

# 水道水で作成した紅茶等飲料の安全性に関する研究

## ～残留塩素と飲料成分の反応生成物の影響について～

### SAFETY STUDIES ON BLACK AND OOLONG TEA PREPARED WITH TAP WATER

#### ～Mutagenicity of organic halogens produced by reaction of organic components of black and oolong tea with residual chlorine in tap water～

堀尾樹里

Juri HORIO

#### 1. はじめに

水は我々が生きていくために欠かせないものである。清浄な水を確保することは人間生活において古来から最も重要なことの一つであった。清浄な水を豊富に、安価に人々に供給するため、水道事業は発展してきた。今日では国内の上水道の普及率は97.1% (2004年度)<sup>1)</sup>にまで達しており、我々の生活の中に深く浸透している。しかし、水道水に変異原物質や発がん性のある物質が含まれていることが報告されてからは、その安全性について疑問視されるようになった。

Rook(1972)<sup>2) 3)</sup>は、ライン川河水からトリハロメタン (THM) の一種であるクロロホルムを検出し、クロロホルムは河水水を塩素処理することによって増加することを報告した。また、THMは発がん性だけでなく、突然変異性を持っているため、妊娠中の場合、胎児に奇形が生じたり、母体へも何らかの悪影響を与える可能性がある<sup>4)</sup>。

Haris (1974)<sup>5)</sup>は、米国ミシシッピ州ルイジアナのニューオリンズ市水道水の飲用者とガン死亡率の間に高い相関関係を有することを報告した。

これらの研究を発端に、浄水場で殺菌及び浄水過程に使用される遊離塩素と水道原水中の有機物が反応して THM や有機塩素化合物 (有機ハロゲン化合物: 以下 TOX) が生成され、それらが発ガン性や変異原性の原因になっていることが知られるようになった。

水道水で飲料を作成したとき、水道水中の残留塩素と茶飲料中の有機物が反応し何らかの TOX 成分が生成する可能性がある。この反応は、図1に示すように、水道水中の TOX 生成反応のメカニズムと類似している。実際にこれまでの研究で水道水による飲料作成により新たに TOX が生成することが明らかになっている。

田中 (2000年)<sup>6)</sup>は、津山市、美作町、勝央町、柵原町、久米町の水道水で水出し紅茶を作成し、TOX 量濃度を測定したところ、図2に示すように水道水に元々含まれる TOX 量の3～6倍量の TOX が新たに生成することを明らかにした。

もし、茶飲料作成過程で新たに生成した TOX に水道水中の TOX のように発がん性や変異原性があるなら、大きな問題である。本研究ではこの茶飲料を作成する際に新たに生成される TOX に水道水のような変異原性が認められるか否かについて議論した。変異原性の測定は、発がん性の一次スクリーニング法として広く用いられ、労働安全衛生法で新規化合物の安全性を調べる試験の一つとして規定されている Ames 変異原性試験を用いた。

Ames 変異原性試験はサルモネラ菌を用いるため、抗菌物質の存在が紅茶やウーロン茶の変異原性を評価する際の大きな障害となっていた。そのため、紅茶の Ames 変異原性試験を行うためには、茶中の抗菌成分を除去するか減少させることが不可欠である。茶の抗菌物質は、カテキン類とテアフラビン類であることが知られ、それらは紅茶の色素成分でもある<sup>7)</sup>。本研究では、遊離塩素濃度 1ppm 程度に調整した水で紅茶を作成した際の色素成分の溶出のタイミングと TOX の生成タイミングとの時間差を利用 (後述するように、着色成分の溶出前に TOX の生成が終了しているため、茶葉の浸漬時間を短くする) して、抗菌成分の溶出を減少させた。

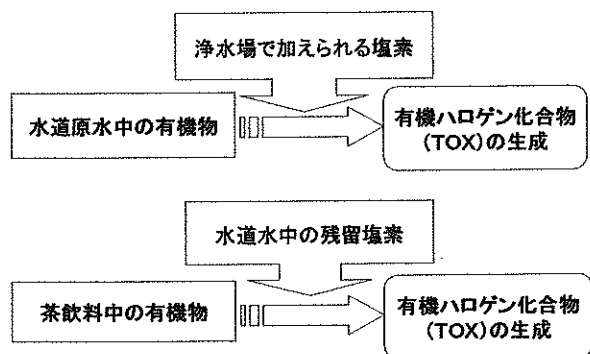


図1 有機物と塩素の反応で生成される有機ハロゲン化合物 (TOX) の生成過程

## 2. 実験方法

### 2.1 茶葉

表1に本研究に用いた茶飲料の原料を記載する。

表1 実験に用いた茶飲料

	紅茶	ウーロン茶
販売元	日東紅茶	伊藤園
品名	渋みの少ない紅茶 (マイルドブレンド)	ウーロン茶 TB増量54袋
原材料	紅茶	茶
原産国	インド スリランカ	中華人民共和国 (福建省)

### 2.2. 水出し紅茶、ウーロン茶の作成方法

#### ① 使用した水について

水出し飲料の作成に用いた水道水は、津山市北園町の美作大学内の蛇口から採水した。水道水は、2006年10月21日(残留塩素濃度0.62ppm)、11月27日(残留塩素濃度0.62ppm)、2006年12月24日(残留塩素濃度0.33ppm)に採水したものをを用いた。以下、それぞれ水道水1、水道水2、水道水3とする。

また、市販ミネラルウォーター(Volvic)を遊離塩素濃度5ppmに調整して(以下、5ppm塩素水)、水出し飲料の作成を行った。Volvicは、残留塩素、TOX、THMを含まず、変異原生成能がないことから用いた。遊離塩素濃度は、次亜塩素酸ナトリウム(石津製薬10%未滴)を加え調整した。

#### ②水出し茶飲料作成方法

水道水もしくは5ppm塩素水を水温20℃に調整した後、水1ℓに対し茶葉約10gの割合で加え、所定の浸漬時間で茶飲料約3.8ℓを作成した。この割合は、概ね紅茶を作成する時の通常の混合割合である。浸漬後すみやかにグラスファイバーフィルターWhatmanGF/C(孔径1.2μm)でろ過し、濃縮した後、TOX量の測定およびAmes変異原性試験を行った。

### 2.3 測定

#### 2.3.1 遊離(残留)塩素濃度の測定

水道水の残留塩素濃度の測定、5ppm塩素水の遊離塩素濃度の確認、水出し茶飲料作成後の残留塩素濃度の測定を行った。

遊離(残留)塩素濃度の測定には、ジエチル-p-フェニレンジアミン法(DPD法)を用いた。遊離(残留)塩素がジエチル-p-フェニレンジアミン(DPD)と反応して生じる桃赤色を553nmの吸光度を測定(分光光度計SHIMADZU UVmini-1240)し定量した。

#### 2.3.2 TOXの測定

TOX測定は、水道水で作成した紅茶及びウーロン茶(茶葉浸漬時間30秒及び1時間)、5ppm塩素水で作成した紅茶及びウーロン茶(茶葉浸漬時間30秒及び1時間)、そして水道水そのものの9種18試料について行った。

飲料試料約25mlに10%リン酸溶液でpH2とした後、活性炭(約0.04g)カラムを直列に6本に通し、TOXを吸着させた。紅茶等の飲料中には多くの有機成分が含まれているため過負荷となり、活性炭に全てのTOXを吸着させることができないことがある。そのため

6本の活性炭カラムを直列に並べ通液させ、6本目の活性炭カラムに吸着されたTOX量が0.3μgより大きい場合は更にカラム数を増やすこととした(0.3μg以下の場合は6本とした)。

TOXを吸着させた後、活性炭カラムに硝酸アンモニウム溶液(濃度0.65g/ℓ)を約10ml通液させ無機塩素を除去し、その後TOX計(三菱化成製:TOX-10Σ)内に活性炭を導入しTOX量を測定した。この吸着方法のフローを図2に示す。

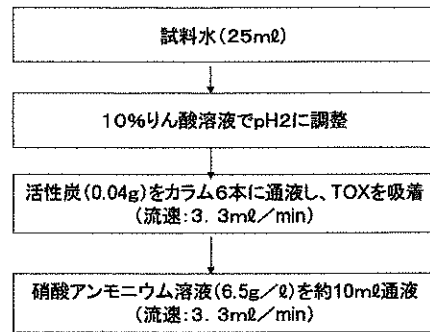


図2 TOXの吸着方法のフローチャート

### 2.3.3 変異原性物質の濃縮方法及び変異原性試験方法

#### ①変異原性物質の濃縮方法

Ames変異原性試験の前に、まず飲料試料から変異原物質を濃縮した。濃縮には、水道水試料の変異原物質の濃縮にしばしば用いられているSep Pak Plus(LONG) CSP800による固層抽出法を用いた。この方法は、水道水中の変異原物質の濃縮において、高い回収率が確認されている<sup>8) 9) 10)</sup>。フローを図3に示す。

3ℓの試料水(飲料試料および比較対照に用いた水道水試料)をCSP800カラムに流速50mlで通し、変異原物質を吸着させ、そのカラムから約2mlジメチルスルホキシド(DMSO)溶液で脱離した(この過程で1500倍濃縮)。このDMSO脱離液をAmes変異原性試験の検体とした。変異原性試験は、1つの検体につき、4段階の濃度(DMSO脱離液を原液とし、1/2希釈液、1/4希釈液、1/8希釈液の4つの濃度試料)で測定を行い、濃度依存性(dose response)を見た。

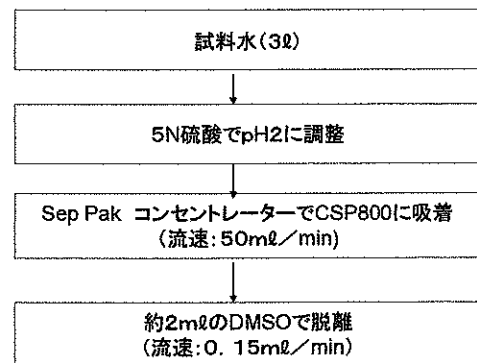


図3 試料の濃縮方法のフローチャート

#### ②Ames変異原性試験の方法

Ames変異原性試験は、水道水で作成した紅茶、ウーロン茶(茶葉浸漬時間30秒)、5ppm塩素水で作成した紅茶、ウーロン茶(茶葉浸漬時間30秒)、そして水道水そのものの5種10試料について実

施した。

Ames 変異原性試験には、Ames の考案したプレート法を改良したプレインキュベーション法を用いた<sup>11)</sup>。Ames 変異原性試験では、Salmonera typhimurium TA100 株及び 98 株が多く用いられており、また代謝活性化物質 S9 MIX が添加された場合と添加されない場合の 4 つの方法が用いられている。その中で水道水の Ames 変異原性試験では、TA100 株の S9 MIX を添加しない条件において変異原性が確認される<sup>12)</sup> ことから、本研究でもこの条件で行った。なお、菌株は、岡山大学薬学部薬品化学教室より入手した。

Ames 変異原性試験の操作手順を図 4 に示す。

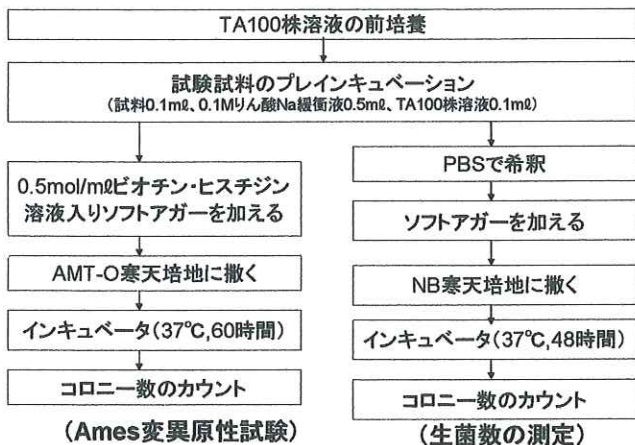


図4 Ames変異原性試験方法と生菌数の測定方法のフローチャート

陽性対照物質としては、4-ニトロキノリン-1-オキシド (4-NQO) を用い、プレートは極東製薬のバイタルメディア AMT-O 培地を使用した。

また、Ames 試験を行う毎に、検体液の添加量(100 μl・(plate)<sup>-1</sup>)と同量の DMSO のみを添加した 4 枚のプレートを用いた陰性対照試験および 637.5 μg/l の 4-NQO を添加した 2 枚のプレートを用いた陽性対照試験を行なった。

### ③ 生菌数の確認、測定方法

図 4 に示したように、検体液と菌株を混ぜ、プレインキュベーション後の生菌数を確認した。

プレインキュベーション後の溶液 0.05ml を、Phosphate buffered saline (PBS) で 10000 倍希釈し、その中から 0.1ml をとり、ソフトアガー 2ml を加えて混ぜ、NB 寒天培地にまいた。37°C のインキュベータで 48 時間培養後、コロニー数をカウントした。

生菌数の確認は、検体液 (DMSO 脱離原液、1/2 希釈液、1/4 希釈液、1/8 希釈液) および陰性対照 (DMSO) 試験について行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 紅茶作成における TOX 生成挙動および色素成分 (抗菌物質) 溶出挙動

紅茶試料の Ames 変異原性試験を可能にする条件を検討するため、著者 (山本<sup>13)</sup>) は、遊離塩素を含む水を用いて水出し紅茶を作成したときの、TOX 生成の経時的挙動や色素成分 (抗菌物質) の溶出挙動を検討した。

図 5 は、遊離塩素濃度 1ppm の水で水出し紅茶を、茶葉浸漬時間 30

秒、1 分、2 分、5 分、10 分、1 時間で作成した時の TOX 生成量を示した。30 秒で 230 μg/l、1~5 分後に 240 μg/l 生成した。最初の 30 秒の時点ですでにほとんどの TOX が生成することがわかった。また、この 30 秒時点において遊離塩素は完全に消失していることを確認した。この結果から遊離塩素と紅茶の有機成分との反応は短時間で一気に進み、遊離塩素が消失し TOX 生成反応も終了すると判断された。なお、茶葉浸漬時間 1 時間で、TOX 量が 210 μg/l となりわずかに減少 (減少率 16%) した。これは、生成した TOX の一部が分解している可能性があるが、詳細は不明であった。

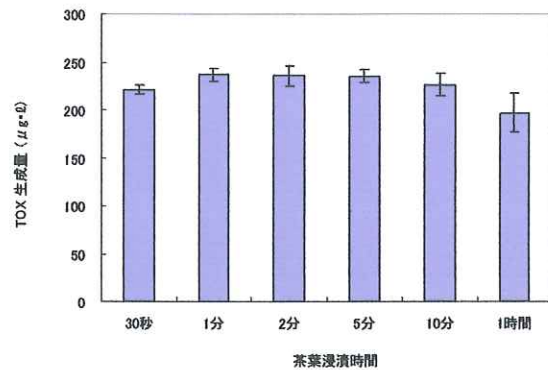


図5 1.3ppm調整水\*で作成した紅茶飲料のTOX生成量

\*遊離塩素濃度1.3ppmに調整した水

また浸漬時間 30 秒の時点でどの程度溶出しているかを検討している。図 6 は、30 秒試料の紫外可視吸収スペクトルを、1 時間試料を純水で 1/12 に希釈したものおよび 1/10 に希釈したものと比較して示している。水出し紅茶が室温や冷蔵庫温度下でおよそ 1 時間程度放置して作るとされているため、1 時間試料を比較対照に用いている。

三者のスペクトルの各波形がほぼ一致している (図 6) ことから、茶葉から溶け出す着色成分は浸漬時間の長短に関わらず質的には大きな違いがないことが示唆された。また 30 秒試料の吸収強度は、1 時間試料の 1/12 と 1/10 の間にあることから、30 秒試料は、1 時間試料のおよそ 1/11 の濃度であると考えられた。また、色素成分自身が多くは抗菌成分である<sup>18)</sup> ことから、30 秒試料中の抗菌成分量についても、通常の紅茶の 1/11 程度であると考えられた。

浸漬時間 30 秒で TOX のほとんどを生成していること、その時、抗菌成分の量は 1/11 程度であることから、本研究ではこの条件で作成した飲料試料について Ames 変異原性試験に供することにした。

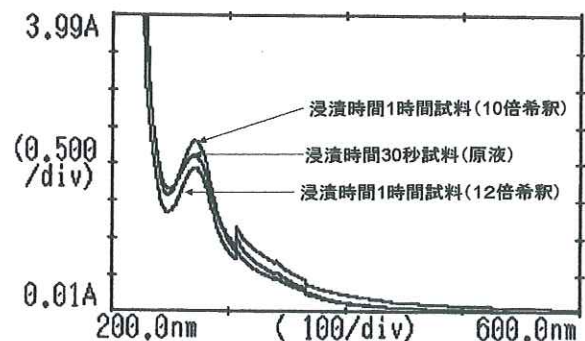


図6 紅茶の紫外可視吸収スペクトル(30秒試料と1時間試料)

12、13に示した。図12は、水道水2、3によって作成した紅茶、ウーロン茶のCSP800樹脂吸着濃縮液(DMSO溶液)を適当倍率に希釈してTA100株に混ぜ、試料添加量の違いによる生菌数(TA100株の懸濁液1ml当たり)の変化を見たものである。また、図13は、5ppm塩素水で作成した紅茶、ウーロン茶について同様に示した。なお、これらの図で試料添加量0は陰性対照試験の結果である。水道水3の紅茶試料以外では、それぞれ試料添加量が最も多い(原液を用いた)時、TA100株は、試料添加量0の30-40%に激減している。しかし各試料とも添加量を半分以下にした場合は、試料添加量0の80%以上の菌数を保っている。生菌数が激減した試料添加量で行った変異原性試験では、図7~11に示したように変異コロニー数も減少するか、あるいは横ばいとなっており、dose-responseの傾向と

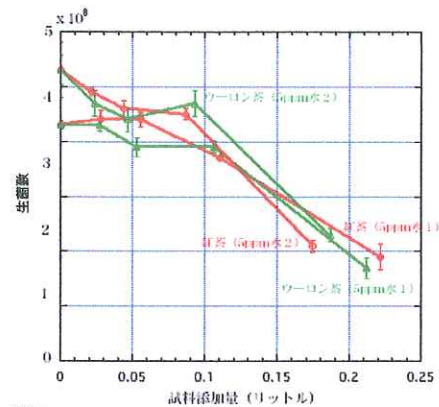


図13 遊離塩素濃度5ppm水で作成した紅茶、ウーロン茶中の抗菌物質の生菌数への影響

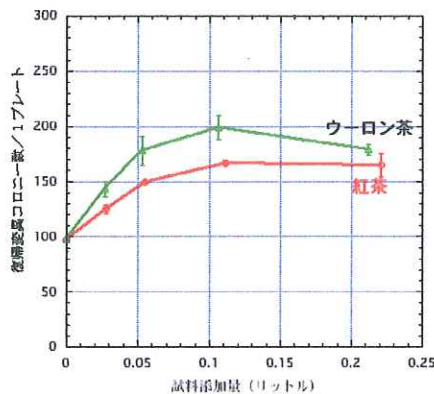


図10 遊離塩素濃度5ppm水(1)により作成した紅茶、ウーロン茶のdose-response

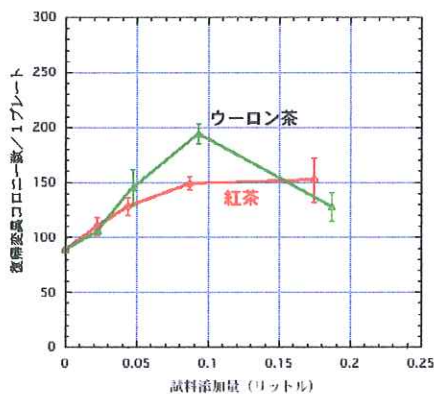


図11 遊離塩素濃度5ppm水(2)により作成した紅茶、ウーロン茶のdose-response

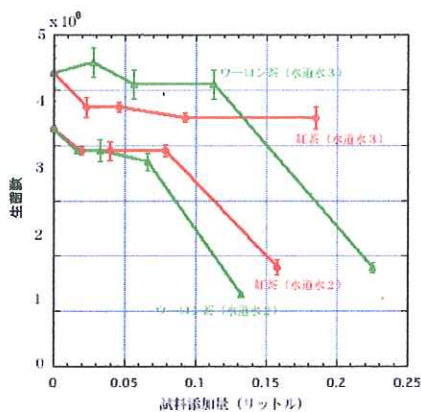


図12 水道水で作成した紅茶、ウーロン茶中の抗菌物質の生菌数への影響

良く対応しており、抗菌成分の影響が確認された。

### 3.4 飲料試料の変異原性の評価

先の議論から、紅茶、ウーロン茶の変異原性試験のうち、次の条件を満たすものを有効とした。(1) 生菌数のカウントでTA100株菌の減少が20%以内のもの、(2) 変異コロニー数と自然復帰コロニー数の比(=MR値)が1.4以上のものであるもの。後者のMR値は、変異原性の有意性の指標として従来から用いられている指標の一つである<sup>14)</sup>。

この条件から、各試料の変異原性は表3にまとめられる。変異原性は、試料1ml当りの変異コロニー数として表したが、各回の変異減試験で実施した陽性対照試験の4-NQOの変異原性を尺度として、変異原性試験の活性度の違いを補正するために、4-NQO換算量として同時に示した。なお、これらの紅茶やウーロン茶の作成における茶葉との浸漬時間は、いずれも30秒のものである。

表3. 各試料の変異原性

試料	変異原性 復帰コロニー数/ℓ	変異原性 4-NQO換算量 μg-4NQO/ℓ
水道水1	875	0.092
水道水2	981	0.075
水道水3	645	0.102
水道水1で作成した紅茶	698	0.074
水道水2で作成した紅茶	539	0.041
水道水3で作成した紅茶	423	0.067
水道水1で作成したウーロン茶	900	0.095
水道水2で作成したウーロン茶	1223	0.094
水道水3で作成したウーロン茶	663	0.105
5ppm塩素水1で作成した紅茶	1003	0.106
5ppm塩素水2で作成した紅茶	782	0.060
5ppm塩素水3で作成した紅茶	801	0.127
5ppm塩素水1で作成したウーロン茶	1253	0.132
5ppm塩素水2で作成したウーロン茶	1394	0.107
5ppm塩素水3で作成したウーロン茶	1163	0.184

図14は、水道水そのものの変異原性、および水道水で作成した紅茶、ウーロン茶の変異原性、5ppm塩素水で作成した紅茶、ウーロン茶の変異原性を、各回の変異原性試験の活性度を補正した4-NQO換算量で示した。

水道水の変異原性は、4-NQO換算量として約0.09 $\mu$ g-4NQO/ℓである。一方その水道水で作成した紅茶は、約0.06 $\mu$ g-4NQO/ℓ、ウーロン茶は約0.10 $\mu$ g-4NQO/ℓであった。紅茶は水道水そのもの比べて3割ほど減少している。水道水によって作成した紅茶、ウーロン茶は、もともと水道水に含まれていた変異原物質がそのまま含まれているはずなので、変異原性が減少することは考えにくい。紅茶、ウーロン茶の変異原性試験でTA100の生菌数が2割ほど少なくなっているため、この減少はその影響によるものと思われる。

また5ppm塩素水で作成した紅茶0.10 $\mu$ g-4NQO/ℓ、ウーロン茶は0.14 $\mu$ g-4NQO/ℓであった。塩素水自体には変異原物質はふくまれていないので、これらは遊離塩素と飲料中の有機物の反応によって新たに生成したTOXに由来するものと思われる。5ppm塩素水で作成した紅茶、ウーロン茶のTOX量はそれぞれ728 $\mu$ g/ℓ、919 $\mu$ g/ℓなので、TOX量当りの変異原性の強さは、紅茶が0.13mg-4NQO/g-TOX、ウーロン茶が0.15mg-4NQO/g-TOXとなる。水道水のTOX量当りの変異原性は、平均2.3mg-4NQO/g-TOXなので、紅茶作成に伴って生成するTOXの変異原性の強さは、水道水のTOXの約18分の1、ウーロン茶作成に伴うTOXの変異原性の強さは、約15分の1の水準である。したがって、水道水中の残留塩素との反応で新たに作られるTOX量の水準(本研究では70-150 $\mu$ g)では、水道水の変異原性を大幅にアップさせることはない。

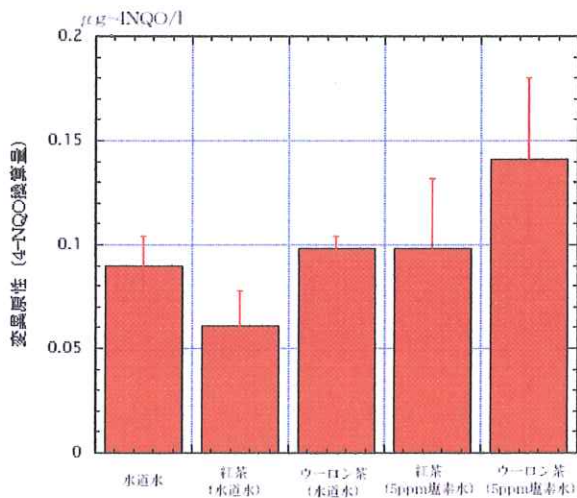


図14 水道水、および水道水あるいは5ppm塩素水で作成した紅茶、ウーロン茶の変異原性

#### 4. 結論

本研究から、水道水中の遊離塩素と紅茶やウーロン茶に含まれる有機成分との反応で生成するTOXには、一定の変異原性が認められた。しかし、変異原性の強さは水道水に含まれるTOXに比べてわずかなもので、水道水に通常含まれる残留塩素濃度で紅茶やウーロン茶を作った時生じるTOXによる変異原性の増加は、限定的であると考えて差し支えないと思われる。水道水中の有機物と遊離塩素で生成するTOXの高い変異原性と、茶成分と遊離塩素から生じるTOX

の相対的に低い変異原性、この違いが何によって生じているかは以前不明である。食品と遊離塩素との反応の場面は、茶飲料の生成のケース以外にも存在する。それぞれのケースでどのような変異原性物質が誕生するのか、今後、更に研究の必要がある。

#### 5. 謝辞

本研究の内、岡山大学薬学部の有元佐賀恵先生にはAmes変異原性試験の技術指導におきまして、大変お世話になりました。また、美作大学大学院生活科学研究科の山口英昌教授には、多くの助言とご指導をいただきました。最後に、美作大学生活科学部の鶴崎実教授にTOX測定の技術指導や、研究生活全般において支えていただきました。ここに記して感謝の意を表します。

#### 6. 参考文献

- 1) 厚生労働省水道課(2007)水道統計
- 2) Rook, J. J (1972) Production of Potable Water from a Highly Polluted River, Water Treatment and Examination, 21, Part 3, p. 259,
- 3) Rook, J. J (1974) Formation of haloform during chlorination of natural water, Water Treatment and Examination, 23, Part 2, p. 259,
- 4) Schwetz, B. A., et al (1974) Embryo and fetotoxicity of inhaled chloroform in rats, Toxicology Applied Pharmacology, Vol. 28, p. 442
- 5) Harris, R. H. Brecher, E. M. and the Editors of Consumer Reports (1974) Is the water safe to drink?, Consumer Reports, p. 436
- 6) 田中 恵巴(2000) 水道水による各種家庭飲料作成時の有機ハロゲン化合物生成量の評価, 美作女子大学卒業論文
- 7) 中林 敏郎, 伊奈 和夫, 坂田 完三(1992) 緑茶・紅茶・烏龍茶の科学と機能, 弘学出版, p. 57-59
- 8) 浦野紘平, 高梨啓和, 金澤伸浩, 藤江幸一(1994) 水道水のAme変異原性に関する研究 第1報 変異原性物質濃縮回収用の吸着剤, 水環境学会誌, 17, 450-460
- 9) 浦野紘平, 高梨啓和, 金澤伸浩, 岡部文枝, 藤江幸一(1994) 水道水のAmes変異原性に関する研究 第2報 高性能吸着剤を用いた変異原性物質の濃縮・回収方法, 水環境学会誌, 17, 461-469
- 10) 1) 浦野紘平, 高梨啓和, 金澤伸浩, 岡部文枝, 藤江幸一(1995) 水道水のAmes変異原性に関する研究 第3報 日本の水道水の変異原性レベルの解析, 水環境学会誌, 18, 1001-1011
- 11) 労働省安全衛生部化学物質調査課(1991) 安衛法における変異原性試験, テストガイドラインとGLP, 173pp, 中央労働災害防止協会, 東京
- 13) 山本樹里(2006) 水道水による紅茶作成に伴う有機ハロゲン化合物の経時変化, 第64回日本公衆衛生学会年会抄録集
- 14) 高梨啓和, 藤江幸一, 浦野紘平(1994) 水試料のAmes変異原性試験結果の統計的解析と評価, 第28回日本水環境学会年会講演集, 764-765