

平成11年度厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
研究成果報告書

**廃棄物ライフサイクルにおける有害化学物質の
リスクアセスメント手法の開発**
(H11-生活-047)

平成12年4月10日

主任研究者

国立公衆衛生院廃棄物工学部

部長 田中 勝

平成11年度厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
研究成果報告書

**廃棄物ライフサイクルにおける有害化学物質の
リスクアセスメント手法の開発**
(H11-生活-047)

平成12年4月10日

主任研究者

国立公衆衛生院廃棄物工学部

部長 田中 勝

研究課題名 : 廃棄物ライフサイクルにおける有害化学物質の
リスクアセスメント手法の開発

研究費の名称 : 厚生科学研究費

研究事業名 : 厚生科学特別研究事業

国庫補助金精算所要額 : 10,000,000 円

研究期間 : 1年間(1999)

主任研究者名 : 田中 勝 (国立公衆衛生院廃棄物工学部部長)

分担研究者名 : 井上 雄三 (国立公衆衛生院廃棄物工学部室長)
山田 正人 (国立公衆衛生院廃棄物工学部主任研究官)
市川 勇 (国立公衆衛生院労働衛生学部室長)
木苗 直秀 (静岡県立大学食品栄養科学部教授)
小野 芳朗 (岡山大学環境理工学部助教授)
吉野 秀吉 (神奈川県環境化学センター研究員)
小田 美光 (大阪公衆衛生研究所主任研究員)
天沼喜美子 (国立環境研究所研究支援協力員)
酒井 康行 (東京大学環境化学工学講師)

研究補助者名 : 小野雄策 (埼玉県公害センター産業廃棄物課課長)
貴田晶子 (広島県保健環境センター生活環境部室長)
野馬幸生 (広島県保健環境センター生活環境部研究員)
花里善夫 ((株)三菱電機環境監視制御グループマネージャー)
水本正浩 ((株)栗田工業開発本部新規技術グループ)

《 目次 》

様式A(4) 厚生科学研究費補助金研究報告書	1
別添1 総括研究報告書概要版	2
別添2 総括研究報告書	5
別添3 分担研究報告書	
有害物質の環境移行評価手法の開発	12
廃棄物処理分野における総合的毒性評価手法の確立および自動簡易試験法の開発	19
魚類小核試験およびコメットアッセイによる毒性評価手法の確立	26
廃棄物最終処分埋め立て地のリスク管理手法	36
廃棄物焼却灰および埋立処分場の浸出水に含まれる変異原性物質の検出と特性	44
都市ごみ焼却灰の数世代ラットの生殖機能等に関して評価する方法の実験的研究	54
廃棄物試験用の高感受性細菌の開発	63
動物細胞を用いた毒性評価手法の確立	70
トランスジェニック魚を用いた毒性評価手法の開発	77

厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

廃棄物ライフサイクルにおける有害化学物質のリスクアセスメント手法の開発

主任研究者 田中 勝 国立公衆衛生院廃棄物工学部長

研究要旨 本研究では廃棄物の流れの中での有害化学物質のフローとこれらの物質の生活・経済・環境への分配、及び廃棄物管理の最後尾に当たる最終処分場での有害物質の毒性評価手法について、実施で利用できる手法開発を進めた。その結果、US-EPA で開発された有害化学物質の順位付け手法が有効であること、またSFAによる環境移行モデルの改良の方策を明らかにした。一方、毒性評価についてはほとんどの手法の標準化が進んでおり、現場での試験の検証を通して、試験結果の大きさと対策レベルの対応付け、また、応答に関与する毒性物質の絞込むロジックを組み上げ、現場管理ツールとしての手法を簡易化、システム化することが今後の課題となる。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

井上雄三・国立公衆衛生院 室長
山田正人・国立公衆衛生院 主任研究官
市川 勇・国立公衆衛生院 室長
木苗直秀・静岡県立大学 教授
小野芳朗・岡山大学 助教授
吉野秀吉・神奈川県環境科学センター 専門研究員
小田美光・大阪公衆衛生研究所 主任研究員
天沼喜美子・国立環境研究所 科学技術振興重点研究支援協力員
酒井康行・東京大学 講師

評価する毒性試験を、廃棄物処理処分施設におけるごみや焼却灰等の搬入物の検査、また、施設からの排水や排ガスのような排出物の監視に適用することを目的として、

- (1) 細菌試験系の適用性、標準化、簡易化に関する検討
- (2) 魚類を用いた最終処分場浸出水モニタリング系の開発
- (3) 試験結果の評価手法の検討を行った。

なお、本研究では、毒性試験で得られた結果を人や生態系に対するリスクの大きさ（危険性）を示すものとは位置づけていない。むしろ、これは有害化学物質に対して個別物質に対応する化学的手法を補完する総合指標であり、得られた結果の大きさはリスクが所在する可能性のみを表し、より詳細な調査やリスクアセスメント手続きや運転操作の自主的改善等の予防原則に基づくアクションを促すものとする。

A. 研究目的

1. 有害物質の環境移行評価手法の開発

US-EPA の有害化学物質のリスク管理のための優先順位付け手法を例にしてわが国における有害化学物質の生産量とフロー及び蓄積量を把握・管理するためにどの化学物質から行ったらよいかという、優先順位付けの手法を明らかにする。また、産業廃棄物処理・処分、特に埋立への鉛の著しい蓄積が起り、実際の現象と異なる原因を追及し、環境移行モデルの改良を試みる。

2. 有害物質の毒性評価手法の開発

未規制物質に対応したより高度な廃棄物処理施設の管理を目指して、種々の化学物質の混合物である環境媒体の質を毒性という総合指標で

B. 研究方法

1. 有害物質の環境移行評価手法の開発

1. 1 化学物質の優先順位付け手法の確立

US-EPA の chemical ranking report (Project Number 92U-7200-001) を中心に、優先順位付け手法に関する文献調査を行い、優先順位付け手法の構造を明らかにし、わが国における利用できる情報を整理する。

1. 2 環境移行モデルの改良

環境移行モデルによる鉛の各コンパートメントへの分配・蓄積は、当該コンパートメントか

らの分配係数によって著しく影響を受ける。そこでここではSFAによって得られた結果を既存のデータに基づき評価し、係数の選定によって対応できるのか、それともモデル自体の改良が必要かどうかを評価する。

2. 有害物質の毒性評価手法の開発

2.1 細菌試験系の適用性、標準化、簡易化に関する検討

(1) Ames 試験を用いた検討

Ames 試験はサルモネラ菌を用いた復帰変異原性試験である。菌株は、塩基対置換型 TA98、フレームシフト型 TA100 株を用い、試料への曝露はプレート法で行い、焼却灰および浸出水試料の抽出・濃縮が試験系に与える影響を調べた。焼却灰からの物質の粗抽出には、酢酸エチルを用いた。粗抽出液をシリカゲルを充填したカラムクロマトグラフィーに通し、移動相の極性を順次高くして得られた抽出画分について、また、極性が高い水からメタノール、酢酸エチル、ヘキサンの順に連続的に振とう抽出して精製したものについて Ames 試験を行った。浸出水試料には、都市ごみ最終処分場から排出された無処理の浸出水を用い、捕収する物質の極性また物性が異なる 8 種類の樹脂に吸着・脱離後、Ames 試験を行った。

(2) umu 試験を用いた検討

umu 試験は大腸菌の SOS 修復を利用した試験系である。その中で、グルタチオン転移酵素高産生株 *Salmonella typhimurium* NM5004 はジハロアルカン類に対して高感受性を示すことが知られている。今回は、廃棄物処理分野でよく問題とされる発がん性を有する有機塩素系化合物の遺伝子毒性を検出可能性を調べるため、発がん性を示すと報告されている Chlorobenzene、1,4-Dichlorobenzene、Pentachlorophenol、2, 4, 6-Trichlorophenol、Hexachlorobenzene における umu 試験親株とグルタチオン転移酵素高産生株の応答特性を求めた。

(3) MRL 試験を用いた検討

MRL 試験も umu 試験同様、大腸菌の SOS 修復を利用した試験系である。ただし、recA 遺伝子の発現をモニターすること、ホストが大腸菌であること、レポータ遺伝子が発光遺伝子であることが異なる。今回はマイクロプレート法の適用への試験手順の改善をのため、オリジナルの試験操作を変更し、S9 無添加の試験系を用い、陽性対照として用いられる Mitomycin C および Nitroquinoline 1-oxide について応答特性を調べた。

2.2 魚類を用いた最終処分場浸出水モニタ

リング系の開発

(1) 最終処分場浸出水における有害物質の流出パターンの検討

安定型一般廃棄物最終処分場の浸出水放流水中のホウ素、カドミウム等の既知の有害物質と塩類の長期的挙動を現場観測により把握した。浸出水原水、水処理施設での処理水、河川の放流口上流、50m下流、処分場堰堤の斜面に穴を掘ったところから湧き出る水、また、それらの下側にある岩盤からしみだしている水、さらに一般廃棄物焼却場の主灰冷却水を 1999 年 11 月 26 日より、2000 年 1 月 20 日に渡り、週 2 回採取した。採取した水について、ICP 蛍光発光法で試料中の金属類を測定した。

(2) コメットを用いた魚類小核試験による検討

小核試験は、被験物質中に染色体異常誘発物質が存在すると細胞の分裂時に小さな核（小核）が生成されるため、その個数を計測しコントロールと比較して染色体異常誘発能を調べる試験法である。今回は、浸出水排出口に魚類を直接飼育して試験を行う際のいくつかの問題について検討した。浸出水試料には一般廃棄物の焼却残渣を受け入れている処分場より、浸出水処理施設の消毒過程直前の処理水を用いた。供試魚類には、金魚 (*Carassius auratus*) の一種であるコメットを用いた。浸出水処理水試料を脱イオン水で希釈したものに魚を入れて、みかけの餌の摂取率を求め金魚の適応度を調べた。また、リファレンス物質の投与経路を決めるため、マイトマイシンCを飼育水に溶かして（水経由で）曝露させる系と、腹腔内投与により曝露させる系で小核誘発頻度を調べた。

(3) 和金を用いた魚類小核試験と魚類コメットアッセイによる検討

コメットアッセイは個々の細胞レベルで DNA 損傷性である 1 本鎖切断とアルカリ易溶出部位を検出する手法である。今回は、魚類を用いたコメットアッセイの標準化に関する検討を行った。試験溶液または溶媒のみを金魚の腹腔内に投与し、数時間後に末梢血を採取した。試験物質としては Methylmethanesulfonate、Trp-P-2、1,2-Benzopyrene を用いた。スライドガラス上に末梢血細胞を挟みこむように、アガロースゲルを重層し、細胞溶解液で核を溶解した。次に、アガロースを氷上で静置して DNA の巻き戻しを行った後、電気泳動を行った。泳動後、静置して中和したのち DNA を染色し、画像解析装置を取り付けた蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察し、Tail moment および Tail Length を計測した。以上の操作の中で、最適な電気泳動時の電圧、電気泳動

時間、DNA unwinding 時間を検討した。また、処理施設排水口に魚類を直接飼育して試験を行うことを想定し、焼却場排水ならびに最終処分場排水中に金魚を飼育し、小核試験及びコマットアッセイを行った。

(4) トランスジェニックゼブラフィッシュ系の開発

トランスジェニック魚のすべての細胞には、変異原物質を検出するためのシャトルベクタープラスミド pML4 が組み込まれている。本法は、魚個体を変異原物質に曝露した後、このシャトルベクターを魚から取り出し、宿主大腸菌に感染させ、抗生物質に対する復帰変異株を調べて、変異原物質モニター遺伝子に生じた突然変異を検出する新しい遺伝子毒性試験である。

トランスジェニックゼブラフィッシュ系統には、シャトルベクター pML4 を約 350 コピー組み込んだ系統を用いた。また、標準物質として B[a]P、MeIQx を用いた。トランスジェニック魚と、非トランスジェニック魚をかけ合わせた受精卵より、胚にまで発生させ、溶媒のみを飼育水で希釈した対照群と、標準物質を飼育水で希釈した曝露群とに曝露した。曝露後は、飼育水で洗浄し、数日間飼育して変異を定着させた。この間にほとんどの胚は孵化して稚魚となった。稚魚よりゲノム DNA を抽出し、そこに含まれるシャトルベクターを自己環状化したのち、エレクトロポレーション法により、宿主大腸菌に導入した。この大腸菌を所定の培地にまき、復帰変異株のコロニーを数えて、突然変異頻度を算出した。また、コロニーから大腸菌を釣り上げて培養し、調製したプラスミド上の rpsL 遺伝子について、塩基配列を決定した。

2. 3 試験結果の評価手法の検討

(1) 動物細胞を用いた試験による評価

ヒト肝細胞由来細胞株 Hep G2 を用いた生存率試験は細胞内酸性フォスファターゼ (AP) 活性が生細胞数に比例することを利用した手法である。また、LDL 活性障害試験は特に肝細胞が持つ高い LDL 取込み能に着目した試験である。今回は、河川水試料ならびに浸出水試料を用いて、試験結果より、毒性に関与する化学物質を推定する手法について検討した。河川水試料には環境庁調査による国内 2 つの河川水を用いた。その化学分析項目は、phenol、hexachlorobenzene、aniline 等の 24 項目である。浸出水では、未処理浸出水を用い、オゾン処理、活性炭吸着処理を行ったもの、またゲルカラムを用い分子量分画を行ったものについて、ヒト正常細胞である TIG-1 を用いた AP 法にて細胞生存率試験を行っ

た。

(2) 数世代ラットを用いた生殖機能の評価

採取した焼却飛灰は粉碎し、粉末試料に混合して用いた。動物は雌雄 Jcl-Wistar 系ラットを用いた。対照群には (n=10) 固形試料のみを、飛灰群 (n=11) には飛灰混合試料を 1 ヶ月間与え、対照群同士、飛灰群同士を交配させた。得られた新生児を授乳期間を経て、雌雄分離した 2 世代目についても交配実験を行い、受胎率、体重変化、新生児数、雌雄比率、奇形の有無等を観察した。また、焼却飛灰混合試料を与えた 1 世代目のラットについて、血中のホルモンとポリフィリン代謝酵素活性を測定した。さらに、臓器の湿重量を測定した。

C. 研究結果

1. 有害物質の環境移行評価手法の開発

まず廃棄物管理における有害化学物質の対策を行うために、化学物質に優先順位を付ける方法について検討した結果、わが国にはこのような手法がないことが明らかにされた。そこでこのような手法について調査したところ、US-EPA が開発していたので、この報告書を詳細に検討した。この優先順位付けの特徴は、①PBT Characteristics、②Environmental Presence③Quantity / Prevalence ④RCRA Programmatic Concern の 4 つの基準を提案して、これらを 156 種類の化合物に対してある適当な境界値を 3 ~ 4 つ付けて 0, 1, 2, 3 というような離散的な点数付けを行い、これらを足し合わせて合計が最高 100 点となるようにアルゴリズムを作ったことにある。このアルゴリズムによって 156 種類の化合物の順位が付けられるとともに、これらの基準値を一つ一つ落とした場合の順位の変動特性を調べて、本手法の有効性が検証された。その結果、総スコアは 2-methoxy-5-nitrobenzenamine の 8.3 から鉛の 94.4 である。

また、昨年構築したサブスタンスフロー解析 SFA の検証を行った結果、産業廃棄物最終処分場への著しい鉛の蓄積が起り、これが実際の現象と異なることから、モデルの修正の必要性が明らかにされた。そこで分配係数を変化させたときの分配量の変動を検討したが、実際の現象を表すまでには至っておらず、モデルのさらなる修正の必要性が明らかにされた。

2. 有害物質の毒性評価手法の開発

2. 1 細菌試験系の適用性、標準化、簡易化に関する検討

(1) Ames 試験を用いた検討

焼却灰の溶媒抽出液をカラムクロマトグラフィーで分画したり、有機溶媒による連続抽出を用いて精製しても抽出原液より変異原性の検出感度が高くなることはなかった。浸出水中の変異原性物質を 8 種類の吸着樹脂で濃縮したところ、ブルーキチンや Porapak Rdx 等の選択的に物質を捕集できる樹脂で不明確な変異原性が認められたにすぎず、浸出水中の最適な濃縮樹脂を特定することはできなかった。また、複数の PAHs を Ames 試験に供した場合、変異原性強度に対する相乗作用は認められず、ほとんどが各単体の変異原性強度を加算した相加作用であること、また PAHs や飛灰の変異原性は、太陽光による影響はほとんど認められず、特に焼却灰では太陽光に対して安定であることがわかった。

(2) umu 試験を用いた検討

親株で S9 非存在下で 1,4-Dichlorobenzene、2,4,6-Trichloro-phenol の遺伝子毒性が検出されたが、GST 高産生株では今回用いた化合物の遺伝子毒性を検出できず、有機塩素系化合物の遺伝子毒性の検出に適当でないことがわかった。

(3) MRL 試験を用いた検討

マイクロプレート法で現在のところリファレンス物質に対して試験管法の 1/2 程度の感度が得られている。ここでは、エンドポイントを測定する反応基質が、近接する他のウエルの発光量に影響することがわかった。また、文献レビューより、開発中また実用化段階にある試験技術を調べ、いくつか自動簡易化の方向性を示した。

2. 2 魚類を用いた最終処分場浸出水モニタリング系の開発

(1) 最終処分場浸出水における有害物質の流出パターンの検討

ホウ素は、浸出水処理施設内ならびに放流水では環境基準値 1mg/L を越えていたが、放流先の河川水では平均して 0.005 mg/L と低いレベルにあった。また、カドミウムは、施設内ならびに岩盤水で環境基準値 0.01 mg/L を越えることがあったが、排水基準値 0.1 mg/L よりも低いレベルにあった。

(2) コメットを用いた魚類小核試験による検討

金魚を試験魚類として用いる場合、飼育する水の電気伝導度を 900 mS/m 以下にする必要があること、また、リファレンス物質の腹腔内投与にすることによって現場で感度を補正できる可能性が示された。

(3) 和金を用いた魚類小核試験と魚類コメットアッセイによる検討

コメットアッセイを行う場合、試料への暴露時間は 3 時間、末梢血で検定する場合、電気泳動は 30V、24 分、DNA unwinding 時間は 15 分が最適であることを明らかにした。実際にごみ焼却施設や最終処分場の放流水に金魚を暴露しながら飼育したところ、コメットアッセイでは 6 日目、小核試験では 9 日目にいずれも最大誘発頻度を示すことがわかった。

(4) トランスジェニックゼブラフィッシュ系の開発

トランスジェニック魚の胚を、benzo[a]pyrene、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline に曝露し、濃度依存性、再現性について検討した結果、両者とも、濃度依存性があること、突然変異頻度を有意に上昇させることが明らかになった。さらに、B[a]P によって生じた突然変異の一部について、塩基配列を決定した。

2. 3 試験結果の評価手法の検討

(1) 動物細胞を用いた試験による評価

まず、ヒト急性致死影響との相関が確認されている培養ヒト細胞を用いる 48 時間の生存率および LDL 取込み活性の阻害試験について、環境試料評価への適用を想定したプロトコールを作成した。確立したプロトコールにそって、河川水に対する試験系の応答曲線を、化学分析値、化学品に対する試験系の応答曲線と比較、解析したところ、当該河川水における毒性支配物質の候補として、アニリンを挙げることが出来た。また、国内埋立地浸出水についてオゾン処理による毒性削減効果を評価したところ、残存毒性は原水よりも高くなる一方であり、活性炭処理による毒性低減もわずかであった。また、分子量分画により、この毒性はこの処理過程で生じる親水性の低分子有機物質に主に由来すると推察された。

(2) 数世代ラットを用いた生殖機能の評価

1 世代目のラットでは、血液中の男性ホルモン以外の性ホルモン濃度の減少傾向が示された。また、ポルフィリンの代謝関連酵素活性に対する焼却灰摂取の影響はみられなかった。また、焼却灰摂取群において、1 世代目と同様、2 世代目においても受胎率の低下、新生児雌比率の増加、及び睾丸湿重量の減少（睾丸の萎縮）が観察された。

D. 考察

1. 有害物質の環境移行評価手法の開発

有害物質の優先順位付けにおいては残念なこ

とにわが国は、その手法を持っていない。そこで私たちは、US-EPA の chemical ranking method を利用することを提案した。ところが実際に本法を利用することには限界がある。わが国には本法で利用できるデータベースが非常に少ないからである。しかし、幾つかの行政上の対策を進めて行くには、とりあえず利用できるデータベースをプロトタイプでもよいから作成し、優先順位を付けることであろう。報告書では environmental presence として一例を紹介した。

一方、環境移行モデルの改良では2県の例から産業廃棄物最終処分場に入る鉛のフラックスを検討した。一般廃棄物最終処分場と同程度と考えてよい。モデルがおかしいのか或いは2県の例が代表値として問題であるのか確証は掴めないが、分配率を変えてみて各コンパートメントへの分配量の変化を見た。しかし、それでも産業廃棄物最終処分場への大きな蓄積を止めることはできなかった。抜本的なモデルの改良の必要性が示唆された。

2. 有害物質の毒性評価手法の開発

細菌を用いた遺伝子毒性試験系は、薬品や食品添加物等の検査で長く利用されており、試験手法自体は比較的確立されている。したがって、手法の標準化においては、廃棄物試料を菌株に曝露させる方法の整備が中心となる。まず、Ames 試験を用いた検討で、試料中の毒性の総合評価という意味では、用いた抽出および濃縮操作が他の物質にマスキングされていた新たな毒性物質を露にする可能性が少なく、逆に粗抽出液に対して感度を下げてしまうという意味で不利であることがわかった。よって、できるだけ化学物質を損なわないように、試料に手を加えないで試験菌株に曝露させる手法を考える必要がある。その一つとして、無濃縮の試料に対して、逆に菌濃度を上昇させるマイクロプレート法が挙げられ、現在検討中の umu 試験の ISO 規格でも取り入れられている。また、さらに感度を上昇させるため、エンドポイントを吸光度ではなく、蛍光発光または生物発光で測定する方法が考えられる。この際、生物発光を用いる MRL 試験では、反応基質の近接するウエルへの影響が指摘されており、試験手法の若干の改善が必要である。さらに、現場適用のためには、人手のかからない簡易化が必要であるが、その方向性として、バックテストのような簡易水質検査キット化、マイクロプレート試験操作のロボット化、さらに、連続監視が可能なバイオセンサー化が挙げられた。また、今回 umu 試験で否定的な結果の得られた有機塩素系化合物へ対応は、

廃棄物処理分野への毒性試験の適用でいつも問題となるところであり、今後も他の試験系に範囲を広げて検討してゆく必要がある。

魚類を用いた最終処分場浸出水モニタリング系は、*in vivo* の試験系を用いて、簡易な血液採取により、半連続的に長期間監視可能であるという利点を有する。今回、試料中で魚を飼育する手法の標準化され、また、浸出水中で小核誘発ならびに DNA 損傷が検出された。しかし、この手法の理想は浸出水処理水の放流口近くで魚類を飼育するという形態であるが、塩分濃度が高いという特殊なマトリックスの妨害を如何に緩和するかという問題が指摘された。希釈と魚種の変更が対策として考えられるが、前者では飼育装置が複雑になり、後者では試験手順や試験法の特徴を一から評価し直さなくてはならない。さらに、得られた結果の大きさが持つ意味も不明確である。これは、次に示すように、浸出水中の化学成分の流出パターンや処理操作の変化、他の試験法による結果と比較しながら、現場での試験の経験を積み重ねて解決してゆく必要がある。

手法の標準化および簡易化が進んでいる動物細胞試験を用い、試料および化学品での試験、試料の前処理前後の試験、ならびに化学分析値を比較して、問題となる化学物質を絞り込み、適切な処理法を選択する方法（毒性同定評価／毒性削減評価）が具体的に示された。これは、毒性試験を用いた監視結果を、単なる基準値だけでなく、具体的な対策に連動させる意味で重要であり、他の試験法でも同様な検討を進めてゆく必要がある。また、化学分析されている物質と実際の毒性応答を引き起こしている物質が一致しないことが多いことも、この取組みの重要性を示すものである。

ラットを用いた試験系はほ乳類の *in vivo* 試験であり、得られた結果が人の健康へのリスクに最も近い決定的な手法である。しかし、その手法にはモニタリング法としては、熟練、コスト、時間を要するという大きな欠点がある。今回検討した血中のホルモン濃度や酵素活性の測定は、このような制約の中で、できるだけ早期に生体に対する悪影響を捉える試みである。現状ではまだ、検討項目が少なく、これらマーカーの変化と受胎率等、実際の生体影響との対応はうまく関係付けられていないが、スクリーニング法である細菌試験、魚類試験また動物細胞試験で得られた結果より、最終的にリスクの所在を検証する手法として位置づけられる。

E. 結論

1. 有害物質の環境移行評価手法の開発

UE-EPA の化学物質優先順位付けモデル-Chemical ranking method が、廃棄物管理における有害化学物質の対策の優先順位付けに非常に有効であることが判明した。また、優先順位付けの一つの基準となる Environmental presence に関するわが国の出現特性を最終処分場の浸出水及び放流水について示した。

モデルの改良に関する検討では、実際の産業廃棄物最終処分場への鉛の調査からは計算値のような蓄積の傾向は示されず、モデルの改良の必要性が明らかとなった。

2. 有害物質の毒性評価手法の開発

手法に細かい問題点はいくつか指摘されているものの、ほとんどの手法の標準化が進んでおり、現場での試験の検証を通して、試験結果の大きさと対策レベルの対応付け、また、応答に関与する毒性物質の絞込むロジックを組み上げ、現場管理ツールとしての手法を簡易化、システム化することが今後の課題となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岩堀恵祐、富田直幸、梅田泰史、青山光太郎、下位香代子、木苗直秀：環境微生物を用いたコメットアッセイ操作条件の実験的検討、日本水処理生物学会誌、35(4)、261-270 (1999)
- 2) Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I.S., Kasahara, K., Tanakamaru, Z., Nakamura, H., Miyauchi, M., Kinase, N. and Hirose, M. : Promoting effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone on rat glandular stomach carcinogenesis initiated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.*, 59(9), 2045-2049 (1999)
- 3) Hirose, A., Nishikawa, A., Kinase, N. and Hasegawa, R. : 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone(MX) : Toxicological properties and risk assessment in drinking water. *Rev. Environ. Health*, 14(3), 103-120 (1999)
- 4) R. Shoji, A. Sakoda, Y. Sakai and M. Suzuki: Rapid bioassay of toxicity in environmental water by LDL-uptaking activity of human cells, *Water. Sci. Technol.*, 38, 271-278 (1998).
- 5) Amanuma, K., Takeda, H., Amanuma, H., and Aoki, Y. Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nature Biotechnology*, 18(1) : 62-5, 2000.

2. 学会発表

- 1) 井上雄三、山田正人、田中勝、坂口浩範、小

泉美枝子、サブスタンスフローアナリシスによる鉛の移動・蓄積および環境移行特性の把握、第10回廃棄物学会研究発表講演論文集、1999.10、大宮

- 2) 井上雄三、山田正人、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物質のサブスタンスフローアナリシス（第2報）、第7回衛生工学シンポジウム、1999.11、札幌

- 3) M.Yamada, Y.Inoue, K.Kinase, Y.oho, H. Yoshino, I.Ichikawa and M.Tanaka: Application of bioassay to solid waste management: a perspective, 第3回韓日廃棄物学会共同学術発表会, 5. 1999, Seoul

- 4) 山田正人、井上雄三、橋本昌洋：MRL 試験および魚類小核試験の廃棄物試験への適用性について、第10回廃棄物学会研究発表講演論文集、1999.10

- 5) M.yamada, N.Kinase, Y.Inoue and M.Tanaka: Standardization of fish micronucleus test for leachate monitoring, 第4回韓日廃棄物学会共同学術発表会, 5. 2000, Seoul

- 6) 田中 仁、木苗直秀、下位香代子、山田正人、井上雄三、田中 勝：金魚を用いる小核試験およびコメットアッセイによるゴミ焼却場試料の毒性評価?廃棄物処理システムにおける有害化学物質によるリスクの管理手法に関する研究(2)、第10回廃棄物学会研究発表会講演論文集Ⅱ、1999.10、大宮

- 7) 田中 仁、下位香代子、木苗直秀：生物検定に用いるための和金の Comet assay の条件検討、日本環境変異原学会第28回大会、講演要旨集、1999.12、岐阜

- 8) 鈴木基之、金範洙、藤井隆夫、酒井康行、迫田章義：細胞毒性試験による酸化・吸着処理における毒性削減、第34回日本水環境学会年会、2000、京都

- 9) 酒井康行、迫田章義、鈴木基之、内海英雄：ヒト細胞を用いる環境水複合毒性評価：庄司良、第5回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会、1999

- 10) 鈴木基之、金範洙、藤井隆夫、酒井康行、迫田章義：酸化・吸着処理における細胞毒性削減とその予測、第5回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会、1999

- 11) 庄司良、大村佳子、酒井康行、迫田章義、鈴木基之：化学物質複合毒性のバイオアッセイによる定量的評価、第33回日本水環境学会年会、1999

- 11) 天沼喜美子、青木康展、トランスジェニックゼブラフィッシュ胚を用いた変異原性の検出、第5回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合

同研究発表会講演要旨集、1999、東京

12) 天沼喜美子、青木康展、トランスジェニックゼブラフィッシュ胚を用いた変異原性の検出 Δ benzo[a]pyrene、MeIQx による突然変異の誘発 Δ. 日本環境変異原学会第 28 回大会、要旨集、1999、岐阜

13) 天沼喜美子、青木康展、水環境モニタリングに用いるトランスジェニックゼブラフィッシュの開発. 染色体学会第 50 回記念大会、要旨集、1999、西宮市

14) Kimiko Amanuma、 Development of transgenic zebrafish for detecting mutagens in water. International symposium of the Endocrine-Disrupting

Substance Testing in Medaka, Japan, Abstract ,2000, Nagoya

15) 天沼喜美子、青木康展、トランスジェニックゼブラフィッシュ胚による水環境中の変異原物質の検出. 日本薬学会第 120 年会、要旨集 4 2000、岐阜

G. 知的所有権の取得状況

発明の名称：「ヒト細胞を用いたバイオアッセイ装置」；発明者：東京大学生産技術研究所，酒井康行，鈴木基之，迫田章義，庄司良（特許出願中）

厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

有害物質の環境移行評価手法の開発

分担研究者 井上 雄三 国立公衆衛生院廃棄物工学部最終処分工学室長

研究要旨：廃棄物管理において有害化学物質の対策を行う場合、関心を示さなければならない物質は非常に多い。そこでここでは US-EPA で開発した優先順位付け手法をレビューし、その有効性を明らかにした。また最終処分場浸出水や処理水で検出された化学物質についてその検出頻度を調査した。一方、鉛の各コンパートメントへの配分について、特に著しい蓄積を示した産業廃棄物最終処分場について検討を行い、調査した鉛のフローから、モデルの改良を試みた。その結果、分配率だけでは実際の現象を説明できず、モデルの改良の必要性を明らかにした。

A 研究目的

昨年度の研究では鉛を例としてSFAによるフローとへの分配を解析したが、関心を示さなければならない化学物質は他に数多く存在する。本研究では US-EPA の有害化学物質のリスク管理のための優先順位付け手法を例にしてわが国における有害化学物質の生産量とフロー及び蓄積量を把握・管理するためにどの化学物質から行ったらよいかという、優先順位付けの手法を明らかにする。

一方、平成 10 年度の研究ではSFAを用いることによって鉛についての自然環境や生活環境等への人為活動エリア（コンパートメント）への分配や蓄積を評価した。しかし、産業廃棄物処理・処分、特に埋立への鉛の著しい集中が起り、実際の現象と異なることが明らかとなった。そこで本研究ではその原因を追及し、環境モデルの改良を試みる。

B 研究手法

(1) 化学物質の優先順位付け手法の確立

US-EPA の chemical ranking report (Project Number 92U-7200-001) を中心に、優先順位付け手法に関する文献調査を行い、優先順位付け手法の構造を明らかにし、わが国における利用で

きる情報を整理する。

(2) 環境移行モデルの改良

環境移行モデルによる鉛の各コンパートメントへの分配・蓄積は、当該コンパートメントからの分配係数によって著しく影響を受ける。そこでここではSFAによって得られた結果を既存のデータに基づき評価し、係数の選定によって対応できるのか、それともモデル自体の改良が必要かどうかを評価する。

C 研究結果

(1) 化学物質の優先順位付け手法の確立

化学物質のリスト化については小野、山田¹⁾がレビューしているのので、それを参照されたい。ここではリスト作成の方法論については、文献 1 に譲るとして、実際に“どの化学物質から対策をとっていくべきか”について、その方法論について EPA の Chemical ranking method を参考にしながら考察を加える。なお、日本における規制物質のリストとしては化審法規制物質（登録件数 368 件）、労働安全衛生法規制物質（同 1507 件）、消防法規制物質（同 5868 件）、毒物劇物取締法規制物質（同 1192 件）、高圧ガス取締法規制物質（同 1192 物質）、大気汚染防止法規制物質（同 67 件）、水質汚濁防止法規制物質（同 61 件）・・・等多くの規制物質が登録されている。

さらに環境庁は膨大な数の既存化学物質の調査を環境汚染の観点から系統的に進めるために、過去において有害性が知られている物質をリストアップし、これに生産量使用形態を考慮し、調査対象として検討が必要と考えられる約 2,000 物質を選択し、昭和 53 年度に「プライオリティリスト」を作成した。これは昭和 49 年から化学物質判定基準設定調査、既存化学物質検討調査、及び化学物質環境追跡調査等を実施することによって行われた。しかし、ここに示されたリストは幾つかを除いて千個以上になっており、これだけの化学物質を管理することは大変な労力とコストを必要とすることを前提としていること、さらにはその効果に疑問が残ることを認識しなければならない。そこでリスク管理の費用対効果を考慮すると、どの物質から管理をすればよいかという、優先順位付けが必要となる。残念なことにはわが国にはこのようなツールが未だに作成されていない。ところが、US 政府は廃棄物中の有害化学物質のリスク管理について化学物質のリスク管理の方法論として、chemical ranking methodology を作成、運用している。極めて参考となるので、ここに要約を示す。

1) US の chemical ranking method

ランキング手法は、リスクに関連する基準を EPA のプログラムされた基準に統合し、総合的な化学物質ランキングを作り上げるものである。リスクに関連する基準は重要である。というのは、EPA は重大性を評価するのに単独的に利用してきた化学物質量を乗り越えようとしているからである。WMNP (Waste Minimization National Plan) と GPRA (Government Performance and Results Act) の廃棄物最少化のゴールに関して PBT (Persistent, Bioaccumulative, and Toxic) 構成物質が注目されるのは、量と同様に PBT を考慮することが、ある化学物質に関するリスクポテンシャルの評価が重要になると認識したことからである。リスクポテンシャルを決定する

際に WMPT から PBT の情報を補完するため、このランキング手法は、化学物質が環境中で検出されたかどうかといったファクターや EPA のプログラムされたファクターも考慮される。というのは化学物質のリストの目的は、EPA RCRA の事業計画 program efforts を作り、廃棄物中の PBT 化学物質の最少化を推し進める際の州政府の事業をサポートするための根幹となるからである。

ここでは4つの主基準が化学物質の重要性を評価するものとして認識された。以下にその4つの基準とその理由を示す。

①PBT Characteristics

WMNP のゴールは、PBT 化学物質を削減することである。この基準はこのような化合物を特定するための手法を与える。

②Environmental Presence

この基準のもとでは、USA の環境データベースが利用され、環境中に存在する重要な化学物質を特定する。もしある化学物質が環境中に存在することが認定され、特にそれが環境中に関心あるレベルにあることが明らかにされると、今後の排出の削減や除去が必要となる。

③Quantity / Prevalence :

この基準は、化学物質がどのくらい広範囲に利用されているか、また生産されているかを評価するために廃棄物量や工業普及 industrial prevalence (生産者数或いは化合物を含んだ廃棄物を管理する保存・処理・処分施設数) といった指標を提供する。量とか普及状態が暴露ポテンシャルの指標になるとすると、大量とか多数生産者に関連する化学物質はこの基準のもとでは最高スコアを受け取る。

④RCRA Programmatic Concern :

WMNP ゴールは、有害廃棄物中の大部分の PBT 化合物を削減することである。それ故に、RCRA PBT List は、RCRA プログラムと自治体が関心を示す化学物質を示していなければならない。

各々の候補化学物質に対して、主基準のスコアに基づき相対的なスコアを配点する。スコア

リングシステムは、全ての主基準を同時に考慮するようになっている。このスコアリングのもとでは、1つの主基準の寄与が他を上回るとして重み付けをすることも可能となる。しかし、この解析では各々の主基準は同じ値(25点)と重みを持つとした。各化学物質に対して総スコアがその化学物質の主基準のスコアを合計することによって計算される。最大スコアは100点である。各主基準のスコアは、1つか他の同様な準基準のスコアによってスコアリングされる。各準基準に対するスコアは、WMPTを含む色々なデータソースからの情報を基にしてつけられる。分散スケール; 0, 1, 2, 3, 4 或いは 0, 1, 2, 3 でスコアリングすることになる。各データソースから求まるデータの分布を解析することによって、各分散スコアに割り当てられる境界値 *fencelines* を決めることが可能になる。この *fencelines* 値の選定は、その分布における自然な分割、或いはほぼ同等な大きさのグループに分布するといったようなファクターを考慮して判断する、これが基本となる。全ての主基準が同じ数の下位基準を有しているわけではなく、また同じ分散値を持っているわけではないので、総スコアとしては次式のような計算法を利用した。

Weighted Primary Criterion Score

$$= 25 \text{ points} \cdot \sum_i \frac{SC_i}{MaxSC_i} \cdot \frac{1}{n}$$

... eq.1

ここで、 SC_i = 準基準に対するスコア i ($i = 1 \text{ to } n$)

$MaxSC_i$ = 準基準 i に対する最大スコア

$1/n$ = 各準基準に対する重みファクター (1/主基準に関連する下位基準数に等しい)

主基準の総スコアは、化学物質ごとに総スコアを合計して求められ、このスコアを基にして順位付けがなされる。

ところで、化学物質の中には性質が似かよっているものがり、これらのものはグループ化される。特に、2つのグループが挙げられる。それらは PCB と PAH である。これらのカテゴリに入る化学物質は、下位準基準に対してカテゴリ内の最高スコアを用いることを基本とする。

ランキング手法が 156 種類の PBT の化学物質及びグループからなる候補化学物質に適用された。表 2 にこれらの化合物の順位を示す。この表からわかるように、各化学物質或いはグループは、総スコアに関係している。相対的な順位付けは総スコアに基づいている。最高スコアの化学物質、鉛にはランキング 1 位を与えた。同じスコアを持つ化合物は同じ順位とする。例えば、1,1,1-Trichloroethane、Anthracene、Chloroform、gamma-hexachlorocyclo hexane、Hexachlorobenze、Phenol は、総スコアが 67.4 で、ランキング 18 位となる。

総スコアは 2-methoxy-5-nitrobenzenamine の 8.3 から鉛の 94.4 である。重要な基準のスコアを検討してみると、鉛は 3 つの基準 (PBT Characteristics, Quantity and Prevalence, and RCRA concerns) で最高得点の 25 点を得ていることがわかる。一方、PBT Characteristics 1 点は、2-methoxy-5-nitrobenzenamine の 8.3 の結果を出している。

Fig.1 は総合的な化学物質スコアのヒストグラムである。スコアは何か 45-50 点の付近に分割点があるような様子を示している。10 化学物質しか 75 以上のスコアをもらっていない。一方、35 化学物質のスコアは 25 点以下である。上位にランクされた化学物質のリストは、このランキング手法が関心を集めているとしてしばしば認識される化学物質にスポットが当たるという結果を得ていることから有効であるとしている。

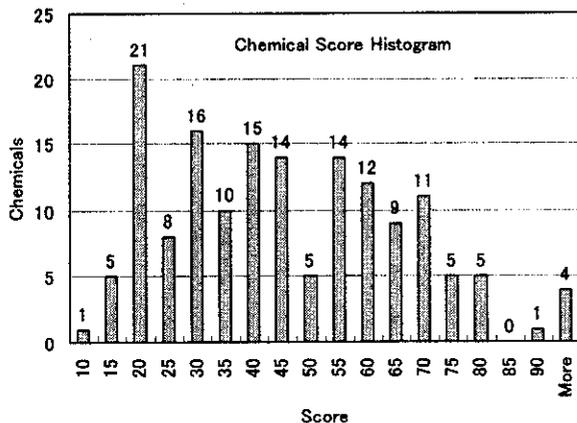


図1 化学物質の総点のヒストグラム

EPA はこれらの主基準がどの程度ランキングに影響を与えるかを調べている。一種の感度解析である。感度解析では次のような方法が用いられた。

①Importance of each primary criterion : 各主基準の1つを落として、ランキングの変化を評価する。

② Importance of RCRA Relevance and Environmental Presence : ランキング手法は単に PBT の考慮と量/普及で決まるとの議論があった。このことを検討するために、RCRA Relevance と Environmental Presence の両基準を落とした場合の影響を調べた。

③Fenceline (境界値) 選定の感度 : 量/普及基準に対する準基準のスコアを割り当てるために、fenceline の値は一般には判断によって決めるという方法がとられる。この影響を評価するために、fenceline 決定に対する代替法を応用した。

その結果、RCRA Relevance、Quantity/Prevalence、PBT のどちらかを落とすと、ランキングに重要な影響を与える。しかし、単一の下位基準だけではトップの 50 から 10 化学物質を置き換えるまでには至らない。Environmental Presence を落としてもランキングへの影響はあるが、他の3つの基準に比べると低い。RCRA Relevance 及び Environmental Persistence の2つを落とすと、トップ 50 の中に新たに 14 物質が入り、50 ランク以上に变化するものが 11 物

質というように、著しくランキングが変化する。

各領域の化学物質数が同じ程度になるようにとられた fenceline を変えても全体的なランキングにそれほど大きな影響は与えない。

以上の結果より、US-EPA の chemical ranking method が化学物質のランキング法として有効であることが判断できる。

2) PBT リストアップ化合物の最終処分場浸出水及び放流水における検出特性

表1, 2 はわが国の最終処分場の浸出水及び処理施設からの放流水における有機性化合物の検出特性を表したものである。この表のオリジナルは小野、山田¹⁾によるものであるが、さらに山田²⁾によって PBT スコアまで書き加えられ

表1 有機化合物の最終処分場浸出水、放流水における出現特性

PBTスコア	検出度数	不検出度数	非測定
PBTリストに存在しない化合物	159	500	
6	22	42	573
7	26	42	346
8	14	14	93
9	17	22	107

表2 PBTスコアが9(最高値)の有機化合物の最終処分場浸出水及び放流水における出現特性

検出化合物名	cas No	PBT 得点	検出		検出特性	
			限界	ng/L		%
3-Methylcholanthrene	56495	9	5	1/19	5.3	
Perylene	198550	9	2	1/19	5.3	
Benzo[<i>j</i>]fluoranthene	205823	9	2	1/19	5.3	
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	205992	9	2	1/19	5.3	
DDE, p,p'	72559	9	0.2	3/19	15.8	
indeno(1,2,3-cd)pyrene	193395	9	7	3/19	15.8	
DDD, p,p'	72548	9	0.6	4/19	21.1	
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	191242	9	4	2/8	25.0	
cis-Nonachlor	5103731	9	0.6	5/19	26.3	
gamma-Hexachlorocyclohexane	58899	9	1.6	6/19	31.6	
p-tert-octylphenol	140669	9	0.1	3/8	37.5	
1,2,3-trichlorobenzene	87616	9	0.3	8/19	42.1	
hexachlorobenzene	118741	9	0.1	9/19	47.4	
Fluoranthene	206440	9	2	9/19	47.4	
Nonachlor, trans-	4E+07	9	1	10/19	52.6	
phenanthrene	85018	9	7.5	11/19	57.9	
fluorene	86737	9	0.1	18/19	94.7	

たものである。ここでは検出率のみを示したが、情報としては、最終処分場の分類、サンプルの 카테고리（浸出水か、放流水か）、及び濃度等が含まれている。データを収集整備することにより、廃棄物最終処分施設における検出頻度、基準値オーバー頻度等の情報を得ることが出来るようになり、Environmental presence の基準の利用が可能となる。

(2) 環境移行モデルの改良

平成10年度においてはSFAを用いることによって鉛の自然環境や生活環境等への社会の各コンパートメントへの分配や蓄積を評価した。

実際の流れはマテリアルフローとして起こる。統計量についてみると人為活動のあるエリア（コンパートメント）ではマテリアルフローが統計資料によって把握できるが、生活系・産業系消費から最終処分に至るコンパートメントでは現段階ではその量を把握することが困難であり、

メントに鉛の蓄積が著しいという結果が出ている。本モデルでは、コンパートメント間において鉛の収支をとりながらフラックスを求めているので、また消費コンパートメントでの排出遅れ（廃棄するまでの期間）を考慮したモデルではないので、最終処分場への蓄積が多く評価されるという特徴を持っている。そこで、鉛の産業廃棄物最終処分場へのフローを検討した。表1は岡山県と広島県の燃えがらの鉛含有量である。計算上ではかなりの量の鉛が焼却や直接埋立を通して最終処分場へ流れることが示されたが、表に示すようにそれほど多くの鉛フラックスが生じていない。そこでどの係数ファクターが鉛のフラックスに影響を与えるかを検討した。表2は計算に使用した各コンパートメントの係数表である。これらの表の中で、産業系のフローにおいて影響を与えると思われる係数ファクターを抽出すると、生活系消費の一般および産業選別率、産業系消費の廃棄率、および産業系

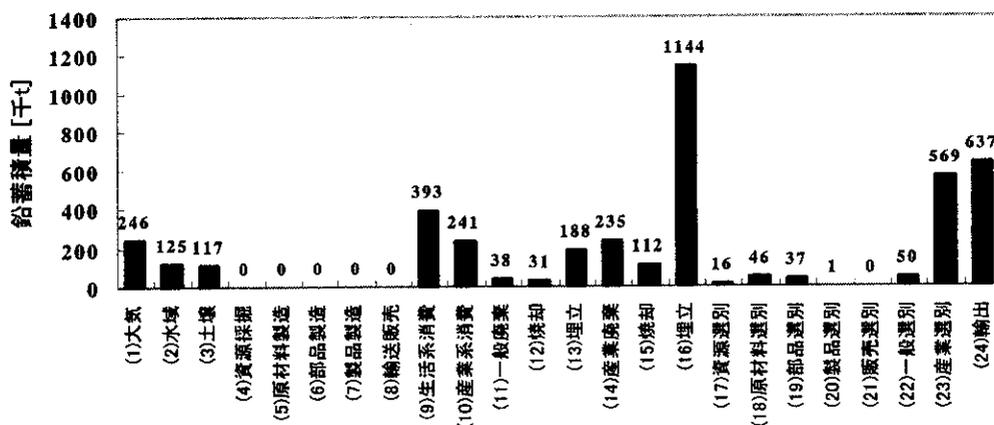


図 2 10年後の各プロセスにおける鉛蓄積量(改良型モデル)

サブスタンスフローで総括的に扱うしかない。昨年度の結果を再び示す(図2)。

この図によると産業廃棄物埋立のコンパート

選別の産業消費財廃棄率である。これらの係数を表3のように変化させ、各コンパートメントへの分配の変化を検討した。図3がその結果で

表1 燃えがらの鉛含有量(mg/kg)

	最大値	最小値	平均値	標準偏差	サンプル数
岡山県	4820	3.7	719	1138	36
広島県	4400	3.5	530	855	44

表3 SFAモデルにおける係数ファクターの変化

original の計数
生活系消費の一般/産業選別率の変化:一般(0.13→0.3),産業(0.87→0.7)
産業系消費の廃棄率を1→0.75
産業系選別の産業消費財廃棄率:0.385→0.1925

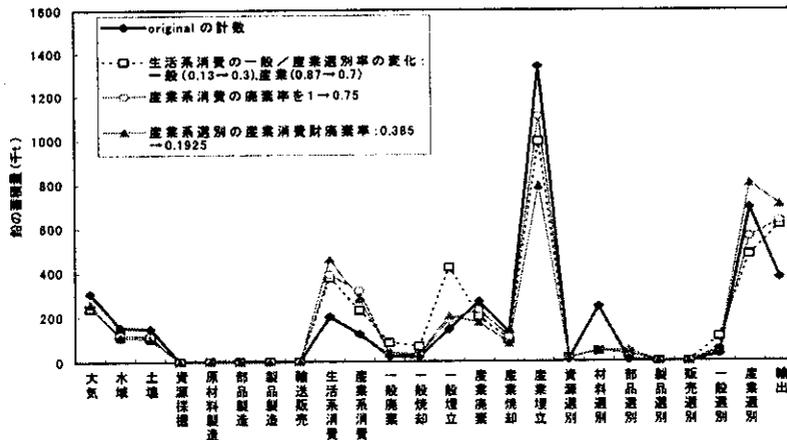


図2 SFAモデルの感度解析(係数ファクターを変化させた場合)

ある。これらの結果から、産業系選別の消費財廃棄率の影響がもっとも大きく 0.385 を 1/2 の 0.1925 にすると最終処分フラックスが半減することがわかる。生活系消費の一般および産業選別率が次に大きいく、産業系消費の廃棄率を 1 ~ 0.75 に低下させても、17%程度しか低下していない。産業系消費廃棄率を 1 以下にすることは、産業系に滞留を作ることである。滞留を作っても 10 年経過すると排出率がそれだけ大きくなることを示している。以上のように各コンパートメントの係数を変えることによって、最終処分蓄積量が大きく変化することがわかった。今後は産業廃棄物系の鉛のフラックスを調査し、より正確なモデルを作る必要がある。

D 結論

UE-EPA の化学物質優先順位付けモデル-Chemical ranking method が、廃棄物管理における有害化学物質の対策の優先順位付けに非常に有効であることが判明した。また、優先順位付けの一つの基準となる Environmental presence に関するわが国の出現特性を最終処分場の浸出水及び放流水について示した。

モデルの改良に関する検討では、実際の産業廃棄物最終処分場への鉛の調査からは計算値のような蓄積の傾向は示されず、モデルの改良の

必要性が明らかとなった。そこで、分配係数による分配率の変化を調べた結果、産業廃棄物最終処分場への蓄積量を大きく低下させることができ、モデル改良のヒントを明らかにした。

E 研究発表

1 論文発表

(なし)

2 学会発表

1) 井上雄三、山田正人、田中勝、坂口浩範、小泉美枝子、サブスタンスフローアナリシスによる鉛の移動・蓄積および環境移行特性の把握、第 10 回廃棄物学会研究発表講演論文集、1999.10, 1141-1143

2) 井上雄三、山田正人、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物質のサブスタンスフローアナリシス(第 2 報)、第 7 回衛生工学シンポジウム、1999.11, 37-42

G 知的所有権の取得状況

(なし)

表1 各コンパートメントにおける対象物質の分配率

(A) 自然環境因子

(1) 大気	分配率
水域移動率(2)	0
土壌移動率(3)	0
(2) 水域	分配率
大気移動率(1)	0
土壌移動率(3)	0
(3) 土壌	分配率
大気移動率(1)	0
水域移動率(2)	0

(B) 生産過程

(4) 資源採掘	分配率
大気発散率(1)	0.04
水域発散率(2)	0.002
土壌発散率(3)	0.002
原材料製造率(5)	0.92
資源輸出率(24)	0
廃棄資源率(17)	0.036
(5) 原材料製造	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0.0005
土壌発散率(3)	0.0005
部品製造率(6)	0.96
原材料輸出率(24)	0.01
廃棄資源率(18)	0.029
(6) 部品製造	分配率
大気発散率(1)	0.004
水域発散率(2)	0.001
土壌発散率(3)	0.001
製品製造率(7)	0.9
部品輸出率(24)	0
廃棄資源率(19)	0.094
(7) 製品製造	分配率
大気発散率(1)	0.0008
水域発散率(2)	0.0002
土壌発散率(3)	0
製品製造率(8)	0.9
製品輸出率(24)	0.095
廃棄資源率(20)	0.004
(8) 輸送販売	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0
土壌発散率(3)	0
生活消費率(9)	0.62
産業消費率(10)	0.38
廃棄資源率(21)	0

(C) 生活系消費過程

(9) 生活系消費	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0
土壌発散率(3)	0
一般廃棄率(11)	0
産業廃棄率(14)	0
一般選別率(22)	0.13
産業選別率(23)	0.87
(22) 生活系選別	分配率
大気発散率(1)	0.005
水域発散率(2)	0.001
土壌発散率(3)	0.005
資源リサイクル率(4)	0.1
原材料リサイクル率(5)	0.1
部品リサイクル率(6)	0
製品リサイクル率(7)	0
生活消費財廃棄率(11)	0.789

(D) 産業系消費過程

(10) 産業系消費	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0
土壌発散率(3)	0
産業廃棄率(14)	0
産業選別率(23)	1
(23) 産業系選別	分配率
大気発散率(1)	0.005
水域発散率(2)	0.005
土壌発散率(3)	0.005
資源リサイクル率(4)	0.24
原材料リサイクル率(5)	0.36
部品リサイクル率(6)	0
製品リサイクル率(7)	0
産業消費財廃棄率(14)	0.385

(E) 一般廃棄物処理過程

(11) 一般廃棄	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0
土壌発散率(3)	0
焼却率(12)	0.85
埋立率(13)	0.15
(12) 一般焼却	分配率
大気発散率(1)	0.01
水域発散率(2)	0.01
土壌発散率(3)	0
埋立率(13)	0.98
(13) 一般埋立	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0.01
土壌発散率(3)	0.001

(F) 産業廃棄物処理過程

(14) 産業廃棄	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0
土壌発散率(3)	0
焼却率(15)	0.5
埋立率(16)	0.5
(15) 産業焼却	分配率
大気発散率(1)	0.05
水域発散率(2)	0.05
土壌発散率(3)	0.05
埋立率(16)	0.85
(16) 産業埋立	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0.01
土壌発散率(3)	0.01

(G) 生産選別過程

(17) 資源廃棄物選別	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0.01
土壌発散率(3)	0.01
資源リサイクル率(4)	0
産業廃棄率(23)	0.98
(18) 原材料廃棄物選別	分配率
大気発散率(1)	0.01
水域発散率(2)	0.01
土壌発散率(3)	0
資源リサイクル率(4)	0.98
原材料リサイクル率(5)	0
産業消費財廃棄率(14)	0
(19) 部品廃棄物選別	分配率
大気発散率(1)	0.005
水域発散率(2)	0.0005
土壌発散率(3)	0.0005
資源リサイクル率(4)	0.3
原材料リサイクル率(5)	0.3
部品リサイクル率(6)	0.194
産業消費財廃棄率(14)	0.2
(20) 製品廃棄物選別	分配率
大気発散率(1)	0.001
水域発散率(2)	0.0005
土壌発散率(3)	0.0005
資源リサイクル率(4)	0
原材料リサイクル率(5)	0.3
部品リサイクル率(6)	0.3
製品リサイクル率(7)	0
産業消費財廃棄率(14)	0.398
(21) 輸送販売廃棄物選別	分配率
大気発散率(1)	0
水域発散率(2)	0
土壌発散率(3)	0
資源リサイクル率(4)	0
原材料リサイクル率(5)	0
部品リサイクル率(6)	0
製品リサイクル率(7)	0
産業消費財廃棄率(14)	0

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

廃棄物処理分野における総合的毒性評価手法の確立および自動簡易試験法の開発

研究分担者 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

最終処分場浸出水処理施設からの放流水に魚類を飼育して小核試験を行う場合の、試験魚類の適応性およびリファレンス物質の曝露方法について検討した。金魚を試験魚類として用いる場合、飼育する水の電気伝導度を 900 mS/m 以下にする必要があること、また、リファレンス物質の腹腔内投与による感度補正法の可能性が示された。また、細菌を用いた DNA 損傷性試験である MRL (Modified Rec-Lux) 試験の簡易化としてマイクロプレート法の開発を行い、リファレンス物質に対して試験管法の 1/2 程度の感度が得られた。さらに、現在、開発中また実用化段階にあるバイオセンサー等の試験技術をレビューし、自動簡易化の方向性を議論した。

A 研究目的

最終処分場浸出水処理施設からの放流水中で魚類を飼育し、遺伝子毒性物質の指標として小核試験を行うモニタリング系の開発を目的とし、塩類濃度が高い現場試料水への試験魚類の適応性およびリファレンス物質の曝露方法について検討した。また、細菌を用いた DNA 損傷性試験である MRL (Modified Rec-Lux) 試験の簡易化としてマイクロプレート法の開発を行った。さらに、現在、開発中また実用化段階にあるバイオセンサー等の試験技術をレビューし、自動簡易化の方向性を検討した。

B 研究方法

1 魚類小核試験を用いた浸出水モニタリング系の開発

魚類は水生生態系の食物連鎖上位の大型の脊椎動物であり、古来より、河川、湖沼、海域といった水系の健全さを測る目安であった。現在、バイオアッセイとしての主な魚類試験には、生

体/胚を用いた短期/長期間曝露における急性/慢性の行動異常、致死、成長阻害試験があり、例えば、上水試験方法には、水道原水の水中毒物の生物検定として、「魚類における常時監視法」(行動異常の連続監視)および「緊急時試験」(毒物確認のバッチ試験)が取り上げられている。最近では、環境に生育する生物や試験生物を用いた環境モニタリング手法として、致死や病変等に至る前の毒性物質に対する応答、すなわちストレス、解毒作用または遺伝子損傷等の痕跡をバイオマーカーとして監視する手法が目されており、外因性内分泌攪乱物質の指標とされる魚類ビテロジェニンが我が国でもよく測定されている。

本研究では、廃棄物処理・処分施設から排出される発ガン等の低濃度長期曝露型毒性を発現する物質の早期発見を目指して、遺伝子毒性試験の廃棄物処理分野への適用を進めてきた。昨年までに、モニタリングの場として最終処分場浸出水を想定し、試験法の一つとして、血中または組織細胞における小核誘発頻度をバイオマーカーを用いる魚類小核試験の標準化を考え、化学品への応答特性、再現性、浸出水試料抽出

物への応答を報告した。今回は、この試験系を現場飼育型のモニタリングツールとして用いるために必要な諸条件、試料への適応性とリファレンス物質の曝露方法について検討した。

1-1 魚類の浸出水への適応性の検討

(1) 浸出水試料

実験のための浸出水試料は Q 最終処分場より採取した。この処分場は埋立面積約 6,000 m² の衛生理立地であり、12 年前より一般廃棄物の焼却残渣を受け入れている。浸出水処理施設は処理能力が 25 m³/day であり、処理プロセスとして、第 1 凝集沈殿、生物学的硝化脱窒、第 2 凝集沈殿、砂ろ過、活性炭ろ過、キレート処理ならびに塩素消毒を備えている。今回は浸出水試料として消毒過程直前の処理水を採取した。採取した水は 20 L のポリタンクに入れ、実験まで 4±1℃ で保存した。

(2) 馴致実験

供試魚類には、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 年以内の個体を市販店より購入し、12 日間以上、実験室内で飼育した個体を試験に用いた。再構成水 (CaCl₂·2H₂O 0.294 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1233 g/L、NaHCO₃ 0.0647 g/L、KCl 0.0058 g/L) を入れたガラス製水槽 (750×400×450 mm) 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 1 週間に 3 回、5 分間で食べきる量だけ与えた。また、飼育条件として、光を 9 hr/day で照射し、温度を 20℃±2℃、酸素を空気飽和値の少なくとも 80% を保つようにした。実験開始から 7 日以上前に実験容器 (容量 2 L、150×250×170 mm) に移した。

実験では、浸出水処理水試料を脱イオン水で、×1~×1/48 に希釈した水槽、ならびにコントロールとして再構成水の水槽を用意し、それぞれに 2 匹ずつ魚を入れた。餌は 3 日に 1 回 0.2 g ずつ与え、3 日後、7 日後、10 日後に餌を与える前に水を入れ替えた。この際、金魚の各希釈試料への適応度をみる指標として、金魚の挙動を観察するとともに、水のに入れ替えの時に全て

の水をろ過して常法にて懸濁物質を測定し、みかけの餌の摂取率 [%、{(与えた餌 g-dry) - (残留する懸濁物質 g-dry) / (与えた餌 g-dry)} × 100] を求めた。

(3) 小核試験

馴致実験 10、14 日後に末梢血を採取して小核試験を行った。採取した末梢血は生理食塩水 (0.9%) で希釈し、予めアクリジンオレンジを塗布したスライドガラス上において蛍光染色し、落射式蛍光顕微鏡 (BX60/BX - FLA/PM 20、OLYMPUS) で血球を観察して (B 励起)、細胞 1000 個あたりの小核出現率を求めた。なお、1 試料ごとにスライドは 2 枚作成し、1 試料あたり、4000 個の細胞をカウントした。

1-2 リファレンス物質の曝露方法の検討

魚類小核試験では、①必ずしも遺伝系統が同一でない個体を試験に用いている、②小核の誘発は水温、水質マトリックス等の環境因子の影響を受けることから、応答の大きさを時間空間的に相互比較するためには、毒性が既知の標準品 (リファレンス物質) を用いた陽性対照試験を同時におこなう必要がある。そこで、浸出水排出口に魚類を直接飼育して小核試験をおこなう際のリファレンス物質の投与方法を決めるため、飼育水に溶かして (水経由で) 曝露させる系と、腹腔内投与により曝露させる系との関係を調べた。

(1) 曝露実験

供試魚類 (コメット) の入手、飼育法は 1-1 に示した通りである。陽性対照物質 (リファレンス物質) として、変異原であり、腹腔内経由で小核を誘発させることが既知のマイトマイシン C (MMC, 和光) を用いた。水経由での曝露では 2 L の再構成水に MMC を、0 mg/L、0.04 mg/L、0.4 mg/L、4 mg/L となるように溶かした。それぞれに馴致した金魚を 4 匹ずつ入れた。なお、餌は実験開始 24 時間前からは与えないようにした。腹腔内投与による曝露では、MMC を DMSO : 生理食塩水 (1:9) に溶解させ、0 mg/kg-BW (溶媒のみ)、1 mg/kg-BW、4 mg/kg-