

(72) 染色体異常誘発性からみた浄水プロセスに おけるオゾン / 塩素処理の評価

越後信哉^{1*}・伊藤禎彦¹・夏井智毅²

¹ 京都大学大学院工学研究科都市社会工学専攻 (〒606-8501 京都市左京区吉田本町)

² 厚生労働省 (〒100-8916 千代田区霞が関1-2-2)

*E-mail: echigo@urban.env.kyoto-u.ac.jp

染色体異常試験を用いてオゾン / 塩素処理水の安全性評価を行った。親水化の程度が異なる可能性のある試料の毒性評価においては試料濃縮過程でのバイアスが懸念されてきたが、塩素処理とオゾン / 塩素処理を行った高濃度フミン酸水溶液について、希釈・再濃縮操作を行った試料と無希釈・無濃縮の試料の染色体異常誘発性を比較し、これら2処理の比較については濃縮過程により不当にオゾン処理の効果が高く評価されていることはないことを示した。

Key Words: ozonation, disinfection by-products, chromosomal aberration test, concentration procedures, chlorination

1. はじめに

浄水プロセスにおいてオゾン処理は、カビ臭の原因となる2-メチルイソボルネオール (2-MIB) などの異臭味物質の分解¹⁾、環境中で分解が遅く生態系に蓄積性があるとされる農薬類の酸化分解²⁾、トリハロメタン類などの塩素処理副生成物の前駆体の低減³⁾を目的に用いられている。またクリプトスポリジウムなどの塩素に対して抵抗性がある病原性微生物の不活化にも有効とされている⁴⁾。このようにオゾンは優れた酸化剤であるが、その使用にあたってはオゾン処理特有の副生成物に注意する必要がある。このうち、アルデヒド類、さらに原水中に臭化物イオン(Br⁻)が存在する場合には、臭素酸イオン(BrO₃⁻)や有機臭素化合物が健康影響が心配されるものとして知られている⁵⁾。特にBrO₃⁻に関してはWHOのガイドライン⁶⁾および我が国の水道水質基準⁷⁾において10 µg/Lに設定されており、近年のオゾン処理副生成物に関する国内外の研究はBrO₃⁻制御を中心に展開されてきた。

また、オゾン処理を用いる場合はオゾン処理自体による副生成物に加えて、二次消毒剤添加にともな

う副生成物についても考慮する必要がある。これはオゾンは中性付近では速やかに自己分解するため、残留効果がなく、最終的な消毒剤としては用いることができないためである。我が国ではオゾン処理後に塩素等残留効果のある消毒剤を添加して配水を行っている。オゾンと塩素を併用する場合(以下オゾン/塩素処理とする)の副生成物は塩素処理副生成物と類似したものが多いが、ハロケトンのように塩素単独処理に比べて、格段に高濃度で生成する物質、いわばオゾン/塩素処理に特有な副生成物も存在する。

一般にオゾン/塩素処理水の変異原性は塩素単独処理水のそれよりも低いとされている⁸⁾。オゾン処理の効果をバイオアッセイの結果に基づいて論ずる場合には、塩素単独処理水の有害性とオゾン/塩素処理水の有害性を比較することになるが、実際の水道水の消毒副生成物の評価においては、試験法の検出感度に限界があることから固相抽出法等により試料を濃縮する必要があるという点にも注意を払うべきである。上述のようにオゾン/塩素処理水と塩素処理水では消毒副生成物の種類が異なるため、固相への吸着特性やその他の濃縮法による濃縮効率

両者では異なる可能性がある。すなわち、試料濃縮過程を経ることで、有害性の評価にバイアスが生ずる可能性がある。ところが、オゾン/塩素処理水についてはこのバイアスに関する評価が行われていない。オゾン/塩素処理水が塩素単独処理水に比べて有害性が低くみえるのはオゾン処理によって水中の有機物が親水化し、副生成物の回収率が相対的に低いからであり、公正な有害性の比較が行われていないという懸念が払拭されていない。

本研究では上記のオゾン/塩素処理水の有害性評価に関連する未解明の点をふまえて、オゾン/塩素処理水と塩素単独処理水の有害性を比較する場合に、試料濃縮過程によるバイアスが存在するか、するとすれば程度かという点について、高濃度フミン酸溶液をそれぞれの方法で処理したものをいったん希釈・再濃縮し、濃縮操作を経ないものと染色体異常誘発性を比較し評価することにより検討を行った。

なお、実験に際しては、チャイニーズハムスター肺細胞 (CHL 細胞) を用いた染色体異常試験の結果を有害性の指標とした。また、試料濃縮法として Sep-pack Plus CSP800 と OASIS-HLB (いずれも Waters) による固相抽出法並びに凍結乾燥法を用いた。

2. 実験方法

(1) 試料

高濃度フミン酸水溶液は、市販のフミン酸塩 (Aldrich) 3 g を 0.1 N NaOH 水溶液 1 L 中で 24 hr 攪拌・溶解の後、HCl にて pH を 7.0 とし、さらに 24 hr 静置し、グラスファイバーフィルター (ADVANTEC, GS25) を用いてろ過することにより調製した。実験にはこの水溶液を TOC=750 mg/L となるように希釈し、所定量のリン酸 2 水素カリウム (和光純薬) とリン酸水素 2 ナトリウム (和光純薬) を加えて pH 7.0 に

調製したものを用いた。

オゾン処理は小型インピンジャー (試料容量 10 mL, 図-1) 中のフミン酸水溶液に一定時間連続的にオゾンガスを送入することにより行った。オゾンの注入速度は 1.5 mg O₃/min とした。オゾンガスは高純度酸素 (O₂ ZERO-U, 住友精化) を原料にオゾン発生器 (OS-IN-A, 三菱電機) により発生させたものを用いた。オゾン処理後の試料は HCl または NaOH で pH を 7.0 に再調整した後、塩素処理に供した。

塩素処理は、上記の高濃度フミン酸水溶液またはオゾン処理後のフミン酸溶液に次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (和光純薬) を初期濃度が 1500 mg Cl₂/L となるように (Cl₂/TOC=2.0 mg/mg) 加え、暗所 20 °C で 24 hr 反応させることにより行った。なお、残留塩素は本研究で用いたいずれの反応条件においても 24 hr 後にはほぼ消失しており、染色体異常試験に影響を及ぼさない濃度範囲であることを確認している。

(2) 染色体異常試験

発がん過程におけるイニシエーション活性の指標として、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 (CHL/IU, 大日本製薬) を用いる染色体異常試験を行った⁹⁾。試料は 0.2 μm の滅菌フィルター (Milex FG, Millipore) によりろ過除菌の後投与した。また投与した試料容量は、水溶液の試料については培養液量の 1/6 (1 mL)、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した濃縮試料については 30 μL を上限とした (固相抽出法では希釈する前の処理水に対して 60 倍に濃縮したものを複数の投与量にて投与した)。検体投与から標本作製までの処理時間は 24 hr とした。染色体異常の評価は光学顕微鏡 (油浸レンズ, 10×100 倍, MICROPHOT-FX, Nikon) で一検体あたり 100 個程度 (最低 95 個) のよく拡がった分裂中期

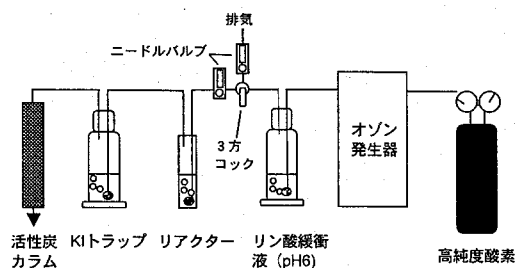


図-1 リアクターの概略図。

像を顕鏡した。ギャップ、切断型異常、交換型異常を計数して、これら異常数（注：異常の数であり異常のあった細胞数ではない）の合計を細胞 100 個あたりに換算し染色体異常数とした。各サンプルについて標本数は 1 個とした。このため、計数結果について統計的な処理は行っていない。また、バックグラウンド値は 0 とした。

(3) 試料濃縮法（図-2）

固相抽出法および凍結乾燥法により高濃度試料を 100 倍に希釈したもの（TOC としては約 7.5 mg/L）を再濃縮しその回収率について比較・検討をおこなった。

固相抽出法では、いずれも Waters 社製の Sep-Pak Puls (long) CSP800（以下 CSP800）と OASIS-HLB Plus（以下 OASIS-HLB）を用いた。カートリッジあたりの充填材量は、CSP800 が 420 mg、OASIS-HLB が 225 mg である。CSP800 は無極性のポリスチレン樹脂でこれまで変異原物質の回収専用の固相として広く用いられてきたものである。一方、OASIS-HLB はジビニルベンゼン-N-ビニルピロロリン重合体であり親水性および疎水性物質両方の吸着が可能とされている。

CSP800 のコンディショニングでは酢酸エチル 400 mL（上向流，10 mL/min），エタノール 200 mL（下向流，10 mL/min），蒸留水 200 mL（下向流，10 mL/min）の順に通液した。また OASIS-HLB のコンディショニングではメタノール 150 mL（上向流，10 mL/min），蒸留水 200 mL（上向流，10 mL/min）の順に通液した。これら 2 種類の固相抽出法では pH1.9-2.0 に調節した試料 3.4 L を CSP800 については 2 本直列（30 mL/min）で、OASIS-HLB カートリッジは 4

本直列（20 mL/min）でそれぞれ上向流で通水した。吸着された物質の溶出は、極性の異なる物質を回収するため、CSP800 についてはアセトン（6.5 mL）と酢酸エチル（1.5 mL）を、また OASIS-HLB についてはメタノール（8.5 mL）と酢酸エチル（1.5 mL）を用いて溶出した。これらの溶出液は吹きつけ式試験管濃縮装置（MG-2000，東京理化機器）を用いて solvent-exchange を行い，DMSO500 μ L に転溶し，染色体異常試験に供した。solvent-exchange では急激な揮発とそれにとりまなう不揮発性分のガラス表面への固着を回避するために吹きつけ窒素ガスの流量を徐々に減じるという操作を行った。この操作には一検体あたり約 2.5 hr を要した。

凍結乾燥法による濃縮は，100 倍に希釈した試料 1 L を予備凍結槽（CA-1500）で凍結の後，真空凍結乾燥機（FDU-540，東京理化機器）で 24 hr 程度かけて乾燥させた。乾燥後の残留物を直接純水 10 mL に溶解し染色体異常試験に供した。

3. 実験結果と考察

(1) 評価法

表 1 に各濃縮法によって処理水を試料調製したものの染色体異常数とその回収率を示す。表中の濃縮倍率とは，各濃縮法によって処理水中の変異原性物質が 100% 回収されると仮定した際の CHL 細胞培養液に投与される反応生成物量が無希釈・無濃縮で投与した生成物量に対する比で表現したものである。なお，濃縮倍率 2.3 倍では multiple aberration（一つの分裂中期像に交換型異常を含めて各種の異常が数多く見られる場合）や fragmentation（一つの分裂中期像に非常に多くの切断やギャップが現れた場合）¹⁰⁾ と呼ばれる異常が認められ，染色体異常数が定量的範囲を超えたので評価には用いなかった。

試料の希釈および濃縮過程を経ないで染色体異常試験に供した高濃度フミン酸水溶液の塩素処理水とオゾン/塩素処理水の染色体異常数（以下コントロール値とする）と各試料調製法で回収された処理水の染色体異常数の比較によりそれぞれの濃縮法による染色体異常誘発性からみた反応副生成物の回収率が評価できる。今回の試験では固相抽出については濃縮倍率 1.0 倍に対する染色体異常数は検出限界に近く定量的評価は困難であったので，同じ濃縮倍率のオゾン/塩素処理水の染色体異常誘発性がほぼ 100% 程度までに回収されるとき，塩素処理水の染色体異常誘発性はどれだけ回収されているかという相対的な比率によって評価を行った。固相抽出の濃

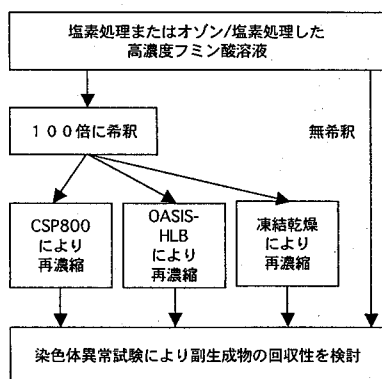


図-2 塩素処理水とオゾン/塩素処理水の染色体異常誘発性の比較に関する試料濃縮過程の影響評価のための実験の概念図。

表-1 各種濃縮法による染色体異常誘発性の回収性の比較.

処理条件: TOC, 750 mg/L; オゾン注入率, 1 mg/mg; 塩素注入率, 2 mg/mg; 塩素処理の反応時間, 1 日.
括弧なしの数字は 100 細胞あたりの染色体異常誘発数を表す. また括弧内の数字は各試料濃縮方法についての
O₃/Cl₂ 処理水の染色体異常数の塩素処理水の染色体異常数に対する比を表す (% 表示). 表中の濃縮倍率につい
ては本文 (2)a) を参照のこと.

濃縮倍率	CSP800		OASIS-HLB	
	塩素処理	オゾン/塩素処理	塩素処理	オゾン/塩素処理
1.2	14	16 (114%)	6	10 (167%)
1.8	37	40 (108%)	130	47 (36%)

濃縮倍率	凍結乾燥法		無希釈	
	塩素処理	オゾン/塩素処理	塩素処理	オゾン/塩素処理
1.0	75	24 (32%)	145	44 (30%)

縮倍率 1.8 倍では OASIS による場合はオゾン / 塩素処理水の染色体異常数は 47 個 /100 細胞であり, ほぼコントロールの値と等しい. また CSP800 による場合も 40 個 /100 細胞であるので, 固相抽出法については濃縮倍率 1.8 倍で比較することとした. 以下この評価方法を中心にまず各濃縮法の特
性, ついで塩素処理とオゾン / 塩素処理の特性について個別に検討する.

(2) CSP800 による固相抽出について

CSP800 により回収されたオゾン / 塩素処理水と塩素処理水の染色体異常数の比はいずれの濃縮倍率でも 100% を超えており, オゾン / 塩素処理水と塩素処理水の染色体異常の大小関係がコントロール実験の結果と逆転した. 従来, オゾン / 塩素処理水の反応生成物ははその極性のために固相抽出法では回収できない可能性が指摘されてきた¹¹⁾. しかしながら, 染色体異常誘発性の回収性からみると CSP800 による試料濃縮過程を経ても上述のようなバイアスは存在せず, 実際にはオゾン / 塩素処理水の染色体異常誘発性の方が数倍程度高い効率で回収されるという逆のバイアスが存在する. この理由として, 本実験の条件下では塩素単独処理においても塩素とフミン酸の反応によっても親水化が進んでおり, オゾン / 塩素処理の反応生成物と親水性の程度が大きく異ならなかったことや, 塩素単独処理の方が親水性の変異原性物質の寄与が大きく, ポリスチレン樹脂である CSP800 による回収率が低かったことなどを可能性としてあげることができが, 現段階で断定することはできない.

以上から, フミン酸水溶液の処理水については, CSP800 による試料調整法について, 逆のバイアスは存在するものの塩素処理に対する前オゾン処理の有効性を安全側から評価することは可能である

といえる.

(3) OASIS-HLB による固相抽出について

OASIS-HLB により回収されたオゾン / 塩素処理水と塩素処理水の染色体異常数の比は濃縮倍率 1.8 倍において 36% で, これは無希釈の場合の比 (30%) に近い. すなわち, OASIS-HLB による試料調整法はフミン酸水溶液の両処理水の染色体異常誘発性の相対的な関係をよく再現できているといえる. これは, CSP800 による方法の場合とは異なり, 塩素処理水の染色体異常誘発性が良好に回収されているためであると考えられる. したがって, OASIS-HLB についても CSP800 同様にオゾン / 塩素処理水の染色体異常誘発性に関わる反応性生成物の回収性が塩素処理に比べて不適切に低いということはない. なお, 濃縮倍率 1.2 と 1.8 の場合では染色体異常数の大小関係が逆転していた. これは両処理の副生成物が異なる用量 - 反応特性をもつためと考えられた. ただし, このバイアスについてもオゾン処理の効果を低く見積もるものではない.

(4) 凍結乾燥法について

濃縮倍率 1.0 で染色体異常数は塩素処理で 52%, オゾン / 塩素処理で 55% 回収された (注: 凍結乾燥法については試料再溶解操作の都合上これ以上

表-2 濃縮倍率あたりの回収率. 単位 %, 各濃縮法によりカウントされた異常数を無希釈の値で除し, さらに濃縮倍率で割った値.

	塩素処理	オゾン/塩素処理
CSP800	8-14	30-50
OASIS-HLB	3-50	19-60
凍結乾燥法	52	55

の倍率で濃縮することはできなかった)。また、各処理水の回収された染色体異常誘発性の比は32%であり、フミン酸水溶液の両処理水の染色体異常誘発性の関係を良好に再現できた。

(5) 塩素処理

塩素処理水の染色体異常誘発性の濃縮倍率あたりの回収性(表-2)は、凍結乾燥法が最も高かった。CSP800とOASIS-HLBによる固相抽出法ではその回収性の大小は濃縮倍率に依存した(表-1)。これはCSP800とOASIS-HLBでは回収する変異原性物質の種類がある程度異なり、その違いがことなる用量-反応特性を示すためと考えられた。

濃縮倍率1.8の値を比較すると、これまで多くの変異原性試験の前処理用の固相カートリッジとして用いられてきたCSP800よりも、場合によってはこれまでのところ変異原性試験では用いられることがほとんどなかったOASIS-HLBの方が塩素処理副生成物の回収性について優れているといえる。今後、より多くの処理条件や試験法で比較検討が進み各濃縮カートリッジの特性が明確になることが期待される。

またAmesテスト用に確立された、固相としてCSP800を、溶出溶媒としてDMSOを用いる方法についても、これまでに確立された試料調整法に基づき予備的な検討を行った。しかしながら濃縮倍率1.2倍では有意な染色体異常を検出できず、DMSOの細胞への影響からこれ以上の投与量は許されなかったため、今回の検討対象からは除外した。

(6) オゾン/塩素処理

オゾン/塩素処理水の染色体異常誘発性の回収能力は3種類の濃縮法で大きく変わらなかった。

(7) 塩素処理水とオゾン/塩素処理水の染色体異常誘発性の比較評価

本研究で用いたいずれの濃縮法においても、オゾン/塩素処理水の染色体異常誘発性は塩素処理水と比べて、不適切に低く評価しているといった従来から懸念されているバイアス問題は認められなかった。逆に、塩素処理水の染色体異常誘発性の回収率がオゾン/塩素処理水のそれより低いという結果を得た。このことから、結果として従来の評価はオゾン/塩素処理水の染色体異常誘発性を相対的に高く推定している可能性があるといえる。両処理水の回収された染色体異常誘発数の比は表-1にあるように濃縮倍率が異なる場合には異なるという点にも注意を払う必要があるが、重要な点はいずれの場合に

もオゾン処理の効果が不当に高く見積もられすぎているということはないという点である。むしろその逆で、例えばオゾン/塩素処理について濃縮過程を経る変異原性試験を行って場合によってはオゾン処理はあまり効果がないというような結果が出る可能性があるが、このような場合にはオゾン処理の効果が不当に低く評価されている可能性があることがわかる。

4. まとめ

本研究では、オゾン/塩素処理水と塩素単独処理水の染色体異常誘発性の比較に関する試料濃縮過程によるバイアスの評価を試みた。その結果、フミン酸水溶液の塩素処理水およびオゾン/塩素処理水の染色体異常誘発性の比較について、従来懸念されていたような原水中の有機物の親水化にともなうオゾン/塩素処理水の樹脂吸着段階でのバイアスは、少なくとも染色体異常試験では認められず、むしろ塩素処理水の染色体異常誘発性の方が回収率が低いという逆のバイアスが存在していること示した。この結果より、試料濃縮過程を経ても塩素処理に対する前オゾン処理の有効性を安全側にたって評価することが可能であることが明らかとなった。

なお、今回の実験では、市販の試薬フミン酸を用いた。今後は、水系由来のNOMを用いたより実際に即した系で確認実験を行う必要がある。

参考文献

- 1) Muramoto, S., Udagawa, T., and Okamura, T.: Effective removal of musty odor in the Kanamachi purification plant, *Water Sci. Technol.*, Vol. 31, No. 11, pp.219-222, 1995.
- 2) Chiron, S., Fernandez-Albal, A., Rodriguez, A., and Garcia-Calvo, E.: Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art, *Wat. Res.*, Vol. 34, No. 2, pp. 366-377, 2000.
- 3) Chaiket, T., Singer, P. C., Miles, A., Moran, M., and Pallotta, C.: Effectiveness of coagulation, ozonation, and biofiltration in controlling DBPs, *J. Am. Wat. Works Assoc.* Vol. 94, No.12, pp. 81-95, 2002.
- 4) Corona-Vasquez, B., Samuelson, A., Rennecker, J. L., and Mariñas, B. J.: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine, *Water Res.* Vol. 36, pp. 4053-4063, 2002.
- 5) von Gunten, U. and Hoigné J.: Ozonation of bromide-containing waters: bromate formation through ozone and hydroxyl radicals, *Disinfection By-products in Water Treatment*, Amy, G. L. and Minear, R. A. eds., Lewis Publishers Inc., pp.187-206, 1995.
- 6) WHO: WHO 飲料水水質ガイドライン(第2版), 日本水道協会, 1996.

- 7) 厚生労働省：水質基準に関する省令（平成15年5月30日厚生労働省令第百一号）<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/syourei.pdf>, 2006年5月23日アクセス, 2003.
- 8) Noot, D. K., Anderson, W. B., Daignault, S. A., Williams, D. T., and Huck, P. M.: Evaluating treatment processes with the Ames mutagenicity assay. *J. Am. Water Works Assoc.* Vol. 81, No. 9, pp. 87-102, 1989.
- 9) Itoh S. and Matsuoka Y.: Contributions of disinfection by-products to activity inducing chromosomal aberrations of drinking water. *Wat. Res.*, Vol. 30, pp. 1403-1410, 1996.
- 10) 日本環境変異原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.
- 11) Richardson S. D., Thurston A. D., Jr., Caughran T. V., Chen P. H., Collette T. W., Floyd T. L., Schenck K. M., Lykins B. W. Jr., Sun G-R., and Majetich, G. : Identification of new ozone disinfection byproducts in drinking water. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 33, 3368-3377, 1999.

(2006. 5. 26 受付)

PERFORMANCE EVALUATION OF OZONE/CHLORINE SEQUENTIAL TREATMENT BY CHROMOSOMAL ABERRATION TEST

Shinya ECHIGO, Sadahiko ITOH, and Tomoki NATSUI

Chromosomal aberration test was performed to evaluate the toxicity of the water treated by ozone/chlorine sequential treatment. The bias caused by sample concentration processes was evaluated for fair comparison of the results of chromosomal aberration test based on the recovery of the activity inducing chromosomal aberrations. It was found that the bias in favor of the ozone/chlorine sequential treatment does not exist. This result confirms the effectiveness of ozonation to reduce the risk of reaction by-products in past evaluations.