

生物学的手法を用いた環境モニタリング手法についての研究（Ⅱ）

半野 勝正 栗原 正憲 稻生 義彦 宇野 健一 依田 彦太郎

1 はじめに

現在、わが国における環境中の有害化学物質は、測定可能な物質について基準値を設け管理されている。しかしながら、全ての化学物質を分析することは時間・労力・コスト・技術的に不可能であり、また、未知物質や複合作用等の影響の把握は更に困難である。一方、バイオアッセイ法は、複合的な汚染を簡便に多検体同時に検出できるという利点があるが、その定量性と汚染原因物質の同定には限界がある。メダカは、我が国で開発された実験生物であり、淡水・海水の両方に適応可能であり塩濃度リッチの最終処分場浸出水にも対応でき、近年その遺伝子情報も充実している。本研究は、化学分析と並行して Microtox 試験（海洋性発光細菌発光阻害試験）やメダカを使った各種の生物学的手法を組み合わせ総合的な生態への影響を評価できる手法について検討している。今回は、遮水工のない県内 O 町最終処分場（旧処分場）及びその周辺環境水に対して調査した。

2 試料採取地点及び分析方法

試料採取地点を図 1 に示す。県内 O 町清掃工場の直下の谷頭を焼却灰・破碎残渣等の廃棄物で埋め立てられた最終処分場（1970 年埋立開始～2000 年埋立終了）基部の浸出水②を起点とし、谷筋に沿って下流表流水、五霊堰及びその下流（③～⑤）について、対照として裏沢表流水⑥と老人ホーム裏堰⑦について採水した。①、②については、廃棄物コアについても調査した。水試料は、GS25（約 1 μm）でろ過後各試験に供した。

2. 1 生物学試験

(1) 海洋性発光細菌の Microtox 試験

海洋性発光細菌（Vibrio Fisheri）を用いてその光の変化量を測定することにより毒性を評価する方法である。発光量測定には Microbics 社（現 AZUR Env

ironmental 社）の Microtox m500 を使用した。

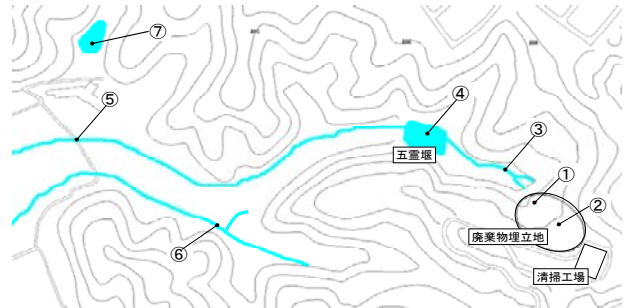


図 1 試験試料採水地点概略図

①, ②: 廃棄物層内観測井 ③, ④, ⑤: 下流表流水
⑥, ⑦: 処分場とは異なる流域の水

(2) メダカ卵胚形成期の顕微鏡による観察試験

ヒメダカの 1 日経過受精卵を 96 穴プレート各セルに入れ、各試験試料（200 μL）に浸して胚発生への阻害等について顕微鏡で観察した。暴露期間は最大 50 日間とした。

(3) メダカ cDNA マイクロアレイ試験

浸出水及びビスフェノール A に浸せきしたヒメダカ卵 96 個から RNA を抽出し、cDNA を増幅・調製した。

シグナルの検出には ScanArray4000 を使用し、解析処理には QuantArray を使用した。

2. 2 化学分析

観測井（①、②）の廃棄物コアを深度 1 m ごとに区切り調製した試料及び周辺環境水（③～⑦）中のダイオキシン類、ビスフェノール A 等の外因性内分泌攪乱物質などの分析を行った。

3 調査結果及び考察

3. 1 化学分析及び Microtox 試験

廃棄物コア試料（表 1）と周辺環境水（表 2）の分析結果を下に示す。

廃棄物コア試料中のダイオキシン類は、処分場先端部①が基部②よりも TEQ 値で約 20 倍、実測濃度で約 5 倍高濃度であった。また、①では浅い部分（2～5m）、②では深い部分（5～9m）が高い。これは、焼

表1 廃棄物コア分析結果

コア位置	コア深度 m	ダイオキシン類 実測濃度 pg/g	ダイオキシン類 TEQ pg-TEQ/g	ビスフェノールA ug/kg	4t-ブチルフェノール ug/kg	2,4-ジクロロフェノール ug/kg	ペンタクロロフェノール ug/kg
No.1先端部	0-1	99000	1100	440	1.4	0.31	0.12
	1-2	14000	1400				
	2-3	150000	1300	20	0.32	0.73	0.14
	3-4			39	0.31	0.15	0.23
	4-5	69000	520	47	0.28	0.45	0.16
	5-6	77000	350	73	0.59	0.4	0.11
	6-7	29000	80	1200	1.3	0.78	0.16
	7-8	30000	190	0.11	<0.01	<0.01	<0.01
	8-9	20000	63	100	0.78	1.2	0.50
	9-10	420	3.2	6.7	0.059	1.5	0.061

コア位置	コア深度 m	ダイオキシン類 実測濃度 pg/g	ダイオキシン類 TEQ pg-TEQ/g
No.2基部	0-1	3700	5.8
	1-2	1900	4.4
	2-3	6300	2.1
	3-4	16000	5.5
	4-5		
	5-6	18000	33
	6-7	14000	58
	7-8	12000	57
	8-9	12000	45
	9-10		
	10-11		

表2 周辺環境水分析結果

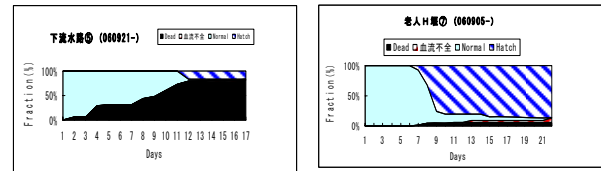
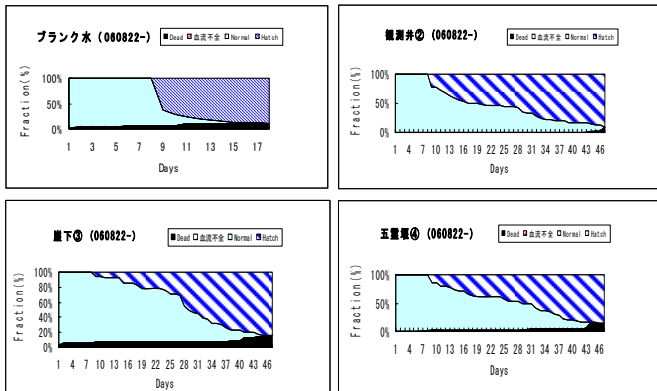
水質位置	ビスフェノールA ug/L	4t-ブチルフェノール ug/L	2,4-ジクロロフェノール ug/L	ペンタクロロフェノール ug/L	Micro-TOX EC50(%) 5分後	Micro-TOX EC50(%) 15分後	Micro-TOX EC50(%) 30分後	メダカ卵 胚成長観察
基部②	0.33	0.010	0.014	<0.001	>100	>100	>100	孵化遅延
崖下③	0.009	0.005	<0.001	0.001	54.5	47.7	43.6	孵化遅延
五霊堰④	0.010	0.003	<0.001	<0.001	>100	50.9	52.3	孵化遅延
下流水路⑤	0.018	0.010	<0.001	<0.001	>100	>100	>100	孵化せず
裏沢水⑥	0.005	0.002	<0.001	<0.001	>100	>100	>100	孵化遅延
老人H⑦	0.005	0.002	<0.001	<0.001	>100	>100	>100	異常なし

却灰が埋められた場所が①では浅い部分、②では深い部分であったことによるものと考えられる。

周辺環境水中のビスフェノールAは、処分場基部②浸出水の0.33ug/Lを最高に他の地点でも崖下③0.009ug/L、五霊堰④0.010ug/L、下流水路⑤0.018ug/Lと同程度の濃度検出され、処分場からの影響が伺えた。裏沢水⑥と老人H⑦の別水系では0.005ug/Lと低かった。4t-ブチルフェノールについても同様の傾向であった。その他、2,4-ジクロロフェノールは処分場基部②から、ペンタクロロフェノールは崖下③から検出された。海洋性発光細菌の急性毒性試験(Microtox)では、崖下③での5分後、15分後、30分後のEC50値は54.5%、47.7%、43.6%で平均48.6%の発光阻害が、五霊堰④で50.9%(15分後)、52.3%(30分後)のやや遅効性の発光阻害が認められた。

その他の水系には異常が認められなかった。

3.2 メダカ卵の胚形成観察試験



上図の横軸は胚形成観察日数を、縦軸は胚形成割合(%, Dead, 血流阻害, Normal, Hatch)を示す。

- (1) コントロール水(ブランク水)に浸したメダカ胚は、順調に生育し、8日目頃からふ化するものが現れ、18日でほとんどがふ化した。
- (2) 処分場基部観測井②～下流の崖下水③、五霊堰水④の水質で同様のふ化が遅くなる生育パターンをみせた。下流水路は、田んぼの下をでて出てきており、3日目あたりから死亡するメダカが続出した。これは還元的な土壌中にあるウイルス又は細菌によるものと思われた。(0.2μmフィルターを通したものは、他の②・③・④・⑥と同様の生育パターンを示した。)
- (3) 老人ホーム裏の堰は、コントロール水と同様に正常なふ化パターンを示していた。

3.3 メダカ cDNA マイクロアレイ試験

ビスフェノールA曝露に対して、遺伝子発現量がコントロールに比して増加する(2倍以上)遺伝子数が196、低下する(0.5未満)遺伝子(抑制遺伝子)数が4であった。現在これらの遺伝子群の解析を行っている。

