

た水は蓄積や滞留することなく全量が次のプロセスに移動すると考えた。

改良型環境移行モデルを用いた数値解析結果を図8～図10に示す。本モデルでは、前述のように生産過程における鉛の蓄積を考慮していないため、解析結果においても、生産過

寿命を考慮しているわけではない。今後の課題として、個々の製品に対して環境移行モデルを適用し、その総和を求めることによって最終的に鉛のサブスタンスフローアナリシスとすべきである。

図9および図10は、10年後における各プ

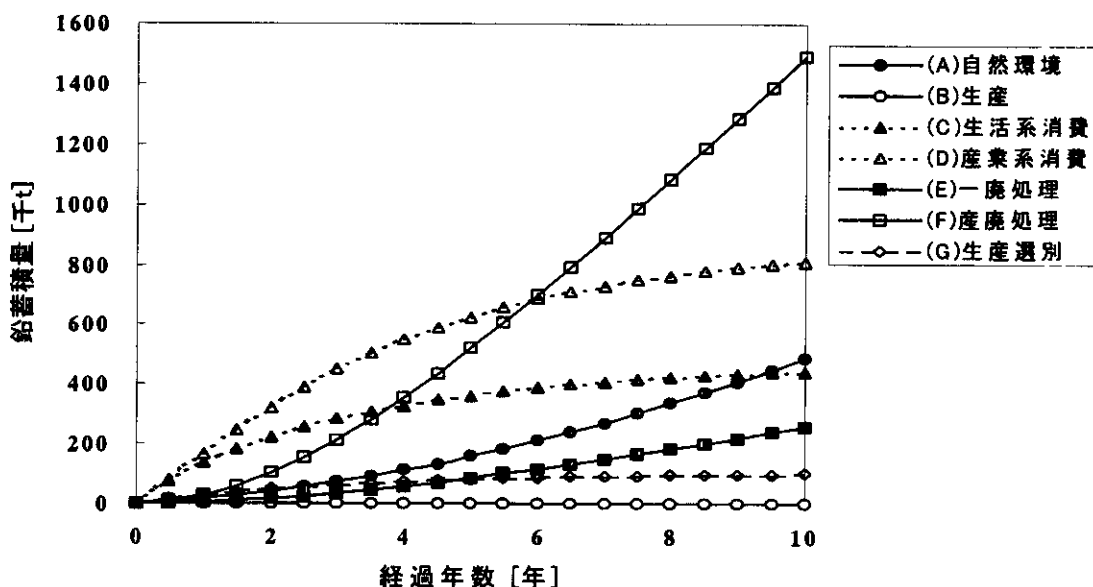


図8 各過程における鉛蓄積量の経年変化(改良型モデル)

程における鉛の蓄積は認められない。

鉛蓄積量の経年変化を示した図8では、産業系消費過程および産業廃棄物処理過程に著しく鉛が蓄積していることがわかる。また、生活系および産業系消費プロセスにおいても蓄積が認められる。これらの結果より、本モデルは、実際の環境移行モデルを正確に表現できていないにせよ、その傾向をある程度正しく表しているといえる。また、自然環境要素、一般および産業廃棄物処理過程の蓄積量は漸増しているのに対し、その他の過程ではほぼ一定値に漸近している。これは、系内に流入した鉛が最終的に自然環境要素および廃棄物処理過程のいずれかに蓄積することを示唆している。

ただし、本モデルでは、モデル内を移動する製品中の鉛量は、各製品に含有している鉛量の平均値であり、個々の製品の流通経路や

プロセスの鉛蓄積量およびこれらを各過程ごとに蓄積割合としてまとめたものである。鉛の蓄積は、産業廃棄物処理過程で最も多く、次いで産業系消費過程で多くなっている。これは、産業廃棄物埋立プロセスおよび産業消費廃棄物選別過程における蓄積が顕著に起こっているためとみられる。ところで、本モデルでは、販売された鉛含有製品の62%が生活系に、38%が産業系に移行すると考えているが、なぜ産業廃棄物処理過程に鉛が流れるのであろうか。それは、生活系消費された製品のうち、大部分(具体的には87%)が産業廃棄物処理過程に移行するからである。これは、大型製品の一部が、販売店によって引き取られ、最終的には産業廃棄物として処理されているためと考えられる。

一方、自然環境中に蓄積する鉛量は、大気中がもっとも多く、次いで水域、土壌となっ

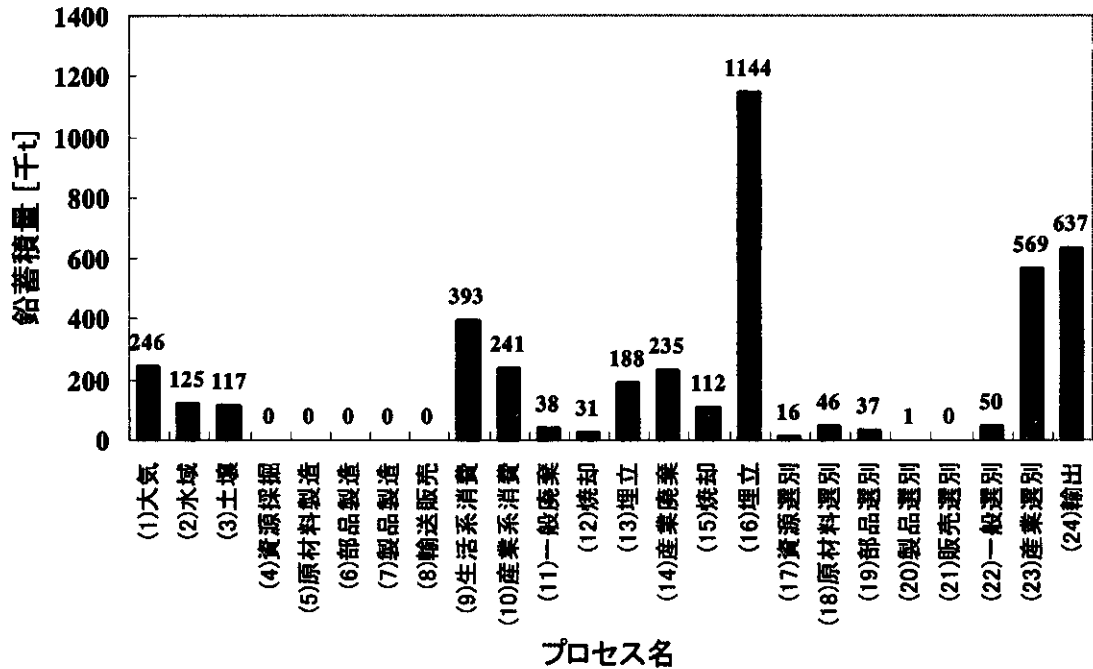


図 9 10年後の各プロセスにおける鉛蓄積量(改良型モデル)

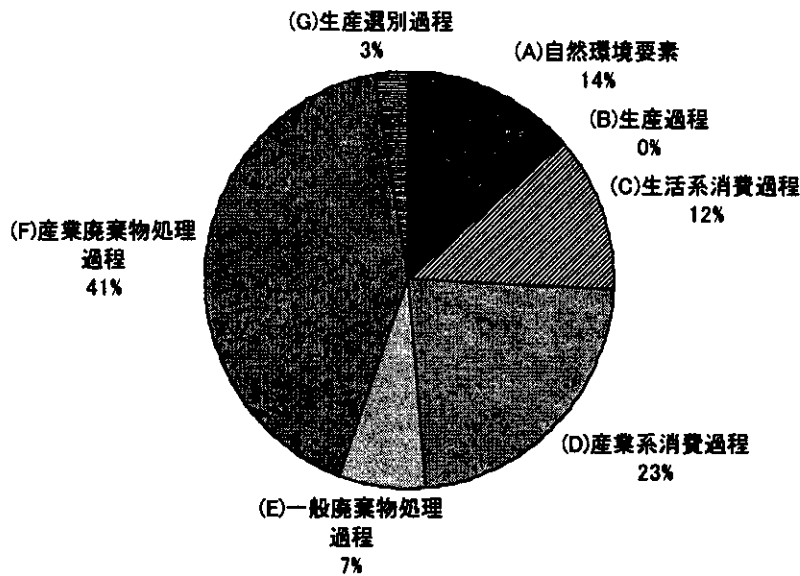


図 10 10年後の各プロセスにおける鉛蓄積量の割合(改良型モデル)

ている。これは、産業廃棄物焼却によって排出された大量の鉛によるものと考えられる。

ここで、各プロセスより自然環境中に排出される鉛が、自然環境、特に大気に対してどの程度負荷を与えているか、その負荷配分について、本モデルを用いて得られた数値計算結果より算出してみることにする。

図 11 は、10年経過時における各プロセスから大気中に排出される鉛の排出速度（1年間あたりの排出量）を解析結果より算出したものおよび、右の円グラフは、大気に対する各プロセスの負荷配分割合を示す。10年経過後では、資源探掘プロセスにおいて、最も多く鉛が大気放出(43%)されており、これに次

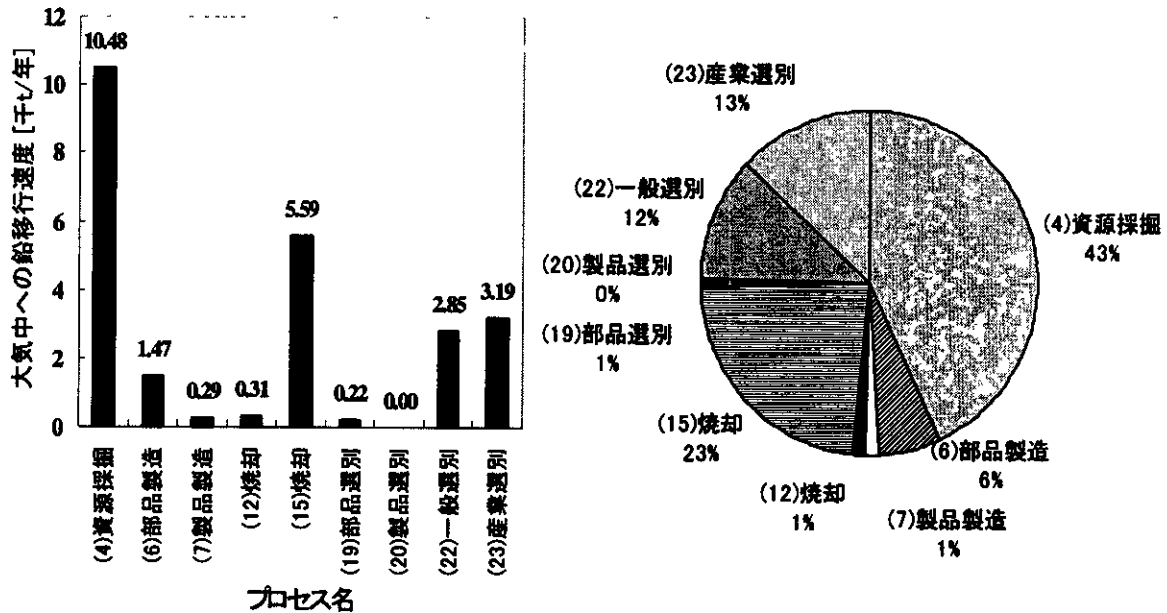


図 11 10年後の各プロセスから大気中への鉛移行速度
およびその負荷割合(改良型モデル)

いで、産業廃棄物の焼却プロセス(23%)で多くの大気負荷を与えていることがわかる。

ここで、本モデルを用いた解析結果によって1つの問題点が示された。それは、産業廃棄物処理過程に大量に集められた塩化ビニルなどの化学製品の焼却処理である。塩化ビニル製品は、建材や土木用資材として用いられることが多く、その多くが産業廃棄物として処理されると考えられる。塩化ビニルには、安定剤として鉛が使用されており、これらが廃棄物として焼却処理された場合、製品に含有している鉛は、焼却灰中に濃縮され、最終的には埋立処分場や自然環境中に蓄積すると考えられる。また、不法投棄などにより野積みになされた製品から鉛が溶出する可能性も十分考えられる。ところが、現段階では、塩化ビニル等の個々の製品に対する廃棄物処理実績は報告されておらず、場合によっては焼却によって濃縮された鉛が環境を汚染している恐れもある。今後は、個々の製品に対する細かな処理フロー等を明らかにし、廃棄物処理場に蓄積する鉛の環境リスク管理を徹底することはもとより、焼却等による質変換時におけ

るリスク管理・システム設計が必要であるといえる。

E. 結論

本研究では、有害物質リスク管理の手法の確立を目的とし、サブスタンスフローアナリシスの鉛への適用を行った。その結果および今後の課題をまとめると次のようになる。

- 1)年間約 400,000t にものぼる量の鉛が国内で流通している。製品中に使用されている鉛の主なものは、鉛蓄電池(199,300t:52.6%)、自動車(85,900t:22.7%)、電化製品(17,900t:4.7%)、塩化ビニル製品(16,300t:4.3%)である。これらの製品は部品から供給される鉛の95.7%を占めることを明らかにした。
- 2)廃製品から鉛がリサイクルされる割合は、製品段階で使用される鉛の約50%(165,000t)である。
- 3)環境移行モデルとして2種類(生産段階に蓄積を考慮したモデルおよび蓄積を考慮しないモデル)を構築し、解析を行った。その結果、生産段階で蓄積を考慮しないモデ

ルの方が、実際の現象に近いことが明らかとなった。

4) 改良した環境移行モデルによる数値解析結果から、鉛は自然環境中および産業廃棄物処理過程に著しく蓄積する傾向が明らかとなった。これは、これらのプロセスがリスク管理のキーポイントなることを示唆するものである。

5) 数値解析結果より、各プロセスより大気中に排出される鉛の負荷量は、資源採掘プロセスによるものが最も大きくなること、次いで、産業廃棄物焼却プロセスによるものが大きくなることが予想される。

今後の課題

1) 環境移行モデルの改良や適切な環境リスク管理を行うためには、産業系消費過程および産業廃棄物処理過程における鉛の流通量について、更に綿密な調査が必要である。

2) 各過程における鉛の挙動をよりの確に表現できるモデルの開発が必要となる。例えば、生産過程では製品段階（下流）からの影響（需要）が物質移動の推進力となるような基礎式の適用などを考慮していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

(なし)

2. 学会発表

(なし)

G. 知的所有権の取得状況

(なし)

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

MRL試験および魚類小核試験の廃棄物試験への適用性の検討

分担研究者 山田正人 国立公衆衛生院廃棄物工学部主任研究官

研究要旨

細菌を用いた DNA 損傷性試験である Modified Rec Lux (MRL) 試験および染色体異常試験である魚類を用いた小核試験について、標準物質ならびにごみ焼却灰、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有害物質に起因するリスク検知のツールとしての適用性について検討した。両試験の繰り返し精度は他の生物化学的な総合指標の範囲内にあり、今回用いた一連の手法は妨害因子の検索、手法上の簡易化と迅速化をさらに進めてゆけば、少なくともごみ燃焼由来の有害物質である芳香族系炭化水素類の評価に適用可能である

A. 研究目的

細菌を用いた DNA 損傷性試験である Modified Rec Lux (MRL) 試験および染色体異常試験である魚類を用いた小核試験について、標準物質ならびにごみ焼却灰、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有害物質に起因するリスク検知のツールとしての適用性について基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料

1-1 標準物質

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 (和光生化学用) の標準品を比較のために試験に用いた。

1-2 焼却灰

9ヶ所のごみ焼却施設から、焼却底灰 (A, B, D および F)、底灰と飛灰が混合したもの (E および G)、飛灰 (全施設) を採取した。試料を採取した施設の概要を表-1 に示す。試料は施設内の焼却灰の輸送コンベアまたはピットから、なるべく湿っていない試料を 1~5kg 採取した。採取した試料はポリ袋に入れ、研究室に搬送し、実験まで暗所で室温にて保存した。

1-3 浸出水

3ヶ所の最終処分場において浸出水処理の各工程ごとに浸出水を採取した。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、1L 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-2 に示す。

表-1 試料採取施設（焼却灰）

施設名	A	B	C	D	E-1	E-2
処理対象物	可燃ごみ	可燃物ごみ、し尿処理汚泥	可燃ごみ、直搬ごみ、処理残渣	可燃ごみ	可燃ごみ	可燃ごみ
処理方式	ストーカ	ストーカ	ストーカ	ストーカ	ストーカ	流動床
炉形式	准連	全連	機バ	全連	全連	全連
処理能力 (t/day)	80	150	46	800	100	120
炉数	2	2	2	4	1	2
使用開始年	1984	1985	1991	1995	1981	1988
集塵機	電気集塵機	電気集塵機	電気集塵機	バグフィルタ	電気集塵機	電気集塵機
その他の排ガス処理	消石灰噴霧	消石灰噴霧 (半乾式)、無触媒脱硝	消石灰噴霧 (乾式)	消石灰噴霧 (乾式)	水噴霧	アルカリ薬品炉内噴霧
施設名	F	G	H	I		
処理対象物	可燃ごみ、直搬ごみ	可燃ごみ、不燃ごみ、直搬ごみ、粗大ごみ、処理残渣	可燃ごみ	可燃ごみ、直搬ごみ、粗大ごみ、処理残渣		
処理方式 ^{*1}	ストーカ	ストーカ	流動床	流動床		
炉形式	准連	全連	全連	准連		
処理能力 (t/day)	100	300	220	110		
炉数	2	3	2	2		
使用開始年	1982	1995	1994	1992		
集塵機	電気集塵機	バグフィルタ	バグフィルタ	バグフィルタ		
その他の排ガス処理	ハイクロトン	湿式洗煙、脱硝反応塔	有害ガス除去	有害ガス除去		

なお、各施設での採取場所は、表-2 に示した処理フローで

K施設：計量槽、再ばっ気槽、凝集沈殿後、砂ろ過後の 4ヶ所

L施設：計量槽、生物処理、凝集沈殿後、活

性炭吸着後の 4ヶ所

M施設：計量槽、第 1 凝集沈殿後、生物処理後、第 2 凝集沈殿後、活性炭吸着後の 5ヶ所である。

表-2 試料採取施設（浸出水）

施設名	K	L	M
埋立場所	平地	山間	山間
経過年数 (年)	4	2	7
面積 (m ²)	40,000	30,000	9,000
埋立対象	不燃ごみ、焼却残渣	不燃ごみ、焼却残渣	焼却残渣
埋立方式	—	セル方式埋立方法	サンドイッチ工法
浸出水処理能力 (t/day)	85	70	70
処理フロー	浸出水→流量調整→計量槽→pH調整→生物処理→再ばっ気→凝集沈殿→砂ろ過→処理水槽→放流	浸出水→流入調整→計量槽→生物処理→凝集沈殿→砂ろ過→活性炭吸着→処理水槽→消毒槽→放流	浸出水→原水調整→第 1 凝集沈殿→生物処理→第 2 凝集沈殿→砂ろ過→活性炭吸着→処理水槽→放流

2. 試料の前処理

2-1 焼却灰

焼却灰からの化学物質の抽出は、吉野と浦野 (1993) の方法に基づき、若干の変更を加えた。採取した焼却灰はまず 105℃で 4 時間乾燥させ、デジケーター中で放冷した。乾燥試料 5g を、50mL のネジ口遠沈管にいれ、酢酸エチルを 30mL (6mL/g-dry) 加えてから、恒温槽 (20±1℃) 中で 200spm、15 分間振盪した。その後、超音波ホモジナイザー (5203-W, 大岳製作所) で 5 分間超音波破碎 (26Hz) をおこない、3000rpm で 10 分間遠心分離をおこなった。遠沈管内の上澄みを 20mL 採取した後、新しい溶媒を 20mL くわえ、同様に振盪、超音波破碎および遠心分離を行い、遠沈管内の上澄みを 20mL 採取して、総量 40mL の抽出液を得た。それぞれの抽出液は、ロータリーエバポレーター (REN-1, 岩城硝子 (株)) を用いて、50℃で溶媒を揮散させ、窒素パージをおこなって溶媒を完全に除去した後に、ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬) に展開して用いた。

2-2 浸出水

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 分メスシリンダーで計り採り加えた。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、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留去させ、秤量した後に 1mL の DMSO に展開させて用いた。

3. 遺伝子毒性試験

3-1 Modified Rec Lux (MRL) 試験

DNA が損傷するとさまざまな修復を行うが、この中で DNA 合成の遅延を回避するために、応急的に、ギャップをでたらめな塩基で埋める SOS 修復と呼ばれるものがある。MRL 試験は、SOS 遺伝子のプロモーター・オペレーター領域下流にレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子 (*luxAB*, *Vibrio harveyi* 由来) 連結した組み替え体試験菌株 (大腸菌 *Escherichia coli*) において、SOS 遺伝子の転写量を、レポーター遺伝子由来の酵素活性として測定する DNA 損傷性試験である。

試験菌株として、大腸菌において、*recA* 遺伝子にレポーター遺伝子として発光遺伝子 *LuxAB* を連結した融合遺伝子をコードするプラスミドを挿入した MC1061(pRAL201)株と、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、発光遺伝子 *LuxAB* 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℃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℃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℃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℃、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 μl 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℃、200rpm で 2 時間振とう培養を続けた。

6) 培養終了後、培養液 200 μ l にエタノールで 10 倍希釈した n-decyl aldehyde を 20 μ 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。

3-2 魚類小核試験

小核試験は、細胞分裂に際し形成される染色体の断片である小核を指標とし、生体内で生じた小核を臓器細胞や赤血球を採取して染色体異常を検出するものである。

被検体動物には金魚 (*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 (CaCl₂·2H₂O 0.294g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1233g/L、NaHCO₃ 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℃ \pm 2℃、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 \times 400 \times 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 \times 高さ 275mm) に 2 匹づつ移した。試験中は 5L ビーカー (φ180 \times 高さ 275mm) に砂利は数かずに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 μ L/10g-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ガ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。

C. 研究結果

1. MRL 試験

1-1 標準品に対する応答

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-3 に示す。応答の大きさは、0~100 μ mol/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 Benzo[a]pyrene~1,3-Dinitropyrene の 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 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

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、繰り返し試験の結果を表-4 および表-5 に示す。各物質に対する

10 または 11 回の繰り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。

表-4 リファレンス物質の繰り返し試験 (MM96) 結果-初期勾配

	+S9		-S9	
	1,8-DNP	B[a]P	1,8-DNP	MMC
	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)	LU/(umol/5mL)	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-5 リファレンス物質の繰り返し試験 (MM96) 結果-最小検出濃度

	+S9		-S9	
	1,8-DNP	B[a]P	1,8-DNP	MMC
	umol/5mL	umol/5mL	umol/5mL	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

1-2 試料に対する応答

1-2-1 焼却灰

ごみ焼却灰 (底灰、飛灰) に対する MRL 試験の応答を表-6 に示す。ここでは、-S9 系には MC1061 株を+S9 系には MM96 株を用い、結果は菌濃度で補正した各発光量を陰性対照の発光量で除した相対発光量で示した。試験は幅広い試料に反応しているが、+S9 系の方が相対発光量が 2 以上を示した試料が多かった。また、いくつかの試料では用量を高めてゆくと発光量が減少する傾向がみられた。

1-2-2 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、ここでは MM96 株を用いた最終検出濃度を評価値とし、抽出物投与量 1 μ L は元の試料水 1mL に相当する。ほぼ全ての試料について MRL 試験は反応していたが、処理プロセスにおける増減に一般的な傾向は見られなかった。また、高用量における反応の低下は焼却灰ほど顕著には見られなかった。

表-6 ごみ焼却灰の MRL 試験結果

Dose (g-ash as extract/5mL)	Relative Fluorecence							
	MC1061 (-S9)				MM96 (+S9)			
	0.07	0.22	0.67	1.6	0.07	0.22	0.67	1.6
A (bottom Ash)	1.02	0.99	2.01	1.26	1.67	1.74	1.41	1.18
A (Fly Ash)	0.93	1.02	0.86	1.09	1.48	2.06	1.66	1.29
B (bottom Ash)	0.75	0.96	0.76	1.07	2.43	1.10	2.50	1.26
B (Fly Ash)	1.13	0.78	0.85	0.98	1.84	1.06	0.96	1.45
C (Fly Ash)	1.93	2.32	1.88	1.57	1.34	2.18	1.46	1.83
D (bottom Ash)	1.02	1.09	1.14	1.03	1.49	1.93	1.88	1.23
D (Fly Ash)	1.51	2.43	2.12	1.01	1.52	2.26	1.71	1.25
E (bottom Ash + Fly Ash)	1.18	1.42	1.35	0.92	2.00	1.97	1.92	1.17
E (Fly Ash)	1.41	1.13	1.39	1.01	1.79	1.50	1.25	1.53
F (bottom Ash)	1.07	0.98	1.15	1.03	2.46	1.56	1.55	1.24
F (Fly Ash)	1.26	1.49	1.29	1.46	1.51	1.22	1.31	1.37
G (bottom Ash + Fly Ash)	1.52	1.53	1.49	0.90	1.11	1.98	1.77	1.46
G (Fly Ash)	0.77	0.90	1.07	0.98	1.67	1.73	1.39	1.20
H (Fly Ash)	1.06	1.23	1.37	1.06	1.95	1.30	2.20	1.02
I (Fly Ash)	1.93	2.32	1.88	-	1.61	2.00	2.12	-

表-7 最終処分場浸出水の MRL 試験結果

Sample	Minimum Detection Dose			
	+S9		-S9	
	MeOH Extract	AcOEt Extract	MeOH Extract	AcOEt Extract
K	uL/5mL	uL/5mL	uL/5mL	uL/5mL
Measuring Tank	N.E.	>100	N.E.	14.4
after Biological Treatment	>100	>100	83.3	49.3
after Coagulating Sedimentation	43.5	19.0	>100	30
after Sand Filtration	>100	32.8	41.5	91.9
Positive Control	umol/5mL	umol/5mL	umol/5mL	umol/5mL
1,8-DNP	707	268	69.5	190
B[a]P	316	146	-	-
MMC	-	-	0.00450	0.0093
L	uL/5mL	uL/5mL	uL/5mL	uL/5mL
Measuring Tank	>100	>100	56.3	32.9
after Biological Treatment	N.E.	>100	66.6	>100
after Coagulating Sedimentation	14.6	>100	12.9	18.0
after AC Absorption	>100	>100	>100	29.8
Positive Control	umol/5mL	umol/5mL	umol/5mL	umol/5mL
1,8-DNP	724	445	161	62.3
B[a]P	420	428	-	-
MMC	-	-	0.00841	0.00592
M	uL/5mL	uL/5mL	uL/5mL	uL/5mL
Measuring Tank	36.0	51.7	16.3	51.1
after 1st Coagulating Sedimentation	89.8	>100	48.5	>100
after Biological Treatment	50.8	76.2	49.7	>100
after 2nd Coagulating Sedimentation	>100	87.3	64.4	>100
after AC Absorption	>100	>100	74.5	>100
Positive Control	umol/5mL	umol/5mL	umol/5mL	umol/5mL
1,8-DNP	259	139	160	194
B[a]P	362	725	-	-
MMC	-	-	0.01154	0.01220

2. 魚類小核試験

2-1 標準品に対する応答

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-8 に示す。3 種の PAHs の中では 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。

表-8 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
Benzo[a]pyrene			
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
Benzo[b]fluoranthene			
5	0.25	0.25	6.00
10	0.75	0.25	7.50
Benzo[a]anthracene			
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)

陰性対照 (溶媒のみ) と陽性対照 (Mitomycin C) について繰り返し試験の結果を表-9 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。

表-9 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.

2-2 浸出水に対する応答

浸出水抽出物に対する応答はL施設およびM施設の原水 (それぞれ生物処理前および第一凝集沈殿前) に対して調べた。結果を表-10 に示す。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 Dose-Response が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。

D. 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、試行した経験が少ないため、試料について得られた応答の大きさやその差が意味するところ、また、試料に含まれる遺伝子毒性物質の同定までには至らない。したがって、ここでは手法を廃棄物試験に適用する上での問題点に着目してついて考察する。

表-10 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	
L				
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
M				
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)

1. 繰り返し精度

試験の結果を施設の機能評価または排出基準等、施設排出物の安全性に関する判断の材料に用いる場合には、得られた応答の信頼性が重要である。これを確認する試みとして、MRL 試験および魚類小核試験の標準品に対する繰り返し試験の結果を表-4、表-5、表-9 に示した。なお、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% 変動するとされている (USEPA, 1991)。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% という変動係数は指標として許容される範囲にあるといえる。一方、魚類小核試験では、標準品 (Mitomycin C) に対する評価値の変動係数は 40～60% 程度であるが、末梢赤血球を用いた評価で低頻度で自然発生する小核一例のため、陰性対照における評価値の変動係数が 200% となっている。えらを用いた評価では自然発生する小核の頻度は高いため、評価値の変動係数は 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いるため、変動を低減するために、細胞の観察数 (現在 2000 個程度) を増やす必要がある。

2. リファレンス物質

生物試験は、多くの場合、試験前の生物の履歴や遺伝形質、または試験の試行条件の違い等により応答が変動すると考えられるため、試験回ごとにブランク (陰性対照) 試験とスパン (陽性対照) 試験を行うことが必須である。また、環境試料を評価する際には陽性対照に用いる標準品は、対象とする試料に含まれる物質であるほうが、結果の評価のために都合が良い。このため、従来陽性対照として用いられてきた Mitomycin C 等の既知の高遺伝子毒性物質の他に、今回は市ごみを焼却した際の排ガス (飛灰) または残渣 (底灰) に含有されることが予想されるリファレンス候補物質として、Benzo[a]pyrene、1,8-Dinitropyrene を検討した。これらは、多環芳香族炭化水素類のうち前者が官能基の無いもの、後者がニトロ基を持つものである。MRL 試験に関しては、表-4、表-5 に示したように、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 を示していた。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-3 に示した MRL 試験における Chlorophenols への応答は重要である。

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-3、魚類小核試験について表-8 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。特に、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-6、表-7、表-10 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. 実試料に対する応答

MRL 試験および魚類小核試験ともに今回用いた焼却灰および浸出水に反応しており、これらが試料に含まれるなんらかの遺伝子毒性物質を検出していることは明らかである。ただし、遺伝子毒性試験における環境試料の評価で最大の妨害因子は、被験体（生物体）の他の機能への影響である。廃棄物試料には様々な有害物質が高濃度で含まれているため、試料からの目的成分の抽出が欠かせない。試料の前処理に用いた溶媒（酢酸エチルおよびメタノール）による抽出は、目的成分（芳香族炭化水素類）の分離の他に、主要な妨害因子である重金属等がある程度除去することを狙ったものでもあるが、MRL 試験の場合には表-6 に示した高用量における発光量の低下、または表-10 に示した魚類小核試験

における個体の死亡が生じている。これら試料中の妨害因子についての検討を進める必要がある。

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、陰性対照の発光量が発光量の測定操作中に安定していないため、陰性対照の検体数を増やして時間毎にチェックする必要があること、また発光量および菌濃度の測定が試験法に最適化されていない（手作業の部分が多い）ためやや煩雑なところがあり、試料の迅速なチェック法として用いるためにマイクロプレート法等を用いた試験操作のさらなる簡易化や迅速化を検討する必要がある。

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。曝露時間は長く、短期試験としてはデメリットであるが、現在の腹腔内への投与を、排水中での飼育による直接曝露にへ変えれば、排水の常時監視生物モニターとして有用と考えられる。操作上の最大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。なお、試験に用いた生物（コメット）は試験毎に市販店から購入したものであり、遺伝形質の一定した純系ではないことが憂慮されたが、表 9 に示す通り結果としては比較的安定した反応を示していた。

E. 結論

細菌を用いた DNA 損傷性試験である Modified Rec Lux (MRL) 試験および染色体異常試験である魚類を用いた小核試験について、標準物質ならびにごみ焼却灰、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有害物質に起因するリスク検知のツールとしての適用性について基礎的な検討を行った。

1) 両試験法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に匹敵する範囲にあった。

2) 両試験法のリファレンス物質として Benzo[a]pyrene、1,8-Dinitropyrene、Mitomycin C が妥当であると考えられた。

3) 両試験法はごみ燃焼由来の有害物質である芳香族系炭化水素類の評価に適用可能である。

4) 実試料に含まれる両試験の応答を妨害する因子について、更なる検討が必要である。

5) 試験操作のマイクロプレート化、画像解析の適用など簡易化および迅速化を図る必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

(なし)

2. 学会発表

(1) 山田正人、井上雄三、木苗直秀、小野芳朗、

吉野秀吉、市川 勇、田中 勝、廃棄物ライフサイクルにおける有害化学物質のリスク評価手法の開発(Ⅱ)、日本環境変異原学会第 27 回大会(大阪)、要旨集、155 (1998)

(2) 山田正人・井上雄三・大迫政浩・木苗直秀・小野芳朗・吉野秀吉・市川 勇・田中 勝、廃棄物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、第 6 回北海道大学衛生工学シンポジウム論文集、49-54 (1998)

(3) 山田正人・井上雄三・大迫政浩・木苗直秀・小野芳朗・吉野秀吉・市川 勇・田中 勝、廃棄物処理・処分システムのリスク管理における遺伝子毒性試験の適用、第 9 回廃棄物学会研究発表会講演論文集Ⅱ、1029-1031 (1998)

G. 知的所有権の取得状況

(なし)

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Ames 試験による標準物質および焼却灰、最終処分場浸出水の変異原性

神奈川県環境科学センター 環境工学部 吉野秀吉

研究要旨

標準物質の Ames 試験への適用性、および焼却灰、浸出水の変異原性特性や含まれる変異原性物質について検討した。1,8-dinitropyrene は TA98 および TA100 の直接変異原性 (-S9)、Benzo[a]pyrene は間接変異原性 (+S9) の陽性対照物質として適正と考えられ、試験結果のばらつきをさらに小さくするためには、プレート数を増加させるなどの対策が必要であることがわかった。都市ごみ焼却施設の飛灰とそれを埋め立てる埋立地からの浸出水では異なる変異原性物質が含まれ、前者はニトロ化合物、後者は塩素化合物の影響を受けていることが推定された。さらに、これらの試料には、架橋型の遺伝子変異を起こす変異原性物質は極めて少ないと推定された。

A. 研究目的

いろいろな生物アッセイに共通して使える陽性対照物質を検索するために、Ames 試験による標準物質の Dose-response カーブや変異原性の陽性判定基準を越える最小容量、試験のばらつきなどを調べ、標準物質の陽性対照物質として適用性の検討を行った。また、焼却灰抽出液や浸出水の変異原性の実態や特性を把握するとともに Ames 試験に用いるいろいろな菌株間の変異原性の関係を比較検討した。

B. 研究方法

1. Ames 試験の概要と操作

1-1 試験の概要

エームス試験は、サルモネラ菌を用いた変異原性試験である。この菌は、ヒスチジンと呼ばれるアミノ酸を作るための遺伝子が欠損している特殊な性質を持つ。したがって、酵素などの蛋白質が合成できず、自然界では、菌は生存し、増殖することができない。しかし、化学物質がサルモネラ菌の体内に進入して遺伝子に作用した場合、遺伝子に突然変異を起こさせ、ヒスチ

ジンの合成ができるもとの正常な遺伝子に戻ることがある。これを利用して、化学物質の変異原性を調べることができる。遺伝子に突然変異を起こさせる化学物質を変異原性物質と呼ぶ。変異原性強度は、サルモネラ菌が増殖して形成する復帰コロニー数で判定できる。

Ames 試験に用いる菌には遺伝子に与える変異の仕方により分類され、TA92、TA94、TA98、TA100、TA1535、TA1538 などの種類がある。このうち TA98、TA1538 は、ヒスチジン合成遺伝子に対する塩基対置換型と呼ばれる遺伝子変異の活性をもち、TA100、TA1538 は同様にフレームシフト型と呼ばれる遺伝子変異の活性をもち、TA92、TA94 は、架橋型の遺伝子変異をもつ。また、ニトロ化合物に感受性の高い YG 株には、TA98 株から作成された YG1021、YG1024 と TA100 から作成された YG1026、YG1029 がある。これらの菌株のうち、本研究では、TA98、TA100、TA92、TA94、YG1021、YG1024、YG1026 の 7 種類を用いる。

化学物質には直接、菌に作用して変異原性を示す直接変異原性物質と、生体内の代謝により活性化して菌に作用する間接変異原性物質とが

ある。

間接変異原性物質の試験は、代謝活性化剤 S9mix (ラットの腹腔内にフェノバルビタールを投与して、薬物の代謝酵素系を誘導した肝臓のホモジネート(S9)を補助因子(コファクター)に添加したもの)を加えて行い(+S9と表示)、直接変異原物質の試験には、S9mixの代わりに10mMのリン酸緩衝液を用いる(-S9と表示)。

エームス試験には、プレート法とプレインキュベーション法とがある。プレート法は化学物質(試料を含む)と菌を混合した後、すぐに培養する方法であり、プレインキュベーション法は、検出感度を上げるために化学物質と菌を混合して、37℃、20分間反応した後培養する方法である。本研究では、直接変異原性(-S9)、間接変異原性(+S9)試験の両方を行い、また簡易で、供雑物による毒性阻害(killing)の少ないプレート法を用いた。

1-2 試験操作

試験に使われる試薬類は、最少グルコース寒天培地(グルコース、無機成分から構成)とS9mix、リン酸緩衝液、陽性対照物質、陰性対照物質、微量のヒスチジンを含むトップアガー(1/2濃度の寒天溶液)である。陽性対照物質は、TA98およびTA100、TA92およびTA94、YG1021およびYG1024およびYG1026の-S9の場合には、それぞれ4-ニトロキノリン-1-オキシド(4NQO)、マイトマイシンC(MMC)、1,6-dinitropyrene、+S9の場合には2-アミノアントラセン(2AA)、2AA、Trp-P-2、陰性対照物質は、試料の溶剤として用いているジメチルスルホキシド(DMSO)である。試験を始める前に菌を培養するための最少グルコース寒天培地を作成しておく必要がある。

操作は、試験管に一定量の試料または陽性対照物質または陰性対照物質を入れ、それぞれにリン酸緩衝液またはS9mixを加え、トップアガーを加えた後、攪拌混合して、作成しておいた最少グルコース寒天培地に一様に広げる。凝固したら、寒天部分を上にして48時間、37℃で培養する。培養後、復帰コロニー数を数える。

試料の変異原性は、このコロニー数を算定し、

陰性対照物質の復帰コロニー数(revertant)を差し引いた後、試料量あたりの正味復帰コロニー数(net revertant)として表す。試料のコロニー数の陰性対照のコロニー数に対する比率をMR(Mutagenic ratio: 変異原性比)値といい、この値が1.5以下の場合には、測定の際につき内で変異原性はないとみなし、1.5-2.0は不明確な変異原性、2.0以上において変異原性があるとみなす。

2. 実験方法

2-1 試料

標準物質: 1,8-dinitropyrene, Benzo(a)pyrene (BaP)、Mitomycin-C (MMC)

焼却灰: E施設、F施設、G施設の飛灰および残灰、H施設、I施設の飛灰

浸出水: E施設の原水、処理水、放流水、J施設の原水、放流水、A施設の原水、処理水、溜水、滅菌処理水

2-2 Ames試験用試料の作成

標準物質はDMSOに溶解して用いた。

焼却灰は、50mlねじ口付き遠沈管に5g取り、30mlの酢酸エチルを加えて10分間の振とう抽出を行い、3000rpm、10分間の遠心分離後、上澄20mlを採取する。新しい酢酸エチルを20ml加えて抽出する操作をさらに2回繰り返して得られた抽出液を濃縮し、窒素ガスパージによって酢酸エチルを除去した後、5mlのDMSOに再溶解してAmes試験に用いた。また別に焼却灰5gにDMSO30mlを加えて上記の抽出操作を1回または2回繰り返して得られたDMSO抽出液をAmes試験に用いた。

浸出水は、静岡県立大学および国立公衆衛生院から分与されたものを用いた。これはXAD樹脂で吸着した物質を酢酸エチルおよびメタノールで抽出した濃縮試料である。

C. 研究結果

1. 標準物質の変異原性

1,8-dinitropyreneのTA98およびTA100の-S9の変異原性は、非常に高く、表1に示したようにDose-responseカーブはほぼ直線の関係を示した。

この場合、表 1 に示したように陽性判定基準を越える最小用量（MR 値が 2 となるときのプレートあたりの化学物質の添加量）は 0.1ng が推定された。TA98 および TA100 の+S9 では、Dose-response カーブは下に凸のカーブを描く傾向を示した。この場合の陽性判定基準を越える最小用量は 0.1 μ g が推定された。Benzo(a)pyrene (BaP) は、TA98、

TA100 とともに+S9 にのみ変異原性が認められた。Dose-response カーブは、やや上に凸の傾向を示し、菌に対する毒性（killing）を示している。陽性判定基準を越える最小用量は、TA98 と TA100 の場合で異なり、TA98 では 2 μ g、TA100 では 0.5 μ g が推定された。

表 1 Ames 試験による試料および標準物質の復帰コロニー数

試料	TA98 (net revertant)						TA100 (net revertant)					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
測定回数	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
E 施設 (飛灰)												
飛灰 0.1g	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	-
飛灰 0.2g	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	-
I 施設												
飛灰 0.05g	69	44	-	73	86	-	92	80	-	228	234	-
飛灰 0.1g	66	93	-	174	194	-	107	87	-	529	498	-
飛灰 0.2g	103	-	-	395	-	-	159	-	-	1053	-	-
E 施設 (原水)												
酢酸エチル抽出 0.68L-水	N.D.	-	-	32	-	-	N.D.	-	-	113	-	-
1.36L-水	N.D.	-	-	76	-	-	N.D.	-	-	64	-	-
メタノール抽出 0.25L-水	N.D.	-	-	103	-	-	N.D.	-	-	N.D.	-	-
0.50L-水	N.D.	-	-	3	-	-	N.D.	-	-	N.D.	-	-
1.8-dinitropyrene												
0.001 μ g	425	525	370	-	-	-	-	197	132	-	-	-
0.002 μ g	852	1000	785	-	-	-	-	338	248	-	-	-
0.004 μ g	1458	-	1342	-	-	-	-	-	534	-	-	-
1.8-dinitropyrene												
0.05 μ g	-	-	-	39	-	-	-	-	-	39	-	-
0.1 μ g	-	-	-	189	160	284	-	-	-	118	144	111
0.2 μ g	-	-	-	1389	976	-	-	-	-	592	422	-
Benzo[a]pyrene												
1 μ g	-	-	-	26	26	90	-	-	-	206	203	243
2 μ g	-	-	-	60	49	60	-	-	-	368	298	424
4 μ g	-	-	-	98	-	95	-	-	-	560	-	692
陰性対照 (DMSO 100 μ L)	24	28	32	50	53	58	100	143	120	110	124	123
陰性対照												
4NQO 1 μ g	1080	914	1362	-	-	-	18580	13600	16860	-	-	-
2AA 1 μ g	-	-	-	316	336	248	-	-	-	720	804	730

N.D. : MR 値が 1.5 以下の場合、- : 試験未実施

2. 焼却灰および浸出水の変異原性

5 カ所の都市ごみ焼却施設から排出された飛灰および残灰の TA98 および TA100 を用いた Ames 試験の結果、表 2 に示したように E 施設の飛灰に TA100+S9 の低い変異原性が認められた。また、I 施設の飛灰にはすべての場合に変異原性が認

められ、とくに TA100+S9 に高い変異原性が認められた。

E 施設および J 施設の浸出水は、表 3 に示したように E 施設の原水のみ TA98+S9 の変異原性が認められた。

表2 焼却灰の TA98、TA100 の Ames 変異原性

試料	TA98 (net rev./g)		TA100 (net rev./g)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
E施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D. (480) {238mg}
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
H施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
I施設				
飛灰	(2200) 660 {36mg}	(1400) 1740 {29mg}	[(4400)] 1700 {101mg}	(4900) 5290 {22mg}

(): 試料 5g に 30mL の DMSO を加えて振とうした場合、[] : MR 値が^a 1.5-2.0 の場合、
 { } : 最小検出濃度

表3 浸出水の TA98、TA100 の変異原性

試料	TA98 (net rev./L-水)		TA100 (net rev./L-水)		
	-S9	+S9	-S9	+S9	
E施設					
原水	(酢酸エチル抽出)	N.D.	[47]	N.D.	[76]
	(メタノール抽出)	N.D.	223	N.D.	N.D.
処理水	(酢酸エチル抽出)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	(メタノール抽出)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
放流水	(酢酸エチル抽出)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	(メタノール抽出)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
寄居					
原水	(酢酸エチル抽出)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	(メタノール抽出)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
放流水	(酢酸エチル抽出)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	(メタノール抽出)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

[] : MR 値が 1.5-2.0 の場合

3. いろいろな菌株による焼却灰および浸出水の変異原性の比較

3-1 焼却灰

菌株は、TA98、TA100 以外に TA92、TA94、YG1021、YG1024、YG1026 を用いて E 施設、F 施設、G 施設、H 施設、I 施設からの飛灰および残灰の変異原性を比較した。表 4 に示したように E 施設の飛灰では TA98 には変異原性が認められず、TA100+S9 のみに弱い変異原性が認められた。一方、YG1021、YG1024 では -S9 にも変異原性が認められ、I 施設の飛灰では、TA98、TA100、YG1021、YG1024、YG1026 のすべてに変異原性が認められ、-S9 より +S9 の方が高い傾向を示した。表 5 に示したように TA92、TA94 ではいず

れの施設からも変異原性は認められなかった。表 2、4 に示した最小検出用量は、MR 値が 2 となるときのプレートあたりの焼却灰の添加量として式(1)から求めた。

[焼却灰の最小検出用量] =

$$\frac{[\text{陰性対照の復帰コロニー数 (rev/plate)}]}{[\text{焼却灰 g あたりの復帰コロニー数から陰性対照の復帰コロニー数を差し引いた正味復帰コロニー数 (net rev./g)}]} \quad \dots \text{式 (1)}$$

この値は、小さいほど変異原性強度が高いことを示す。

表4 焼却灰の YG1021、YG1024、YG1026 の Ames 変異原性

試料	YG1021 (net rev./g)		YG1024 (net rev./g)		YG1026 (net rev./g)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
E 施設						
飛灰	165 {200mg}	N.D.	380 {71mg}	N.D.	N.D.	N.D.
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F 施設						
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G 施設						
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
H 施設						
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
I 施設						
飛灰	7160 {5mg}	13830 {4mg}	11720 {2mg}	17970 {8mg}	3890 {36mg}	9180 {20mg}

{ } : 最小検出濃度

表5 焼却灰の TA92、TA94 の Ames 変異原性

試料	TA92 (net rev./g)		TA94 (net rev./g)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
E 施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F 施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G 施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
残灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
H 施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
I 施設				
飛灰	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

3-2 浸出水

A 施設の浸出水（原水、処理水、溜水、滅菌処理水）について TA98、TA100、TA92、TA94、YG1021、YG1024、YG1026 を用いて変異変性の比較を行った。

浸出水については、原水のメタノール抽出液では、表6、7に示したように TA100、YG1024、YG1026 の-S9 に変異原性が認められた。

最小検出用量は、焼却灰の場合と同様に式(2)から求めた。

$$[\text{浸出水の最小検出用量}] = \frac{[\text{陰性対照の復帰コロニー数 (rev/plate)}]}{[\text{浸出水 L あたりの復帰コロニー数から陰性対照の復帰コロニー数を差し引いた正味復帰コロニー数 (net rev./L)}]}$$

… 式(2)

原水の最小検出用量は、YG1026 でやや大きい、TA100 および YG1024 ではやや小さくほとんど同程度であることから、ニトロ化合物がとくに多く含まれているとは考えられなかった。

滅菌処理水については、酢酸エチル抽出液およびメタノール抽出液の TA98 および TA100 の-S9 でかなり高い変異原性が認められた。TA100-S9 の変異原性が塩素滅菌による塩素化合物の生成が塩素滅菌による塩素化合物の生成によることが明らかになっており、TA98-S9 についても同様

に塩素化合物によることが推定された。最小検出用量は、メタノール抽出液の TA98-S9 では低く、したがって変異原性強度は高いと思われるが、TA98 の酢酸エチル抽出液や TA100 の酢酸エチルおよびメタノール抽出液の間では大きな差

は認められなかった。一方、YG 株では YG1026 の酢酸エチル抽出液のみに変異原性が認められた。最小検出用量は、比較的小さかった。

表 6 A施設浸出水の TA98、TA100 の Ames 変異原性

試料	TA98 (net rev./L-水)		TA100 (net rev./L-水)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
浸出水 (原水)				
酢酸エチル抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メタノール抽出物	N.D.	N.D.	980 {160mL}	N.D.
浸出水 (処理水)				
酢酸エチル抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メタノール抽出物	N.D.	N.D.		N.D.
浸出水 (溜水)				
酢酸エチル抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メタノール抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
浸出水 (滅菌処理水)				
酢酸エチル抽出物	812 {40mL}	N.D.	15500 {10mL}	N.D.
メタノール抽出物	58000 {1mL}	N.D.	10000 {15mL}	N.D.

{ } : 最小検出濃度

表 7 A施設浸出水の YG1021、YG1024、YG1026 の Ames 変異原性

試料	YG1021 (net rev./L-水)		YG1024 (net rev./L-水)		YG1026 (net rev./L-水)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
浸出水 (原水)						
酢酸エチル抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メタノール抽出物	N.D.	N.D.	190 {170mL}	N.D.	280 {550mL}	N.D.
浸出水 (処理水)						
酢酸エチル抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メタノール抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
浸出水 (溜水)						
酢酸エチル抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メタノール抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
浸出水 (滅菌処理水)						
酢酸エチル抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6400n {22mL}	N.D.
メタノール抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

{ } : 最小検出濃度