

講演

埋立処分場の浸出水問題
—コメットアッセイによる DNA 損傷性評価—

岩堀 恵祐

静岡県立大学
環境科学研究所教授

プロフィール

昭和 53 年	大阪大学大学院工学研究科環境工学専攻 前期課程修了
昭和 60 年 平成 8 年	大阪大学工学部環境工学科 助手 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科 環境物質科学専攻 助教授
平成 13 年 平成 18 年	静岡県立大学環境科学研究所 教授 静岡県立大学環境科学研究所長

1. はじめに

我々を取り巻く生活環境には、自然界由来あるいは人為的に合成された化学物質やその生物学的代謝・化学的変換で生成する未知の化学物質が無数に存在している。このため、従来の化学分析とは異なり、水の有害性そのものを総合的に評価するバイオアッセイの導入が検討されてきた。

バイオアッセイには、動物実験や水生生物試験を始め、細胞毒性・遺伝毒性の各種試験法が実用化されている。しかし、これらの大半は、ある生物応答で検出した毒性指標の一断面にすぎず、また生物個体での実験は有害性の事前評価を主目的としているので、複合汚染物質を含む環境水への適用には、評価系の毒性学的意味づけや適用限界の確認が必要である。

そこで、本講演では、個々の細胞での DNA 損傷/修復を評価できる「アルカリ性単細胞ゲル電気泳動法(通称コメットアッセイ)」に着目し、コメットアッセイへの環境微生物の適用とその埋立処分場浸出水の生態毒性評価への応用について話題提供する。

2. コメットアッセイへの環境微生物の適用¹⁾

水環境におけるバイオアッセイの現状と課題を踏まえて、コメットアッセイへの環境微生物の適用可否とその操作条件の検討を行った。使用した環境微生物は次の 5 種である。

- ・絨毛虫 *Tetrahymena pyriformis* NIES-403 株
- ・鞭毛虫 *Monas guttula*

(国立環境研究所・稲森悠平博士より分与)

- ・酵母 *Saccaromyces cerevisiae* IFO0209 株
 - ・緑藻 *Chlamydomonas pulsatilla* NIES-122 株
 - ・ミドリムシ藻 *Euglena gracilis* NIES-49 株
- コメットアッセイの操作条件である細胞溶解、DNA unwinding、電気泳動について、種々の条件で検討した結果、ミドリムシ藻 *E. gracilis* の適用が最も有効で、操作条件として、陰イオン界面活性剤(SDS)の 0.01% 溶液による細胞溶解が 5 分、DNA unwinding が 20 分、電気泳動(25V、300mA)が 20 分であることを特定した。

3. ミドリムシ藻 *Euglena gracilis* の DNA 影響評価²⁾

各変異原性物質と γ 線による *E. gracilis* の DNA 損傷および修復の評価実験をコメットアッセイで行った。アルキル化剤 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG)、代謝活性物質 Benzo(a)pyrene (BAP)、DNA 架橋化剤 Mitomycin C (MMC)、DNA 挿入剤 Actinomycin D (AMD)をそれぞれ対象物質として用い、色素排除法で生存率 90%以上の細胞を供試した。

MNNGでは 5 μ M 以上、BAPでは S9mix 添加条件で 1 μ M、S9mix 無添加条件では 5 μ M 以上でそれぞれ DNA 損傷を検出し、MMC と AMD では検出されなかった(Fig. 1)。また、MNNGと γ 線により損傷した DNA の修復評価を試みたところ、1 時間以内に完全に修復されることが確認できた。

4. DNA 損傷評価指標の標準化³⁾

コメットアッセイに関する既往の研究では多種多様の生物材料と DNA 損傷評価指標が使用され、これらデータ間の相互比較はきわめて困難であった。そこで、Control の平均値を基準とした評価指標の標準化を提案し、個体差の影響排除と他の試験法との感度比較を試みた。

その結果、Tail moment が最も有効な指標であることが明らかとなり、Control を基準とした標準化 Tail moment によって各実験データの比較を容易にすることが可能となった。

また、3 種の変異原性試験との比較を行ったところ、コメットアッセイでは DNA 架橋化剤の検出が困難であったものの、他の変異原性物質では同様の結果となり、検出感度は Ames 試験、Rec アッセイよりも高く、umu 試験と同程度である傾向が確認された。

5. 埋立処分場浸出水の DNA 損傷性検出⁴⁾

コメットアッセイの生態毒性評価への応用として埋立処分場浸出水の変異原性評価を行った。供試試料は、日本国内 4 ヶ所の管理型埋立処分場浸出水(試料 A~D)である。試料 A~C は有機物濃度が高く、特に試料 B の COD_{Mn} は 19,957mg/l であり、さらに試料 A と B では窒素成分も高濃

度に含有していた。試料 D は、有機鬱・重金属類など、分析した大半の項目は低濃度であった。

評価結果として、4種の試料のうち2種で変異原性が検出され、それぞれ40倍、10倍濃縮時で標準化 Tail moment の有意な増加が確認できた。ひとつは試料 A で、S9 mix 添加条件で検出されたことから、原因物質は間接的変異原性物質であり、もう一方は試料 B で、Fig. 2 からも明らかなように、S9 mix 無添加条件で検出されており、直接的変異原性物質が原因物質であると考えられる。また、同試料を用いて *umu* 試験を行ったところ、すべての条件で変異原性は検出されなかった。このことから、コメットアッセイは *umu* 試験よりも検出感度に優れ、環境水の有害性評価における有用性の高さを確認することができた。

6. まとめ

本講演で紹介したコメットアッセイは、埋立処分場浸出水のみでなく、未規制かつ未知の物質を多く含む環境水全般の評価においても、化学分析を補完するとともに、問題の有無をいち早く把握する上で有望であると考えられる。現在、環境水の有害性を評価するために様々なバイオアッセイが検討されているが、水環境での水質変動や共存物質の影響、複合毒性への応答をできるだけ明らかにする必要があり、それぞれの対象水の排出、処理、利用の実態・目的に応じたリスク管理体制を構築することが重要である。

なお、本講演は引用文献の論文内容を取りまとめたものであることを付記する。

[引用文献]

- 1) 岩堀恵祐 ら: 日本水処理生物学会誌, 35(4), 261-270(1999)
- 2) Aoyama, K. et al.: Mutat. Res., 538, 155-162(2003)
- 3) Iwahori, K. et al.: Japanese J. Wat. Treat. Biol., 40(2), 63-70(2004)
- 4) Aoyama, K. et al.: Japanese J. Wat. Treat. Biol., 41(2), 73-81(2005)

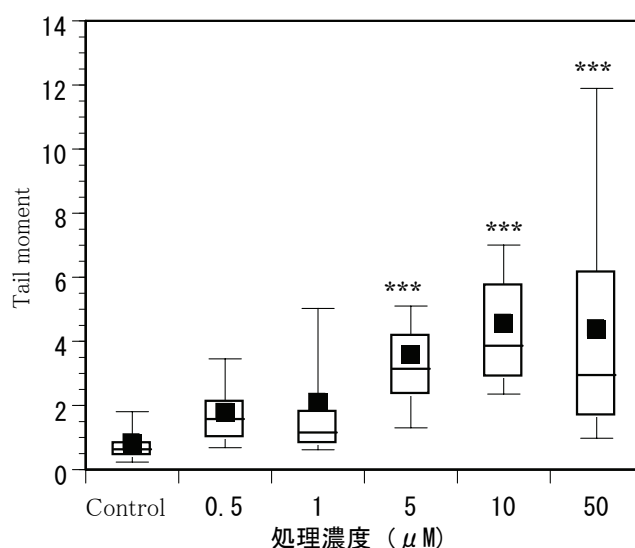


Fig.1 Comet assay of *E. gracilis* treated with MNNG²⁾. Significance:***, $P<0.001$. Data were taken from 30 comets per sample and represented by box and whiskers plots as following: measured values for a tested compound were shown by a box including 50% of the data. The top and bottom of the box marked the 25th and 75th percentiles, respectively.

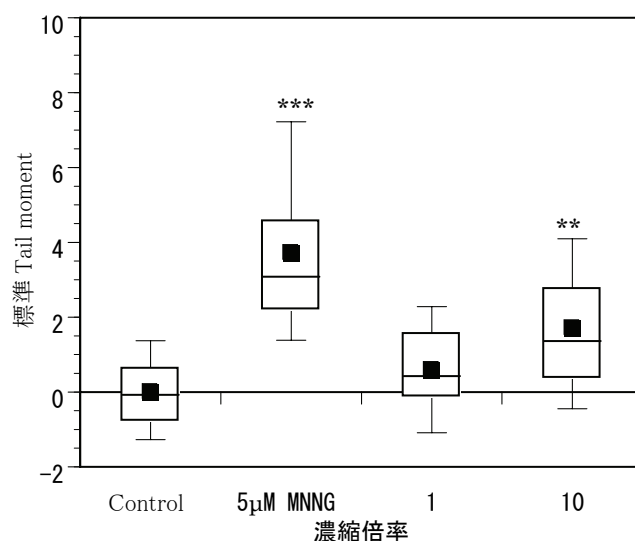


Fig.2 DNA damage at landfill leachate (sample B) without S9mix using normalized Tail moment in comet assay⁴⁾. Significance: **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$.