



Title	廃棄物処理分野におけるバイオアッセイ手法の適用について-第3報：遺伝子毒性試験の標準化の検討
Author(s)	山田, 正人; 井上, 雄三; 木苗, 直秀 他
Description	第7回衛生工学シンポジウム（平成11年11月11日（木）-12日（金） 北海道大学学術交流会館）．1 廃棄物 1．1-6
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 7, 24-29
Issue Date	1999-11-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/7258">https://hdl.handle.net/2115/7258</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	7-1-6_p24-29.pdf



## 1-6 廃棄物処理分野におけるバイオアッセイ手法の適用について —第3報：遺伝子毒性試験の標準化の検討

山田正人（国立公衆衛生院），井上雄三（国立公衆衛生院），  
木苗直秀（静岡県立大学），小野芳朗（岡山大学），吉野秀吉（神奈川県環境科学センター），  
市川 勇，田中 勝（国立公衆衛生院）

### 1. はじめに

我々は、廃棄物処理・処分過程に由来する化学物質の人の健康や生態系に対するリスクを、低濃度長期曝露型の毒性を視野に入れて迅速かつ総合的に評価する手法として、遺伝子毒性試験の廃棄物処理分野への適用を検討している<sup>1)</sup>。本稿では、Modified Rec Lux (MRL) 試験と魚類小核試験について、標準物質ならびに最終処分場浸出水を用いた試験を行い、廃棄物処理施設におけるリスク検知に用いるための手法上の問題点について検討した。

### 2. 方法

#### 2.1 試料

廃棄物試験用のリファレンス（陽性対照）物質として、ごみの焼却により生成されると予想される直接変異原である 1,8-Dinitropyrene (Aldrich) ならびに間接変異原である Benzo[a]pyrene (和光特級)、さらに架橋型の直接変異原物質である Mitomycin C (和光生化学用) を選んで試験に用いた。また、その他に(多環)芳香族炭化水素類である 1,6-Dinitropyrene (Aldrich)、1,3-Dinitropyrene (Aldrich)、Fluoranthene (和光一級)、Benzo[a]anthracene (Aldrich)、Benzo[b]fluoranthene (和光)、Trp-P-2 (和光生化学用)、Pentachlorophenol (和光残留農薬試験用)、2,4,6-Trichlorophenol (和光一級)、2,4-Dichlorophenol (和光化学用) の標準品を比較のために試験に用いた。

3ヵ所の最終処分場において浸出水処理施設の計量槽と消毒前の処理槽より浸出水を採取した。各処理工程の滞留時間を考慮し数日に渡ってサンプリングを行い、短期的な水質の変動を平均化するため、1工程につき30分間隔で1Lの採水を3回繰り返し、これを分析室内で等量混合し1検体とした。試料を採取した施設の概要を表1に示す。これら浸出水試料を遺伝子毒性試験のため以下のように調製した。

Amberlite XAD-2000 樹脂 (Sigma) を、購入後、アセトン、アセトニトリル、メタノールの順でそれぞれ12時間づつソックスレー抽出器で洗浄し、使用までメタノール中で保存した。2Lのガラスビンにろ過した浸出水試料を2L入れ、水で完全に置換したXAD-2000樹脂を容積で20mL分を加えた。容器内をスターラーを用い500rpmで2時間攪拌し、試料と樹脂を接触させた。その後、樹脂を吸引ろ過にて回収し、窒素パージにより完全に水分を除去した後に、酢酸エチルを、

表1 浸出水を採取した最終処分場の概要

Code	K	L	M
Waste	uncombustibles, incinerator residue	uncombustibles, incinerator residue	incinerator residue
Time of reclamation (yr.)	4	2	7
Leachate treatment plant			
Capacity (ton/day)	85	70	70
Process	measuring tank, pH adjustment, biological dinitrification, reaeration, coagulation, rapid sand filtration, and sterilization	measuring tank, biological dinitrification, coagulation, rapid sand filtration, AC absorption, and sterilization	measuring tank, 1st coagulation, biological dinitrification, 2nd coagulation, rapid sand filtration, AC absorption, and sterilization

60mL 加え、15 分間攪拌した後吸引ろ過にて溶媒と樹脂を分離した。無水硫酸ナトリウムを加え脱水して、酢酸エチルによる抽出液を得た。樹脂を窒素パージして酢酸エチルを完全に除去した後、メタノールを、60mL 加え、15 分間攪拌した後吸引ろ過にて溶媒と樹脂を分離し、メタノールによる抽出液を得た。これら抽出液は、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を蒸発除去させ、秤量した後に 1mL のジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬) に展開させて用いた。

## 2. 2 遺伝子毒性試験

MRL 試験<sup>2)</sup>の菌株として、大腸菌 (*Escherichia coli*) に膜透過性に関与する *rfaC* 遺伝子と除去修復遺伝子 *uvrB* を欠損し、*recA* 遺伝子にレポータとして発光遺伝子 *LuxAB* を連結した融合遺伝子を染色体上に内在する MM96 株を用いた。操作の概要は以下の通りである。

- 1) まず  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存しておいた菌の表面をエーゼでかきとり平板培地に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 日程度培養して復元した。
- 2) 次に滅菌した試験管に 5 ml の滅菌済みの LB 前培養培地を分注し、保存培地に形成された菌を植菌した後  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 晩 (16 時間) 振とう培養した。
- 3) 培養後の前培養液 1 ml を、LB 培地 100ml に植菌し、3 時間、 $37^{\circ}\text{C}$ 、200rpm で振とう培養した。
- 4) 試験物質をクリーンベンチ内で、滅菌した試験管に DMSO で数段階に希釈し、全液量を 100  $\mu\text{l}$  になるように分注した。この時、DMSO の溶媒のみの陰性対照系も同時に作成した。
- 5) 試験物質を分注した試験管について、S9mix を 1mL 添加した系としない系を用意し、培養液を加えて全液量を 5 ml とし、更に  $37^{\circ}\text{C}$ 、200rpm で 2 時間振とう培養を続けた。
- 6) 培養終了後、培養液 200  $\mu\text{l}$  にエタノールで 10 倍希釈した n-decyl aldehyde を 20  $\mu\text{l}$  添加して発光を開始させ、5 秒後、10 秒間の発光量積分値 (LU) を、生物化学発光量測定装置 (UPD\_8000、明電舎) を用いて測定した。また、測定後即座に吸光光度計を用いて培養液の OD600 を測定し、菌濃度を求めた。

なお、S9 無添加の試験系における陽性対照物質には Mitomycin C (MMC)、1,8-Dinitropyrene (1,8-DNP) を、S9 添加の試験系には Benzo[a]pyrene (B[a]P)、1,8-DNP を用いた。陰性対照は S9 添加、無添加によらず DMSO の溶媒のみを用いた。

小核試験<sup>3)</sup>には金魚 (*Carassius auratus*) の一種であるコメットを用いた。体重約 10g、体長約 10cm、生後 1 年以内の個体を購入し、12 日以上実験室内で飼育した個体を試験に用いた。飼育水には再構成水 (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.294g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1233g/L、NaHCO<sub>3</sub> 0.0647g/L、KCl 0.0058g/L) を用いた。また、飼育条件として光は 9hr/day で照射し、温度は  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、酸素は空気飽和値の少なくとも 80%を保つようにした。

試験前の飼育には、砂利を敷いたガラス製水槽 (750×400×450mm) にコメットを 20~30 匹入れ、市販の配合飼料 (エンゼル、日本ペット株式会社) を一週間に 3 回、5 分間で食べきる量だけ与えた。実験開始から 7 日以上前に実験中用の 5L ビーカー (φ180×高さ 275mm) に 2 匹づつ移した。試験中は 5L ビーカー (φ180×高さ 275mm) に砂利は敷かずと同じ実験群のコメットを 2 匹づつ入れて行い、餌は実験開始 24 時間前からは与えないようにした。

被験物質は DMSO : 生理食塩水 (1:9) に溶解または均一に分散させ、腹腔内に注射器で溶媒量 100  $\mu\text{L}/10\text{g-BW}$  になるように投与した。陰性対照には溶媒のみを、陽性対照には、MMC 4 mg/kg-BW を用いた。

被験物質投与後、96 時間、144 時間後に採血を行い、また 144 時間後には鰓を採取した。採取した末梢血は仔ウシ血清または生理食塩水で希釈し、鰓は 0.1%トリプシン BBS 溶液で細胞を解いた後に KCl 溶液及び酢酸-メタノール溶液で固定した。これら末梢血や臓器細胞はスライドグラス上に塗布したアクリジンオレンジで蛍光染色した後、小核を落射式蛍光顕微鏡 (BX60/BX-FLA/PM-20, OLYMPUS) 下 (B 励起) で計数して、スライドごとに細胞 1000 個あたりの出現頻度を求めた。なお、試料毎にスライドは 2 枚作成した。

## 3. 結果

### 3. 1 リファレンス物質

表2 MRL 試験 (MM96 株) の標準品に対する応答

Chemicals	+S9		-S9	
	initial slope	minimum detection dose	initial slope	minimum detection dose
	LU/(umol/5mL)	umol/5mL	LU/(umol/5mL)	umol/5mL
Benzo[a]pyrene	27.8	312	-	-
Benzo[a]anthracene	74.9	161	50.8	190
Fluoranthene	48.4	206	20.5	383
Benzo[b]fluoranthene	40.4	99.8	17.1	152
Trp-P-2	186	36.5	53.9	82.3
1,8-Dinitropyrene	122	71.0	133	53.2
1,6-Dinitropyrene	114	75.9	134	58.3
1,3-Dinitropyrene	60.4	157	71.8	99.3
Pentachlorophenol	9.61	425	19.0	174
2,4,6-Trichlorophenol	81.2	95.7	50.9	124
2,4-Dichlorophenol	16.6	376	41.4	145
Mitomycin C	-	-	1340000	0.00598

12 種の化学物質標準品に対する応答は MM96 株の S9mix 添加系 (+S9) および未添加系 (-S9) で検討した。結果を表 2 に示す。応答の大きさは、0 ~ 100umol/5mL の範囲で標準品を投与して得た Dose-Response 曲線の直線部分の傾きを一次回帰により (初期勾配) を求め、さらに陰性対照の 2 倍の応答が得られる濃度 (最小検出濃度) として表した。間接変異原であることが知られている表中 PAHs、8 物質の中では+S9 系で Trp-P-2 が最も強い応答を示し、1,8-Dinitropyrene が続いた。1,8-Dinitropyrene は -S9 系では最も強い応答を示した。また、Ames 試験では応答が無い Pentachlorophenol~2,4-Dichlorophenol の 3 物質にも応答が見られた。ただし、この応答は用いた標準品の純度が必ずしも高いわけではなく確定的できない。架橋型の直接変異原である Mitomycin C は調べた全ての標準品の中でケタ違いの強い応答を示した。

表3 リファレンス物質の繰返し試験 (MM96) -初期勾配

	+S9		-S9	
	1,8-DNP LU/(umol/5mL)	B[a]P LU/(umol/5mL)	1,8-DNP LU/(umol/5mL)	MMC LU/(umol/5mL)
n	11	10	10	11
AVG	11.6	18.0	49.7	1018308
STD	6.50	4.83	23.1	521817
CV, %	55.9	26.9	46.4	51.2

表4 リファレンス物質の繰返し試験 (MM96) 結果-最小検出濃度

	+S9		-S9	
	1,8-DNP umol/5mL	B[a]P umol/5mL	1,8-DNP umol/5mL	MMC umol/5mL
n	11	10	10	11
AVG	454	336	154	0.0072
STD	193.9	86.2	56.2	0.00287
CV, %	42.7	25.7	36.5	40.0

これら標準品の中でリファレンス (陽性対照) 物質に選んだ 3 物質について、繰返し試験の結果を表 3 および表 4 に示す。各物質に対する 10 または 11 回の繰返し試験における変動係数 (CV) は初期勾配で 27~56% の範囲、最小検出濃度で 26~43% の範囲にあった。

4 種の化学物質標準品に対する魚類小核試験の結果を表 5 に示す。これら PAHs の中には Benzo[a]pyrene および Benzo[a]anthracene は Dose-Response がとれる明確な応答を示したのに対して、Benzo[b]fluoranthene は陰性対照を越える応答は示したものの、Dose-Response は明確では無かった。陽性対照として用いた Mitomycin C については一貫して明確な応答が得られた。

陰性対照 (溶媒のみ) と陽性対照 (Mitomycin C) について繰返し試験の結果を表 6 に示す。陰性対照における小核誘発頻度の変動係数 (CV) は 0~200% の範囲に、また陽性対照 (Mitomycin C) では 40~62% の範囲にあった。

### 3. 2 浸出水

最終処分場浸出水の酢酸エチルおよびメタノール抽出物に対する MRL 試験結果を表 7 に示した。なお、抽出物投与量 1uL は元の試料水 1mL に相当する。一般的に原水よりも処理水の方が活性が小さいが、処理水の方が活性が大きい抽出物および代謝活性の組み合わせがいくつかあ

た。

L施設およびM施設の原水に対する魚類小核試験の結果を表8に示した。L施設の酢酸エチル抽出物では陰性対照より大きい小核の誘発が見られたが Dose-Response は明確ではなかった。同メタノール抽出物では高用量で個体が死亡した。M施設の酢酸エチル抽出物では明確な応答が得られたが、メタノール抽出物では応答は得られなかった。

#### 4. 考察

今回用いた MRL 試験および魚類小核試験は開発中の手法であり、現段階では試料の毒性によるリスクを評価するまでには至らない。したがって、ここでは手法を廃棄物試験に適用するための手法上の問題点について考察する。

表5 魚類小核試験の標準品に対する小核出現頻度 (o/oo)

Dose (mg/kg-BW)	Exposure Time (hr)		
	Peripheral erythrocyte		Gill
	96	144	144
<b>Benzo[a]pyrene</b>			
2.5	0.25	0.25	5.50
5	1.00	1.25	8.50
N.C.*	0.00	0.00	4.75
P.C.**	0.50	1.00	6.50
<b>Benzo[b]fluoranthene</b>			
5	0.25	0.25	6.00
10	0.75	0.25	7.50
<b>Benzo[a]anthracene</b>			
5	0.25	0.25	6.75
10	0.25	1.00	8.75
N.C.*	0.00	0.25	5.75
P.C.**	0.50	0.75	7.00

\* Negative Control: Solvent (DMSO: Saline=1:9) Only

\*\* Positive Control: Mitomycin C (4mg/kg-BW)

表6 陰性対照および陽性対照の繰り返し試験の結果 (小核出現頻度 [o/oo])

No.	Negative Control			No.	Positive Control*		
	Exposure Time (hr)				Exposure Time (hr)		
	Peripheral erythrocyte		Gill		Peripheral erythrocyte		Gill
	96	144	144		96*	144*	144*
1	0.00	0.00	6.50	1	0.25	0.75	1.75
2	0.00	0.00	4.75	2	0.50	1.00	1.75
3	0.00	0.25	5.75	3	0.50	0.50	1.25
4	0.00	0.00	4.25	4	0.25	0.25	0.75
5	0.00	0.00	2.25	5	0.00	0.25	2.75
AVG	0.00	0.05	4.70	AVG	0.30	0.60	1.65
STD	0.00	0.10	1.45	STD	0.19	0.30	0.66
CV (%)		200.0	30.9	CV (%)	62.4	53.0	40.2

\* Mitomycin C (4mg/kg-BW)

\*\* Values are corrected by subtracting those of negative control.

表7 最終処分場浸出水の MRL 試験結果

Sample	Initial Slope of Dose-Response Curve			
	+S9		-S9	
	MeOH Extract	AcOEt Extract	MeOH Extract	AcOEt Extract
K	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)
Raw water	N.E.	28.2	N.E.	86.1
Treated water	17.7	143	109	54.0
Positive Control	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)
1,8-DNP	4.88	7.57	39.9	29.6
B[a]P	14.9	25.4	-	-
MMC	-	-	669000	478000
L	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)
Raw water	17.8	18.8	39.6	89.2
Treated water	30.9	21.2	31.6	217
Positive Control	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)
1,8-DNP	9.37	9.53	33.1	68.6
B[a]P	17.6	14.2	-	-
MMC	-	-	561000	1030000
M	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)	LU/(uL/5mL)
Raw water	56.9	18.8	83.8	48.5
Treated water	3.67	10.1	62.7	48.9
Positive Control	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)
1,8-DNP	18.5	19.3	63.7	41.1
B[a]P	13.8	3.97	-	-
MMC	-	-	695000	613000

N.E.: Not Evaluated

#### 4. 1 繰り返し精度

試験の結果を施設排出物の安全性に関する判断に用いるためには、得られた応答に信頼性が必要である。BOD や TOC 等の生物・化学的総合指標では測定値が真値の 20~120% 変動する<sup>4)</sup>。これと比較すると標準品に対する MRL 試験の評価値の 30~60% という変動係数 (表 3, 4) は指標として許容される範囲にある。

魚類小核試験 (表 8) では、Mitomycin C に対する評価値の変動係数は 40~60% 程度であるが、末梢赤血球では低頻度で自然発生する小核のため、陰性対照で変動係数が 200% となっている。一方、えらを用いた評価では自然発生する小核の頻度が高いため、陰性対照の変動係数は平均化され 30% 程度である。試験の簡便さでは細胞が元々分離している末梢赤血球の方が勝っており、変動をより平均化するため細胞の観察数をできるだけ増やす必要がある。

表 8 浸出水の魚類小核試験結果  
(小核誘発頻度 [o/oo])

Dose (mL as water/kg-BW)	Exposure Time (hr)			
	Peripheral erythrocyte		Gill	
	96	144	144	
<b>L</b>				
EtOAc Extract	31	0.25	0.25	4.00
	62	0.25	0.25	3.75
MeOH Extract	31	0.25	0.00	2.75
	62	0.25	death	death
N.C.*		0.00	0.00	2.25
P.C.**		0.00	0.25	5.00
<b>M</b>				
EtOAc Extract	31	0.25	0.50	6.25
	62	0.75	1.25	9.50
MeOH Extract	31	0.00	0.25	4.50
	62	0.00	0.00	2.75
N.C.*		0.00	0.00	4.25
P.C.**		0.25	0.25	5.50

\* Negative Control: Solvent (DMSO: Saline=1:9) Only

\*\* Positive Control: Mitomycin C (4mg/kg-BW)

#### 4. 2 リファレンス物質

生物試験では、試験前の生物の履歴や遺伝形質または試験の操作条件の違いで応答が変動する。したがって、結果を比較するためには、試験回ごとにブランク (陰性対照) とスパン (陽性対照) をとる必要がある。また、陽性対照には対象とする試料に含まれる物質を用いるほうが、結果の相互評価のために都合が良い。このため、今回は都市ごみ焼却に由来するリファレンス物質として、PAHs である Benzo[a]pyrene, 1,8-Dinitropyrene を検討した。MRL 試験 (表 3, 4) では、ある程度の大きさの応答と繰り返し精度が得られており、リファレンス物質として妥当であると考えられる。小核試験に関しては、繰り返し精度は未検討であるが、Benzo[a]pyrene は比較的明瞭な Dose-Response を示しており (表 5) リファレンス物質として有望である。廃棄物試料に含まれる芳香族系の炭化水素としてはこの他に塩素基を有するものがあり、今後加えるべきリファレンス物質である。この点で表 2 に示した MRL 試験における Chlorophenols への応答は重要である。

#### 4. 3 評価範囲

燃焼由来の有害物質として選んだ主に芳香族系炭化水素類に対する試験の応答は、MRL 試験について表 2、魚類小核試験について表 5 に示した。MRL 試験では調べた全ての物質について応答が得られている。細菌を用いた遺伝子毒性試験で応答が得られるものが少ないとされる塩素系の化合物について応答が得られているところは、用いた標準品の純度に問題はあがあるが、注目される場所である。一方、魚類小核試験では、Benzo[a]pyrene および Benzo[a]anthracene では明確な応答が得られた。また、焼却灰および浸出水試料からの物質の抽出に用いた溶媒、特に酢酸エチルは芳香族系の炭化水素類の抽出をターゲットとしたものであり、表 7、表 8 に示すように両試験法はこれら抽出物に反応している。以上は、両試験法がごみ燃焼由来の副生成物、少なくとも芳香族炭化水素類の評価に対しては適用可能であることを示している。

#### 4. 4 実試料に対する応答

廃棄物関連試料にはたいがい既知また未知の化学物質が様々な濃度レベルで多数混在している。これらのいくつかは試験生物を殺したり、酵素反応を阻害して試験法を妨害する。また、遺伝子毒性試験では低濃度長期曝露により発現する毒性を高用量の投与により短期的に評価しようとする。したがって、試料に対して含まれるターゲットとする化学物質を濃縮・抽出する必要がある。

MRL 試験および魚類小核試験ともに今回用いた浸出水からの抽出物に反応があり、何らかの

遺伝子毒性物質を検出している。しかし、表 8 に示したように魚類小核試験において個体の死亡が生じており、この原因を究明する必要がある。また、処理による毒性の増減は抽出溶媒および代謝活性により異なっており、ターゲットとする物質群の抽出効率や検出割合を調べる必要がある。

#### 4. 5 操作

MRL 試験は、菌体の復元に 3 日程度、試験操作には菌体の前培養を含めて 6 時間程度であり、比較的迅速に結果を得ることができる。ただし、発光量および菌濃度の測定には手作業の部分が多いためやや煩雑なところがあり、マイクロプレート法等の適用でさらなる試験操作の簡易・迅速化が図れるだろう。魚類小核試験は、生物の馴致に 20 日程度、試料の投与から血液等の採取まで 6 日間、プレパラートの作成から評価まで、1 検体あたり半日程度を要する。曝露時間は長い。現在の腹腔内への投与を排水中での曝露に変えれば、蓄積を考慮した長期監視に使えるだろう。操作上の問題は検鏡による小核の計数の労力である。特に、えらを用いる場合には細胞の分散性に劣り、検鏡時の労力は増大する。画像解析等を用いた検鏡操作の自動化が望まれる。

#### 5. 結論

MRL 試験および魚類小核試験を廃棄物処理施設におけるリスク検知に用いるための手法上の問題点について検討した。

- 1) MRL 試験及び魚類小核試験の標準品に対する繰り返し精度は、他の生物化学的な総合指標の範囲にあった。
- 2) MRL 試験のリファレンス物質として、主に燃焼由来の PAHs をターゲットとする場合、現段階では Benzo[a]pyrene、1,8-Dinitropyrene が妥当であると考えられた。
- 3) 両試験法は芳香族炭化水素類の評価に対しては適用可能であるが、実試料に含まれる妨害因子、また、ターゲットとする物質群の抽出効率、検出割合等をさらに検討する必要がある。
- 4) 試験操作においては、マイクロプレート化、画像解析などの簡易化および自動化を図る余地がある。

本原稿は第 10 回廃棄物学会研究発表会（1999）で発表したものを修正・加筆したものである。

この研究は厚生省厚生科学研究費補助金による助成を受けた。また、MRL 菌株を提供いただいた栗田工業（株）技術開発センター水本正浩氏、卒業研究生として実験を行った橋本昌洋、曾我真理子両氏、および試料の入手に協力をいただいた関係者各位に深く謝意を表す。

#### 参考文献

- 1) 山田正人ら、第 9 回廃棄物学会研究発表会講演論文集 II, 1029-1031, 1998
- 2) 水本ら、水環境学会誌, 21(6), 347-352, 1998
- 3) 谷所ら、環境変異原研究, 20, 1-9, 1998
- 4) U.S.EPA, EPA/505/2-90-001, 1991

