



HOKKAIDO UNIVERSITY

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2報：各種変異原性試験法の適用性の検討
Author(s)	山田, 正人; 井上, 雄三; 大迫, 政浩 他
Description	第6回衛生工学シンポジウム（平成10年11月5日（木）-6日（金） 北海道大学学術交流会館） . 2 モデリング・評価 . 2-5
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 6, 49-54
Issue Date	1998-11-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7320
Type	departmental bulletin paper
File Information	6-2-5_p49-54.pdf



2-5 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2報：各種変異原性試験法の適用性の検討

山田正人（国立公衆衛生院），井上雄三（国立公衆衛生院），大迫政浩（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（国立公衆衛生院），田中 勝（国立公衆衛生院）

1. はじめに

現在、有害化学物質の環境中への漏洩等、廃棄物処理施設に対する不信感がいたずらに煽られ、施設の設置や適正な廃棄物の管理に支障をきたしている。この問題を解決するには、法規制されている物質だけではなく、未知かつ未規制なものを含めた化学物質のリスクを総合的に同定・評価して、社会的に許容されるレベルまで制御する厳重なリスク管理を、廃棄物処理・処分システムにおいて行う必要がある。

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迅速かつ総合的に評価する手法として、変異原性試験に着目し、その廃棄物処理分野への適用を検討している¹⁾。今回は、廃棄物処理・処分過程において特徴的と考えられる化学物質や、都市ごみ焼却施設の焼却灰および埋立処分場の浸出水について、複数の変異原性試験法を同時に行い、各手法の適用性を検討した。

2. 方法

2.1 モデル物質

国内外における法規制の有無、廃棄物に含有または焼却で生成すること、また変異原性や発ガン性情報の有無等を考慮して、13種の金属および有機化合物（主に単環・多環芳香族）をモデル物質として選定し、標準品を入手した。

2.2 試料

4ヶ所のごみ焼却施設（表1）から、焼却底灰と飛灰を採取した。また2ヶ所の最終処分場（表2）から浸出水の原水、消毒前の処理水、および消毒後の放流水を採取した。

表1 試料を採取したごみ焼却施設の概要

Code	A	B	C	D
Waste	combustibles	combustibles and sludge from night soil treatment plants	combustibles, direct houblings, and treatment residues	combustibles
Type ¹⁾	semi-continuous feed/stoker	continuous feed/stoker	mechanical batch/stoker	continuous feed/stoker
Capacity (ton/day) /Number of furnaces	80/2	150/2	46/2	800/4
Establishment	1984	1985	1991	1995
Dust collector	electric precipitator	electric precipitator	electric precipitator	bug filter
Exhaust treatment	spraying of slaked lime	spraying of slaked lime (semi-dry) and noncatalytic reduction of NOx	spraying of slaked lime (dry)	spraying of slaked lime (dry)

¹⁾: operation of these type of plants are defined as continuous feed=24hr/day; semi-continuous feed=16hr/day; and mechanical batch=8hr/day

表 2 試料を採取した最終処分場の概要

Code	A		B
Site location	plain	plain	mountain
Waste	incinerator residue, pulverization residue, and night soil treatment residue	incinerator residue and pulverization residue	bulky waste, pulverization waste, and combustibles
Establishment	1991	1995	1990
Closure (plan)	1995	2000	
Area (m ²)	-	6,650	22,500
Volume (m ³)	9,150	32,600	217,370
Filled volume (m ³)	9,150	4,402	17,931
Type	semi-aerobic	semi-aerobic	semi-aerobic
Liner	equipped	equipped	equipped
Leachate treatment plant			
Capacity (ton/day)	30		70
Processes	Ca reduction, biological dinitrification, advanced treatment (coagulation + rapid sand filtration + AC absorption), and sterilization		Ca reduction, biological dinitrification, advanced treatment (coagulation + rapid sand filtration + AC absorption + chelate), and sterilization

2.3 焼却灰からの化学物質の抽出・濃縮

乾燥させた試料について、吉野と浦野²⁾の方法にしたがって、酢酸エチルで振盪、超音波による抽出操作を行った。回収された抽出液について、溶媒をエバポレータで減圧留去し、得られた残渣を酢酸エチル抽出物とした。

2.4 浸出水からの化学物質の抽出・濃縮

浸出水は、加圧ろ過して懸濁物を取り除いたのち、XAD-2000 樹脂を充填したガラスカラムに通水して有機物を吸着させた。樹脂より吸着物を適量の酢酸エチルで抽出し、脱水および減圧留去の後、得られた残渣を酢酸エチル抽出物とした。また、続けて、樹脂より吸着物をメタノールで抽出し、脱水および減圧留去の後、得られた残渣をメタノール抽出物とした。

2.5 変異原性試験

細菌を用いて *in vitro* で遺伝子突然変異を検知する Ames 試験と DNA 損傷を検知する umu 試験、また、魚類を用いて *in vivo* で染色体異常を検知する小核試験と DNA 損傷を検知する SCG 試験 (コメットアッセイ) を用い、モデル物質、焼却灰および浸出水の抽出物の変異原性を調べた。Ames 試験²⁾では、菌株に *Salmonella typhimurium* TA98 と TA100 を用い、それぞれ肝臓機能を模した代謝活性化剤を加えた系 (+S9) と加えない系 (-S9) について、プレート法で復帰変異株のコロニー数を求めた。umu 試験³⁾では、親株 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 とアミノアレーンに高感受性を持つ菌株である NM2009 と感受性が低い NM2000 (+S9)、また、ニトロアレーンに高感受性を持つ株である NM3009 と感受性がない株 NM1000 (-S9) を用い、菌体あたりの β -galactosidase 活性を測定した。以上の細菌試験では被験物質は DMSO に溶解させて用いた。小核試験⁴⁾では、試験動物として金魚 (*Carassius auratus*) の和金およびコメットを用い、被験物質は生理食塩水または DMSO に溶解させて、腹腔内に投与し、96 および 144 時間後に、末梢血または鰓を採取して細胞あたりの小核誘発頻度を調べた。SCG 試験⁵⁾では、被験動物として和金を用い、被験物質はエタノールに溶解させて、腹腔内に投与し、96 時間後に末梢血を採取して、アガロースゲル上で核溶解および DNA 巻き戻し後に電気泳動を行い、得られた核の形状とその出現頻度を調べた。

3. 結果

3.1 モデル物質に対する各試験法の応答 (表 3)

SCG 試験では調べた化学物質および用量 (Trp-P-2、PCP および Benzo[a]pyrene、1 および 5mg/kg) において明確な応答が得られなかった。Ames 試験は、+S9 系で多環芳香族炭化水素 (PAHs) およびヘテロサイクリックアミンに反応し、特に Dinitropyrene 類で強い反応が得られた。umu 試験 (親株) でも同様に Dinitropyrene 類で強い反応が得られ、-S9 系でわずかながら重金属にも反応が見られた。Fluoranthene 類では反応は小さかった。魚類を用いた小核試験では、Benzo[a]pyrene、Trp-P-2 で明確に反応し、この他に単環で塩素を有する PCP にもわずかに反応した。また、Fluoranthene に対しては反応がなかった。

表 3 モデル物質に対する各試験法の応答

Dose	Ames (net rev./ug-chemical) ¹⁾				umu (unit/unit ²⁾				Micronucleus (relative frequency ³⁾)	
	TA98		TA100		TA1535/pSK1002		TA1535/pSK1002		P.E. ^{6,7)}	Gill ⁸⁾
	-S9	+S9	-S9	+S9	0 ug/mL -S9 ³⁾	3 ug/mL	0 ug/mL	3 ug/mL +S9 ⁴⁾	5mg/kg	5mg/kg
Pb2+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.31	0.41	0.15	0.14	N.E.	N.E.
Sb3+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.31	0.35	0.15	0.15	N.E.	N.E.
Cd2+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.31	0.29	0.15	0.17	N.E.	N.E.
Benzo[a]pyrene	N.D.	60	N.D.	220	0.58	0.60	0.33	1.5	0.67	0.73
1,6-Dinitropyrene	200000	2000000	140000	980000	0.58	7.2	0.33	4.9	N.E.	N.E.
1,8-Dinitropyrene	1000000	900000	500000	260000	0.58	5.6	0.33	3.3	N.E.	N.E.
1,3-Dinitropyrene	140000	300000	110000	280000	0.58	6.6	0.33	5.1	N.E.	N.E.
Trp-P-2	N.D.	4000	N.D.	240	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	0.67	0.34
Pentachlorophenol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	0.17	0.13
2,4,6-Trichlorophenol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
2,4-Dichlorophenol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Fluoranthene	N.D.	N.D.	N.D.	24	0.58	0.68	0.33	0.35	0.00	-0.10
Benzo[b]fluoranthene	N.D.	N.D.	N.D.	53	0.58	0.60	0.33	0.31	N.E.	N.E.

N.D. = not detected, N.E. = not evaluated

¹⁾: obtained from dose-response slope ²⁾: calculated as chemical/positive control of β-galactosidase unit

³⁾: used 4NQO 1mg/L as positive control ⁴⁾: used 2-AA 1mg/L as positive control

⁵⁾: calculated as [(chemical)-(negative control)]/[(positive control)-(negative control)] of micronucleus frequency

⁶⁾: used mitomycin C 4mg/kg as positive control ⁷⁾: Peripheral Erythrocytes

3.2 焼却灰の酢酸エチル抽出物に対する各試験法の応答 (表 4)

Ames 試験では、全ての試料について明確な反応がみられなかった。umu 試験では、アミノアレーンおよびニトロアレーンに由来する DNA 損傷性が、焼却飛灰で底灰より大きくなる傾向があった。小核試験では、和金、コメットとも、大部分の試料について反応があり、表には示していないが、値的には焼却底灰が飛灰より大きい小核誘発頻度を示す傾向があった。SCG 試験では、A 施設の飛灰で明確な DNA 損傷性が認められた。

表 4 焼却灰酢酸エチル抽出物の変異原性

Dose	umu		Micronucleus			
	0.02-0.56 g-ash/mL		Wakin		Comet	
	NM2009/2000	NM3009/1000	94-3700 g-ash/kg	94-3700 g-ash/kg	100-400 g-ash/kg	100-400 g-ash/kg
			P.E.	Gill	P.E.	Gill
A-fly ash	+	±	+	±	+	+
A-bottom ash	±	-	+	+	+	+
B-fly ash	+	+	N.E.	N.E.	+	±
B-bottom ash	+	+	+	±	+	+
C-fly ash	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	+	+
D-fly ash	±	±	N.E.	N.E.	+	+
D-bottom ash	±	±	N.E.	N.E.	+	+

"-": 0<x<1.5; "±": 1.5≤x<2; "+": 2≤x, x=sample / negative control

N.E.: not evaluated

3.3 浸出水の酢酸エチルおよびメタノール抽出物に対する各試験法の応答 (表 5)

Ames 試験では、A 施設の原水および放流水において-S9 系で反応があった。特に放流水のメタノール抽出物には強い変異原活性が認められた。umu 試験では A 施設原水のメタノール

表5 浸出水抽出物の遺伝子毒性

Dose		Ames				umu NM3009/1000 0.38-2.6 L-leachate/mL	Micronucleus Wakin	
		TA98 0.04-1.17 L-leachate/plate		TA100 0.04-1.17 L-leachate/plate			1-5 L-leachate/body P.E.	Gill
		-S9	+S9	-S9	+S9			
A-raw water	EtAc	-	-	-	-	+	+	+
	MeOH	-	-	+	-	-	N.E.	N.E.
A-treated water	EtAc	-	-	-	-	+	+	+
	MeOH	-	-	-	-	±	N.E.	N.E.
A-effluent	EtAc	+	-	+	-	+	+	7
	MeOH	+++	-	++	-	+	N.E.	N.E.
B-raw water	EtAc	-	-	-	-	+	N.E.	N.E.
	MeOH	-	-	-	-	++	N.E.	N.E.
B-treated water	EtAc	-	-	-	-	+	N.E.	N.E.
	MeOH	-	-	-	-	+	N.E.	N.E.
B-effluent	EtAc	-	-	-	-	+	N.E.	N.E.
	MeOH	-	-	-	-	+	N.E.	N.E.

"-": $0 < x < 1.5$; "±": $1.5 \leq x < 2$; "+": $2 \leq x < 20$; "++": $20 \leq x < 200$; "+++": $200 \leq x$, x=sample/negative control
N.E.: not evaluated

抽出物以外で応答があり、B 施設原水のメタノール抽出物に特に大きな DNA 損傷性が認められ、ニトロ化合物の存在が示された。小核試験では、試験した全ての酢酸エチル抽出物で小核誘発能が見られた。なお、これら試料について SCG 試験は行っていない。

4. 考察

4.1 変異原性試験の応答特性

環境試料の変異原性の評価では Ames 試験が単体で用いられている例が多い^{2) 6) 7)}。今回用いた試験法では、PAHs で代表的な発がん性物質 Benzo[a]pyrene に対して有意な応答があり、Dinitropyrene 類に大きな遺伝子毒性活性が見られた点が共通している。また、一般に、変異原性試験（特によく用いられている Ames 試験）は含塩素化合物に対する応答が得られないことが大きな欠点とされているが、今回の結果で、魚類小核試験において弱いながらも応答が得られていることは注目すべき事項である。焼却灰および浸出水試料の溶媒抽出物を用いた試験は、ある試験で検出されなかった変異原性物質が他の試験で捉えられていること、また、試験法で検知している物質種または感度が異なることを示している。

4.2 変異原性試験の焼却灰、浸出水への適用性

本研究で用いた試料の前処理法および変異原性試験法は、焼却灰および浸出水に含まれる遺伝子毒性を検出しており、一連の手法が廃棄物分野に適用可能であることが確かめられた。しかし、今回用いた試料の抽出・濃縮法は、有害物質として燃焼由来の高沸点非極性の有機化合物を想定したものであり、これ以外の性質をもった物質に対しては、別の前処理法を考える必要がある。また、今回試験に用いた用量範囲が、焼却灰や浸出水の評価に広く用いることができるか、リスクの所在の有無を判定するのに妥当であるかどうかは、より多くの試料について含有される有害化学物質の濃度との対応を把握し、試料そのものの発癌性等を哺乳動物による試験で確認するなどして、検討する必要がある。

4.3 焼却灰および浸出水に含まれる変異原性物質

焼却灰および浸出水では、大部分で umu 試験および小核試験において明確な応答が認められた。試料の変異原性の評価で用いた umu 試験菌株はアミノ化合物およびニトロ化合物を高感度に検出する系であり、応答があった試料には変異原性をもつこれらの物質が含まれるこ

とが示唆される。なお、モデル物質の中で極めて強い変異原性活性を示した Dinitropyrene 類はニトロ化合物である。これらアミノおよびニトロ化合物は主に燃焼によって生ずることが知られており^{3) 8)}、焼却を経由する廃棄物処理システムにおいて、重要な有害物質である可能性がある。また、浸出水の処理過程で活性を比較すると、A 施設では塩素滅菌により変異原性 (Ames 試験) 物質が生成する様子、B 施設では処理の過程でニトロアレーンによる DNA 損傷性 (umu 試験) 物質が除去される様子が明確に現れている。すなわち、変異原性試験を利用して、有害物質の消長に関して処理プロセスの評価を行うことが考えられる。

4.4 各試験法のリスク検知システムの中での位置づけ

廃棄物処理施設で想定される有害化学物質によるリスク検知システムについて、前報¹⁾より修正した概念図を図1に示す。また、リスク検知の各段階において、試験法に求められる要件を表6に示す。

放出物および周囲環境におけるモニタリングは、周辺環境に存在する生物 (例えば魚) を利用して、地理的、時間的なバックグラウンドとの比較により異常を検知することを想定している。この際には、現場への常時設置がまず基本となる。周囲環境モニタリングでは、魚類小核試験および SCG 試験を、供試生物を現場環境で飼育して用いることが考えられる。また、放出物のモニタリングでは、より迅速な応答が求められるため、細菌試験のような応答が比較的迅速な *in vitro* の試験系を、自動化したり、バイオセンサーのような形式にすることが必要である。

搬入物の展開検査を想定した一次スクリーニングでは、オンサイトで使えるような簡易分析キット型の試験系が想定される。例えば、umu 試験のように、毒性応答を発色や生物発光で測定する試験系が適しているだろう。また、この時点では、急性毒性を示すような高濃度での物質の混入も予想されるので、マイクロトックス試験等の急性毒性試験も併用する必要がある。

モニタリングや一次スクリーニングで得られた異常値の精査のため行われる二次スクリーニングは、前処理による物質の選別と変異原性試験手法を組み合わせ、特に変異原活性の高い変異原物質群 (例えば、塩素、ニトロ、アミノ化合物等) とその優先順位を推定し、次に続く化学分析へ情報を与え、その費用、時間および労力を軽減することを想定している。この際に

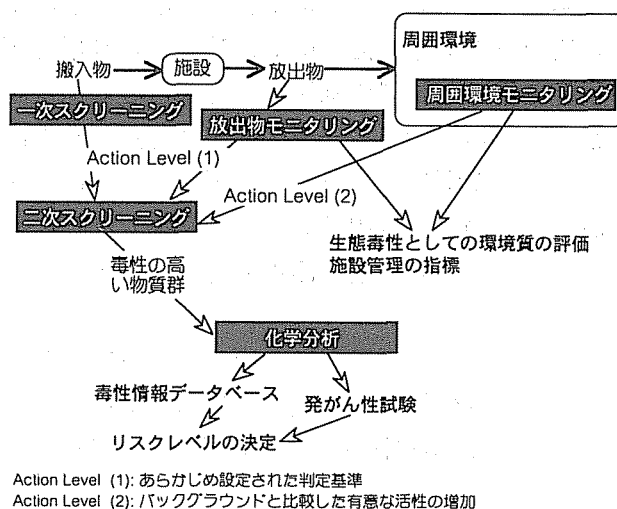


図1 変異原性試験を用いたリスク検知システム

表6 試験法に求められる要件

	物質特異性	感度	応答速度	試料	形式
周囲環境モニタリング	包括的	中～低	中～低	全量	蓄積型 (生育生物)
放出物モニタリング	包括的	中	高	全量	センサー型
一次スクリーニング	包括的	高～中	高～中	全量	分析キット型
二次スクリーニング	選択的	高	中～低	分画	分析器型 (高感受性株)

は、今回用いた umu 試験におけるニトロ、アミノ化合物に対する高感受性株等を組み合わせる用いることが考えられる。また、これらを補完するために TOX のような化学分析による総合指標も併用することも考えられる。

最終的には、試験で得られた全体の毒性に対して重要な個別物質の化学分析値を、動物個体を用いた試験で得られた Dose-Response から、例えば発ガンリスクポテンシャルへと定量的に変換し、規制等の対策に利用する。また、変異原性試験の結果自体も、施設の処理能力の改善や監視の目安となる指標として利用する。

以上のような変異原性試験法のシステム化による現場での運用を視野にいれると、手法の自動化、簡易化に関する研究も、今後の重要な課題である。

5. まとめ

廃棄物処理・処分過程において特徴的と考えられる化学物質や、都市ごみ焼却施設の焼却灰および埋立処分場浸出水について、複数の変異原性試験法を同時に用い、その適用性を検討した。本研究で用いた試料の前処理法および変異原性試験法は、焼却灰および浸出水に含まれる変異原性を検出しており、一連の手法が廃棄物分野に適用可能であることが確かめられた。また、有害物質を包括的にスクリーニングするという目的においては、単一の試験だけではなく、複数の試験法を同時に併用することが必須であると考えられた。また、焼却を経由する廃棄物処理システムにおいて、ニトロ化合物およびアミノ化合物が重要な変異原である可能性が示唆された。

今後は、前処理法、試験系について、新たな手法を加えることを視野に入れて、より広範な物質特異性、結果の精度・再現性、化学分析とのリンクさせる方法、手法の簡易化・迅速化等について、引き続き検討を進めてゆく予定である。

本研究は、平成 7～9 年度にかけて厚生省公衆衛生研究推進費により行われたものである。また、本原稿は、第 9 回廃棄物学会研究発表会（1998）に発表したものを、修正・加筆したものである。

参考文献

- 1) 山田ら（1997）：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 5 回衛生工学シンポジウム論文集，76-81
- 2) 吉野・浦野（1993）：廃棄物焼却炉飛灰の変異原性試験のための試料調整方法，廃棄物学会論文誌，4(2)，64-71
- 3) 小野ら（1998）：焼却廃棄物中の窒素化合物による遺伝毒性，廃棄物学会論文誌，9(4)，115-122
- 4) 谷所ら（1998）：魚類の小核試験を用いる沿岸水域の汚染モニタリング，環境変異原研究，20，1-9
- 5) 平井・Tice（1994）：細胞レベルで高感度な DNA 損傷試験法—Single Cell Gel Assay—，変異原性試験，3(1)，1-11
- 6) 染谷（1995）：処分場浸出水の変異原性，廃棄物学会誌，6(4)，285-293
- 7) 吉野・浦野（1995）：都市ごみ焼却排ガスの変異原性，Environ. Mut. Res. Commun.，17，191-201
- 8) 常盤（1993）：芳香族炭化水素ニトロ誘導体の変異原性，発がん性との関連性、変異原性試験，2，76-89