

BW、8 mg/kg-BW となるように溶媒量 100  $\mu$  L/10g-BW に調製し、腹腔内にシリンジで投与して再構成水で飼育した。

## (2) 小核試験

曝露開始後 1、2、4、7 日後 (24 時間、48 時間、96 時間、168 時間後) に末梢血を採取、また 168 時間後には鰓を採取した。なお、各個体につき採血は 1 度限りとした。鰓は 0.1%トリプシン-BBS 溶液で細胞を解した後に、75 mM KCl 溶液で洗浄および酢酸-メタノール (1:20) 溶液で固定した。その他、末梢血の調製ならびに細胞の染色、観察方法は 1-1 に示した通りである。

## 2 MRL 試験のマイクロプレート系の開発

### (1) MRL 試験

試験菌株として、大腸菌において、*recA* 遺伝子にレポータ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。

オリジナルの試験操作手順は以下の通りである。

- 1) まず  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存しておいた菌の表面をエーゼでかきとり平板培地に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 日程度培養して復元する。
- 2) 次に滅菌した試験管に 5 ml の滅菌済みの LB 前培養培地を分注し、保存培地に形成された菌を植菌した後  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 晩 (16 時間) 振とう培養する。
- 3) 培養後の前培養液 1 ml を、LB 培地 100 ml に植菌し、3 時間、 $37^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm で振とう培養する。
- 4) 試験物質をクリーンベンチ内で、滅菌した試験管にジメチルスルホキシド (DMSO) で数段階に希釈し、全液量を 100  $\mu$  l になるように分注する。この時、DMSO の溶媒のみの陰性対照系も同時に作成する。

5) 試験物質を分注した試験管について、S9mix を 1ml 添加した系としない系を用意し、培養液を加えて全液量を 5 ml とし、更に  $37^{\circ}\text{C}$ 、200rpm で 2 時間振とう培養を続ける。

6) 培養終了後、培養液 200  $\mu$  l にエタノールで 10 倍希釈した *n-decyl aldehyde* を 20  $\mu$  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を用いて測定する。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、菌濃度を求める。

### (2) マイクロプレート法

上記の試験操作の 4) の段階より、マイクロプレート法の適用を試みた。

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、10  $\mu$  L をマイクロプレートのウェルに添加する。

5\*) 一晩培養液 90  $\mu$  L をマイクロプレートのウェルに加え、マイクロプレート用ルミノメーター内で  $37^{\circ}\text{C}$ 、200rpm で 2 時間振とう培養する。

6\*) マイクロプレート用ルミノメーター内で培養液 100  $\mu$  l にエタノールで 10 倍希釈した *n-decyl aldehyde* を 10  $\mu$  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) を測定する。また、測定後即座に培養液の OD600 を測定し、菌濃度を求める。

マイクロプレート用ルミノメーターには、LUMINOSCAN EL (Labsystems) を用いた。この装置は温度範囲  $20-43^{\circ}\text{C}$  の条件下で 1,800 rpm でプレートの振盪が可能であり、液量 5 - 530  $\mu$  L の分注装置を備えている。なお、今回は 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 (MMC) および Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) について、応答特性を調べた。陰性対照は DMSO (溶媒) のみを用いた。

## C 研究結果と考察

### 1 魚類小核試験を用いた浸出水モニタリング系の開発

#### 1-1 魚類の浸出水への適応性の検討

最終処分場Q施設の処理水槽から採取した水は、4,600 mS/m とほぼ海水の電気伝導度 (4,788 mS/m) と同じレベルにあった。したがって、この水で淡水魚である金魚 (コメット) を飼育するには希釈する必要があると考えられる。なお、日本の河川水における伝導度の平均値は 11.15ms/m である。

表1および2には、それぞれ、希釈率 1/3~1/48、1/3~1/6 における金魚の見かけの餌の摂取率を示す。両実験とも希釈率 1/3 では、3 日以内に魚は死亡した。魚が 10 日間生存できる限界が希釈率 1/4 程度 (電気伝導度 1,000 mS/m 程度) であり、また、比較的高い見かけの摂取率が得られたのは希釈率 1/5 (約 900mS/m) 以下であった。また、希釈率 1/48 においても 7 日目には見かけの餌の摂取率が減少し、10 日目に回復することを示している。表3には表2の実験をおこなった魚から採取した赤血球の小核誘発頻度を示す。全ての希釈率で陰性対照よりも高い小核誘発が観察され、希釈率 1/6 よりも 1/5 および 1/4 で小核誘発頻度は大きくなった。

### 1-2 リファレンス物質の曝露方法の検討

表4に、飼育水経由および腹腔内経由で MMC に曝露させた金魚 (コメット) の赤血球および鰓細胞における小核誘発頻度を示す。各投与量の分母が異なるので比較するのは科学的ではないが、目安として、飼育水を飼育水経由の曝露では、腹腔内経由の曝露よりも同等か若干高い dose-response の傾きを示し、曝露時間および細胞の種類によりその程度は異なっていた。現場設置型のモニタリング系を行う場合、適当な時間間隔での感度のチェックが必要となるが、この際に、以上のような関係を確立すれば、より簡便なりファレンス物質の腹腔内投与による感度補正が可能となる。

以上より、最終処分場浸出水処理施設で金魚を飼育して小核誘発を監視する場合、浸出水処理水の伝導度を 900 mS/m 以下のなるように希釈する必要があること、また、少なくとも 10

表1 浸出水希釈水における金魚の見かけの餌の摂取率 (1)

Dilution	day		
	3	7	10
1/3	dead		
1/6	64%	13%	54%
1/12	58%	46%	64%
1/24	60%	28%	66%
1/48	78%	52%	79%
control	78%	55%	71%

表2 浸出水希釈水における金魚の見かけの餌の摂取率 (2)

Dilution	day		
	3	7	10
1/3	dead		
1/4	12%	29%	11%
1/5	49%	40%	40%
1/6	52%	50%	45%
control	70%	69%	69%

表3 浸出水希釈水における金魚末梢血赤血球の小核誘発頻度

Dilution	Exposure time (days)		(o/oo)
	Exposure time (days)		
	10	14	
1/4	1.25	1.25	
1/5	1.25	1.25	
1/6	-	0.25	
control	0.00	0.00	

表4 MMC による金魚の小核誘発頻度 (o/oo)

#### 飼育水経由

Conc. (mg/L)	Exposure time (days)				
	Peripheral erythrocyte				gill
	1	2	4	7	
4.00	1.75	1.75	2.25	10.25	6.50
0.40	1.25	1.00	1.75	9.75	6.00
0.04	1.00	1.00	1.25	8.75	5.25
control	0.00	0.00	0.00	0.25	4.50

#### 腹腔内経由

Dose. (mg/kg)	Exposure time (days)				
	Peripheral erythrocyte				gill
	1	2	4	7	
8	1.50	2.25	4.00	9.25	6.50
4	0.75	1.75	3.75	8.50	5.25
1	0.50	1.25	2.50	8.50	5.25
control	0.00	0.00	0.00	0.50	4.75

日間は浸出水処理水に馴致した後に試験を行う必要があることがわかった。さらに、本試験は 1/6 程度希釈した浸出水処理水においても応答があ

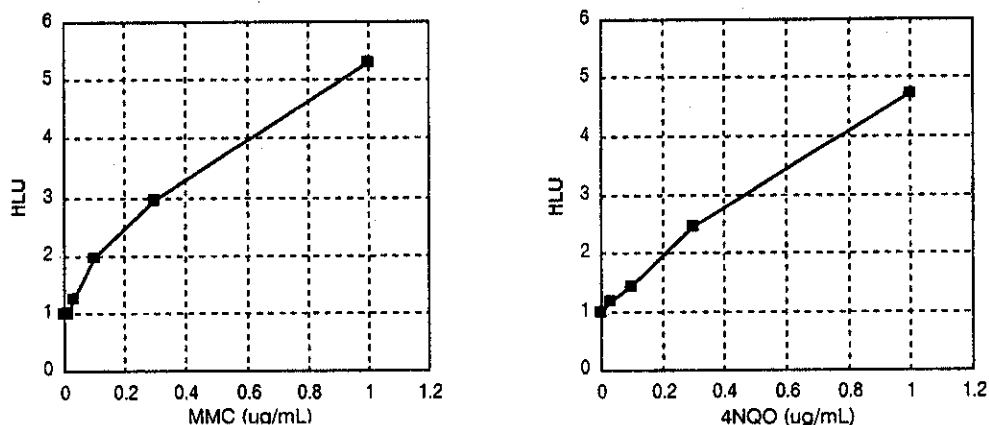


図1 MMCおよび4NQOに対するMRL-マイクロプレート法の応答

ることがわかった。しかし、全体的な生態系への影響を考えると、淡水魚が容易に死滅してしまうほど塩分濃度が高い排水を淡水域に放流すること自体に問題があるともいえる。

## 2 MRL 試験のマイクロプレート系の開発

マイクロプレート法で得られた MMC および 4NQO の dose-response 曲線を図 1 に示す。それぞれの最小検出濃度（陰性対照の 2 倍の発光量を与える検体濃度）はそれぞれ、約 0.1、0.2 µg/mL となり、試験管を用いた系での結果（それぞれ 0.05、0.076 µg/mL）の 2 倍の値となった。また、同一プレートを使用して時間をずらして測定する場合、アルデヒドが揮発して未測定ウェルの菌株に影響する（陽性対照存在下で発光量が減少）ことがわかった。今後の課題として、培養・誘導時間や検体／菌体比の最適化、また、n-decyl aldehyde に代わる反応基質の検索等を行い、感度の上昇および妨害因子の除去を進めてゆく必要がある。

## 3 自動化されたバイオアッセイ手法の概要

まず、自動化の究極の形であるバイオセンサー技術の現状を USEPA の文書、“Biosensors for Analytical Monitoring (Kim R. Rogers and Marco Mascini (1999), <http://www.epa.gov/crdlvweb/>

chemistry/ biochem/ intro.htm)”よりまとめた。バイオセンサーは、図 2 に示すように酵素系、免疫系、遺伝子系、微生物代謝等による生体認識部と電極、圧電素子、光変換素子、サーミスタ等の信号変換部の組み合わせで構築されており、現状では表 5 に示すような化学物質の検出例が報告されている。今後、遺伝子毒性試験のバイオセンサー化を目指し、MRL 試験等の発光をエンドポイントとした細菌試験と光変換素子の組み合わせを考え、適当な菌株の検索・開発とセンサーの形態（バッチ型／連続型）の検討を進めてゆく必要がある。

また、より短期での実現性の高い簡易分析装置としては、試料を連続または間欠的に注入して装置に流し、一連の反応、定量操作を行うフロー方式と、マイクロプレート法における試料の分注・添加・反応・測定等の試験操作をロボット化する自動バッチ方式が考えられた。前者では *umu* 試験の自動化（小林ら、水環境学会誌、20(11), 732-737, 1997）がフロー式の水質比色分析装置を改良した装置（図 3）で実証されており、後者では改良発光細菌遺伝毒性試験法（白石ら、環境化学、9(2), 329-338, 1999）で提案されているマイクロプレート法の試験操作手順（図 4）をロボット化することが考えられた。

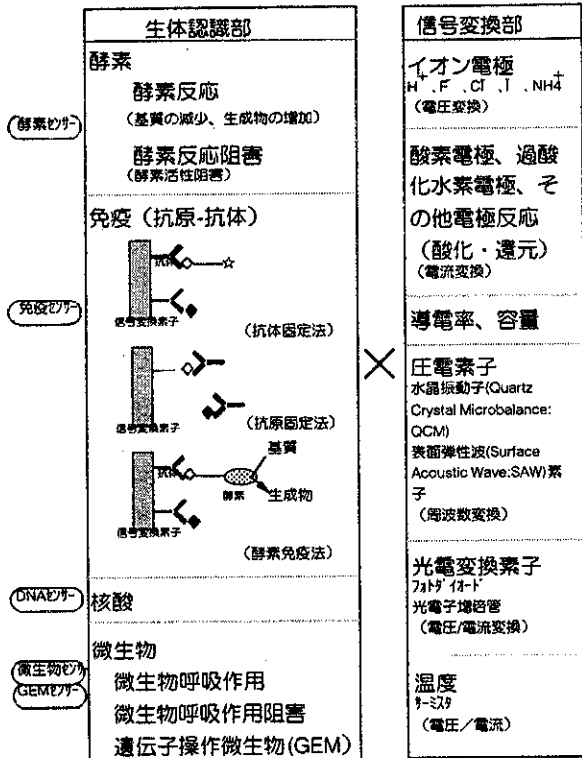


図2 バイオセンサーの分類

表5 バイオセンサーで検出が報告されている化学物質 Kim R. Rogers and Marco Mascini (1999) より

分類	対象物質名	方式
農薬	alachlor	免疫センサー
	triazines	免疫センサー
	imidazolinones	免疫センサー
	cyclodienes	免疫センサー
	2,4-D	免疫センサー、GEMセンサー
	organophosphates/carbamates	酵素センサー、免疫センサー
	dithiocarbamates	酵素センサー
	diphenylureas	免疫センサー
	sulfonylureas	酵素センサー
	有機物	benzene/toluene/ethylbenzene/xylene
chlorobenzoates		GEMセンサー
formaldehyde(aqueous/vapor)		酵素センサー
peroxides		酵素センサー
organonitriles		酵素センサー
explosives(TNT,RDX,HMX)		免疫センサー
phenol(aqueous/vapor)		酵素センサー、微生物センサー
chlorophenols		酵素センサー
cyanide		酵素センサー、GEMセンサー
polychlorinated biphenyls (PCBs)		免疫センサー、GEMセンサー
benzo(a)pyrene		免疫センサー
nitrate		微生物センサー
sulphite		酵素センサー
naphthalene		GEMセンサー
重金属		Zn,Hg,Cu,V,Ni,Ag,Pb,Cr,Co
生物学的パラメータ	multi-compound toxicity (重金属、2,1-4類、除草剤、界面活性剤) (microorganism)	GEMセンサー、微生物センサー
	multi-compound toxicity (enzyme)	酵素センサー
	photosystem inhibition	酵素センサー
	biological oxygen demand (BOD)	GEM、微生物、酵素センサー
	DNA damage	DNA組み込みセンサー
	Bacterial (同定/計数)	免疫センサー、DNA配列センサー

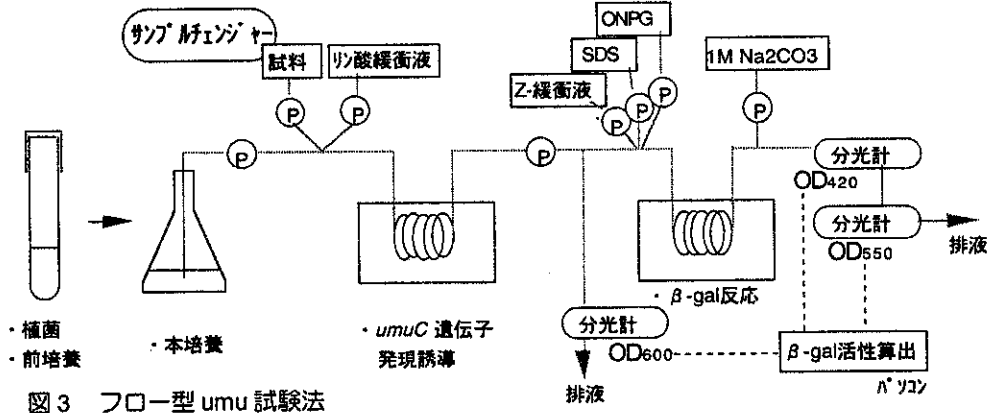


図3 フロー型 umu 試験法

小林、小野、宗宮、毛利、水環境学会誌 Vol.20 No.11, pp.732-737 (1997)に掲載図を一部改変。

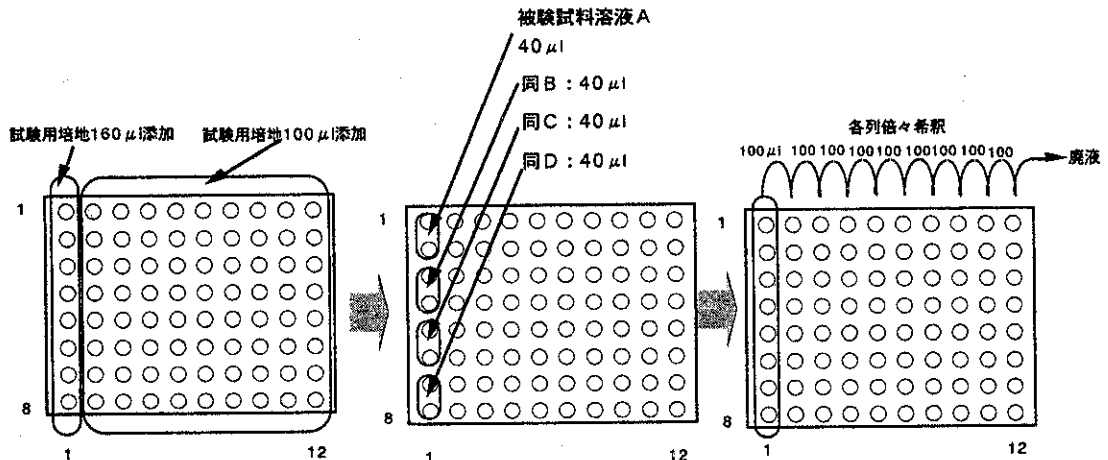


図4 改良発光細菌遺伝毒性試験法 (96 ウェルプレート使用) 手順 白石ら (1999) より

## D 結論

金魚を最終処分場浸出水中に飼育して小核試験を行う際には、浸出水の塩分濃度が高い場合には希釈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の可能性が示された。また、MRL 試験のマイクロプレート法を開発し、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、試験法の自動簡易化の方向として、バイオセンサー化と簡易分析装置のあり方を議論した。

## E 研究発表

- 1 論文発表  
(なし)

## 2 学会発表

- 1) M. Yamada, Y. Inoue, K. Kinae, Y. Ono, 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
- 2) 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会, 10.1999, 大宮
- 3) M. Yamada, N. Kinae, 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

- ## G 知的所有権の取得状況
- (なし)

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

研究分担者 木苗直秀 静岡県立大学食品栄養科学部教授

研究要旨

水環境中に含まれる変異・がん原物質について水生生物を用いた短期スクリーニング法を確立し、実際にフィールドワークとして適用することが可能か否かを試した。その結果、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、DNAunwinding 時間は15分が最適であることを明らかにした。実際にゴミ焼却場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した。これらの結果を考えると環境水中の変異・がん原物質のスクリーニングには金魚を用い、両変異原性試験を併用することが望ましいと考えた。

A 研究目的

Singh らは、個々の細胞レベルで DNA 損傷性を調べる目的でアルカリ条件下で電気泳動を行い、1本鎖切断とアルカリ易溶出部位を検出できるコメットアッセイを開発した。現在までに種々の条件検討がなされてきた。従来コメットアッセイは、架橋形成剤などの crosslink する物質を検出することは、できなかった。しかし、Pfuhrer と Wolf らは、架橋形成剤が、DNA の移動を阻害することを利用してそれらの検出を可能にした。また、コメットアッセイが、他の変異原性を検出する試験法と比較して検出感度が高く、簡便であるとする報告もあり、Leroy らは、同じ DNA 損傷を検出する試験法であるアルカリ溶出法やニックトランスレーション法と比較し、コメットアッセイ法が感度が高くまた、相対的に簡便で、且つ実験日数当たり多くのサンプルを試験することができることを報告している。

コメットアッセイの特徴としては、(1) DNA の検出感度が高い。(2) 個々の細胞レベルでデータを採取することにより細胞集団による平均的な反応では検出不可能な統計解析が可能であ

る。(3) 非常に少ない細胞サンプルで試験ができる。(4) いかなる有核細胞も解析対象となりうるなどがあげられ、それ故、現在、注目を集めている試験法である。In vivo 実験では、哺乳類、魚類、貝類など多くの生物が用いられている。

コメットの解析法としては、尾のある核の出現率を求める方法、コメットを損傷の度合いによってタイプ分けする方法、コメットの長さ(Tail length)を測定する方法、画像解析装置を用いる方法などがある。

上述のように本試験法は、様々なバリエーションがあるため研究グループによりデータに差違が生じている。そのため、至適な実験条件を決定する必要がある。そこで、化学物質への暴露時間、電気泳動条件などの条件を検討することにした。また、設定できた実験条件を用いて環境中の変異原のモニタリングに実際に活用できるか否かを検討するため静岡市内の2ヶ所のゴミ処理場施設の排水を用いて金魚を飼育し実用化の可能性を検討することにした。

B 研究方法

## B 研究方法

### 1. コメットアッセイ実用化のための条件検討

#### 1-1 金魚に対する暴露時間の検討

##### (1) 試験溶液の調製

Methylmethanesulfonate (MMS, Aldrich) を、40、80、160mg/kg、Trp-P-2 (acetate form) (和光純薬、生化学用) を 5、13、20mg/kg の濃度になるように生理食塩水に溶解した。また、1,2-Benzopyrene (和光純薬、特級) を 50、100、250mg/kg の濃度になるように Dimethyl sulfoxide (SIGMA) に溶解した。

##### (2) 金魚

静岡市内の観賞魚店で購入した。精製水中 (水温約 20℃) で 1 週間以上馴化した後実験に使用した。

##### (3) 投与

(1) の試験溶液 100 $\mu$ l を金魚の腹腔内に投与した。また、コントロールとしてそれぞれ溶解した溶媒 (生理食塩水、DMSO) 100 $\mu$ l を投与した。

##### (4) DNA 損傷性の検定

投与 1、3、6 時間後に末梢血を採取してコメットアッセイを行い、さらに画像解析を行った。

##### (i) 試薬の調製

##### ① 普通アガロース (NMP Agarose)、低ゲル化温度アガロース (LMP Agarose)

普通アガロース (AGAROSE Type Low EEO, SIGMA) と低ゲル化温度アガロース (GTG AGAROSE, SIGMA) をそれぞれ 1%、2% の溶液になるように 0.85% の生理食塩水を加えた。また、使用する前に電子レンジで加熱溶解した。

##### ② 細胞溶解液 (Lysing solution)

NaOH (和光純薬、特級) 3g を精製水 450ml に溶解し、EDTA · 2NA (和光純薬、特級) 18.6g、NaCl (和光純薬、特級) 73.2g、Tris (TRIZMA BASE, SIGMA) 0.6g、Na Sarcosinate (和光純薬、特級) 5g を加え、6N NaOH で pH を 10 にした後、精製水を加え最終液量を 500ml とした。この溶

液に Triton X-100 (SIGMA) 5.5ml、Dimethylsulfoxide (DMSO, SIGMA) を加えよく混ぜた後、冷蔵庫で保存した。

##### ③ 中和用緩衝液 (0.4M Tris buffer)

Tris 48.5g を精製水 950ml に溶解し、6N HCl で pH を 7.5 に調整した後、精製水を加え最終液量を 1000ml とし、冷蔵庫で保存した。

##### ④ 染色液

Ethidium bromide (EtBr, MERCK) を 20 $\mu$ g/ml の濃度になるように精製水に溶解し、冷蔵庫で保存した。

##### ⑤ DNA の巻き戻し (unwinding) および電気泳動用緩衝液

NaOH 12g、EDTA · 2NA 0.37g 精製水を 1000ml に溶解し、冷蔵庫で保存した。

##### (ii) プレートの作成

コメットアッセイ用のアガロースについてプレコート、第 1 層、第 3 層には、NMP Agarose、第 2 層には LMP Agarose を用いた。プレコートとして、50 $\mu$ l スライドガラス上に滴下し別のスライドガラスの側面で寒天を広げた後、平らな面の上に置き、乾燥機 (50℃) に入れて乾燥させた。第 1 層ゲルとして 75 $\mu$ l をプレコート済みのスライドガラス上に滴下し別のスライドガラスをかぶせてアガロースを広げ、水平において固化させた。次いでかぶせてあるスライドガラスを横に滑らせるようにしてはがし、加熱溶解後、約 45℃ に保温しておいた LMP Agarose を魚の末梢血 10 $\mu$ l に対して PBS1000 $\mu$ l 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。さらに第 3 層ゲル 100 $\mu$ l を重層し同様に固化した。

##### (iii) 核の溶解

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

##### (iv) DNA の巻き戻しと電気泳動

核を溶解後、直ちにアガロースを電気泳動層に移して陽極側に並べ、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 15 分間静置して DNA の巻き戻しを行った後、20V で 24 分間、電気泳動を行った。

(v) 中和

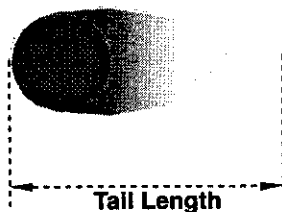
泳動後、アガロースゲルをガラスシャーレに移し、アガロースゲルが完全に浸るまで中和用緩衝液を加え、20 分間静置した。

(vi) 染色および顕微鏡観察

アガロースゲルに 20 μg/ml の Ethidium bromide 液 50ml を滴下して染色し、カバーガラスをかぶせた。その後、プレートを蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(vii) 画像解析装置によるコメットの解析

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 (Fig.0)。1 スライド当たり 50 個の細胞について計測した。



$$\text{Tail Moment} = (\text{Tail mean} - \text{Head.mean}) \times \text{Tail\%DNA} / 100$$

$$\text{Tail\%DNA} = (\text{Tail.Opt.In} / (\text{Head.Opt.In} + \text{Tail.Opt.In})) \times 100$$

Opt.In=Optical Intensity

Fig.0 Tail Length and Tail Moment

1-2 電気泳動時の電圧の検討

(1) 試験溶液の調製

MMS を一定の濃度になるように生理食塩水に溶解した。

(2) 金魚

静岡市内の観賞魚店で購入した。精製水中 (水温約 20℃) で 1 週間以上馴化した後実験に使用した。

(3) 投与

(1) の試験溶液 100μl を金魚の腹腔内に投与した。また、コントロールとして生理食塩水 100μl を金魚の腹腔内に投与した。

(4) DNA 損傷性の検定

投与 3 時間後に末梢血を採取し電気泳動時の電圧を 20、30V で行う以外は、1-1 (4) に準じてコメットアッセイを行ったのち、画像解析を行った。

1-3 電気泳動時間の検討

(1) 試験溶液の調製

MMS を一定の濃度になるように生理食塩水に溶解した。

(2) 金魚

静岡市内の観賞魚店で購入した。精製水中 (水温約 20℃) で 1 週間以上馴化した後実験に使用した。

(3) 投与

(1) の試験溶液 100μl を金魚の腹腔内に投与した。また、コントロールとして生理食塩水 100μl を金魚の腹腔内に投与した。

(4) DNA 損傷性の検定

投与 3 時間後に末梢血を採取し電気泳動時間を 15、24、60 分、電圧を 30V で行う以外は 1-1 (4) に準じてコメットアッセイを行ったのち、画像解析を行った。

1-4 DNA unwinding 時間の検討

(1) 試験溶液の調製

MMS を一定の濃度になるように生理食塩水に溶解した。

(2) 金魚

静岡市内の観賞魚店で購入した。精製水中 (水温約 20℃) で 1 週間以上馴化した後実験に使用した。

(3) 投与

(1) の試験溶液 100μl を金魚の腹腔内に投与した。また、コントロールとして生理食塩水 100μl を金魚の腹腔内に投与した。

(4) DNA 損傷性の検定

投与 3 時間後に末梢血を採取し unwinding 時間を 15、30 分、電気泳動時の電圧を 30V で行う以外は 1-1 (4) に準じてコメットアッセイを行ったのち、画像解析を行った。



## 2. ゴミ処理場排水へのコメットアッセイと小核試験の適用

### 2-1 焼却場排水 (A) について

金魚 (和金  $10 \pm 1$  g, 1群4匹) を網かごに入れ、焼却場内の貯水槽中で暴露した。暴露 3、6、9、12 日後に金魚を取りだし、末梢血と鰓を採取したのち、小核試験及びコメットアッセイを行った。

### 2-2 最終処分場排水 (B) について

最終処分場から採水した排水をイオン交換水で 2 倍に希釈し、実験室内で金魚 (和金  $10 \pm 1$  g, 1群4匹) を暴露した。水は、3 日毎に交換した。暴露 3、6、9、12 日後に金魚を取りだし、末梢血と鰓を採取したのち、小核試験及びコメットアッセイを行った。

### 2-3 小核試験

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。

#### (1) 末梢血

採取した末梢血を牛胎児血清で希釈しアクリジンオレンジで染色済みのスライドガラス上に滴下しカバーガラスをかぶせた。

#### (2) 鰓

採取した鰓は、トリプシン溶液で組織を均一にした後、メタノール：酢酸 (20:1) 溶液でスライドガラス上に固定し、アクリジンオレンジで染色した。

それぞれ作製したものを蛍光顕微鏡で観察し幼若赤血球 1000 個中の小核を有する細胞数を計測した。

### 2-4 コメットアッセイ

1-2 に準じて操作した。採取した末梢血を PBS で希釈後、アガロースと混合しスライドガラス上に滴下した。アガロースゲルを細胞溶解

液で処理し、DNA の巻き戻しを行いアルカリ条件下で電気泳動した。電気泳動後、中和しエチジウムブロマイドで染色した。染色したものを蛍光顕微鏡で観察した。画像自動解析装置を用いて Tail moment と Tail length を調べた。

## C 研究結果

### 1. コメットアッセイ実用化のための条件検討

#### 1-1 暴露時間の DNA 損傷性に及ぼす影響

標準物質を金魚に投与した後の暴露時間を変えて検討した。MMS で誘導される DNA 損傷の結果を Fig.1、Fig.2 に、1,2-Benzopyrene で誘導される DNA 損傷の結果を Fig.3、Fig.4 に、Trp-P-2 に誘導される DNA 損傷の結果を Fig.5、Fig.6 にそれぞれ示した。

MMS を 160mg/kg 投与し暴露 1 時間後の結果では、Tail moment、Tail length とともに、コントロールに比べ高い値を示した。暴露 3 時間後では、40、80、160mg/kg の濃度で Tail moment、Tail length とともに、コントロールに比べ高値を示した。また、暴露 6 時間後では、80、160 mg/kg 投与の個体でのみ、コントロールに比べ高値を示した。

1,2-Benzopyrene の場合、暴露 1、3、6 時間後に、Tail moment、Tail length が、コントロールと同程度の値を示した。

Trp-P-2 の場合、暴露 1、3、6 時間後に、Tail moment、Tail length が、コントロールと同程度の値を示した。

#### 1-2 電気泳動時の電圧の DNA 損傷性に及ぼす影響

電気泳動時の電圧を 20V あるいは 30V に変えてコメットアッセイを行った。その時の Tail moment と Tail length の細胞間分布と平均値を Fig.7 に示した。

生理食塩水を投与した個体では、20V および 30V では、Tail moment、Tail length がいずれも同様な分布を示した。また、Tail moment、Tail length の平均値にも 20V、30V の場合に類似の値を示

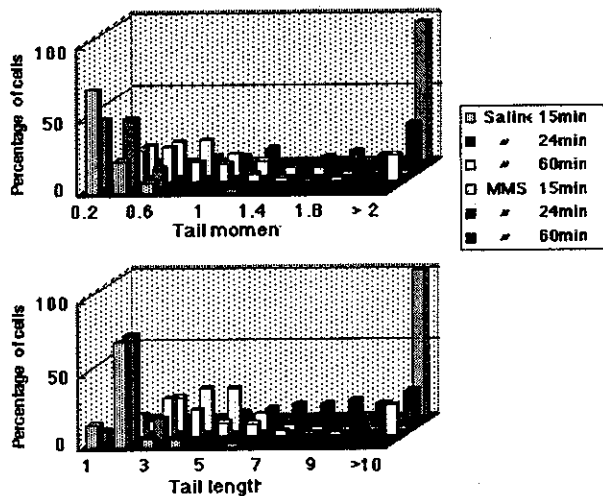


Fig.8 Effect of Electrophoretic Time on Cellular DNA Damage

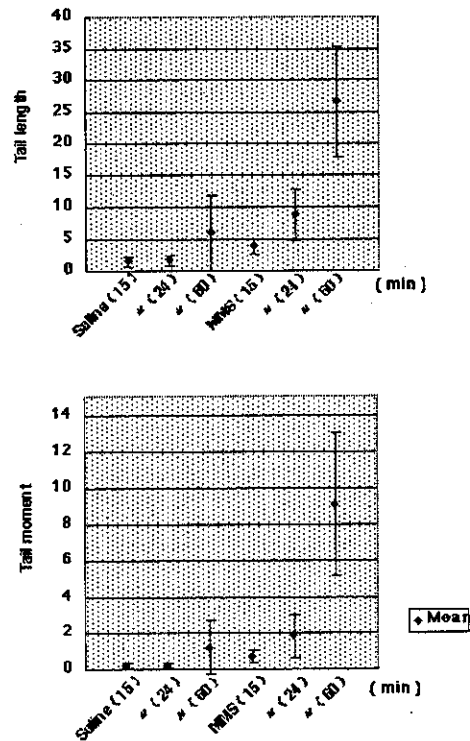


Fig.9 Effect of Electrophoretic Time on Cellular DNA Damage

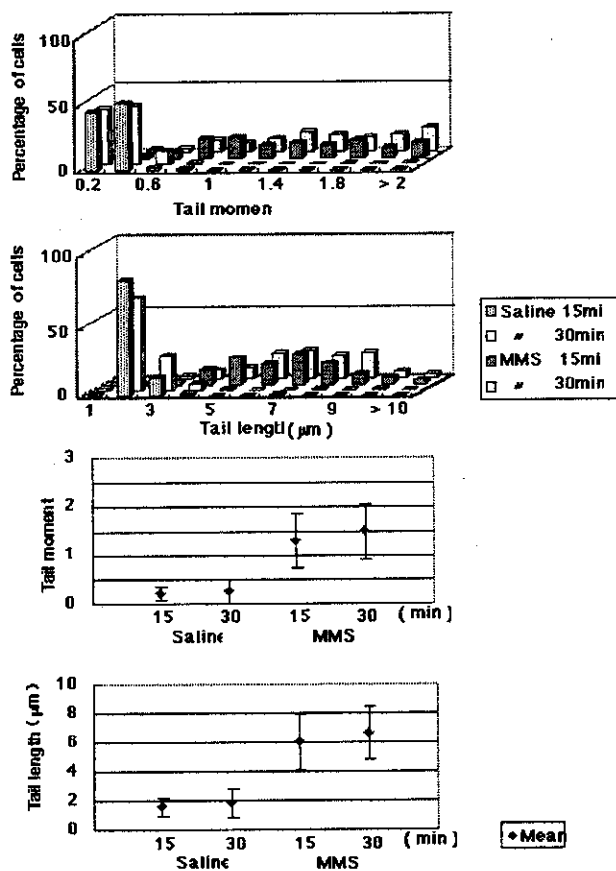


Fig.10 Effect of DNA Unwinding Time on Cellular DNA Damage

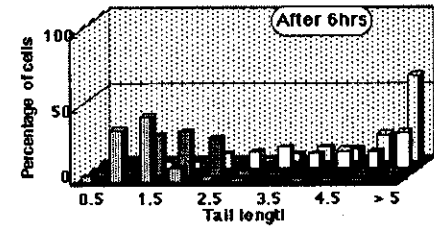
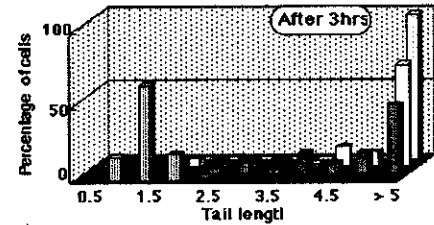
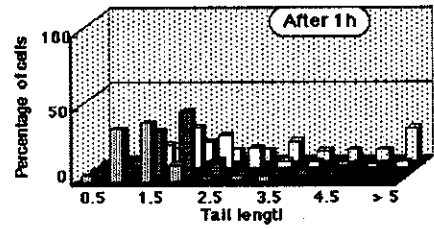
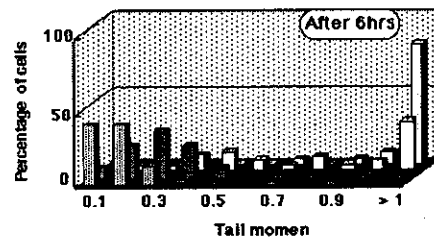
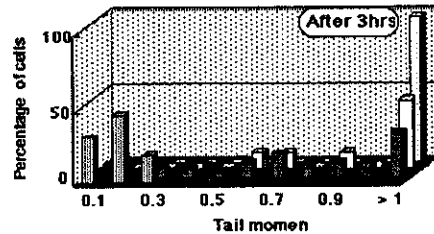
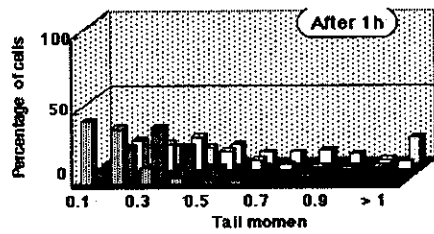


Fig.1 Distribution of Cellular DNA damage induce by Methylmethanesulfonate (Tail moment)

Fig.2 Distribution of Cellular DNA damage induce by Methylmethanesulfonate (Tail length)

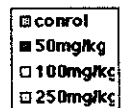
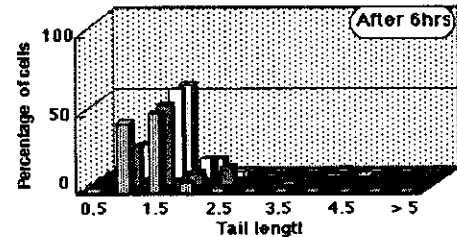
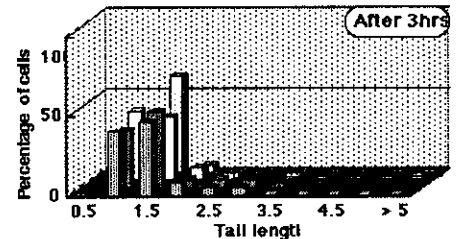
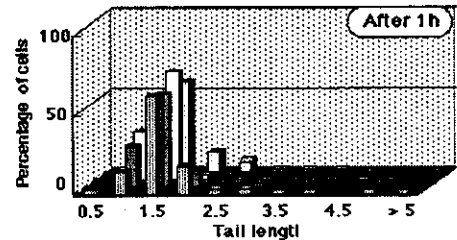
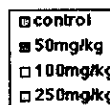
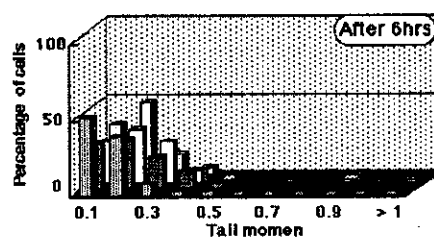
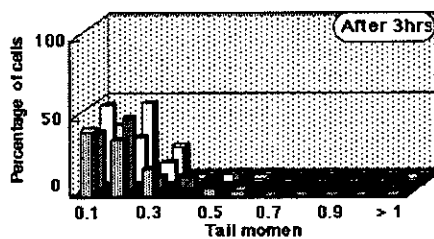
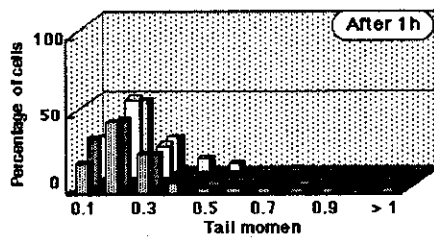


Fig.3 Distribution of Cellular DNA damage induce by 1,2-Benzopyrene (Tail moment)

Fig.4 Distribution of Cellular DNA damage induce by 1,2-Benzopyrene (Tail length)

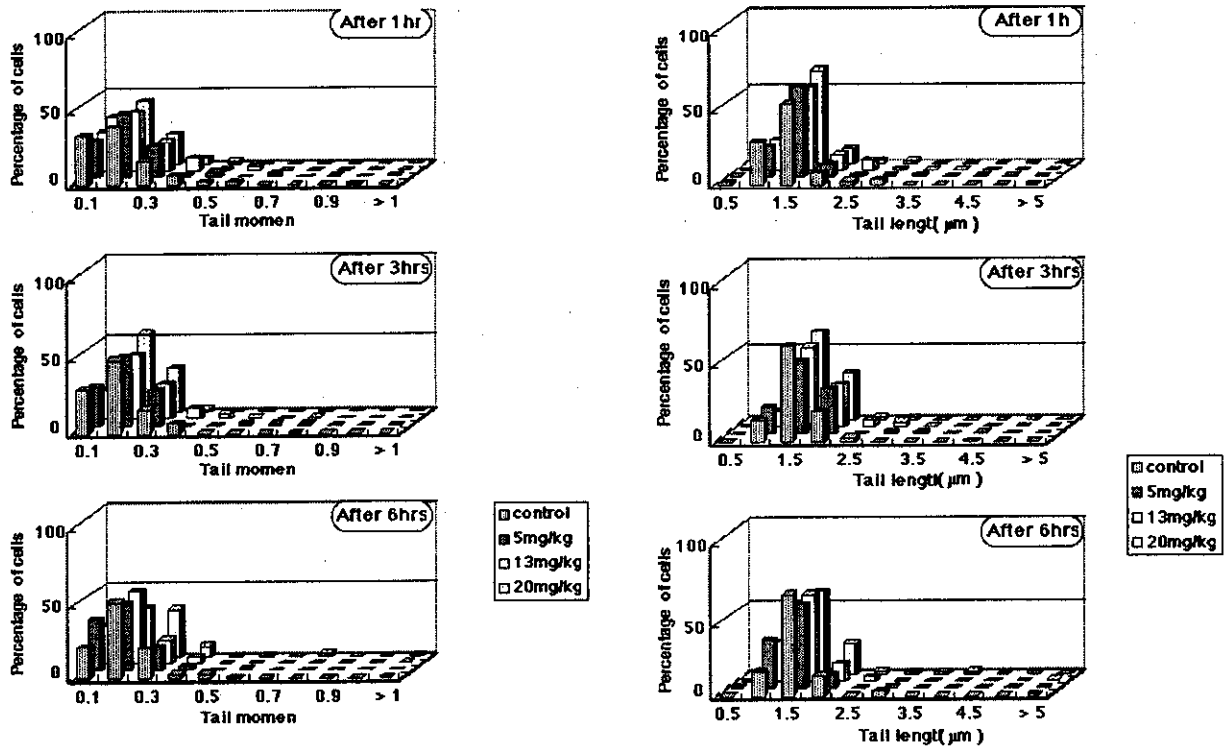


Fig.5 Distribution of Cellular DNA damage induce by Trp-P-2 (Tail moment)

Fig.6 Distribution of Cellular DNA damage induce by Trp-P-2 (Tail length)

した。なお、Standard deviation (SD) は、20V に比べ、30Vの方が大きな値を示した。

MMSを投与した個体については、Tail moment、Tail lengthともに20Vに比べ30Vの方が、グラフが右の方にシフトしていた。また、Tail moment、Tail lengthの平均値についても20Vに比べ30Vの方が大きな値を示し、SDも20Vに比べ、30Vの方が大きな値を示した。

### 1-3 電気泳動時間のDNA損傷性に及ぼす影響

電気泳動時間を15分、24分、60分と変えてコメントアッセイを行った。その時のTail momentとTail lengthの細胞間分布をFig. 8に、またTail momentとTail lengthの平均値を、Fig. 9に示した。

生理食塩水を投与した個体については、Tail moment、Tail lengthともに、15分と24分比べ、60分のグラフは、右側にシフトし、また、MMSのTail moment、Tail lengthも15、24分比べ、60分のグラフは、右側にシフトした。

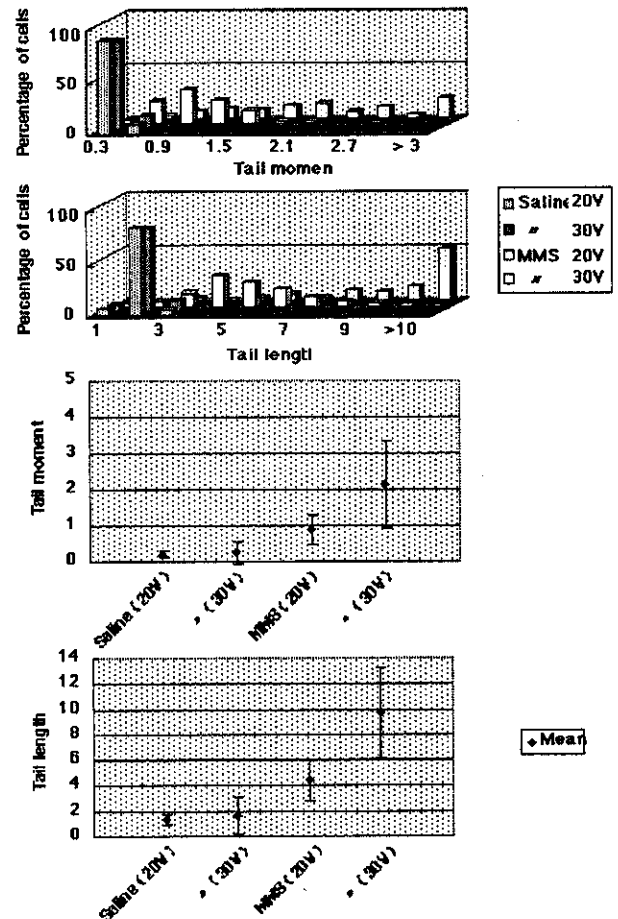


Fig.7 Effect of Electrophoretic Voltage on Cellular DNA Damage

生理食塩水を投与した個体の Tail moment、Tail length の平均値は、15 分、24 分に比べ、60 分で高値を示した。また、Tail moment、Tail length の SD も、15、24 分に比べ、60 分が高値を示した。MMS を投与した個体の Tail moment、Tail length の平均値は、15 分<24 分<60 分の順で高値を示した。また、SD も同様の結果を示した。

#### 1-4 DNA unwinding 時間の DNA 損傷性に及ぼす影響

DNA の unwinding 時間を 15 分、30 分と変えてコメットアッセイを行った。その時の Tail moment と Tail length の細胞間分布と平均値を Fig.10 に示した。

生理食塩水を投与した個体では、15 分、30 分の Tail moment、Tail length はいずれも同様の分布を示した。また、MMS も 15 分、30 分の Tail moment、Tail length が類似の分布を示した。

生理食塩水を投与した個体の Tail moment、Tail length の平均値は、15 分、30 分ともに同程度の値を示した。また、MMS も Tail moment、Tail length の平均値は、15 分、30 分ともに同程度の値を示した。また、SD も同様の結果を示した。

#### 1-5 電気泳動時間と DNA 損傷性との関連

Tail moment と電気泳動時間との相関を Fig.11 に示した。また、Tail length と電気泳動時間との相関を Fig.12 に示した。Tail moment と電気泳動時間は、MMS で相関係数 0.996、生理食塩水で 0.976 と非常に高い相関が見られた。また、Tail length と電気泳動時間についても MMS で相関係数 1.000、生理食塩水で 0.978 と非常に高い相関が得られた。

#### 2. ゴミ処理場排水へのコメットアッセイと小核試験の適用

小核試験の結果を Fig.13 に示した。焼却場排水に暴露した金魚の場合、末梢血と鰓はともに暴露時間の増加にともない徐々に小核誘発頻度が増加し 9 日目に最大値を示したのち低下した。

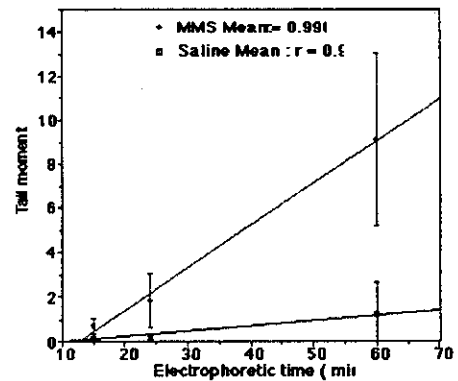


Fig.11 A Correlation between Electrophoretic Time and Tail moment

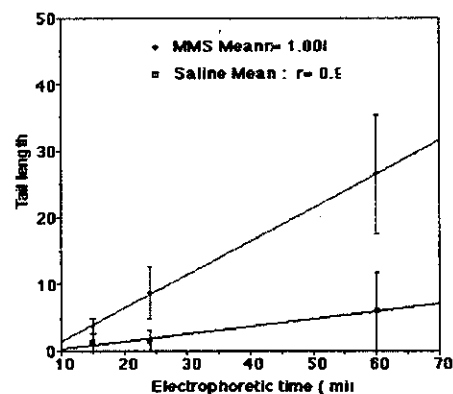


Fig.12 A Correlation between Electrophoretic Time and Tail length

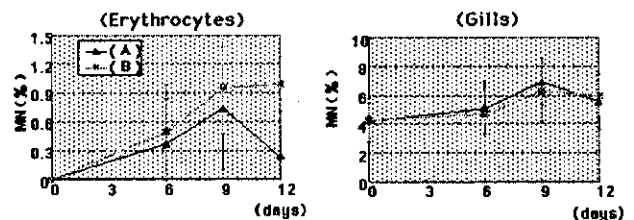


Fig.13 Frequency of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes and Gills of Goldfish Exposed to Sewage A and B

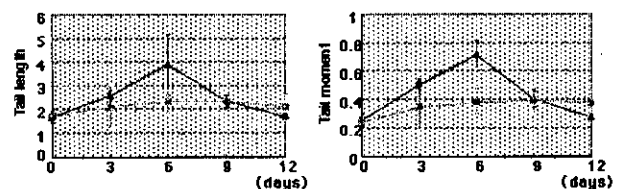


Fig.14 DNA Damaging Potency of Sewage A and B on Peripheral Erythrocytes of Goldfish

一方、最終処分場の排水に暴露した場合、末梢血と鰓はともに暴露時間の増加にともない徐々に小核誘発頻度が増加し 9 日目以降はプラトーとなった。

コメットアッセイの結果を Fig.14 に示した。焼却場排水に暴露した金魚の場合、暴露時間の増加にともない徐々に Tail length と Tail moment ともに値が増加し 6 日目に最大値を示したのち低下した。それに対して最終処分場の排水に暴露した場合、暴露時間の増加にともない徐々に Tail length と Tail moment ともに値が増加し 6 日目以降プラトーとなった。

## D 考察

### 1. コメットアッセイ実用化のための条件検討

コメットアッセイは、主に単細胞で DNA 鎖切断を測定する試験法である。低融点アガロースに細胞を懸濁させマイクロスライドに乗せた後、Lysing buffer に浸し細胞溶解を行った後 DNA unwinding、電気泳動、中和、染色を行う。電気泳動の間、切断された DNA は、陽極の方に移動し Comet tail を形成する。DNA 損傷を受け、断片化した DNA は、サイズに逆相関的に移動する。また、DNA 移動距離は損傷の大きさに比例して増加するものと考えられている。そこで、金魚の末梢血を用いたコメットアッセイの最適条件を検討した。DNA unwinding と電気泳動時の温度の増加により DNA migration が増加し、15℃ または、それ以上の温度でコントロールの細胞で Comet が誘導されたため、10℃ 以下で行うことが望ましいとされているので、DNA unwinding と電気泳動は、氷浴上で行うこととした。

コメットアッセイの条件検討を行うため、変異原性が知られている数種の化合物 (MMS、1,2-Benzopyrene、Trp-P-2) を金魚の腹腔内に投与し暴露時間 (1, 3, 6 hours) を変えコメットアッセイを行った。その結果、MMS では、投与後 3 時間の暴露で Tail moment と Tail length いずれも最高値を示した。しかし、1,2-Benzopyrene、

Trp-P-2 では、Tail moment と Tail length でいずれの暴露時間でもコントロールと同程度の分布しか示さなかった。佐々木らは、1,2-Benzopyrene が肝臓と肺では、DNA 損傷を誘導するが、1 時間、3 時間、24 時間暴露後の骨髄において DNA 損傷の誘導は、示されなかったとしている。そのため、1,2-Benzopyrene は、末梢血を用いるコメットアッセイでは検出できないこと、1、3、6 時間以外の時間が最適な暴露時間であることなどが考えられた。MMS 投与後 6 時間の Tail moment と Tail length の値は、投与後 3 時間の Tail moment と Tail length の値より低下していた。これは、損傷した部分の修復または、アポトーシスにより損傷した細胞の除去が行われていると考えた。MMS を用いた場合、投与後 3 時間の暴露が最も感度がよいことがわかった。そのため以下の条件検討の暴露時間を 3 時間で行うこととした。次に電気泳動時の電圧 (20V、30V) を変えコメットアッセイを行った。その結果、電圧を高くする (20V→30V) ことによって Tail moment と Tail length がいずれも増加した。また、20V より 30V の電気泳動でコントロールのスライドと MMS 暴露のスライドに大きな差が示された。それ故、電気泳動時の電圧は、20V より 30V の方が望ましいと考え、以下の条件検討の際には、30V で行うこととした。

電気泳動時間 (15 分、24 分、60 分) を変えコメットアッセイを行った。その結果電気泳動時間の増加に伴い Tail moment と Tail length がいずれも増加した。また、電気泳動時間の延長に伴いばらつきも増加した。電気泳動時間の増加に伴い、コントロールと MMS 暴露で Tail moment と Tail length の平均値の差も増加した。しかし、60 分の電気泳動時間では大部分の細胞が 15 分、24 分の細胞に比べ Tail が長く観察が非常に困難であった。それ故、電気泳動時間は、24 分が最適であると考え、以下の条件検討の際には 24 分で行った。

DNA unwinding 時間 (15 分、30 分) を変えコメットアッセイを行った。15 分、30 分の Tail moment と Tail length は、いずれも類似した値を

示した。そのため、unwinding 時間を 15 分と設定した。

以上の条件検討から金魚を用いたコメットアッセイの実験条件は、暴露時間 3 時間、電気泳動条件 30V、24 分、DNA unwinding 時間 15 分が最適であることが明らかとなった。

## 2. ゴミ処理場排水へのコメットアッセイと小核試験の適用

焼却場の放流水に暴露した個体で小核試験及びコメットアッセイの値が最大値を示した後、低下したことについては以下のことが考えられた。第 1 に金魚が、網に入れられていたこと、流入してくる水の影響で貯水槽中の水が激しく揺れることなどのストレスにより小核誘発や DNA 損傷が惹起された可能性があること、第 2 としては、最大値を示す期間（6～9 日）までは、小核を誘発する物質や、DNA 損傷を誘発する物質が放流水中に存在したが最大値を示した後は、影響を及ぼさない量に減少した可能性等が考えられた。これらのことからさらに長い期間の暴露実験や他の同種施設における暴露実験が必要であると考えている。

## E 結論

金魚を用いたコメットアッセイについて測定条件を検討した結果、化学物質への暴露時間は 3 時間、電気泳動条件は 30V、24 分、DNA unwinding 時間は 15 分が最適であることが明らかになった。また、実際にゴミ焼却場放流水に金魚を暴露することによりコメットアッセイでは 6 日目に最

大値を示した。小核試験では 9 日目に最大誘発頻度を示したことから、両試験の併用がより有効であることを確認した。

## 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., Kinae, 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 1-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.*, 59(9), 2045-2049 (1999)

(3) Hirose, A., Nishikawa, A., Kinae, 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)

### 2. 学会発表

(1) 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、p.1144-1146、1999 年 10 月

(2) 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 (岐阜)、講演要旨集、p.136、1999 年 12 月

## 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

廃棄物最終処分埋め立て地のリスク管理手法

分担研究者 小野芳朗 岡山大学環境理工学部

研究要旨

廃棄物の最終処分場を対象とし、浸出水の安全性を評価すべく、いくつかのツールを適用した。ここでは重金属類と、多環芳香族炭化水素の含有量、ならびにこれら化学分析と連動させた形で、現場の水を濃縮することなく、バイオアッセイ系に与えることで、安全性を評価しようとしている。本報告では、重金属類のデータに関して、ホウ素、カドミウム、塩類に関して示された。

A 研究目的

廃棄物のひとつの最終処分場（安定型）を対象とし、そこからの浸出水の安全性を評価すべく、いくつかのツールを適用した。我々は重金属類と、多環芳香族炭化水素の含有量、ならびにこれら化学分析と連動させた形で、現場の水を濃縮することなく、バイオアッセイ系に与えることで、安全性を評価しようとしている。本報告では、その調査の概要と重金属類のデータに関する考察を述べる。

1 プラズマ発光分析装置

重金属類の分析にはセイコーインスツルメンツ（株）のSPS1700Hを用いた。分析条件は以下の通りである。

検量モード：検量線法（検量線次数：1，重み付け：無）

測光高さ：10.0 mm

キャリアガス：1.0 L/min

プラズマガス：16.0 L/min

補助ガス：0.5 L/min

パージガス：OFF

スリット幅：常

B 研究方法

表1 分析条件

元素	波長(nm)	BG 補正方法	ピーク 検出	分光器	積分時間 (秒)	積分回数 (回)	積算回数 (回)	ホトマル 電圧
B	182.641	無し	PSM	B	1.0	3	1	L
Na	588.995	無し	PSM	A	1.0	3	1	L
K	766.490	無し	PSM	A	1.0	3	1	H
Ca	317.933	無し	PSM	B	1.0	3	1	L
Al	167.080	無し	PSM	B	3.0	5	3	H
Mn	257.610	無し	PSM	B	3.0	5	3	H
Fe	238.204	無し	PSM	B	3.0	5	3	H
Zn	213.856	無し	PSM	B	3.0	5	3	H
Sr	407.771	無し	PSM	B	3.0	5	3	H
Cr	205.552	無し	DPM	B	3.0	5	3	H
Ni	221.647	無し	DPM	B	3.0	5	3	H
Cu	324.754	無し	PSM	B	3.0	5	3	H
Cd	214.438	無し	PSM	B	3.0	5	3	H



高周波出力：1.3 kW

分析順序：試料毎

液性：水溶液

各元素ごとの分析条件に関して、表 1 に示す。ただしクロム、ニッケル、銅、カドミウムは超音波ネブライザーを使用した。

## 2 試料の採取

### 2-1 周辺環境

浸出水試料を採取した A 市安定型一般廃棄物最終処分場は台地・小起伏の広陵地が広い面積を占める盆地を山地とした盆地南縁の海拔 350m 以下の小起伏山地にある。この小起伏山地は、主として古生層と中生代後期に溢流したと思われる流紋岩からなる。流紋岩質岩の性質は耐圧強度 100-400kg/c m<sup>2</sup>程度となっており、特色は灰白色～灰黒色のものが多く、大部分は殻礫凝灰岩及び凝灰岩からなる。礫種は流紋岩質岩、凝灰岩粘土岩を多く含む。風化深度は約 10m 以浅で、傾斜 20-40 度の急傾斜が広がっている。なお、処分場は谷地を利用している。周辺土壤は乾性褐色森林土壤及び褐色森林土壤で、特色は流紋岩を母体とする土壤であり、土層は一般的に薄く緊密で尾根筋は材木の生育に不適である。処分場の東側に B 川が位置しており、施設からの処理水を放流している。ただし袋詰された可燃ごみ焼却灰が仮置きとされている。処分場の概要を表 2 に、仮設の排水処理施設の概要を表 3 に、その処理フローを図 1 に、2000 年 2 月より行われる水処理の主な工程を図 2 に、A 市ごみ焼却場の焼却炉の能力を表 4 に、シート断面図を図 3 に示す。遮水シートは高密度ポリエチレンシート (HDPE) である。

### 2-2 サンプルングポイント

サンプルングポイントを表 5 に示す。①は浸出水、③は水処理施設での処理水、④は③の放流されている河川のすぐ上流、⑤は③から 50m 下流、⑥～⑧は処分場堰堤の斜面に穴を掘ったところから湧き出る水で下から⑥⑦⑧の順番で、⑥は流れが止まっており、嫌気状態でガスも出

ている。⑧のあたりまで埋立地である。⑨はそれらの下側にある岩盤からしみだしている。⑩は A 市一般廃棄物焼却場の主灰 (底灰) 冷却水である。

### 2-3 サンプルング方法

サンプルング日の午前中に各サンプルングポイントにて、ひしゃくと漏斗を共洗いの後、それらを用いて 100mL ポリ瓶を共洗いして、ポリ瓶にサンプルングした。サンプルはただちにクール宅配便で輸送し、pH 測定後ろ過して SS を測定し、硝酸で pH2 に調製して冷蔵保存した。

### 2-4 サンプルング日時

サンプルング日を表 6 に示す。1999 年 1 月 26 日より、2000 年 1 月 20 日に至る期間で、時間は午前中で、サンプルング日は月曜日・木曜日とした。

### 2-5 気象データ

岡山地方気象台より気象月表を入手した。そのデータよりサンプルング期間中のサンプルング日の平均気温・降水量・天気概況を図 4 に示す。サンプルング期間中、11 月下旬からほとんど降水はなく、12 月 7 日に 7.5mm あった。その後、1 月 6 日よりまとまって降雨があった。

## C 結果と考察

ホウ素の環境基準値は 1mg/L である。図 5-1 より貯水槽流入端は全採水日にホウ素の環境基準値を超過しており、その超過量の範囲は 0.6-1.5mg/L であった。図 5-2 より放流水は全採水日にホウ素の環境基準値を超過しており、その超過量の範囲は 0.3-1.5mg/L であった。図 5-3 より、浸出水 A は全採水日にホウ素の環境基準値を超過しており、その超過量の範囲は 0.4-1.7mg/L であった。図 5-4 より、浸出水 B は 11 月 29 日、12 月 2 日、6 日、20 日、27 日にホウ素の環境基準値を超過しており、その超過量は 0.09mg/L 未満であった。浸出水 C は図 5-5 より、12 月 13 日、1 月 17 日、20 日以外の採水日にホウ素の環境基準を超過しており、その超過量の範囲は 0.2-0.6mg/L であった。

表2 A市の安定型一般廃棄物最終処分場  
(一部管理型)の概要

埋立物	直接不燃ゴミ, 資源化ゴミ分別収集後, 焼却残渣, 粗大ゴミ破碎残渣, 環境清掃ゴミ
埋立年数	28年間
埋立面積	約52,000 m <sup>2</sup> (管理型面積 10,000 m <sup>2</sup> 容積 56,000m <sup>3</sup> )
これまでの埋立量	約300,000 t

表3 仮設排水処理設備の設備概要

処理能力	日平均処理量 96.0 m <sup>3</sup> /日
運転時間	24時間/日

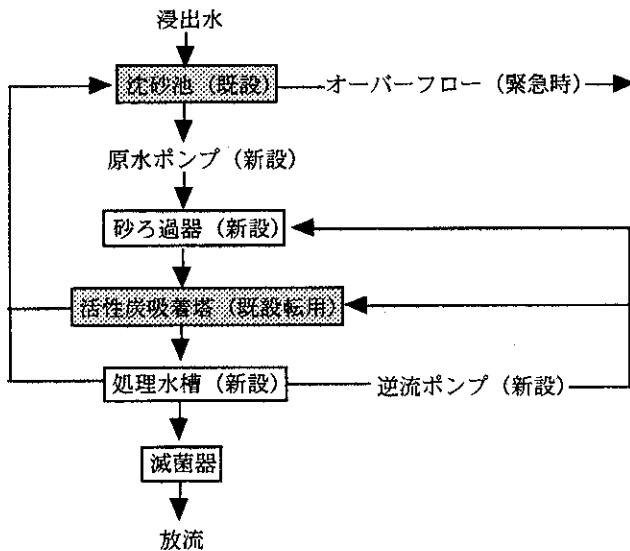


図1 処理フロー

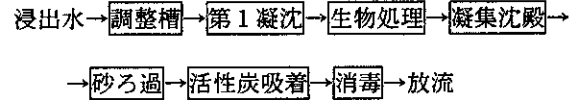


図2 水処理の主な工程

表4 焼却炉 (昭和51/4~)

	設計	稼働時
処理能力	60t/8h(2基分)	—
低位発熱量	700kcal	2,600kcal
基準発熱量	800kcal	—
高位発熱量	1,400kcal	2,130kcal

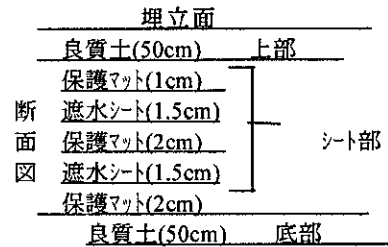


図3 シート断面図

表5 サンプルポイント

①	貯水槽流入端
②	管理型流出端
③	放流水
④	河川水
⑤	B川中流
⑥	浸出水A
⑦	浸出水B
⑧	浸出水C
⑨	岩盤水
⑩	焼却灰ホッパー排水

表6 サンプル日 1999年—2000年

	11/26	11/29	12/02	12/06	12/10	12/13	12/16	12/20	12/23	12/27	01/06	01/10	01/13	01/17	01/20
①	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
②													○		
③	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
④	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
⑤	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
⑥	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
⑦		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
⑧		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
⑨			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
⑩	○				○				○		○				○

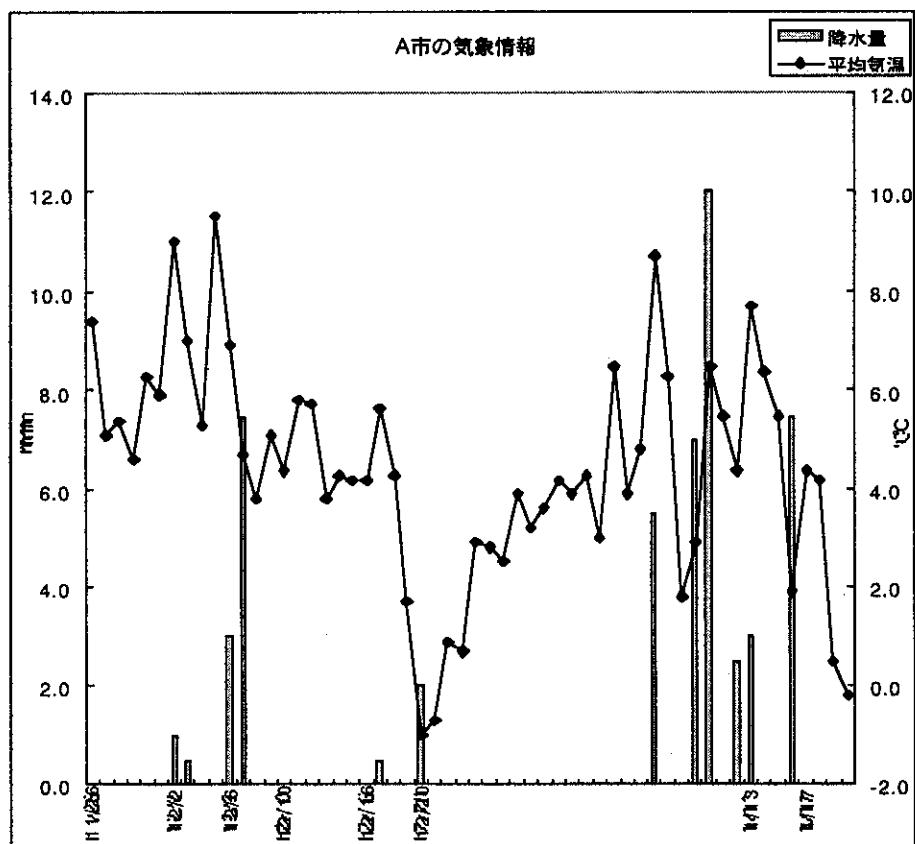


図4 A市の降水量と平均気温

表7 地点毎の各元素の平均濃度 (mg/L)

元素	貯水槽 流入端	放流水	河川水	B川 中流	浸出水 A	浸出水 B	浸出水 C	岩盤水	ホッパー排水
B	2.25	2.20	0.005	0.600	2.37	0.898	1.30	0.111	1.73
Na	764	712	5.72	224	822	520	639	17.9	2954
Al	0.009	0.015	0.142	0.105	0.006	0.078	0.016	0.245	3.22
K	563	533	2.14	134	576	327	437	1.30	2849
Ca	77.0	74.5	5.51	28.9	68.5	86.7	70.8	29.9	2391
Cr	0.004	0.003	0.000	0.000	0.009	0.010	0.009	0.007	0.021
Mn	0.457	0.485	0.019	0.035	0.277	0.120	0.293	0.006	0.060
Fe	0.318	0.219	0.063	0.079	0.491	0.037	0.065	0.008	0.071
Ni	0.013	0.005	0.002	0.003	0.012	0.023	0.020	0.014	0.079
Cu	0.005	0.004	0.003	0.004	0.005	0.028	0.020	0.007	0.384
Zn	0.025	0.063	0.045	0.022	0.021	0.025	0.074	0.016	0.123
Sr	0.322	0.358	0.037	0.134	0.323	0.271	0.228	0.149	1.25
Cd	0.002	0.002	0.001	0.000	0.002	0.007	0.006	0.006	ND

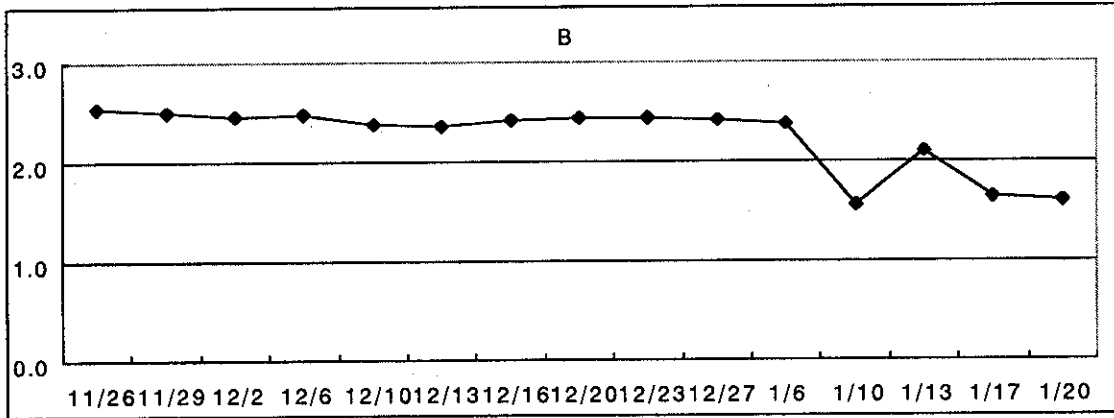


図 5-1 貯水槽流入端におけるホウ素の経日変化(mg/L)

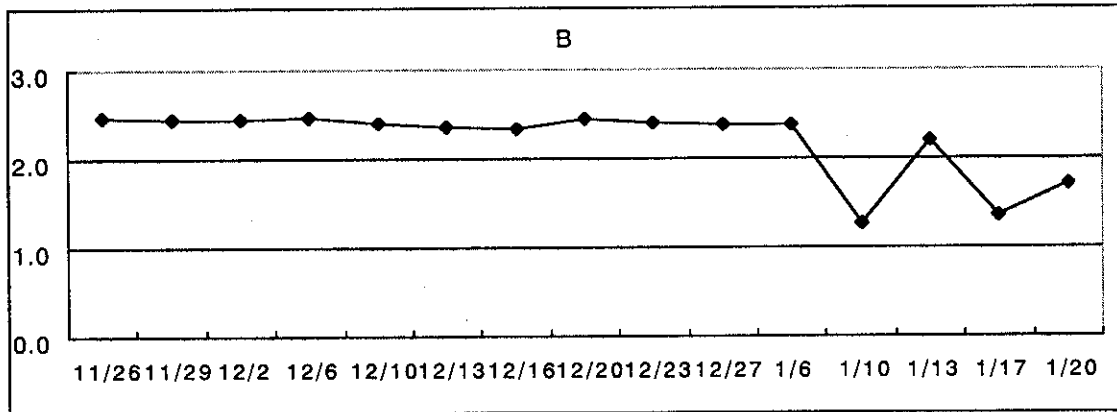


図 5-2 放流水における経日変化(mg/L)

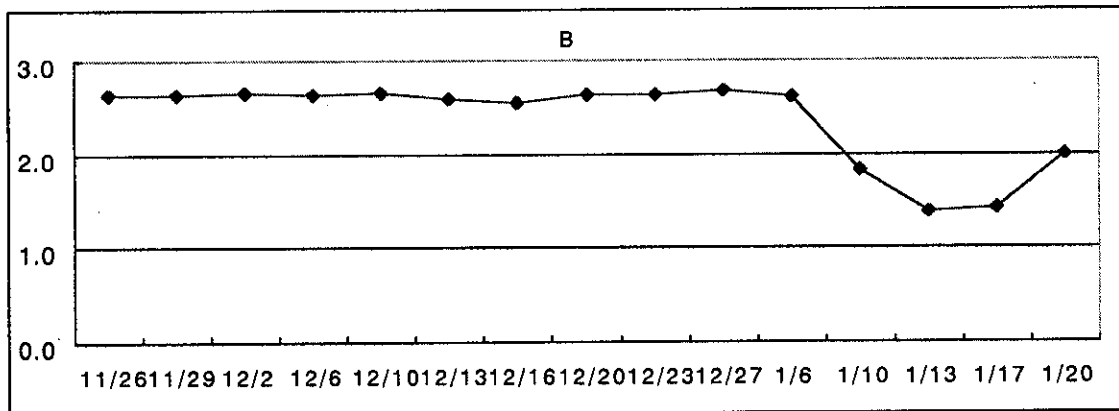


図 5-3 浸出水 A におけるホウ素の経日変化(mg/L)