

【研究報告】

給水栓水とそのオゾン処理水の変異原性、

エストロゲン活性および免疫毒性

中室克彦,上野仁,奥野智史,川井仁,

梅谷かおり,戎脇登,福田由之,菅原静代

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.7, No.3, 1-5. (2000)

研究報告

給水栓水とそのオゾン処理水の変異原性、 エストロゲン活性および免疫毒性

摂南大学薬学部 中室克彦、上野 仁、奥野智史、川井 仁、
梅谷かおり

田村金属製作所 戎脇 登、福田由之、菅原静代

要約 水道の給水栓水及びその家庭用オゾン水生成器による処理水のエストロゲン様活性、変異原性及び免疫毒性を測定した。給水栓水のXAD-2樹脂カラム-酢酸エチル濃縮画分は塩基対置換型直接変異原性と比較的弱いエストロゲン様活性を示した。しかし、一定量の17 β -エストラジオールに濃縮画分を共存させた場合はそのエストロゲン活性を抑制した。これら給水栓水で認められた変異原性及びエストロゲン様活性はオゾン-活性炭処理によって低下した。また、給水栓水およびオゾン処理水いずれにも免疫毒性は認められなかった

キーワード： 水道水、オゾン水、変異原性、エストロゲン様活性、免疫毒性

1. はじめに

大都市近傍において水道原水となっている都市河川水中には複雑多岐にわたる微量有機汚染物質を含有することが考えられる。これらの中には発がん性や変異原性を有するものも多く同定されている^{1)・2)}。また、環境庁³⁾や建設省⁴⁾の内分泌攪乱作用が疑われる物質の分布調査によって河川、湖沼等の環境水中にエストロゲン様活性を有する物質の存在が認められている。しかし、これら河川水や湖沼水を原水とする水道水のエストロゲン様活性については、ほとんど検討されていないのが現状である。そのため、今回は水道における給水栓水についてエストロゲン様活性を測定するとともに変異原性および免疫毒性について把握し、さらに給水栓に家庭用オゾン水生成器を直結して用いた時のオゾン処理水およびオゾン処理後の活性炭処理水についてもこれら活性の挙動を明らかにするための検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1. 試料の採取

摂南大学薬学部環境衛生学研究室の給水栓水およびこれに直結した家庭用オゾン水生成器(田村金属製作所製TMO-05)からオゾン処理水とオゾン処理後の活性炭処理水(オゾン-活性炭処理水)を開栓後3、4分経過した後に採水した。なお、本オゾン水生成器の溶存オゾン濃度は平均0.4 mg/L(水量3 L/min)である。オゾン処理水については、溶存オゾンのないことを確認してから濃縮操作を行った。

2.2. 試料水の濃縮法

2.2.1. XAD-2樹脂カラム濃縮法¹⁾

洗浄済みXAD-2樹脂(オルガノ(株))を充填したカラムに、予めpH 2に調整した試料水60 Lを通水して可溶性有機物質を吸着させた。通水後、カラム内の水を除去し、酢酸エチルおよびメタノール各500 mLを用いて順次溶出させた。濃縮乾固後、残留物をジメチルスルホキシド(DMSO)1 mLに溶解したものをそれぞれ酢酸エチル濃縮画分およびメタノール濃縮画分とした。

2.2.2. Sep-Pak CSP800樹脂カラム濃縮法

洗浄済みSep-Pak CSP 800樹脂カートリッジ(Waters社製)を用い、予め0.05 Nチオ硫酸ナトリウムで残留塩素を除去した試料水6 Lを約50 mL/minの上向流で通水した。通水後、DMSOを用いて逆方向に約0.15 mL/min

で溶出し、最初の1 mLを捨てた後、つぎの3 mLの溶出液を分取し、濃縮画分とした。

2.3. Ames assay⁵⁾

各濃縮画分を濾過滅菌後、*Salmonella typhimurium* TA98およびTA100株を用いて変異原性試験を行った。S9mixはフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボン処理で誘導したラット肝S 9 (和光純薬工業製)を用いて調製した。

2.4. エストロゲン様活性の測定⁶⁾

GAL4DNA結合領域-ホルモンレセプターリガンド結合領域とGAL4活性化領域-Coactivatorを含むプラスミド導入酵母Y190を用いたTwo-hybrid法で測定した。一晚培養した酵母前培養液に被検物質を加え30℃で4時間培養した後、生菌数として630nmにおける吸光度を測定した。残りの培養液を遠心分離後、zymolyase処理で菌体を破壊し、遊離するβ-galactosidaseをo-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideを基質として加え、30℃で18時間反応させたときに生成するo-nitrophenolを405 nmと560 nm (バックグラウンド)における吸光度を測定することによって活性を求めた。なお、β-galactosidase活性は以下の計算式に従って算出した。

$$U = 1000 \times [(A_{405}) - (1.75 \times A_{560})] / (V \times (A_{630})) \quad (V: \text{assay容量(mL)})$$

試料水のエストロゲン様活性は、 $10^{-10} \sim 10^{-9}$ mol/Lの濃度範囲の17β-エストラジオールによる検量線から17β-エストラジオール等量値として表した。

2.5. マウスリンパ球幼若化反応を利用した免疫毒性評価⁷⁾

T細胞およびB細胞の幼若化反応にはBALB/c系およびC3H/He系雄性マウス (7週齢) をそれぞれ用いた。マウスの脾臓からflashing法により得られた細胞をRPMI-1640培地懸濁液とし96穴マイクロプレートに 1×10^5 cells/0.2mL/wellとなるように調製した。MitogenとしてT細胞にはconcanavalin A (2μg/mL) を、B細胞にはlipopolysaccharide (100μg/mL) を加え、被検物質は最終濃度0.1nM~10μMの5段階で曝露した。37℃、5%CO₂条件下で4日間培養した。培養後細胞を洗浄し、0.05%SDS溶液200μlを添加して細胞を溶解した。次に50mg/mL ethidium bromide溶液100μlを加えDNAと結合させ、波長515nmの励起光で620 nmの蛍光強度を測定した。これを総DNA量の指標として細胞増殖率を求めた。

3. 結果および考察

3.1. 給水栓水およびそのオゾン水生成器通過処理水の変異原性

水道における給水栓水と家庭用オゾン水生成器より得られたオゾン処理水およびオゾン-活性炭処理水のTA98±S9mixに対する変異原性を検討した結果、XAD-2 樹脂カラム濃縮法およびSep-Pak CSP800樹脂カラム濃縮法のいずれの濃縮画分もフレームシフト型の直接および間接変異原性は認められなかった。しかし、図1に示すように、TA100に対する変異原性を検討した結果、給水栓水は塩基対置換型の比較的高い直接変異原性を示した。この変異原活性はオゾン処理およびその後の活性炭処理によって低下または消失することが認められた。一般に水道水は、塩素消毒により、生成する塩素消毒副生成物に起因する塩基対置換型変異原性を有することが報告されていること^{2), 8)}と一致した。

これらの結果から家庭用オゾン水生成器を用いることによって給水栓水が通常有する塩基対置換型変異原性を低減化しうることが考えられた。

3.2. 給水栓水およびそのオゾン水生成器通過処理水のエストロゲン様活性

給水栓水とそのオゾン水生成器による処理水のXAD-2 樹脂カラム濃縮画分のエストロゲン様活性について検討した結果を図2に示す。

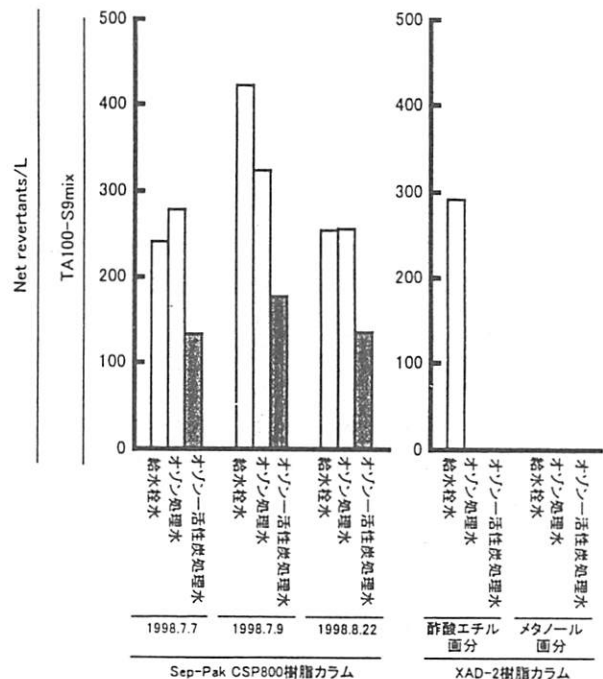


図1 給水栓水とそのオゾン処理水およびオゾン-活性炭処理水のTA100に対する直接変異原性

すなわち、給水栓水はXAD-2樹脂カラム-酢酸エチルおよびメタノール濃縮画分のいずれも弱いエストロゲン様活性を示した。しかし、オゾン処理水およびオゾン-活性炭処理水のいずれの濃縮画分においてもエストロゲン様活性が認められなかった。このことから給水栓水のエストロゲン様活性はオゾン処理によって低減化することが考えられた。ここでエストロゲン様活性が検出されたのは、60000倍濃縮物を用いたためであり、淀川水系河川水では10000倍濃縮物で検出されている⁹⁾ことから、給水栓水のエストロゲン様活性は河川水に比べて1/6と弱いことが判明した。

給水栓水が低いエストロゲン様活性を示すことおよび著者らはすでに淀川水系河川水のXAD-2樹脂カラム濃縮物が17β-エストラジールのエストロゲン活性を減弱させることを認めていること⁹⁾から、17β-エストラジールのエストロゲン活性に対する試料水のXAD-2樹脂濃縮画分が

及ぼす影響について検討した。その結果、図3に示すように、これら試料水のXAD-2樹脂カラム-酢酸エチルおよびメタノール濃縮画分はいずれも17β-エストラジールによるエストロゲン活性を40~80%抑制することが認められた。次に、17β-エストラジールを酵母に前処理して一定時間経過後、濃縮

画分を添加して検討を行った。その結果図4のごとく、給水栓水のXAD-2樹脂カラム-メタノール濃縮画分において5分経過後に処理した場合はすでに17β-エストラジール単独での活性にほぼ回復したが、酢酸エチル濃縮画分では30分経過後に濃縮画分を処理した場合でも17β-エストラジール単独処理時の約50%が抑制されたままであった。また、濃縮画分の添加量を減少させることによって17β-エストラジールによるエストロゲン活性が徐々に回復し、給水栓水ではいずれの濃縮画分も0.1 μL(標準添加量の1/25)の低処理量にすると影響のないことが認められた(図5)。

以上の結果から、給水栓水中にはエストロゲン様活性を示す物質と、この活性を抑制する物

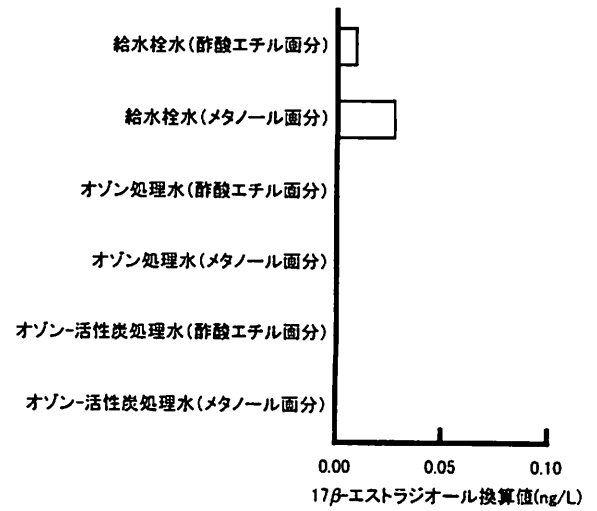


図2 給水栓水とそのオゾン処理水およびオゾン-活性炭処理水のXAD-2樹脂カラム濃縮画分におけるエストロゲン様活性

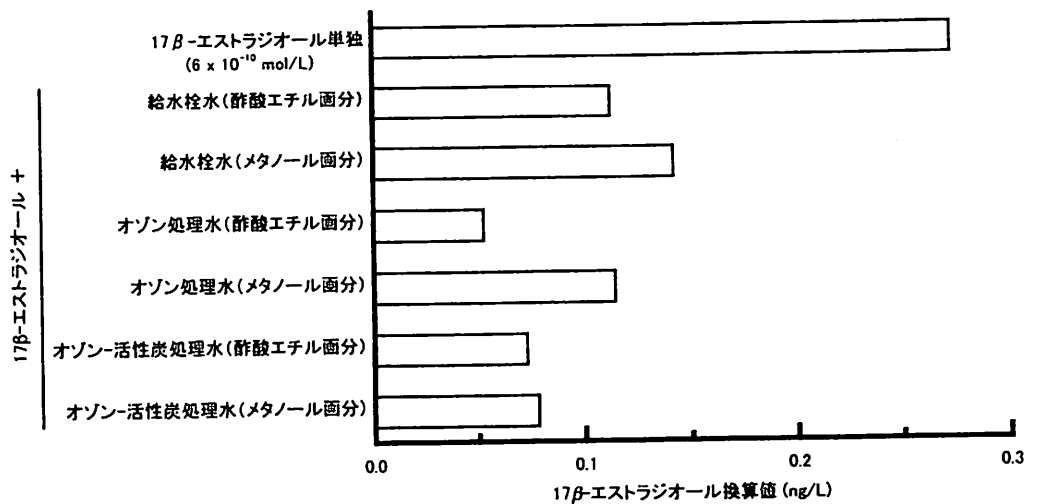


図3 17β-エストラジールのエストロゲン活性に及ぼす各種処理水濃縮画分の影響

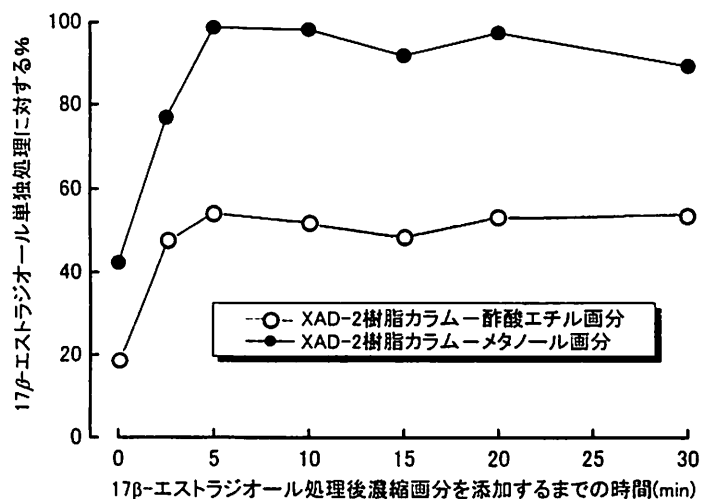


図4 17β-エストラジールのエストロゲン活性に及ぼす給水栓水濃縮画分添加における時間差の影響

質が給水栓水中に含有することが考えられるが少なくともエストロゲン様物質はオゾン処理によって分解・低減化されやすいことが示唆された。

3.3. 給水栓水およびそのオゾン水生成器通過処理水の免疫毒性

給水栓水とそのオゾン水生成器による処理水のXAD-2樹脂カラム濃縮画分の免疫毒性について検討した結果を図6に示す。すなわち、給水栓水、オゾン処理水およびオゾン-活性炭処理水のXAD-2樹脂カラム-酢酸エチルおよびメタノール濃縮画分のいずれの濃縮画分においてもT細胞およびB細胞のいずれに対してもマウスリンパ球幼若化を特異的に抑制することは認められなかった。これらの結果から給水栓水およびそのオゾン水生成器通過処理水は免疫毒性を示さないことが考えられた。

4. まとめ

給水栓水および家庭用オゾン水生成器による処理水のエストロゲン様活性、変異原性および免疫毒性について検討を行った結果、以下に示す知見が得られた。

- 1) 給水栓水は塩基対置換型の直接変異原を示すとともに弱いエストロゲン様活性を示した。
- 2) 給水栓水で認められた直接変異原活性および弱いエストロゲン様活性は、家庭用オゾン水生成器のオゾン処理およびその後の活性炭処理によって低下または消失した。
- 3) 給水栓水中にはエストロゲン様活性を示す物質と抑制する物質の存在が考えられたが、少なくともエストロゲン様物質はオゾン処理によって分解・低減化されやすいことが示唆された。
- 4) 給水栓水および家庭用オゾン水生成器による処理水にはリンパ球幼若化反応を用いた免疫毒性は認められなかった。

5. 引用文献

- 1) Sayato Y., Nakamuro K., Ueno H., Johtatsu Y., Goto R., Hasegawa T., Hayatsu H. and Sakamoto H.: Comparative studies on preconcentration methods for detecting the organic mutagens in water. *Eisei Kagaku*, 37, 197-204 (1991).
- 2) Sayato Y., Nakamuro K., Goto R. and Ueno H.: Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water. *Mutation Res.*, 300, 207-213 (1993).
- 3) 環境庁:「水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)の実態概況調査(夏季)結果(速

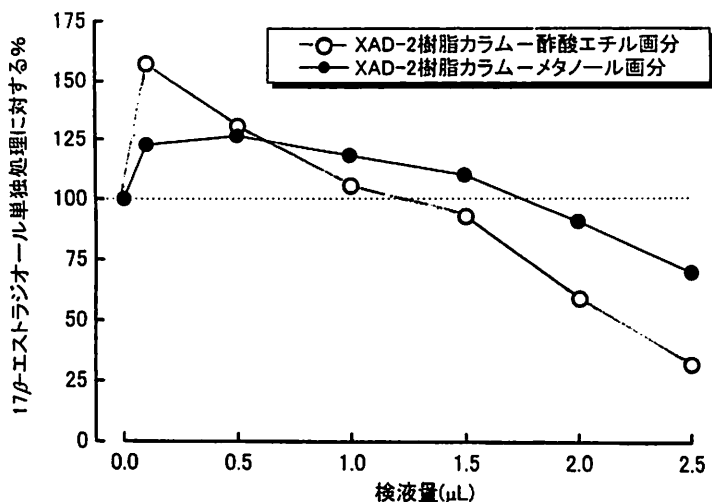


図5 17β-エストロジオールのエストロゲン活性に及ぼす給水栓水濃縮画分の検液量の影響

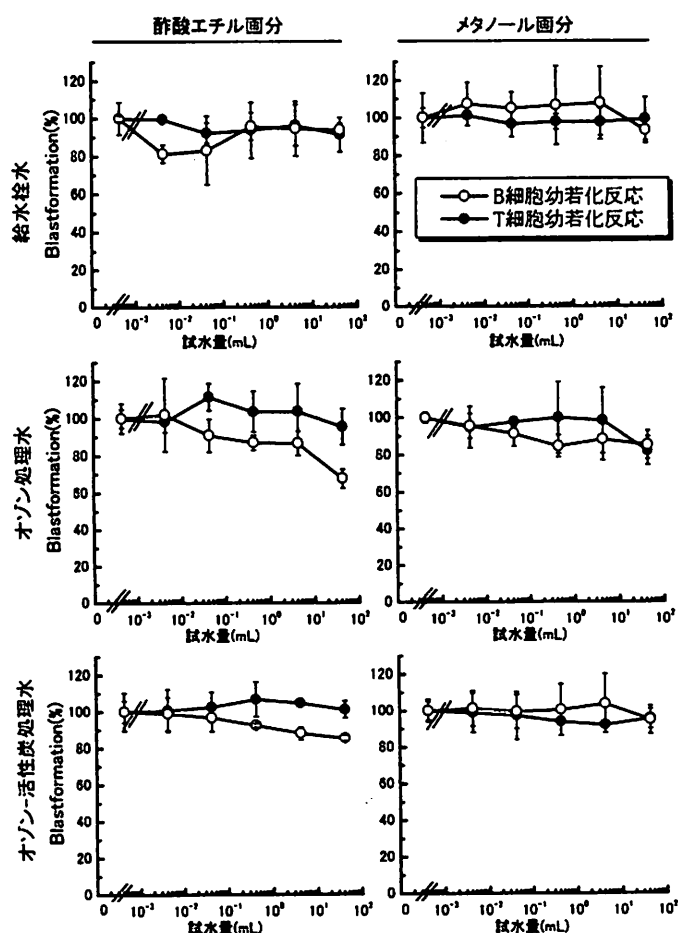


図6. 給水栓水、オゾン処理水およびオゾン-活性炭処理水のXAD-2樹脂カラム濃縮画分のマウスリンパ球幼若化反応に及ぼす影響

- 報)」について、1998年12月。
- 4) 建設省:「平成11年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果(春期・夏期調査)について」、1999年11月19日。
 - 5) Maron D.M. and Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215 (1983).
 - 6) Nishikawa J., Saito K., Goto J., Dakeyama F., Matsuo M. and Nishihara T.: New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, 76-83 (1999).
 - 7) 環境庁 未来環境創造型基礎研究推進制度平成10年度報告書:化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発に関する研究、p13、1999。
 - 8) Nakamuro K., Ueno H. and Sayato Y.: Mutagenic activity of organic concentrates from municipal river water and sewage effluent after chlorination or ozonation, *Wat. Sci. Tech.*, 21, 1895-1898 (1989).
 - 9) 中室克彦、川井 仁、梅谷かおり、坂崎文俊、奥野智史、上野 仁、西川淳一、西原 力:酵母Two-hybrid法による河川水中エストロゲン活性物質の評価、日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究発表会要旨集、p76 (1999).
-

解説

食品産業におけるオゾンの利用(5)

— 食品変敗防止へのオゾンの利用技術(その2) —

愛知県食品工業技術センター 内藤 茂三

1. はじめに

和洋菓子の変敗を起こさせる酵母とは、製造された和洋菓子が保存、流通段階において好ましくない現象を発生させる酵母のことである。和洋菓子は植物性原材料を使用し、糖類を多量に使用するので酵母により変敗が起きやすい。その変敗現象は、酵母菌体付着による斑点生成、アルコール発酵、ガス発生、エステル生成、酸生成等が多い。また酵母は有機酸類を資化する場合が多く、食品のpH調整に用いられている酢酸、乳酸、クエン酸が資化されてpHが高くなり、細菌の増殖が促進される場合もある。さらに酵母は保存料に対しても抵抗力のあるものが多く、*Rhodotorula*に属する数種の酵母は0.25%の安息香酸を炭素源としてpH 4.5でよく増殖し、*Saccharomyces rosei*は0.25%のプロピオン酸(pH 4.5)、*Brettanomyces intermedius*は0.1%のソルビン酸存在下で良好に増殖する。このように保存料で酵母の増殖を阻止することは極めて困難である。しかしこれらの酵母により食品が腐敗、変敗しても食品が有毒化して食中毒の原因になることはほとんどない。酵母の代謝産物には毒性がないし、一部の酵母において酵母菌自体に病原性(*Candida albicans*)があるといっても細菌類や他の真菌類で起こるように、酵母自身が食物を通じて感染症や中毒症の原因になることはない。そこで今回、酵母による和洋菓子の変敗現象とオゾンによる防止方法についてとりまとめた。

2. 酵母による和洋菓子の変敗現象

(1) 酵母のパスツール効果とクラブツリー効果

酵母の酸素呼吸によってグルコースの一部が炭酸ガスと水になることをパスツール効果といい、グルコースの存在によって酸素呼吸が抑制されアルコール発酵が起きる現象をクラブツリー効果と呼ぶ。またクラブツリー効果は絶対好気条件下でのアルコール発酵の出現と定義された¹⁾。酵母は一般的にアルコール発酵を行い、1モルのグルコースを2モルずつのエタノールと炭酸ガスに変える。しかし*Saccharomyces cerevisiae*は、エタノールやグリセリンなどの発酵によって利用できない化合物と同様に、グルコースをも呼吸に利用出来る代謝能力を備えている。0.1%以下のグルコース存在下で、空気の供給があればグルコースを炭酸ガスと水に変換する。*Saccharomyces cerevisiae*は生育の条件により発酵と呼吸とを交互に切り替えることができる。つまり好気、グルコース制限下で生育した菌体に充分量のグルコースを添加すると、ただちにアルコー