水過程におけるMXの指標性	
	に関する実験	44
第1節	本章の目的	44
第2節	配水過程を想定した実験	44
第3節	残留塩素濃度条件に注目したMXの指標としての適応範囲	
	に関する検討	56
第4節	結語	61
第6章	結論	63
付録	ガスクロマトグラフ・質量分析の分析条件	66
	塩素処理水の染色体異常誘発性・形質転換誘発性の変化過程と	
	強変異原物質MXの指標性	70
	Change of The Toxicity of Chlorinated Drinking Water and MX as an Index	77
	配水過程における強変異原物質MXの指標性	83

はしがき

消毒副生成物の問題は、Rookが1974年に塩素消毒によりクロロホルムが生成することを報告して以来、水道工学の中心的課題の一つであり続けてきた。検出・定量可能な消毒副生成物の数は分析技術の発展にともない増加してきたが、ハロゲン量ベースで同定可能な塩素処理副生成物の量は、今日においてもなお、高々50%である。このため、消毒副生成物全体の有害性、あるいはその配水過程での変化傾向など、水道システムの構築または管理に真に有用な点に関しては未解明な点も多い。

本研究では、水質管理の場として給配水過程を取りあげ、配水過程における有害性の変化を把握するための指標を提示している。指標物質としては強変異原物質3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX)に注目し、MXの水中での特性を明らかにした上で、バイオアッセイ結果からMXの指標としての妥当性、またその限界について検討している。

本研究で得られた結果は、水道水質管理について、重要な知見といえる。その一方で、消毒副生成物に関連する反応系は非常に複雑であり、本研究の終了後も数多くの課題を残すこととなった。今後も本課題に関連する調査研究を鋭意進めていく予定である。

平成16年3月

研究代表者 伊藤 禎彦

京都大学大学院工学研究科教授

研究組織

研究代表者 伊藤 禎彦 (京都大学・工学研究科・教授)

研究経費

平成14年度 5,000千円

平成15年度 3,200千円

合計 3,700千円

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) 伊藤禎彦, 仲野敦士, 荒木俊昭, 塩素処理水の染色体異常誘発性・形質転換誘発性の変化過程と強変異原物質MXの指標性, 水環境学会誌, Vol.26, No.8, pp.499-505, 2003.

- 2) Itoh, S., Nakano, A., and Araki, T, Change of The Toxicity of Chlorinated Drinking Water and MX as an Index, Water Sci. Technol., 2004 (印刷中) .

(2) 学会発表

- 1) 伊藤禎彦, 仲野敦士, 荒木俊昭, 配水過程における強変異原物質MXの指標性, 第53回全国水道研究発表会講演集, pp.616-617, 2002.5.
- 2) Itoh, S., Nakano, A., and Araki, T, Change of The Toxicity of Chlorinated Drinking Water and MX as an Index, Proceedings of the 4th IWA Specialized Conference on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water -ECOHAZARD 2003-, pp.62/1-62/4, 14-17 September, 2003, Aachen, Germany.

第1章 序論

第1節 研究の背景

現在、塩素は水道水の消毒剤として広く用いられている。塩素は自然水中の細菌やウイルスによる感染を防ぐ効果を有する。しかしその一方で、塩素は水中の有機物と反応し、トリハロメタンに代表される消毒副生成物を生成する。1972年、オランダのRookがライン川水を塩素処理することでクロロホルムが生成することを初めて報告した。その2年後の1974年に、Harisが米国ミシシッピ州ルイジアナ住民のがん発生率が高く、これは水道水中の有機塩素化合物が関係していると報告した。これがきっかけとなり、水道水の安全性が改めて注目されるようになった。最初に注目されたのはトリハロメタンをはじめとした消毒副生成物であり、その後世界各国で規制値が設けられるなどの措置がとられたのである。

消毒副生成物の中には発がん性などの有害性が疑われているものがあり、飲料水水質への影響が危惧されている。そこで、塩素処理された飲料水においては、病原微生物などへの消毒効果を損なうことなく、水質が安全に維持される管理方策が求められる。

世界保健機構（WHO）は2003年に飲料水水質ガイドラインを改定し、日本でもこの動きにあわせて平成16年4月より新水道水基準が施行される。水道水基準は個々の有害物質に対して規制値を定めている。水道原水中には無数の化学物質が混在しており、水道水基準により規制される物質は全体のごく一部にしかすぎない。有機ハロゲン物質として検出されるものの中で、トリハロメタンやハロ酢酸のように構造が同定されているものは3、4割にすぎないと言われる。したがって、半分以上の物質は未同定であり、規制もされていない。しかし、これらの物質の中にも発がん性のような有害性を有するものが存在することは十分考えられる。さらに飲料水の有害性という観点からはこれらの物質の複合作用を本来考慮すべきである。

現在の水道水基準には限界があるという立場から、塩素処理により生成する消毒副生成物をどのような形で飲料水水質の管理に活用していくべきか検討されることが望まれる。

第2節 本研究の目的

一般に、塩素処理後トリハロメタンやハロ酢酸の濃度は経時的に増大する^{1,2,3,4)}。つまり、浄水場から給配水過程を経て給水末端に至る間に水道水基準で規制されている物質の濃度は大きくなる。一見、飲料水の有害性も増大するようにも考えられる。だが、バイオアッセイ結果からは発がんに関する有害性は逆に低減することが推定されている^{5,6)}。これらの結果は、給配水過程を流下する飲料水の発がんに関する有害性の指標としては、トリハロメタンやハロ酢酸は不適當であることを示唆している。

多種多様な物質が存在する飲料水の安全性を管理するうえで、個別物質の分析のみに頼る方法には限界が存在するとの立場から、飲料水質の包括的な指標としてのバイオアッセイ結果をいかにして水質管理に活用するかという検討をおこなう必要がある。また、指標はいかなる場面で適用でき、いかなる場面で不適當かということについても検討しなければならない。

そこで、本研究では、水質管理の場としては給配水過程を想定し、配水過程における有害性の変化を把握するための指標を提示することを目的とする。指標物質としては強変異原物質 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone に注目する。MX の水中での特性を明らかにした上で、バイオアッセイ結果から MX の指標としての妥当性、またその限界について検討する。

第3節 本研究の構成

第2章では、本研究で用いるバイオアッセイ（染色体異常試験・形質転換試験）、MX、既往の研究結果についての考察をおこなう。

第3章ではMXの分析方法に関する検討をおこなう。

第4章では、MXの水中での特性を明らかにするための検討をおこなう。

第5章では、琵琶湖水を用いて、配水過程を想定した実験をおこない、バイオアッセイから見たMXの水道水水質指標としての妥当性・限界について検討をおこなう。

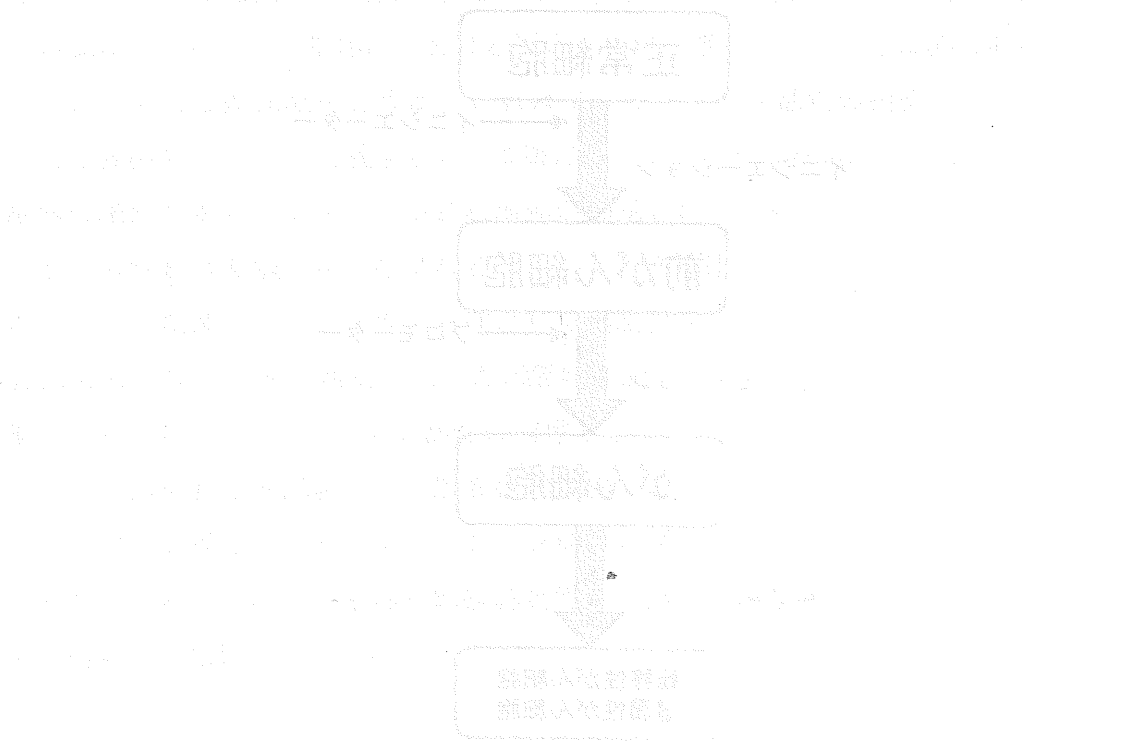
第6章では本研究で得られた知見をまとめるものとする。

参考文献

1. Tanaka K., Shikada Y., Matuda A. and Takahashi Y, Occurrence of organic halogens and mutagenicity in drinking water in Niigata district of Japan, Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants in Water, 1991
2. Sasaki T. and Umeda S., Control technology for disinfection by-products including alternate disinfectants, 3rd U.S.-Japan Governmental Conference on Drinking Water Quality Management, 1992
3. Summers R.S., Hooper S.M., Shukairy H.M., Solarik G. and Owen D, Assessing DBP yield: uniform formation conditions, J. Am. Wat. Wks. Assoc, Vol. 88, No. 6, 1996
4. Arora H., LeChevallier M.W. and Dixon K, DBP occurrence survey, J. Am. Wat. Wks. Assoc, Vol. 89, No. 6, 1997
5. 伊藤禎彦、村上仁士：塩素処理水の染色体異常誘発性に対する加水分解の影響、環境工学研究論文集，Vol. 30, pp. 219-226, 1993

6. 伊藤禎彦、池田大助、鳥羽裕一郎：塩素処理水における発がんイニシエーション・プロモーション活性の変化過程、第34回日本水環境学会年会講演集, p213, 2000

塩素処理水は、消毒効果により病原菌の増殖を抑制する一方で、有機物と反応して生成する消毒副生成物（DBPs）が、発がんイニシエーション・プロモーション活性を示すことが報告されている。本研究では、塩素処理水の生成過程におけるDBPsの生成と、その発がん活性との関係について検討した。結果として、塩素処理水の生成過程において、DBPsの生成量は増加するにつれて、発がん活性も増加することが明らかになった。これは、DBPsの生成量が増加するにつれて、発がん活性を示すDBPsの種類や濃度が増加するためと考えられる。本研究の結果は、塩素処理水の発がん活性を低減するための対策として、DBPsの生成量を抑制する必要があることを示している。



第2章 文献考察

第1節 本研究で用いるバイオアッセイについて

本研究で用いるバイオアッセイは発がんに関連する有害性を検出するものである。がんとは多細胞生物の体内で細胞が正常な機能を喪失し、際限なく増殖し続ける現象である¹⁾。DNA上の遺伝子に異常が引き起こされ、p53のようながんに対して抑制作用のあるたんぱく質が作られなくなることや、遺伝子の変異によって異常なたんぱく質が作られることで細胞は秩序を失った増殖を始めると考えられている。

さまざまな研究が発展するにしたがい、発がんの過程は多岐にわたる複雑な過程であることが明らかになってきた。この複雑な発がんの過程を簡素化したモデルが図2-1である。まず第一段階として、正常な細胞にたいして変異原物質、紫外線、ウィ

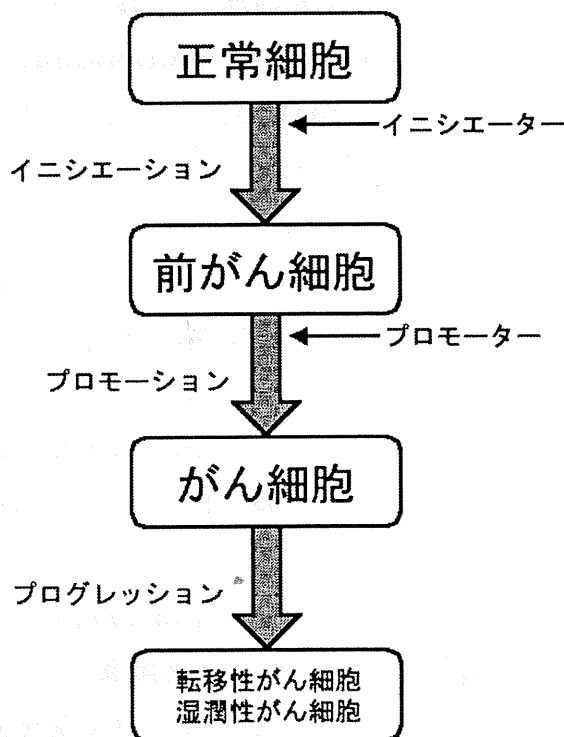


図2-1 発がんの過程のモデル

ルスなどのイニシエーターと呼ばれる要因により DNA に不可逆的な変化がもたらされるイニシエーションという段階がある。続く第二段階は、イニシエーションを受けた前がん細胞が形質転換をおこし、腫瘍を形成していくプロモーションという段階である。その後、プロモーションを受けたがん細胞がより悪性度の高いがん細胞へとなる過程がプログレッションという段階である²⁾。

本研究では、染色体異常試験をおこなうが、これは発がんイニシエーション活性の指標として用いる。化学物質などが DNA にダメージを与える性質は変異原性と呼ばれ、イニシエーション活性をスクリーニングする試験の多くは一般に変異原性試験である。変異原性試験では、染色体異常試験の他に Ames 試験が広く知られているほか、DNA 損傷を指標とする試験、DNA 修復を指標とする試験などがある。染色体異常試験は染色体におこった変異を視覚的に検出する試験である。染色体異常が誘発されるメカニズムの全てが解明されているわけではないが、化学物質などが DNA と直接反応し、染色体を切断する場合や DNA の複製を阻害することで二次的に構造異常が起こると考えられている^{3,4)}。染色体異常試験には、ヒトを含め哺乳動物細胞を用いるので動物個体を試験対象とするよりも試験が簡便であるが、閉鎖された系内の試験であるために生体内における反応を再現しきれないという限界もある。

一方、形質転換試験を行うが、これはプロモーション活性の指標として用いる。正常な細胞を *in vitro* で培養すると、単層に広がる。これは細胞同士の接触によって、細胞の増殖が適当にコントロールされ増殖が抑制されるためである。本来、細胞が有するこの性質は接触阻止と呼ばれる。しかし、接触阻止の機能を喪失した細胞は重なり合って増殖し、フォーカスと呼ばれる細胞群を形成する。本研究では、マウス胎児由来の BALB/3T3 細胞を用いた形質転換試験を行い、形成したフォーカスを定量化することでプロモーション活性の指標とした。

非二段階形質転換試験とは、形質転換試験におけるイニシエーション処理の段階でサンプルを投与し、イニシエーション活性とプロモーション活性をあわせて評価するものである。非二段階形質転換誘発性には両活性が不可欠であり、発がんに関する有害性の指標となりえる。

第2節 既往の研究に関する文献考察^{5,6,7)}

伊藤らは試薬フミン酸塩素処理水について、バイオアッセイ結果と分析結果から多くの知見を得ているので以下にまとめる。

フミン酸塩素処理水には染色体異常誘発性、形質転換誘発性が認められ、それぞれの作用強度は添加塩素濃度を大きくするにつれて大きくなる。フミン酸を塩素処理した際に生成する染色体異常誘発性と形質転換誘発性は塩素による分解を受けにくい。フミン酸塩素処理水中の染色体異常誘発性は加水分解により時間とともに低減するのに対して、形質転換誘発性は逆に増大する。このとき、それぞれの時間に

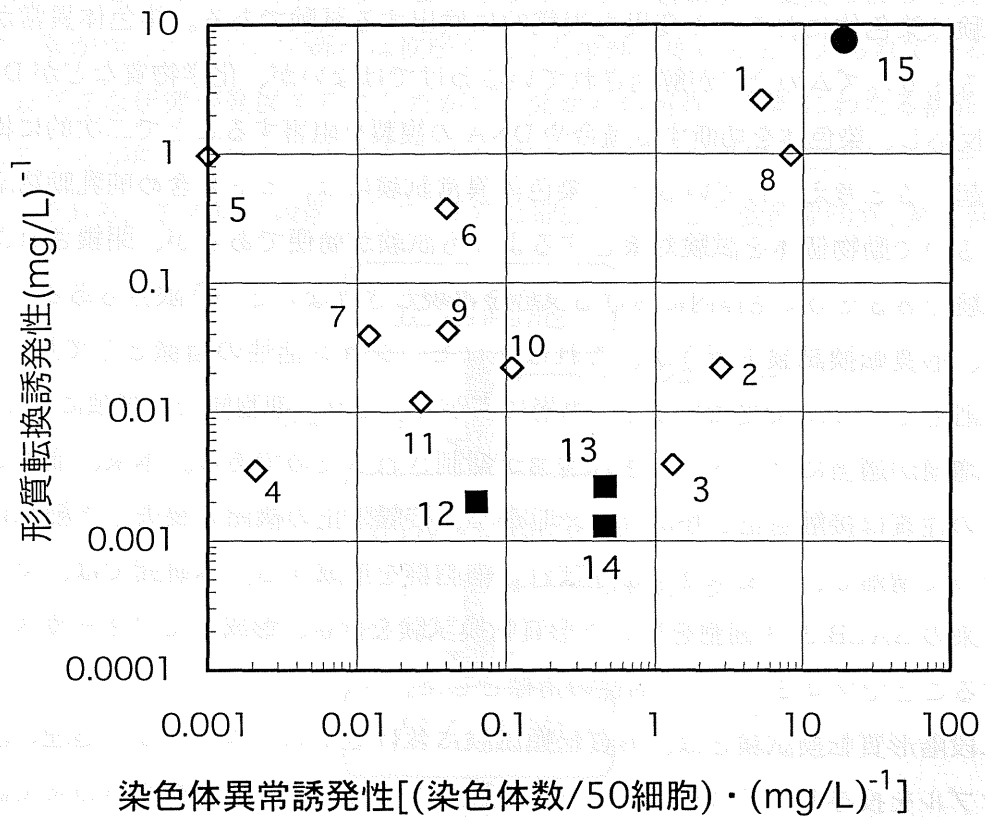


図2-2 染色体異常誘発性と形質転換誘発性の相対的關係

1:4-NQO 2:ケルセチン 3:5-フルオロウラシル 4:硝酸ナトリウム 5:TPA 6:メゼレイン 7:BHA 8:3-メチルコラントレン 9:テオフィリン 10:尿素 11:カフェイン 12:クロロホルム 13:ジクロロ酢酸 14:トリクロロ酢酸 15:MX

対する減少速度、増加速度は pH が高いほど大きくなる。つまり、pH が高くなると染色体異常誘発性はより速く減り、形質転換誘発性はより速く増えるということである。非二段階形質転換誘発性の性質は経時的に減少傾向を示し、pH が高くなるにしたがい減少速度が大きくなり、染色体異常誘発性に近い性質を持つ。以上より、フミン酸塩素処理水の発がんに関連する有害性は配水過程においては低減すると推定している。

一方、生成する消毒副生成物などの測定から以下のような結果が得られている。クロロホルムとクロロ酢酸類の寄与率は合計でも染色体異常誘発性に対して 1.9 ~ 6.5%、形質転換誘発性では 1.3 ~ 2.3% にとどまり、水道水の基準項目、監視項目に指定されているこれらの物質はフミン酸塩素処理水の有害性の主要成分とは考えにくい。消毒副生成物のフミン酸塩素処理水の有害性に対する指標性を検討すると、クロロホルムとジクロロ酢酸が形質転換誘発性の変化に定性的かつ反応速度論的に対応し、配水過程で形質転換誘発性を把握するための指標となりえた。染色体異常誘発性の指標については、個別の消毒副生成物ではないが、カルボニル化合物が示されている。カルボニル化合物は塩素処理により生成増大し、加水分解により減少するなど染色体異常誘発性との類似性が認められ、定性的かつ反応速度論的に配水過程で染色体異常誘発性の指標となることを示している。しかし、クロロホルムやクロロ酢酸類は定性的に染色体異常誘発性や非二段階形質転換誘発性の傾向とは異なり、配水過程においてはこれらの適当な指標とはなり得なかった。

なお、これらの結果はすべて試薬フミン酸をもちいた結果であり、TOC は 1000mgC/L 以上、塩素注入量も 2000mgCl₂/L といったオーダーであることを見落としてはならない。

第 3 節 / MX について

水道水中にはトリハロメタンやハロ酢酸のような代表的なもの以外にも多種無数の消毒副生成物が混在している。それらの中には発がん性などが疑われるものが少なくない。中でも 1981 年にパルプ工場の塩素処理排水中から検出・同定された 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone は通常 MX と呼ばれ⁸⁾、他の消毒

副生成物と比べて強い変異原性が確認されている^{9,10)}。また、プロモーション活性についても確認されている¹¹⁾。本研究でおこなった染色体異常試験や形質転換試験でもその強い作用が確認されている¹²⁾。図 2-2 は横軸に染色体異常誘発性、縦軸に形質転換誘発性をプロットして相対的な強度関係を示したものであるが、MX は右上にプロットされている。MX の染色体異常誘発性、形質転換誘発性は代表的な消毒副生成物と比べても非常に強い。この結果より MX は発がんの過程においてイニシエーターおよびプロモーターとして作用すると思われる。実際、1997 年にラットを用いた個体試験で発がん性が確認されている¹³⁾。MX は消毒副生成物の中でも近年最も注目され、水質指標の候補とされつつある物質である。

MX は日本を含め、世界各国の飲料水中から検出されている。検出される濃度レベルは ng/L オーダーである。日本での検出報告例は数 ng/L ~ 20ng/L 程度であり、諸外国と比較して値が小さいのは原水 TOC が小さいためと考えられている^{14,15,16)}。

水道水中 MX 濃度と MX の変異原性から求められる変異原性への寄与率についても多くの報告がされている。日本における寄与率は数% ~ 20% との報告が多い^{15,16)}。外国においても 20 ~ 40% 程度とする報告が多いが¹⁷⁾、中には変異原性の 60% 近くが MX の寄与によるものとする報告もある¹⁸⁾。これらの数字には複合作用などの影響は考慮されていないが、単独の消毒副生成物としての寄与率としては極めて大きく、注目すべき値である。

MX の生成機構は明らかにされていないが、水道水中から検出されることからフミン質を塩素処理することで生成する物質であると考えられる。琵琶湖・淀川水系における水道原水に対して、水道水としての適当な塩素処理を行うと TOC 1mg から MX がおよそ 1ng 程度生成するという報告がある¹⁹⁾。フミン質以外にも前駆物質としてチロシン、カテキン類を含むポリフェノール化合物^{11,20)}、アミノ酸²¹⁾などを塩素処理すると MX が生成することが確認されている。

MX の構造異性体として、フラノン環が開いた E-MX が存在する。E-MX の変異原性は MX の 10 分の 1 程度である¹⁸⁾。MX は pH によって図 2-3 のように変化すると考えられている¹⁸⁾。

MX は水中で不安定であり、特に高温度や高 pH 領域での不安定性が報告されている^{22,23)}。特に、着目すべき性質は高 pH 領域で加水分解を受けやすいことである。フミン質を塩素処理した際に生成する染色体異常誘発性も加水分解に対して不安定で

あることから、染色体異常誘発性の指標となることが期待される。

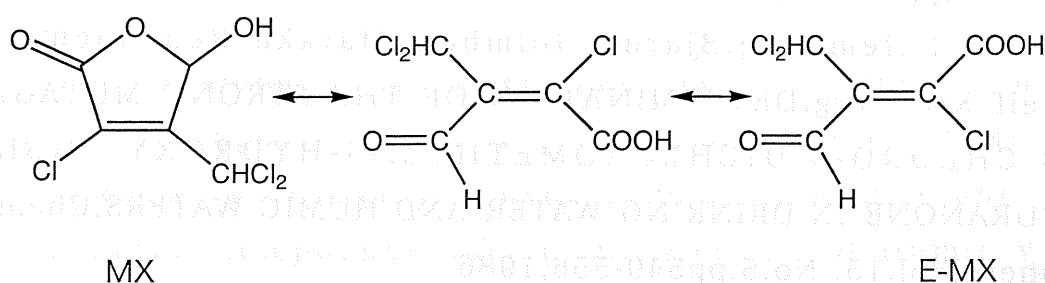


図 2-3 MX の化学構造

参考文献

1. 生田哲：がんと DNA、講談社、1997
2. 日本組織培養学会：組織培養の技術（応用編） 第三版、朝倉書店
3. 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店、1988
4. 染色体異常試験データ集 1998年版、Life-science Information Center,1998
5. 伊藤禎彦、村上仁士：塩素処理水の染色体異常誘発性に対する加水分解の影響、環境工学研究論文集、Vol.30,pp.219-226,1993
6. 伊藤禎彦、池田大助、鳥羽裕一郎：塩素処理水における発がんイニシエーション・プロモーション活性の変化過程、第34回日本水環境学会年会講演集、p213,2000
7. 住友恒、伊藤禎彦：水道水の消毒と変異原性の生成、土木学会工学委員会 用水廃水の高度処理技術に関する研究小委員会研究報告書、pp.7-12,1998
8. Bjarne Holmbom, Ronald H. Voss, Richard D. Mortimer, and Alfred Wong, Fractionation, Isolation and Characterization Of Ames Mutagenic Compounds in Kraft Chlorination Effluents, Environmental Science & Technology, Vol.18, No.5, pp333-337, 1984

9. H.Horth, Identification of mutagens in drinking water, Aqua Vol.38, pp80-100, 1989
10. Jarl Hemming, Bjarne Holmbom, Markku Reunanen and Leif Kronberg, DETERMINATION OF THE STRONG MUTAGEN 3-CHLORO-4-DICHLOROMETHYL-5-HYDROXY-2(5H)-FURANONE IN DRINKING WATER AND HUMIC WATERS, Chemosphere, Vol.15, No.5, pp549-556, 1986
11. N.Kinae, J.Tanaka, N.Kamio, C.Sugiyama, M.Furugori, K. Shiomi and K.Tanji, DETECTION AND ORIGIN OF 3-CHLORO-4-DICHLOROMETHYL-5-HYDROXY-2(5H)-FURANONE (MX) IN RIVER WATER, Proceedings of The 3rd IWA Specialized Conference on Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminations -ECOHAZARD'99-, 1999
12. 伊藤禎彦、池田大助、仲野敦士：水道水の染色体異常誘発性・形質転換誘発性の塩素処理後の変化過程、第53回水道研究発表会講演集, 2002(印刷中)
13. Hannu Komulainen, Veli-Matti Kosma, Sirkka-Liisa Vattinen, Terttu Vartiainen, Elia Kaliste-Korhonen, Simo Lotjonen, Raimo K. Tuominen and Jouko Tuomisto. Carcinogenicity of the Drinking Water Mutagen 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone in the Rat, Journal of the National Cancer Institute, Vol.89, No.12, pp848-856, 1997
14. 石黒靖尚、大野健治、松枝隆彦：水道水及び排水中の 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) の定量、水道協会誌, Vol.63, No.5, 1994
15. Noriyuki Suzuki and Junko Nakanishi, THE DETERMINATION OF STRONG MUTAGEN, 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone IN DRINKING WATER IN JAPAN, Chemosphere, Vol.21, No.3, pp387-392, 1990

16. N.Suzuki and J.Nakanishi,BROMINATED ANALOGUES OF MX(3-CHLORO-4- DICHLOROMETHYL-5-HYDROXY-2(5H)-FURANONE) IN CHLORINATED DRINKING WATER,Chemosphere,Vol30,No8,pp1557-1564,1995
17. Peter Backlund,Leif Kronberg and Leena Tikkanen,Formation of Ames Mutagenicity and of The Strong Bacterial Mutagen 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone and other Halogenated Compounds during Disinfection of Humic Water, Chemosphere,Vol.17, No.7,pp1329-1336,1988
18. Leif Kronberg and Terttu vartiainen,Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomer E-3-Chloro-4-dichloromethyl-4-oxobutenoic acid in chlorine-terated tap waters,Mutation Research,Vol.206,pp177-182,1988
19. 森實圭二、梅谷友康、石本知子：浄水の 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy -2(5H)-furanone (MX) 濃度と変異原性寄与率、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績第 49 集 ,pp6-11,1997
20. 木苗直秀、今村希美、古郡三千代、下位香代子：水道水中の変異・がん原物質 MX に関する研究、第 33 回水環境学会年会講演集 ,p545,1999
21. Zou Huixian,Lu Junhe,Chen Zhuo,Yang Chengyong,Zhang Jinqi and Zhou wen,Screening The Precursors Of Strong Mutagen [3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone] MX From Chlorinated Water,Water Reserch,Vol.34,No.1,pp225-229,2000
22. N.Kinae,C.Sugiyama,M.Y.Nasuda,K.Goto,K.Tokumoto,M.Furuogi and K.Shiomi,Seasonal Variation and Stability of Chlorinated Organic Mutagens in drinking water,Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants in Water,1991

23. Jophn R.Meier,Richard B.Knohl,W.Emile Coleman,H. Paul Ringhand,Jean W. Munch,William H. Kaylor,Robert P.Streicher and Frederick C. Kopfler,Studies on the potent bacterial mutagen, 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone:aqueous atability ,XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic asid solution,Mutation Research,Vol. 189,pp363-373,1987

第3章 MXの測定方法に関する検討

第1節 本章の目的

MXの水道水中での検出濃度レベルは数ng/Lであり¹⁾、非常に微量しか存在しない。そのため、MXの定量は非常に困難である。より効率的にMXの定量を行うために、測定方法に関する検討を行った。検討項目は前処理における誘導体化の方法と、ガスクロマトグラフへの注入方法の2点である。

第2節 誘導体化法に関する検討

第1項 実験方法

MXの誘導体化には、一般にメチル化が行われている^{1,2)}。しかし、メチル化のためには、作業手順中にMXを70°Cの高温に1時間反応させることなどが含まれ、MXの熱分解が危惧される。そこで、作業自体も簡便なTMS化について、メチル化と比較検討を行った。

3.2.1.1 メチル化

MX標準原液(100 μ g/mL)を25 μ g/mLに希釈した。なお、標準原液は溶媒に酢酸エチルを使用し、希釈にも酢酸エチルを用いた。希釈液1mLを遠沈管に採取し、窒素ガスを吹き付けて酢酸エチルを十分乾固させた。2%硫酸・メタノール溶液1mLを加えて、70°Cのウォーターバス内で1時間反応させて、MXをメチル化した。メチル化後、2w/v%炭酸ナトリウム水溶液で硫酸を中和する。つぎにヘキサン1mLを加えて液液抽出を行った。ヘキサンによる液液抽出を合計4度繰り返した。回収したヘキサン4mLを脱水後、窒素ガスで1mLまで濃縮し、これをガスクロマトグラフ質量分析計測定用検液とした。ガスクロマトグラフ質量分析計はスプリット

レス法で測定したが、使用機器と測定条件については付録に示す。

3.2.1.2 TMS化³⁾

MX標準液1mL(25 μg/mL)を窒素ガスを吹き付けて0.4mLまで濃縮した。これに、BSTFA+1%TMCS (N,O-bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% Trimethylchlorosilane、PIERCE)を0.2mL添加し、室温で30分放置した。これを酢酸エチルで1mLに定容し、ガスクロマトグラフ質量分析計測定用検液とした。測定条件は2.1.1メチル化と同じである。

第2項 実験結果

TMS-MXとメチル-MXの化学構造式をあわせて図3-1に示す。TMS-MXのピーク面積はメチル-MXに比べて、およそ3.6倍になった。TMS-MXがメチル-MXより感度がよいという結果は既往の報告とも一致する³⁾。ガスクロマトグラフに注入した検液中MX濃度は同じであるのでTMS-MXの方が感度がよいといえる。この原因としては、メチル化の際にMXが熱分解の影響を受けて分解してしまったことや、TMS-MX自体の感度がメチル-MXよりもよいことなどが考えられる。

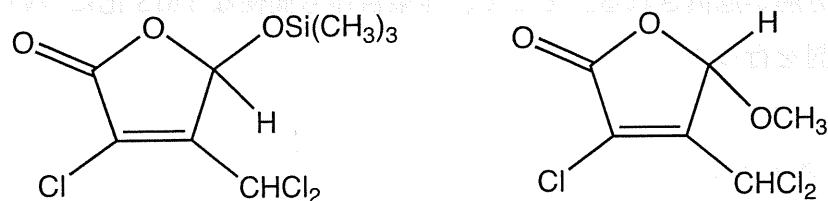


図3-1 TMS-MXとメチル-MXの化学構造式

第3節 ガスクロマトグラフへの注入方法に関する検討

MXの標準品を用いて、ガスクロマトグラフへの注入方法の検討を行った。注入方法で検討を行ったのは従来のスプリットレス法にクールオンカラム法と

PTV(Programmed Temperature Vaporizing)法を加えた3種類の方法である。

クールオンカラム注入法とは、インジェクション部の温度を低温に保ち、カラムにサンプルを液体状態で注入する方法である。ディスクリミネーション(シリンジ内での蒸発現象などにより低沸点成分に比べ高沸点成分の揮発・導入率が低くなる現象)の防止の効果がある。さらに、以下のような利点が挙げられる。

- ・熱的に不安定な成分を低温でカラムに展開できるので、熱分解の影響を抑えることが出来る。
- ・オンカラム注入が正しく実行されると、極めて正確・精密な分析結果を得ることが出来る。

しかし一方で、溶媒以外の成分をカラムに導入するスプリットレス法とは異なり、カラムに直接試料を導入するため、カラムなどが汚れやすいという欠点も持つ。

PTV法はプログラブル加熱気化注入法とも呼ばれる方法である。スプリットレス法ではガスクロマトグラフへの試料注入量は1~2 μ Lが一般的であるが、PTV法ではより多くの試料をガスクロマトグラフに注入できる。本研究で用いた機器においてPTV法では、シングルインジェクションで最大25 μ L注入が可能であり、マルチインジェクションを用いることで注入量が200 μ Lまでは優れた直線性をえることが可能とされる。大容量注入により、最小検出限界の向上などが可能となる。また、ボラタイルインレットにより、熱的に不安定なサンプルの変質を抑制できる。

第1項 実験方法

スプリットレス法とクールオンカラム法の比較のためには、MXを1 μ g/mL含む酢酸エチル1mLに窒素ガスを吹き付けて0.2mLまで濃縮し、BSTFA+1%TMCSを0.2mL添加し室温で30分放置してTMS化を行った。これに再度窒素ガスを吹き付けて0.2mLまで濃縮し、これを測定用検液とした。ガスクロマトグラフなどの測定条件は付録に示す。

PTV法の検討のためには、MXを20 μ g/mL含む酢酸エチル1mLに窒素ガスを吹き付けて0.2mLまで濃縮し、BSTFA+1%TMCSを0.2mL添加し室温で30分放置して

TMS化を行った。これに再度窒素ガスを吹き付けて0.2mLまで濃縮し、これを測定用検液とした。ガスクロマトグラフなどの測定条件は付録に示す。なお、PTV法においては、注入回数を変化させて、その効果を確認した。

第2項 実験結果

クールオンカラム法でTMS-MXを注入した場合、スプリットレス法で注入した場合に比べて、ピーク面積はおよそ3.0倍になった。これは、スプリットレス法ではインジェクション温度が200°Cであるのにたいして、クールオンカラム法使用時のインジェクション温度は63°Cから昇温することが原因であると考えられる。インジェクション部分におけるTMS-MXの熱分解が抑制され、カラムに注入される絶対量が増えたことで感度があがったと思われる。

PTV法で注入回数を変更した時の測定結果を図3-2に示す。注入回数とピーク面積の間には $R^2=0.99$ という高い相関関係がみられた。注入回数が20回程度までであ

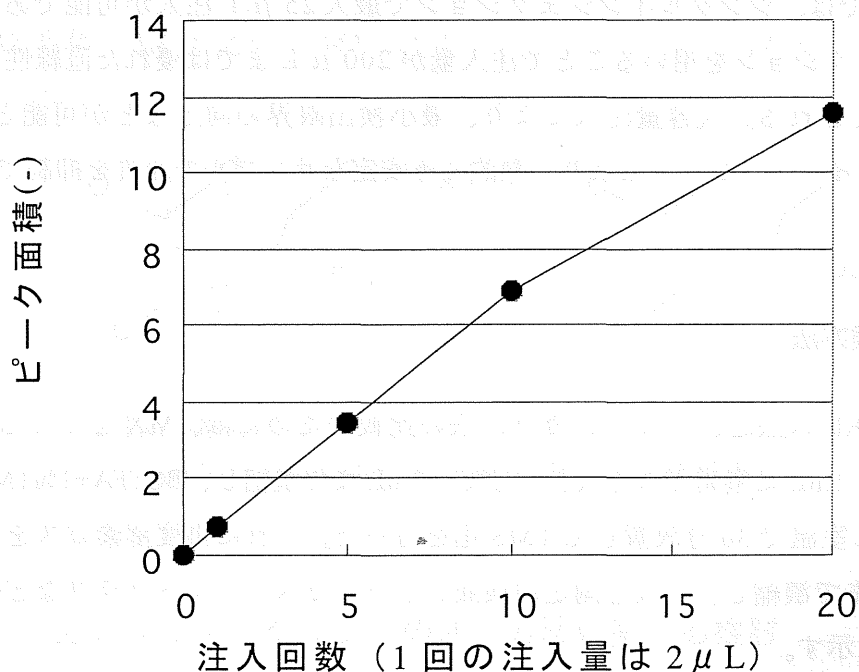


図3-2 PTV法における注入回数とピーク面積の関係

れば、大容量注入による影響はないと判断できた。

TMS 化と PTV 注入法を組み合わせることで、感度を高めることが可能となった。PTV 法で 1 回の注入量を $2\ \mu\text{L}$ 、注入回数 20 回として $40\ \mu\text{L}$ を注入する場合、試料中の MX 濃度は 50ng/mL までは検出可能であった。つまり、検出限界は MX の絶対量で 2ng であった。また、自然水などの試料を MX の回収率が 100% とされる CSP800 樹脂⁴⁾ を用いて濃縮して測定し、試料水 20L を濃縮すると (5 章 2 節参考) 試料水中の MX 濃度は 0.5ng/L あれば検出可能である。

第 4 節 結語

本章では MX の分析における、誘導体化の方法とガスクロマトグラフへの注入方法について検討を行った。本章で得られた知見を以下に示す。

- MX の誘導体化の方法について検討した結果、メチル化に比べて TMS 化は作業自体も簡便であり、測定時の感度も TMS-MX はメチル-MX の 3.6 倍となった。MX の誘導体化については TMS 化がより適していた。
- MX のガスクロマトグラフへの注入方法について、スプリットレス法、クールオンカラム法、PTV 法について検討をおこなった。スプリットレス法とクールオンカラム法との比較では、クールオンカラム法で分析をおこなった方が 3.0 倍ほど感度がよかった。しかし、PTV 法を用いて大容量を注入することで感度はさらにあがると思われた。MX 分析時の注入方法としては本研究の検討範囲内ではカラムの汚染などの実用的な点を考慮しても PTV 法がもっとも優れていると考えられる。
- MX の測定には、誘導体化には TMS 化を、ガスクロマトグラフへ注入方法としては PTV 法を用いることとした。
- 自然水中 MX 濃度が 0.5ng/L 以上であれば、MX の測定は可能であると考えられた。

参考文献

1. 日本水道協会：上水試験法（解説編）、1993
2. Jarl Hemming, Bjarne Holmbom, Markku Reunanen and Leif Kronberg, DETERMINATION OF THE STRONG MUTAGEN 3-CHLORO-4-DICHLOROMETHYL-5-HYDROXY-2(5H)-FURANONE IN DRINKING WATER AND HUMIC WATERS, Chemosphere, Vol.15, No.5, pp549-556, 1986
3. 奥村学、大谷恭靖：固相抽出—GC/MSによるMXの分析、第51回水道研究発表会講演集, pp546-547, 2000
4. 森實圭二、梅谷友康、石本知子：浄水の3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) 濃度と変異原性寄与率、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績第49集, pp6-11, 1997

第4章 水中でのMXの特性に関する実験

第1節 本章の目的

本章では、水中でのMXの特性を調べる。本章の目的は、実際の水道水中でのMXの挙動を推定するために、加水分解や塩素分解がMXに与える影響を定量的に把握することである。

第2節 水中でのMXの安定性に関する実験

MXの安定性がpHの異なる水中においてどのように変化するかを検討した。

第1項 実験方法

4.2.1.1 試料水の調製

蒸留水のpHを塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸緩衝液を用いて2,7,12になるように調整した。それぞれのpHを調整した後、MXの初期濃度が1 μ g/Lとなるように添加した。これを、20°C、暗所、密閉条件下にて静置した。MXの標準原液は酢酸エチルを溶媒としているため、一度酢酸エチルを乾固させた残さを蒸留水に溶解させたものを添加した。それぞれ、MX添加後1,2,5日後にMXの濃度を測定し残存率を求めた。

4.2.1.2 CSP800樹脂のコンディショニング¹⁾

Sep-Pak Plus(Long)CSP800（日本ウォーターズ）は、三菱化成製MCIゲルCSP800を内容積約2mLのカートリッジに充填してSep-Pak Plus(Long)CSP800として販売しているものである。

主な特徴として

- ・揮発性物質を含む様々な変異原物質が効率的に吸着できる。
- ・少量の試料でも十分な濃縮効果が得られる。

・短時間で処理でき、経時変化する試料にも対応できる。

・再現性の高い測定が可能。

・多孔性ポリマー、充填材量 420mg/cartridge、粒子径 75-150 μ m

などが挙げられる。CSP800 の化学構造を図 4-1 に示す。

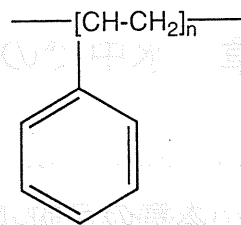


図 4-1 CSP800 樹脂の化学構造式

5 本直列につないだ CSP800 樹脂をコンセントレーター（日本ウォーターズ社製）にセットし以下の手順によりコンディショニングを行った。

1. 酢酸エチル 400ml を上向流・10mL/min で通液する。
2. エタノール 200ml を下向流・10mL/min で通液する。
3. 蒸留水 100ml を上向流・10mL/min で通液し、エタノールを除去する。
4. コンディショニングを終えたカートリッジの保存は蒸留水内で湿潤状態を保ち、暗所にて冷蔵保存した。

4.2.1.3 MX 濃度測定法

MX 濃度は試料水を酸性条件下で CSP800 樹脂を用いた固相抽出後、酢酸エチルで溶出し、誘導体化（TMS 化）し 2)、ガスクロマトグラフ質量分析計で測定した。以下に詳細を示す。

1. 試料水 1L を 5N 硫酸で $\text{pH}2 \pm 0.2$ 程度に調整した。
2. CSP800 樹脂に流量 15ml/min の上向流で通水させた。
3. マイクロシリンジポンプ（IC 3100、Kd Scientific 社製）を用いて、酢酸エチルを脱離溶媒に用いて流量 0.20mL/min で脱離を行った。脱離は酢酸エチルの比重が水より小さいので酢酸エチルが流下するように下向流で行った。滴下液面の変化により酢酸エチルが脱離し始めたことを確認してから 5mL 分を採取した。また、カートリッジ型 Sep-Pak は、デッドボリュームが少ない構造になっているため上下どちらからでも通液が可能である。Back flush 法とはこの特性を活かして試料注入方向とは逆方向で脱離液を通液するものである。回収物質が脱離するまでの移動距離が短く、少ない脱離液量で効率的に脱離が行えるという長所がある。本研究でも、こ

の Back flush 法を採用した。

4. 溶出した酢酸エチルを無水硫酸ナトリウムで脱水し、内部標準物質としてムコブROM酸標準液 (2,3-Dibromomale-aldehydic Acid、和光純薬) をムコブROM酸メチル量が $1 \mu\text{g}$ になるように加えた。

5. 酢酸エチルに窒素ガスを吹き付けて、約 $200 \mu\text{L}$ まで濃縮した。

6. TMS 化の為に、BSTFA+1%TMCS $100 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 30 分間放置し TMS 化させた。

7. 再度窒素ガスを吹き付け $200 \mu\text{L}$ まで濃縮し、これを検液とした。

検液はガスクロマトグラフ質量分析計を用いて測定した。ガスクロマトグラフ質量分析計の詳細な運転条件は付録に示す。

第 2 項 実験結果

測定結果を図 4-2 に示す。なお、実験期間中水中 pH に有意な変化は無かったことを確認している。図 4-2 に示したとおり、MX の水中での安定性は pH に大きく依存することがわかった。特に、MX は pH12 のアルカリ性の水中では加水分解の影響を強く受け、すみやかに分解することがわかる。水中 pH が 12 であれば、1 日

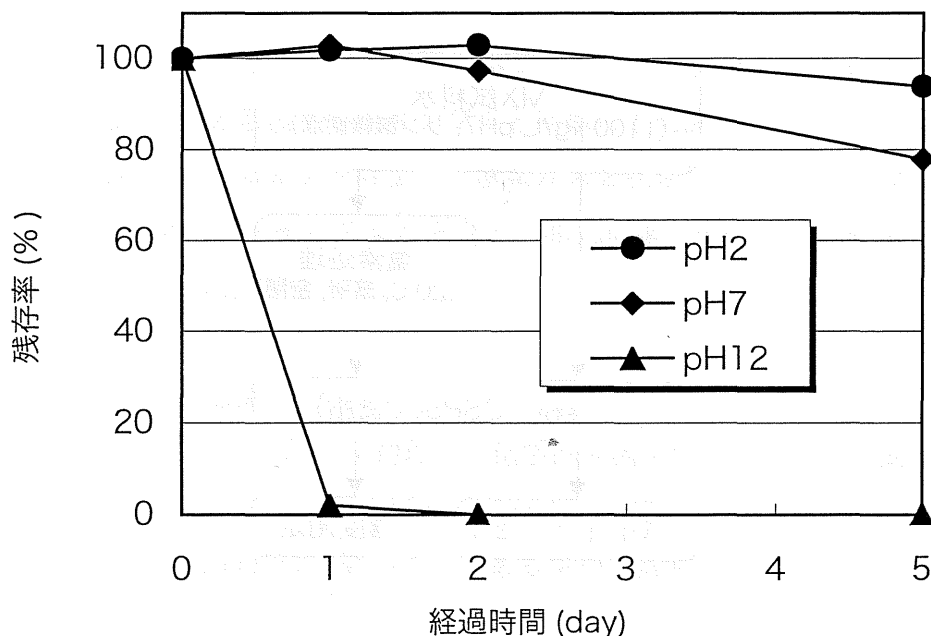


図 4-2 pH の異なる水中での MX の残存率

以内に MX はほとんど全てが加水分解を受け、2日後には消失した。MX がアルカリ域で不安定であることは既往の報告と一致する(3,4,5)。また、pH2,7 の酸性、中性領域においても MX は緩やかに加水分解することがわかった。5 日後の残存率は、pH2 中で 94%、pH7 中で 78%であった。

MX は pH が中性付近でも緩やかではあるが経時的に減少することが分かった。試料水は 20°C、暗所、密閉条件下にて静置してあったので、MX が減少したのは熱や光の影響は考えられず、加水分解によるものであると考えられる。

この結果から、飲料水中での MX の挙動を論じる際には pH 条件に注意を払わねばならないことが明らかになった。実際の飲料水の pH は 7 程度の中性であるので、今後の MX に関する検討は全て pH7 付近の中性域で論じることとする。

第 3 節 塩素との反応による MX の変化特性に関する実験

MX が水道水中に存在する限り、MX は残留塩素と反応する可能性がある。MX が残留塩素存在下でどのような変化特性を持つのか、濃度測定とバイオアッセイから検討を行った。実験の概略を図 4-3 に示す。

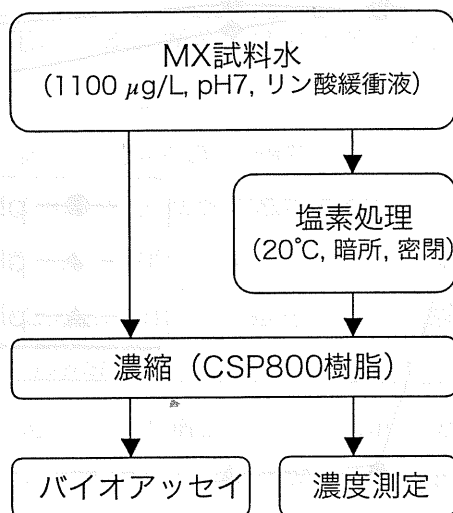


図 4-3 実験内容の概略

第1項 実験方法

4.3.1.1 試料水の調製

pH7、67mM リン酸緩衝液に MX 初期濃度を MX 濃度測定用には $1 \mu\text{g/L}$ 、バイオアッセイ用には $100 \mu\text{g/L}$ となるように MX を添加した。この試料をそのまま、もしくは次亜塩素酸ナトリウム水溶液を $2\text{mgCl}_2/\text{L}$ 、 $20\text{mg Cl}_2/\text{L}$ となるように添加し、 20°C 、暗所、密閉条件下にて静置した。所定の時間 (0, 0.25, 1, 2, 3, 5 日) が経過した後、pH と残留塩素濃度の測定、MX 濃度測定、染色体異常試験、形質転換試験を行った。残留塩素濃度は DPD 滴定法により測定した。

4.3.1.2 濃度測定方法

本章第2節と同様の方法で行った。試料水中に残留塩素が存在する場合にも、残留塩素を除去するための亜硫酸ナトリウムなどの還元剤は使用しなかった。

4.3.1.3 バイオアッセイ用試料調製方法

1. 試料水 5L を 5N 硫酸で $\text{pH}2 \pm 0.2$ 程度に調整した。
2. 並列に並べた CSP800 樹脂 2 本にそれぞれ 2.5L ずつ流量 $30\text{mL}/\text{min}$ の上向流で通水させた。
3. マイクロシリンジポンプを用いて、酢酸エチル 10mL 、流量 $0.30\text{mL}/\text{min}$ で脱離を行った。脱離は MX 濃度測定用サンプルと同様に下向流で行った。
4. 脱離した酢酸エチルは水分を除去し、窒素ガスを吹き付けて乾固させた。
5. DMSO (生化学用ジメチルスルホキシド、和光純薬) $400 \mu\text{L}$ に転溶させて、これをバイオアッセイ用試料とした。

4.3.1.4 染色体異常試験⁶⁾

DNA に突然変異を引き起こす物理的、化学的要因を変異原とよぶ。変異原性試験の一種である、Ames 試験などもイニシエーション活性の指標として広く用いられている。本研究では変異原性試験の一つである染色体異常試験を行った。本実験では、チャイニーズハムスター肺 (CHL) 細胞を用いた *in vitro* 試験を行った。

(1) 使用細胞

使用した細胞はチャイニーズハムスター肺細胞（チャイニーズハムスター雌新生仔肺由来繊維芽細胞株、大日本製薬）であり、染色体異常試験において最も一般的に用いられる細胞である。CHL細胞を必要に応じて凍結保存、解凍、継代を繰り返し用いた。

使用細胞をCHL細胞とする理由としては、

- ・染色体数が25本と少なく、染色体が大きいので染色体異常の観察に適している
- ・細胞倍化時間が約15～17時間と速く、短時間で実験が行える
- ・薬物に対する感受性が高い

などの理由が挙げられる。

CHL細胞の培養は、37°Cインキュベーター内で、培養ビンを密栓した閉鎖系で行った。

(2) 培養液

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM、日水製薬) 9.4g、牛胎児血清 100mL (Fetal Bovine Serum、大日本製薬)、グルタミン (日水製薬) 0.27g、炭酸水素ナトリウム 1.2g を蒸留水 (林純薬) に溶かし全量を 1L としたものを培養液とした。保存は冷暗所にて行った。

(3) 細胞継代方法

細胞増殖が死亡相に入ると細胞は急速に死滅し始め、生きた細胞がその破片を取り込み状態が悪くなることがある。死亡相に入る前に増殖のための空間を提供する操作が継代である。本研究では3～4日に1度の頻度で継代を行った。

1. トリプシン/EDTA2Na 溶液 (0.25%、GIBCO)、CMF-PBS (無機緩衝液)、培養液を 37°C に温める。
2. 培養ビン内の培養液を除去する。CMF-PBS 2mL で洗浄し固着力の弱った細胞を剥離させ、CMF-PBS を除去する。CMF-PBS 2mL でもう一度洗浄を繰り返す。
3. トリプシン/EDTA2Na 溶液 2mL を培養ビン内に加え、細胞表面を軽く共洗する。共洗いの後トリプシン/EDTA2Na 溶液を除去する。
4. トリプシン/EDTA2Na 溶液を 1.2mL 加え、細胞が剥離するまでよく振る。
5. 培養ビンに培養液を約 9mL 加え、トリプシン/EDTA2Na 溶液により剥がれた細

胞の塊をほぐすためによくピペッティングする。

6. トリプシン/EDTA2Na 溶液と培養液の混合液を遠心管に移し、1000rpm で5分間遠心分離する。
7. 遠心管内の上澄み液を取り除き、培養液を約8mL加える。丁寧にピペッティングする。
8. 培養液を11.0～11.5mLを加えた培養ビンに細胞浮遊液を0.5～1.0mL分注し培養液量が12mL、培養ビンの底面積が40cm²であるので培養液深さは3mmになる。培養ビンを軽く振り、培養液と細胞浮遊液を混合させインキュベーター内に入れる。

(4) 試料の投与

本実験では、最終溶媒にDMSOを使用したので、培養液中DMSO濃度がCHL細胞の増殖速度などに影響を及ぼさない範囲内で試料の投与量を定めなければいけない。この観点から、加えるDMSO量は培養液に対して0.5%とした。したがって、培養液6mlに対して0.03mlの試料を添加して実験を行った。なお、試料添加を行う前に0.20 μ mのフィルターにより除菌濾過を行った。

(5) 標本作製法

1. 継代1日後の対数増殖期にあるCHL細胞に対して無菌状態で検体を投与する。
2. 検体投与の22時間後に細胞周期を分裂期で止める作用のあるコルセミド(和光純薬)を培養液中最終濃度が0.2mg/Lになるように加え、インキュベーター内で2時間培養する。この処理により分裂細胞は中期で停止し、分裂中期像が増加する。この操作を含めてこれ以降の操作は無菌条件下で行う必要はない。
3. あらかじめトリプシン/EDTA2Na溶液(0.25%、GIBCO)とCMF-PBSを37°Cに温めておく。コルセミド投与から2時間経過後、培養液を除去する。
4. CMF-PBS 2mLで細胞表面を洗浄後、トリプシン/EDTA2Na溶液2mLで細胞表面を共洗する。
5. トリプシン/EDTA2Na溶液1mLで細胞をすべて剥離させ、遠心管に移す。細胞が剥離しにくい時には必要に応じてピペッティングを行う。
6. 遠心管にKCl低張液(0.075M)を7mL加え、軽くピペッティングし、ふたを

- して 1000rpm で 5 分間遠心分離する。
7. 上澄み液を除去し、KCl 低張液を 8mL 加え丁寧にピペッティングする。遠心管にふたをして、インキュベーター内に移し 37°C で 15 分から 20 分間低張処理を行う。低張処理により細胞は膨張し観察しやすくなる。
 8. 遠心管をインキュベーターから取り出し軽くピペッティングする。その後、カルノア液（メタノール：氷酢酸 = 3:1、）を 2mL 加え全量を 10mL とするが、カルノア液は遠心管の壁面を伝わらせるように加える。ピペッティングにより KCl 低張液とカルノア液をゆっくりと混合させる。カルノア液は細胞浮遊液と置換され、細胞構造を固定する。
 9. ふたをして 1000rpm で 5 分間遠心分離する。
 10. 上澄み液を除去した後、カルノア液を 8mL 加え丁寧にピペッティングする。再びふたをして 1000rpm で 5 分間遠心分離する。
 11. 10 の操作をさらに 2 回、合計 3 回行う。
 12. 上澄みを除去した後、細胞の量に応じてカルノア液を 0.5 ~ 1.5mL 加え、細胞を浮遊させる。
 13. 100% エタノール中に保存しておいたスライドガラスを自然乾燥させ、この上に細胞浮遊液を 2 ~ 3 滴落とし火炎乾燥させる。
 14. 火炎乾燥後、ギムザ液（メルクジャパン）を 0.05M リン酸緩衝液（pH6.9）で 1.5% に希釈したものをスライドガラス上に盛り、25 分間放置する。染色後水道水でスライドガラスを軽く洗浄し、自然乾燥させる。
 15. 乾燥後、オイキット液（O.Kindjer 社、ドイツ）をスライドガラス上に 1 滴垂らし、カバーガラスをかけ一晩放置する。

(6) 画像解析⁷⁾

光学顕微鏡（油浸レンズ、10 × 100 倍、MICROPHOT-FX、Nikon 社製）で、一つの染色体標本あたり 50 個のよく拡がった分裂中期像を検鏡するとともに、顕微鏡画像を PDMC Ie デジタル・マイクロスコープ・カメラ（ポラロイド）で、PC（DELL, Precision）上に取り込み、画像解析・計測ソフトの Image-Pro Plus Ver.4.0 で画像解析を行った。

画像解析することにより、

1) 染色体の分析に相当の熟練と時間を要すところを短時間に誰でも容易に染色体異常検出が可能となる

2) 試験結果を客観的に評価することができる
といった利点が挙げられる。

(7) ブランク値⁸⁾

本研究と同じ方法で染色体異常試験を行った場合のブランク値は、16 標本を画像解析した結果 5.1/ (異常染色体数 / 50 細胞) であった。本研究においてもこの値をブランク値としてもちいることにする。

4.3.1.5 形質転換試験^{9,10,11)}

プロモーション活性を検出する試験系としては代謝共同阻害試験などが広く知られている。本研究ではプロモーション活性試験の中でもっとも感度がよいとされる BALB 細胞をもちいた形質転換試験をおこなった。その方法について述べる。

(1) 使用細胞

マウス繊維芽細胞 BALB/3T3A31-1-1 (JCRB0601) は、ヒューマンサイエンス振興財団より入手したものを必要に応じて凍結保存、解凍、継代を繰り返し用いた。

使用細胞を BALB 細胞とする理由としては

- ・細胞が形質転換すると接触阻止の喪失、塩基性、細胞密度など正常細胞との区別がはっきりしている。

- ・薬物に対する感受性が強い
などの理由が挙げられる。

(2) 培養液

培養液は、染色体異常試験で用いた MEM 培養液と DMEM/F12 培養液の 2 種類を用いた。DMEM/F12 培養液は、DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F12(Ham)(1:1)Powder、GIBCO)、Insulin-Transferrin-Selenium-X (ITES、オリエンタル社) 10mL、ウシ胎児血清 20mL (Fetal Bovine Serum、大日本製薬)、炭酸水素ナトリウム 1.2g を蒸留水 (林純薬) に溶かし全

量を 1L としたものである。MEM 培養液は細胞の凍結、解凍、培養に使用した。DMEM/F12 培養液は検体の添加後に用いた。DMEM/F12 培養液を用いることで形質転換試験の高感度化および短期化が可能となる。

(3) 細胞凍結方法

細胞を培養し続けると、正常細胞は通常分裂寿命を持つので継代により分裂不能になること、細菌やウイルス感染の危険が伴うこと、細胞分裂不能にならなくとも染色体構成・ウイルス感受性・抗原性など変化を起こすことなどのデメリットが生じる。そのため、細胞を長期にわたり保存することが必要となる。また、試験時に細胞を解凍することで、同じ状態の細胞を使用することが出来る。ここで用いる培養液は MEM 培養液のみである。

1. トリプシン/EDTA2Na 溶液(0.25%、GIBCO)、CMF-PBS、培養液を 37°C に温める。
2. 培養ビン内の培養液を除去する。CMF-PBS 2mL で洗浄し固着力の弱った細胞を剥離させ、CMF-PBS は除去する。CMF-PBS 2mL でもう一度洗浄を繰り返す。
3. トリプシン/EDTA2Na 溶液 2mL を培養ビン内に加え、細胞表面を軽く共洗する。共洗い後、トリプシン/EDTA2Na 溶液を除去する。
4. トリプシン/EDTA2Na 溶液を 1.2mL 加え、細胞が剥離するまでよく振る。
5. 培養ビンに培養液を約 9mL 加え、トリプシン/EDTA2Na 溶液により剥がれた細胞の塊をほぐすためによくピペッティングする。
6. トリプシン/EDTA2Na 溶液と培養液の混合液を遠心管に移し、1000rpm で 5 分間遠心分離する。
7. 遠心管内の上澄み液を取り除き、除菌濾過を行った DMSO を 10% となるように調製した培養液を細胞濃度がおおよそ 10^6 個/mL となるように加え、丁寧にピペッティングする。
8. 細胞浮遊液を約 1mL ずつチューブに分注し、ふたをしっかりと閉める。
9. チューブを冷蔵庫内で冷やしておいたバイセル (日本フリーザ) に入れ、ふたをして -80°C のフリーザ (日本フリーザ) 内で保管する。

(4) 解凍方法

解凍に用いる培養液は MEM 培養液のみである。

1. チューブを 37°C のウォーターバス内で急速解凍し、チューブを 70% エタノールで消毒しクリーンベンチ内に入れる。
2. あらかじめ、遠沈管に培養液を 8mL 程度分注しておく。チューブ内の細胞浮遊液を遠沈管に移し、丁寧にピペティングする。1000rpm で 5 分間遠心分離する。
3. 遠心分離後、上澄み液を除去する。再び、培養液を 10mL 加えてピペティングし、1000rpm で 5 分間遠心分離する。この操作をもう一度繰り返す。合計で 3 回遠心分離を行い、細胞浮遊液内の DMSO を培養液中に残さないようにする。
4. 遠心分離後、上澄みを除去する。1mL の培養液を加えピペティングする。この細胞浮遊液を、あらかじめ 11mL の培養液を入れておいた培養ビンに移す。細胞は 5%CO₂ インキュベーター内で培養する。

(5) 培養液交換

1. CMF-PBS、MEM 培養液を 37°C に温める。
2. 培養ビン内の培養液を除去する。CMF-PBS 2mL で洗浄し固着力の弱った細胞を剥離させ、CMF-PBS は捨てる。CMF-PBS 2mL でもう一度洗浄を繰り返す。
3. 培養液を深さが 3mm になるように培養液を適量加え、5%CO₂ インキュベーター内に入れる。細胞の培養には底面積が 40cm² 培養ビンを用いたので、加える培養液は 12mL で培養液交換を行った。

(6) 細胞継代方法

染色体異常試験と同じ方法で行った。

(7) イニシエーション処理

形質転換試験は発がんにおけるプロモーション活性のスクリーニングの試験である。そのため、イニシエーション処理を薬品により行わなければならない。本研究ではイニシエーターとして 3-メチルコラントレン（和光純薬）を用いた。イニシエーション処理条件として、処理濃度は培養液中濃度を 0.5mg/L とし、処理時間は 2 日間とした。

(8) 試料添加方法

1. 継代1日後の細胞に対して、DMSOに溶解させた3-メチルコラントレンを培養液中濃度が0.5mg/Lとなるように添加し、2日間イニシエーション処理を行う。
2. イニシエーション処理を終えた細胞を、継代と同様の操作を行いベントキャップフラスコ（底面積25cm²）に播種する。このとき、ベントキャップフラスコ1つあたりの細胞数がおよそ 1×10^4 個となるようにした。また、培養液量は4mLとし、これ以降、培養液はDMEM/F12培養液を使用する。なお、細胞数の計数にはフックス・ロゼンダール型血球計算盤を用いた。
3. 細胞をベントキャップフラスコに播種後1日に、除菌濾過を行った試料を1.6 μ L添加する。
4. 3～5日に1度の割合で、培養液交換と試料添加を繰り返す。
5. 2週間培養を続けた後、標本作製する。

(9) 標本作製法

1. 培養液と試料を除去し、ウォーターバスで37°Cに温めたCMF-PBS2mLで細胞表面を丁寧に洗う。この操作をもう一度繰り返す。
2. メタノール4mLを添加し、5分間静置する。この操作により細胞構造を固定する。この操作をさらに2度繰り返し、合計3度メタノールを添加する。
3. 一晩自然乾燥させる。
4. メタノールが乾燥しているのを確認後、5% ギムザ液（pH6.9、1/20Mリン酸緩衝液で希釈）を4mL添加し、20分間放置する。ギムザ液がむら無く全体に広がるように注意する。
5. ギムザ液を除去した後に水道水で丁寧にすすぎ、自然乾燥させる。

(10) 画像解析

正常な細胞は接触阻止の機能を有している。しかし、この機能が失われると細胞は重なり合って増殖する。重なり合った細胞は染色すると単層に生育している細胞とは濃く染色される。この濃淡差を利用することで画像解析が可能となる。あらかじめ正常と異常の判別がされた標本があるわけではないので、画像解析上のある指標について、正常細胞（コントロール細胞）のコロニーの分布特性を分析し、その集団から外れたものを検出することにより、形質転換を起こしたコロニー

(フォーカス)を定量する方法を用いた。

以下に画像解析の方法を示す。

1. 細胞集団の画像を実体顕微鏡 (Leika MZ12) で 25 倍に拡大し、顕微鏡画像を PDMC Ie デジタル・マイクロスコープ・カメラ (ポラロイド) で、PC (DELL、Precision) 上に取り込み、画像解析・計測ソフトの Image-Pro Plus Ver.4.0 で以下の通り、画像解析を行う。
2. 画像に対し、モノクロ変換、平滑化処理、階調変換処理を行う。
3. 2 値化、微小粒子の除去を行い、コロニーの面積 (A) を測定する。
4. 高濃度部をグレイレベル 7 で 2 値化し、高濃度部の面積 (B) を測定する。
5. B/A を算出し、コントロール細胞群に属するかどうかの判定を行う。
6. 全コロニー数に対する形質転換を起こしたコロニー数 (フォーカス数) の割合を形質転換誘発率として用いることとする。

(11) ブランク値について⁸⁾

本研究と同じ BALB 細胞を解凍して用いた試験により、ブランク値について次のような結果が報告されている。

・二段階形質転換試験

ブランク試験として、0.5mg/L の 3-MC により 2 日間イニシエーション処理を行った BALB/3T3 細胞を、2 週間、DMEM/F12 培地を用いて培養した。フォーカスの判別に際しては画像解析を用いた。786 コロニーに対するフォーカス数 25 より、ブランク値は 0.0318 であった。

・非二段階形質転換試験

ブランク試験として、イニシエーション処理を行わなかった BALB/3T3 細胞を、2 週間、DMEM/F12 培地を用いて培養した。フォーカスの判別に際しては画像解析を用いた。460 コロニーに対するフォーカス数 5 より、ブランク値は 0.0109 であった。

第2項 実験結果

実験期間中、いずれのケースも水中 pH は 7.0 ~ 7.4 程度であった。また、残留塩素濃度については図 4-4,5 に示す。塩素を添加した系では、残留塩素が 0 になる

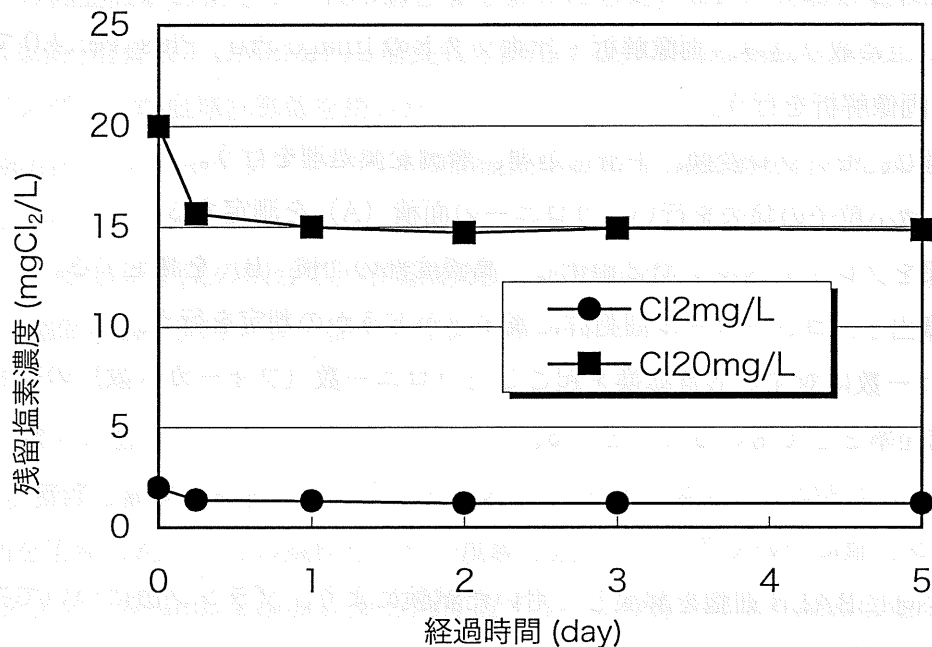


図 4-4 残留塩素濃度の変化 (MX 濃度測定用試料水)

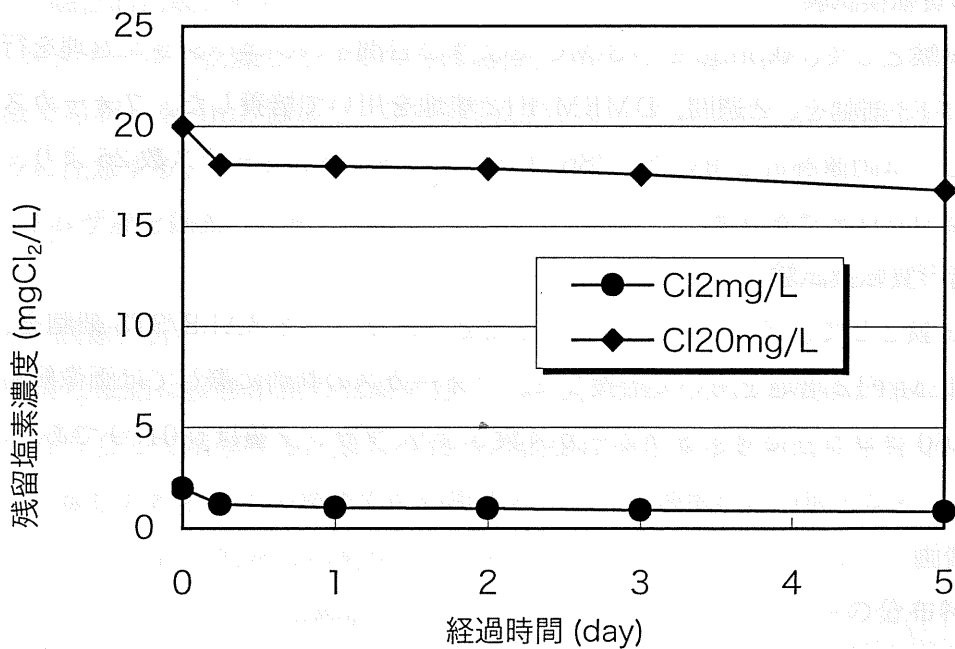


図 4-5 残留塩素濃度の変化 (バイオアッセイ用試料水)

こともなく、MX に対して常に大過剰に存在していたことが確認できる。

まず、図 4-6 に MX の濃度測定結果を示す。第 1 項で MX が中性でも加水分解の影響を受けることが明らかになったが、塩素を添加することで MX の分解が促進されていることがわかる。5 日経過後の MX 残存率は塩素未処理の場合も塩素処理濃度 $2\text{mgCl}_2/\text{L}$ の場合も 80% 程度で大きな差は見られない。しかし、塩素処理濃度 $20\text{mgCl}_2/\text{L}$ の場合、5 日後の残存率は 16% であり、塩素処理による分解を強く受けているといえる。

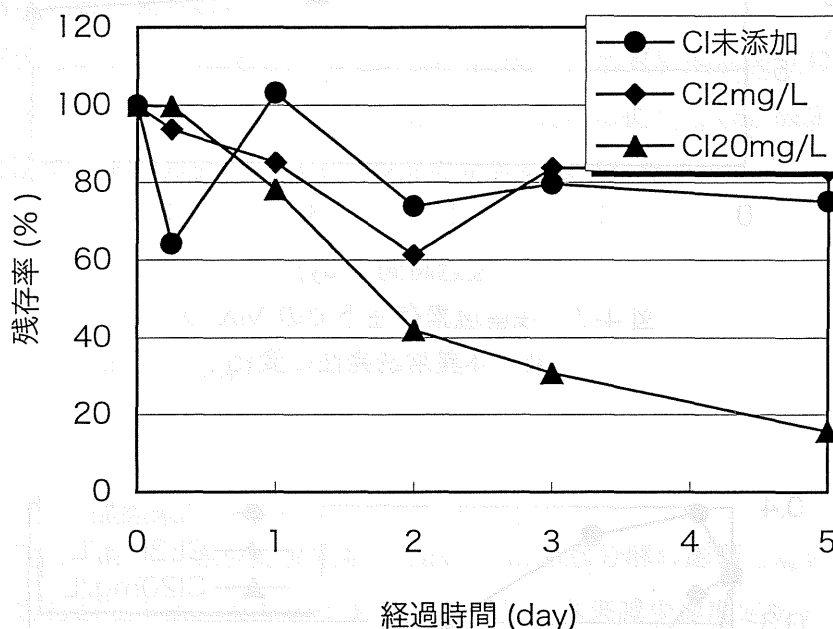


図 4-6 残留塩素存在下での MX の残存率

つぎに、図 4-7 に染色体異常試験結果を示す。染色体異常誘発性の変化も、ほぼ MX の濃度に対応し、経時的に減少した。また、塩素未処理の場合と塩素処理濃度 $2\text{mgCl}_2/\text{L}$ の場合では大差ないが、塩素処理濃度 $20\text{mgCl}_2/\text{L}$ の場合には差が顕著に見られる点も濃度変化とよく対応している。

図 4-8 に形質転換試験結果を示す。形質転換誘発性もやはり MX 濃度によく対応した結果となったが、塩素未添加と塩素 $2\text{mgCl}_2/\text{L}$ 注入ではほとんど差がみられない結果であった。塩素を $20\text{mgCl}_2/\text{L}$ 注入しても、MX 濃度や染色体異常誘発性ほどの差はみられなかった。

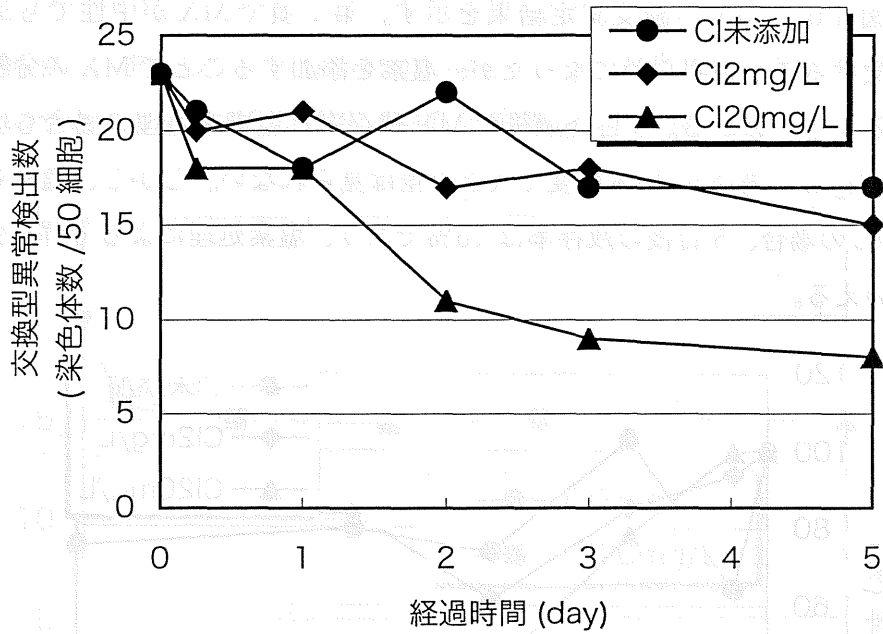


図 4-7 残留塩素存在下でのMXの染色体異常誘発性の変化

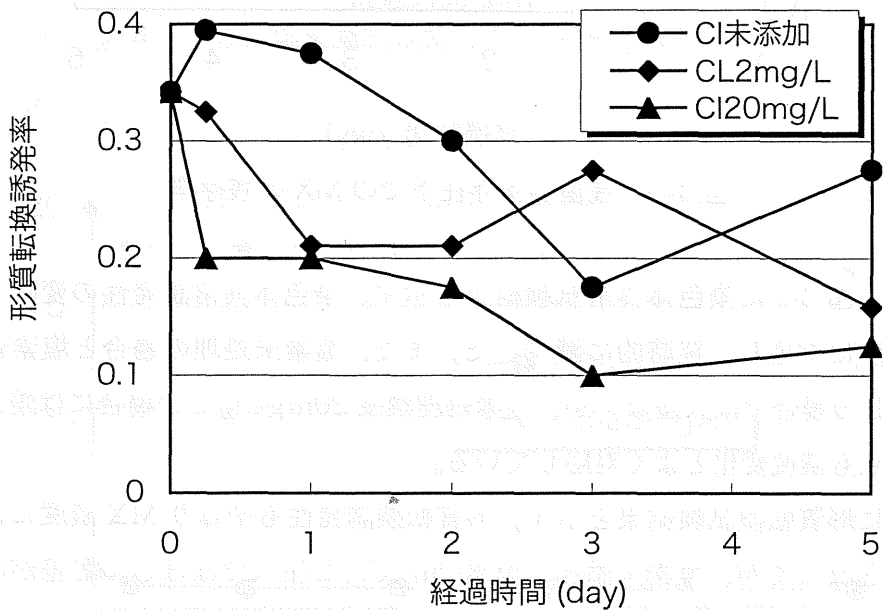


図 4-8 残留塩素存在下でのMXの形質転換誘発性の変化

第4節 考察

第2節においてMXの水中での安定性はpHに強く依存し、MXは加水分解の影響を受けることがわかった。MXはpH7の中性域でも加水分解を受け経時的に減少した。

第3節では、MXの濃度、染色体異常誘発性、形質転換誘発性が十分な残留塩素の存在下では経時的に減少することがわかった。さらに、残留塩素濃度が大きいほど減少傾向は顕著に見られた。

残留塩素存在下でMX濃度、染色体異常誘発性、形質転換誘発性はいずれのケースにおいても減少したので、MXの分解は一次反応に従うものと仮定し、以下の反応速度に関するモデル式を用いて減少速度定数を算出した。

$$\frac{dC}{dt} = KC$$

C: MX濃度 ($\mu\text{g/L}$)

t: 反応時間 (day)

K: 減少速度定数 (day^{-1})

(4-1)

ここで定義したK: 減少速度定数 (day^{-1})は加水分解の影響と塩素による分解の影響などをあわせて表したものである。ただし、本来減少速度定数Kは残留塩素濃度により値は変化するが、ここではMXに対して残留塩素が大過剰であることを確認しているので、残留塩素の変化は減少速度定数Kの中に含まれるものとしている。MXの分解がすべて加水分解と塩素による分解の2つによって説明でき、K: 減少速度定数 (day^{-1})はそれぞれの和で表せると仮定すると、以下の式が成り立つ。

$$K = K_1 + K_2$$

K: 減少速度定数 (day^{-1})

K_1 : 塩素による減少速度定数 (day^{-1})

K_2 : 加水分解による減少速度定数 (day^{-1})

(4-2)

本来、加水分解による減少は酸性、中性、アルカリ性プロセスの和である。しかし、通常の水道水の pH が 7 であること、塩素の反応性が pH の影響を受けることを考慮して、以降の考察は pH7 を前提条件とし、 K_2 により加水分解の影響を一括で考察できるものとする。まず、塩素未添加系の結果から加水分解による減少速度定数 $K_2=0.0275$ (day^{-1}) が得られる。

MX を $2,20\text{mgCl}_2/\text{L}$ で塩素処理したときの減少速度定数 K はそれぞれ、 0.0330 、 0.3906 (day^{-1}) となる。減少速度定数 K は塩素処理と加水分解の影響の和であらわせると仮定している。したがって、加水分解による減少速度定数 $K_2=0.0275$ (day^{-1}) を減じて、塩素濃度が $2,20\text{mgCl}_2/\text{L}$ の時、それぞれの塩素による減少速度定数 K_1 は 0.0055 、 0.3631 (day^{-1}) となる。

通常の水道水の pH は 7、残留塩素濃度は $0.1 \sim 1.0\text{mgCl}_2/\text{L}$ である。残留塩素濃度が通常の水道水に比べて $1\text{mgCl}_2/\text{L}$ 程度大きいのが、本実験での塩素注入量 $2\text{mgCl}_2/\text{L}$ がほぼ実際の水道水の条件に対応している。このとき、減少速度定数 K は 0.0330 (day^{-1}) であった。このうち、加水分解によって説明できる $K_2=0.0275$ (day^{-1}) であり、塩素による分解により説明できる K_1 は 0.0055 (day^{-1}) であった。 K_2 は K_1 のおよそ 5 倍である。したがって、実際の水道水の条件であれば、MX が分解する主たる要因は残留塩素による分解ではなく、加水分解であると推定できる。

同様に、式 4-1 の C を染色体異常誘発性 (染色体数/50 細胞) のブランク補正を行ったものに置き換えて、染色体異常誘発性についても減少速度定数を求めると、加水分解による減少速度定数 $K_2=0.0703$ (day^{-1}) となる。この値は濃度のそれに比べておよそ 2.6 倍である。また、MX を $2,20\text{mgCl}_2/\text{L}$ で塩素処理したとき、染色体異常誘発性の減少速度定数 K はそれぞれ、 0.1040 、 0.3741 (day^{-1}) となる。したがって、塩素による減少速度定数 K_1 はそれぞれ、 0.0337 、 0.3038 (day^{-1}) となる。染色体異常誘発性についても、水道水の条件下では加水分解の影響が塩素分解をおよそ 2.1 倍卓越すると推定できる。

形質転換誘発性についても、式 4-1 を用いて減少速度定数を求めると、塩素未添加、塩素 $2\text{mgCl}_2/\text{L}$ 注入、塩素 $20\text{mgCl}_2/\text{L}$ 注入の順に、 0.1109 (day^{-1})、 0.1437 (day^{-1})、 0.2242 (day^{-1}) となった。形質転換誘発性については加水分解による減少速度定数 $K_2=0.1109$ (day^{-1}) であり、濃度や染色体異常誘発性に比べて大きい。

減少速度定数を塩素添加量ごとにまとめたものを図 4-9 に示す。MX 濃度、染色

体異常誘発性、形質転換誘発性のいずれも塩素を添加するほど減少しやすくなったが、その速度の大きくなる程度は必ずしも同じではない。これは、バイオアッセイそのものが精度に限界のある試験であることが関連していると思われる。

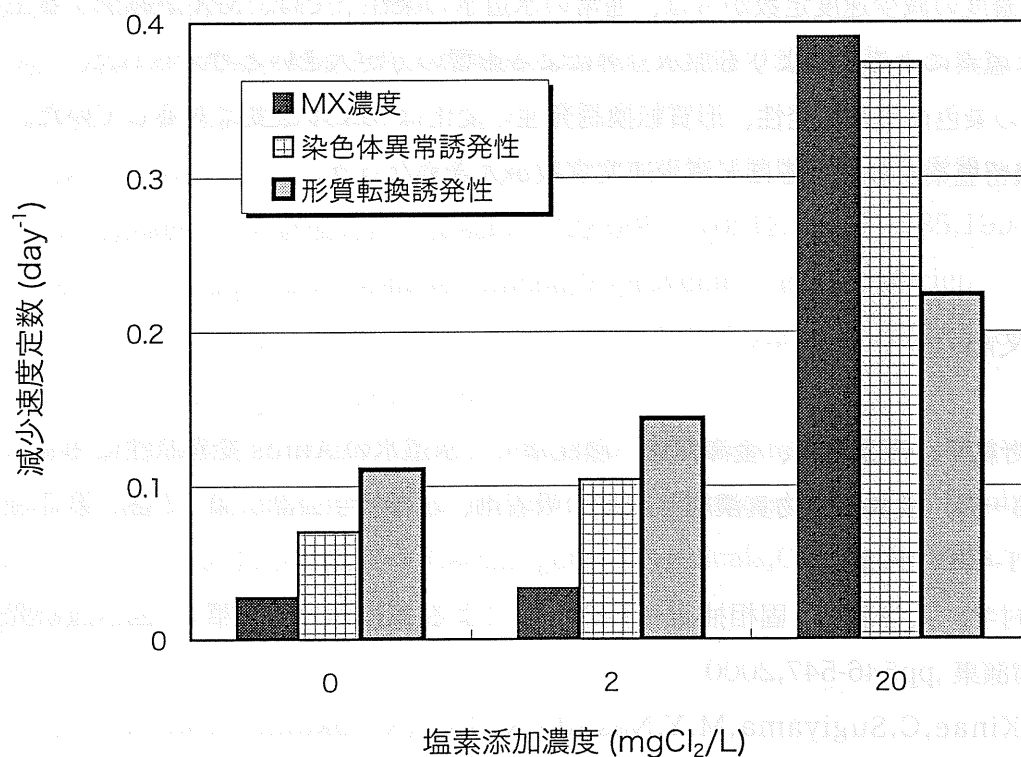


図 4-9 塩素処理における減少速度定数

第 5 節 結語

本章では、水道水中での強変異原物質 MX の特性に関する検討を行った。検討内容は、pH の異なる水中での挙動、残留塩素と接触時の挙動である。以下に本章で得られた知見をまとめる。

- ・MX の水中での安定性は pH に大きく依存し、pH が大きくなるにつれて MX の分解は促進された。
- ・MX は中性の水中でも加水分解を受け、徐々に減少した。

- ・MX はアルカリ領域では極めて不安定であった。
- ・塩素処理水中で、塩素注入量の増大に伴ってMXの安定性は低下し、減少速度定数も大きくなった。
- ・MX濃度の減少速度定数からは、通常の水道水の条件下では、MXが減少する主な要因は塩素による分解よりも加水分解による影響の方が大きいと考えられた。
- ・MXの染色体異常誘発性、形質転換誘発性の変化はMXの濃度に対応していた。また、残留塩素が多くなるほど減少速度定数が大きくなった。

参考文献

1. 浦野紘平、高梨啓和、金澤伸浩、藤江幸一：水道水のAmes変異原性に関する研究 第一報 変異原生物質濃縮回収用の吸着剤、水環境学会誌 第17巻 第7号 pp.451-460、1994
2. 奥村学、大谷恭靖：固相抽出—GC/MSによるMXの分析、第51回水道研究発表会講演集 ,pp546-547,2000
3. N.Kinae,C.Sugiyama,M.Y.Nasuda,K.Goto,K.Tokumoto,M.Furuogi and K.Shiomi,Seasonal Variation and Stability of Chlorinated Organic Mutagens in drinking water,Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants in Water,1991
4. Bjarne Holmbom,Ronald H. Voss,Richard D.Mortimer, and Alfred Wong,Fractionation ,Isolation and Characterization Of Ames Mutagenic Compounds in Kraft Chlorination Effluents, Environmental Science & Technolgy,Vol.18,No.5,pp333-337,1984
5. Jophn R.Meier,Richard B.Knohl,W.Emile Coleman,H. Paul Ringhand,Jean W. Munch,William H. Kaylor,Robert P.Streicher and Frederick C. Kopfler,Studies on the potent bacterial mutagen, 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone:aqueous atability ,XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solution,Mutation Research,Vol.189,pp363-373,1987

6. 伊藤禎彦、住友恒、土木学会衛生工学委員会編：環境微生物工学研究法,pp.379-382,1993、技報堂出版
7. 住友恒、伊藤禎彦：画像解析を導入した染色体異常試験法の開発、衛生工学研究論文集,Vol.26,pp.107-115,1990
8. 池田大助：哺乳動物細胞を用いた塩素処理水の安全性の変化過程評価に関する研究、京都大学修士論文、1999
9. 住友恒、伊藤禎彦、山下基、池田大助：マウス繊維芽細胞を用いる形質転換試験結果の画像解析による評価方法、環境衛生工学研究、Vol.12,pp.181-185,1998
10. Toshiyuki Tutiya and Makoto Umeda,Improvement in the efficiency of the in vitro transformation assay method using BALB/3T3 A31-1-1 cells,Carcinogenesis,Vol.16, No.8,pp.1887-1894,1995
11. IARC/NCI/EPA Working Group,Cellular and Molecular Mechanisms of Cell Transformation and Standardization of Transformation Assays of Established Cell Lines for the Prediction of Carcinogenic Chemicals,Cancer Reserch,Vol.45, pp.2395-2399,1985

第5章 バイオアッセイからみた配水過程におけるMXの指標性に関する実験

第1節 本章の目的

浄水場から給水末端に至る給配水過程において、トリハロメタンやハロ酢酸の濃度は増大する。しかし、発がんに関する有害性はこの傾向とは反対に減少すると推定されている^{1,2)}。すなわち、給配水過程を流下する水道水の有害性を比較する目的にトリハロメタンやハロ酢酸は不适当であると思われる。本章では強変異原物質MXに着目し、配水過程でのMXの指標性とその適応条件について検討する。

配水過程を流下する水道水を想定し、琵琶湖水を塩素処理した後の経時変化について実験をおこなう。MXの指標としての妥当性を速度変化定数から検証する。また、MXの指標としての適応条件についても残留塩素濃度条件から検討する。

ただし、本研究で用いたバイオアッセイは発がんに関連する有害性をin vitro試験で検出するものであり、結果は必ずしも人体への影響を正確に把握しうるものではない。消毒副生成物の指標性についても結論づけるのではなく、あくまで推定する範囲にとどまることに注意しなければならない。しかし、本章で行うような実験をin vivo試験で行うのは極めて難しく、バイオアッセイ結果を消毒副生成物との関係から水質管理に活用する1つの方法として検討する。

第2節 配水過程を想定した実験

水道水の給配水過程を想定した実験をおこなった。琵琶湖水を対象として、塩素処理後のバイオアッセイ結果とMX濃度の経時変化を測定し、MXの指標としての妥当性について速度変化定数から検証した。実験の概略を図5-1に示す。

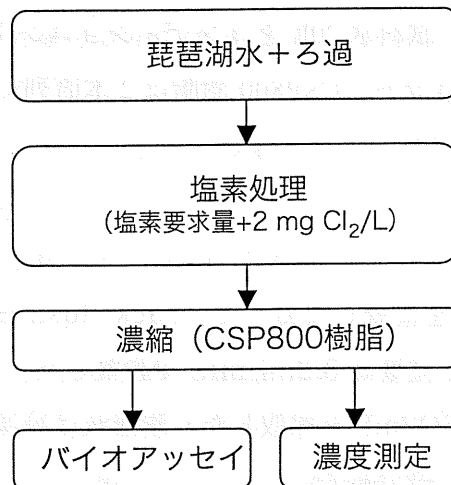


図 5-1 実験の概略

第 1 項 実験方法

5.2.1.1 実験原水について

2001 年 11 月 29 日に琵琶湖南湖にて琵琶湖水を採水し、これを実験原水とした。採水後はすみやかに実験室に運び、1.0 μm メンブランフィルター (ADVANTEC) でろ過して SS 成分を除去した。

ろ過した実験原水の TOC (全有機炭素濃度) は TOC 計 (TOC-5000A、島津製作所) により測定した結果 1.9mgC/L であった。

5.2.1.2 塩素処理

初期残留塩素濃度が 2.0mgCl₂/L 程度となるように次亜塩素酸ナトリウム水溶液を添加した。塩素要求量は約 1.8mgCl₂/L であり、塩素注入量は 3.8mgCl₂/L であった。塩素処理後は 20°C、暗所、密閉条件下で所定の時間静置した。残留塩素濃度は DPD 滴定法により測定した。

5.2.1.3 バイオアッセイ用試料調製³⁾

(1) 吸着

試料水中の毒性物質の解離を抑制するために、試料水の pH を塩酸で 2 程度に調整した。試料水中には残留塩素が存在するが、亜硫酸ナトリウムなどの還元剤

を添加すると塩素副生成物が残留塩素より先に還元されることがあるので残留塩素は消去しなかった³⁾。試料水 20L をコンディショニング済み CSP800 樹脂 4 本に流量 50mL/min で吸着させた。CSP800 樹脂は 2 本直列に接続したものを 2 組並列に並べて吸着させた。

(2) 脱離

脱離は CSP800 樹脂を接続しなおして、back flush 法によりおこなった。脱離液には DMSO を用い、流量は 0.2ml/min で脱離した。DMSO が溶出し始めたことを確認してから DMSO 2mL を採取した。脱離液は冷凍保存した。なお、濃縮倍率は体積比で 1.0×10^4 倍である。

5.2.1.4 染色体異常試験

染色体異常試験は 4 章 3 節と同様の方法でおこなった。培養液への DMSO の添加量は培地 6mL に対して $30 \mu\text{L}$ としたので、培養液中 DMSO 濃度は 0.5% である。

5.2.1.5 形質転換試験・非二段階形質転換試験

形質転換試験は 4 章 3 節と同様の方法でおこなった。培養液への DMSO の添加量は培地 4mL に対して $10 \mu\text{L}$ としたので、培養液中 DMSO 濃度は 0.25% である。

非二段階形質転換試験とは、形質転換試験のイニシエーション処理の段階からサンプルを投与し、イニシエーション・プロモーション両活性をあわせて検出する試験である。したがって、試験方法は形質転換試験においてイニシエーション処理にサンプルをもちいるだけでよい。非二段階形質転換試験については、1999 年 11 月 24 日に琵琶湖で採取した表流水を用いて同様の試験をおこなった。この琵琶湖水の TOC は 2.7mg/L であった。

5.2.1.6 MX 濃度測定方法

MX 濃度は試料水を塩酸酸性条件下で CSP800 樹脂に吸着させ、酢酸エチルで溶出し、誘導体化 (TMS 化) し、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて定量した。以下にその詳細を示す。

1. 試料水 20L の pH を塩酸で 2 程度に調整した。これを CSP800 樹脂 4 本に吸着させた。吸着方法は流量を 30mL/min でおこなった点以外はバイオアッセイ用試料調製時と同様である。
2. CSP800 樹脂を接続し直し、樹脂に吸着された夾雑物を除去するために、ヘキサン 8ml で樹脂を洗浄した。
3. back flush 法により酢酸エチル 15ml で溶出した。下向流 0.3mL/min で溶出した。
4. 溶出した酢酸エチルは Sep-Pak Silica に通液し脱水、洗浄した。なお、この Sep-Pak Silica はあらかじめ酢酸エチル 10ml でコンディショニングをおこなったものを使用した。さらに、酢酸エチルは無水硫酸ナトリウムで脱水した。
5. 酢酸エチルに内部標準物質として MBA (ムコブロム酸) 100ng を添加した。
6. 酢酸エチルに窒素ガスを吹き付けて、約 200 μ L まで濃縮した。
7. TMS 化の為に、BSTFA+1%TMCS100 μ L を添加し、室温で 30 分間放置し TMS 化させた。
8. 再度窒素ガスを吹き付け 200 μ L まで濃縮し、これを検液とした。
検液はガスクロマトグラフ質量分析計を用いて測定した。ガスクロマトグラフ質量分析計の詳細な運転条件は付録に示す。

第 2 項 実験結果

実験期間中の pH と残留塩素濃度の変化を図 5-2 に示す。残留塩素は塩素処理後 4 日で 0.8mgCl₂/L であり、pH は 7.4 ~ 7.8 程度であった。残留塩素濃度は初期の注入量が塩素要求量に 2mgCl₂/L 加えているので、実際の水道中のそれよりもやや大きい程度である。

琵琶湖水塩素処理水の染色体異常誘発性の経時変化を図 5-3 に示す。なお、経過時間 0day とは塩素を添加せず、琵琶湖水の実験結果である。図 5-3 に示したとおり、染色体異常誘発性は全体としては塩素処理後、生成しやがて低減する傾向をみせた。染色体異常誘発性が最大となり低減過程に移行するのは塩素注入後少なくとも 1 日以内である。したがって、水道の給配水過程においては染色体異常誘発性は低減し続けるものと考えられる。

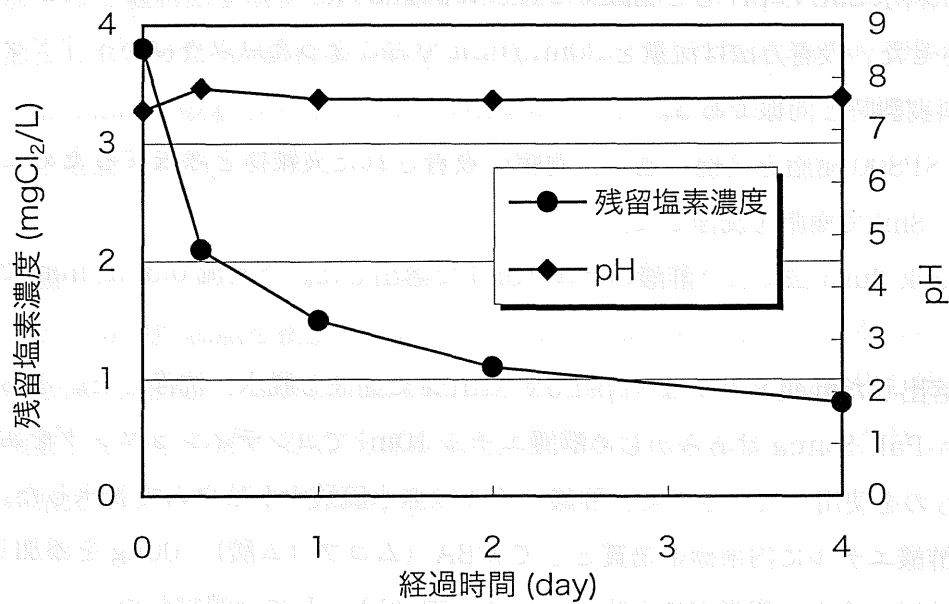


図 5-2 残留塩素・pH の変化

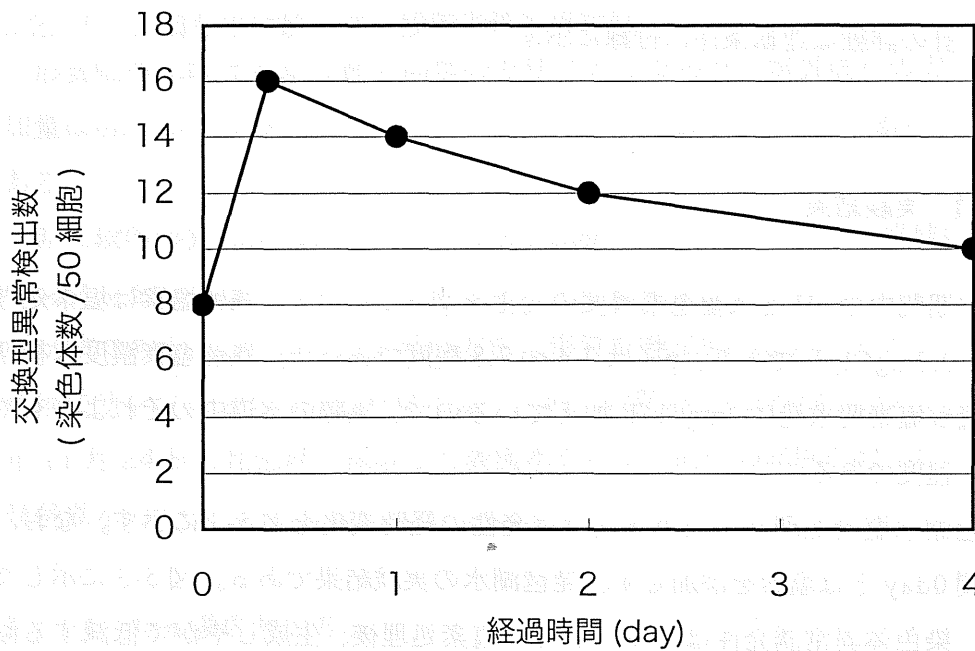


図 5-3 染色体異常試験結果

形質転換誘発性は染色体異常誘発性とは反対に、経時的に緩やかな増加傾向を示した(図 5-4)。非二段階形質転換試験の結果を図 5-5 に示す。非二段階形質転換誘発性の変化傾向はほぼ染色体異常誘発性と同じであった。

MX の測定結果を図 5-6 に示す。琵琶湖水中からは MX は検出されなかった。

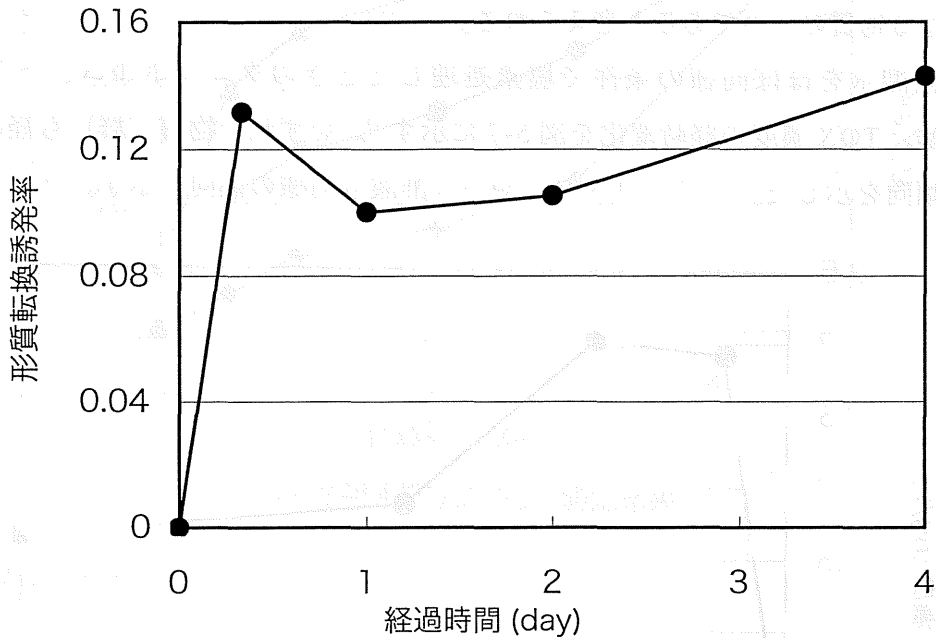


図 5-4 形質転換試験結果

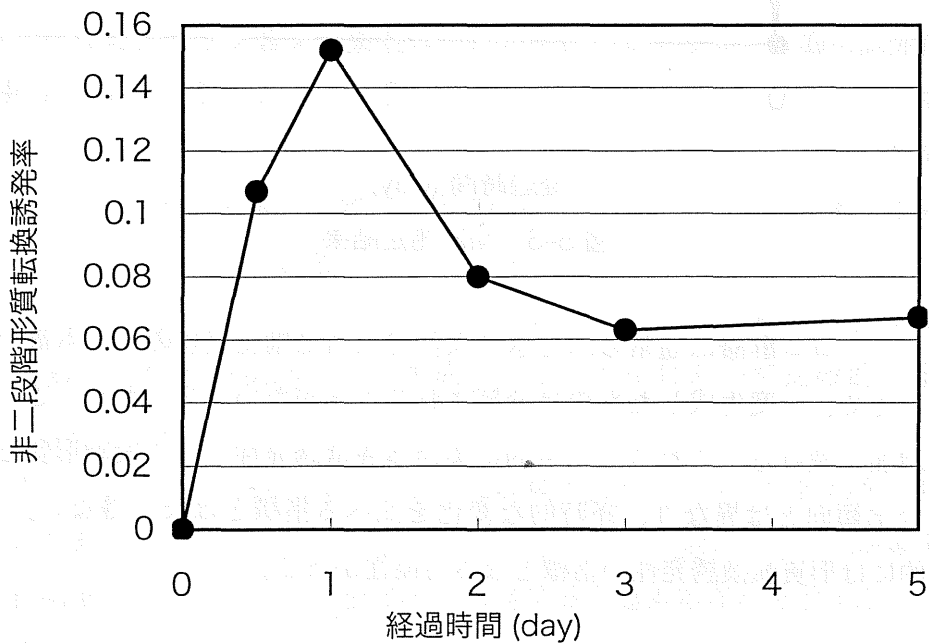


図 5-5 非二段階形質転換試験結果

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

琵琶湖水をほぼ同様の条件で塩素処理したときのクロロホルム、トリクロロ酢酸、TOX 濃度の経時変化を図 5-7 に示す¹⁾。いずれの物質 (群) も経時的に増加傾向を示した。トリハロメタンやハロ酢酸も同様の傾向を示す。クロロホル

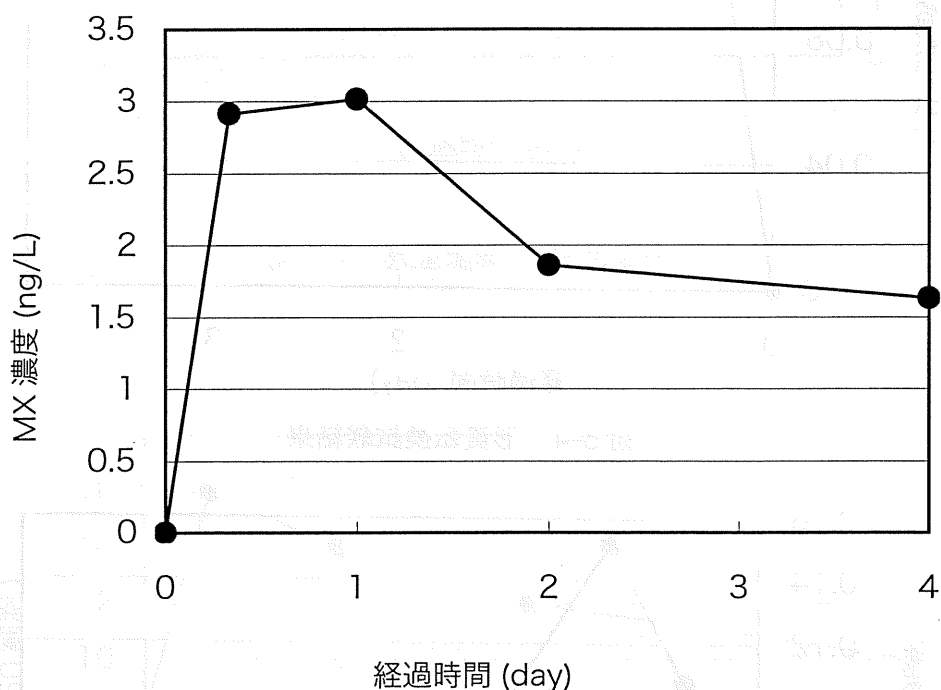


図 5-6 MX 測定結果

ムやトリクロロ酢酸は通常の水道水の条件では消毒副生成物の中でも最終生成物であるため、一度生成したものは分解されることがない。そのため、これらの濃度は増加し続ける。これらは定性的に染色体異常誘発性・非二段階形質転換誘発性の変化傾向とは異なり、経時的な変化を比べる指標とはなり得ない。しかし、定性的には形質転換誘発性の指標となる可能性がある。

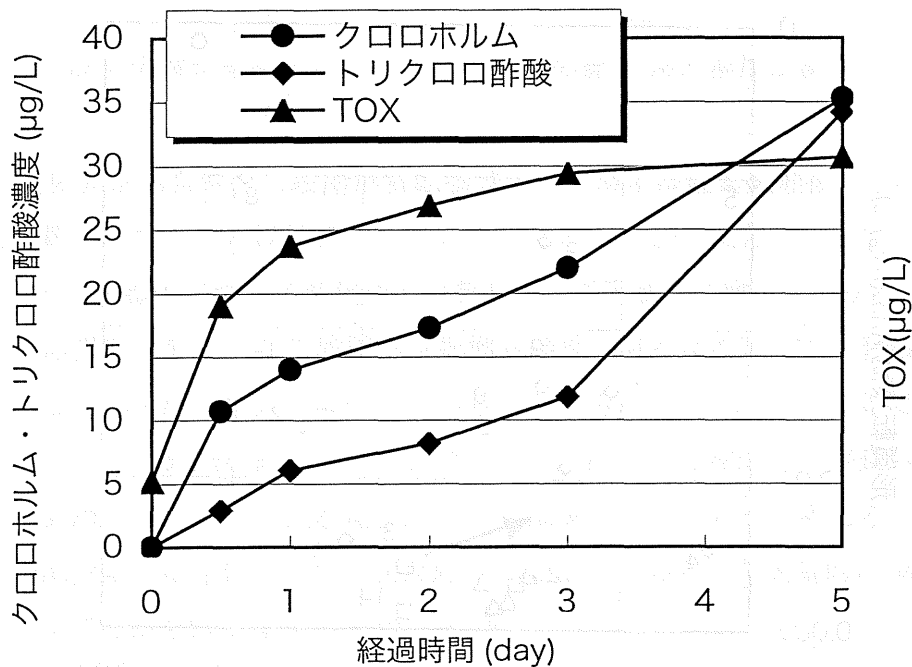


図 5-7 THM,TCAA,TOX 測定結果

第 3 項 考察

染色体異常誘発性が塩素処理後増大したのは、琵琶湖水中のフミン物質中に染色体異常誘発性前駆物質が存在し、これらが塩素と反応したためと考えられる。また、伊藤らはフミン質を塩素処理したときに生成する染色体異常誘発性物質は加水分解に対して不安定であることを報告している。さらにフミン質は塩素により酸化、塩素の付加、分解などの反応を受ける。したがって、一度琵琶湖水中に生成した染色体異常誘発性物質は安定ではなく、加水分解などの影響を受けて徐々に低減したものと考えられる。

形質転換誘発性は塩素処理後増大し続けた。これは形質転換誘発性物質が水中有機物と塩素の反応により生成し、かつ水中において比較的安定であるためと推測できる。

図 5-8 は図 2-2 上に琵琶湖水の塩素処理後 8 時間から 4 日の変化をプロットしたものである。図 5-8 では TOC がすべて回収できたと仮定し、単位炭素あたりの有害性強度をプロットした。図 5-8 中の琵琶湖水塩素処理水を示す△印と他の化学物質と比較すると、琵琶湖水は形質転換誘発性よりも染色体異常誘発性の方が強いことがわかる。経時的には図 5-8 上で左上方向に移動していく、これは染色

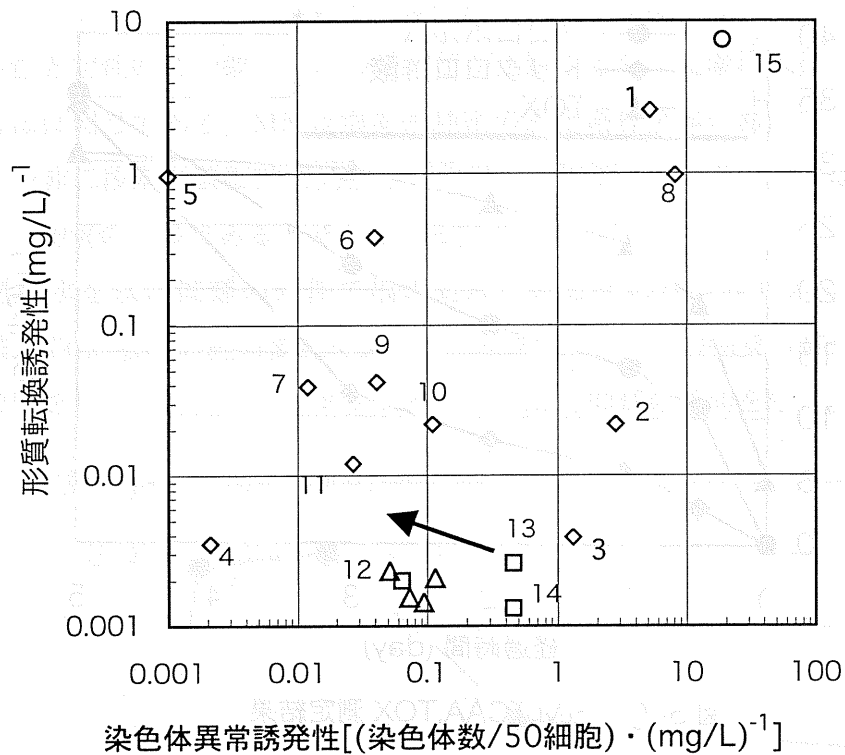


図 5-8 染色体異常誘発性・形質転換誘発性の相対的变化

△：琵琶湖水塩素処理水（単位炭素あたり） →は時間変化の傾向
 1:4-NQO 2:ケルセチン 3:5-フルオロウラシル 4:硝酸ナトリウム 5:TPA
 6:メゼレイン 7:BHA 8:3-メチルコラントレン 9:テオフィリン 10:尿素
 11:カフェイン 12:クロロホルム 13:ジクロロ酢酸 14:トリクロロ酢酸
 15:MX

体異常誘発性が低下し、形質転換誘発性が増大するためである。しかし、それにも関わらず非二段階形質転換誘発性が減少傾向を示したのは塩素処理水の有害性としては染色体異常誘発性が卓越するため、これに追随したものと推定できる。以上のことから、塩素処理水の発がんに関する有害性は塩素処理後速やかに生成し、給配水過程においては低減し続けると考えられる。

MX濃度は塩素処理後生成し、やがて減少した。MXが塩素注入後すぐに生成するのは、MX前駆物質が塩素と反応してMXが生成したためであると考えられる。また、MXがやがて減少に転じるのは4章で取り上げた加水分解や塩素による分解が原因であると考えられる。

MX濃度が減少している間も、残留塩素が存在することなどから、MXは絶え

ず生成しているものと考えられる。しかし、塩素処理後1日あたりを境にして、MXの生成を分解が卓越するようになり、その結果MX濃度が減少したものと推測できる。

染色体異常誘発性、二段階形質転換誘発性、MXは塩素処理後に生成し、1日以内に最大となりその後低減するという非常によく似た変化傾向を示した。そこで、MXの指標性について変化速度定数を用いて定量的に検討してみる。

染色体異常誘発性、非二段階形質転換誘発性、MXは本来、水中有機物と塩素の複雑な反応を経て増大・減少していると考えられる。しかし、ここでは増大傾向が続くのは塩素処理後1日程度までであり、減少する期間の方が長いことから水道の実用上はいずれも配水過程において減少するものとして考える。さらにこれらの減少傾向は全体として一次反応にしたがうものとして定量的にMXの指標性について考察をおこなう。

MXの減少速度定数を次の式から求める。

ただし、ここではMXの減少を想定しているので対象は減少傾向がみられる1日から4日の間とした。MXの減少速度定数は $0.19 \text{ (day}^{-1}\text{)}$ であった。また、Cを

$$\frac{dC}{dt} = KC$$

C: MX濃度 ($\mu\text{g/L}$) (5-1)

t: 反応時間 (day)

K: 減少速度定数 (day^{-1})

染色体異常誘発性に置きかえて染色体異常誘発性の減少速度定数を求めると $0.19 \text{ (day}^{-1}\text{)}$ となる。Cを非二段階形質転換誘発性に置きかえて非二段階形質転換誘発性の減少速度定数を求めると $0.18 \text{ (day}^{-1}\text{)}$ となる。これらの速度定数もMXにあわせて1日目から4日目もしくは5日目の間における結果である。

4章4節でもとめたMXの減少速度定数と比較してみる。琵琶湖水のpHはおおよそ7.4~7.8で推移し、残留塩素濃度についても塩素要求量+ $2\text{mgCl}_2/\text{L}$ で処理をおこなったので、第4章の実験条件としてはpH7、塩素注入量 $2\text{mgCl}_2/\text{L}$ がほぼ同じ条件であるといえる。このときのMXの減少速度定数は $0.033 \text{ (day}^{-1}\text{)}$ であり、琵琶湖水中の $0.19 \text{ (day}^{-1}\text{)}$ と比較すると小さい。琵琶水を塩素処理した場合、MX濃度が減少している間もMXは生成し続けると考えられるので減少速度定数は純

水系の分解の場合よりも小さくなると考えられたが、加水分解や塩素分解以外の要素がMXに寄与したものと考えられる。

次に染色体異常誘発性の減少速度定数について、伊藤らが報告している試薬フミン酸との結果と比較してみる。伊藤らは試薬フミン酸溶液をもちいて、フミン酸塩素処理水の染色体異常誘発性の経時変化を測定している。だが、TOCが1080mg/L、添加塩素濃度は2000mgCl₂/Lと、本研究とは実験条件が大きく異なる。低減過程においても、本研究では残留塩素がCl/TOCで0.42以上は常に存在していたが、伊藤らの実験系ではCl/TOCが0.09程度である点も異なる。これらをもまえた上で、減少速度定数を比較してみると、琵琶湖水塩素処理水中の染色体異常誘発性の減少速度定数は0.19 (day⁻¹)、一方、試薬フミン酸塩素処理水の染色体異常誘発性の減少速度定数は1.3(day⁻¹)であり、試薬フミン酸の値はおよそ6.7倍となる。これは、TOCや塩素注入量などの違いにより、反応速度が異なるためと解釈できる。

琵琶湖水塩素処理水中の染色体異常誘発性の減少速度定数は0.19 (day⁻¹)、非二段階形質転換誘発性の減少速度定数は0.18 (day⁻¹)、MXの減少速度定数は0.19 (day⁻¹)と定量化できた。速度変化論的にみてこれらの値に大きな差がないといえよう。したがって、MXは配水過程において、染色体異常誘発性や非二段階形質転換誘発性とよく似た変化傾向を持ち、速度変化論的からみてもそのおよその指標となりえる物質であるといえる。

次に、経時的に増加した形質転換誘発性とトリハロメタンなどの関係を式5-2を用いて定量的に検証してみる。仮定として、形質転換誘発性などは塩素存在下で前駆物質濃度に比例して増大し、かつ前駆物質は一次反応にしたがつて減少するものとする。

$$\frac{dC}{dt} = k_1 P$$

$$\frac{dP}{dt} = -k_2 C$$

C: 形質転換誘発性もしくは濃度

P: 前駆物質濃度

k_1 : 塩素による減少速度定数 (day^{-1})

k_2 : 加水分解による減少速度定数 (day^{-1}) (5-2)

t: 反応時間 (day)

以上の式を積分し、

初期条件($t = 0, C = 0$)、境界条件($t \rightarrow \infty, C = C_{\max}$)を与えると

$$C = C_{\max}(1 - e^{-k_2 t})$$

なお、 C_{\max} については便宜的に測定結果の最大値をあてはめた。ここで得られる k_2 は厳密には前駆物質の減少速度定数であるが、これを増大速度定数とみなす。

増大速度定数は形質転換誘発性が $0.12(\text{day}^{-1})$ となった。また図 5-7 からクロロホルムは $0.29(\text{day}^{-1})$ 、トリクロロ酢酸が $0.17(\text{day}^{-1})$ 、TOX が $0.93(\text{day}^{-1})$ となった。クロロホルムやトリクロロ酢酸は配水過程における形質転換誘発性のおおまかな指標となると考えられる。

第3節 残留塩素濃度条件に注目したMXの指標としての適応範囲に関する検討

前節で配水過程における発がんに関する有害性の指標としてはMXが適していることを定量的に指摘できた。しかし、MXと水道水の有害性は同一のものではないので、指標としての適応条件には注意しなければならない。そこで、適応条件として残留塩素濃度に着目する。MXは残留塩素濃度が大きいほど分解されやすいことを4章で指摘した。しかし、伊藤⁴⁾らは塩素処理水中の染色体異常誘発性は残留塩素濃度が大きくなるほど低減しにくいと報告している。

本節では有害性としては染色体異常誘発性のみを対象とした。これは、琵琶湖水塩素処理水の有害性の変化傾向を染色体異常誘発性が代表していると考えられるからである。

第1項 実験方法

2001年12月12日に琵琶湖水を採水し、これを実験原水とした。前節と同様にこれを1.0 μ mメンブランフィルターでろ過した。ろ過後のTOCは2.3mgC/Lであった。塩素処理は初期注入量が25,100mgCl₂/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウム水溶液を添加した。バイオアッセイ用試料調製、染色体異常試験、MX測定については前節と同様の方法で行った。

第2項 実験結果

図5-9に残留塩素濃度とpHの変化を示す。残留塩素は本節の目的を考察するのに十分存在していた。

染色体異常試験の結果を図5-10に示す。図5-10中には比較のため、前節結果もあわせて示した。染色体異常誘発性は塩素注入量が大きくなるほど大きくなった。しかし、伊藤らの報告では染色体異常誘発性は塩素処理に比例して増大しているが⁴⁾、今回の結果では塩素注入量25,100mgCl₂/Lの間に大きな差はみられなかつ

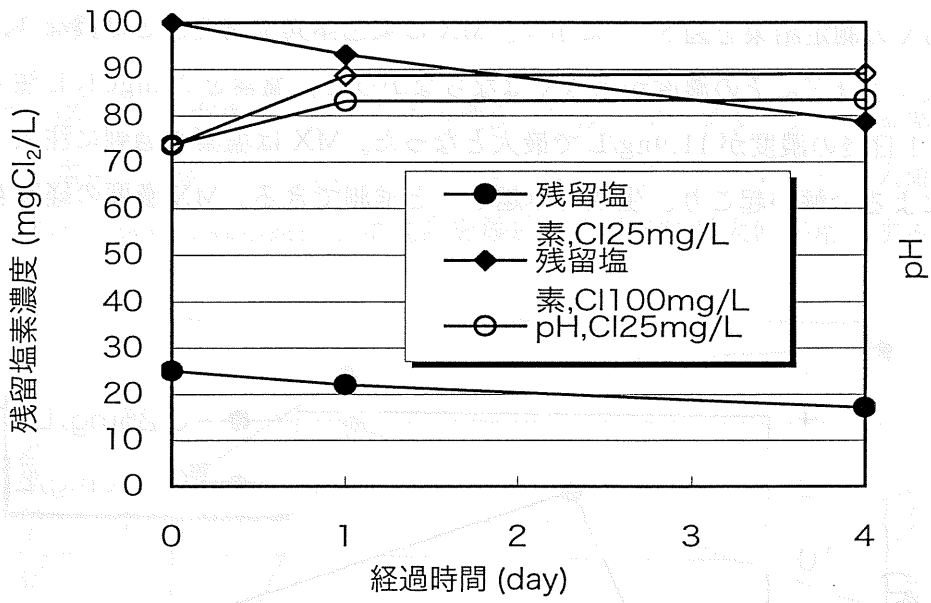


図 5-9 残留塩素・pH の変化

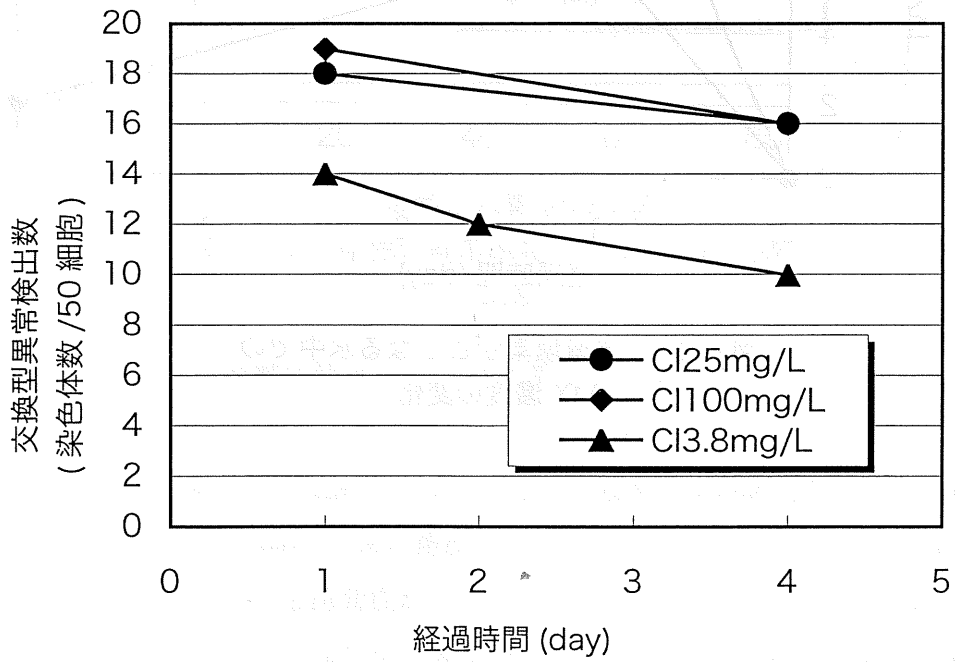


図 5-10 残留塩素が異なる水中での染色体異常誘発性の変化

た。また、経時的な変化として、一度生成した染色体異常誘発性が低減するという傾向は前節と同様に見られた。

MX の測定結果を図 5-11 に示す。MX は染色体異常誘発性とは異なり、塩素を注入するほどにその濃度が大きくはならなかった。塩素を 25mgCl₂/L 注入した時の、1 日後の濃度が 11.9ng/L で最大となった。MX は塩素を過剰に注入すると塩素による分解が起こり、生成を卓越したと推測できる。MX 濃度の経時変化も染

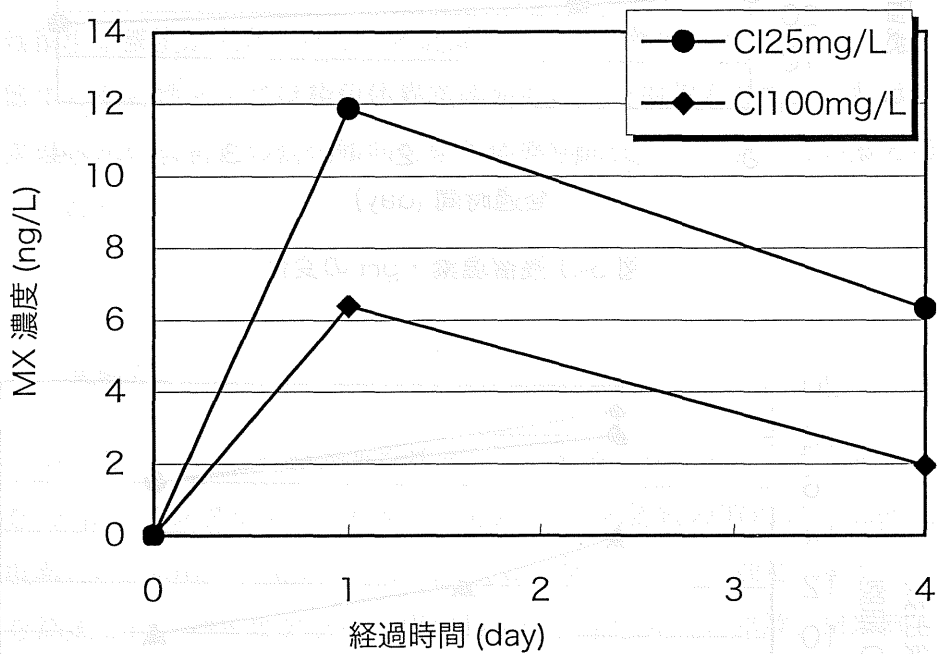


図 5-11 残留塩素がことなる水中での MX 濃度の変化

染色体異常誘発性同様、水中で生成後低減するという変化傾向を示した。

第3項 考察

まず、図5-12に塩素注入量ごとに処理後1日後のMX濃度と染色体異常誘発性を示す。塩素注入後1日目はMX濃度も染色体異常誘発性もおよそ最大値に近いと思われる。染色体異常誘発性は塩素を添加するほどに最大値が増加するのに対し

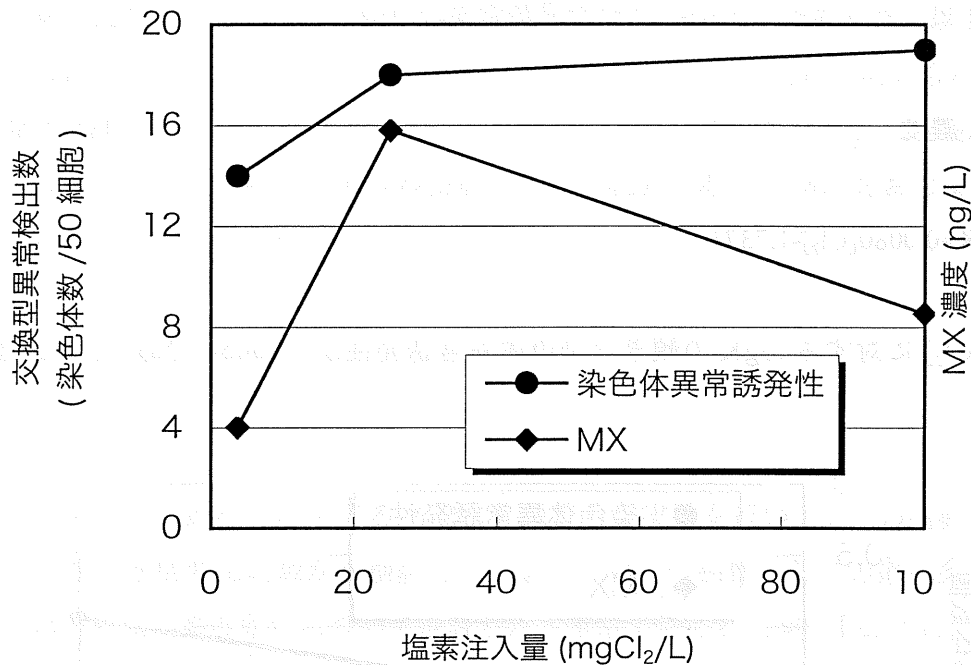


図5-12 染色体異常誘発性とMXの最大値の比較

して、MXは塩素を過剰に添加すると逆に濃度が低減してしまうのが対照的である。

式5-1を用いて減少速度定数を定量化すると、塩素を25mgCl₂/L注入した時、染色体異常誘発性が0.06(day⁻¹)、MX濃度が0.21(day⁻¹)であった。塩素を100mgCl₂/L注入した時は、染色体異常誘発性が0.08(day⁻¹)、MX濃度が0.39(day⁻¹)であった。

前節の結果とあわせて、染色体異常誘発性とMXの速度定数を塩素注入量ごとにプロットしたのが図5-13である。横軸の塩素濃度は琵琶湖水に対する塩素注入量を対象とし、濃度変化は考慮していない。塩素注入量の増加に伴い、染色体異常誘発性の減少速度定数は小さくなる、つまり減りにくくなるのに対して、MX

の減少速度定数は大きくなる、つまりMXは反対に減りやすくなっていることがわかる。また、図5-13から、減少速度定数Kと塩素注入量 $[Cl_2]$ の間には染色体異常誘発性とMX濃度についてそれぞれ以下の式を得ることが出来る。

染色体異常誘発性

$$\log K = -0.0054[Cl_2] - 2.1091 \quad (5-3)$$

MX濃度

$$\log K = 0.0080[Cl_2] - 1.7371 \quad (5-4)$$

$[Cl_2]$ に対する $\log K$ の傾きは染色体異常誘発性が-0.0054であり、MX濃度は

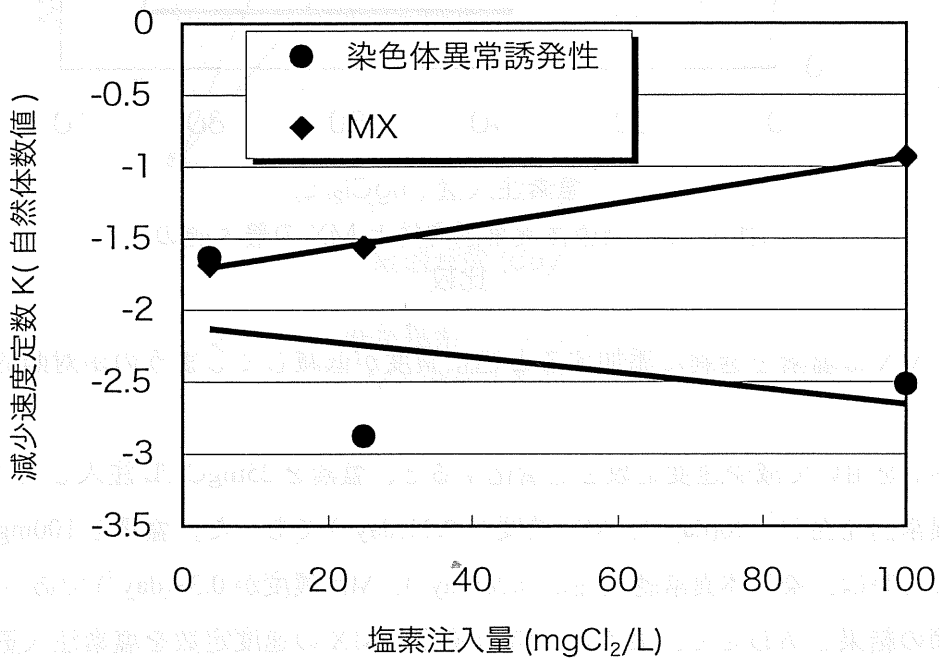


図5-13 染色体異常誘発性とMXの塩素による減少速度定数

0.0080である。傾きが負と正になっている。これは、残留塩素濃度に対するそれぞれの減少速度定数の特性が逆であることを示している。したがって、残留塩素濃度が大きくなるほど、両者のlogKの差は大きくなる。残留塩素濃度が大きくなるほど、MXは指標として適さなくなるということである。

しかし、通常の水道水中の残留塩素濃度は0.5mgCL₂/L程度である。これに、式5-3,5-4を適用するとlogKの差は0.38であり、MXの減少速度定数は染色体異常誘発性の1.5倍となる。また、水道水に近い濃度で処理した前節において、MXの減少速度定数は0.19(day⁻¹)、染色体異常誘発性は0.19(day⁻¹)であった。以上から、通常の残留塩素濃度範囲であれば、MXは指標とすることが可能と考えられる。

配水過程において、MXを指標として適用するには残留塩素条件に注意しなければならないが、実際の水道の残留塩素濃度の範囲であればMXをおおよその指標としてもよいと思われる。

第4節 結語

本章では配水過程を流下する水道水を想定した実験を行い、MXの指標としての妥当性を速度変化定数から検証した。また、MXの指標としての適応条件については残留塩素濃度条件について検証した。本章で得られた知見を以下に示す。

- ・琵琶湖水塩素処理水の染色体異常誘発性と非二段階形質転換誘発性は生成後速やかに低減した。一方、形質転換誘発性は増大し続け、反対の傾向であった。
- ・染色体異常誘発性と非二段階形質転換誘発性に対応する指標副生成物としてはMXが、形質転換誘発性に対応するものとしてはクロロホルムやトリクロロ酢酸が定性的に一致した。
- ・一次反応を仮定して、染色体異常誘発性、非二段階形質転換誘発性、MXの減少速度定数を求めたところ、それぞれ0.19,0.18,0.19(day⁻¹)と定量化できた。MXは配水過程において、これらのおおまかな指標となりうることを指摘できた。
- ・形質転換誘発性の増大速度定数は0.12(day⁻¹)となった。同様に、クロロホルムは0.29(day⁻¹)、トリクロロ酢酸が0.17(day⁻¹)、TOXが0.93(day⁻¹)となり、形質転換誘

発性の指標としてはクロロホルムやトリクロロ酢酸が適していると考えられた。

・琵琶湖水に過剰な塩素処理を行ったところ、染色体異常誘発性は塩素注入量の増加にともない、作用は大きくなった。また、経時的に減少傾向を示したがその時の減少速度は残留塩素が増えるにつれて小さくなった。

・MX は塩素注入量 $25\text{mgCl}_2/\text{L}$ の時に、生成量が 11.9ng/L で最大となり、塩素注入量と比例しなかった。しかし、減少速度は残留塩素が多くなるほどに大きくなった。

・配水過程においてMXを発がんに関する有害性の指標として用いるには、残留塩素濃度に注意しなければならないが、通常の水道水のレベルであれば十分指標として適用可能であると考えられた。

参考文献

1. 伊藤禎彦、藪下登史子、仲野敦士：配水過程における指標副生成物に関する実験的考察、環境衛生工学研究、Vol.14,pp193-198,2000
2. 伊藤禎彦、池田大助、鳥羽裕一郎：塩素処理水における発がんイニシエーション・プロモーション活性の変化過程、第34回日本水環境学会年会講演集 ,p213,2000
3. 浦野紘平、高梨啓和、金澤伸浩、藤江幸一：水道水の Ames 変異原性に関する研究 第二報 変異原生物質濃縮回収用の吸着剤、水環境学会誌 第17巻 第7号 pp.461-469、1994
4. 住友恒、伊藤禎彦：水道水の消毒と変異原性の生成、土木学会工学委員会 用水廃水の高度処理技術に関する研究小委員会研究報告書 ,pp.7-12,1998

第6章 結論

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

第3章ではMXの測定方法について、誘導体化方とガスクロマトグラフへの注入方法について検討を行った。

- ・MXの誘導体化の方法について検討した結果、メチル化に比べてTMS化は作業自体も簡便であり、測定時の感度もTMS-MXはメチル-MXの3.6倍となった。MXの誘導体化についてはTMS化がより適していた。
- ・MXのガスクロマトグラフへの注入方法について、スプリットレス法、クールオンカラム法、PTV法について検討をおこなった。スプリットレス法とクールオンカラム法との比較では、クールオンカラム法で分析をおこなった方が3.0倍ほど感度がよかった。しかし、PTV法を用いて大容量を注入することで感度はさらにあがると思われた。MX分析時の注入方法としては本研究の検討範囲内ではカラムの汚染などの実用的な点を考慮してもPTV法がもっとも優れていると考えられる。
- ・MXの測定には、誘導体化にはTMS化を、ガスクロマトグラフへ注入方法としてはPTV法を用いることとした。
- ・自然水中MX濃度が0.5ng/L以上であれば、MXの測定は可能であると考えられた。

第4章では水中はpHや塩素がMXとその有害性に与える影響について検討を行った。

- ・MXの水中での安定性はpHに大きく依存し、pHが大きくなるにつれてMXの分解は促進された。
- ・MXは中性の水中でも加水分解を受け、徐々に減少した。
- ・MXはアルカリ領域では極めて不安定であった。

- ・塩素処理水中で、塩素注入量の増大に伴ってMXの安定性は低下し、減少速度定数も大きくなった。
- ・MX濃度の減少速度定数からは、通常の水道水の条件下では、MXが減少する主な要因は塩素による分解よりも加水分解による影響の方が大きいと考えられた。
- ・MXの染色体異常誘発性、形質転換誘発性の変化はMXの濃度に対応していた。また、残留塩素が多くなるほど減少速度定数が大きくなった。

第5章では水道の配水過程を想定した実験を行い、MXが発がんに関する有害性の指標として妥当であることを定量的に示すとともに、その適応条件について残留塩素条件からも検討を行った。

- ・琵琶湖水塩素処理水の染色体異常誘発性と非二段階形質転換誘発性は生成後速やかに低減した。一方、形質転換誘発性は増大し続け、反対の傾向であった。
- ・染色体異常誘発性と非二段階形質転換誘発性に対応する指標副生成物としてはMXが、形質転換誘発性に対応するものとしてはクロロホルムやトリクロロ酢酸が定性的に一致した。
- ・一次反応を仮定して、染色体異常誘発性、非二段階形質転換誘発性、MXの減少速度定数を求めたところ、それぞれ0.19, 0.18, 0.19(day^{-1})と定量化できた。MXは配水過程において、これらのおおまかな指標となりうることを指摘できた。
- ・形質転換誘発性の増大速度定数は0.12(day^{-1})となった。同様に、クロロホルムは0.29(day^{-1})、トリクロロ酢酸が0.17(day^{-1})、TOXが0.93(day^{-1})となり、形質転換誘発性の指標としてはクロロホルムやトリクロロ酢酸が適していると考えられた。
- ・琵琶湖水に過剰な塩素処理を行ったところ、染色体異常誘発性は塩素注入量の増加にともない、作用は大きくなった。また、経時的に減少傾向を示したがその時の減少速度は残留塩素が増えるにつれて小さくなった。

- ・ MX は塩素注入量 25mgCl₂/L の時に、生成量が 11.9ng/L で最大となり、塩素注入量と比例しなかった。しかし、減少速度は残留塩素が多くなるほどに大きくなった。
- ・ 配水過程において MX を発がんに関する有害性の指標として用いるには、残留塩素濃度に注意しなければならないが、通常の水道水のレベルであれば十分指標として適用可能であると考えられた。

付録：ガスクロマトグラフ質量分析計測定条件（第3章、スプリットレス法）

使用機器

ガスクロマトグラフ	Hewlett Packard 5890 Series II
質量分析計	日本電子製 JMS-AX505
データ処理	Hewlett Packard Apollo Series 400
カラム	J&W 製 キャピラリーカラム DB-1 長さ 15m 内径 0.25mm 膜厚 0.25 μ m

GC 測定条件

インジェクション温度	200°C
カラム温度	80°C → 6°C/min → 200°C (0min) → 25°C/min → 250°C
試料注入量	2 μ L
キャリアーガス	ヘリウム (35mL/min)

MS 測定条件

イオン源温度	200°C
イオン化電圧	70eV
イオン化電流	300 μ A
スキャン範囲	25 ~ 500
スキャン速度	2sec/scan
分解能	500

定量

Selected Ion Monitoring

測定質量数	TMS-MX $m/z=135,273,275$ メチル-MX $m/z=198.912,200.909,202.906$
-------	------------------------------------------------------------------

ガスクロマトグラフ質量分析計測定条件（第3章、クールオンカラム法）

使用機器

ガスクロマトグラフ

Hewlett Packard 5890 Series II

質量分析計

日本電子製 JMS-AX505

データ処理

Hewlett Packard Apollo Series 400

カラム

J&W 製 キャピラリーカラム DB-1

長さ 15m 内径 0.25mm 膜厚 0.25 μ m

GC 測定条件

インジェクション温度 63 °C (1min) \rightarrow 10 °C /min \rightarrow 203 °C (0min) \rightarrow 25 °C /min \rightarrow 253 °C オープントラックモード

カラム温度 60 °C (1min) \rightarrow 10 °C /min \rightarrow 200 °C (0min) \rightarrow 25 °C /min \rightarrow 250 °C (2min)

試料注入量 2 μ L

キャリアーガス ヘリウム (35mL/min)

MS 測定条件

イオン源温度

200 °C

イオン化電圧

70eV

イオン化電流

300 μ A

スキャン範囲

25 ~ 500

スキャン速度

2sec/scan

分解能

500

定量

Selected Ion Monitoring

測定質量数

TMS-MX $m/z=135,273,275$

メチル -MX $m/z=198.912,200.909,202.906$

付録：ガスクロマトグラフ質量分析計運転条件（第3章 PTV法、第4,5章）

使用機器

ガスクロマトグラフ Agilent 社製 6890plus
質量分析計 日本電子製 JMS-AX505
オートインジェクター Agilent 社製 7683 シリーズ
インジェクター G2613A
データ処理 Hewlett Packard Apollo Series 400
カラム J&W 製 キャピラリーカラム DB-1
長さ 15m 内径 0.25mm 膜厚 0.25 μ m

GC 測定条件

インジェクション温度 78°C (10.5min) \rightarrow 720°C /min \rightarrow 200°C (21min)
カラム温度 80°C (10.5min) \rightarrow 6°C /min \rightarrow 200°C (0min) \rightarrow 25°C /min
 \rightarrow 250°C (2min)
試料注入量 40 μ L (2 μ L \times 20回)
キャリアーガス ヘリウム (1mL/min)

MS 測定条件

イオン源温度 200°C
イオン化電圧 70eV
イオン化電流 300 μ A
スキャン範囲 25 ~ 500
スキャン速度 2sec/scan
分解能 500

定量

Selected Ion Monitoring

測定質量数	TMS-MX	m/z=135,273,275
	TMS-MBA	m/z=313,315,317

内部標準法