

(25) 生態毒性からみた界面活性剤の環境影響評価

Micro-toxicity, Biodegradability and Mutagenicity of Household Detergents and Soaps, and Their Effects on the Biodegradation of Organic Matter and the Intensity of Mutagens in Water Environment.

守田康彦*、高橋敬雄**、遠藤哲広***、楠井隆史****、浦野紘平*****

Yasuhiko MORITA*, Yukio TAKAHASHI**, Tetsuhiro ENDOU***, Takashi KUSUI**** and Kouhei URANO*****

ABSTRACT; First, acute toxicity, biodegradability and mutagenicity of 8 commercial household detergents (main surfactants were soap in 3 detergents, synthetic detergents in 3 and the mixture of the both in the remaining 2) and pure nonion- and anion- surfactants were studied, using Microtox assay, BOD meter and Ames' assay, respectively. Next, effects of the detergents on the glucose biodegradation and the mutagen intensity of 4NQO, 2AA and BaP were tested, using BOD meter and Ames' assay.

As a result, detergent which main component was α -SFE showed the highest EC50 value in Microtox assay. Other detergent which main components were LAS, AS and AE showed the lowest EC50 value. The highest biodegradability was found in soap and the lowest was found in α -SFE or LAS detergents. Mutagenicity was not found in any detergent with and without S9-Mix. Detergents with low biodegradability lowered the glucose biodegradation. Synthetic detergents enhance the 4NQO mutagenicity without S9-Mix. In contrast, soap increase the BaP mutagenicity with S9-Mix.

KEYWORDS; household detergent, Microtox, biodegradability, Ames' assay, mutagenicity

1. はじめに

1988年の時点で、下水道等の手段により処理されている生活排水は全体の43%であり、残りの57%(6950万人分)は処理されないまま環境水中に放出されている¹⁾。そのため年間販売量が約72万トンの²⁾衣料用洗剤の大部分も、使用後に生活排水に含まれ、未処理のまま河川・湖沼等に放出されている。

洗剤が環境に与える影響については、これまで種々の観点から多くの研究がなされている。しかし界面活性剤をはじめとする洗剤の配合成分は、例えば α -スフィンゴ脂肪酸エステルトリウムのような新素材の導入により刻々と変化し、また試験方法もより迅速かつ高感度なものへと進歩しつつあるため、現代の洗剤による環境影響が、現代的手法によって評価される事が常に求められている³⁾⁴⁾⁵⁾。

また洗剤は界面活性を持っており、洗剤の配合成分は様々な化学的特性を有しているので、洗剤が環境水中に放出される事により、環境水中の有機物と水中生物との関係に変化が起こり (Fig. 1)、有

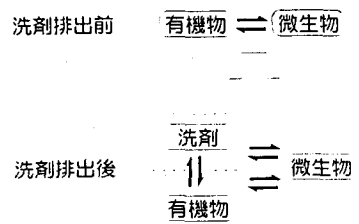


Fig.1 Schema of Detergents effects on Water Environment

* 新潟大学自然科学研究科 (Graduate School of Science and Technology, Niigata University)

** 新潟大学工学部 (Faculty of Engineering, Niigata University)

*** 日本生活協同組合連合会 (Japanese Consumer's Cooperative Union)

**** 富山県立大学短期大学部 (College of Technology, Toyama Prefectural University)

***** 横浜国立大学工学部 (Faculty of Engineering, Yokohama National University)

機物の分解が阻害されたり促進されたりする可能性が考えられる。

また環境水中に放出された洗剤が環境水中の有害物あるいは生物に作用し、有害物の有害性を強めたり弱めたりすることが考えられる。しかし、こうした観点に立った研究は従来殆ど見られない。

そこで本研究では、市販衣料用洗剤8種類と非イオン系、陽イオン系界面活性剤それぞれ1種類ずつについて、まず洗剤自体の性質としての急性毒性、生分解性そして変異原性を検討し、次に前述した環境水中の有機物と微生物の関係が洗剤の流入によってどのように変化するか(生分解阻害性)について検討し、更に環境水中の有害物質の生物への作用が洗剤の流入により増長されるか否か(補助変異原性)について検討を行った。

2. 実験試料・方法

2.1 実験試料

試料は市販衣料用洗剤から、石鹼3種類、複合石鹼2種類、合成洗剤3種類の計8種類(Table 1)を使用し、更に洗剤に含まれていない界面活性剤の性質を知るために非イオン系界面活性剤、陽イオン系界面活性剤から各1種類ずつ計2種類(Table 2)を使用した。石鹼・複合石鹼・合成洗剤の分類は、家庭用品品質表示法のそれに従った。

Table1 List of commercial household detergents used in this study

種類	主成分	標準使用量	特徴
石鹼A	脂肪酸ナトリウム (61%)	40g/30L	米ぬか油が原料
石鹼B	脂肪酸ナトリウム 脂肪酸カリウム (計70%)	40g/30L	回収食用油が原料
石鹼C	脂肪酸ナトリウム (65%)	35g/30L	米ぬか油が原料 EDTAを配合
複合石鹼A	脂肪酸ナトリウム 脂肪酸カリウム (計61%) 脂肪酸アルカノールアミド (DA) (7%)	30g/30L	セオライトを配合
複合石鹼B	脂肪酸ナトリウム 脂肪酸カリウム (計31%) アルキル硫酸エステル塩 (AS) ポリオキシエチレンアルキルエーテル (AE) (計12%)	30g/30L	
合成洗剤A	アルキル硫酸エステル塩 (AS) ポリオキシエチレンアルキルエーテル (AE) 脂肪酸ナトリウム (計42%)	25g/30L	セオライトを配合
合成洗剤B	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) ポリオキシエチレンアルキルエーテル (AE) (計41%)	25g/30L	セオライトを配合
合成洗剤C	アルファスルフォ脂肪酸エステル塩 (α -SFE) (22%)	25g/30L	セオライトを配合

Table2 List of pure surfactants used in this study

分類	名称	分子式
非イオン系	ヘptaエチレン*リコールモノ*ト*デシルエーテル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7\text{H}$
陽イオン系	塩化テトラデシル*メチルベンゾリウム	$\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{NCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2.2 急性毒性試験

急性毒性試験としては、MICROTOX試験を用いた。MICROTOX試験とは、フラビンモノオキシド (FMN)、長鎖アルデヒド、前者が還元されたFMNH₂の3物質と、ルシフェラーゼ (発光酵素) の反応 (Fig. 2) によって発光する海洋性発光細菌 (Photobacterium Phosphoreum) に試料を与え、試料が発光機構に作用し、抑制する事によって起こる発光量の減少から、その試料の毒性を知ろうというものである⁶⁾。基本的な試験方法は、以下の通り⁷⁾。

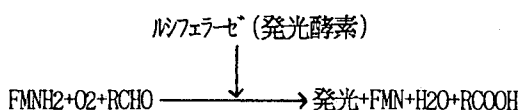


Fig.2 Radiation mechanism of Photobacterium phosphoreum⁶⁾

- 1) 凍結乾燥し、-80℃で保存してある海洋性発光細菌を栄養塩、塩分と共に超純水で溶解し、4℃で保存する。
- 2) 15℃に安定化した希釈液 (NaCl 2% aq) 500μLのキューベットに1)の菌液を10μLずつ分注し、15分置いて安定させる。
- 3) 試料の塩分濃度を塩分補正液 (NaCl 22% aq) で2%に調製し、15℃に安定させる。この時の試料濃度は90%となる。
- 4) 3)から更に4~8段階の希釈列を作成し、ブランクとして希釈液のみのキューベットも作成する。
- 5) 2)で用意したキューベットの初期発光量を所定の測定器で測定する。
- 6) 5)で測定したキューベットに、4)で調製した試料を500μLずつ注入する。この時の試料の最高濃度は45%となる。
- 7) 暴露時間5分、15分の発光量を測定する。
- 8) 5)と7)それぞれの発光量の差から発光減少量を求め、投与-反応曲線を作成し、試料の毒性を算出する。本研究では5分、15分の暴露時間について50%影響濃度 (EC-50) を求めた。

2.3 生分解性試験

生分解性試験は、BODメーター (タイテック社 BOD-TESTER100) を使用し、試料の試験開始時のTOCが15mg/Lとなるよう、JIS K0102の21に定める植種希釈水を用いて調製した後に、約500時間酸素消費量を観測した。植種は新潟大学構内の汚水処理施設から得た活性汚泥上澄み液を使用し、TOC測定は島津 TOC-5000を使用した。

2.4 変異原性試験

試験法はAMES試験を用いた。試験はSalmonella typhimurium TA100を使用したプレインキュベーション法に依り、代謝活性化酵素S-9 Mix (以下S-9 Mix) を加える系 (+S9) と加えない系 (-S9) の両方を行った。S-9 Mixはオリエンタル酵母製のS-9とcofactorを用いて調製した⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。

試料はイオン交換水により0.5g/L又は1g/Lの濃度に調製し、ポアサイズ0.45μmのナロンメンブランフィルターを用いて滅菌した後に試験を行った。試験毎に陽性対照試験を行ない、直接変異原としては4-ニトロキノリン-N-オキシド (4NQO) を、間接変異原としては2-アミノアントラセン (2AA) とベンゾ(a)ピレン (BaP) を用いた。いずれの薬品も和光純薬製で、4NQO、BaPは特級を使用した。

2.5 生分解阻害性試験

生分解阻害性試験は、環境水中の有機物として、生分解性が高い事で知られるグルコースを想定し、グルコースと洗剤が混合した場合に生分解性がどのように変化するかを、2-3. で述べたBODメーターを使用して検討した。試験開始時のグルコース・洗剤混合溶液のTOCは15mg/Lとなるよう、2-3. で述べた植種希釈水を用いて調製し、洗剤量の影響を知るために、洗剤の占める割合がTOCの1/3と2/3になるよう設定し試験した。植種は2-3. と同様である。

2.6 補助変異原性試験

補助変異原性試験は、環境水中の有害物質として4NQOと2AA・BaPをそれぞれ想定し、水中の生物としてはSalmonella typhimurium TA100を想定し、各変異原の強度が洗剤の共存によってどのように影響されるかを検討した。洗剤試料はまず変異原性試験と同様、イオン交換水により0.5g/L又は1g/Lの濃度に調製し、ポアサイズ0.45μmのナロンメンブランフィルターを用いて滅菌した。次に各変異原物質に試料を所定量添加した後に、代

謝活性化酵素を加える系(+S9)と加えない系(-S9)の両方について、プレインキュベーション法に依るAMES試験を行った8)9)10)。薬品はAMES試験と同様、和光純薬製を使用し、4NQOとBaPは特級を使用した。

3. 実験結果

3.1 MICROTOX試験

試験結果をFig. 3に示す。縦軸は試験の結果得られたEC-50値(洗剤 mg/L)を示しており、値が高いものほど低い毒性を表している。また暴露時間は、5分と15分の2通りとした。

試験の結果、暴露時間にかかわらず、AS、AE及びLASを主成分とする合成洗剤A、CのEC50値が最も低く、続いて石鹼を主成分とする洗剤(石鹼A~C、複合石鹼A、B)、 α -SFEを主成分とする合成洗剤Bの順となり、MICROTOX試験は、石鹼や合成洗剤といった従来の一般的な分類に捕らわれない、洗剤固有の性質を評価するのに有効な一試験方法であることが示唆された。

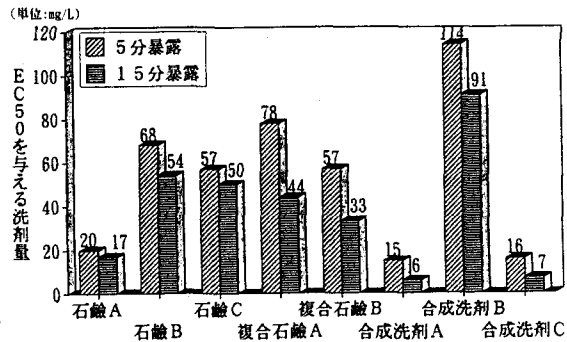


Fig.3 Results of MICROTOX assay

3.2 生分解性試験

試験の結果をFig. 4からFig. 8(各図X印の部分)に示す。図において、横軸は試験開始時からの経過時間を表し、縦軸は試験開始時における試料のCODcrに対する、当該時間までの総酸素消費量の割合を示している。

石鹼Aの生分解性はおおむね良好で、約500時間経過後のBOD/CODは72%であった(Fig. 4)。また複合石鹼のBOD/CODも石鹼Aと同程度であった(Fig. 5)。合成洗剤について見てゆくと、高級アルコール系界面活性剤であるAS、AEを主体としている合成洗剤Aは、石鹼主体の洗剤に近い約60%のBOD/CODを示したが(Fig. 6)、 α -SFEを主成分とする合成洗剤B、LASを主成分とする合成洗剤CのBOD/CODは、それぞれ約40%、50%と低かった(Fig. 7、8)。

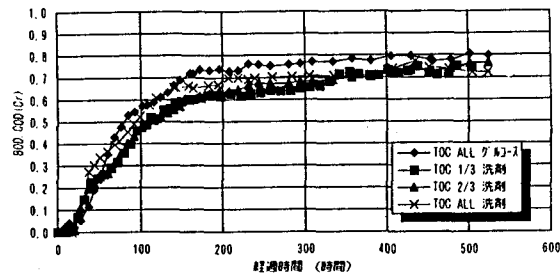


Fig.4 Biodegradability of Soap A and its effects on glucose biodegradation

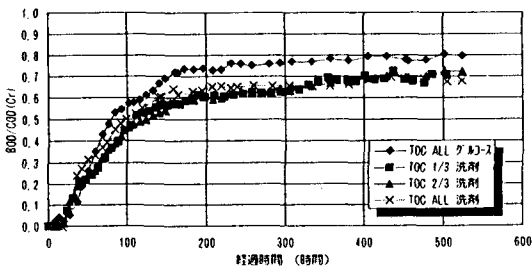


Fig.5 Biodegradability of Complex Soap A and its effects on glucose biodegradation

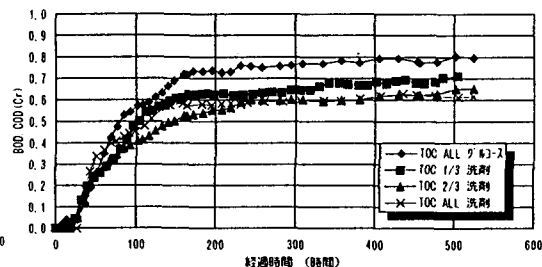


Fig.6 Biodegradability of Synthetic Detergent A and its effects on glucose biodegradation

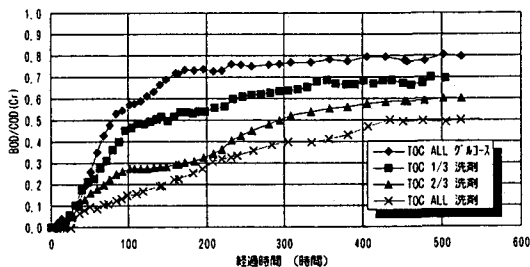


Fig.7 Biodegradability of Synthetic Detergent B and its effects on glucose biodegradation

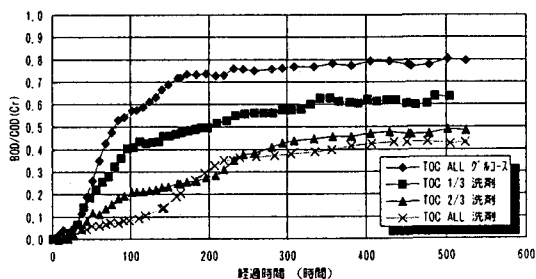


Fig.8 Biodegradability of Synthetic Detergent C and its effects on glucose biodegradation

3. 3 AMES試験

試験結果をFig. 9からFig. 12に示す(第28回水環境学会年会講演集pp. 192-193に既報)。図において横軸はプレート当りの洗剤投与量、縦軸はプレート当りのSalmonella typhimurium TA-100の復帰変異コロニー数(リバート数)を示している。試験の結果、何れの衣料用洗剤についても代謝活性化の有無にかかわらず、明確な変異原性は見い出されなかった(Fig. 9、Fig. 10)。

非イオン系、陽イオン系界面活性剤でも同様に、明確な変異原性は見られなかった。しかし陽イオン系界面活性剤で代謝活性化しない場合、試料の毒性によるものと思われるリバート数の減少が見られた(Fig. 11、Fig. 12)。

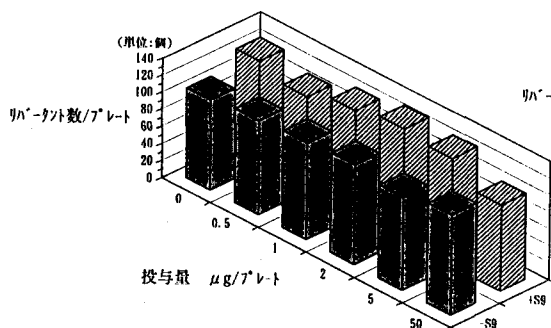


Fig. 9 Mutagenicity of Soap A

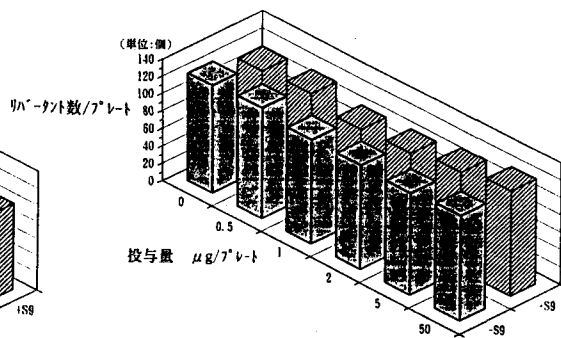


Fig. 10 Mutagenicity of Synthetic Detergent C

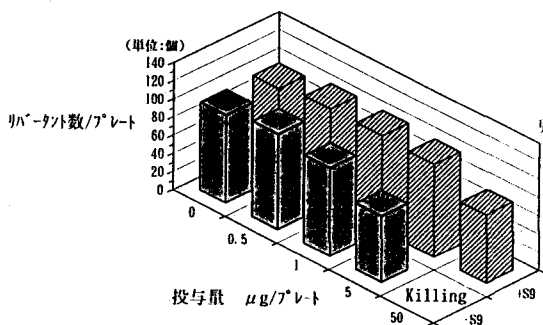


Fig. 11 Mutagenicity of Tetradecyldimethylbenzyl ammonium Chloride

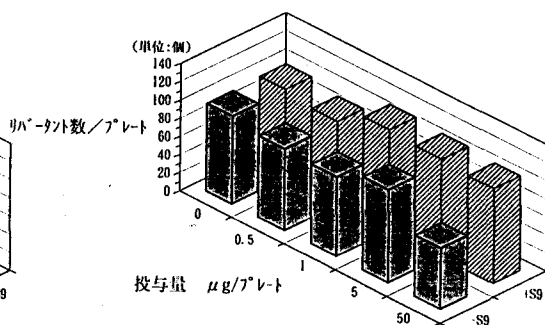


Fig. 12 Mutagenicity of Heptaethylene Glycol Mono-n-dodecyl Ether

3.4 生分解阻害性試験

試験結果をFig. 4からFig. 8に示す。LAS又は α -SFEを主成分とする合成洗剤BとCにおいて、何れも洗剤量が増えるに従って生分解性が低下しているが、合成洗剤CはBと比較してより顕著に低下しており、特にTOC2/3洗剤の曲線と洗剤のみの曲線がほぼ重なり合った(Fig. 7、Fig. 8)。石鹼、AS、AEを主成分とする複合石鹼A、合成洗剤Aでも同様の低下が見られたが、洗剤自体の生分解性が高かったため、低下の度合は比較的小さく(Fig. 5、Fig. 6)、石鹼のみの洗剤である石鹼Aでは洗剤の混合割合にかかわらず、酸素要求量曲線がほぼ重なりあった(Fig. 4)。

3.5 補助変異原性試験

試験結果をFig. 12からFig. 20に示す(第28回水環境学会年会講演集pp. 192-193に既報)。図の横軸はプレート当りの洗剤投与量、縦軸はプレート当りのバクテリウム数を示している。

(1)代謝活性酵素を加えた(-S9)場合

合成洗剤A～Cで補助変異原性が見られ、これはプレート上の4NQOの量が多いほど顕著であった(Fig. 13)。しかし石鹼主体の石鹼A、Bと複合石鹼A、Bでは洗剤投与量の増加に伴うバクテリウム数の減少が見られた(Fig. 14)。また非イオン系、陽イオン系界面活性剤でも同様のバクテリウム数の減少が見られ、特に陽イオン系界面活性剤ではキリングが見られた(Fig. 15、Fig. 16)。

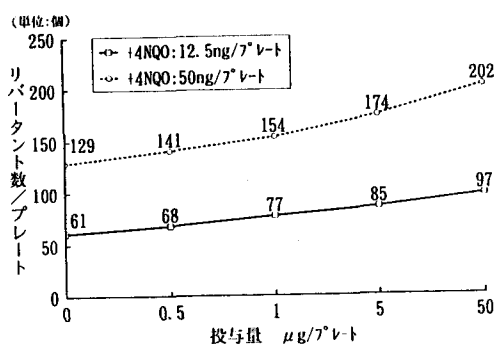


Fig. 13 Effects of Synthetic Detergent C on 4NQO mutagenicity

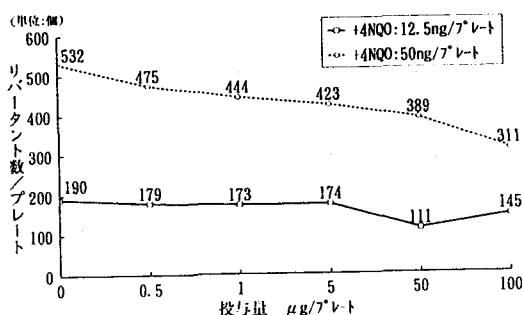


Fig. 14 Effects of Soap A on 4NQO mutagenicity

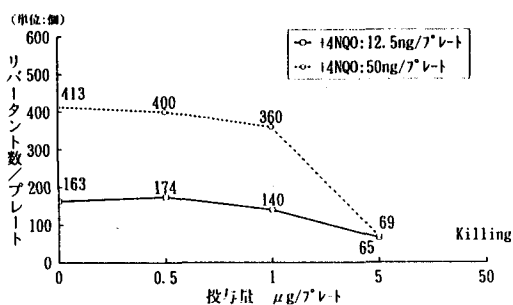


Fig. 15 Effects of Tetradecyldimethylbenzyl ammonium Chloride on 4NQO mutagenicity

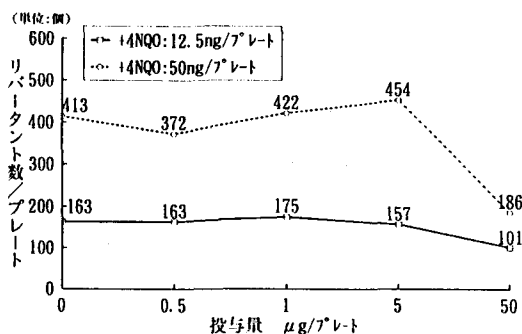


Fig. 16 Effects of Heptaethylene Glycol Mono n-dodesyl Ether on 4NQO mutagenicity

(2)代謝活性化酵素を加えた(+S9)場合

石鹼主体の石鹼A~Cと複合石鹼A、Bで、2AA、BaP何れの場合にも補助変異原性が見られ、特にBaP添加の場合に顕著であった。また何れの場合にも陽性対照物質の添加量が多い場合にコロニー数の増加が顕著であった(Fig. 17、Fig. 18)。

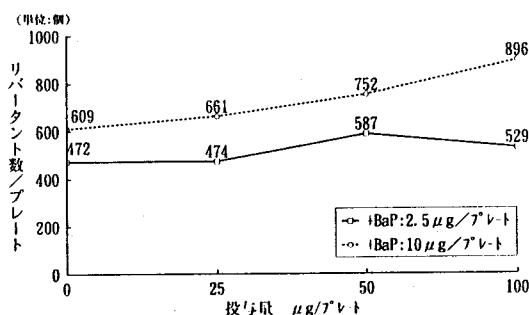


Fig. 17 Effects of Soap B on BaP mutagenicity

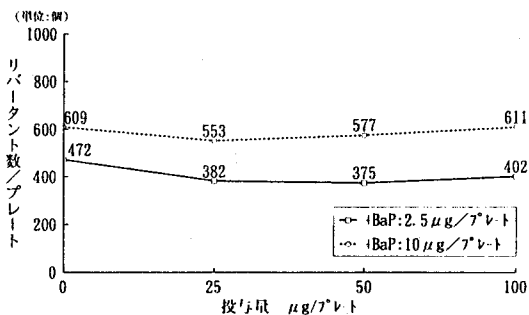


Fig. 18 Effects of Synthetic Detergent C on BaP mutagenicity

非イオン系界面活性剤、陽イオン系界面活性剤は2AAを用いた試験のみを行った。いずれの試料も添加量の増加と共にコロニー数の減少が見られた(Fig. 19、Fig. 20)。

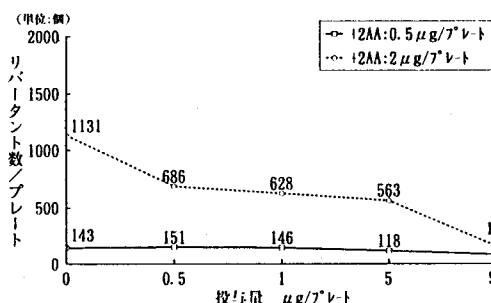


Fig. 19 Effects of Tetradecyldimethylbenzyl-ammonium Chloride on 2AA mutagenicity

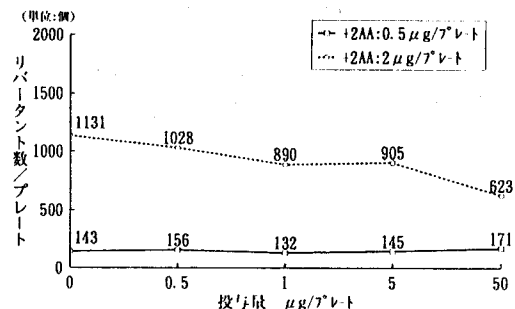


Fig. 20 Effects of Heptaethylene Glycol Mono-n-dodesyl Ether on 2AA mutagenicity

4. 考察とまとめ

洗剤の環境影響について、洗剤の直接的な環境影響を知る手掛かりとしてMICROTOX試験、生分解性及び変異原性試験を行った。また洗剤の間接的な環境影響を明らかにするため、生分解阻害性と補助変異原性について検討した。その結果、以下の事が明らかとなった。

(1)MICROTOX試験による急性毒性を見ると、暴露時間にかかわらずAS、AE、LASを主成分とする洗剤のEC50を与える濃度が比較的低く、次いで石鹼主体の洗剤となり、α-SFEを主成分とする洗剤の値は比較的高い値となった。

(2)石鹼を主成分とする洗剤の生分解性は、合成洗剤を主成分とする洗剤に比べ良好であった。更に合成洗剤の生分解性は、AE、ASを主成分としている洗剤で高く、α-SFE、LASを主成分としている洗剤で低かった。

(3)AMES試験による変異原性を見ると、市販衣料用洗剤については代謝活性の有無にかかわらず明確な変異原性は見られなかった。

(4)洗剤がケルコースの生分解性に与える影響を見たところ、それ自体の生分解性が良好であった石鹼、AS、AEを主成分とする洗剤の場合は、わずかな生分解性の低下が見られたのみであった。しかしそれ自体の生分解性が低かった α -SFE、LASを主成分とする洗剤の内、特に前者の場合に、生分解性の低下が顕著であった。これより、元々生分解性が低い洗剤が環境水中に入ると、環境水の生分解性が、流入して来た洗剤の生分解性の影響を受け、低下する事がありうる事が示唆された。

(5)補助変異原性試験の結果を見ると、-S9では合成洗剤主体の洗剤で、+S9では特にBaPについて石鹼主体の洗剤でそれぞれ補助変異原性が見られた。これより、環境水に洗剤が流入すると、環境水中にあった有害物質の毒性が強められる事がある事が示唆された。

以上より、特に市販の8衣料用洗剤について見ると、いずれも配合されている界面活性剤・助剤の成分により、それぞれ異なった特徴を有している事が分かった。それゆえ、石鹼・複合石鹼・合成洗剤という洗剤の慣用的な分類や、LAS・非LASといった合成洗剤の慣用的な分類は洗剤の環境影響を考える上で不適切と言える。今後も更に生体への影響が少なく、かつ生分解性に優れた界面活性剤、洗剤を開発してゆく必要があると考えられ、今回のような研究が更に深められる(例えば、今回用いた試験の個々の成分への適用等)必要があると考えられた。

参考文献

- 1) 高橋敬雄, 水がめなくなる, ポプラ社, 1991。
- 2) 吉村孝一, 化学物質としての界面活性剤, 水環境学会誌, Vol. 16, No. 5, pp. 294-301, 1993。
- 3) 鈴木紀雄, 合成洗剤の生態系に及ぼす影響, 水環境学会誌, Vol. 16, No. 5, pp. 319-323, 1993。
- 4) 岡田光正, 洗剤の生産量等の推移, 第27回水環境学会年会講演集, pp. 492-493, 1993。
- 5) 菊池幹夫, 水生生物への影響, 第27回水環境学会年会講演集, pp. 500-501, 1993。
- 6) 楠井隆史, 発光細菌を用いて水の毒性を知る, 水情報, Vol. 11, No. 10, pp. 10-13, 1991。
- 7) MICROBICS, Microtox Manual-A Toxicity Testing Handbook-, 1992。
- 8) 中央労働災害委員会, 安衛法による変異原性試験—テスト・ガイドラインとGLP—, 1991。
- 9) 田中一浩, 守田康彦, 高橋敬雄, 新潟県内の水道水、河川水の変異原性について, 水環境学会誌, Vol. 16, No. 9, pp. 657-665, 1993。
- 10) 守田康彦, 高橋敬雄, 浦野紘平, 遠藤哲広, AMES試験による界面活性剤の遺伝毒性評価, 第28回水環境学会年会講演集, pp. 192-193, 1994。