

表 8 に示したように TA92 および TA94 を用いた試験では、変異原性は全く認められなかった。

表 8 A施設浸出水の TA92、TA94 の Ames 変異原性

試料	TA92 (net rev./g)		TA94 (net rev./g)	
	-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.	N.D.	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.	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	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メタノール抽出物	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

#### D. 考察

標準物質の陽性対照物質としての適用性について、1,8-dinitropyrene は陽性対照物質としての使用に問題はないが、+S9 では Dose-response カーブが直線性を示さないため陽性対照物質として適用性がより低いと考えられた。BaP は、低濃度側で Dose-response カーブが直線性を示すと予想され、+S9 の陽性対照物質として適用性があると考えられた。マイトマイシン C (MMC) は、架橋型の遺伝子変異に感受性の高い TA92 や TA94 の -S9 に変異原性を示ものであり、TA98 および TA100 には適当ではない。複数回のアッセイによるばらつきは、Ames 試験の場合は ±20% といわれている。表 1 にした試験結果のばらつきについてはこの範囲内であったが、操作ミスと思われる数値もあることから、さらにプレート数を増やして測定誤差を小さくすることも考えなければならない。

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)、焼却飛灰には TA100+S9 に

変異原性を示す物質が多い BaP などの多環芳香族炭化水素類 (PAHs) が含まれることが推定された。一方、浸出水 (原水) では TA98+S9 に変異原性が認められ、含まれる変異原性物質は、焼却灰に含まれるものとは異なることが推定された (表 3)。一般に滅菌処理水には高い変異原性が認められるが、その他の原水や処理水には認められないことが多い。試験液は、濃縮倍率が高く、濃度の高い試料が得られたために検出されやすくなったと考えられる。

表 2 および 4 に示した最小検出用量では、TA98 と TA98 系の YG1021、YG1024、TA100 と TA100 系の YG1026 を比較しても YG 株の場合の方が小さく、変異原性強度が高いことから、飛灰の変異原性が PAHs などのニトロ化合物に影響されていることが推定された。表 3、6 および 7 に示したように、浸出水では変異原性物質として、TA100+S9 に変異原性を示すことが多い PAHs は少なく、-S9 に感受性を示す変異原性物質が溶解していると考えられた。ここで大きく影響するのは、塩素滅菌処理により生成される塩素化

物であると考えられた。また、表 8 により架橋型の遺伝子変異を起こす変異原性物質は、浸出水中には極めて少ないと考えられた。

#### E. 結論

標準物質の Ames 試験への適用性や焼却灰、浸出水の変異原性特性や変異原性物質について検討したところ、以下のことが明らかとなった。

(1) 1,8-dinitropyrene の TA98 および TA100 の直接変異原性 (-S9) は、Dose-response カーブが直線性を示し、陽性対照物質として適正と考えられた。

(2) BaP の TA98 および TA100 の間接変異原性 (+S9) は、Dose-response カーブが直線性を示すことが予想されるため、陽性対照物質として適正と考えられた。

(3) Ames 試験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。

(4) 5 カ所の都市ごみ焼却施設のうち 2 カ所の飛灰から TA100+S9 の変異原性が認められ、PAHs などの生成が推定された。

(5) (4) と同じ施設の焼却灰埋立地からの浸出には焼却灰とは異なる TA98+S9 の変異原性が認められたことから、焼却灰とは異なる変異原性物質が浸出水中に含まれることが推定された。

(6) TA 株と YG 株による変異原性の比較から、飛灰の変異原性が PAHs などのニトロ化合物の影響を受けていることが推定された。

(7) TA 株と YG 株による変異原性の比較から、A 施設の浸出水の変異原性物質が PAHs とは異なる

り、とくに滅菌処理水に含まれる変異原性物質は塩素化合物であると推定された。

(8) TA92 および TA94 による変異原性は、焼却灰および浸出水にも認められないことから、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。

#### 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

廃棄物試料のエストロジェン性・遺伝毒性評価

分担研究者 小野芳朗 岡山大学環境理工学部助教授

研究要旨

廃棄物焼却場の飛灰、底灰、及び最終処分場の浸出水に関して、その抽出物をニトロアレーンにかかわる遺伝子毒性試験、およびヒト乳癌細胞を用いたエストロジェン性を評価した。その結果、いくつかの飛灰にはとくに電気集塵機灰に高い遺伝子毒性が、また浸出水の処理されたものの塩素消毒水に時折、たかい遺伝子毒性とエストロジェン性が検出された。

A 研究目的

廃棄物焼却灰、および浸出水試料に遺伝子毒性とエストロジェン性試験を適用することにより、その適用性を評価するとともに、廃棄物試料のリスク評価とモニタリング、あるいは早期警戒システム構築のための毒性試験ツールの一端を担うことである。

B 研究方法

1. ヒト乳癌細胞 MCF-7 細胞

1-1 培養と保存

1-1-1 細胞と培養条件

ヒト乳ガン細胞（MCF-7、ATCC #HTB22）は、国立医薬品食品研究所より提供された。維持培養として、25cm<sup>2</sup> のフラスコで E-MEM 培地 [滅菌済みミリ Q 水 90mL に E-MEM 粉末培地 0.953g、NEAA（NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS）1mL、ピルビン酸ナトリウム 1mL（すべて ICN Biomedicals, Inc）、カナマイシン（和光純薬）0.1g、8% NaHCO<sub>3</sub> 1.5mL、10% FBS（Biosciences PTY LTD.）を添加したもの] 内で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下でインキュベーターで培養した。

1-1-2 継代培養

①新しい E-MEM 培地を 0.45μm のフィルターで濾過しながらフラスコに注入しておき、MCF-7 細胞の生育している培養フラスコから

古い培地を除き、乾熱滅菌済みのピーカーに入れる。

②フラスコ内をリン酸緩衝液 [PBS(-) pH 7.3] で洗浄した後、0.25%トリプシン溶液 (2.5%トリプシン (ICN Biomedicals, Inc.) 10 倍 PBS(-):EDTA (ICN Biomedicals Inc) =1:1:10 で作成し、-20℃で保存しておいたもの) を添加し、2~3 分置いた後、古い培地を加えてトリプシンの反応を止める。

③②を数回ピペッティングした後、15mL スピッツに懸濁液を移し、1000ppm で 5 分間遠心分離する。

④③の上澄みの古い培地を除き、新しい E-MEM 培地を加えてピペッティングした後、ヘパトメーターで 1mL 中の細胞数を計数し、細胞濃度が 1×10<sup>4</sup> cell となるように調整して①の培養フラスコに加えて、37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下でインキュベーターで培養する。

1-1-3 保存

①MCF-7 細胞の生育している培養フラスコから古い培地を除き、乾熱滅菌済みのピーカーに入れる。

②フラスコ内を PBS(-) で洗浄した後、0.25%トリプシン溶液を添加し、2~3 分置いた後、古い培地を加えてトリプシンの反応を止める。

③②を数回ピペッティングした後、15mL スピッツに懸濁液を移し、1000ppm で 5 分間遠心

分離にする。

④③の上澄みの古い培地を除き、PBS(-)を加えてピペティングした後、1mL 中の細胞数をヘパトメーターで計数して再び 1000ppm で 5 分間遠心分離する。

⑤④の上澄みの PBS(-)を除き、細胞濃度が  $1 \times 10^4$  cells/mL となるようにセルパンカー(日本全薬)を加えてピペティングした後 1mL ずつセラムチューブに分注し、-80℃で保存する。

## 1-2 エストロジェン性評価

### 1-2-1 前培養

96 穴マイクロプレートに E-MEM 培地を注入し、E-MEM 培地中に MCF-7 細胞を懸濁したものを、1well あたり約  $1 \times 10^4$  cells の細胞濃度になるように分注した。これを 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養し、着床させた。

### 1-2-2 FBS のホルモン除去 (GA 処理)

通常の FBS には性ステロイドホルモンが含まれるため、これを添加した培地では各試料のエストロジェン性が正確に評価できない。よって、実験用培地のために FBS 中の女性ホルモン除去を以下の手順で行った。

- ① FBS を 55℃で 30 分間熱非動化する。
- ② スピッツ中に FBS と和光活性炭 (No.034-02125) を 0.5g/10mL 加えて 3 時間低温攪拌する。
- ③ 和光活性炭を除き、続いて BIO-RAD AG1×-

8 ( No.140-1441;Bio-Rad Laboratories ) を 0.5g/10mL 加えて 48 時間低温攪拌する。

④③を遠心分離して BIO-RAD AG1×-8 を除いた後、5μm と 0.22μm のフィルターで濾過する。これを 10mL ずつ分注し、使用の直前まで -20℃で保存した。

Soto et al. の E-スクリーン Test で行なった類似の実験によれば、血清中の性ステロイドホルモンのうち、99%が除去された。また、処理後の E<sub>2</sub> (17-β エストラジオール) レベルは放射線免疫検定法の測定によると 0.01pg/mL 以下となった。

### 1-2-3 実験用培地

pH のインジケーターとして E-MEM 培地中に含まれるフェノールレッドには 25μL でエストロジェン性があると報告されているため、実験用培地には滅菌済みミリQ水にフェノールレッドフリーのオートパウ MEM (大日本製薬) 0.953 g、カナマイシン 0.01 g、8%NaHCO<sub>3</sub> 1.5mL、NEAA 1 mL、ピルビン酸ナトリウム 1mL、グルタミン酸ナトリウム (Icn Biomedical Inc.) 1mL、GA 処理済み FBS 10mL を加えたものを用いた。

### 1-2-4 試料投入とマイクロプレートリーダーでの計測

各試料の希釈列(10<sup>-1</sup>~10<sup>-10</sup> 倍)を作成しておき、MCF-7 細胞を前培養した 96 穴マイクロプレートから E-MEM 培地を除いて PBS で洗浄した。ここに実験用のオートパウ MEM 培地を 90μL/well

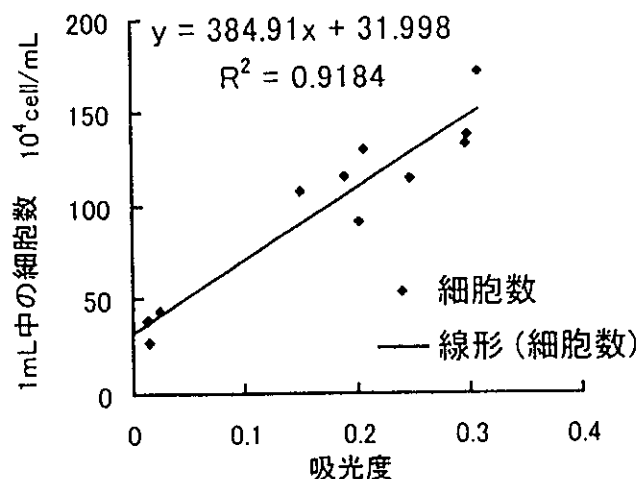


図-1 alamarBlue による吸光度と細胞数の検量線

ずつ注入し、そこに試料の各希釈列を 10  $\mu$ L ずつ注入して 100  $\mu$ L とした。また、ポジティブコントロールとして、 $10^{-7}$ M の 17- $\beta$  エストラジオール (E<sub>2</sub>) の列を 1 列と、ネガティブコントロールとしてサンプル濃度 0mg/ml のものを 1 列作成した。さらに、各列ともブランク (alamarBlue を加えない well 列) を作成し、これを 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下でインキュベーター内で 6 日間培養し、6 日目に alamarBlue (和光純薬) を 1well につき 10  $\mu$ L ずつ加え、同条件下で 4 時間おき、この時の吸光度をマイクロプレートリーダーで計測した。

#### 1-2-5 吸光度による細胞数の算出

alamarBlue は細胞の呼吸、代謝による還元作用によって、青 (酸化状態) から、赤 (還元状態) へと変色する。この性質を用いて、吸光度を測定することによって細胞増殖を定量的に算出することができる。

well 内の細胞数の算出には、alamarBlue (和光純薬) を培地の 10% 加えて 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間培養した時の吸光度を、実験より得られた検量線により細胞数に換算した。この実験は、マイクロプレートリーダーで計測した well ごとの吸光度 (波長 570nm の吸光度を波長 595nm のリファレンスで計測) とマニュアルで計数した細胞数との間の検量線を求めたものである。この検量線は次式で表される。(図-1 参照)

$$\begin{aligned} \langle \text{細胞数}(10^4 \text{cells/ml}) \rangle = \\ 384.91 \times \langle \text{吸光度} \rangle + 31.998 \quad (R^2 \\ = 0.9184) \end{aligned}$$

また、この吸光度は、計測値から各列のブランクの吸光度を引いたものである。

## 2 遺伝毒性試験

### 2-1 原理

*umu*-test は、化学物質により DNA が損傷した際、応急的に DNA 合成の遅延を回避するため、ギャップをでたらめな塩基で埋める SOS 修復と呼ばれる修復機構を生体は備えているが、この誤

りがちの修復を行う *umuDC* 遺伝子の誘発を測定する遺伝毒性試験である。これは *umuDC* 遺伝子にラクトースオペロンの 1 つである *lacZ* 遺伝子を融合させた *umuCi-lacZ* 融合遺伝子を乗せたプラスミド *pSK1002* を作成し *Salmonella typhimurium* TA1535 に挿入した試験菌株を親株とする。液体培地中で検体を投与し培養反応させた後、菌体内で発現した *umuDC* 遺伝子を *lacZ* の産生する  $\beta$ -galactosidase 活性で測定し、遺伝毒性の指標とする。最近では、Ames の種類の株にこのプラスミドを導入した特定の物質に対する高感度株も作成されている。

本研究ではニトロ化合物の遺伝毒性の検出に芳香族ニトロ化合物に高感受性を持つ菌株である *S. typhimurium* NM3009 と、それに対して感受性が低い株 NM1000 を用いた *umu*-test を適用した。NM3009 は nitroreductase を多量に誘発でき、もし試料中にニトロ化合物が存在すると、S9-下でニトロ還元酵素によるアミノ化により毒性が検出できる。逆に NM1000 はニトロ還元酵素を持たない。したがって、両者の毒性の差は、ニトロ化合物による毒性を表現していることになる。

### 2-2 試験方法

#### 1 日目 (準備)

① 本研究で使用する試験株 NM3009 及び NM1000 を培養するための LB 培地 (バクトクリプトン 1g、NaCl 《和光純薬、特級》 0.5g、酵母エキス 0.5g、蒸留水 90mL) と TGA 培地 (バクトクリプトン 3g、NaCl 1.5g、グルコース 《和光純薬、特級》 0.6g、蒸留水 270mL) を各 2 個ずつ作成し、試験で使用するマイクロチップ、注射器、とともに高圧蒸気滅菌する。また、試験で使用する試験管、ビベット等も乾熱滅菌しておく。

② 高圧蒸気滅菌後、培地が 37°C 前後になれば一方の LB 培地にはアンピシリン (和光純薬、生化学用) 溶液 (20mg/100mL) を他方の LB 培地にはクロラムフェニコル (和光純薬、生化学用) 溶液 (アンピシリン 10mg、クロラムフェニコル 10mg/100mL) を 10mL 入れ、その後菌株 (NM3009 および NM1000) を植菌する。

③37℃の恒温培養器において145rpmで振とうしながら、12～16時間の菌の前培養を行う。

## 2日目

①アンピシリン溶液およびクロラムフェニコール溶液30mLを加えたTGA培地に前培養したLB培地の菌液を6～10mL注入し、TGA培地のOD<sub>600</sub>を吸光度計でモニタリングしながら、投与操作の前後の平均が約2.0になるまで37℃、145rpmで振とうする。この振とうの間にZ-buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O《和光純薬 特級》 1.23 g、Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>《和光純薬 特級》 1.71 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O《和光純薬 特級》 0.05 g、KCl《和光純薬 特級》 0.15 g、蒸留水200ml、使用直前に2-melcaptoethanol《和光純薬 1級》 0.78mL)、2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (和光純薬 特級) /Naリン酸buffer (2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 100 mg、Naリン酸buffer25mL)、さらに対象サンプルの希釈列 (1/3倍、1/9倍、1/27、1/81、1/243倍をDMSOで作成) を作成しておく。

②サンプル数だけの新しい試験管に振とう後の菌液2.4mLを分注器で分注し、Naリン酸buffer0.5mLを加え、これらにあらかじめ希釈列を作成しておいた各サンプルとPC (ポジティブコントロール)、NC (ネガティブコントロール) 0.1mLを加え、37℃、145rpmで、さらに2時間振とうする。PCは1-nitrotyrene 1 mg/L、NCは、DMSOとする。

③2時間後、新しい試験管に②で振とうした菌液0.2mL (残りの菌液2.8mlは、方法⑤参考) それぞれ移し、これらにZ-buffer1.8mL、トデシル硫酸ナトリウム0.05mL、クロロホルム (和光純薬 特級) 0.01mLを加えた後、約5秒間ボルテックスミキサーにかけ、細菌の細胞膜を破壊する。

④ここで2-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideをそれぞれに0.4mLずつ加え、37℃で15分間静置しておく。

⑤この15分間に方法③での残りの菌液2.8mLのOD<sub>600</sub>を吸光度計で測定する。

⑥15分静置した方法④の菌液に1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を

1mLずつ加え、β-galactosidase活性反応を停止させた後、吸光度計でOD<sub>420</sub>とOD<sub>550</sub>を測定する。

## 計算式

酸素活性の測定法、単位の計算式は、Miller (1972) により以下のように与えられている。

$$\beta\text{-galactosidase(units)} = \frac{1000 \cdot (\text{OD}_{420} - 1.75 \cdot \text{OD}_{550})}{t \cdot v \cdot \text{OD}_{600}}$$

OD<sub>600</sub>: 600nmでの吸光度 (=菌体濃度)

OD<sub>420</sub>: 420 nmでの吸光度 (=2-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideによる発色)

OD<sub>550</sub>: 550 nmでの吸光度 (=破碎細胞片による散乱)

t: 酵素β-galactosidaseと基質2-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideの反応時間 (秒)

v: 菌液の希釈倍率

遺伝毒性の指標は、β-galactosidase活性値より溶媒対象の活性値を引いた値とする。

## 3. サンプルの調整

### 3-1 廃棄物最終処分場浸出水試料

本研究で使用した処理場浸出水は、ODS カラム (Sep-pak C<sub>18</sub>) で濃縮後メタノール (和光純薬、特級) と酢酸エチルで脱着し、DMSO 置換した。各操作について以下に示す。

①マイクロチューブポンプ装置を用いて、蒸留水 20mL、メタノール 30mL、蒸留水 20mL、酢酸エチル 30ml の順に 5mL/min の速度でそれぞれ ODS カラムに通し、カラムを予洗した後、対象サンプルを 20mL/min の速度で通し、吸着させる。その後、蒸留水 20mL を 5mL/min の速度で通し、カラムを洗浄する。

②吸着させたカラムにメタノール 100mL を 5mL/min の速度で通し脱着を行なう。

③同様に酢酸エチル 100mL を 5mL/min の速度の速度で通し、脱着を行う。

④脱着液を定量済みのナス型フラスコにそれぞれ入れ、ロータリーエバポレーターでメタノールと酢酸エチルを蒸発させる。

⑤蒸発し終えたナス型フラスコを乾燥機

(105℃)で完全乾固し重量を定量する。

→蒸発残留物の重量の定量化完了

⑥定量後、DMSO(和光純薬)3mLを加えて蒸発残留物を再溶解し、実験に試供する。

### 3-2 焼却場の灰の抽出法

#### 3-2-1 酢酸エチルによる固形物からの抽出

振り分け試験を行った後、75μm以下の試料を以下の手順で抽出した。

①試料 20gに酢酸エチルを 30mL 加え、5 分間ホモジナイズを行う。

②2000rpmで5分間遠心分離機にかける。

③②の上清を 20mL 採取する。

④①②の操作をもう一度繰り返し行い、上清を 40mL 採取する。

⑤採取した上清を混合し、定量済みのナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターで酢酸エチルを蒸発させる。

⑥⑤蒸発し終えたナス型フラスコを乾燥機(105℃)で完全乾固し重量を定量する。

→蒸発残留物の重量の定量化完了

⑦定量後、DMSO 3 mL を加えて蒸発残留物を再実験に試供する。

#### 3-2-2 固形物の水溶出

環境庁告示第13号に基づき溶出させた

①常温において40gの試料を400mLの蒸留水に入れ、振とう機で6時間振とうさせる。

(注) 球塊または粒状のものは粉碎し粉末状にしてから振とうさせる

②6時間後、振とう器から取り出し、静置して溶質を沈殿させる。

③GS-25のろ紙でろ過し、液体はSep-pak、固体は酢酸エチル抽出を行う

《Sep-pak》

①Sep-pakは、2環以下の多環性芳香族を選択的に吸着するカラム通水法である。濃縮方法はマイクロチューブポンプ装置を用いて、蒸留水20mL、メタノール(和光純薬、特級)30mL、再び蒸留水30mLの順に5mL/minの速度でそれぞれカラム(PLUS<sub>C18</sub> ENV.)に通し、カラムを予洗した後、対象サンプルの溶出液400mLを20mL/minの速度でカラム

に通し、吸着させる。蒸留水20mLを5mL/minの速度で通し、カラムを洗浄する。

②吸着させたカラムにメタノール100mLを5mL/minの速度で通し脱着を行う。

③定量済みのナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターでメタノールを蒸発させる。

④蒸発させ終わったナス型フラスコを乾燥機(105℃)で完全乾固し重量を定量する。→蒸発残留物の重量の定量化完了

⑤定量後、DMSO(和光純薬、特級)3mLを加えumu-testに試供する。

## 4 対象試料

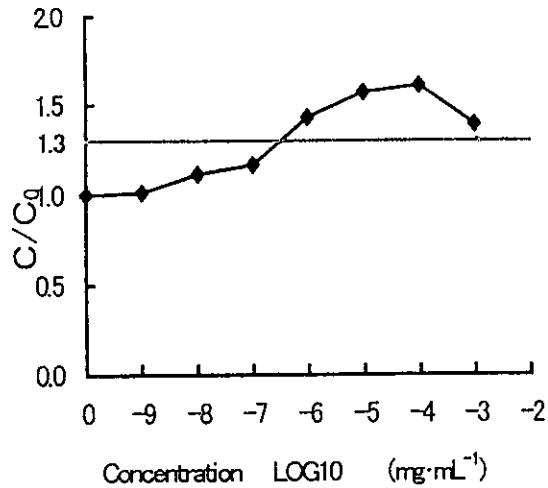
### 4-1 焼却灰

表-1 焼却灰の試料

工場名	灰の種類
イ工場	未処理焼却灰
	処理EP灰
	未処理EP灰
ロ工場	処理焼却灰
	未処理焼却灰
	処理EP灰
ハ工場	未処理EP灰
	処理焼却灰
	未処理焼却灰
ニ工場	処理EP灰
	未処理EP灰
	未処理EP灰
ホ工場	処理焼却灰
	処理EP灰
ヘ工場	(1系) 処理焼却灰
	(2系) 処理焼却灰
	(2系) 未処理焼却灰

焼却灰試料は、表-1に示すとおり、イ～への処理場から19試料入手した。これらを砕き、環境庁告示第13号に基づき水に溶出させ、残ったものを酢酸エチルで抽出した。

なお、処理灰とはオレート剤により重金属を処理したものであり、EP灰とは電気集塵機で



C ; 各投与濃度での細胞濃度  
 C<sub>0</sub> ; 投与濃 0mg/mL での細胞濃度  
 (単位 ; 10<sup>4</sup>cells/mL)

図-2 E<sub>2</sub>での実験結果

収集した飛灰である。

#### 4-2 最終処分場浸出水

最終処分場はK、L、M、N及びE、Jの5カ所から採取し、表-2のものをSep-pakにより抽出した。

表-2 最終処分場浸出水試料

処分場	採取試料	抽出溶媒
M	原水・第1凝集沈後水・生物処理水・第2凝集沈後水・活性炭吸着後水	メタノール
K	原水・生物処理水・砂ろ過後水	メタノール
L	原水・活性炭吸着後水	メタノール
E	原水・処理水・放流水	メタノール 酢酸エチル
J	原水・放流水	メタノール 酢酸エチル
N	原水・生物処理水	メタノール 酢酸エチル

### C 結果と考察

#### 1 エストロジェン性

##### 1-1 17-β-エストラジオール (E<sub>2</sub>)

細胞核内のレセプターに結合してレセプターの構造変化をもたらし、続いて種々の生理作用をもたらすものを agonist いう。agonist の中で最大の生理作用を発揮できるものは full agonist と呼ばれ、また、高濃度を適用しても最大の効果

を発揮できないものは partial agonist と呼ばれる。

E<sub>2</sub> (SIGMA CHEMICAL Co) での実験結果を図-2 に示す。縦軸は投与濃度 0mg/mL に対する増殖比を表し、横軸は投与濃度を LOG で表示した。

この物質では 10<sup>-4</sup>mg/mL の投与量で最大の細胞増殖が得られた。投与濃度 0mg/mL のものに対して、約 1.6 倍の効果が得られているので、E<sub>2</sub> は MCF-7 細胞に対して、完全に full agonist として作用しているといえる。

E<sub>2</sub> は 100% DMSO に溶解した後希釈したため、高濃度での反応が濃度 0 に対して低いことは、DMSO によって細胞が死滅したためと思われる。いずれにせよ、E<sub>2</sub> はこの実験では MCF-7 細胞に対して full agonist としての挙動を示し、逆U字的效果が認められた。また、血清に含まれているホルモンを十分に除去する必要があるが、この反応曲線から細胞を PBS(-) でさらに洗浄する必要が認められることも考えられたが、全試験通して同様の感度であり、データの解釈を以下に示すように E<sub>2</sub> に対する相対的な強さとして表現することとして、この反応曲線に沿った解析を行うこととした。

以下の廃棄物試料の実験結果では、full agonist とは MCF-7 細胞に対して完全に細胞増殖を誘発し、投与濃度 0mg/mL に対する細胞増殖比が E<sub>2</sub> と同様か、またはそれ以上の試料を指し、partial agonist とは、細胞増殖を誘発するが、投与濃度 0



に対する細胞増殖比がE<sub>2</sub>よりも低い試料を指すこととした。得られた各試料の反応曲線に関しては、E<sub>2</sub>での実験より得られたグラフ形状に基づき full agonist、partial agonist のどちらであるのかについて考察を行った。full agonist と認められた試料についてはE<sub>2</sub>と濃度でみたエストロジェン性を比較した。ここでは最大細胞増殖が得られた濃度が濃度がE<sub>2</sub>よりも低いほどエストロジ

エン性が強いとした。加えてE<sub>2</sub>での実験結果より、逆U字型のグラフ形状が得られ、明らかな増殖を示したのは、投与濃度 0mg/mL の well に対する細胞増殖比(C/C<sub>0</sub>の値)が約 1.3 の時であった。よって C/C<sub>0</sub>の値が 1.3 未満となった試料についてはエストロジェン性はないものとした。

表-3 廃棄物処分場での実験結果

試料名称		最大細胞増殖を誘発した投与濃度 (mg/mL)	C/C <sub>0</sub> *	full or partial agonist **	E <sub>2</sub> と比較したエストロジェン性 *	
M	原水	10 <sup>-5</sup>	1.44	partial (0.90)		
	凝集沈殿池 (1)	10 <sup>-5</sup>	1.38	partial (0.86)		
	生物処理槽	10 <sup>-3</sup>	1.25	agonist作用無し		
	凝集沈殿池 (2)	N.D.	N.D.	agonist作用無し		
	活性炭吸着後	10 <sup>-7</sup>	1.87	full (1.16)	1000倍	
K	原水	N.D.	N.D.	agonist作用無し		
	生物処理水	10 <sup>-2</sup>	1.49	partial (0.93)		
	砂ろ過後水	10 <sup>-5</sup>	1.27	agonist作用無し		
L	原水	N.D.	N.D.	agonist作用無し		
	活性炭吸着後水	10 <sup>-3</sup>	1.15	agonist作用無し		
E	酢エチ	原水	10 <sup>-3</sup>	1.48	partial (0.92)	
		処理水	10 <sup>-6</sup>	1.41	partial (0.88)	
		放流水	10 <sup>-2</sup>	1.6	full (1.00)	1/100倍
	メタ	原水	10 <sup>-1</sup>	2.03	full (1.26)	1/1000倍
		処理水	10 <sup>-7</sup>	1.39	partial (0.86)	
		放流水	10 <sup>-4</sup>	1.16	agonist作用無し	
J	酢エチ	原水	10 <sup>-3</sup>	1.27	agonist作用無し	
		放流水	10 <sup>-4</sup>	1.14	agonist作用無し	
	メタ	原水	10 <sup>-1</sup>	1.49	partial (0.93)	
		放流水	10 <sup>-2</sup>	1.32	partial (0.82)	
N	酢エチ	原水	10 <sup>-4</sup>	2.89	full (1.80)	1倍
		生物処理水	10 <sup>-2</sup>	2.18	full (1.36)	1/100倍
	メタ	原水	10 <sup>-1</sup>	2.48	full (1.54)	1/10倍
		生物処理水	10 <sup>-4</sup>	1.58	full (0.98)	1倍

\* 最大細胞増殖を誘発した投与濃度で比較した。

\*\* E<sub>2</sub>におけるC/C<sub>0</sub>の最大値を1として比較した。

## 1-2 廃棄物処分場浸出水試料

上記の解析法に従って 6ヶ所の処分場での実験結果から、E<sub>2</sub> と比較したエストロゲン性、full, partial agonist を、表-3 にまとめ、以下に試水別の結果について考察を行った。

### 1-2-1 原水

例外はあるが、ほぼ高い投与濃度でより強いエストロゲン性が見出された。しかし、full agonist としての挙動を示したのは、M処分場においてのみであり、他の処分場では partial agonist として作用するか、もしくは agonist としての作用は認められなかった。

### 1-2-2 生物処理水

生物処理水について実験を行ったのはK、M、N処分場の3ヶ所である。N施設では full agonist としての挙動を示し、K施設では partial agonist として作用が認められた。

### 1-2-3 凝集沈殿池

凝集沈殿池について実験を行ったのはM処分場においての2つの試料のみであるが、傾向としては、full agonist としては作用せず、partial agonist として作用しても、C/C<sub>0</sub>の最大値も、E<sub>2</sub>

と比較して小さい結果となった。

### 1-2-4 放流水

処理の最終段階にある試料水（放流水）では全体的に結果にばらつきがあるものの、8つの試料のうち、4つの試料で full agonist としての挙動が認められた。処理系による副生成物の影響が懸念される。

## 2 遺伝毒性試験結果

試験を行なった結果は以下の表のとおりである。ここで傾きとは、用量作用曲線において反応が強く出た区間において、β-galactosidase(units) 値を、抽出した蒸発残渣物をDMSOに溶出した時の重量濃度(mg/L)で割ったものである。毒性の判定に関しては用量反応曲線の傾きが存在すれば、何らかの毒性を示したと考えてもよいが、遺伝毒性に関しては計算式に示したように、細胞濃度で除しているため、細胞濃度が細胞毒性などで減少した場合も、見かけ上遺伝毒性は高く計算されることがある。これらに関しては曲線を検討した上で、傾きはあるものの遺伝毒性は無い、と判定している。

## 2-1 焼却灰

表-4 酢酸エチル抽出

工場名	灰の種類	傾き units/(mg/L)	毒性	備考
イ工場	未処理焼却灰	218.1	有り	強毒性(注1)
	処理E P 灰	230.6	有り	強毒性(注1)
	未処理E P 灰	8.875	有り	(注2)
ロ工場	処理焼却灰	8.373	有り	(注1)
	未処理焼却灰	34.25	有り	
	処理E P 灰	22.68	有り	
	未処理E P 灰	6.176	有り	(注2)
ハ工場	処理焼却灰	13.898	有り	
	未処理焼却灰	2 367	無し	
	処理E P 灰	735.5	有り	
	未処理E P 灰	49.97	有り	(注1)
ニ工場	処理焼却灰	86.04	有り	(注1)
	処理E P 灰	1817.7	有り	
	未処理EP灰	39.92	有り	
ホ工場	処理焼却灰	18.13	有り	(注2)
	処理E P 灰	14.70	有り	
ヘ工場	(1系) 処理焼却灰	1617.3	有り	
	(2系) 処理焼却灰	1282.8	有り	
	(2系) 未処理焼却灰	18.98	有り	(注1)

表-5 水溶出物のSep-pak抽出物

工場名	灰の種類	傾き units/(mg/L)	毒性	備考
イ工場	未処理焼却灰	59.21	有り	強毒性
	処理E P灰	39.43	有り	強毒性
	未処理E P灰	35.91	有り	強毒性
ロ工場	処理焼却灰	23.57	有り	
	未処理焼却灰	1.505	無し	
	処理E P灰	0.976	無し	
ハ工場	未処理E P灰	1.462	無し	
	処理焼却灰	3.334	有り	(注1)
	未処理焼却灰	2.994	無し	
ニ工場	処理E P灰	1.922	有り	(注2)
	未処理E P灰	34.44	有り	(注1)
	処理焼却灰	46.85	有り	(注2)
ホ工場	処理E P灰	0.4974	無し	
	未処理E P灰	8.142	有り	
	処理焼却灰	2.593	有り	
ヘ工場	処理E P灰	14.28	有り	(注1)
	(1系) 処理焼却灰	63.03	有り	
	(2系) 処理焼却灰	6.547	有り	
	(2系) 未処理焼却灰	-0.392	無し	

2-2 最終処分場流出水

表-6 M処分場流出水

種類	傾き units/(mg/L)	毒性	備考
原水	2.138	有り	(注2)
凝集沈殿池 (1)	32.62	有り	
生物処理槽	18.45	有り	強毒性
凝集沈殿池 (2)	15.59	有り	強毒性
活性炭吸着後	34.76	有り	強毒性

表-7 K処分場流出水

種類	傾き units/(mg/L)	毒性	備考
原水	3.175	無し	
生物処理水	16.89	有り	(注1)
砂ろ過後水	21.40	有り	強毒性(注1)

表-8 L処分場流出水

種類	傾き units/(mg/L)	毒性	備考
原水	-0.79	無し	
活性炭吸着後水	10.94	有り	(注1)

\*注1：濃度の高いところにおいて、使用した菌の増殖阻害が起こりβ-gal値が減少している。ゆえにグラフは山形となっている。増殖阻害の原因は、使用したサンプルの毒性が強すぎたため、菌が死滅しOD<sub>550</sub>値が大きくなり、さらには十分な酵素反応ができなかったためOD<sub>420</sub>値が小さくなり、結果β-gal値が減少したと考えられる。従って、毒性を有すると判断した。

\*注2：濃度希釈列の中央付近濃度におけるところにおいて、何らかの原因によりβ-gal値が減少している。ゆえにグラフは谷型となっている。その原因については不明だが、高濃度付近のβ-gal値が再増加していることから毒性を有すると判断した。

## 2-3 考察

以上のの結果をもとに、各試料について以下のような考察を行った。

### 2-3-1 焼却灰

#### (1) イ工場

未処理焼却灰、処理E P灰、未処理E P灰のいずれも酢酸エチル抽出したものと及び水溶出し Sep-pak で抽出したものの共に毒性を示した。特に、未処理焼却灰、処理E P灰の酢酸エチル抽出したものと及び水溶出し Sep-pak で抽出したものの、未処理E P灰の水溶出し Sep-pak で抽出したものは強い毒性を示した。

これは、未処理焼却灰及び処理E P灰については、脂溶性の強毒性を有すると共に、水溶性であり脂溶性も併せ持つような強毒性も有することが考えられる。未処理E P灰については水溶出し Sep-pak で抽出したものに特に強い毒性を示したことから、水溶性であり脂溶性も併せ持つような強毒性を有すると考えられる。

#### (2) ロ工場

処理焼却灰の酢酸エチル抽出したものと及び水溶出し Sep-pak で抽出したものの、未処理焼却灰、処理E P灰及び未処理E P灰の酢酸エチル抽出したのものには毒性がみられたが、未処理焼却灰、処理E P灰及び未処理E P灰の水溶出し Sep-pak で抽出したものについては毒性がみられなかった。

これは処理焼却灰は、脂溶性の毒性を有すると共に、水溶性であり脂溶性も併せ持つような毒性も有することが考えられる。また、未処理焼却灰、処理E P灰及び未処理E P灰では酢酸エチル抽出したもののだけに毒性がみられたことから、脂溶性の毒性は有するものの、水溶性であり脂溶性を併せ持つような毒性は含まないことが考えられる。

#### (3) ハ工場

処理焼却灰、処理E P灰、未処理E P灰の酢酸エチル抽出したものと及び水溶出し Sep-pak で抽出したのものには毒性がみられたが、未処理焼却灰の酢酸エチル抽出したものと及び水溶出し Sep-pak で抽出したのものには毒性はみられなかった。

これは処理焼却灰、処理E P灰、未処理E P灰については、脂溶性の毒性を有すると共に、水溶性であり脂溶性も併せ持つような毒性も有することが考えられる。また未処理焼却灰についてはどちらにも毒性を示さなかった。

#### (4) ニ工場

処理焼却灰、未処理E P灰の酢酸エチル抽出したものと及び水溶出し Sep-pak で抽出したものの、処理E P灰の酢酸エチル抽出したのものについては毒性を示したが、処理E P灰の水溶出し Sep-pak で抽出したものについては毒性を示さなかった。

これは処理焼却灰、未処理E P灰については、脂溶性の毒性を有すると共に、水溶性であり脂溶性も併せ持つような毒性も有することが考えられる。また、処理E P灰については酢酸エチル抽出したのものについてだけ毒性を示したことから、脂溶性の毒性は有するものの、水溶性であり脂溶性も併せ持つような毒性は含まないことが考えられる。

#### (5) ホ工場

処理焼却灰、処理E P灰のいずれも、酢酸エチル抽出したものと及び水溶出し Sep-pak で抽出したものに毒性がみられた。

これは処理焼却灰、処理E P灰のいずれも脂溶性の毒性を有すると共に、水溶性であり脂溶性も併せ持つような毒性も有することが考えられる。

#### (6) ヘ工場

(1系) 処理焼却灰、(2系) 処理焼却灰の酢酸エチル抽出したものと及び水溶出し Sep-pak で抽出したものの、(2系) 未処理焼却灰の酢酸エチル抽出したものは毒性がみられたが、(2系) 未処理焼却灰の水溶出し Sep-pak で抽出したものについては毒性がみられなかった。

これは(1系) 処理焼却灰、(2系) 処理焼却灰では脂溶性の毒性を有すると共に、水溶性であり脂溶性も併せ持つような毒性も有することが考えられる。また、(2系) 未処理焼却灰については酢酸エチル抽出したもののだけに毒性がみられたことから、脂溶性の毒性は有するものの、水溶性であり脂溶性を併せ持つような毒生

は含まないことが考えられる。

## 2-4 最終処分場流出水

### (1) M処分場

原水、凝集沈殿池(1)、生物処理槽、凝集沈殿池(2)、活性炭吸着後のすべてに毒性がみられた。特に、生物処理槽、凝集沈殿池(1)、活性炭吸着後は強い毒性を示しており、またその順に毒性が強くなっており、処理系で添加または生成されるものに強い毒性が見られることが推察できる。

### (2) K処分場

原水については毒性がみられなかったが、生物処理水、砂ろ過後水に毒性がみられた。特に、砂ろ過後水では強い毒性を示している。M処分場と同様に処理系による副生成物の影響が推察できる。

### (3) L処分場

原水については毒性がみられなかったが、活性炭吸着後水に毒性がみられた。M処分場と同様に処理系による副生成物の影響が推察できる。

## D 結論

(1) 浸出水のエストロジェン性は、原水でfull agonistとしてK、E、N処分場のものが検出され

た。

(2) 生物処理水ではN施設でfull agonistとして、K施設でpartial agonistとして検出された。

(3) 最終処理水(放流水)は、4試料でfull agonistであり、処理系による副生成物の影響が考えられる。

(4) 遺伝子毒性に関しては、焼却灰で、イ工場における未処理焼却灰、処理EP灰、未処理EP灰のいずれも水溶性であり脂溶性も併せ持つような強毒性を示した。

(5) K、L、M処分場浸出水で、いずれも処理副生成物の毒性が強いことが考えられる。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

(なし)

### 2. 学会発表

加納佐江子、小野芳朗、山田正人；廃棄物浸出水等の内分泌攪乱性評価、日本水環境学会年会講演集、1999年

## G 知的所有権の取得状況

(なし)

金魚を用いる小核試験およびコメットアッセイによる変異・がん原物質のスクリーニング法の検討

分担研究者 木苗直秀 静岡県立大学食品栄養科学部教授

研究要旨

ゴミ焼却場試料（底灰、飛灰、浸出水）の酢酸エチル抽出物を金魚（*Carrasius auratus*）の腹腔内に投与し、一定時間後に末梢血あるいは鰓を採取して染色体異常誘発能を小核試験により、DNA 損傷性をコメットアッセイ（単一細胞ゲル電気泳動法）により検定した。その結果、ゴミ焼却場試料には染色体異常や DNA 損傷性を有する化学物質が存在すること、それらの試料の変異原性検定にはエンドポイントを異にする小核試験とコメットアッセイの組み合わせが有効であることを明らかにした。

A. 研究目的

生活廃棄物を焼却すると含有される化学物質とは異なる二次生成物が生じ、それらの中には変異原物質や発がん性物質が存在するものと推定されている。従来、それら焼却物については理化学試験や個別分析が行われているが、水生生物を含めたバイオアッセイ法は確立されていない。本研究では特に発がん物質をスクリーニングする目的で数種の標準化学物質とゴミ焼却場試料を金魚に投与したのち、変異原性試験として位置づけられている小核試験とコメットアッセイを適用し、スクリーニング法として採用することが可能か否かを検討した。

B. 研究方法

1. 試料

焼却灰は施設内の焼却灰の輸送コンベアまたはピットから採取した。浸出水は、最終処分場に付設されている浸出水処理施設より採取した。原水は処理施設の調整槽の流水部より、処理水は、塩素消毒前の貯留槽より、また、放流水は滅菌槽よりそれぞれ 100L を採取した。標準物質として Trp-P-2(acetate form:和光純薬、生化学用) pentachlorophenol (PCP:和光純薬、残留農薬試験用),b

enzo (a)pyre(和光純薬、特級)、fluoranthene(和光純薬、一級)、2,4,6-trichlorophenol(和光純薬、一級)を用いた。

2. 試料の前処理

1) 焼却灰

試料 5 g を、50mL のネジ口遠沈管に入れ、酢酸エチル 30mL を加え、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で 5 分間超音波破碎(26Hz)したのち、3000rpm で 10 分間遠心分離を行った。上澄みを採取した後、新しい溶媒 20mL を加え、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 20mL を採取して、総量 40mL の抽出液を得た。

抽出液は、ロータリーエバポレーターを用いて、50℃で溶媒を留去し、窒素パージをおこなって溶媒を完全に除去した。

2) 浸出水

ガラスカラム(Φ2 cm×30 cm)に石英綿を詰め、メタノール、酢酸エチルで洗浄した XAD-2000 50mL を蒸留水を用いて湿式充填した。このカラムを浸出水を入れた 20L の蛇口付きポリ容器に接続し、浸出水を 15 mL/min の流速で通水し、有機化学物質を吸着させた。通水後、カラムを装置より外し、蒸留水でカラ

ム内の XAD-2000 を洗浄した後、カラムの先端をアスピレータに接続し、20 分間吸引して水分を除去した。カラムより XAD-2000 を取り出し、吸着物を適量の酢酸エチルで抽出した。得られた酢酸エチル抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、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。酢酸エチルによる抽出を行った XAD-2000 樹脂は、窒素パージにより溶媒を完全に除去した後、残った吸着物をメタノールで抽出した。メタノール抽出液の溶媒をエバポレータで減圧留去し、得られた残渣をメタノール抽出物とした。

### 3) 金魚を用いる小核試験

静岡市内の金魚店で購入した和金(体重  $10 \pm 1$ g)を 100 ml ガラス製水槽に入れ、試料投与前の 1 週間は、水温 15℃ の精製水中で飼育し、順化した。

#### ①試験溶液の投与

焼却灰試料は 0.85~123.0 mg/ml の割合に生理食塩水に溶解・懸濁し、浸出水試料は浸出水 1 ml および 5 ml 相当量を生理食塩水 100  $\mu$ l に溶解してそれぞれ試験溶液とした。試験溶液 100  $\mu$ l を金魚の腹腔内に投与した。また、対照として生理食塩水あるいは DMSO を用い、陽性対照としてマイトマイシン C (MMC) 100  $\mu$ l (4 mg/kg) を腹腔内に投与した。

#### ②末梢血の小核誘発頻度の検定

投与 96 時間後に水槽から金魚を取り出し、ヘパリン処理した 26G の注射針で尾部静脈から採血した。末梢血 10  $\mu$ l に FBS (fetal bovine serum, 牛胎児血清: GIBCO) 40  $\mu$ l を加えて希釈した。あらかじめアクリジンオレンジ・メタノール溶液(1 mg/kg) 15  $\mu$ l を均一に塗布したスライドガラス (MATUNAMT, 70×26mm) 上に先の希釈液 9  $\mu$ l を乗せ、カバーガラスをかけてプレパラートを作製した。各検体についてプレパラートを 2 枚ずつ作製した。2 時間以上放置後、48 時間以内に蛍光顕微鏡 (オリンパス製 AH2-FL,  $\times 1000$ ) を用いて励起波長 490nm、蛍光波長 515nm で鏡検した。プレパラート 1 枚当たり、正常な幼若赤血球細胞 2000 個中に含まれる小核を有する細胞数を計測し、1000 個当たりの小核出現頻度 (%) を算出した。

#### ③鰓を用いる小核誘発頻度の検定

投与 96 時間後に金魚を取り出し、鰓 3 枚を 0.1%

トリプシン平衡塩類溶液 5 ml 中で 2 分間静置した。次いでピンセットを用いて 2 分間細胞をほぐし、1000rpm で 5 分間遠心分離した。上清を捨て、75mM KCl 5 ml を加えて十分に攪拌した後、2 分間静置し 1000rpm で 5 分間遠心分離した。上清を 1/4 残し、酢酸-メタノール固定液 5 ml を加えて攪拌後、1000rpm で 5 分間遠心分離した。上清を 1/3 残し、酢酸-メタノール固定液 3 ml を加えて攪拌後、1000rpm で 5 分間遠心分離した。上清を 1/3 残し、酢酸-メタノール固定液 3 ml を加えて攪拌後、1000rpm で 5 分間遠心分離した。上清を 1/3 残し、沈殿と十分に混合後、2 滴をスライドグラス上に滴下した。各検体についてプレパラートを 2 枚ずつ作製した。乾燥後、0.01% アクリジンオレンジ水溶液で 30 秒間染色した。リン酸緩衝液で 5 分間洗浄し、1 晩放置後、蛍光顕微鏡 (オリンパス製 AH2-FL,  $\times 1000$ ) を用いて励起波長 490

nm、蛍光波長 515nm で小核を観察した。プレパラート 1 枚当たり、正常な幼若赤血球細胞 1000 個中に含まれる小核を有する細胞数を計測し、2 枚の平均値より小核出現頻度 (%) を求めた。

### 4) 金魚を用いるコメットアッセイ

#### ①試験溶液の投与

2-3)-①で調整した試験溶液 100  $\mu$ l (試料はアセトンまたはエタノールに溶解) を金魚の腹腔内に投与(30 mg/kg, 10 mg/kg 相当量)した。またコントロールとしてエタノール 100  $\mu$ l を金魚の腹腔内に投与した。

#### ②DNA 損傷性の検定

投与 3 時間後に金魚を取り出し、26G の注射針で尾部静脈から採血した。

#### (a)アガロースの作成

コメットアッセイ試験用のアガロースは第 1、第 3 層は普通アガロース、第 2 層は低ゲル化温度アガロースを用いた。これらのアガロースは 0.85% 生理食塩水を用いて第 1、第 3 層は 1%、第 2 層は 2% となるように作成し、用時電子レンジで加熱溶解した。第 1 層ゲルとして 75  $\mu$ l を全面フロストスライドガラス上に置き、直ちにその上にスライドガラスをかぶせてアガロースを広げ、室温で水平に置いてアガロースを固化させた。アガロースが固化したの

ち、かぶせたスライドガラスを横に滑らせるようにして引きはがした。低ゲル化温度アガロースは加熱溶解後 45℃に保温しておき、金魚の末梢血 10 $\mu$ l に対して PBS1 ml で希釈したものと 1:1 で混合した。その 75

$\mu$ l を固化した第 1 層ゲルに重層し、直ちにスライドガラスをかぶせて固化させた。異常や DNA 損アガロースが固化したのを見計らって、スライドガラスを引きはがし、さらに第 3 層ゲルとして 100 $\mu$ l 重層して同様に固化させた。

#### (b)核溶解

作成したアガロースゲルをガラスシャーレに水平に置き、直ちに氷冷しておいた核溶解液をアガロースゲルが完全に浸るまで加えた。そのまま 4℃の冷蔵庫に移し、2 時間静置して核を溶解させた。

#### (c)DNA 巻き戻しおよび電気泳動

核溶解後、直ちにアガロースゲルを電気泳動層に移して陽極寄りに並べ、氷冷しておいた電気泳動緩衝液をアガロースゲルが完全に浸るまで加え、氷上で 10 分間静置して DNA を unwinding させた後、25V で 15 分間、電気泳動を行った。

#### (d)中和及び染色

泳動後、アガロースゲルをガラスシャーレに移し、アガロースゲルが完全に浸るまで中和液を加え、10~20 分間静置した。その後、20 $\mu$ l/ml のエチジウムブロマイド染色液 50 $\mu$ l を滴下して染色し、カバーガラスをかけた。蛍光顕微鏡を用いて DNA 損傷性を 5 つの type (type1-5, type1 は完全なもので type5 は DNA の損傷が最も大きいものとして 5 段階に分類)に分けて検定した。

### C. 研究結果

#### 1. 焼却灰および浸出水の酢酸エチル抽出物

4 つのゴミ焼却場で採取した焼却灰 (底灰および飛灰) から得られた酢酸エチル抽出物量を Table 1 に示した。

A と B の試料が他の地域のもの比べて酢酸エチル抽出物量が多く、また飛灰より底灰の方が収量が多かった。しかし、地域により大きな差がみられた。A の浸出水から得られた酢酸エチル抽出物量を

Table 2 に示した。

いずれの試料においてもメタノール抽出物量と比べて収量は低かった。

#### 2. 金魚末梢血における小核誘発頻度

標準物質を金魚に投与した場合の末梢血における小核誘発頻度を Fig. 1 に示した。

Trp-P-2, benzo(a)pyrene が投与量に比例して多くの小核を誘発した。焼却灰および浸出水の酢酸エチル抽出物の小核誘発頻度を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

焼却灰の中では A, B の底灰が高い誘発頻度 (1.40%, 2.48%) を示したがいずれの飛灰も比較的 low 値であった。浸出水においては A の原水が 2.84% と最も高く、処理水、溜水は low 値を示した。しかし、塩素処理後の滅菌水ではわずかながら小核誘発頻度が上昇した。

#### 3. 金魚鰓における小核誘発頻度

標準物質の小核誘発頻度を Fig. 4 に示した。

benzo(a)pyrene が 8.96% と高値を示し、Trp-P-2 も陽性となった。焼却灰および浸出水の酢酸エチル抽出物の鰓に対する小核誘発頻度を Fig. 5 および Fig. 6 に示した。

焼却灰では A が 8.94% と最も高く、D も 7.96% と高値を示した。浸出水では A の原水が 12.48% と陽性対照のマイトマイシン C (4 mg/kg) より高値を示した。また、A の処理水も 9.50% と高値を示したが処理工程を通過するたびに low 値となる傾向がみられた。

なお、各試料の酢酸エチル抽出物の末梢血と鰓における小核誘発頻度の間には  $r=0.638$  と相関性がみられた。

#### 4. 金魚末梢血における DNA 損傷性

コメットアッセイで検定した標準物質の金魚末梢血における DNA 損傷性を Fig. 7 に示した。

benzo(a)pyrene, PCP はいずれも 1~5 mg/kg 投与で type2 が 20% 以下であり、DNA 損傷性は弱いものであった。

焼却灰の酢酸エチル抽出物の DNA 損傷性を Fig. 8~10 に示した。

A では飛灰に type2 が 30 mg/kg で 90%、type3 が 3% と DNA 損傷がみられた。

B では底灰で type2 が 30 mg/kg で 35%、type2 が 5%



と DNA 損傷性を示した。

C では底灰が 30 mg/kg で type2 が 80%、10 mg/kg でも type2 が 70% と強い DNA 損傷性を示したが飛灰では陰性であった。浸出水の酢酸エチル抽出物の DNA 損傷性を Fig 11 に示した。

E の原水を処理することにより DNA 損傷性が低下することを観察した。

#### D. 考察

焼却灰抽出物は、umu 試験で明確な変異原性を示すが、Ames 試験では、変異原性が認められないことが多い。そのため、本研究ではゴミ焼却場排水が河川に放流されていることを考え、飼育が容易である金魚を用いて小核試験とコメットアッセイを適用し、酢酸エチル抽出物の変異原性を調べた。小核試験では、染色体の構造異常を誘発する化学物質や細胞の分裂装置に傷害を与え、染色体の数的な異常を誘発する化学物質（紡錘体阻害剤、分裂阻害剤）を検出することができ、コメットアッセイでは、細胞の DNA に損傷を起こす化学物質を検出することができる。とされている。

1) 焼却灰の酢酸エチル抽出物について末梢血に対する小核試験では、A の底灰が 1.44(%)、飛灰が 0.50(%)、鰓による小核試験では、A の底灰が 8.94(%)、飛灰が 4.44

(%)の小核誘発頻度であった。それ故、飛灰より底灰の方に小核を誘発する変異原物質が多く含まれているものと推測した。

2) 浸出水の酢酸エチル抽出物を用いた末梢血に対する小核試験では、A の原水が陽性対照である MMC と同程度の 2.84(%)の小核を誘発した。それに対して、処理水、滅菌水等では、小核誘発は見られたが 0.49,

0.98(%)と原水より低値を示した。また、鰓に対する小核試験では、A の原水が処理水 9.50% に比べて 12.48(%)と高い値を示した。滅菌水は 5.75(%)と低い値を示した。これらのことから原水を処理、滅菌することにより小核誘発頻度が低下する傾向を認められた。

3) 標準物質を用いた末梢血の小核試験では、Trp-

P-2,benzo(a)pyrene がいずれも 1.99(%)と高値を示した。また、benzo(a)pyrene は鰓の小核試験でも 8.96(%)と高値を示した。標準物質として用いた Trp-P-2,PCP,benzo(a)pyrene には、DNA 損傷が見られなかった。焼却灰の酢酸エチル抽出物のうち A の飛灰が強い DNA 損傷を示した。このことは A の飛灰が、小核を誘発しないが DNA 損傷を起す物質、または複合的な効果で DNA 損傷を起こす物質を含んでいる可能性が示唆された。

B の試料では底灰に弱いながら DNA 損傷性がみられた。浸出水 E は原水の方が処理水より高い DNA 損傷性を示したことから、処理工程で変異原物質が除去されるものと思われた。

以上の実験から変異原性の検定には、小核試験やコメットアッセイを単独で使用するよりも複数の試験法を組み合わせることで総合的に評価することが望ましいと考えた。

#### E. 結論

ゴミ焼却場の灰および排水に含まれる変異・がん原物質の *in vivo* スクリーニング法を確立するため、金魚を用いるバイオアッセイ法を検討した。

金魚の腹腔内に各試料の酢酸エチル抽出物を腹腔内投与し、末梢血および鰓を用いて小核試験とコメットアッセイを行った。

①その結果、焼却灰においては、A の飛灰よりも底灰が末梢血、鰓とともに高い小核誘発頻度を示した。また、末梢血と鰓の小核誘発頻度の間に相関性がみられた。コメットアッセイでは、A の底灰よりも飛灰の方が高い DNA 損傷を示しており、小核試験とは逆の結果を示した。

②A の浸出水は処理後および滅菌後の試料が原水に比べて末梢血、鰓とともに低い小核誘発頻度を示した。

以上の結果から、焼却場の灰および浸出のバイオアッセイに金魚の末梢血や鰓を用いる小核試験とコメットアッセイを利用できる可能性が高いこと、また、いずれか一方の試験だけではなく、両試験を併用して総合的に評価することが望ましいことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

A.Nishikawa, F.Furukawa,I-S Lee, K.Kasahara, Z.Tanakamaru,H. Nakamura, M.Miyauchi, N.Kinae and M.Hirose Promoting effect of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone [MX] on rat glandular stomach carcinogenesis initiated with N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine. Cancer Res. (in press)

2. 学会発表

(1)田中 仁、今村希美、古郡三千代、下位香代子、

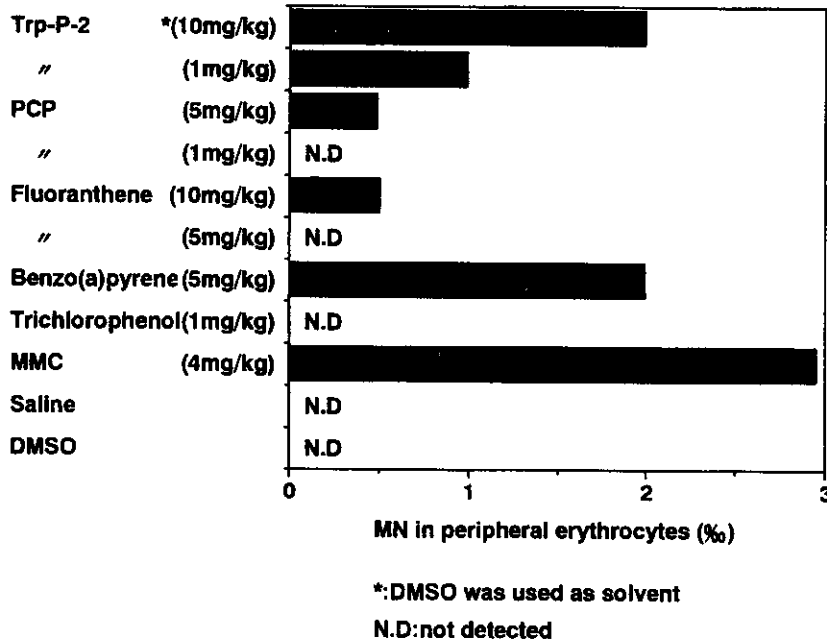
木苗直秀、山田正人、井上雄三、田中 勝、ゴミ焼却場灰および排水のバイオモニタリング. 第44回日本薬学会東海支部大会(静岡)、要旨集 P.24(1998)

(2)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 P.155(1998)

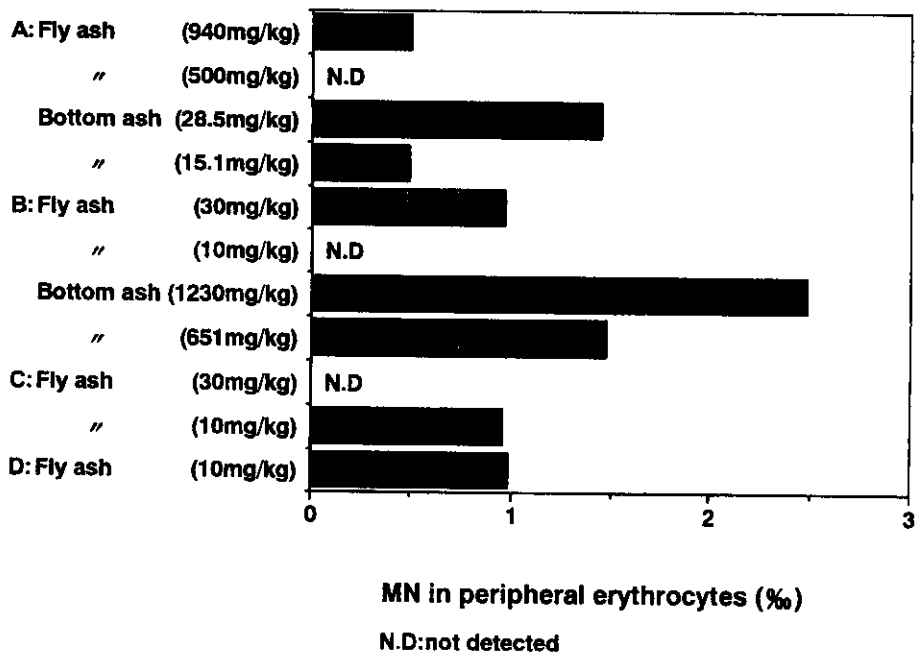
G. 知的所有権の取得状況

(なし)

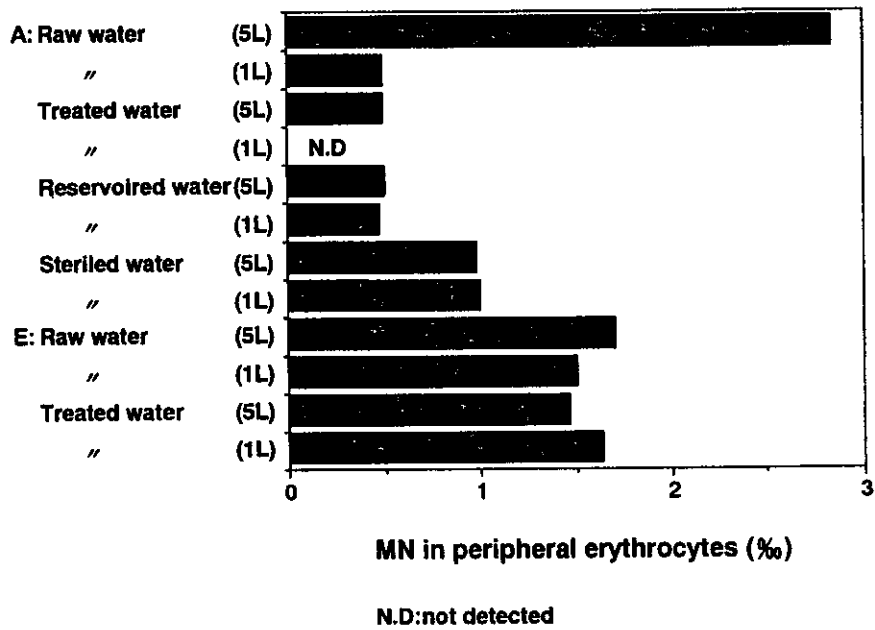
**Fig.1 標準物質の金魚末梢血に対する小核誘発頻度**



**Fig.2 焼却灰から得られた酢酸エチル抽出物の金魚末梢血に対する小核誘発頻度**



**Fig.3** 浸出水から得られた酢酸エチル抽出物の金魚末梢血に対する小核誘発頻度



**Fig.4** 標準物質の金魚鰓に対する小核誘発頻度

