

廃棄物処理等科学研究費補助金 研究報告書概要版

・研究課題名・研究番号=一斉化学分析および分子生物学的手法を用いた最終処分場由来有害物質の包括的リスク評価に関する研究(K1910,K2027)

・国庫補助金精算所要額(円)=37,611,000

(英数は半角で。以下同じ。)

・研究期間(西暦)=2007-2008

・研究年度(西暦)=2007-2008

・代表研究者名=有菌幸司(熊本県立大学)

・共同研究者名=富永伸明(国立有明工業高等専門学校), 鎌迫典久(国立環境研究所)

・研究目的=最終処分場のダイオキシン類や重金属など既知化学物質については、これまで汚染実態解明や生物影響評価が精力的に行われてきた。しかし、最終処分場由来の化学物質は多種多様なため、未知化学物質や非意図的生成物などの複合した総体として包括的に評価する必要がある。また、廃棄物に対する住民の不安感を払拭し、予防原則に基づいたより安心・安全な循環型社会形成の推進において、化学物質の環境負荷の増低減を定量的に情報提供することも重要である。本研究では、埋立物や浸出水水質の履歴等が明らかでない最終処分場を選択し、その処理施設由来の浸出水を対象として、前年度に構築した結合平衡除外法の測定系による LAS の測定および Cd のイムノクロマトの実サンプルの分析を行う。また、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)で多成分分析できるデータベース「GC/MSD 精度管理・相対定量ソフトウェア NAGINATA」を活用し、最終処分場由来の化学物質を一斉スクリーニングする。これら化学物質の複合影響をより包括的にリスク評価するために、「化学物質のスクリーニングデータ」と「実験生物の DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現変動情報」による生態(生体)毒性影響評価の予測を行うアプリケーションの構築により、発現変動する遺伝子群の機能別分類から、化学物質の潜在的毒性影響の包括的なリスク評価を可能とするデータベース作成を試みる。

・研究方法=

(1)化学物質約 700 種類の一斉スクリーニング

ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)で多成分分析できるデータベース「GC/MSD 精度管理・相対定量ソフトウェア NAGINATA」を活用し、最終処分場由来の化学物質を一斉スクリーニングする。測定対象は、多環芳香族炭化水素(PAHs)・PCB、フェノール類、芳香族アミン・ニトロ化合物、含硫黄化合物、含リン化合物、殺虫剤・除草剤・殺菌剤などの農薬など約 700 である。同時に既知の有害物質(ダイオキシン類・重金属・内分泌攪乱物質など)についても化学分析を行い、現在、新規環境汚染物質として問題になりつつある医薬品・生活関連物質や有機フッ素化合物も対象とする。

(2)DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイリングと潜在的毒性影響評価

早期アラームシステムとして遺伝子レベルでのバイオアッセイを活用する。すなわち、多数の遺伝子発現変動を網羅的に解析できるセンチウおよび酵母 DNA マイクロアレイを用いて、未知化学物質や非意図的生成物などの複合した総体として、化学物質の包括的リスク評価を試みる。各種試料の暴露による遺伝子発現プロファイリングや遺伝子ネットワーク間の解析を行い、発現変動する遺伝子群の MIPS データベースなどによる機能別分類から、その潜在的毒性影響を予測する。

(3)タイヤチップ溶出水に含まれる化学物質の水生生物に与える複合影響評価

リサイクル段階における化学物質の複合曝露による水生生物への影響を網羅的に把握することに重みをおき、ケーススタディとして、古タイヤをリサイクル地盤材料として実用化した場合を想定して、古タイヤに含まれる複数の化学物質が環境を経由して、水生生物にどのような影響を与えるのか、を把握するための試験手法を開発する。

(4)生物学的測定法を用いた簡易モニタリング手法の開発および応用

上記の検討で得られた結果から、化学物質のプロファイリングと予測された潜在的毒性影響を総合的に比較し、最終処分場由来の環境試料中で優先的にリスク評価の必要な有害物質を特定する。それらの化学物質を対象に簡便かつ迅速に測定可能な生物学的測定法を開発する。すなわち、特異抗体を利用したバイオセンサを開発し、実環境中のモニタリングを行い、包括的な化学物質のリスク管理・リスクコミュニケーションを試みる。

(5)神経回路網モデル(SOM)の遺伝子発現変動パターン解析への応用

自己組織化マップ (Self-Organizing Maps: SOM) とは、神経回路網モデルの 1 つである。DNA マイクロアレイを用いて得られる遺伝子発現変動データは典型的な高次元多変量データである。したがって、様々な環境要因によって発現量を変化させる非常に

多くの遺伝子群をその発現量変化という観点から機能分類を行い、人間にわかりやすい形(2次元マップ)で提示することに SOM を用いるのは有効である。ここでは6種類の環境下での遺伝子発現変動量すなわち6次元ベクトルから成る多変量データを学習データとして SOM は遺伝子特性関連マップ(2次元)を構成した。得られたマップは、クラスター解析の結果を2次元空間に展開したものであるとも言える。ただし、結果的に得られる変換則は非線形であり、もともとのデータに内在している遺伝子間のある種の関連構造が得られたマップ上で保持されている。

・ 結果と考察=

(1)廃棄物処分場浸出水および放流水に含まれる化学物質

廃棄物処分場浸出水及び放流水を用いて化学物質の検出を試みた。廃棄物処分場浸出水から、ビスフェノール A (BPA) あるいはノニルフェノール及びオクチルフェノールなどのアルキルフェノール類が検出され、そのなかでも BPA は 101 $\mu\text{g/l}$ と極めて高濃度であった。また、エストラジオール (E2) などのエストロゲン類は、浸出水において検出されたが、放流水では BPA のみ検出されたが (0.086 $\mu\text{g/l}$)、その他の化学物質は検出されなかった。また今回、定量はできなかったが、医薬品・生活関連物質 (PPCPs) や有機フッ素化合物なども検出された。これらのことから、プラスチック製品の原材料や医薬品・生活関連物質、有機フッ素化合物等の化合物をデータベースに追加する必要性が判明した。

(2)DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイリングと潜在的毒性影響評価

廃棄物処分場浸出水を対象とした「化学物質の一斉スクリーニング」及び「DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析」の結果が集積されつつあることから、非意図的生成物質も含め多くの環境化学物質が相加・相乗的に複合して生態(生体)影響を惹起する可能性を予測すべく、これらに関するデータベースのスーパーマルチフィッティングを行うアプリケーションの構築が大事である。

H19 年度の研究から廃棄物処分場浸出原水曝露により発現抑制した遺伝子群は 234 個であった。解毒や酸化ストレス応答に関する遺伝子群、機能の未解明である hypothetical protein の発現誘導が特徴的であった。発現誘導した遺伝子群を MIPS カテゴリー分類したところ、結合タンパク質あるいは cofactor を必要とするタンパク質 (25%)、シグナル伝達機構 (10.2%)、タンパク質活性調節 (7.7%)の順に変動した割合が高かった。一方、処理水曝露により発現抑制した遺伝子群は 194 個であった。特に、代謝やタンパク質合成・変性に関与する遺伝子群の抑制が多くみられた。発現抑制した遺伝子群をカテゴリー分類したところ、結合タンパク質あるいは cofactor を必要とするタンパク質 (25%)、細胞環境関連 (4.5%)、

タンパク質合成 (3.6%) の順に変動した割合が高かった。このように廃棄物処分場浸出原水を処理することによって、発現誘導する遺伝子群の減少が確認され、その潜在的毒性影響が消失する可能性が示唆された。しかし、未分類タンパク質などの遺伝子群では発現が逆に増加しており、処理水中において細胞に毒性を与える新たな化学物質の存在が示唆された(H19年度報告書)。

H20年度はバイオマーカーとして有用なシトクローム P450(CYP)に注目し、DNA マイクロアレイを用いて、廃棄物処分場浸出水および処理水に含まれる化学物質に発現応答する遺伝子群を網羅的に解析するため、先行実験として哺乳類 CYP 誘導剤である 3-methylcholanthrene(3-MC), phenobarbital(PB), clofibrate(CF), rifampicin(RIF)曝露による線虫 CYP 遺伝子発現変動の解析を行った。哺乳類 CYP 誘導剤の体表的な 3-MC, PB, CF, RIF は P450 に対して、多くの毒性が強い化学物質と同様な誘導性を持ち、これらの化学物質を廃棄物処分場浸出水および処理水に含まれる化学物質のモデル物質としても有効である。

線虫 DNA マイクロアレイの結果、CYP35A1 が 3-MC, PB, CF で、CYP31A3 が PB, RIF, CF において共通して発現が誘導された。これら CYP 遺伝子は、RT-PCR により発現誘導を確認したところ、3-MC, CF において CYP35A1 の発現誘導を PB において CYP31A3 の発現誘導を確認した。さらに、4 種の CYP 誘導剤による線虫 CYP 遺伝子の発現変動を階層的クラスタリングにより系統化した結果、PB と RIF は同一クラスターにグルーピングされた。

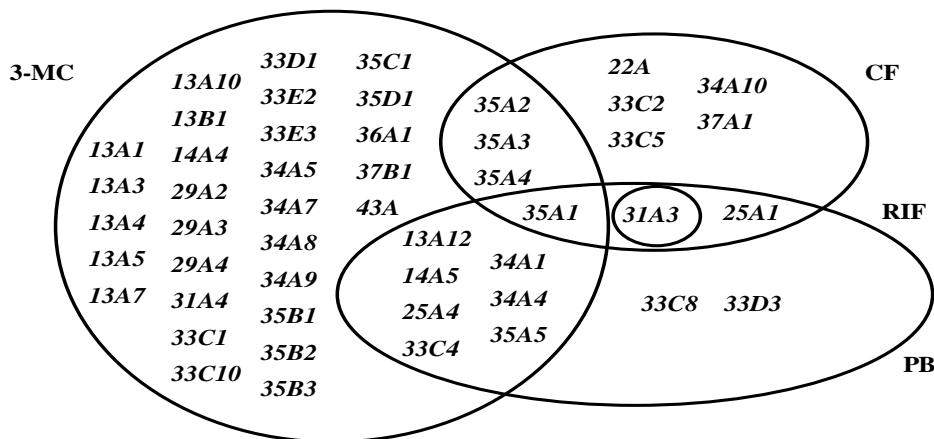


図1 CYP誘導剤により共通して発現誘導が見られた遺伝子の分類

(3)タイヤチップ溶出水に含まれる化学物質の水生生物に与える複合影響評価

廃棄段階におけるタイヤに含まれる化学物質の水生生物への安全性評価に係る試験手法や解釈などは未整備である。そこで、タイヤチップ溶出水に含まれる化学物質の複合曝露

による水生生物への影響を網羅的に把握することに重みをおき、古タイヤに含まれる複数の化学物質が環境を経由して、水生生物にどのような影響を与えるのか調査した。

化学的酸素要求量(COD)は差が認められず、溶出水の pH に依存しないことが確認できた。また、銅(Cu)や鉄(Fe)がアルカリ性側の溶出水によってやや検出された。亜鉛(Zn)は酸性側の溶出水によって最も溶出し、中性付近及び塩基性側の溶出水は酸性側の場合と比較してそれぞれ 1/5, 1/25 の溶出量であった。各溶出水の成分分析結果を表 1 に示す。各種生態毒性試験をおこなったところ、発光バクテリア試験では、中性付近(pH 7-8)及び酸性側(pH 4)の溶出水での影響に差は認められなかったが、中性付近及び酸性側に比べ、アルカリ性側(pH 11)の溶出水では約 2.5 倍の影響が認められた。ミジンコ試験では中性付近及びアルカリ性側の溶出水での影響に差が認められなかったに対し、中性付近及びアルカリ性側に比べ、酸性側の溶出水では約 1.5 倍の影響が認められた。メダカ試験では中性付近及び酸性側の溶出水での影響に差が認められなかったに対し、中性付近及び酸性側に比べ、アルカリ性側の溶出水では約 5 倍の影響が認められた。これらのことから、溶出水の pH により試験生物に対する毒性影響は異なっており、オオミジンコに関しては酸性雨による悪影響の可能性が示唆された。

表 1 各溶出水の成分分析結果

試験液 Lot No.		1225047		1225049		1225048	
溶出水のpH		中性付近		酸性側		塩基性側	
		mean± SD (mg/L)	CV (%)	mean± SD (mg/L)	CV (%)	mean± SD (mg/L)	CV (%)
有機物量	COD	109 ± 0.3	0.3	117 ± 15.3	13.0	123 ± 0.3	0.3
	TH	68.7 ± 2.02	2.9	74.7 ± 1.16	1.6	29.2 ± 0.66	2.3
金属	Cu	< 0.2	-	< 0.2	-	0.705 ± 0.026	3.7
	Fe	0.020 ± 0.001	2.9	0.061 ± 0.004	6.6	0.264 ± 0.001	0.2
	Mn	< 0.5	-	< 0.5	-	< 0.5	-
	Ni	< 0.5	1.3	< 0.5	-	< 0.5	-
	Zn	0.710 ± 0.000	0.0	3.49 ± 0.006	0.2	0.142 ± 0.006	0.4
非金属	F	0.282 ± 0.030	10.8	0.992 ± 0.002	0.2	0.316 ± 0.011	3.5
ハロゲン	Cl	11.9 ± 0.11	0.9	23.7 ± 0.12	0.5	11.8 ± 0.27	2.2
	S	< 0.05	-	< 0.05	-	0.147 ± 0.001	0.4
有機化合物	FOR	0.596 ± 0.051	8.5	0.625 ± 0.005	0.8	0.685 ± 0.020	2.9
	NH ₄	5.17 ± 0.026	0.5	5.85 ± 0.129	2.2	2.64 ± 0.060	2.3
無機化合物	Phenol	4.52 ± 0.017	0.4	4.63 ± 0.018	0.4	5.01 ± 0.012	0.2

(4)生物学的測定法を用いた簡易モニタリング手法の開発と応用

界面活性剤、エストロゲン様物質あるいは重金属のオンサイトモニタリングへの応用を目指し、ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル (APE) 及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) 系あるいはエストロゲン様物質の抗体を利用したバイオセンサの開発・改良、Cd 等の重金属のイムノクロマトへの前処理法を確立した。

今回着目した水質汚染物質はいずれも、競合 ELISA 法による測定系が開発され市販されているが、水試料を濃縮操作なしに測定しうる高感度かつ、数分という短時間の分析が可能となればこれらの汚染物質分析に貢献できることから、結合平衡除外法による測定系構築を試みた。測定には結合平衡除外法を原理とし優れた測定精度を有する、小型バイオセンサ DXS-600(京都電子工業(株))を使用し、昨年度に構築した結合平衡除外法による APE 測定系により各々サンプルの検討を行った。結合平衡除外法にて構築した測定系による LAS 標準品(和光純薬)の検量線を図 6 に示した。定量下限値および検出下限値はそれぞれ 0.026 ng/ml, 0.002 ng/ml と算出され、市販 ELISA キットとほぼ同等の測定感度を得た。

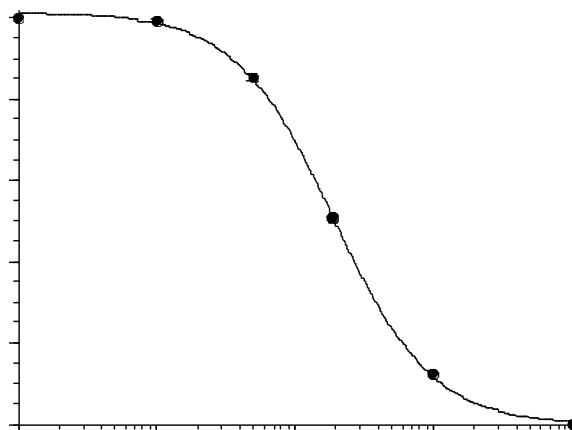


図2 結合平衡除外法による LAS の標準曲線

浸出水のサンプルは福岡、長崎の各一地点複数回採集した。結合平衡除外法にて構築した測定系による LAS と Cd のイムノクロマトの測定結果を表 2,3 に示した。定量に用いた検量線の定量下限値は 0.31ng/l である。特異抗体を利用したバイオセンサによる最終処分場の浸出水のモニタリングから LAS が 0.80-14.67 ng/l の範囲で検出された(表 2)。また、Cd 等の重金属のイムノクロマトの結果は N.D.-0.58ng/l 検出された(表 3)。上記の 2 地域の 2 地点の顕著な差は見られなかった。また、複数回の LAS の値のばらつきがみられた。特に地点 B

は降雨量の影響が大きいことが示唆された。地点 C では嫌気性処理槽より准好気性の方の濃度が低かった。これは准好気性微生物による LAS の分解がされやすいことを示唆した。

今後、試料の濃縮工程の省略など前処理の簡易化も含め、実試料の分析を通して迅速分析法の確立を目指す。また、測定感度の改善が必要な測定系については、抗体とリガンドとの親和性の低減や競合反応の抑制などにより、高感度化を図る予定である。

表 2 廃棄物処分場浸出水中 LAS 濃度

	処理条件	LAS濃度(ng/l)
地点C	准好気1 ^a	2.3 ^b
	准好気2	2.24
	准好気3	1.43
	准好気4	1.56
地点C	嫌気1	3.43
	嫌気2	4.64
	嫌気3	3.51
	嫌気4	3.33
地点B	貯水池1	1.16
	貯水池2	0.82
	貯水池3	3.78

a: サンプル回数; b: 500倍濃縮濃度

表 3 廃棄物処分場浸出水中 Cd 濃度

地 域	分 類	Cd濃度(ng/l)
地点A	原水	0.40
	調整	0.58
地点B	排水管	N.D.
	貯水池	0.12
地点C	准好気	0.02
	嫌気	0.11

(5) 神経回路網モデル (SOM) の遺伝子発現変動パターン解析への応用

DNA マイクロアレイを用いて得られる遺伝子発現変動データは典型的な高次元多変量データである。したがって、例えば様々な環境要因によって発現量を変化させる非常に多くの遺伝子群をその発現量変化という観点から機能分類を行い、人間にわかりやすい形(2次元マップ)で提示することに SOM を用いることは自然であり大変有効である(図 3)。

図 4 に SOM を遺伝子発現変動データに適用した例を示す。ここでは、様々な種類の薬毒物暴露環境下にある線虫(Nematode)における遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイによって測定することによって得られたデータを用いた。それぞれの遺伝子は、様々な環境下での発現変動量を成分とする高次元ベクトル $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ の形で特徴付けされている。ここでは 6 種類の環境下での遺伝子発現変動量すなわち 6 次元ベクトルから成る多変量データを学習データとして SOM は遺伝子特性関連マップ(2次元空間)を構成した。得られたマップは、クラスター解析の結果を 2次元空間に展開したものであるとも言える。ただし、結果的に得られる変換則は非線形であり、もともとのデータに内在している遺伝子間のある種の関連構造が得られたマップ上で保持されている。

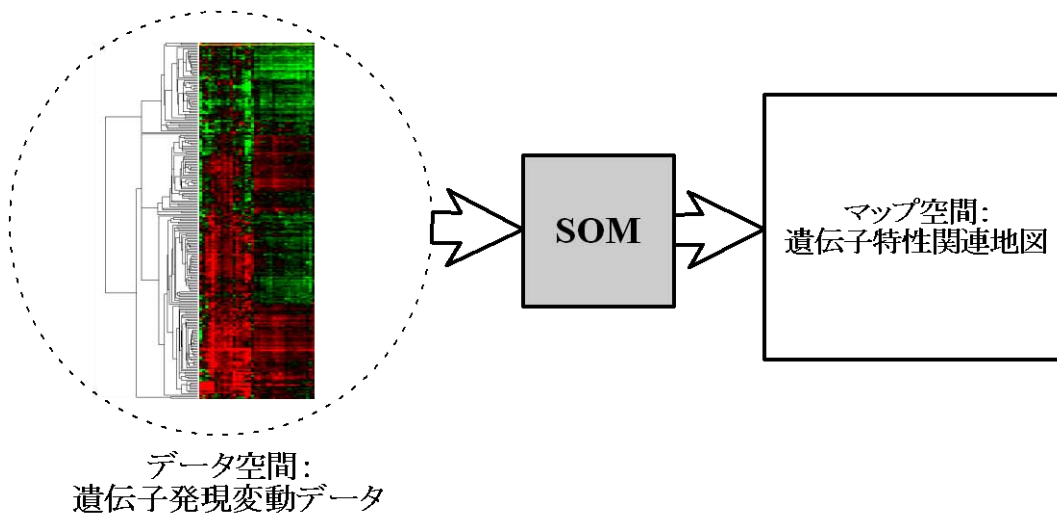


図 3 SOM の遺伝子発現変動データへの適用

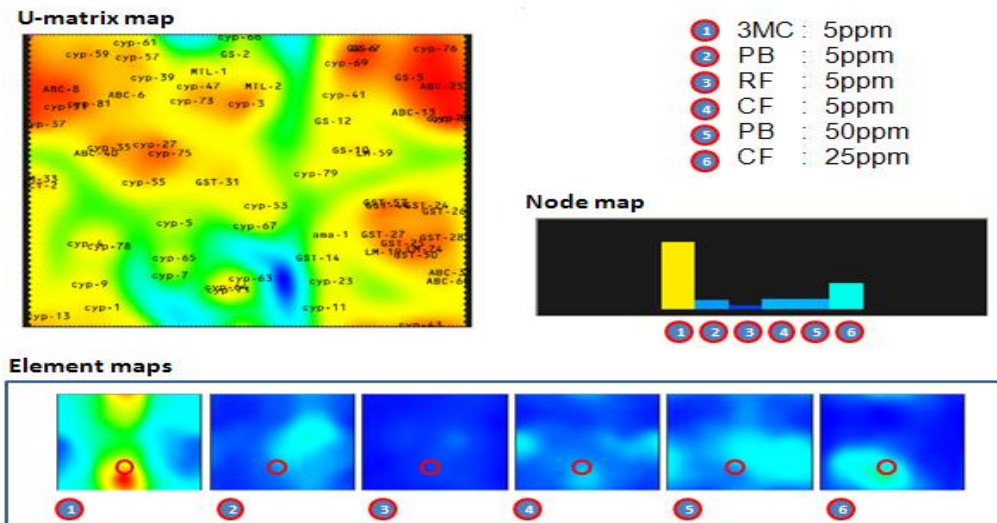


図 4 遺伝子特性関連地図

図 4 の遺伝子特性関連地図(U-matrix map)には解析に用いられた遺伝子群がその発現変動量に基づいて 2次元空間ないにクラスタリングされている様子が示されている。図 6 の Node map には, ある神経細胞(図 4 の Element maps において赤丸)の 6 種類の環境への応答特性が示されている。図 4 の Element maps は神経細胞集団の応答特性を示している。

図5に3通りの学習パラメータ設定値において得られた遺伝子特性関連地図を示す。パラメータ設定値に依存して異なるマップが得られることがわかる。

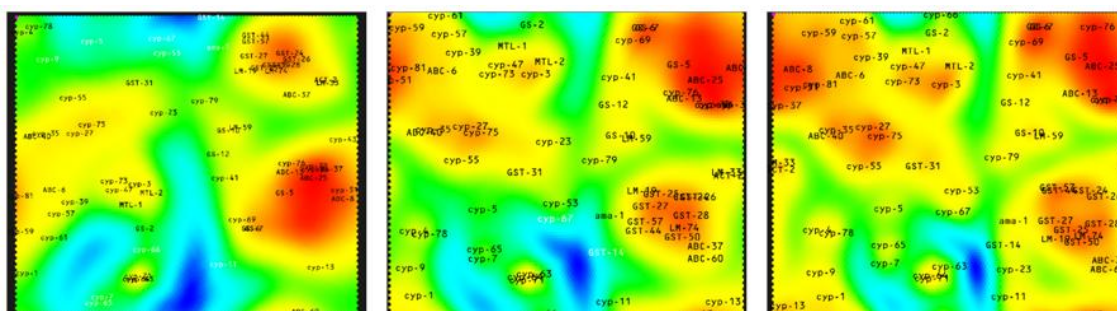


図 5 マップ空間上に構成された遺伝子特性関連地図

適切な学習パラメータをどのように設定するのかについては、今後の課題であるが、本研究においては、様々なパラメータ設定値におけるマップを一斉に表示し、他の種類のデータを人間(あるいはソフトウェア)が参照し、適切なアルゴリズムで最適なパラメータ設定値を決定する方法を検討する。

・結論=最終処分場から採取した浸出水を用いて化学物質の一斉スクリーニングを試みたところ、多種多様な化学物質が検出され、プラスチック製品の原材料や医薬品・生活関連物質、有機フッ素化合物等の化合物をデータベースに追加する必要性が判明した。特異抗体を利用したバイオセンサによる最終処分場の浸出水のモニタリングから LAS が 0.80-14.67 ng/l の範囲で検出された。また、Cd 等の重金属のイムノクロマトの結果は N.D.-0.58ng/l 検出された。また、化学物質の複合影響をより包括的にリスク評価するために、DNA マイクロアレイを用いて得られる遺伝子発現変動データを環境要因によって発現量を変化させる非常に多くの遺伝子群をその発現量変化という観点から機能分類を行い、人間にわかりやすい神経回路網モデル(SOM)を用いて DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変動データの解析を試みた。以上のことから、浸出水に含まれる化学物質のプロファイリングとそれらの複合した潜在的な毒性影響評価が可能となり、構築したバイオセンサは化学物質のリスク管理・リスクコミュニケーションにおいて真価を発揮することが期待される。

英語概要

- ・ 研究課題名 = 「New strategies for evaluation of hazardous chemicals in leachate from waste landfills」

- ・ 研究代表者名及び所属 = Koji Arizono (Prefectural University of Kumamoto), Nobuaki Tominaga (Ariake National College of Technology), and Norihisa Tatarazako (National Institute for Environmental Studies)

- ・ 要旨(200 語以内) = The hazardous chemicals in leachate from waste landfills were measured by GC/MS analysis based on NAGINATA software. Concentrations of bisphenol A, nonylphenol, octylphenol, and estrogens were higher in the leachate from waste landfill than those in treated leachate, suggesting high priority hazardous chemicals associated with contamination in the leachate from waste landfill. To monitor these targeted compounds, we also developed the biosensor for detecting LAS and metals (Cd). To further assess potential biological effect, the genomic responses to leachate and treated leachate were investigated using *C. elegans* (nematode) cDNA microarray. Genes classified as CYPs, ABC transporters were induced by 3MC, PB, RF, CF which medel compounds on leachate and treated leachate waste waters. Using micro array data with hazardous chemical treatment and biological toxicity databases, we have established SOM map which is related to on time and on site inclusive risk evaluation system for hazardous chemicals in leachate from waste landfills. New tools for evaluation of hazardous chemicals such as GC/MS analysis based on NAGINATA software, SOM map using cDNA microarray and biosensor would be useful for monitoring the environmental safety of landfill sites.

- ・ キーワード(5 語以内) = leachate, NAGINATA software, cDNA microarray, biosensor, SOM map