

長距離輸送大気と家庭排水の遺伝子毒性の評価および
原因物質の毒性寄与率に関する研究

2022年3月

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

柏汶志(Bai Wenzhi)

目次

| | |
|---|----|
| 第一章 緒言 | 1 |
| 1.1 研究背景 | 1 |
| 1.2 遺伝子毒性とその評価方法 | 7 |
| 第二章 長崎県内で観測された長距離輸送大気中の多環芳香族炭化水素類 (PAHs)の濃度と遺伝子毒性の季節変動 | 10 |
| 2.1 研究背景と目的 | 10 |
| 2.2 実験方法 | 11 |
| 2.2.1 試料の採取 | 11 |
| 2.2.2 PAHs の分析 | 12 |
| 2.2.3 umu 試験に用いられた菌株 | 14 |
| 2.2.4 umu 試験 | 14 |
| 2.2.5 データの解析 | 15 |
| 2.2.5.1 後方流跡線解析 | 15 |
| 2.2.5.2 排出源の推定 | 16 |
| 2.3 結果と考察 | 16 |
| 2.3.1 後方流跡線解析 | 16 |
| 2.3.2 PAHs の濃度と総遺伝子毒性 | 18 |
| 2.3.3 越境汚染の寄与 | 20 |
| 2.3.4 季節変動 | 20 |
| 2.3.5 PAHs の発生源の解析 | 23 |
| 第三章 4 種類の家庭排水処理方式による排水の遺伝子毒性比較 | 26 |

| | | |
|---------|---------------------------------|----|
| 3.1 | 研究背景と目的 | 26 |
| 3.2 | 実験方法 | 26 |
| 3.2.1 | 水試料の採取 | 26 |
| 3.2.2 | umu 試験 | 26 |
| 3.3 | 異なる処理方式からの家庭排水の毒性の測定結果 | 30 |
| 3.3.1 | 水試料における増殖阻害 | 30 |
| 3.3.2 | 水試料の遺伝子毒性の結果 | 31 |
| 3.3.3 | -S9 と+S9 試験結果の比較 | 33 |
| 3.4 | 本章の考察 | 34 |
| | | |
| 第四章 | 家庭排水中の種々の酸塩基特性を示す遺伝子毒性物質の割合 | 37 |
| 4.1 | 研究背景と目的 | 37 |
| 4.2 | 実験方法 | 38 |
| 4.2.1 | 水試料の採取 | 38 |
| 4.2.2 | 水試料の濃縮 | 39 |
| 4.2.2.1 | 逆相系固相抽出カートリッジと活性炭カートリッジを用いた濃縮方法 | 39 |
| 4.2.2.2 | 4種類のイオン交換逆相系カートリッジを用いた濃縮方法 | 41 |
| 4.2.3 | umu 試験 | 45 |
| 4.3 | 実験結果と考察 | 45 |
| 4.3.1 | 濃縮時の吸着剤の種類と pH の違いによる遺伝子毒性の強度 | 45 |
| 4.3.2 | 様々な処理方式からの排水に含まれる遺伝子毒性物質の酸塩基特性 | 48 |
| 4.3.3 | イオン交換カートリッジで酸塩基特性別に分画した各濃縮液の遺伝 | |

| | |
|--------|----|
| 子毒性強度 | 51 |
| 第五章 結言 | 55 |
| 参考文献 | 58 |
| 謝辞 | 74 |

第一章 緒言

1.1 研究背景

世界各国において、人口増加や急速な工業化などによる環境問題が深刻になっている。これらの問題の改善も含め、2030年までによりよい世界を目指すために、17の持続可能な開発目標（Sustainable Development Goals, SDGs）が2015年9月の国連サミットで採択された。この中で、以下の三つのGoalsが人の健康や安全な生活に関連し、その中のいくつかは大気の質に関連している。すなわち、SDG 3は「あらゆる年齢のすべての人々の健康的な生活を確保し、福祉を促進する」であり、これを達成するためのTarget 3.1~3.8では伝染病や非感染性疾患などが述べられているが、Target 3.9は大気や水質からの汚染物質等の暴露による死亡の減少を目指し、Indicator 3.9.1で大気汚染、3.9.2で水質汚染による死亡率の関連が言及されている。また、SDG 7「すべての人々の、安価かつ信頼できる持続可能な近代的なエネルギーへのアクセスを確保する」ではクリーンエネルギーの普及が提案され、この目標の達成により生活の質の向上と大気汚染の改善が実現できるとされている。更に、SDG 11「包括的で安全かつレジリエントで持続可能な都市および人間居住地を実現する」の中のIndicator 11.6.2では都市部の大気を監視対象とし、粒子状物質の濃度を低減する必要性が示されている。

世界保健機関(WHO)の2016年の報告によると、大気汚染による疾病は全世界で年間約650万人の死亡を引き起こし、この死亡者の36%が肺がん、34%が脳卒中、27%が心臓病に関連していたと推定されている¹⁾。また、世界人口の92%がWHOのAir Quality Guidelineに記載されたPM_{2.5}濃度(年平均10 µg/m³)を超える地域に住んでいると推定されている^{1,2)}。以上のことから、大気汚染は他の汚染、例えば水質汚染などよりも比較的人間の健康に有害な影響を及ぼす

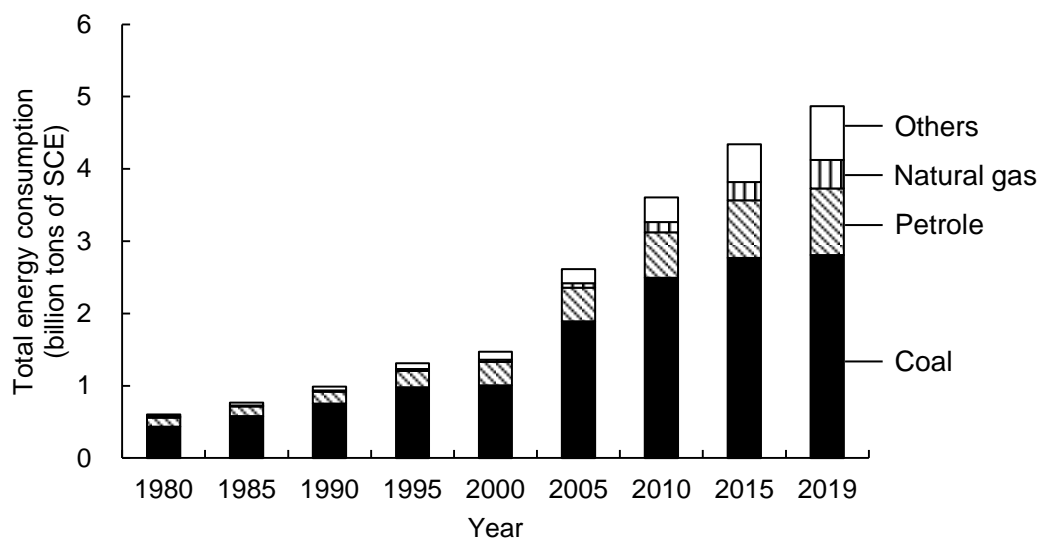


Fig. 1.1 Changes in China's primary energy consumption converted to standard coal equivalent (SCE).

ため、大気汚染を定期的に監視して改善することは、人間の健康への悪影響の軽減の観点から非常に重要である。

近年、東シナ海に面する数カ国の急激な経済発展に伴う化石燃料の消費量の増加が、大気汚染の主要な原因となっている。特に中国では、主要なエネルギー源である石炭の燃焼に加え、大都市部を中心とした自動車交通量の増加が大気汚染を深刻化している。中国統計局で公開されている中国国内の一次エネルギー消費量(石炭換算量、standard coal equivalent: SCE)の推移を Fig. 1.1 に示した³⁾。2019 年における石炭と石油の年間消費量は 1980 年よりそれぞれ 6.5 倍と 7.4 倍に増加した。また、石炭の消費量は石油より 3 倍ほど高かった。一般に石炭の燃焼は石油と比べて燃焼温度が低く、不完全燃焼物が発生しやすい特徴がある。この不完全燃焼によって多環芳香族化合物類 (polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs) のような有害物質が発生する。

多環芳香族化合物類 (PAHs) は近年の代表的な環境汚染物質の一つであり、

内分泌かく乱作用や急性毒性や遺伝子毒性などを有することが知られている。PAHs はベンゼン環を 2 個以上持つ化合物の総称である。これらの物質は、大気^{4, 5)}、湖と海^{6, 7)}、堆積物⁸⁻¹⁰⁾と土壌^{8, 11)}などのあらゆる場所から検出されている。PAHs の排出源は 90%以上が燃焼由来とされており、残りは燃料などからの直接漏洩である¹²⁾。主な発生源は、人為的発生源として、コークス製造、石炭の転化、石油精製、工場におけるアルミニウム、鉄や鋼管の製造、発電所、住宅暖房や調理、廃棄物の燃焼、自動車の排気および喫煙などがある。また、非人為由来としては森林火災、火山活動などが挙げられる。これらの発生源より PAHs は環境中に放出される。気温によっても若干左右されるが、大気中において、2~3 環 PAH はガス状、4 環はガス状と粒子状、5 環以上は粒子状で存在することがよく知られている。また、PAHs は粒子状物質（砂、粉塵等のエアロゾル）に付着した状態でも存在する。

これらの中国で発生した PAHs などの汚染物質が季節風や偏西風の気象学的要因により大陸から日本列島に運ばれてくる頻度が高いことが予想される。日本では、この越境大気汚染による健康影響の増大が懸念されている^{13~15)}。2013 年 1 月、中国での大規模な大気汚染が報道され、日本国内でも越境汚染に対する関心はさらに高まり、微小粒子状物質（PM_{2.5}）濃度が全国の自治体により公表され始めた。大気中の粒子状物質（PM）は燃焼によって生じる煤塵、黄砂等の土壌粒子、海塩粒子、化石燃料の燃焼により発生した化学物質が形成した粒子などからなる。その中でも PM_{2.5} は微小であるため、ヒトの呼吸器に直接影響する可能性が考えられている。本研究の前半では、上述した越境大気を研究対象とし、粒子状物質に付着した化学物質の総遺伝子毒性強度と各種 PAHs の濃度を測定することを目的とした。

一方、SDGs 6 は「すべての人々の水と衛生の利用可能性と持続可能な管理を

確保する」であり、水の安全性、下水処理、安全な再利用の重要性が確認されている。Target 6.1 と 6.2 はそれぞれ安全な飲料水と下水処理が述べられた。Target 6.3 は汚染の減少と有害化学物質の最小限の排出を言及し、Indicator 6.3.1 は家庭排水を安全に処理することを目標とされた。世界の都市部では、家庭排水は主に下水処理場により処理されている。しかし、先進国のアメリカと日本でさえ下水道の人口普及率はそれぞれ 76 と 78%であり、約 1/4 の人口は下水道が普及されていない土地に住んでいる¹⁶⁾。このような地域は一般に人口密度が低く、山間部や郊外であり、浄化槽のような小型の下水処理施設がよく使われている。アメリカ、日本とアイルランドにおける小型下水処理施設の使用率はそれぞれ 20%、9.5%と 33%である¹⁷⁻¹⁹⁾。世界中で古いタイプの浄化槽は嫌気性処理のみが多かったが、好気性処理が汚濁を浄化する能力が高いため、現在はエアレーションする浄化槽が増えている。さまざまな化合物が含まれた家庭排水は、住宅地の近くにある川や湖に放流され、人間の健康へのリスクを高めている。これは、処理された河川水が水道水として使用されることがあるためでもある。いくつかの国では、水道水から遺伝子毒性が検出されたと多く報告されている²⁰⁻²³⁾。この原因は、飲料水水源が抗生物質や消毒剤や有機ハロゲンなどの遺伝毒性物質により汚染されていること²⁴⁾、または浄水処理の過程で遺伝子毒性を有する消毒副生成物が生成された可能性があることによる^{25, 26)}。これらの遺伝毒性物質による DNA ダメージが修復されない場合、遺伝子変異または染色体異常が生じる可能性がある。これは細胞がん化の原因の一つとなっている。

家庭排水には、主にトイレからのし尿とそれ以外の排出源からの生活雑排水が含まれている。日本において、都市が運営する下水処理場の下水管が普及されていない地域では Fig. 1.2 に示された 4 種類の小型処理施設を利用し、家庭排

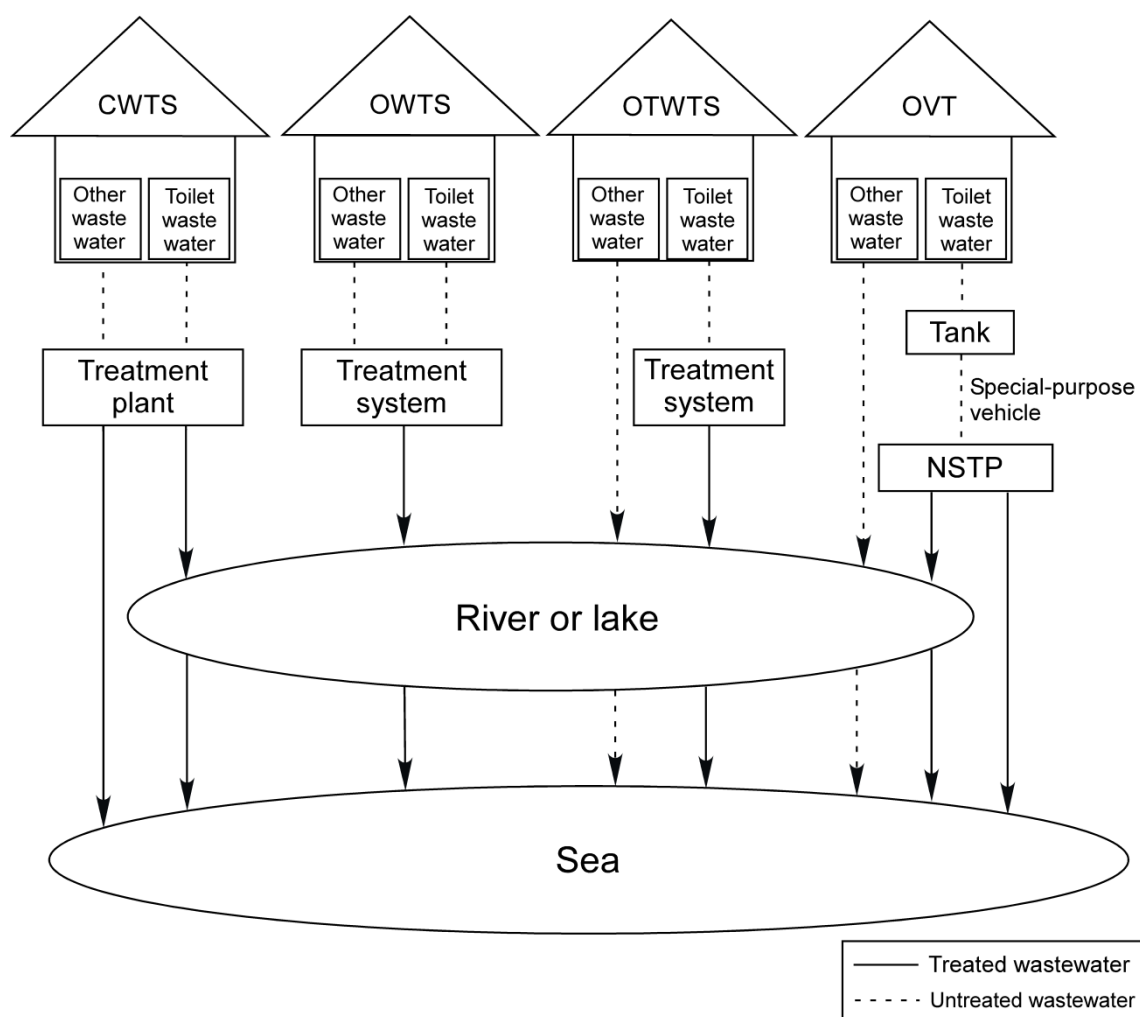


Fig. 1.2 Four kinds of small-scale household wastewater treatment system utilized in uncovered areas of sewerage system in Japan and the discharge destination of these effluents.

CWTS: community wastewater treatment system; OWTS: on-site wastewater treatment system; OTWTS: on-site toilet wastewater treatment system; OVT: on-site vault toilet; NSTP: night soil treatment plant.

水を処理している。すなわち、コミュニティプラント (community wastewater treatment system, CWTS)、合併浄化槽 (on-site wastewater treatment system, OWTS)、単独浄化槽 (on-site toilet wastewater treatment system, OTWTS)、汲み

取り槽(on-site vault toilet, OVT)である。小規模な自治体などが運営するコミュニティプラントは、小型の下水処理施設として住宅団地に設置され、その地域の約 50-200 世帯分の家庭排水を処理している。コミュニティプラントは、これらの 4 種の処理施設の中で汚濁の浄化能力がもっとも高いと言われている。合併浄化槽は山林を切り開いて新しく造成した住宅地でよく利用され、各家の駐車場の下にタンクを設置するのが一般的である。コミュニティプラントのように複数の家屋からの排水を処理するのではなく、一世帯分のみ家庭排水を処理し、河川に放流する。日本においては、一部の海外で使用されている septic tank と異なり、処理水を地中に浸透させることはほぼない。単独浄化槽は、合併浄化槽より古く、し尿のみ処理し、生活雑排水が未処理のまま河川に放流される。単独浄化槽からの排水は、合併浄化槽放流水より環境への負荷が高いと報告されている。たとえば、Tanaka et al.²⁷⁾の報告によれば単独浄化槽と合併浄化槽からの排水の BOD はそれぞれ 36-50 と 10-18 mg/L である。日本では、環境負荷を低減するために、単独浄化槽の新設は 2011 年から禁止されたが、今でも使用中のものが残っている。汲み取り槽は、生活雑排水が単独浄化槽と同じように未処理のまま放流される一方、すべてのし尿がタンクに貯められ、月一回程度でし尿処理場に専用の車で吸引・搬送され、そこで処理される。このため、汲み取り槽の地域から採取した水試料には、原則としてし尿排水およびその処理水は含まれていないはずである。汲み取り槽は現在古い住宅地にしか存在しないが、新設されることがほとんどない。汲み取り槽以外の三種類の小型処理施設は、有機物を分解するためにエアレーションを行っている。本研究の後半では、これらの処理施設から放流された家庭排水を研究対象として、この家庭排水の遺伝子毒性および原因物質の官能基の酸塩基特性を調べることを目的とした。

1.2 遺伝子毒性とその評価方法

産業活動により大量な化学物質が環境中に放出されている。これらの化学物質は様々な毒性を有し、生物に影響を及ぼす場合がある。その影響、すなわち作用の種類には、例えば、遺伝子毒性、急性毒性、慢性毒性、生殖毒性などがある。環境中には多種多様な化学物質が含まれているが、それらの濃度をすべて測定し、それぞれの毒性を個別に測定することは不可能であり、従来の手法である化学分析だけで水や大気を監視・評価するには不十分である。そのため、化学物質の毒性を総括的に評価できるバイオアッセイ試験が非常に有用となり、これを用いて、環境試料の毒性を評価することも環境の監視・評価の指標の一つとして認められつつある。

上述したいくつかの種類毒性において、遺伝子毒性はその他の毒性と作用期間が異なっている。一般に、急性毒性や慢性毒性などは、一定の濃度を超えると直ちにその種の影響が及ぼされる。一方、遺伝子毒性では、外来性の化学物質などの要因により DNA 損傷や染色体異常が引き起こされ、数か月から年単位で影響が出現し、場合によっては次世代に伝達されることもある。この遺伝子毒性はがん化の原因の一つである。日本の厚生労働省の公表データによると、悪性腫瘍は 2020 年の死因順位の一位であり、27.6%を占めている²⁸⁾。発がん性を有する化学物質の環境基準値は通常毒性物質の基準値よりも数桁低く設定されていることもあり、特に警戒しなければならないと考えられている。このようなことから、本論文は遺伝子毒性に注目し、以下でその評価方法について説明する。

これまでに提案されている遺伝子毒性を評価する手法には、コメットアッセイ、UDS 試験、小核試験、Ames 試験、umu 試験などがある。この中で最も高頻度で用いられているのは Ames 試験と umu 試験である。Ames 試験は、1975

年代に生物化学学者の Ames らにより開発された²⁹⁾。これまでに数多くの研究例があるが³⁰⁻³⁴⁾、試験期間が 2-3 日間であり比較的長く、一つの検体につき一つのシャーレを用いるために一度に多数の試料を試験しづらい、菌の特異性によって複数の菌株が必要である、ヒスチジンを含有した試料の測定ができない等の欠点が言われている。

これに対して、本研究で使用した umu 試験は 1985 年に Oda ら³⁵⁾により開発された。この umu 試験は 2000 年に国際標準化機構(ISO)により水中の遺伝子毒性の評価方法 ISO13829³⁶⁾として採用された。また、ドイツの排水令(DIN 38415 T3)³⁷⁾にも公定法として記載されるなど、世界的にも認められたアッセイの一つである。umu 試験は約 7-8 時間で前培養から測定するまでを済ませることができ、Ames 試験と比較すると処理速度の点で速いメリットがある。また、umu 試験では 96 ウェルマイクロプレートを使用するため、同時に 5-6 個の試料が測定でき、12 個のウェルで一つの試料を測定するため、統計処理に必要なデータが入手できる。umu 試験は多種多様な試料の遺伝子毒性評価に用いられており、例えば、大気試料^{38, 39)}、河川水^{22, 40-41)}、食品⁴²⁾、医薬品^{43, 44)}、化学物質の純品^{42, 45)}および各種の公共的な水処理施設からの放流水(たとえば、下水処理場^{22, 46-48)}、し尿処理場⁴⁷⁾、再生水処理場^{48, 49)}、浄水場^{50, 51)})等の遺伝子毒性を測定した報告がある。

umu 試験の原理を Fig. 1.3 に示した。細菌内で遺伝子毒性が起こっていないときには、SOS 遺伝子群の発現は、lexA 遺伝子によって作られる LexA タンパク質によって抑制されている。DNA 損傷が起こると、recA 遺伝子が産み出す RecA タンパク質が損傷部位に結合して RecA タンパク質の活性化が起こる。この活性化した RecA タンパク質が SOS 遺伝子群の発現を抑制している LexA タンパク質を分解し、SOS 遺伝子群の発現が起こる。SOS 遺伝子群が発現すると

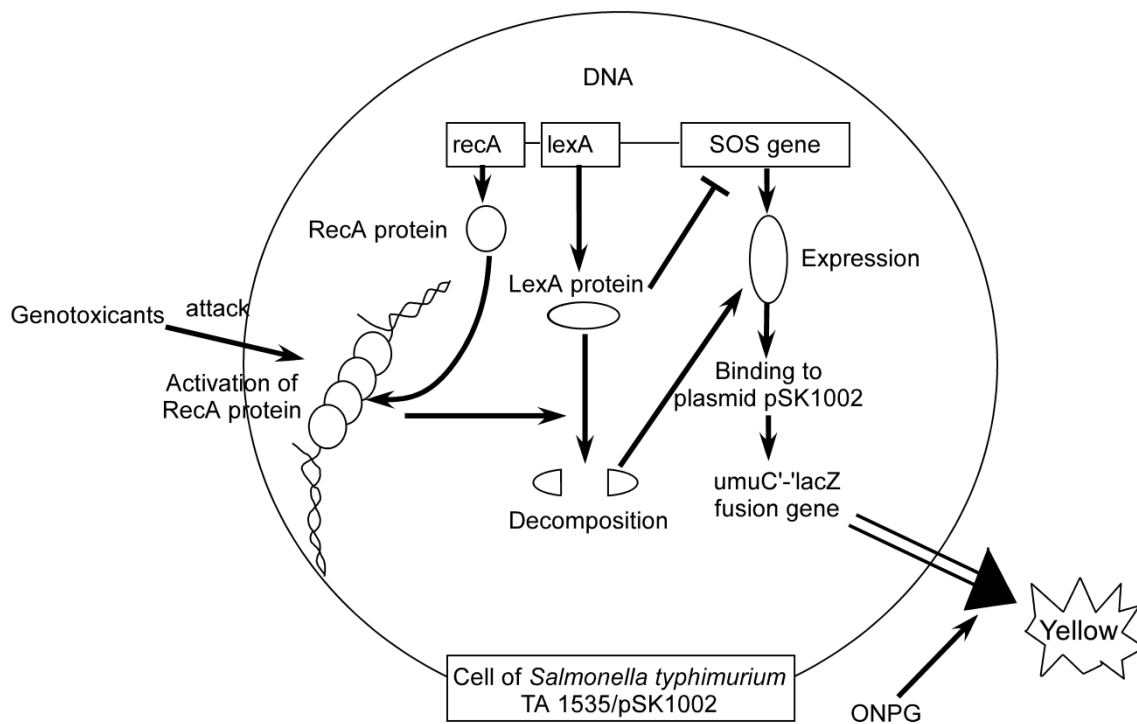


Fig. 1.3 Mechanism of intracellular reaction in umu test using *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 after exposed to genotoxicants and color development.

β -ガラクトシダーゼ活性を有する umuC'-lacZ 融合タンパク質が産生する。これに2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside: ONPG) を添加すると黄色に発色する。この黄色は SOS 遺伝子群の発現量、すなわち、遺伝子損傷量が多いほど濃くなる。この吸光度を 415 nm 付近の波長で測定することで、遺伝子毒性強度を評価できる。

本研究ではこの umu 試験を用いて、長崎県内で採取した大気試料と各種の家庭排水試料の遺伝子毒性強度を評価した。

第二章 長崎県内で観測された長距離輸送大気中の多環芳香族炭化水素の濃度と遺伝子毒性の季節変動

2.1 研究背景と目的

環境汚染は、必ずしも汚染物質の排出源の近くに限定されているわけではない。それは、国境を越えて、何千キロメートルも大気により運搬される可能性もある。このいわゆる越境汚染は、古くて新しい環境問題である。1920年代に始まり、国際環境法の制定につながったトレイル製錬所の事件は、越境大気汚染によって引き起こされた⁵²⁾。1970年代後半以降、ノルウェーからの越境大気汚染に関する調査の報告がある⁵³⁾。

第一章に述べたように、環境中の多環芳香族炭化水素(PAHs)は、主に有機物の不完全燃焼により生成されるが、原油や石油などの漏洩により放出されることもある。多くの PAHs は、発がん性物質および/または遺伝子毒性物質として報告されている。特に、ベンゾ[a]ピレン(BaP)は発がん性物質としてよく知られている。国際がん研究機関(International Agency for Research on Cancer, IARC)は、BaP をグループ 1(ヒトに対して発がん性がある)として分類している。他のいくつかの PAHs は、グループ 2A (おそらくヒトに対して発がん性がある) または 2B (ヒトに対して発がん性が疑われる) として分類されることもある⁵⁴⁾。これまでに PAHs の発生源として、排気ガス⁵⁵⁻⁵⁷⁾、バイオマス燃焼⁵⁸⁻⁶⁰⁾、石油関連製品⁶¹⁻⁶³⁾、排水⁶⁴⁻⁶⁶⁾などが報告されている。一方、環境試料中の PAHs の濃度比から排出源を推定する試みもある⁶⁷⁻⁶⁹⁾。

PAHs は、大気中に粒子状物質または気体分子として存在している。この大気中の PAHs の濃度は、ヨーロッパやアジアを含むさまざまな地域で測定の結果がある⁷⁰⁻⁷²⁾。さらに、いくつかの調査は、越境汚染の可能性も示している⁷³⁻⁷⁵⁾。現在までの報告では、季節ごとに PAHs 濃度を比較した研究もある一方で⁷⁶⁻⁷⁸⁾、

バイオアッセイと組み合わせて数年にわたる毒性を検討した研究はほとんどない。本研究の目的は、森林地域と市街地で収集された浮遊粒子中の PAHs の濃度測定とバイオアッセイである umu 試験を併用して、数年間にわたる PAHs 濃度と総遺伝子毒性の季節変動のパターンと年間の傾向を明らかにすることであった。また、この PAHs の個別の濃度比を用いて、排出源の推定を行うことも目的とした。

2.2 実験方法

2.2.1 試料の採取

大気試料は、Fig. 2.1 に示した長崎県内の森林地域と長崎市内で収集された。森林地域の採取地点(32°54'32.4" N, 129°44'33.5" E, 533 m above sea level)は、長崎県民の森(長崎市中心部から北西 18 km)内のみはらし山山頂にあり、木々に囲まれているところである。ここは東シナ海に面した半島であり、平坦地が少なく、人口密度が低く、人為的汚染源から比較的離れている地点である。長崎市内の採取地点 (32°47'07.9" N, 129°51'52.6" E, 20 m above sea level) は、長崎大学文教キャンパスにあり、4 階建てのビルの屋上である。キャンパスは人口 40 万人の長崎市の住宅街とビジネス街に囲まれている。この地点の南 5 km には、長崎港がある工業地域である。

石英繊維フィルター(254 mm×203 mm, QR-100, Advantec, Tokyo, Japan)を 800°C で 8 時間加熱し、デシケーターで 24 時間以上乾燥させた後に計量した。石英繊維フィルターは、ハイボリウムエアサンプラー(HV-7000F, Sibata Scientific Technology Ltd., Saitama, Japan)にセットし、エアサンプラーの流量を 700 L/min に設定し、粒子サイズの選択はせずに、すべての浮遊粒子を収集した。エアロゾル粒子の収集は、2012 年から 2018 年までの春(3 月~5 月)、夏(6

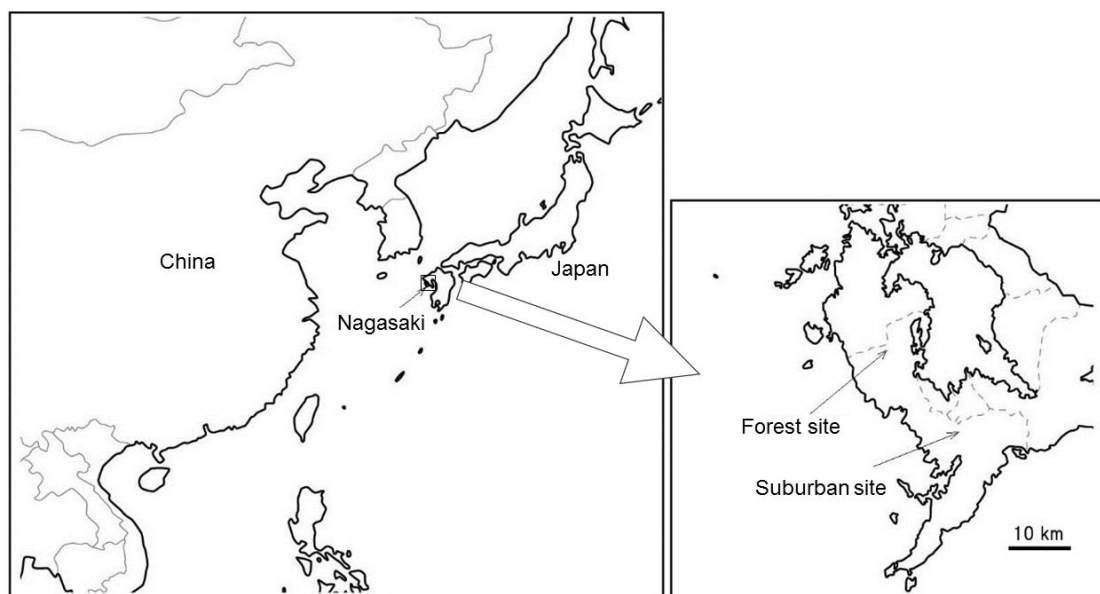


Fig. 2.1 Location of the sampling sites.

月~8月)、秋(9月~11月)、冬(12月~2月)の各季節に3~4回行った。一つの試料の採取時間は1週間であった。これらの試料採取期間を決める際には、この地域で通常雨量が少ない時期とした。

2.2.2 PAHsの分析

PAHs分析では、アメリカ環境保護庁(EPA)によって指定された16の重要汚染物質のPAHsを参照して、ナフタレンを除いたアセナフチレン(acenaphthylene, Acy)、アセナフテン(acenaphthene, Ace)、フルオレン(flourene, Flu)、フェナントレン(phenanthrene, Phe)、アントラセン(anthracene, Ant)、フルオランテン(fluoranthen, Flt)、ピレン(pyrene, Pyr)、ベンゾ[a]アントラセン(benzo[a]anthracene, BaA)、クリセン(chrysene, Chr)、ベンゾ[b]フルオランテン(benzo[b]fluoranthen, BbF)、ベンゾ[k]フルオランテン(benzo[k]fluoranthen, BkF)、ベンゾ[a]ピレン(benzo[a]pyrene, BaP)、ジベンゾ[a, h]アントラセン

(dibenz[a,h]anthracene, DahA)、インデノ [1,2,3-cd] ピレン (indeno [1,2,3-cd]pyrene, IcdP)、およびベンゾ[ghi]ペリレン (benzo[ghi]perylene, BghiP) を対象として選択した。Acenaphthene-d₁₀、phenanthrene-d₁₀、pelyrene-d₁₂、と pyrene-d₁₀ は内部標準物質として使用した。

捕集後の石英繊維フィルターをデシケーター内で数日間保管した後、フィルターの重さを測り、PAHs 等の抽出まで-20°Cで保存した。前処理では、フィルターを細かく切り刻んで、遠心分離管に入れ、前述の 4 つのサロゲート（内部標準物質）を 100 ng ずつ加えた。これに 30 mL のアセトンを加え、超音波抽出を 10 分間行った。遠心分離をした後、抽出液を孔径 0.45 μm のフィルターでろ過した。このアセトンを用いた超音波抽出を 3 回繰り返した。ろ液に窒素を吹き付けることにより約 1 mL に濃縮した。この濃縮液を 5 %含水シリカゲルカラムに入れ、ヘキサン:ジクロロメタン=3:2 の 50 mL の混合溶液で PAHs 等を溶出させた。さらに、窒素ガスを吹き付け、1 mL 以下までに濃縮させ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、孔径 0.20 μm のフィルターを通して GC/MS-MS 測定用の褐色バイアル内で 1 mL に定容した。

PAHs は、7000A 質量分析計 (Agilent Technologies) を備えた 7890A ガスクロマトグラフ (Agilent Technologies) で測定した。1 μL の濃縮液を HP-1MS キャピラリーカラム(30 m × 0.25-mm i.d., 0.25 μm)に 1.4 mL / min のヘリウムガスで注入した。インジェクターの温度は 300°C に保った。カラム温度は 60°C で 1 分間保持後、10°C/分で 300°C に加熱し、5 分間保持した。定量は、各 PAHs および PAHs の d 体の分子量を使用して、選択イオンモニタリング (SIM) モードで実行した。

2.2.3 umu 試験に用いられた菌株

umu 試験の試験菌には横浜国立大学大学院環境情報研究院亀屋研究室から供与された *Salmonella typhimurium* TA1535 pSK1002 を用いた。

2.2.4 umu 試験

前節と同じように、大気捕集後の石英繊維フィルターをアセトンで 3 回抽出した後、シリカゲルカラムを通さずに、窒素ガスを吹き付けて乾固させて、500 μL のジメチルスルホキシド (DMSO) を加えて umu 試験溶液を調製した(転溶処理)。

-80°Cで保存したサルモネラ菌を解凍し、30°Cで一晩培養した。この菌液を 10 倍希釈し、37°Cで 1.5 時間培養した。濃縮後の 100%DMSO 試料を精製水で 12% の DMSO 溶液となるように希釈した(100%濃度試料)。この調製した試料をさらに 12%の DMSO 溶液で 75%、50%、および 25%濃度試料に希釈し、各濃度試料を 3 ウェルずつ 96 ウェルマイクロプレートに分注し、培養した菌液を 70 μL 加え、2 時間培養した。この後、各ウェルから 30 μL の液を別のプレートに移し、TGA 培地を用いて、10 倍希釈、37°Cで 2 時間培養した後、595 nm で吸光度値を測定し、増殖率を算出した。この 595 nm は、液の濁りを表す指標となり、細胞が増えれば、吸光度値も高くなる。続いて、発色助剤としての ONPG と B 緩衝溶液を添加し、28°Cで 30 分培養後に反応停止剤として炭酸ナトリウムを添加し、414 nm で吸光度値を測定し遺伝子毒性を算出した。遺伝子毒性物質によりサルモネラ菌の遺伝子がダメージを受け、修復中に、組み込まれた SOS 遺伝子が発現し、発色するタンパク質を放出する。遺伝子のダメージが強いほど、吸光度値は大きくなる。

本研究では、4-NQO(4-Nitroquinoline-1-oxide)と 2-AA(2-Aminoanthracene)を

それぞれ-S9 と+S9 試験の陽性対象物質として用いた。また、12%の DMSO 溶液を陰性対象として使用した。菌液を含まない TGA 培地をブランクとした。

ISO13829³⁶⁾により、サルモネラ菌の増殖率(G)及び Induction ratio(IR)は以下のように計算した。

$$G = \frac{A595_{\text{sample}} - A595_{\text{blank}}}{A595_{\text{negative control}} - A595_{\text{blank}}}$$

$$IR = \frac{A414_{\text{sample}} - A414_{\text{blank}}}{A414_{\text{negative control}} - A414_{\text{blank}}} \times \frac{1}{G}$$

これらを用いて、次の4項目を決定した。(1)サルモネラ菌の増殖率が0.75以下の場合、試料に細胞毒性があると判断した。(2)最大濃度(100%)で $IR > 1.5$ ならば遺伝子毒性あり、 $1.5 > IR > 1.2$ なら遺伝子毒性があるが定量不可能(Tr.)、 $1.2 > IR$ なら、未検出(N.D.)と定義した。(3)用量反応直線は縦軸を IR、横軸を暴露量とし、切片を1とした近似直線を引いた。この傾きは遺伝子毒性強度(Slope)と定義した。なお、相関係数(R^2)は-S9 試験で0.7以上、+S9 試験で0.5以上となると、試験成功とした。(4)さらに、この遺伝子毒性強度(Slope)を用いて、陽性対照物質の遺伝子毒性で換算することにより、陽性対照換算値(toxic equivalent quantity, TEQ)を以下の式で定義した。

$$TEQ_{4-NQO} \text{ (ng/ml)} = \frac{\text{Slope}_{\text{sample}}}{\text{Slope}_{4-NQO}}$$

$$TEQ_{2AA} \text{ (ng/ml)} = \frac{\text{Slope}_{\text{sample}}}{\text{Slope}_{2AA}}$$

なお、-S9 と+S9 試験に用いられた陽性対象物質が異なるため、同じ試料での遺伝子毒性を比較する場合は、遺伝子毒性強度(Slope)を使用した。その他の場合には TEQ を使用して遺伝子毒性を比較した。

2.2.5 データの解析

2.2.5.1 後方流跡線解析

大気中の粒子状物質の長距離輸送を把握するために、多くの研究で後方流跡線解析が行われている⁷⁹⁻⁸¹⁾。本研究では、米国海洋大気庁の HYSPLIT Model-Trajectory Frequencies を使用した^{82, 83)}。解析結果は、気団の軌道がグリッドセルを通過した頻度で示される。主な分析条件は①気団の到達位置が森林地域の採取地点とした。②各季節の 32 日間をデータ解析対象とした。③計算するグリッドの解像度は 2.0 度とし、12 時間ごとに気塊の 72 時間分の後方流跡線を解析した。

2.2.5.2 排出源の推定

排出源の特性を反映していると言われている固有の PAHs の濃度比からその排出源推定を行った。推定には、さまざまな比率が提案されているが⁶⁷⁻⁶⁹⁾、本研究では、特定の PAH 濃度比である Flt/(Flt+Pyr)と IcdP/(IcdP+BghiP)を、石油、石油燃焼、バイオマスと石炭燃焼の 3 種類の発生源が区別できる指標として使用した。たとえば、Flt/(Flt+Pyr)は 0.4 以下の場合が石油由来、0.4~0.5 の場合が石油燃焼由来、0.5 以上の場合がバイオマスまたは石炭燃焼由来と考えられている。IcdP/(IcdP+BghiP)は 0.2 以下の場合が石油由来、0.2~0.5 の場合が石油燃焼由来、0.5 以上の場合がバイオマスまたは石炭燃焼由来と考えられている^{84, 85)}。

2.3 結果と考察

2.3.1 後方流跡線の解析

大気エアロゾルの季節的傾向を調査するために 2018 年の森林地域の後方流跡線を解析し、その結果を Fig. 2.2 に示した。なお、長崎市内でも採取したが、後方流跡線の解析の距離オーダーではほぼ同じ結果が得られた。(a)に示した春

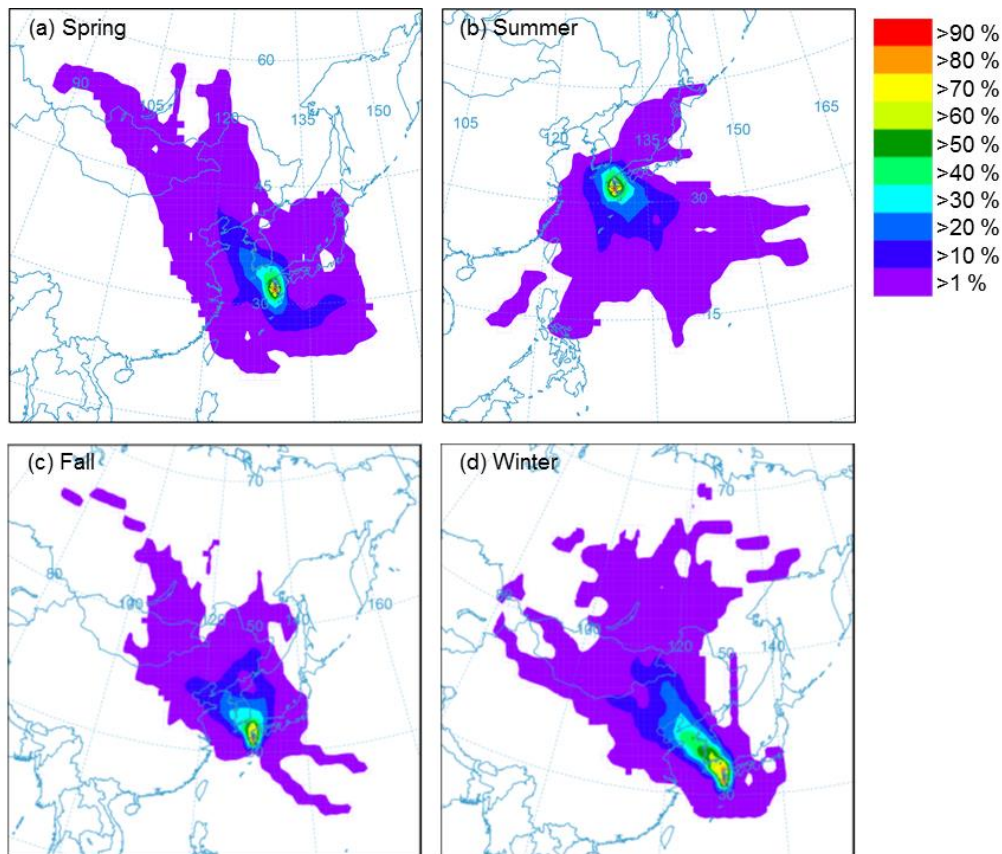


Fig. 2.2 Frequency with which the back trajectories from the sampling site passed over a grid cell calculated by HYSPLIT Model of the National Oceanic and Atmospheric Administration, USA: (a) 29 March 2018–3 May 2018; (b) 29 June 2018–3 August 2018; (c) 29 September 2018–3 November 2018; (d) 30 December 2017–3 February 2018.

には北西からの移流が優勢であったが、南からの移流も見られた。夏になると、日本の南東からの移流が多かった。秋には、北および北西から多くの移流があった。冬には、北西からの移流が明らかに優勢であった。すなわち、春、秋、冬の3季節に採取した大気エアロゾルは、中国北部や朝鮮半島などから大気を捕集した森林地域に輸送されたことが示唆された。一方、夏は太平洋側からの影響を強く受けており、大陸からの影響は弱いように見えた。また、Fig. 2.2に

は示されていないが、他の年にも同様な傾向が見られ、毎年繰り返された。

2.3.2 PAHs の濃度と総遺伝子毒性

2カ所の採取地点における2012年から2018年までのPAHs濃度と遺伝子毒性の季節ごとの平均値と標準偏差の結果をTable 2.1に示した。県民の森と長崎市内で採取した試料からの15種のPAHsの総濃度は、それぞれ 1.495 ± 1.570 ng/m^3 および 1.996 ± 2.209 ng/m^3 であった。長崎市内は、森林地域の県民の森に比べて、交通量の増加がPAHs濃度の上乗せの主要な原因であると考えられた。本研究の測定対象物質は、汚染度の高い中国唐山市とモンゴル国のウランバートル市より、PAHsの総濃度は約2桁低い傾向があった^{86, 87)}。季節ごとに比較すると、森林地域における春、秋、冬のPAHsの値は、夏の値よりそれぞれ

Table 2.1 Seasonal average of PAH concentrations and genotoxicities of aerosols collected in Nagasaki from 2012 to 2018.

| Parameters | Forest site | | | | | Suburban site | | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Total average | Spring | Summer | Fall | Winter | Total average | Spring | Summer | Fall | Winter |
| Concentration of PAHs (ng/m^3) | (n = 95) | (n = 21) | (n = 25) | (n = 26) | (n = 23) | (n = 97) | (n = 22) | (n = 25) | (n = 26) | (n = 24) |
| Acy | 0.012 ± 0.021 | 0.004 ± 0.002 | 0.005 ± 0.008 | 0.007 ± 0.007 | 0.034 ± 0.034 | 0.024 ± 0.105 | 0.005 ± 0.003 | 0.003 ± 0.003 | 0.010 ± 0.012 | 0.079 ± 0.203 |
| Ace | 0.003 ± 0.005 | 0.001 ± 0.001 | 0.004 ± 0.007 | 0.004 ± 0.006 | 0.002 ± 0.002 | 0.004 ± 0.006 | 0.001 ± 0.001 | 0.005 ± 0.008 | 0.004 ± 0.008 | 0.003 ± 0.003 |
| Flu | 0.032 ± 0.086 | 0.006 ± 0.005 | 0.024 ± 0.082 | 0.009 ± 0.008 | 0.090 ± 0.140 | 0.046 ± 0.119 | 0.042 ± 0.151 | 0.005 ± 0.007 | 0.017 ± 0.036 | 0.125 ± 0.165 |
| Phe | 0.182 ± 0.257 | 0.101 ± 0.063 | 0.027 ± 0.037 | 0.081 ± 0.077 | 0.538 ± 0.302 | 0.198 ± 0.301 | 0.135 ± 0.082 | 0.046 ± 0.045 | 0.095 ± 0.070 | 0.526 ± 0.459 |
| Ant | 0.035 ± 0.162 | 0.015 ± 0.039 | 0.005 ± 0.008 | 0.018 ± 0.023 | 0.104 ± 0.321 | 0.047 ± 0.170 | 0.032 ± 0.074 | 0.013 ± 0.023 | 0.018 ± 0.025 | 0.129 ± 0.324 |
| Flt | 0.273 ± 0.322 | 0.204 ± 0.127 | 0.053 ± 0.053 | 0.198 ± 0.194 | 0.662 ± 0.399 | 0.342 ± 0.413 | 0.275 ± 0.155 | 0.047 ± 0.041 | 0.203 ± 0.157 | 0.861 ± 0.508 |
| Pyr | 0.177 ± 0.194 | 0.125 ± 0.063 | 0.054 ± 0.095 | 0.133 ± 0.127 | 0.409 ± 0.225 | 0.211 ± 0.229 | 0.173 ± 0.079 | 0.049 ± 0.047 | 0.141 ± 0.123 | 0.489 ± 0.281 |
| BaA | 0.065 ± 0.076 | 0.045 ± 0.025 | 0.021 ± 0.031 | 0.061 ± 0.061 | 0.136 ± 0.103 | 0.124 ± 0.368 | 0.093 ± 0.087 | 0.017 ± 0.014 | 0.061 ± 0.061 | 0.333 ± 0.700 |
| Chr | 0.168 ± 0.194 | 0.122 ± 0.084 | 0.034 ± 0.038 | 0.148 ± 0.134 | 0.378 ± 0.252 | 0.245 ± 0.296 | 0.178 ± 0.135 | 0.036 ± 0.031 | 0.248 ± 0.209 | 0.521 ± 0.412 |
| BbF* | 0.268 ± 0.390 | 0.161 ± 0.125 | 0.081 ± 0.063 | 0.167 ± 0.182 | 0.705 ± 0.600 | 0.467 ± 0.647 | 0.260 ± 0.248 | 0.081 ± 0.073 | 0.387 ± 0.429 | 1.173 ± 0.895 |
| BkF* | 0.051 ± 0.069 | 0.047 ± 0.063 | 0.026 ± 0.037 | 0.055 ± 0.037 | 0.079 ± 0.113 | 0.068 ± 0.081 | 0.054 ± 0.046 | 0.018 ± 0.016 | 0.065 ± 0.057 | 0.140 ± 0.119 |
| BaP | 0.097 ± 0.097 | 0.088 ± 0.086 | 0.035 ± 0.043 | 0.098 ± 0.090 | 0.173 ± 0.108 | 0.094 ± 0.098 | 0.087 ± 0.052 | 0.035 ± 0.053 | 0.095 ± 0.074 | 0.159 ± 0.144 |
| DahA | 0.023 ± 0.054 | 0.023 ± 0.058 | 0.017 ± 0.037 | 0.014 ± 0.011 | 0.038 ± 0.085 | 0.019 ± 0.025 | 0.015 ± 0.014 | 0.005 ± 0.007 | 0.022 ± 0.019 | 0.035 ± 0.038 |
| IcdP | 0.092 ± 0.109 | 0.069 ± 0.058 | 0.044 ± 0.057 | 0.095 ± 0.154 | 0.163 ± 0.094 | 0.117 ± 0.128 | 0.084 ± 0.069 | 0.025 ± 0.034 | 0.108 ± 0.085 | 0.251 ± 0.162 |
| BghiP | 0.094 ± 0.135 | 0.083 ± 0.087 | 0.040 ± 0.052 | 0.065 ± 0.049 | 0.194 ± 0.224 | 0.140 ± 0.190 | 0.109 ± 0.119 | 0.035 ± 0.035 | 0.109 ± 0.089 | 0.313 ± 0.286 |
| Σ PAHs | 1.495 ± 1.570 | 1.039 ± 0.587 | 0.439 ± 0.471 | 1.117 ± 0.795 | 3.485 ± 1.864 | 1.996 ± 2.209 | 1.469 ± 0.662 | 0.388 ± 0.283 | 1.436 ± 0.991 | 4.761 ± 2.721 |
| Genotoxicity | (n = 81) | (n = 17) | (n = 19) | (n = 25) | (n = 20) | (n = 82) | (n = 17) | (n = 19) | (n = 24) | (n = 22) |
| -S9 (TEQ _{4+NOQ} (ng/m^3)) | 0.16 ± 0.16 | 0.076 ± 0.040 | 0.040 ± 0.043 | 0.14 ± 0.062 | 0.39 ± 0.18 | 0.16 ± 0.12 | 0.12 ± 0.048 | 0.046 ± 0.037 | 0.16 ± 0.11 | 0.30 ± 0.11 |
| +S9 (TEQ _{2-AA} (ng/m^3)) | 0.65 ± 0.70 | 0.21 ± 0.15 | 0.21 ± 0.22 | 0.53 ± 0.44 | 1.6 ± 0.64 | 0.84 ± 0.74 | 0.39 ± 0.21 | 0.14 ± 0.13 | 0.81 ± 0.48 | 1.8 ± 0.44 |

* Since BbF and BkF had been measured as a total value at the beginning of this study, the amount of data for BbF and BkF was about 60% of other PAHs.

れ 2.4、2.5、7.9 倍高かった。長崎市内における春、秋、冬の値は、それぞれ夏の 3.8、3.7、12.3 倍であった。PAHs 濃度に関して、両地点に共通して冬>秋≒春>夏の傾向が見られ、以前の報告⁷⁶⁻⁷⁸⁾と一致した。冬の PAHs の高濃度には、以下のいくつかの要因が考えられた。①冬季の中国北部における暖房のための石炭とバイオマスの燃焼、②安定したシベリア高気圧によって北西から吹く優勢な冬の風、③冬の対流圏内における空気が安定、④冬の気温が低く日照が弱いこと、化学物質の分解が少ない、⑤低温度により、低環数 PAHs の粒子相から気相への移行が少ない、などが考えられた。

次に、遺伝子毒性の視点から見ると、森林地域の県民の森から採取した試料は、-S9 試験で 0.16 ± 0.16 ng-4NQO/m³、+S9 試験で 0.65 ± 0.70 ng-2AA/m³ であった。長崎市内で採取した試料の遺伝子毒性は、-S9 試験で 0.16 ± 0.12 ng-4NQO/m³、+S9 試験で 0.84 ± 0.74 ng-2AA/m³ であった。両地点を比較すると、+S9 試験において、長崎市内の方が高かった。これは、PAHs 濃度の上乗せと同じ理由で、比較的高い交通量が主な理由と考えた。一方、-S9 試験では、両地点の試料の遺伝子毒性はほぼ同程度であった。現時点では、その理由は不明である。なお、-S9 試験と+S9 試験に用いられた陽性対象物質が異なるため、両者の結果を直接比較することはできない。季節ごとに比較すると、県民の森における春、秋、冬の遺伝子毒性の値は、-S9 試験では夏より 1.9、3.5、9.8 倍高く、+S9 試験では 1.0、2.5、7.6 倍高かった。一方、長崎市内における春、秋、冬の値は、-S9 試験では夏の 2.6、3.5、6.5 倍、+ S9 試験では 2.8、5.8、12.9 倍であった。これらの遺伝子毒性強度の傾向は、冬>秋>春>夏であった。PAHs 濃度の傾向と同様に、冬に高く、夏に低くなる傾向を示した。なお、PAHs 濃度の季節の比較では、秋≒春であったが、遺伝子毒性強度は秋が春より、1.5~2 倍ほど高くなった。理由として、秋季の農作物収穫後の野焼き等の影響などが考えら

れたが、詳細は不明であった。ところで、大気中の遺伝子毒性に関する季節変動は以前の Ames 試験の結果と一致した⁸⁸⁻⁹⁰⁾。冬の高遺伝子毒性の原因は、前述した高濃度の PAHs の原因と共通すると考えられた。なお、我々の調べた範囲では、本研究は、大気中の PAHs 濃度と umu 試験で測定した遺伝子毒性を組み合わせて季節変動を評価した初めての報告である。

2.3.3 越境汚染の寄与

ここでは、長崎における越境汚染の影響の大きさを把握するために、森林地域と市街地において冬季の PAHs 濃度(6年間平均)を比較した。Table 2.1 に示したように、森林地域の県民の森と市街地の長崎市内で観測された PAHs の濃度は、それぞれ 3.485 ng/m³ と 4.761 ng/m³ であった。県民の森のすべての PAHs が越境汚染由来、およびこの等量の PAHs が長崎市内にも飛来すると仮定すると、国境を越えた PAHs の寄与は、長崎市内で最大 70%に達した可能性が考えられた。池田らは、3次元化学輸送モデルに基づいて、長崎県福江島の冬季の PM2.5 に対する中国東北部、中国中部、中南、朝鮮半島と日本の相対寄与率は、それぞれ 7.3%、60.6%、29.2%、11.8%、1.6%と報告されている⁹¹⁾。したがって、本研究で得られた 70%の寄与率もあり得る範囲であるため、長崎県での越境汚染の影響は無視できないレベルであると判断された。このため、関連研究を継続し、できるだけ早く問題を解決できる国際的な努力が必要であると考えた。

次に、上述と同じように、-S9 試験と+S9 試験での遺伝子毒性で算出した越境大気の寄与率は、それぞれ 100%と 75%であった。

2.3.4 季節変動

大気試料の PAHs 濃度と遺伝子毒性を連続的に測定した結果を Fig. 2.3 に示し

た。図の灰色の部分で示したように、どちらの地点においても冬には高い PAHs 濃度と遺伝子毒性値を示し、春から夏にかけて徐々に低くなり、類似した傾向が毎年見られた。長崎市内の大気試料の結果(b)では、2018年の冬の大気試料において PAHs 濃度が比較的高い傾向が見られたが、両地点の PAHs 濃度と遺伝子毒性において、6年間にわたって顕著な増加または減少はなかった。この PAHs 濃度と遺伝子毒性の相関を明らかにするために、都市での交通の影響を受けない県民の森の試料の PAHs 濃度と-S9 試験の遺伝子毒性強度を用いて、相関性を

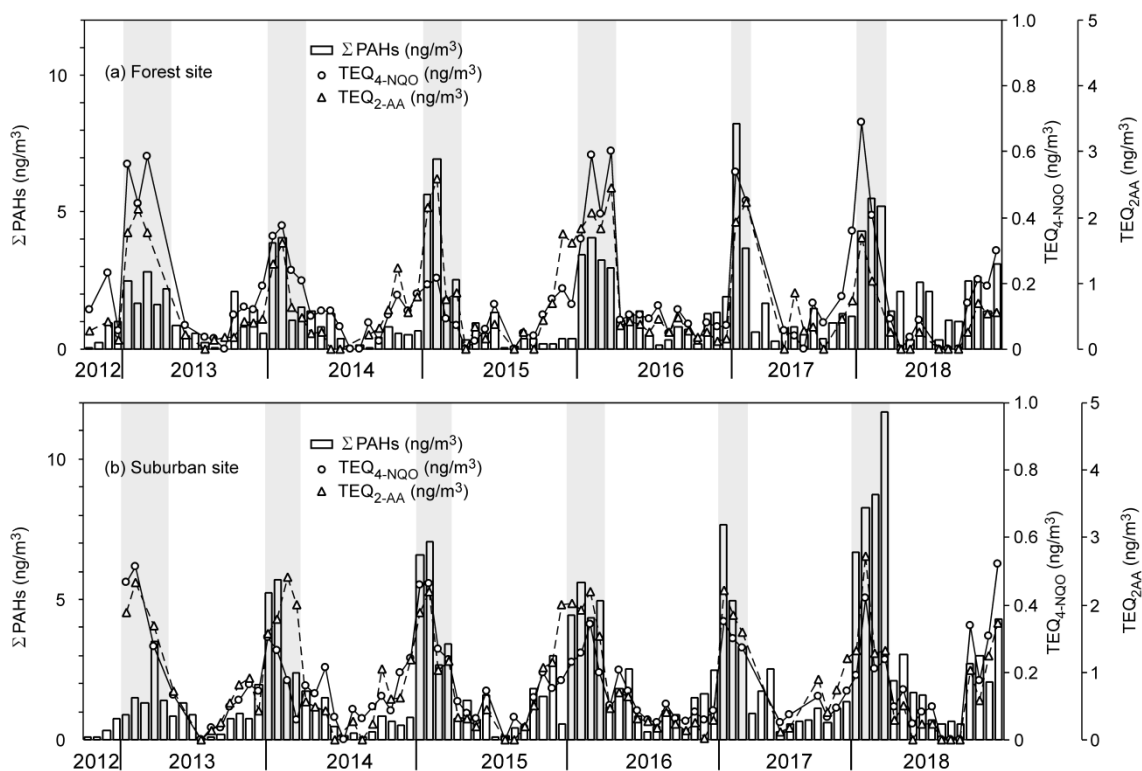


Fig. 2.3 Seasonal fluctuation of PAH concentrations and genotoxicity. The bar graph represents the total PAH concentrations. The circle and triangle plots in the line and broken line show genotoxicity under -S9 and +S9 conditions, respectively. The gray areas indicate winter data: (a) values of the forest site; (b) values of the suburban site.

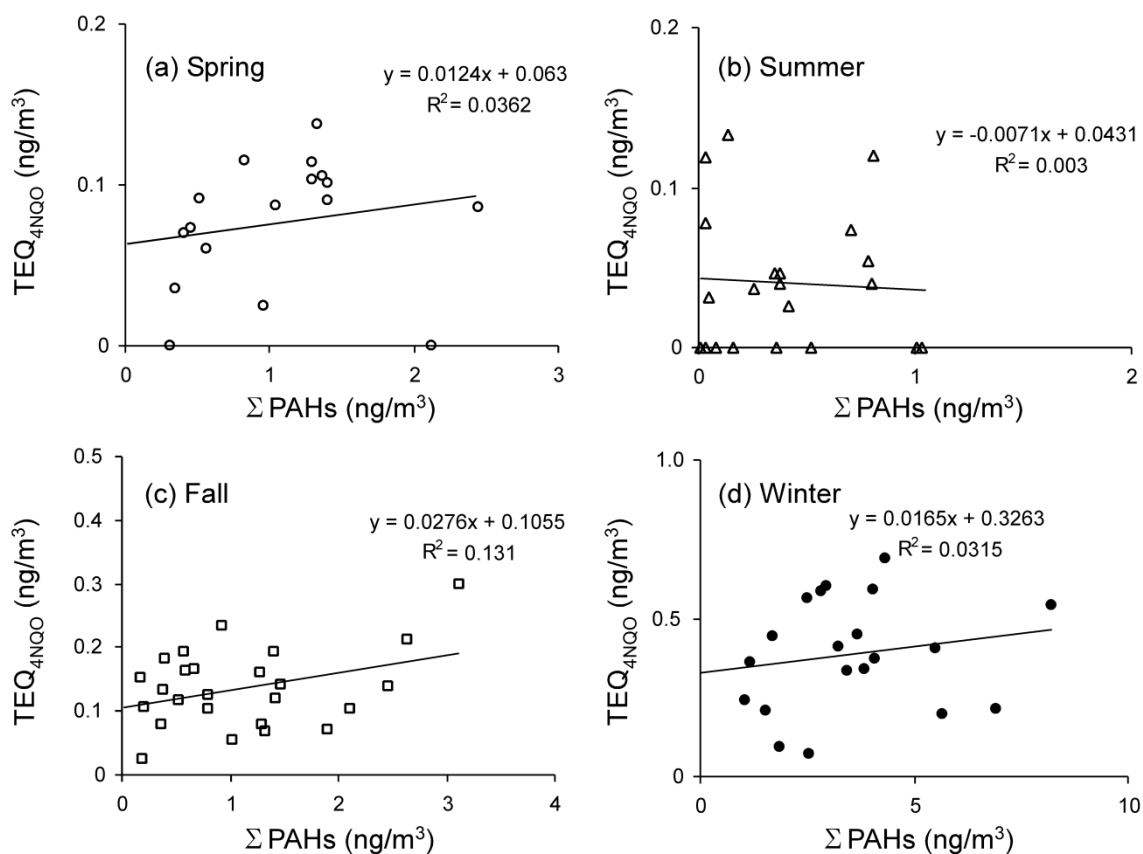


Fig. 2.4 Seasonal relationship between total PAHs concentration and genotoxicity without S9 enzyme (TEQ_{4NQO} (ng/m³)) at forest site in (a) spring, (b) summer, (c) fall, and (d) winter.

検証した。その結果を Fig. 2.4 に示した。図に示したように、どの季節でも明確な相関が見られなかった。この結果より、大気試料の遺伝子毒性に寄与する化学物質は PAHs だけでなく、その他の多種多様な物質の関与が考えられる。この詳細について、現段階でまだ解明していないが、更に研究する必要があると考えた。なお、グラフには示していないが、+S9 試験の遺伝子毒性や長崎市内の PAHs 濃度と ±S9 試験の遺伝子毒性の相関も同じ傾向であった。

2.3.5 PAHs の発生源の解析

PAHs の発生源を解析するために、森林地域の県民の森からの試料の結果を用いて、 $FIt/(FIt+Pyr)$ および $IcdP/(IcdP+BghiP)$ の値を計算した。その結果を Fig. 2.5 に示した。図によると、夏のプロットは比較的広く分散し、さまざまな発生源、例えば、バイオマスや石炭の燃焼、石油燃焼、石油漏れの影響を受けていることを示唆した。一方、他の季節の結果において、全体的に右上のバイオマス・石炭燃焼の分類方向にシフトしている様子が見られるが、図中の点線で示した明確な分類はできず、発生源の特定は困難であった。これは、大気がそもそも

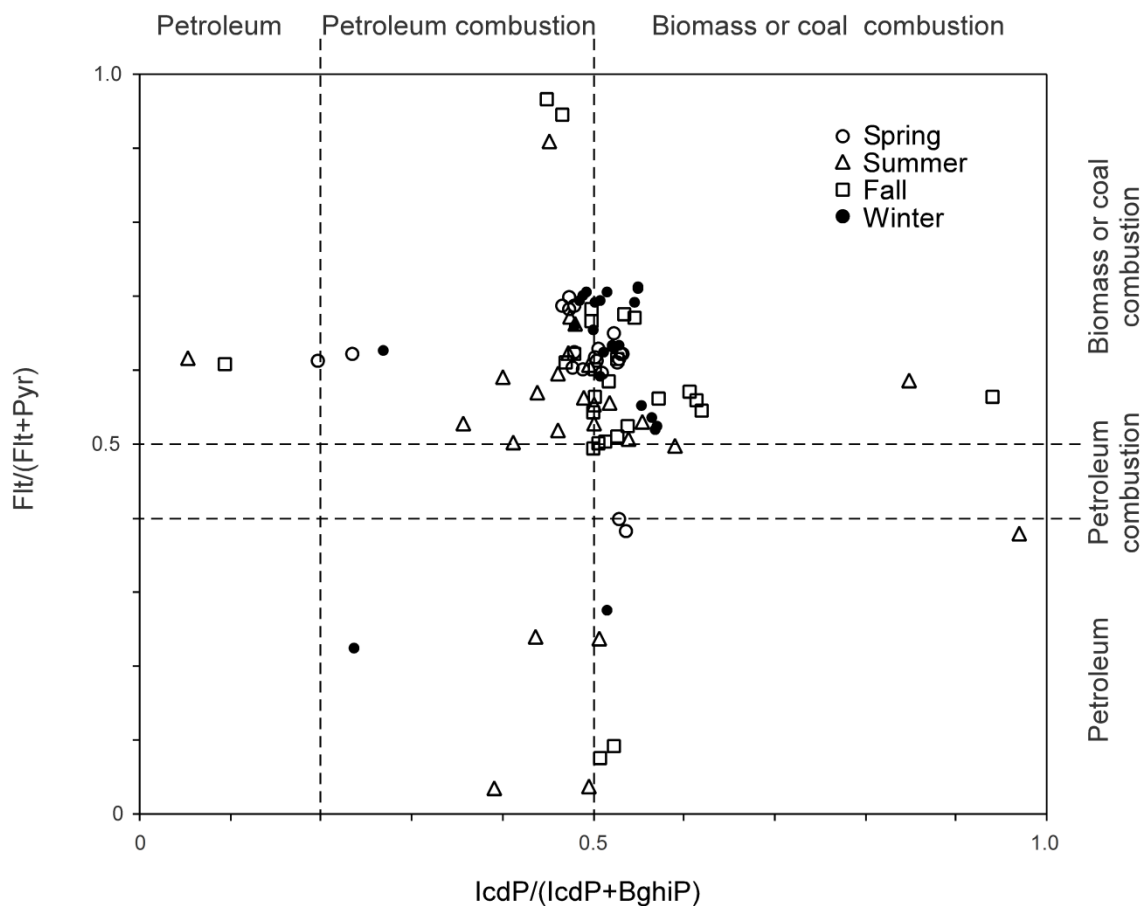


Fig. 2.5 Cross plot of the diagnostic ratios of the forest site for PAH sources in each season.

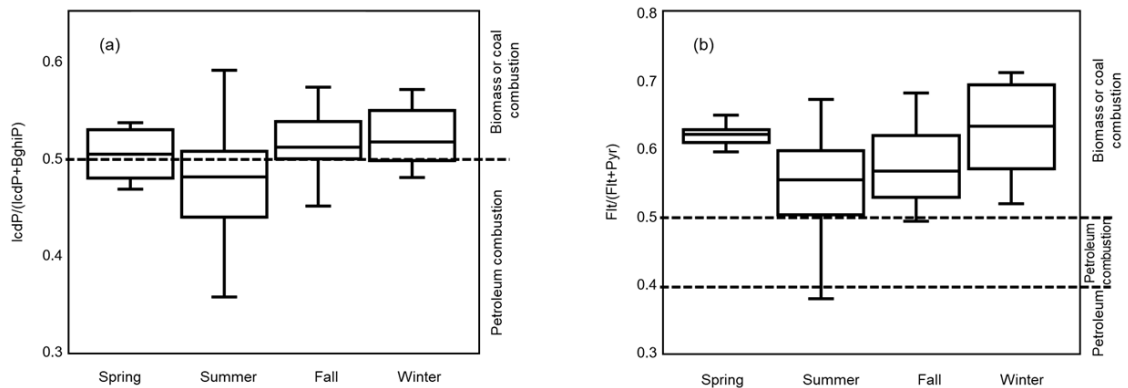


Fig. 2.6 Ranges of the diagnostic ratios of the forest site for each season, excluding outliers. The upper and lower ends of the bars represent the upper and lower limits of the observed values. The upper and lower ends of the boxes represent the third and first quartiles. The lines intersecting the boxes represents the median values: (a) ranges of $IcdP/(IcdP+BghiP)$; (b) ranges of $Flt/(Flt+Pyr)$.

単一の排出源ではないこと、越境移流に 2 日程度要すること、何らかの化学変化などが考えられた。次に、この季節変化を詳しく調べるために、Fig. 2.5 のデータに基づいて、季節ごとに箱ひげ図として、Fig. 2.6 に示した。なお、四分位範囲の 1.5 倍を超える値は、外れ値として定義し、除外した。図に示したように、両指標において、春、秋、冬の中央値はバイオマスと石炭燃焼の範囲に入った。これらと後方流跡線の結果も合わせて考慮すると、秋～春の PAHs は野焼き(バイオマス燃焼)及び中国北部と朝鮮半島地域における暖房のための石炭燃焼から生成された可能性が高いと考えられた。なお、後方流跡線による解析で秋から春にかけて気団が通過した中国東北部の季節は気温が低いため、石炭暖房が多くの都市で幅広く使用されている⁹²⁾。ところで、 $IcdP/(IcdP+BghiP)$ では、夏の中央値のみが石油燃焼の範囲内にあった。夏の後方流跡線は太平洋側からの気

塊の影響が大きいことを合わせて考慮すると、船舶や近隣の市街地からの自動車排気ガスが PAHs の主な発生源である可能性が高いと考えた。しかし、Flt/(Flt+Pyr)の値は夏でもバイオマスと石炭燃焼の範囲であるが、その原因は不明であった。

第三章 遺伝子毒性評価を用いた 4 種類の家庭排水の水処理方式の比較

3.1 研究背景と目的

第一章では小型下水処理施設から環境へ放流される排水の遺伝子毒性を調べる必要性を述べた。また、これまでに下水処理場やし尿処理場からの排水及び、小型処理施設で処理された単一の排水の遺伝子毒性に関する研究が多少ある一方、本研究で調査対象としたような数十軒分の一般家庭の同型の浄化槽が集中する地域の排水に関する研究はほとんど見当たらない。以上のことから本章ではこのような地域の家庭排水を研究対象とし、4 種類の小型処理施設から放流された家庭排水の遺伝子毒性強度や細胞毒性を比較すること及び、どの種類の放流水が実環境へ悪影響を及ぼしているかを明らかにすることを目的とした。

3.2 実験方法

3.2.1 水試料の採取

本研究では、Table 3.1 に示した小型処理施設を利用した長崎県内の 11 箇所の家庭排水を調査対象とし、2012 年から 2016 年まで年 1 回の採水を行った。Table 3.1 に示したように、単独浄化槽の地域は 2 カ所(Site 1, 2)、個別合併浄化槽の地域は 3 カ所(Site 3, 4, 5)、コミュニティプラントの地域は 3 カ所(Site 6, 7, 8)、汲み取り槽は 3 カ所(Site 9, 10, 11)とした。このうち、Site 10 は 78.5%が汲み取り槽で、5.7%が単独浄化槽で、15.9%が合併浄化槽と混ざり合った地域であったが、汲み取り槽の割合が高かったため、汲み取り槽地域とした。

単独浄化槽と合併浄化槽の例として、Site 1 と Site 3 のサンプリングポイントを Fig. 3.1 と 3.2 に示した。家庭排水は各家庭に埋設された小型処理施設により処理された後、排水溝に排出され、これらの排水溝からの水は一つに合流する。本研究で用いた水試料は、川に放流される直前に図中のサンプリングポイントから採取された。ま

Table 3.1 Characteristics of the residential area sites with the number of households and their wastewater treatment type. Site 11 was located in Nagasaki city and the other sites were in Sasebo city, in Nagasaki prefecture, Japan.

| Site number | Number of households | Wastewater treatment type |
|-------------|----------------------|--|
| Site 1 | 36 | On-site toilet wastewater treatment system (OTWTS) |
| Site 2 | 1 | On-site toilet wastewater treatment system (OTWTS) |
| Site 3 | 69 | On-site wastewater treatment system (OWTS) |
| Site 4 | 34 | On-site wastewater treatment system (OWTS) |
| Site 5 | 20 | On-site wastewater treatment system (OWTS) |
| Site 6 | 168 | Community wastewater treatment system (CWTS) |
| Site 7 | 171 | Community wastewater treatment system (CWTS) |
| Site 8 | 204 | Community wastewater treatment system (CWTS) |
| Site 9 | 14 | On-site vault toilet (OVT) |
| Site 10 | 177 | On-site vault toilet (OVT) |
| Site 11 | 28 | On-site vault toilet (OVT) |

た、コミュニティプラントの例として、Site 6 のサンプリングポイントを Fig. 3.3 に示した。各家庭の汚水は未処理のまま道路下の地下パイプ内を流れ、処理施設に集まり、処理後に放流され、図中に示されたサンプリングポイントから採水した。

本研究では、各採取地点から人間活動が活発である且つ放流水が連続的に流れる時間帯の 7 時、13 時、19 時に 1L ずつを採取し、混合して合計 3L とした。なお、この研究で調査されたすべての水試料の排水源は家庭排水のみであり、近くに湧き水や工場や病院などの水源または汚染源はなかった。

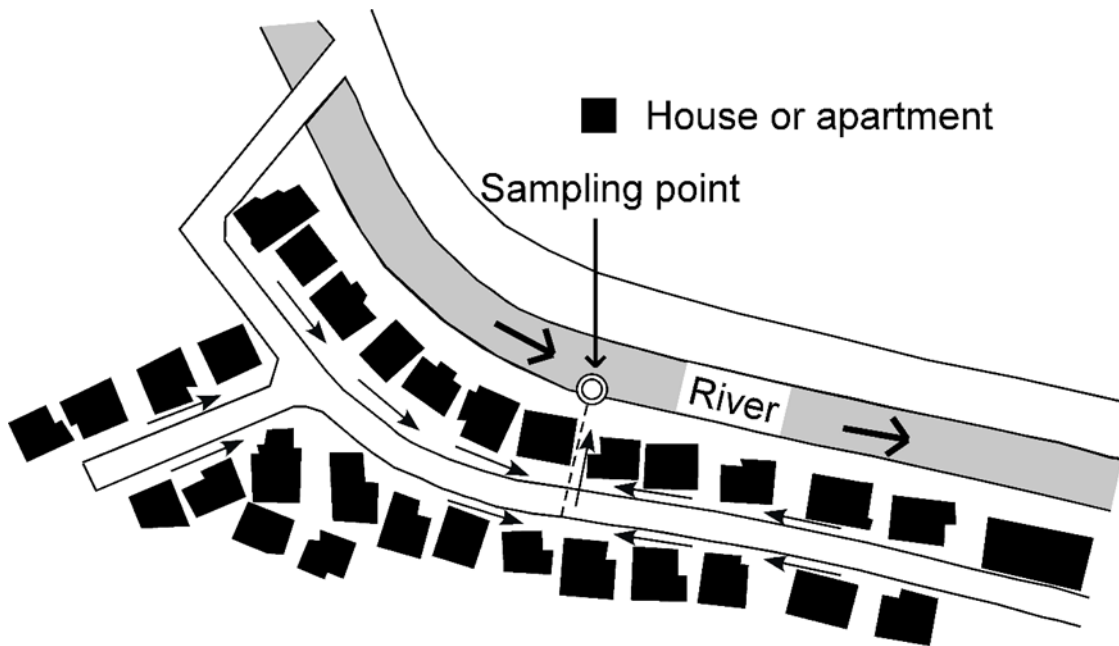


Fig. 3.1 Site 1 showing the flow of treated household effluents, the sampling point and the river close to the residential area.

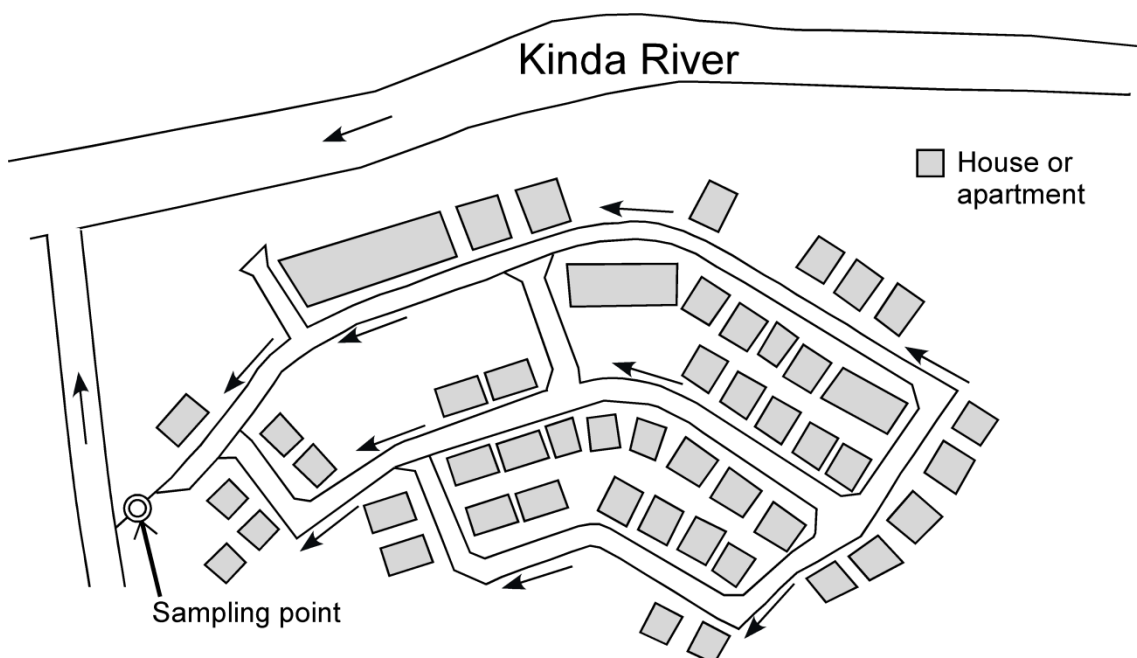


Fig. 3.2 Site 3 showing the flow of household effluents, sampling point and the river close to the residential area.



Fig. 3.3 Site 6 showing the flow of untreated household effluents, the treatment facility and the sampling point.

Site 2 は、他の地域と異なり、単独浄化槽が設置された一軒家であった。ここでは小型処理施設からの排水の放流前における塩素処理の前後の家庭排水の遺伝子毒性を評価することを目的として、塩素処理前後の家庭排水を採取した。この排水は、単独浄化槽であるため、処理済みのトイレからの排水のみであった点が特徴である。一方、単独浄化槽を使用する数十軒の家で構成された Site 1 では、水試料は処理済みトイレ排水と未処理の生活雑排水の混合水で構成された。

これらの水試料を実験室に持ち帰った後、翌日にガラス繊維ろ紙でろ過し、4°Cで保存した。このろ液を一週間以内に umu 試験により遺伝子毒性を評価した。

3.2.2 umu 試験法

本章で行った umu 試験は、基本的に前章と同じであるが、ISO13829³⁶⁾を参考し、ろ過後の水試料を精製水で 100%、75%、50%、および 25%の 4 段階に希釈し、各濃度の 3 ウェルずつ 96 ウェルマイクロプレートに分注した。以降の手順は第二章と同じように-S9 試験と+S9 試験を行った。

3.3 異なる処理方式からの家庭排水の毒性の測定結果

3.3.1 水試料における増殖阻害

Table 3.1 に示した地域から採取した水試料におけるサルモネラ菌の増殖率を-S9 と+S9 試験で測定した結果を Fig. 3.4 に示した。前節で定義した細胞毒性を判断する下限の増殖率 0.75 を破線で図中に示した。この線以下は図に示したように“Cytotoxicity”(細胞毒性有り)となる。また、強い細胞毒性(増殖率が 0.5 以下)が示された場合は、水試料を精製水で 75%、50%、25%に希釈した試料の結果も合わせて図に示した。

まず、図中の黒いバーで示した-S9 試験の結果を説明する。単独浄化槽地域(OTWTS)の排水は細胞毒性が比較的強かったが、それ以外の地域ではほとんど細胞毒性を示さなかった。このうち、Site 1 から採取した 1 つの水試料は、-S9 試験におけるサルモネラ菌の増殖率が 0.27 となり、最も強い細胞毒性を示した。2 番目と 3 番目に強い細胞毒性は、Site 2 から採取された塩素処理前後の水試料であった。これらを Milli-Q 水で希釈すると、いずれも細胞毒性が用量依存的に弱くなり、25%に希釈した場合、細胞毒性は見られなくなった。以上のことから、単独浄化槽地域は、他の処理方式よりも、川や湖などの環境に、強い細胞毒性物質を大量に放出していることが示唆された。

一方、S9 酵素を添加した結果では、Fig. 3.4 の白いバーで表されるように、どの水

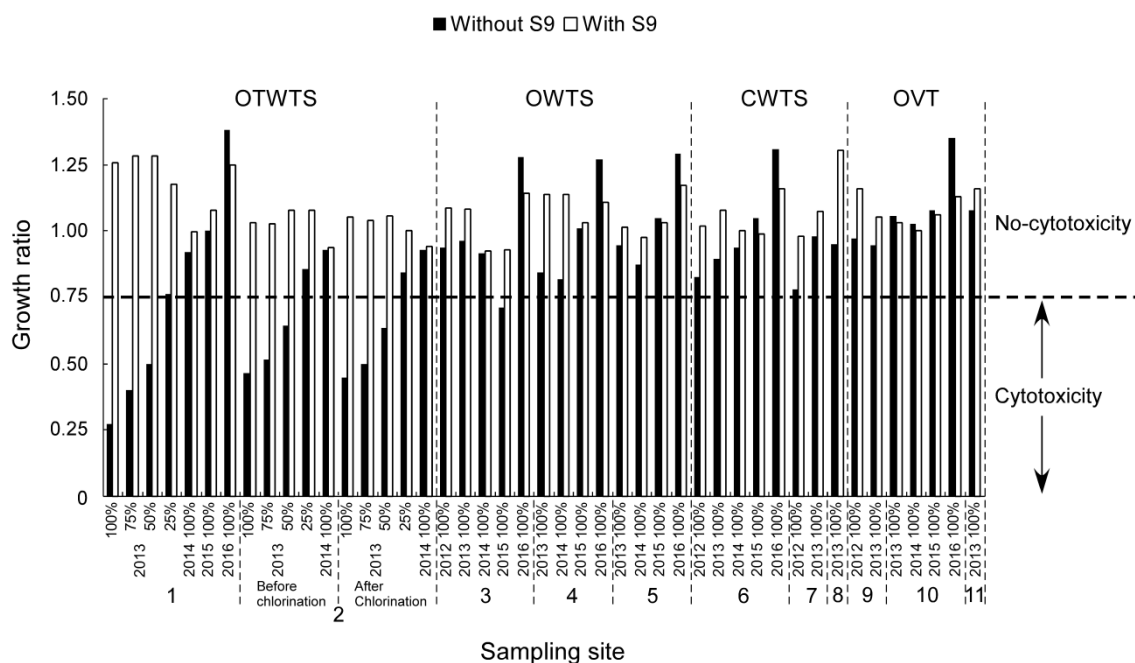


Fig. 3.4 The effect of household effluents on the growth factor of *Salmonella typhimurium* from each wastewater treatment type. The growth ratio lower than 0.75 was considered to be cytotoxic.

OTWTS: on-site toilet wastewater treatment system; OWTS: on-site wastewater treatment system; CWTS: community wastewater treatment system; OVT: on-site vault toilet.

試料も細胞毒性を示さなかった。これは、家庭排水中の細胞毒性物質が S9 酵素により容易に分解されたためと考えられた。このことから、前述した単独浄化槽排水中の細胞毒性物質は河川等へ放出されても、比較的早い時期に毒性を減じられる可能性も考えられる。

3.3.2 水試料の遺伝子毒性の結果

水試料の遺伝子毒性を-S9 試験と+S9 試験で測定した結果をそれぞれ Fig. 3.5 に示した。図の上段に示した-S9 試験での陽性検出率は、単独浄化槽、合併浄化槽

(OWTS)、コミュニティプラント(CWTS)及び汲み取り槽(OVT)の地域から採取した試料において、それぞれ 87.5%、61.5%、62.5%と 42.9%であり、単独浄化槽地域からの検出率が最も高かった。前節に説明した細胞毒性では、単独浄化槽の 3 試料と合併浄化槽の 1 試料のみ検出された(検出率: 11.1%)が、この遺伝子毒性では、合計 23 試料となり、全体の検出率は 63.9%であり、細胞毒性よりも高感度に測定できることが分かった。

一方、Fig. 3.5 の下段に示した+S9 試験では、遺伝子毒性の検出率が-S9 試験に

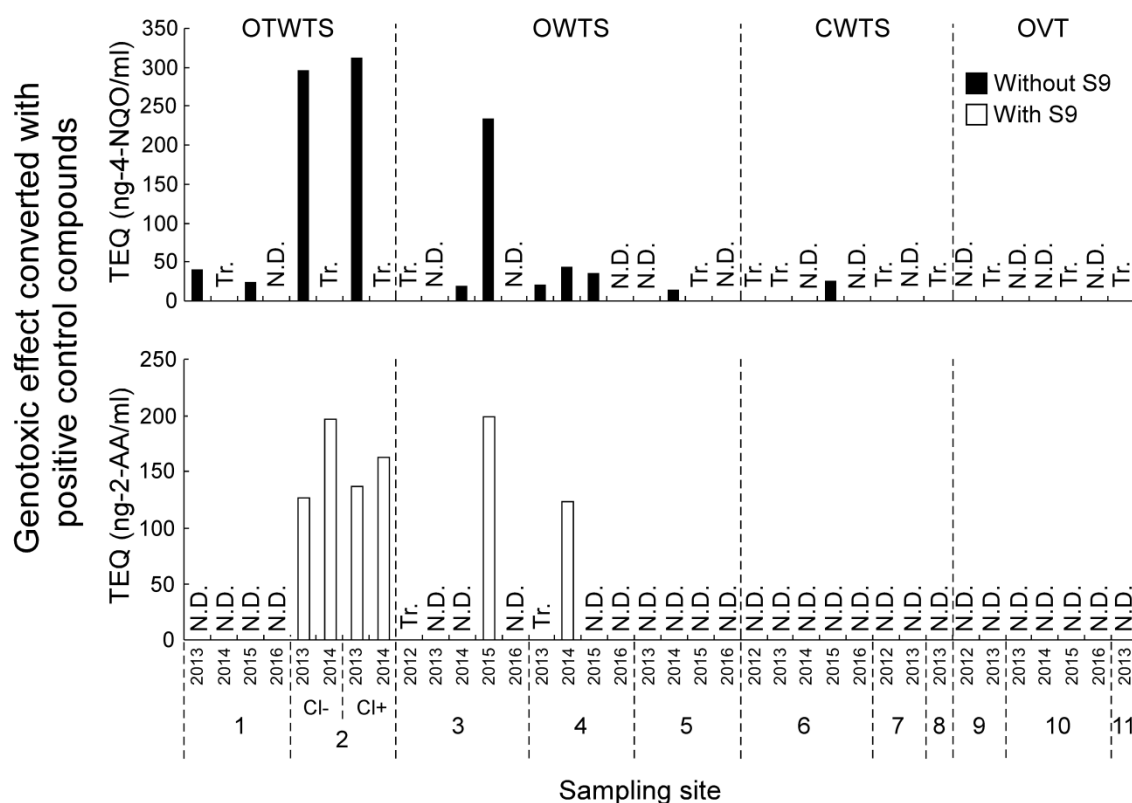


Fig. 3.5 Genotoxic effect converted with positive control compounds without and with the S9 enzyme mix on the treatment type of wastewater.

Tr.: trace level as lower than determination limit; N.D.: not detected. The abbreviation of treatment types was same as that of Fig. 3.4. Cl- and Cl+ meant not treated and treated by chlorination, respectively.

比べると、約 1/3 となった(-S9 試験:63.9%、+S9 試験:19.4%)。特に、コミュニティプラントおよび汲み取り槽地域の試料からは遺伝子毒性を完全に検出しなかった(すべて N.D.)。ところで、Site 2 からの塩素消毒前後の家庭排水は、2 回の採水ともにほぼ同程度の遺伝子毒性が示された。これは、Site 2 に設置された単独浄化槽での塩素消毒により遺伝子毒性化合物が除去または新たに生成しなかったことを示唆していると考えた。

3.3.3 -S9 と+S9 試験結果の比較

umu 試験では-S9 と+S9 試験の陽性対象物質が異なるため、例えばある1つの水試料の酵素代謝前後の遺伝子毒性を比較することは一般に行われていない。しかし、本節ではこれを比較するために、節 2.2.4 に前述した用量反応直線の傾きを使用し、

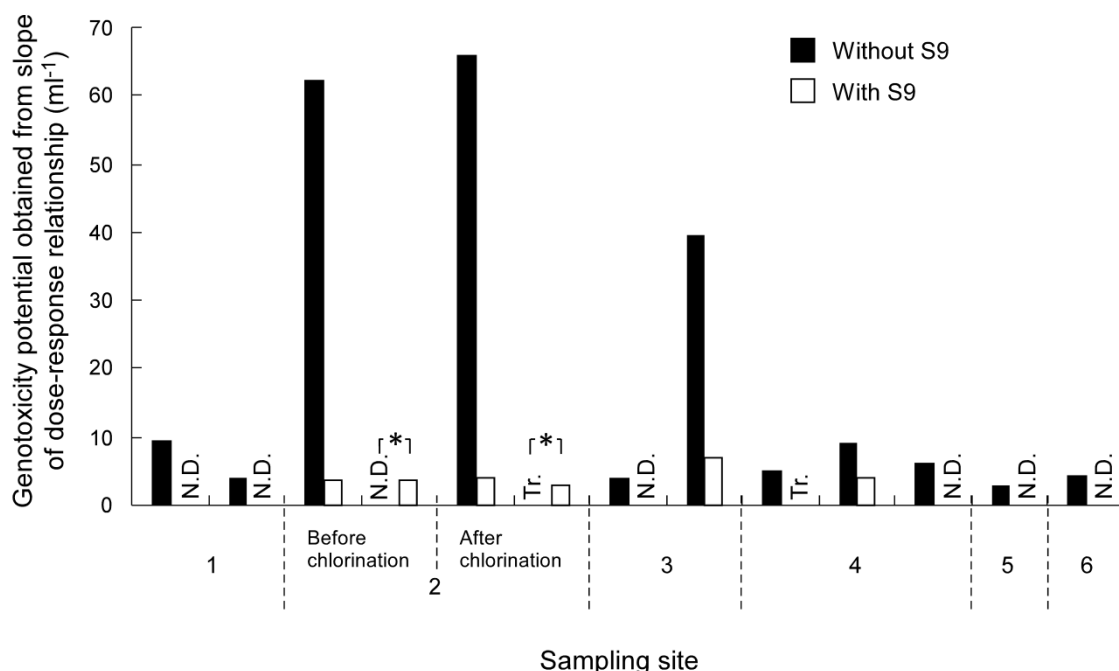


Fig. 3.6 The genotoxicity of water samples obtained from the slope of dose-response relationship. Tr.: trace level as lower than determination limit; N.D.: not detected.

その結果を Fig. 3.6 に示した。なお、-S9 と+S9 試験の結果が共に Tr.か N.D.の場合、その試料の結果はこのグラフに示していない。Fig. 3.6 に示されたように、-S9 試験で得られた遺伝子毒性(傾き)は、グラフに「*」でマークされた 2 試料を除いて、S9 酵素により遺伝子毒性が減少された。これは、S9 酵素が水試料中の遺伝子毒性物質を分解したことを示唆している。

3.4 本章の考察

Fig. 3.4 と 3.5 に示したように、汲み取り槽(OVT)地域から採取した生活雑排水は、細胞毒性がなく(細菌の増殖率がほぼ 1)、遺伝子毒性無し(N.D.)またはわずかな遺伝子毒性(Tr.)であった。この結果から、生活雑排水には細胞毒性と遺伝子毒性を有する物質が含まれていないことが示唆された。すなわち、家庭排水から検出される遺伝子毒性と細胞毒性物質はほぼし尿に由来すると推測した。

一方、単独浄化槽(OTWTS)地域の Site 2 は特別にし尿処理水のみを採取することができ、測定を行った結果、非常に強い細胞毒性と遺伝子毒性を示した。これは前述の推測を後押しするものである。また、単独浄化槽地域の Site 1 の家庭排水は、毒性が Site 2 の排水より弱かった。これは、毒性が高いし尿処理水はほぼ無毒性の生活雑排水により希釈されるためと考えられた。

コミュニティプラント(CWTS)は比較的大規模な処理施設であり、高い処理能力を備えていたため、このような地域から採取した水試料は細胞毒性と遺伝子毒性が弱かった。合併浄化槽地域(OWTS)からの排水は、細胞毒性を示さず、やや強い遺伝子毒性を示した。このことから、合併浄化槽の処理能力が単独浄化槽とコミュニティプラントの間であることが示唆された。

ところで、本研究の研究対象となる処理方式の中で最も高い処理効率を示したコミュニティプラントでさえ、半分の排水試料から遺伝子毒性(-S9 試験)が検出された。す

なわち、本研究の対象である家庭排水処理施設は、汲み取り槽を除いて、何らかの毒性を有する物質を河川に排出していることが明らかになり、水生生物や飲料水源に悪影響を与える可能性が示された。本研究では、排水の遺伝子毒性は検討したが、その原因物質は特定していない。Ohe et al.のレビュー(2004)によると、河川水中や下水処理場の放流水中の遺伝子毒性化学物質には、重金属、多環芳香族炭化水素(PAHs)、複素環アミン(HCA)、農薬などが報告されている⁴¹⁾。しかしながら、家庭排水に特化した分析例が非常に少ないのが現状である。

一般的に、生下水は下水処理場の生物処理によって完全に処理することができない。多くの国において、CODとしての除去率は80%から95%であることが分かっている^{48, 93-94)}。したがって、遺伝子毒性物質も完全に分解されていないと想定される。先行研究では、下水処理場および、し尿処理場の排水からの遺伝子毒性の検出が報告されている^{47-48, 95)}。本研究で調査された単独浄化槽、合併浄化槽、およびコミュニティプラントでも、下水処理場と同様に生物処理を利用しているため、Fig. 3.5に示したように排水中から遺伝子毒性が検出されたことは理解できる。なお、活性炭処理やオゾン処理などの高度処理により、排水中の遺伝子毒性が低減できると報告されている^{48, 96)}。また、コミュニティプラントの浄化能力は、他の小型処理施設より優れていた。これらの結果から、下水処理場が建設できない農村地域において環境に放出される毒性物質の影響とリスクを低減するために、高度処理システムを備えたコミュニティプラントを利用することを本研究では提案したい。

家庭排水の遺伝子毒性が小型処理施設の塩素処理によって減少するかを調べるため、本章では塩素処理前後の遺伝子毒性をSite 2の水試料で測定した。その結果、塩素処理は、これらの試料の遺伝子毒性を低減させなかった。しかし、いくつかの研究では、下水処理場の塩素処理によって遺伝子毒性が低減されると報告されている^{49, 97-98)}。この違いは、本章で調査した塩素消毒に使用された錠剤の効果が弱

かったためと考えられた。

以上、同じ種類の小型処理方式が集まった地域の排水を採取し、研究対象とした研究は我々が調べた範囲で初めての試みであった。その結果、各種の処理方式において、単独浄化槽は遺伝子毒性と細胞毒性の観点から見ると、環境負荷が大きいことを明らかにした。また、汲み取り槽の結果から、生活雑排水に遺伝子毒性物質がほとんどないことから、遺伝子毒性と細胞毒性を有する物質はし尿に由来することを明らかにした。これらは本研究で得られた新たな知見であった。また、本章で測定した単独浄化槽における塩素消毒は極めて弱く、排水中の遺伝子毒性物質を除去できないことも分かった。

第四章 家庭排水中の種々の酸塩基特性を示す遺伝子毒性物質の割合

4.1 研究背景と目的

一般に水試料の遺伝子毒性を評価する前処理として、水中の微量物質を濃縮する場合としない場合の 2 パターンがある。第三章では、水試料を濃縮せずに遺伝子毒性を測定した。前章で述べたように、-S9 試験の全試料の検出率は 63.9%と半分以上の試料から遺伝子毒性を検出できたが、定量できたのは 30.6%となり、あまり高くはなかった。特に+S9 試験では、定量率 16.7%と低すぎるため、それぞれの結果を比較することが困難であった。本章では、この比率を高めるために、水試料の濃縮を行った。濃縮法にはいくつかの手法があるが、近年主に使用されている濃縮方法は固相抽出法(Solid-phase extraction, SPE)である⁹⁹⁻¹⁰²⁾。さらに、SPE 法には pH 調整有無で 2 つのパターンがある。pH 調整有の場合、水試料の pH を酸性に調整することがほとんどである一方で、水試料の pH をアルカリ側に調整した報告は我々の調べた限り、見つからなかった。これまでの数多くの環境中の毒性物質に関する研究の中で、水酸基やニトロ基等がついた物質が取り上げられ、研究対象とされてきたことに起因すると我々は考えた。近年、非常に少数ながら、ヘテロサイクリックアミン(HCA)類のような毒性物質が報告されており、我々はこれらの物質は酸性側に調整すると SPE 法で抽出できないことを懸念しており、本章の研究を着想した。すなわち、排水中の塩基性官能基を持つ遺伝子毒性物質は低 pH 範囲の水の中では分子状態ではなくイオン化され、SPE カートリッジに吸着されないため、遺伝子毒性を実際の値より低く見積もっている可能性が考えられる。したがって、本研究では、排水の pH を酸性側または中性だけでなく、アルカリ側の pH に調整し、塩基性官能基を持つ物質の遺伝子毒性も比較・評価することを目的とした。なお、厳密には単純な逆相系の SPE カートリッジを用いた場合は pH を酸側からアルカ

り側まで、調整した。後述するイオン交換併用型逆相系 SPE カートリッジの場合には、抽出時は pH 無調整であったが、溶出時には各カートリッジのイオン交換が効きやすい pH に調整した溶出液を用いた。

ところで、両性イオン(Zwitterion, Z)は負と正の両方に帯電した官能基を持ち、アミノ酸はこの代表としてよく知られている。これらの化学物質は家庭排水にも存在すると容易に予想できる。これらの物質は広い pH 範囲でイオン化し、一般的な SPE カートリッジには吸着されないため、両性イオンの遺伝子毒性は現在までの報告も見られず、おそらく本研究は世界初の試みとなる。本研究は近年開発が進んでいるイオン交換併用型 SPE カートリッジを用いた抽出により、両性イオンの遺伝子毒性も評価することを目的とした。

4.2 実験方法

4.2.1 水試料の採取

本章に使用された水試料は、Table 4.1 に示したように小型処理施設を利用する前章の採水地点と同じ長崎県内の 9 カ所の住宅地を調査対象地域とした。このうちの Site H は長崎市内であり、これ以外の採取地点は佐世保市に位置している。Table 4.1 に示したように、コミュニティプラントの地域(CWTS)は 3 カ所(Site A, B, C)、合併浄化槽の地域は 3 カ所(Site D, E, F)、単独浄化槽の地域は 1 カ所(Site G)、汲み取り槽の地域は 2 カ所(Site H, I)とした。Site I における処理施設の割合は汲み取り槽が 78.5%、単独浄化槽が 5.7%、合併浄化槽が 15.9% であり、汲み取り槽の割合が多かったため、本章では汲み取り槽地域とした。それ以外の地域はすべて 1 種類の小型処理施設のみで構成されていた。

水試料の採取方法と時間は、第三章と同様であった。水試料は、2012 年から 2014 年の 5 月から 7 月まで年に 1 回、Table 4.1 に示した地域から採取した。

Table 4.1 Characteristics of the sample collection sites with the number of households and their wastewater treatment type.

| Site number | Number of households | Type of wastewater treatment |
|-------------|----------------------|--|
| Site A | 168 | Community wastewater treatment system (CWTS) |
| Site B | 204 | Community wastewater treatment system (CWTS) |
| Site C | 171 | Community wastewater treatment system (CWTS) |
| Site D | 69 | On-site wastewater treatment system (OWTS) |
| Site E | 20 | On-site wastewater treatment system (OWTS) |
| Site F | 34 | On-site wastewater treatment system (OWTS) |
| Site G | 36 | On-site toilet wastewater treatment system (OTWTS) |
| Site H | 14 | On-site vault toilet (OVT) |
| Site I | 177 | On-site vault toilet (OVT) * |

* OVT: 78.5%; OTWTS: 5.7%; OWTS: 15.9%.

すべての水試料は実験室に持ち帰り、4°C で保管し、翌日にガラス繊維フィルターでろ過した。ろ過後の排水の pH は 6~6.5 であった。これらの水試料のろ過液は、1 週間以内に固相抽出によって濃縮した。

4.2.2 水試料の濃縮

4.2.2.1 逆相系固相抽出カートリッジと活性炭カートリッジを用いた濃縮法

一般に、水中に存在する有害物質は無機物と有機物に分類される。重金属等の無機系の遺伝子毒性物質はすでに特定されており、機器分析が可能であるため、umu 試験のようなバイオアッセイ法によって評価する必要がない。このた

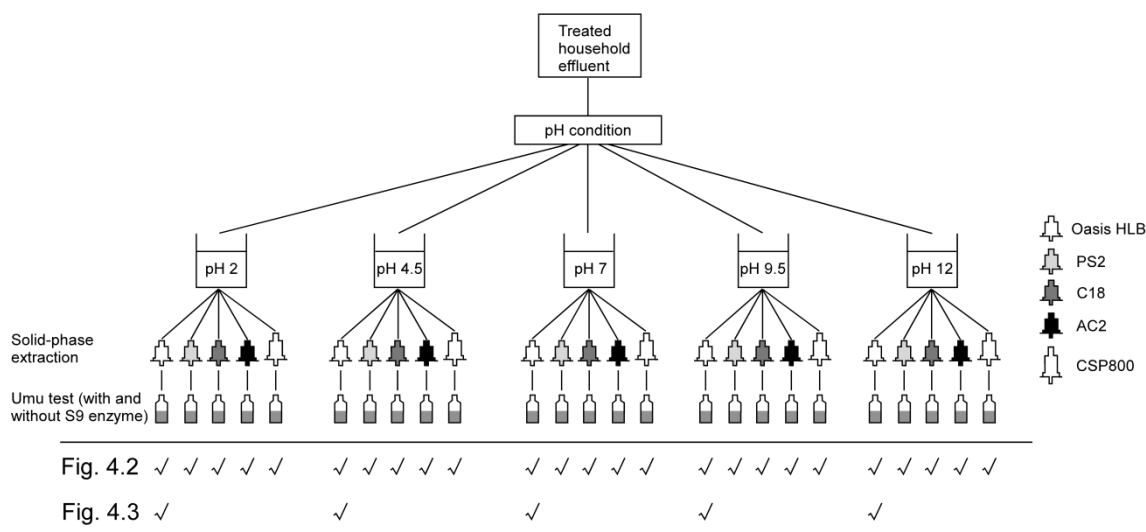


Fig. 4.1 Flow diagram showing the concentration of household effluents using Solid-phase cartridges at different pH conditions. “✓” indicates the sample shown in each figure described below.

め、本研究は多種多様な混合体と想定される有機物を対象とし、研究者により幅広く使用されている逆相系 SPE カートリッジを主として使用した。また、吸着剤の代表である活性炭カートリッジも参考として追加した。使用したカートリッジは以下の 5 種類であった。C₁₈ パウダーが充填された逆相系の C₁₈ カートリッジは長い歴史を有する。PS2 は、C₁₈ の改良型として農薬分析用等によく使用されている。Oasis HLB は、親水性から疎水性までの幅広い特性を有する化学物質を高い回収率で集められるように改良されたものである。CSP800 は主に変異原性試験用に使用されている。AC2 カートリッジは活性炭を充填したものである。これらのすべてのカートリッジは Waters 社から入手した。抽出前の洗浄操作であるコンディショニングは CSP800 カートリッジを除いて、20 mL のメタノール(MeOH)を 2 mL/min で通過させた後、100 mL の精製水を 10 mL/min で 2 回通過させた。CSP800 カートリッジには、10 mL のアセトン(Ace)

とメタノールを 2 mL/min で、100 mL の精製水を 10 mL/min で通過させること
によってコンディショニングした。コンディショニング後、Fig. 4.1 に示したよ
うに、硫酸または水酸化ナトリウム溶液を用いて、pH を 2、4.5、7、9.5、 12 ± 0.1
に調整し、150 mL の各試料水を 10 mL/min の流速で各カートリッジに通した。
その後、カートリッジ内の水分をエアポンプで除去後、吸着材上の化学物質を、
バックフラッシュ法により 1.5 mL のジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて
0.2 mL/min で脱離させて、回収した。この時点での濃縮倍率は 100 倍であった。
これらの濃縮液は -20°C で保管され、遺伝子毒性は 2 週間以内に umu 試験によ
って測定された。

4.2.2.2 4 種類のイオン交換逆相系カートリッジを用いた濃縮方法

家庭排水には、さまざまな官能基を持つ化学物質が存在していると考えられ
る。採取された水試料は pH 6.0~6.5 であった。この pH 範囲の水試料中の強酸
性物質(Strong acidic chemicals, SA, $\text{pKa} < 2$)は負に帯電したイオンとして存在し、
弱塩基性物質(Weak basic chemicals, WB, $7 < \text{pKa} < 10$) および強塩基性物質
(Strong basic chemicals, SB, $10 < \text{pKa}$) は正に帯電したイオンとして存在すると
考えた。ただし、弱酸性物質(Weak acidic chemicals, WA)はこの範囲(pH 6~6.5)
で、次の 2 つの状態を想定した。 $2 < \text{pKa} < 7$ の弱酸性物質(WA_{2-7})は、ほとんど
負に帯電したイオンであると見なすが、 $5 < \text{pKa} < 9$ の弱酸性物質(WA_{5-9})はほと
んど分子状態と考えた。一方、両性イオンはこの pH 範囲でイオン化される。と
ころで、両性イオンに結合した酸性および塩基性官能基は強弱があるため、例
えば強酸と弱塩基性の官能基を有する両性イオンは SA-Z-WB と表すこととす
る。さらに、これらの組み合わせをすべて表現すると、SA/WA-Z-WB/SB とし
て表される。イオン性の官能基を持たない分子は中性物質(Neutral, N)として表

Table 1 The washing and eluting liquid passed through four kinds of ion-exchange cartridges, and the acid-base properties of adsorbed and eluted substances in each experimental procedure.

| Experimental procedure | Cartridge name (Ion-exchange type) | | | |
|------------------------------------|--|---|---|--|
| | Oasis MCX (Strong cation-exchange) | Oasis WAX (Weak anion-exchange) | Oasis WCX (Weak cation-exchange) | Oasis MAX (Strong anion-exchange) |
| Loaded water (100 ml) | Water samples | Water samples | Water samples | Water samples |
| Load Absorbed chemicals | WA ₅₋₉ (molecule, less), N, WB, SB, SA/WA-Z-WB/SB | SA, WA ₂₋₇ (ion), WA ₅₋₉ (molecule, less), N, SA/WA ₂₋₇ -Z-WB/SB | WA (molecule, less), N, WB, SB, SA/WA-Z-WB/SB | SA, WA, N, SA/WA ₂₋₇ -Z-WB/SB |
| Passed through chemicals | SA, WA ₂₋₇ (ion) | SB, WB, WA ₅₋₉ -Z-WB/SB | SA, WA (ion) | WB, SB, WA ₅₋₉ -Z-WB/SB |
| Wash Washed liquid (50 ml) | 2% formic acid | 2% formic acid | 5% NH ₄ OH | 5% NH ₄ OH |
| Washed out chemicals | none | WA ₂₋₇ -Z-WB/SB | WA (molecule, less), SA/WA-Z-WB | none |
| Elute-1 Eluted liquid 1 (50 ml) | 100% methanol | 100% methanol | 100% methanol | 100% methanol |
| Eluted chemicals | WA ₅₋₉ (molecule, less), N (c) | WA ₂₋₇ (ion), WA ₅₋₉ (molecule), N (d) | N, WB (f) | N (e) |
| Elute-2 Eluted liquid 2 (50 ml) | 5% NH ₄ OH in methanol | 5% NH ₄ OH in methanol | 2% Formic acid in methanol | 2% Formic acid in methanol |
| Eluted out chemicals | WB, SA/WA-Z-WB (g) | SA, SA-Z-WB/SB (a) | SB, SA/WA-Z-SB (h) | WA, WA ₂₋₇ -Z-WB/SB (b) |
| Residual material in cartridges | SB, SA/WA-Z-SB | none | none | SA, SA-Z-WB/SB |

SA: strong acids; WA: weak acids; N: neutrals; WB: weak bases; SB: strong bases; ex. WA-Z-WB: zwitterion with WA and WB function groups; ex. WA₅₋₉: weak acids with 5<pKa<9

し、これらは水溶解度が低く、分子全体として非極性または低極性の化学物質である。

試料中の上述した各種の化学物質を分画するために、Table 4.2 に示した Waters 社製のイオン交換と逆相の両方の吸着特性を備えた 4 種のカートリッジを使用した。これらは逆相と強陽イオン交換のミックスモードの Oasis MCX、逆相と強陰イオン交換のミックスモードの Oasis MAX、逆相と弱陽イオン交換のミックスモードの Oasis WCX および逆相と弱陰イオン交換のミックスモードの Oasis WAX である。これらの 4 種類のカートリッジは、以下ではイオン交換カートリッジと呼称する。これらを用いる際には同カートリッジを 2 つ連結し用いた。これをメタノールと精製水でコンディショニングした後、pH 無調整の 100 mL のろ過後の水試料を 2 mL/min で通過させて水中の化学物質をロードした。続いて、Table 4.2 に示した「Wash」、「Elute-1」、「Elute-2」の溶液を順番に流した。以下に、Oasis MCX を例として、各過程で吸着または流出が予想される化学物質について説明する。

水試料をロードすると、Oasis MCX が有する逆相系の分子鎖に、分子状態の微量な弱酸(WA₅₋₉ (molecule, less))と中性物質(N)が Table 4.2 の「Load」の「Absorbed chemicals」に記したようにトラップされる。また、このカートリッジは $-\text{SO}_3^-$ 基が樹脂に結合した強陽イオン交換の部分も有するため、水試料中の弱塩基(WB)や強塩基(SB)物質のような水中で正に帯電する官能基を含む物質が、イオン結合によってトラップされる。また、両性イオン(SAWA-Z-WB/SB)はイオン化状態にあるため、正に帯電した WB か SB の部位がイオン結合によってトラップされる。一方、負に帯電した官能基を持つ強酸性物質(SA)とイオン状態の $2 < \text{pKa} < 7$ の弱酸性物質(WA₂₋₇, ion)は、「Passed through chemicals」に記したように水溶解度が高いため、中性の官能基部分は

吸着することができず、全体として吸着せずにカートリッジを通過する。

次にカートリッジの洗浄工程である「Wash」では、2 mL/min の流速で 50 mL の 2%ギ酸溶液を洗浄液として通過させる。しかし、吸着している中性分子と塩基性物質の状態は変化しないため、「Washed out chemicals」に none と記したように物質の流出はないと考えた。

次の溶出工程である「Elute-1」では、50 mL のメタノールを 2 mL/min の流速で通し、分子鎖に吸着された分子状態の微量の WA₅₋₉ (molecule, less) と N が「Eluted chemicals」に記したようにメタノールにより溶出され・回収される。

最後に、引き続きカートリッジに残っている物質を溶出させる工程である「Elute-2」では、50 mL の 5% NH₄OH in MeOH を 2 mL/min の流速で流した。この過程では WB のイオン化が抑制され、分子状態に戻り、 $-SO_3^-$ とのイオン結合が消失するため、WB と SA/WA-Z-WB が「Eluted chemicals」に示したようにメタノールにより溶出され、回収される。ただし、SB と SA/ WA-Z-SB は 5%アンモニアでは分子状態に戻らずイオンのままを維持するため、これらの物質は「Residual material in cartridges」に記したようにカートリッジ内に残留する。

Table 4.2 に示した 4 種類のイオン交換カートリッジを用いて得られた Elute-1 および-2 から収集した溶液は、窒素ガスを吹き付けて乾燥させた。次に、1 mL の DMSO を加えて物質を再溶解した。なお、「Wash」で洗われた洗浄液は回収せずに廃棄した。したがって、各採取地点からの排水は酸塩基特性に基づいて 8 つの試験用試料(Table 4.2 に示した(a)~(h))に分画された。これらの分画後の試料は-20°C で保存され、遺伝子毒性は 2 週間以内に umu 試験によって評価された。

4.2.3 umu 試験

本章で行った umu 試験は、基本的に第二章と同じであるが、ISO13829³⁶⁾を参考し、濃縮後の 100%DMSO 試料を精製水で 12%の DMSO 溶液となるように希釈した。この調製した試料をさらに 12%の DMSO 溶液で 100%、75%、50%、および 25%の 4 段階に希釈し、各濃度の 3 ウェルずつ 96 ウェルマイクロプレートに分注した。したがって、カートリッジからの DMSO 溶出の直後は濃縮倍率が 100 倍であったが、この時点の最高濃度の 100%でも濃縮倍率が 8 倍となる。これは、100%の DMSO ではサルモネラ菌が増殖しないためである。以降の手順は第三章と同じように-S9 試験と+S9 試験を行った。

4.3 実験結果と考察

4.3.1 濃縮時の吸着剤の種類と pH の違いによる遺伝子毒性の強度

Fig. 4.2 にコミュニティプラントから抽出した試料を-S9 と+S9 試験で評価した遺伝子毒性を示した。この排水は 2012 年に Site A から採集され、5 種類の吸着剤と濃縮時の水試料の pH を変化させ、抽出液を作った。コミュニティプラントは小さな下水処理場に類似の施設であるため、一日中ほぼ処理後の排水の流れが切れることなく比較的水量が安定していた。

Fig. 4.2 に示したように、活性炭吸着剤(AC2)以外の場合、pH 7 で濃縮した水試料から遺伝子毒性が検出されたため、排水中に中性物質に代表されるような水溶性の低い遺伝子毒性物質の存在が確認できた。水試料を酸性側の pH 4.5 に調整すると、遺伝子毒性がほとんどの場合で強くなった。更に、pH を 2 に下げると、-S9 試験と+S9 試験で検出された遺伝子毒性はそれぞれ 5.8~10.0 ng-4-NQO/mL と 24.4~29.6 ng-2-AA/mL であり、一つの試料を除いて、pH 7 で濃縮した試料よりほぼ 2 倍に増加した。このことは、排水中に含まれた酸性

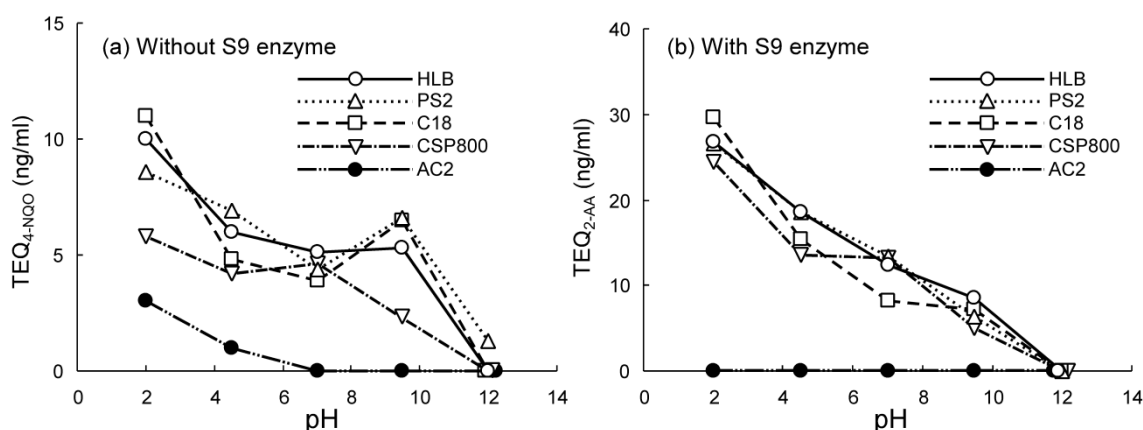


Fig. 4.2 Genotoxicity potential (TEQ_{4-NQO}, TEQ_{2-AA}) (a) without and (b) with S9 enzyme of household effluents collected from site A in 2012 after being concentrated by four kinds of solid-phase cartridges and one kind of activated carbon cartridge under five pH conditions.

官能基を有する化学物質は酸性条件下では pH 7 よりもさらにイオン化が抑制されることにより、分子状態になり、カートリッジにファンデルワールス結合したと考えられた。このことは、pH 7 時に吸着していた遺伝子毒性物質とほぼ同量の酸性官能基を有する毒性物質が排水中に存在していたことを表すと考えられる。また、これは多くの先行研究で pH を調整する場合に酸性側に調整することが理にかなっていることを表している。

pH 12 において、ほとんどの試料で遺伝子毒性を示さなかった。理由は 2 つ考えられる。製品パッケージに示されている pH 使用範囲は、Oasis HLB が 0~14、PS2 が 1~13 であったが、DMSO 溶液を使用した pH 12 の溶出段階におけるカートリッジの手押しで感じた圧力は、他の pH 値よりもかなり高かった。すなわち、カートリッジ内のオクタデシル基等に覆われたシリカ粒子が高アルカリにより、一部膨潤し、内部のシリカ表面が露出し、そこに塩基性官能基を有する物質が強固に結びつき、溶出できなかったと考えられる。なお、この場合、

排水中の酸性の官能基を有する化学物質は pH 12 でイオン状態にあるため、そもそも吸着できていない。2 つ目の理由として、膨潤して固くなったカートリッジから 1.5 ml の DMSO では吸着していた化学物質を溶出する能力が足りなかった可能性が高いと考えられたが、その理由は不明であった。次に、濃縮時の pH を 9.5 に調整すると、-S9 試験で測定された遺伝子毒性は 3 つの試料で pH7 よりも高い遺伝子毒性を示したことは特に注目すべきである。この結果は、塩基性官能基を有する遺伝子毒性物質の家庭排水中における存在を明らかにしたといえる。すなわち、環境に排出されるこれらの物質の遺伝子毒性を評価することも重要であると考えられる。

+S9 試験において、pH 9.5 で濃縮したすべての試料の遺伝子毒性は、pH 7 の試料よりも低い傾向が示され、-S9 試験で示された傾向と異なった。これは、家庭排水中の塩基性官能基を有する遺伝子毒性物質が、酸性物質よりも S9 酵素により分解されやすいことを意味する。これも、この研究で得られた新たな発見である。

吸着剤の種類における遺伝子毒性の違いについて以下で説明する。活性炭吸着剤を使用した場合、ごくわずかな遺伝子毒性が検出された。活性炭の吸着強度はほかの吸着材よりも強い一方、DMSO では溶出効果が弱く、遺伝子毒性を有する物質がほとんど溶出できなかつた可能性が考えられたが、詳細な原因は不明であった。CSP800 カートリッジによって濃縮された試料の遺伝子毒性は、いくつかの pH 値で他のカートリッジより低くなる傾向があった。これは、CSP800 カートリッジ中の吸着剤の量は、他のカートリッジの 1.5 倍であったが、他のカートリッジと同じ量の溶離液(DMSO)を使用した。したがって、CSP800 の溶出液から検出された遺伝子毒性が低いのは、脱着が不十分であるためと考えた。他の 3 つの吸着剤により濃縮された試料は、誤差内で遺伝子毒

性にほとんど差はなかった。このため、次の節では、比較的新しい製品である Oasis HLB カートリッジを使用して、様々な処理方式からの家庭排水中の遺伝子毒性物質の酸塩基特性を調べた。

4.3.2 様々な処理方式からの排水に含まれる遺伝子毒性物質の酸塩基特性

本節では、コミュニティプラント地域に限らず、様々な種類の処理施設の排水を Oasis HLB で抽出した濃縮液の遺伝子毒性強度の結果を調べ、Fig. 4.3 に示した。なお、図中の(a)および(b)における 2012 年の白丸プロットは、Fig. 4.2 の Oasis HLB の結果と同じものである。

家庭排水を pH 2 で濃縮した結果、-S9 試験と+S9 試験で検出された遺伝子毒性はそれぞれ 4.1~12.1 ng-4-NQO/mL と 17.4~51.8 ng-2-AA/mL であり、汲み取り槽を除いて、最も高い値を示した。umu 試験で我々と同じ陽性対照物質を使用した先行研究で報告された中国の河川水と下水処理施設からの排水の遺伝子毒性は、それぞれ約 N.D.~0.03 ng/mL と 0.2~6.0 ng/mL であった^{97-98, 103-104})。本研究の結果をこれらの値と比較すると、処理後の家庭排水の遺伝子毒性は河川水および下水処理場からの排水よりもそれぞれ約 100 倍および数倍高かった。このことから、小型処理施設の処理効率は、大規模な下水処理場に比べて低いことが分かった。

合併浄化槽からの放流水の遺伝毒性を示した(c)と(d)はコミュニティプラント(a, b)よりほぼ高い傾向が見られた。これは、合併浄化槽の処理能力が比較的低かったためと考えられた。また、濃縮時の pH を 7 ではなく 9.5 に調整すると、すべての遺伝子毒性値が増加し、コミュニティプラント (a)と(b)より明確な^{こぶ}瘤の形状が現れた。これは、合併浄化槽においては処理能力が低いいため、塩基性官能基を持つ遺伝子毒性物質が微生物分解によって比較的多く除去されな

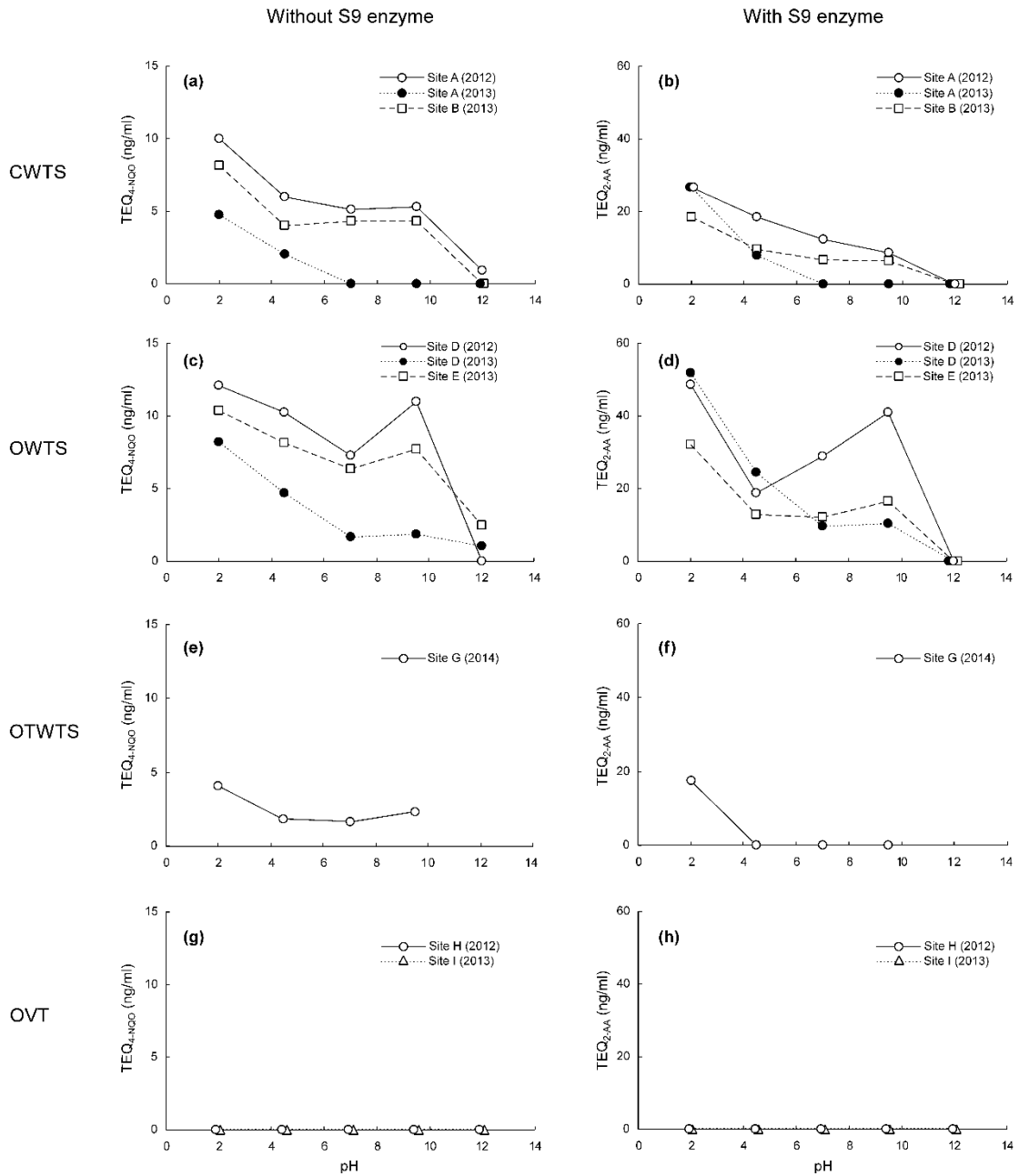


Fig. 4.3 Genotoxicity potential (TEQ_{4-NQO}, TEQ_{2-AA}) of household effluents discharged from CWTS (a, b), OWTS (c, d), OTWTS (e, f) and OVT areas (g, h) after being concentrated by Oasis HLB cartridge at various pH conditions.

OTWTS: on-site toilet wastewater treatment system; OWTS: on-site wastewater treatment system; CWTS: community wastewater treatment system; OVT: on-site vault toilet.

い可能性があること、または処理中に新しい塩基性遺伝子毒性物質が生成された可能性もある。また、第三章で汲み取り槽地域からの台所、洗濯、風呂場の未処理排水は遺伝子毒性が検出されなかったことを示したが、本章でも、Fig. 4.3 (g), (h)に示したように、汲み取り槽地域からの排水をどの pH 値で濃縮しても遺伝子毒性は検出されなかった。この結果から、未処理の生活雑排水に酸性だけではなく、中性および塩基性官能基を持つ遺伝子毒性物質もほとんど含まれていないと考えられる。すなわち、し尿系排水に遺伝子毒性物質が多く含まれることが示唆された。ところで前章では比較的高い遺伝子毒性を示した単独浄化槽からの水試料は(e, f)に示したようにどの pH においても、比較的低い遺伝子毒性を示した。これは、この年、この地点で採水を行った際に、生活雑排水が大量に流され、希釈されたためと考えた。これを明らかにするためには、複数年、複数回の採水が必要である。

以上の結果により、排水中には様々な酸塩基特性を示す官能基を持つ遺伝子毒性物質が存在すると想像できた。次の節で、これらの遺伝子毒性物質を、酸塩基特性が異なる 4 種類のイオン交換カートリッジでより細かく分画し調べた。さらに、本節までに用いた逆相カートリッジは、広い pH 範囲でイオン状態として存在する両性イオンを吸着できないため、その遺伝子毒性が評価できていない。次の節ではこの両性イオンもイオン交換カートリッジを使用することで遺伝子毒性を明らかにすることが期待される。

なお、これらの 4 種類のイオン交換カートリッジは環境水中のさまざまな化学物質のターゲット分析に使用された報告があるが¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾、遺伝子毒性を評価するようなノンターゲット分析に利用された研究は我々が調べた範囲で見当たらなかった。

4.3.3 イオン交換カートリッジで酸塩基特性別に分画した各濃縮液の遺伝子毒性強度

コミュニティプラント、合併浄化槽および単独浄化槽からの排水に含まれた遺伝子毒性物質の官能基の酸塩基特性を調べるために、4種類のイオン交換カートリッジを用いて、酸塩基特性別に分画した各濃縮液の遺伝子毒性強度をFig. 4.4に示した。なお、前節で汲み取り槽地域からの生活雑排水に遺伝子毒性物質が含まれていないことを明らかにしたため、本節では汲み取り槽地域を対象から除いた。図の横軸は、Table 4.2に示したSA (Strong acidic chemicals)からSB (Strong basic chemicals)の順に(a)から(h)の8つの溶液中の物質の酸塩基特性を示した。この節に用いられた水試料は2014年に採取されたものであった。

合併浄化槽からの家庭排水の遺伝子毒性強度はFig. 4.4 (3, 4)に示したように-S9試験と+S9試験の両方で、他の2種の処理施設より強い傾向が見られた。Fig. 4.4 (1, 2)に示したコミュニティプラントからの家庭排水の遺伝子毒性は非常に低く、Fig. 4.3に示した結果と異なる傾向であった。この差は採取年の違いにより生じたと考えたが、原因は不明であった。単独浄化槽からの排水も非常に低い遺伝子毒性を示し、その原因は前節で説明したように、水試料が大量の生活雑排水により希釈されたためと考えた。上述した結果を踏まえ、(3)に示した遺伝子毒性が比較的強かった合併浄化槽地域のSite D~Fの家庭排水を用いて、排水中の遺伝子毒性物質の各酸塩基特性別の相対強度の概略を算出した。

WAとNを含んだ濃縮溶液(d)の値とNのみを含んだ溶液(e)の遺伝子毒性の差は、WAの遺伝子毒性と見なせると考えた。すなわち、Fig. 4.4 (3)の(d)の3つの地点からの平均値16.2 ng-4NQO/mLから、(e)の3地点からの平均値(Tr. と

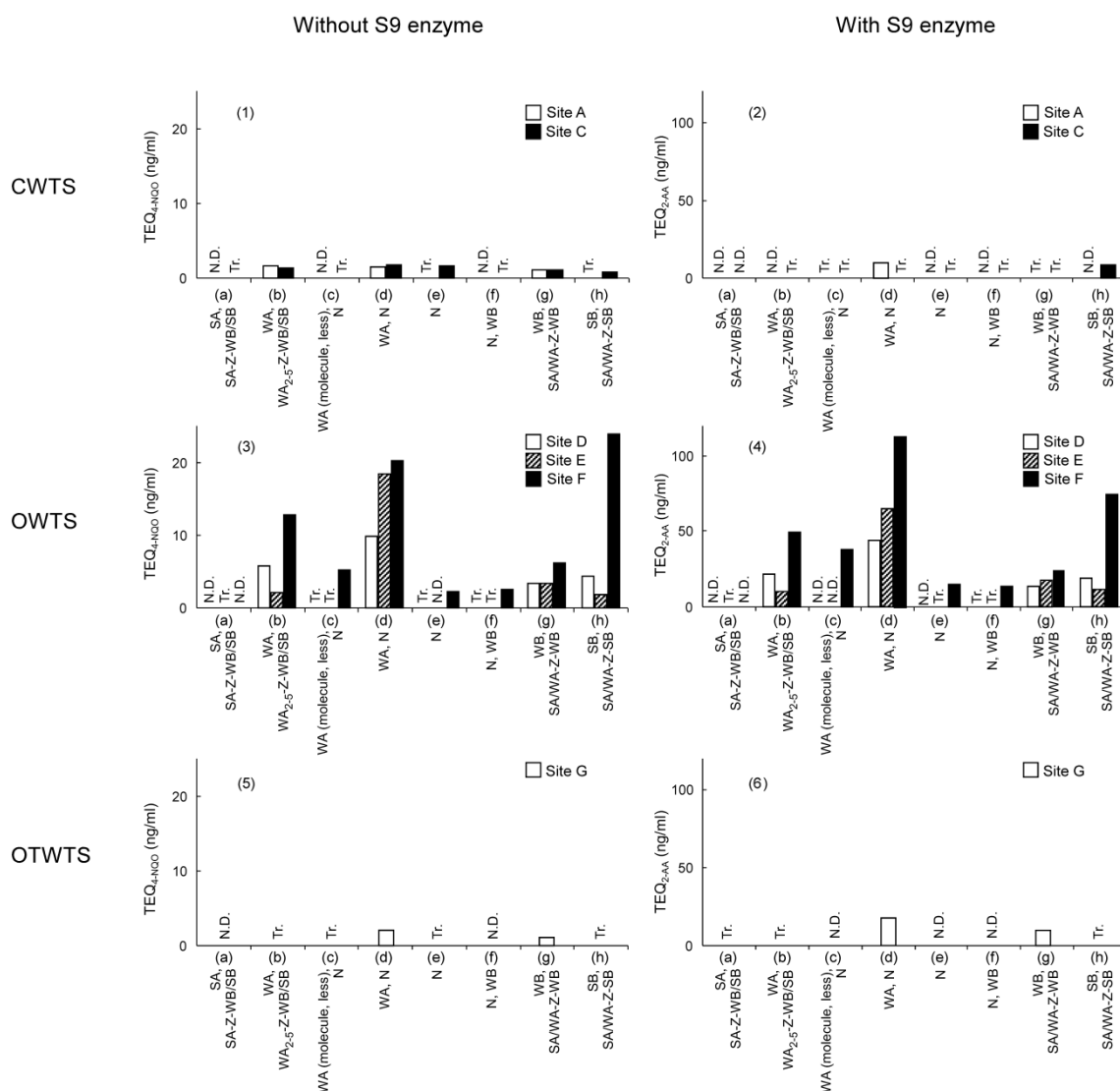


Fig. 4.4 Genotoxicity potential (TEQ4-NQO, TEQ2-AA) of household effluents from CWTS (1, 2), OWTS (3, 4) and OTWTS (5, 6) divided by acid-base properties (a) to (h) of functional groups of chemical substances using four kinds of ion-exchange cartridges. The abbreviations of the treatment types and acid-base properties were the same as those shown in Table 4.1 and 4.2 respectively.

N.D.はゼロとした) 0.7 ng-4NQO/mL を差し引くと WA=15.5 ng-4NQO/mL と算出できる。また、N と WB の両方を含んだ濃縮溶液(f)は N を含んだ(e)とほぼ同

じ遺伝子毒性を示したことから、WB はほとんど遺伝子毒性が示さないことが分かった。すなわち、 $WB \doteq 0$ であった。次に、アルカリ側の濃縮液(g)の遺伝子毒性は $WB \doteq 0$ であることから、平均値を用いて、 $SA/WA-Z-WB=4.3$ ng-4NQO/mL となることに加えて、(a)に示されているように、 $SA-Z-WB \doteq 0$ であるため、 $WA-Z-WB=4.3$ ng-4NQO/mL となる。次に、濃縮液(h)を考える。(a)から $SA-Z-SB \doteq 0$ であるため、これを差し引くと、(h)の有効物質は $SB+WA-Z-SB$ のみである。これを平均値で表現すると、 $SB+WA-Z-SB=10.0$ ng-4NQO/mL となる。

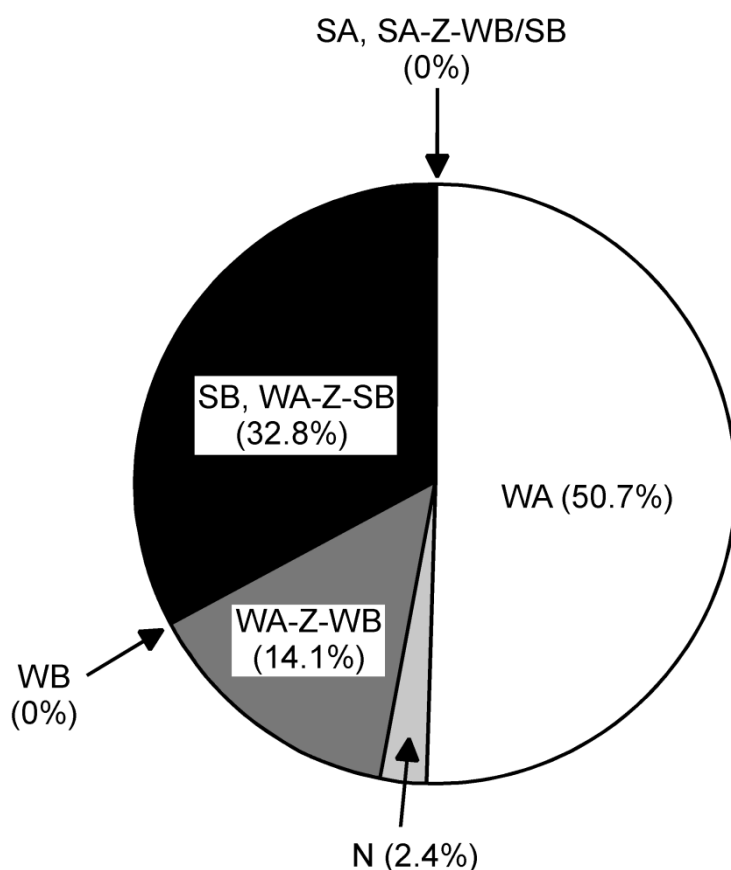


Fig. 4.5 The estimated proportion of genotoxics with various acid-base properties based on the results of Fig. 4.4 (3). The abbreviations of the acid-base properties are the same as those in Table 4.2.

上記で濃縮液(d)を用いて、WA の遺伝子毒性強度を算出したが、溶液(b)にも WA が含まれているため、(b)の遺伝子毒性は(d)と同程度かそれ以上になると予想されたが、予想より遺伝子毒性は低かった。これは、一部の WA が洗浄溶液の 5% NH₄OH / H₂O (Table 4.2 参照)により洗い流されて回収されていなかった可能性がある、または 50 mL の Elute-2 (2% Formic acid in methanol)では WA をすべて分子状態に変換させ、溶出するのに不十分であり、対象物質の一部がイオン交換基に結合したままでカートリッジ内に残留した可能性が考えられた。次に、濃縮液(c)は、の平均値 1.7 ng-4NQO/mL から N の平均値を差し引くと、WA (molecule, less)=1.0 ng-4NQO/mL となる。

以上の算出された結果に基づき、遺伝子毒性物質の官能基の酸塩基特性の割合を分かりやすくするために Fig. 4.5 を作製した。なお、図中の WA には、pH 6~7 の水試料で分子状態の WA (molecule, less)も含まれるため、図中には示していない。Fig. 4.5 に示したように、弱酸性物質 (WA) の遺伝子毒性が家庭排水の総毒性の約半分を占めた一方、中性物質の遺伝子毒性 (N) はわずかであった。特に注目すべきなのは、総遺伝子毒性の残り半分は、両性イオンと強塩基性物質によることであった。すなわち、本章で行った研究により、塩基性官能基を有する物質の遺伝子毒性研究が今後不可欠であることを示唆した。更に、両性イオンの遺伝子毒性を研究するためには、逆相系カートリッジでは吸着できないため、イオン交換カートリッジが必要であることも加えて、明らかにできた。また、遺伝毒性を示す両性イオンの酸性官能基が弱酸性の WA タイプ (WA-Z-WB/SB)に限られていることを明らかにした。

第五章 結言

第一章では、本論文の研究背景と目的を述べた。世界各国において、人口増加や急速な工業化などによる環境問題が深刻になっている。本論文で着目した大気汚染と水質汚濁は人間の健康に悪影響を及ぼしている主要な 2 つである。2015 年 9 月の国連サミットで採択された 17 の持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals, SDGs) において、いくつかの Goal が大気と下水処理の安全性に言及している。本論文では、この大気試料、および家庭排水試料を研究対象とし、その遺伝子毒性強度を明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の 3 つの章で記した研究を行った。

第二章では、長崎県の森林地域と市街地で収集した浮遊粒子中の PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) の濃度測定とバイオアッセイである umu 試験を併用して、6 年間にわたる PAHs 濃度と総遺伝子毒性の季節変動の傾向を明らかにすることを目的とした。この PAHs は汚染物質の代表的化学物質の一つであり、いくつかの PAHs が遺伝子毒性又は発ガン性を有することが報告されている。本研究の結果、両地点の PAHs 濃度と遺伝子毒性強度において 6 年間にわたって明らかな増減は見られなかった。また、両者はともに冬季が比較的高くなり、春から夏にかけて徐々に低くなる同調した傾向があることを見出した。後方流跡線解析の結果を合わせると、これらの汚染物質は主に、中国大陸と朝鮮半島から飛来したと考えられた。また、県民の森の汚染物質はすべて大陸から飛来したと仮定すると、長崎市内の PAHs 濃度および-S9 試験と+S9 試験での遺伝子毒性は越境大気がそれぞれ約 70%、100%と 75%に寄与していることを見出された。次に、PAHs の中の特定の化合物比である IcdP/(IcdP+BghiP) と Flt/(Flt+Pyr) の値を求めた結果、この冬季の大気中の毒性物質の起源は自動車等の工業活動ではなく、暖房用の石炭燃焼とバイオマスが主な排出源であると

示唆された。一方、PAHs 濃度と遺伝子毒性強度には、明らかな相関が見られなかった。すなわち、大気中の遺伝子毒性を有する化学物質は PAHs だけでなく、未知の物質も含めて多種多様であろうと推測できる。この詳細を明らかにするために、さらなる研究が必要と考えた。

第三章では、4 種類の小型処理施設から河川等の環境へ放流された処理後の家庭排水の遺伝子毒性強度や細胞毒性を比較すること及び、どの種類の放流水が実環境へ悪影響を及ぼしているかを明らかにすることを目的とした。これまでに下水処理場やし尿処理場からの排水及び、小型処理施設で処理された単一の排水の遺伝子毒性に関する研究が多少ある一方、本研究で調査対象としたような数十軒分の一般家庭の同型の浄化槽が集中する地域の排水に関する研究はほとんど見当たらない。これらの細胞毒性強度と遺伝子毒性強度を調べた結果、環境負荷は、単独浄化槽が最も高く、次に合併浄化槽、コミュニティプラントおよび汲み取り槽の順であった。この汲み取り槽地域から採取した生活雑排水は遺伝子毒性がごく微量か未検出であった一方で、し尿系排水と生活雑排水の両方を処理している合併浄化槽から、比較的高い遺伝子毒性が検出されたことから、家庭排水中の遺伝子毒性物質は主にし尿系排水由来であることを見出した。これは、本研究で得られた新たな知見であった。

第四章では、4 種類の小型処理施設からの家庭排水を逆相系および近年開発された逆相系イオン交換カートリッジで濃縮し、これらの排水中の遺伝子毒性物質の酸塩基特性を明らかにすることを目的とした。逆相系カートリッジで抽出した結果、pH 2 で濃縮した試料の遺伝子毒性が最も高く、従来から報告があったように酸性の官能基を有する物質の遺伝子毒性が最も強いと分かった一方、これまでに全く研究されていない高 pH 領域である pH 9.5 で濃縮した試料でもそれに匹敵する強い遺伝子毒性を示すことを明らかにした。この官能基をより

細かく分けて、評価するために、次に逆相系イオン交換カートリッジを使用した。その結果、弱酸性の官能基を有する物質は、家庭排水の遺伝子毒性全体の50.7%に寄与していた。一方、遺伝子毒性の46.9%は、強塩基性物質または両性イオンによることを見出し、本研究は初めてこれらの物質の遺伝子毒性を明らかにした。さらに、両性イオンは弱酸性官能基を有する物質に限られていることを見出した。

以上、本論文で行った長崎の大気及び家庭排水に関する研究から、いくつかの新たな知見が得られた。今後は、これらの結果が得られた新しい知見に基づき、主要な原因物質の特定や、環境中の遺伝子毒性物質を低減できる手法の開発が必要と考えられた。

参考文献

- 1) World Health Organization, 2016. Ambient Air Pollution: a Global Assessment of Exposure and Burden of Disease.
- 2) Rafaj, P., Kiesewetter, G., Gül, T., Schöpp, W., Cofala, J., Klimont, Z., Purohit, P., Heyes, C., Amann, M., Borken-Kleefeld, J., Cozzi, L., 2018. Outlook for clean air in the context of sustainable development goals. *Glob. Environ. Change* 53, 1-11.
- 3) National Bureau of Statistics of China, 2019. China statistical yearbook 2019, 9-2 Total Consumption of Energy and Its Composition.
- 4) Wang, R., Huang, Q., Cai, J., Wang, J., 2021. Seasonal variations of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) surrounding Chaohu Lake, China: Source, partitioning behavior, and lung cancer risk. *Atmos. Pollut. Res.* 12, 101056.
- 5) Ishtiaq, J., Syed, J., Jadoon, W., Hamid, N., Iqbal Chaudhry, M., Shahnawaz, M., Nasir, J., Haider Rizvi, S., Chakraborty, P., Li, J., Zhang, G., 2021. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at urban settings in Pakistan: Spatial variations, sources and health risks. *Chemosphere* 274, 129811.
- 6) Rocha, M., Ribeiro, A., Campos, D., Rocha, E., 2021. Temporal-Spatial Survey of PAHs and PCBs in the Atlantic Iberian Northwest Coastline, and Evaluation of their Sources and Risks for both Humans and Aquatic organisms. *Chemosphere*, 130506.
- 7) Bhutto, S., Xing, X., Shi, M., Mao, Y., Hu, T., Tian, Q., Cheng, C., Liu, W., Chen, Z., Qi, S., 2021. Occurrence and distribution of OCPs and PAHs in

- water, soil and sediment of Daye Lake. *J. Geochem. Explor.* 226, 106769.
- 8) Yuan, Z., He, B., Wu, X., Simonich, S., Liu, H., Fu, J., Chen, A., Liu, H., Wang, Q., 2021. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban stream sediments of Suzhou Industrial Park, an emerging eco-industrial park in China: Occurrence, sources and potential risk. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 214, 112095.
 - 9) Jordan, R., Cejas, M., Costa, H., Sauer, T., McWilliams, L., 2021. PAH source differentiation between historical MGP and significant urban influences for sediments in San Francisco Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 166, 112248.
 - 10) Jia, T., Guo, W., Xing, Y., Lei, R., Wu, X., Sun, S., He, Y., Liu, W., 2021. Spatial distributions and sources of PAHs in soil in chemical industry parks in the Yangtze River Delta, China. *Environ. Pollut.* 283, 117121.
 - 11) Zhang, Y., Chen, H., Liu, C., Chen, R., Wang, Y., Teng, Y., 2021. Developing an integrated framework for source apportionment and source-specific health risk assessment of PAHs in soils: Application to a typical cold region in China. *J. Hazard. Mater.* 415, 125730.
 - 12) 小林由典, 大河内博, 緒方裕子, 名古屋俊士, 2013。大気中ガス態多環芳香族炭化水素及びオキシ化多環芳香族炭化水素の高速溶媒抽出法を用いた同時迅速前処理法の開発。分析化学 62 巻 10 号, 879-889。
 - 13) 畠山史郎, 2009。(4) 東アジアの大気環境。大気環境学会誌, 44 巻 6 号, 339。
 - 14) 宮本潤, 2005。日本海沿岸の地域における高オキシダント濃度。埼玉学園大学紀要(経営学部編) 第 5 号, 1-5。
 - 15) 岩本真二, 大石興弘, 田上四郎, 力 寿雄, 山本重一, 2008。福岡県におけ

る光化学オキシダントの高濃度要因の分類。大気環境学会誌第 43 巻第 3 号, 173-179。

- 16) OECD.Stat, last updated: Mach 2020. “Wastewater treatment (% population connected)”. https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=WATER_TREAT. Accessed 14/08/2020.
- 17) U.S. Census Bureau, 2013. American Housing Survey for the United States: 2011, Current Housing Reports, Series H150/11, Washington, DC, 2013.
- 18) Ministry of the Environment Government of Japan, 2013. Press Release: FY 2012 Dissemination Status of Johkasou, On-Site Treatment Systems for Domestic Wastewater. <https://www.env.go.jp/en/headline/1999.html>. Accessed 14/08/2020.
- 19) Carlow Tanks, Septic Tank Regulations in Ireland, 2014. Available from: <https://www.carlowtanks.ie/septic-tank-regulations-in-ireland/>. Accessed 14/08/2020.
- 20) Feretti, D., Acito, M., Dettori, M., Ceretti, E., Fatigoni, C., Posadino, S., Zerbini, I., Villarini, M., Moretti, M., Castiglia, P., Azara, A., 2020. Genotoxicity of source, treated and distributed water from four drinking water treatment plants supplied by surface water in Sardinia, Italy. *Environ. Res.* 185, 109385.
- 21) Han, X., Ji, X., Ma, X., Liu, J.-L., He, Z.-Y., Chang, W., Tang, F., Liu A.-L., 2020. An investigation of changes in water quality throughout the drinking water production/distribution chain using toxicological and fluorescence analyses. *J. Environ. Sci. (China)* 87, 310–318.

- 22) Žegura, B., Heath, E., Černoša, A., Filipic, M., 2009. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere* 75, 1453–1460.
- 23) Zeng, Q., Zhang, S.H., Liao, J.D., Miao, Y., Wang, X.Y., Yang, P., Yun, L.J., Liu, A.L., Lu, W.Q., 2015. Evaluation of genotoxic effects caused by extracts of chlorinated drinking water using a combination of three different bioassays. *J Hazard Mater.* 296, 23–29.
- 24) Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources. *Chemosphere* 45, 957–969.
- 25) Mazhar, M., Khan, N.A., Ahmed, S., Khan, A.H., Hussain, A., Rahisuddin, Changani, F., Yousefi, M., Ahmadi, S., Vambol, V., 2020. Chlorination disinfection by-products in municipal drinking water - A review. *J. Clean. Prod.* 273, 123159.
- 26) Takanashi, H., Kishida, M., Nakajima, T., Ohki, A., Akiba, M., Aizawa, T., 2007. Surveying the mutagenicity of tap water to elicit the effects of purification processes on Japanese tap water. *Chemosphere* 77, 434–439.
- 27) Tanaka, T., Ogiwara, T., Kobayashi, Y., Kinoshita, E., Sugiyama, H., 2007. Pollutant load discharged from Johkasou systems and its impact on water quality of river and lake. *J. Jpn. Soc. Water Environ.* 30, 219–325.
- 28) 厚生労働省、2021. 令和2年(2020)の人口動態統計月報年計(概数)の概況。
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai20/dl/gaikyouR2.pdf>.

- 29) Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 31, 347–363.
- 30) Tsai, W., Chang, H., Tseng, Y., Yin, H., Liao, J., Agrawal, D., Wen, H., 2020. Toxicity evaluation of water extract of tissue-cultured *Taraxacum formosanum* by acute, subacute administration, and Ames test. *Electron. J. Biotechnol.* 45, 38–45.
- 31) Sujbert, L., Rácz, G., Szende, B., Schröder, H., Werner, W., Török, G., 2006. Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: Survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test. *Toxicology* 219, 106–112.
- 32) Corvi, R., Madia, F., 2017. In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced?. *Food Chem. Toxicol.* 106, 600–608.
- 33) Dantas, F., Castilho, P., Almeida-Apolonio, A., Araújo, R., Oliveira, K., 2020. Mutagenic potential of medicinal plants evaluated by the Ames Salmonella/microsome assay: A systematic review. *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* 786, 108338.
- 34) Levy, D., Zeiger, E., Escobar, P., Hakura, A., van der Leede, B., Kato, M., Moore, M., Sugiyama, K., 2019. Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test). *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 848, 403074.
- 35) Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H., 1985. Evaluation of the new system, (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res, Environ Mutagen Relat Subj.* 147, 219–229.

- 36) ISO 13829, 2000. Water Quality – Determination of Genotoxicity of Water and Waste Water Using the umu-test (Switzerland).
- 37) DIN 38415 T3. 1995. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, abwasser- und Schlammuntersuchung. Suborganismische Terstverfahren (Gruppe T), Bestimmung des erbgutveraendernden Potentials von Wasser und Abwasser mit dem umu-Test, VCH Verlagsgesellschaft mbh. Weinheim, Germany.
- 38) Hamers, T., van Schaardenburg, M., Felzel, E., Murk, A., Koeman, J., 2000. The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. *Sci Total Environ.* 262, 159–174.
- 39) Fushimi, A., Nakajima, D., Furuyama, A., Suzuki, G., Ito, T., Sato, K., Fujitani, Y., Kondo, Y., Yoshino, A., Ramasamy, S., Schauer, J., Fu, P., Takahashi, Y., Saitoh, K., Saito, S., Takami, A., 2021. Source contributions to multiple toxic potentials of atmospheric organic aerosols. *Sci Total Environ.* 773, 145614.
- 40) Kittinger, C., Marth, E., Reinthaler, F.F., Zarfel, G., Pichler-Semmelrock, F., Mascher, W., Mascher, G., Mascher, F., 2013. Water quality assessment of a Central European River— Does the Directive 2000/60/EC cover all the needs for a comprehensive classification?. *Sci Total Environ.* 447, 424–429.
- 41) Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: A review. *Mutat. Res. Rev Mutat. Res.* 567, 109–49.
- 42) Caillet, S., Lessard, S., Lamoureux, G., Lacroix, M., 2011. Umu test applied for screening natural antimutagenic agents. *Food Chem.* 124, 1699–1707.

- 43) Yasunaga, K., Kiyonari, A., Nakagawa, M., Yoshikawa, K., 2006. Investigation into the ability of the Salmonella umu test to detect DNA damage using antitumor drugs. *Toxicol. In Vitro* 20, 712–728.
- 44) Zounkova, R., Kovalova, L., Blaha, L., Dott, W., 2010. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. *Chemosphere* 81, 253–260.
- 45) Reifferscheid, G., Heil, J., 1996. Validation of the SOS/umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutat Res, Genet Toxicol.* 369, 129–145.
- 46) Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B., Hansen, P.-D., 2002. The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. *Chemosphere* 46, 225–233.
- 47) Ono, Y., Somiya, I., Kawagauchi, T., Mohri, S., 1996. Evaluation of toxic substances in effluents from a wastewater treatment plant. *Desalination* 106, 255-261.
- 48) Wei, D., Tan, Z., Du, Y., 2012. Toxicity-based assessment of the treatment performance of wastewater treatment and reclamation processes. *J Environ Sci.* 24, 969–978.
- 49) Tang, F., Hu, H., Wu, Q., Tang, X., Sun, Y., Shi, X., Huang, J., 2013. Effects of chemical agent injections on genotoxicity of wastewater in a microfiltration-reverse osmosis membrane process for wastewater reuse. *J Hazard Mater.* 260, 231– 237.
- 50) Wang, D., Xu, Z., Zhao, Y., Yan, X., Shi, J., 2011. Change of genotoxicity

for raw and finished water: Role of purification processes. *Chemosphere* 83, 14–20.

- 51) Zeng, Q., Zhang, S., Liao, J., Miao, Y., Wang, X., Yang, P., Yun, L., Liu, A., Lu, W., 2015. Evaluation of genotoxic effects caused by extracts of chlorinated drinking water using a combination of three different bioassays. *J Hazard Mater.* 296, 23–29.
- 52) Wirth, J.D., 1996. The Trail Smelter Dispute: Canadians and Americans Confront Transboundary Pollution, 1927–41. *Environ. Hist.* 1, 34–51.
- 53) Lunde, G., Bjorseth, A., 1977. Polycyclic aromatic hydrocarbons in long-range transported aerosols. *Nature* 268, 518–519.
- 54) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Agents Classified by the IARC Monographs, 1-129.
- 55) Lee, W.J., Liow, M.C., Tsai, P.J., Hsieh, L.T., 2002. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from medical waste incinerators. *Atmos. Environ.* 36, 781–790.
- 56) Yang, H.H., Hsieh, L.T., Liu, H.C., Mi, H.H., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from motorcycles. *Atmos. Environ.* 39, 17–25.
- 57) Borrás, E., Tortajada-Genaro, L.A., Vázquez, M., Zielinska, B., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon exhaust emissions from different reformulated diesel fuels and engine operating conditions. *Atmos. Environ.* 43, 5944–5952.
- 58) Pham, C.T., Boongla, Y., Nghiem, T.D., Le, H.T., Tang, N., Toriba, A., Hayakawa, K., 2019. Emission characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons from open burning

- of rice straw in the north of Vietnam. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 2343.
- 59) Cattaneo, A., Fermo, P., Urso, P., Perrone, M.G., Piazzalunga, A., Tarlassi, J., Carrer, P., Cavallo, D.M., 2016. Particulate-bound polycyclic aromatic hydrocarbon sources and determinants in residential homes. *Environ. Pollut.* 218, 16–25.
- 60) Piazzalunga, A., Anzano, M., Collina, E., Lasagni, M., Lollobrigida, F., Pannocchia, A., Fermo, P., Pitea, D., 2013. Contribution of wood combustion to PAH and PCDD/F concentrations in two urban sites in Northern Italy. *J. Aerosol Sci.* 56, 30–40.
- 61) Marr, L.C., Kirchstetter, T.W., Harley, R.A., Miguel, A.H., Hering, S.V., Hammond, S.K., 1999. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in motor vehicle fuels and exhaust emissions. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3091–3099.
- 62) Zoccolillo, L., Babi, D., Felli, M., 2000. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in gasoline by HPLC and GC-MS. *Chromatographia* 52, 373–376.
- 63) Zhao, Y., Hong, B., Fan, Y., Wen, M., Han, X., 2014. Accurate analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and alkylated PAHs homologs in crude oil for improving the gas chromatography/mass spectrometry performance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 242–250.
- 64) Crisafully, R., Milhome, M.A.L., Cavalcante, R.M., Silveira, E.R., De Keukeleire, D., Nascimento, R.F., 2008. Removal of some polycyclic aromatic hydrocarbons from petrochemical wastewater using low-cost adsor-

- bents of natural origin. *Bioresour. Technol.* 99, 4515–4519.
- 65) Qi, W., Liu, H., Qu, J., Hu, C., Lan, H., Berg, M., Ren, H., Xu, W., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons in effluents from wastewater treatment plants and receiving streams in Tianjin, China. *Environ. Monit. Assess.* 177, 467–480.
- 66) Qi, W., Liu, H., Pernet-Coudrier, B., Qu, J., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater, WWTPs effluents and in the recipient waters of Beijing, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 4254–4260.
- 67) Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002. PAHs in the Fraser River basin: A critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 33, 489–515.
- 68) Zhang, X.L., Tao, S., Liu, W.X., Yang, Y., Zuo, Q., Liu, S.Z., 2005. Source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons based on species ratios: A multimedia approach. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9109–9114.
- 69) De La Torre-Roche, R.J., Lee, W.Y., Campos-Díaz, S.I., 2009. Soil-borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: Analysis of a potential problem in the United States/Mexico border region. *J. Hazard. Mater.* 163, 946–958.
- 70) Odabasi, M., Vardar, N., Sofuoglu, A., Tasdemir, Y., Holsen, T.M., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Chicago air. *Sci. Total Environ.* 227, 57–67.
- 71) Bari, M.A., Baumbach, G., Kuch, B., Scheffknecht, G., 2010. Particle-phase concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air of rural

- residential areas in southern Germany. *Air Qual. Atmos. Health* 3, 103–116.
- 72) Singh, D.P., Gadi, R., Mandal, T.K., 2011. Characterization of particulate-bound polycyclic aromatic hydrocarbons and trace metals composition of urban air in Delhi, India. *Atmos. Environ.* 45, 7653–7663.
- 73) Vestenius, M., Leppänen, S., Anttila, P., Kyllönen, K., Hatakka, J., Hellén, H., Hyvärinen, A.P., Hakola, H., 2011. Background concentrations and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in south-eastern Finland. *Atmos. Environ.* 45, 3391–3399.
- 74) Chen, Y.C., Chiang, H.C., Hsu, C.Y., Yang, T.T., Lin, T.Y., Chen, M.J., Chen, N.T., Wu, Y.S., 2016. Ambient PM_{2.5}-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Changhua county, central Taiwan: Seasonal variation, source apportionment and cancer risk assessment. *Environ. Pollut.* 218, 372–382.
- 75) Yang, L., Tang, N., Matsuki, A., Takami, A., Hatakeyama, S., Kaneyasu, N., Nagato, E.G., Sato, K., Yoshino, A., Hayakawa, K., 2018. A comparison of particulate-bound polycyclic aromatic hydrocarbons long-range transported from the Asian continent to the Noto Peninsula and Fukue Island, Japan. *Asian J. Atmos. Environ.* 12, 369–376.
- 76) Manoli, E., Kouras, A., Samara, C., 2004. Profile analysis of ambient and source emitted particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from three sites in northern Greece. *Chemosphere* 56, 867–878.
- 77) Li, Z., Porter, E.N., Sjödin, A., Needham, L.L., Lee, S., Russell, A.G., Mulholland, J.A., 2009. Characterization of PM_{2.5}-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Atlanta—Seasonal variations at urban, suburban, and rural

- ambient air monitoring sites. *Atmos. Environ.* 43, 4187–4193.
- 78) Rehwagen, M., Müller, A., Massolo, L., Herbarth, O., Ronco, A., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Sci. Total Environ.* 348, 199–210.
- 79) Moreno, T., Kojima, T., Amato, F., Lucarelli, F., De La Rosa, J., Calzolari, G., Nava, S., Chiari, M., Alastuey, A., Querol, X., Gibbons, W., 2013. Daily and hourly chemical impact of springtime transboundary aerosols on Japanese air quality. *Atmos. Chem. Phys.* 13, 1411–1424.
- 80) Masiol, M., Benetello, F., Harrison, R.M., Formenton, G., De Gaspari, F., Pavoni, B., 2015. Spatial, seasonal trends and transboundary transport of PM_{2.5} inorganic ions in the Veneto region (Northeastern Italy). *Atmos. Environ.* 117, 19–31.
- 81) Itahashi, S., Uno, I., Osada, K., Kamiguchi, Y., Yamamoto, S., Tamura, K., Wang, Z., Kurosaki, Y., Kanaya, Y., 2017. Nitrate transboundary heavy pollution over East Asia in winter. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 3823–3843.
- 82) Stein, A.F., Draxler, R.R., Rolph, G.D., Stunder, B.J.B., Cohen, M.D., Ngan, F., 2015. NOAA's HYSPLIT atmospheric transport and dispersion modeling system. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 96, 2059–2077.
- 83) Rolph, G., Stein, A., Stunder, B., 2017. Real-time Environmental Applications and Display System: READY. *Environ. Model. Softw.* 95, 210–228.
- 84) Tobiszewski, M., Namieśnik, J., 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environ. Pollut.* 162, 110–119.
- 85) Huang, L., Chernyak, S.M., Batterman, S.A., 2014. PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons), nitro-PAHs, and hopane and sterane biomarkers in

- sediments of southern Lake Michigan, USA. *Sci. Total Environ.* 487, 173–186.
- 86) Shi, G.L., Feng, Y.C., Wu, J.H., Li, X., Wang, Y.Q., Xue, Y.H., Zhu, T., 2009. Source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban particulate matter of Tangshan, China. *Aerosol Air Qual. Res.* 9, 309–315.
- 87) Byambaa, B., Yang, L., Matsuki, A., Nagato, E.G., Gankhuyag, K., Chuluunpurev, B., Banzragch, L., Chonokhuu, S., Tang, N., Hayakawa, K., 2019. Sources and characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient total suspended particles in Ulaanbaatar City, Mongolia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 442.
- 88) Matsumoto, Y., Sakai, S., Kato, T., Nakajima, T., Satoh, H., 1998. Long-term trends of particulate mutagenic activity in atmosphere of Sapporo. 1. Determination of mutagenic activity by the conventional tester strains TA98 and TA100 during an 18-year period (1974-1992). *Environ. Sci. Technol.* 32, 2665–2671.
- 89) Zwodziak, J., Jadczyk, P., Kucharczyk, J., 2001. Seasonal variability of the mutagenicity of airborne particles in the town center. *J. Aerosol Sci.* 32, 409–423.
- 90) Coulibaly, S., Minami, H., Abe, M., Hasei, T., Sera, N., Yamamoto, S., Funasaka, K., Asakawa, D., Watanabe, M., Honda, N., Wakabayashi, K., Watanabe, T., 2015. Seasonal fluctuations in air pollution in Dazaifu, Japan, and effect of long-range transport from mainland East Asia. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1395–1403.
- 91) Ikeda, K., Yamaji, K., Kanaya, Y., Taketani, F., Pan, X., Komazaki, Y., Ku-

- rokawa, J., Ohara, T., 2014. Sensitivity analysis of source regions to PM_{2.5} concentration at Fukue Island, Japan. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 64, 445–452.
- 92) Yang, X.Y., Okada, Y., Tang, N., Matsunaga, S., Tamura, K., Lin, J.M., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., 2007. Long-range transport of polycyclic aromatic hydrocarbons from China to Japan. *Atmos. Environ.* 41, 2710–2718.
- 93) Aishwarya, J.M., Nilavunesan, D., Baskaralingam, P., Sivanesan. S., 2016. Performance evaluation of sewage treatment plant at a residential building. *Int. J. Environ. Sustainable Dev.* 15, 326–336.
- 94) Makino, R., Gamo, M., Sato, N., Nakanishi. J., 2005. Removal rate of 1,4-dioxane in a sewage treatment plant. *J. Jpn. Soc. Water Environ.* 28, 211–215.
- 95) Campos, C.F., Morelli, S., De Campos, E.O., Santos, V.S.V., De Morais, C.R., Cunha, M.C., Souto, H.N., Pavanin, L.A., Bometti, A.M., Pereira, B.B., 2019. Assessment of genotoxic potential of water courses impacted by wastewater treatment effluents using micronucleus assay in plants from the species *Tradescantia*. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 82, 752–759.
- 96) Tang, X., Wu, Q.Y., Yang, Y., Hu, H.Y., 2014. Genotoxicity removal of reclaimed water during ozonation. *J. Environ. Sci.* 26, 1243–1248.
- 97) Wu, Q.Y., Li, Y., Hu, H.Y., Sun, Y.X., Zhao, F.Y., 2010. Reduced effect of bromide on the genotoxicity in secondary effluent of a municipal wastewater treatment plant during chlorination. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4924–4929.
- 98) Wu, Q.Y., Hu, H.Y., Zhao, X., Li, Y., 2010. Effects of chlorination on the

- properties of dissolved organic matter and its genotoxicity in secondary sewage effluent under two different ammonium concentrations. *Chemosphere* 80, 941–946.
- 99) Chai, Q., Hu, A., Qian, Y., Ao, X., Liu, W., Yang, H., Xie, Y.F., 2018. A comparison of genotoxicity change in reclaimed wastewater from different disinfection processes. *Chemosphere* 191, 335–341.
- 100) Mišák, M., Ferk, F., Schaar, H., Yamada, M., Jaeger, W., Knasmueller, S., Kreuzinger, N., 2020. Genotoxic activities of wastewater after ozonation and activated carbon filtration: different effects in liver-derived cells and bacterial indicators. *Water Res.* 186, 116328.
- 101) Ragazzo, P., Feretti, D., Monarca, S., Dominici, L., Ceretti, E., Viola, G., Piccolo, V., Chiucchini, N., Villarini, M., 2017. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. *Water Res.* 116, 44–52.
- 102) Zeyad, M.T., Kumar, M., Malika, A., 2019. Mutagenicity, genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide industry wastewater using bacterial and plant bioassays. *Biotechnol. Rep.* 24, 00389.
- 103) Yan, Y., Jiang, W.W., Li, N., Ma, M., Wang, D.H., Wang, Z.J., Rao, K.F., 2014. Assessing of genotoxicity of 16 centralized source-waters in China by means of the SOS/umu assay and the micronucleus test: Initial identification of the potential genotoxicants by use of a GC/MS method and the QSAR Toolbox 3.0. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 763, 36–43.
- 104) Han, Y.N., Li, N., Oda, Y., Ma, M., Rao, K.F., Wang, Z.J., Jin, W., Hong, G.,

- Li, Z.G., Luo, Y., 2016. Evaluation of genotoxic effects of surface waters using a battery of bioassays indicating different mode of action. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 448–456.
- 105) Fontanals, N., Borrull, F., Marcé, R., 2020. Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* 1609, 460531.
- 106) Hu, S.Y., Gong, T.T., Ma, J., Tao, Y.X., Xian, Q.M., 2018. Simultaneous determination of iodinated haloacetic acids and aromatic iodinated disinfection byproducts in waters with a new SPE- HPLC-MS/MS method. *Chemosphere* 198, 147–153.
- 107) Santos, M., Franquet-Griell, H., Alves, A., Lacorte, S., 2018. Development of an analytical methodology for the analysis of priority cytostatics in water. *Sci. Total Environ.* 645, 1264–1272.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力と、懇切丁寧なご指導を賜りました長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科教授、高尾雄二氏、助教、久保隆氏に心より感謝致します。

また、有益なご助言、ご助力をいただいた同研究科教授、長江真樹氏、西山雅也氏に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究における様々な面でご協力を賜りました、環境科学部高尾研究室の皆様に深く御礼を申し上げます。

2022年3月 柏汶志(Bai Wenzhi)