

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11669

研究課題名(和文) 土壌環境における消毒副生成物質の挙動に及ぼす気候的要因の影響

研究課題名(英文) Effects of climatic factors on the behavior of disinfectant-produced substances in soil environment

研究代表者

高木 敬彦 (TAKAGI, Yukihiko)

帝京平成大学・健康医療スポーツ学部・教授

研究者番号：30163182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：感染症流行時に酪農関連施設周辺の土壌に散布される各種消毒剤のうち、塩素系消毒剤散布による有害な反応副生成物について、当該物質散布後の挙動に寄与する因子として、温度変化や紫外線、さらに降雨による影響を突異原性検出を指標に調べた。その結果、温度については夏場、冬場の温度下での3か月間における顕著な低下は認められなかった。また降雨の影響を調べたカラム試験では副生成物の水への溶出が確認され、さらに野外試験での結果から、表層の突異原性を示す反応生成物は降雨と共に地下に浸透することで表層の突異原性が低下することが示唆され、生成された突異原性物質には、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸などが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、塩素系消毒剤の土壌への利用は土壌にすでに存在する物質等との反応により突異原性物質が産生されること、その残留は高温環境下、低温環境下においても3か月を超える期間は残存すること、また、降雨により地下浸透が起こりうることから、副生成物の地下水への混入等についても懸念される。よって、消毒剤を感染症の予防に土壌等に使用する場合には、アルカリ系消毒剤等を優先することが推奨される。

研究成果の概要(英文)：Among various disinfectants sprayed on the soil around livestock-related facilities during the occurrences of an infectious disease, harmfully reactive by-products caused by chlorine-based disinfectants were investigated. As factors contributing to the behaviors of the reactive products after spraying the concerned substances, the effects of temperature changes, ultraviolet rays, and rainfalls were measured by the detection of mutagenicity. As a result, no significant decrease in mutagenicity was observed for three months under the temperature conditions of summer and winter. In addition, in a column test investigating the effects of rainfall, it was confirmed that reactive by-products were eluted in water. Furthermore, the results of field tests suggest that the amount of mutant progenitor on the ground surface decreases as it penetrates underground due to rainfall. It is found / noted that the mutable substances produced contained dichloroacetic acid and trichloroacetic acid.

研究分野：環境衛生

キーワード：塩素系消毒剤 土壌 突異原性 温度環境 降水 microsuspension法

1. 研究開始当初の背景

頻繁に発生する鳥インフルエンザ等のウィルス性感染症の発生や口蹄疫などの重大な感染症は周辺諸国から報告されており、再び日本国内へのウィルス侵入の危険性が拭えないことから、人への感染を含めた感染症の脅威は続いている。これらの感染症対策の主なものの1つに消毒剤による施設内や周辺の大規模な消毒があり、その使用の有効性が認められている。現在、感染症の発生が報告されると発生地域や当該施設だけでなく、周辺の地域においても原因微生物の侵入を阻止するため消毒剤は幅広く使用されている。一方、消毒剤が対象以外の周辺環境に使用された場合、その影響には不明な点も多い。今後も感染症が発生した場合、大量の消毒剤が周辺地域や道路等にも散布されることが予想されるため、環境への配慮も必要となる。野外における消毒薬の使用により、特に土壤中で副生成物が生成された場合には移動がないため、一定期間残存する可能性は否定できない。一方で土壌表層は降水、風、紫外線、気温等の自然的要因の影響を絶えず受けることから、土壌環境における副生成物の挙動にこれらの物理的環境条件が関与する可能性が高いが、その実態には不明である。そのため実験室内や野外試験などを行い、副生成物の挙動を明らかにしていく必要がある。

2. 研究目的

環境中での消毒副生成物の問題は、水道水で起きることが数多く報告され、よく知られているが、浄水場では大量の塩素剤を添加した結果、水道水中に元来含まれている有機物と添加した塩素剤による反応で消毒副生成物[トリハロメタン類 (THMs) に代表される多くの有機ハロゲン化合物]が生成されている。生成の原因には、原水中に含まれるフミン酸、フルボ酸などの物質があり、これらと塩素が反応することで生成するクロロホルムなどの消毒副生成物に変異原性を示していることが指摘され、人体への影響が懸念されている。消毒副生成物の前駆物質であるフミン酸、フルボ酸などの物質は土壌中にも含まれており、これらの物質と塩素系消毒剤散布後の過程で副生成物が変異原性を有することも想定されることから、本研究では塩素系消毒剤を対象に、関東で分布率の高い3土壌を対象に、実験室内において同消毒剤副生成物の消長について変異原性検出を指標に夏と冬の温度下で一定期間確認すると共に、紫外線による影響、さらに野外試験において地下浸透実験等も行い、消毒副生成物の挙動の把握、また機器分析による主たる変異原性物質の同定を試み、その実態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

関東エリアから3種類の土壌をそれぞれ異なった地域で2か所ずつ採取し、採取した土壌個々に塩素系消毒剤を散布し、乾燥後に抽出に供した。

塩素系消毒剤の散布によって生成された土壌中の副生成物の消長に及ぼす物理的環境の影響に関する研究では、温度や紫外線の影響を調べるため、室内に設定した各温度下(4℃、30℃)および紫外線灯を用いた紫外線照射下で定期的に各土壌の一部を採取しながら最終的には3か月間まで採取を行った。地下浸透のモデル実験では、ガラス製カラムを用い、各土壌に対して2本のガラス製カラムに同じ土壌を同量入れた後、塩素系消毒剤を添加し、一方のカラムはそのまま放置、他方のカラムには蒸留水(以下、水)を一定量添加した。野外での地下浸透試験では3本のステンレス製筒を施設内の敷地に等間隔で立て(写真)、筒内に塩素系消毒剤を一定量添加して放置後、3か月分の降水量相当の水を分割して定期的に上から注ぎ、放置してから筒横の土壌を縦方向に掘り下げ、筒下の土壌を深さ別に横から20 cm間隔で採取した。地下浸透の検討とは別に野外における消毒副生成物の挙動を調べるため、施設内の別の場所に一定の区画2か所を確保し、区画内の土壌表層に塩

素系消毒剤を同量散布して定期的に1年後まで表層の一部を採取した。採取した各土壌はアセトンを抽出溶媒とする超音波抽出法で抽出し、濃縮液を濾過滅菌した後に窒素ガスで溶媒のみを留去し、変異原性試験当日まで-80℃で保存した。変異原性測定はAmes法の高感度法であるmicrosuspension法を用いた。試験菌株には*Salmonella* Typhimurium TA98株およびTA100株を使用し、S9mix添加および無添加条件下で測定した。機器分析用の試料調製は、塩素系消毒剤処理土壌を水抽出し、ろ過後、pHを2に調整し、過飽和の状態まで塩化ナトリウムを加え、tert-Butyl-methyl etherで抽出したものをLC-MS/MS(LC800; ジーエルサイエンス社製, 3200QTRAP; ABサイエックス社製)によるQ1 SCAN測定およびGC/MS(GC6890/5973MSD; Agilent technologies社製)によるSCAN測定を行った。LC-MS/MS Q1 SCAN測定はエレクトロスプレーイオン化によりSCAN Range: m/z 30-300とした。GC/MSによるSCAN測定は電子衝突イオン化法によりSCAN Rangeをm/z 50-500とした。

4. 研究成果

今回、試験に供した6土壌ともに塩素系消毒剤散布未処理時に変異原性試験に供した結果、変異原性はすべて陰性であった。

まず塩素系消毒剤を散布され生成された副生成物の変異原性の消長に及ぼす物理的条件の影響についても6土壌で検討した。その結果の一部をFig. 1に示す。

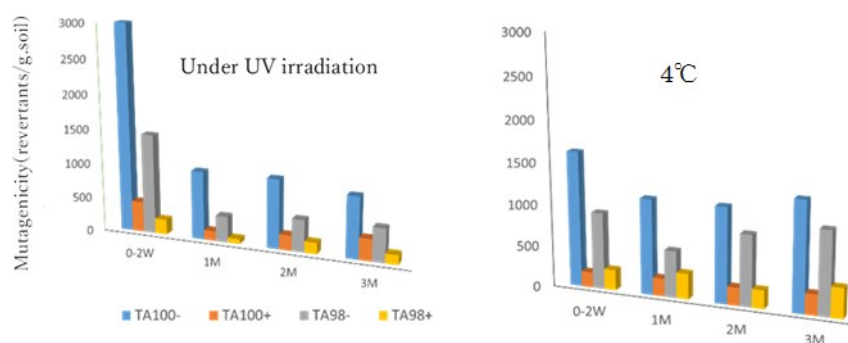


Fig.1 The mutagenicity of chlorine-based disinfectant (revertants/g) until three months after spraying.

Fig. 1から、低温条件下(4℃)で変異原性の消長は多少の変動はあるものの、全ての試験系で顕著な低下は認められず、冬場における塩素系消毒剤散布の影響は一定期間維持されることが示唆された。また、紫外線照射(250nm)下では散布直後に変異原性は高くなり、1か月目で低下はするものの、その後は大きな変化は認められなかった。

Table. 1 Mutagenicity up to 3 months after soil application of chlorine fungicides under various conditions.

month	4℃				30℃				UV irradiation(260nm)			
	TA100		TA98		TA100		TA98		TA100		TA98	
	S9mix(-)	S9mix(+)	S9mix(-)	S9mix(+)	S9mix(-)	S9mix(+)	S9mix(-)	S9mix(+)	S9mix(-)	S9mix(+)	S9mix(-)	S9mix(+)
0	1458±1045	873±1111	1064±692	187±86	1413±973	834±1124	778±413	153±40	1610±1041	870±845	932±445	185±88
1	1475±794	578±522	834±568	206±146	1006±684	685±930	993±911	166±124	794±606	249±203	579±503	78±51
2	1240±654	592±420	1205±619	184±102	1033±933	279±292	632±440	171±169	940±864	426±283	546±455	113±59
3	1691±2043	505±354	975±756	207±144	811±598	392±290	662±600	116±80	940±755	578±427	816±760	137±78

Table 1には6土壌の試験結果の平均値および標準偏差を示してある。今回の結果から、夏場および冬場においても散布後3か月間では変動はあるものの、顕著な低下は認めにくく、生成された変異原性物質は一定期間残留する可能性が示唆された。

これらの土壌を用いて行った地下浸透に関するカラム試験では、両カラム内土壌の変異原性試験結果において、水を添加した場合に変異原性の減少が認められ、また通過した水を回収した溶媒抽出物から高い変異原性が検出されたことから、副生成物の水への溶出が示唆された。

野外における土壌消毒剤副生成物の地下浸透試験では、副生成物の変異原性は深度によって差はあるものの、特に高い変異原性を示した S9mix 無添加条件下において、両菌株共に水添加前後の表層における変異原性の低下が顕著であったことから、水の地下への浸透に伴い、副生成物の一部が表層から移動することが認められた。これらの結果により、表層の副生成物の挙動に降水の影響があることが示唆された。

副生成物の消長に関する試験では、表層土壌における副生成物の変異原性は、散布後1週間の経過で大幅に低下した。この間に降水量が約50mmあったこと、気温と日照時間との関連性は特に認められず不明であるが、変異原性の大幅な低下にはカラム試験や野外試験の結果を考慮すると、降水が関与した可能性が示唆された。

散布後は1年間経過しても変異原性の消失には至らなかったことから、散布による土壌への影響は長期に亘る可能性も示唆された。

これらの結果から、塩素系消毒剤を土壌に散布すると、変異原性を示す副生成物について、機器分析による物質の同定を行った。生成された変異原性物質は水溶性であることが考えられたため、まず、LC-MS/MSによるQ1 SCAN測定を行なったところ、塩素系化合物と考えられるスペクトルパターンが認められた。そこで、同じ試料をGC/MSによるSCAN測定を行い、ライブラリーリサーチによる含有成分を推定した。その結果、塩素系化合物が数多く検出され、その中でも遺伝毒性が認められたり、疑われる物質で、かつ生成量が多いものとして、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸などが検出された。(Fig. 2)

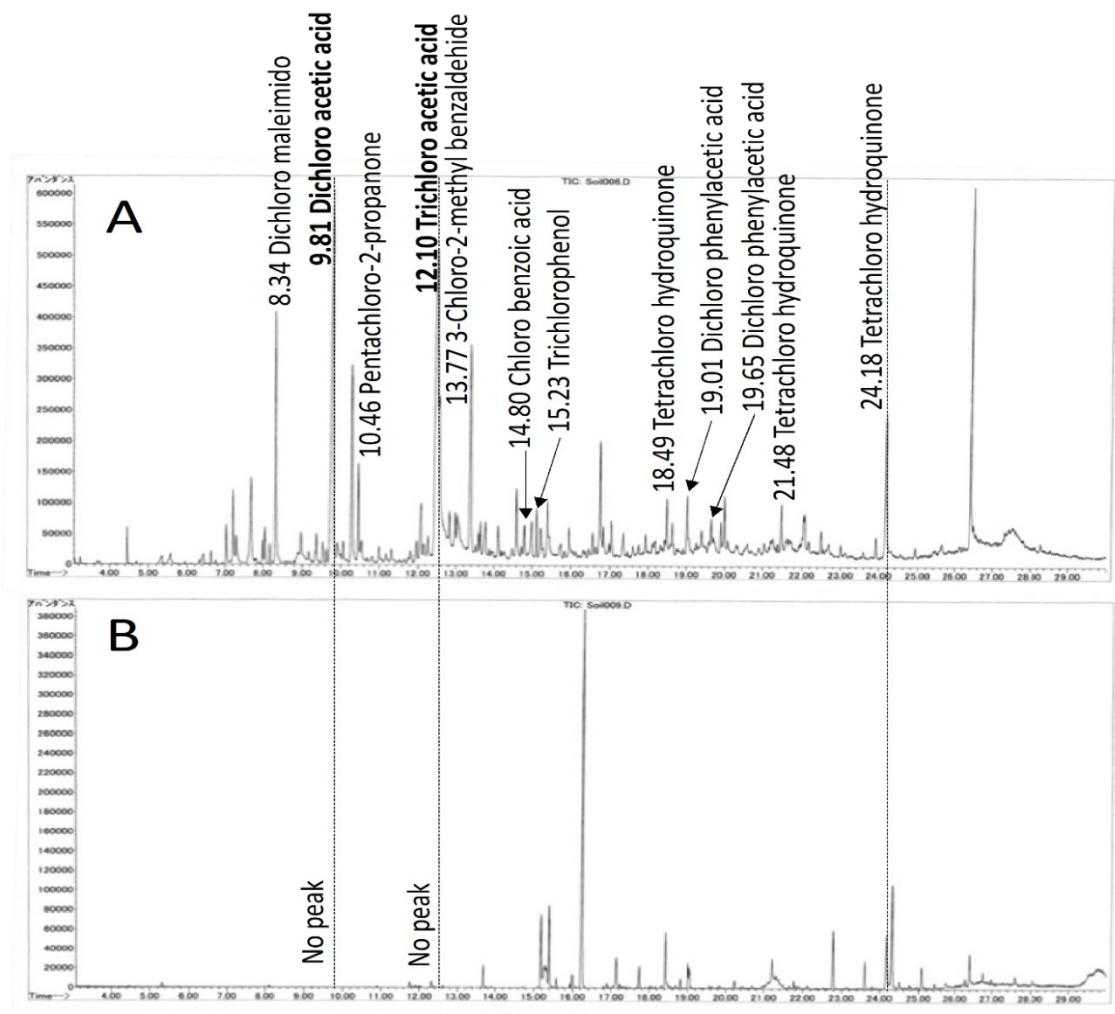


Fig.2 Comparison of products with and without chlorination of Andosols in Kanagawa

A: Products with chlorination B: Products without chlorination

引用文献

- 1) 野附 巖. 2004. わが国に見られるメガファームの現状と今後の展望, COWBELL No. 93.
- 2) 石川 拓也, 小瀬 洋喜, 佐藤 孝彦, 富田 伴一. 1978. し尿処理放流水の塩素処理による有機塩素化合物の生成, し尿処理に関する研究, 第9報, 衛生化学 24(5):235-240.
- 3) Moarca, S., Ziglio, G., Pasquini, R., Beltramelli, G., Feretti, D., Donator, F., Nardi, G., Gervasoni, M., Micheli, F., Dalmiglio, A. and Moretti, M. 1992. :Mutagenicity of drinking water obtained by different treatment procedures from two northern Italian lakes, *Inter. J. of Environ. Health Res.*, 2: 192-200.
- 4) Takagi, Y., Hisamatsu, S., Maekawa, Y., Nakajima, D., Kageyama, S., Goto, S., 2011. :Mutagenicity of the Chlorination Reactant of Cow Dung and Horse Dung, *J. Environ.*, 21(4), 321-324

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野史礼, 杉田和俊, 高木敬彦
2. 発表標題 土壌の塩素処理に伴う変異原性挙動の変化
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉田和俊, 丸山美優, 小野史礼, 高木敬彦
2. 発表標題 塩素処理土壌中の変異原性物質の検索
3. 学会等名 第30回環境化学討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉田 和俊 (SUGITA Kazutoshi) (00747701)	麻布大学・獣医学部・講師 (32701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------