

# 環境汚染物質の効率的判定手法の検討

## — 変異原性試験による検討 —

佐々木 裕 子      遠 藤 立 一      古井戸 良 雄  
 飯 田 靖 雄      舟 島 正 直      鈴 木 正 次  
 (大 気 部)      (大 気 部)      (大 気 部)

### 1 はじめに

環境中の発癌性、遺伝毒性を持つ物質を検索するために、筆者らは昭和51年度より変異原物質の検出法の開発ならびにその検索を行ってきた。大気中の浮遊粒子状物質、河川底泥、アルデヒド類等を取り上げ検討してきたが、その結果、多方面に多種の変異原物質の存在が明らかになってきた。このうち浮遊粒子状物質は、呼吸器へ直接進入するため、人体に影響を与える可能性が高いと考えられる。そこで本年度は、浮遊粒子状物質の主要な発生源の1つである自動車排出ガスを取り上げ、検討を行った。なお、大気汚染を検討する場合、粒子状物質と併せてガス状物質の検討が不可欠であるが、従来適当な試験法がなかったため、充分検討されていなかった。最近、乾燥状態に耐え、感受性も優れている *Bacillus subtilis* (枯草菌) の spore を用いる試験法<sup>1)</sup> が開発された。我々はこの方法を自動車排出ガスと NO<sub>2</sub> に応用し、変異原性を認めた<sup>2)</sup> ので、併せて報告する。

### 2 検討方法

#### (1) 使用菌株・方法

##### ア 粒子状物質

*Salmonella typhimurium* のヒスチジン要求性 TA 98 株 (フレームシフト型変異検出)、TA 100 株 (塩基交換型変異検出) の 2 菌株を用いる preincubation 法によって行った。代謝活性化は Ames らの方法に従い、ラット 3 の肝 S 9 (PCB 誘導) mix によって行った。

##### イ ガス状物質

*Bacillus subtilis* (枯草菌) のヒスチジン要求性野生株 HA101 (*his B met leu*)、除去修復欠損株 TKJ

5211 (*his B met uvr A10*)、DNAポリメラーゼ I 欠損株 TKJ 8201 (*his B met pol A151*) を用いた。これら 3 株の spore を Schaeffer 培地を用いて作り、一定菌数をミリポアフィルター (0.22 $\mu$ ) 上にまき、乾燥させた。この spore をガス曝露し、滅菌蒸留水に懸濁し、生菌数・復帰変異菌数を測定し、変異原性を検討した。

#### (2) 検体

##### ア 自動車排出ガス中の粒子状物質

1973 年型排出ガス未規制車 (トヨペットコロナ、1580CC、4-サイクル4-シリンダー) を、市販レギュラーガソリンを使用し、シャーシダイナモ上に走行させた。排出ガスは図1の通り風洞で希釈し、ガラス繊維濾紙上に、Hi-vol サンプラーで採取した。得られたタール、もしくはそれを Wynder らの方法に準じて 5 分画に分けたタールは、ジメチルスルフォキシドに溶かし、濾過滅菌したものを検体とした。

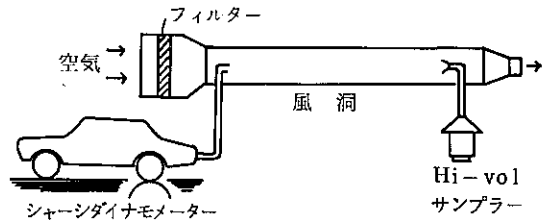


図1 自動車排出ガス粒子状物質採取装置

##### イ 自動車排出ガス中のガス状物質

アと同じ車を、図2の通りシャーシダイナモ上に定速走行 (60 km/h) させた。排出ガスは水分の凝縮を防ぐため、CVS 装置で 5.4 倍に希釈し、フィルター

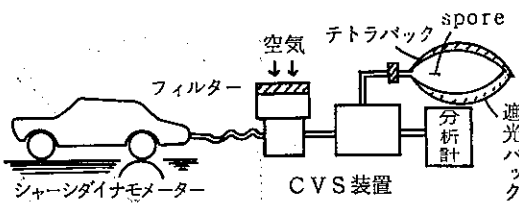


図2 自動車排出ガス粒子状物質採取装置

(8μ2枚, 0.45μ1枚)で粒子状物質を除去した。遮光テトラバック内で、sporeにこのガスを曝露し、一定時間後バックからsporeを取り出し、変異原性を検討した。

ウ NO<sub>2</sub>

500ppmのNO<sub>2</sub>ガスにsporeを一定時間曝露し、イと同様に變異原性を検討した。

### 3 結果および考察

自動車排出ガス粒子状物質については、表1に時速20km, 40km, 80kmで定速走行させた場合の変異原性を示した。その結果、TA98, 100, ±S9いずれでも速度が速い程、変異原性が増加した。また、いずれの場合もTA98株-S9での變異原性が強く、フレームシフト型のdirectな變異原の存在が多いことが推測された。Wangらもアイドリング時にTA98-S9で變異原性が最も強いと報告<sup>3)</sup>しているが、大西ら<sup>4)</sup>はTA100株の方に強い變異原性が認められたと報告<sup>4)</sup>している。これが車種や運転条件によるものなのかどうかさらに検討が必要と考えられる。なお、比較のため公研屋上で採取した浮遊粒子状物質の結果も併せて掲げた。排出ガスに比べ採取ガス量当りの變異原性は

はるかに弱い。粒子状物質質量当りでは排出ガスに比べる強さを持っていた。これは公研が高速道路際に立地するため、自動車排出ガス由来の浮遊粒子状物質がかなりあるためと考えられる。図3に時速80kmで1時間定速走行させた時得られた粒子状物質153mgの分画ごとの結果を示した。5分画全てに變異原性が検出されたが、特に芳香族炭化水素の分画が強く、全變異原性の79%を占めた。この分画の變異原物質は多環芳香族炭化水素、芳香族ニトロ化合物<sup>3),5)</sup>と推定されるが、残り21%を占める他の分画の變異原物質も明らかにしていかなければならない。図4は東京都内の車の走行状況を解析し、パターン化された走行の1つから得られた粒子状物質32mgの結果である。採取時間は同じ1時間であるが、平均車速8.4km/hとかなり遅く、粒子状物質質量も約1/5のため、塩基性、脂肪族、芳香族の3分画にしか變異原性は検出されなかった。しかし、定速走行の場合と同様芳香族分画のTA98株-S9で特に強い變異原性を示した。表2は、図3, 4に示した定速走行80km/hと実走行パターンの粒子状物質質量当りと排出ガス量当りの變異原性である。両者が變異原性を検出された塩基性、脂肪族、芳香族の3分画の比較を試みたが、そのほとんどが、排出ガス量当りの變異原性は定速走行の方が強いが、粒子状物質質量当りでは実走行パターンの方が強いという結果が得られた。減速・加速時にベンツ(a)ピレンの発生が最大になるとの報告<sup>6)</sup>があるが、表2の結果は變異原性に関しても、減速もしくは加速時に變異原性の強い粒子状物質が出る可能性を示唆している。この走行条件と變異原性の関係は、今後10モードその他多くの現実走行を踏まえての検討が必要と考えら

表1 速度別自動車排出ガス粒子状物質變異原性

	1時間当り粉じん量 (mg)	コロニー数/粉じん mg				コロニー数/排出ガス m <sup>3</sup>			
		TA100		TA98		TA100		TA98	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
定速走行 20 km/h	17.3	5	25	108	17	35	181	775	125
定速走行 40 km/h	127.5	300	140	1,180	270	4,299	1,935	16,857	3,916
定速走行 80 km/h	76.2	720	330	2,160	520	6,014	2,792	18,139	4,368
(参考) 公研屋上浮遊粒子状物質 (1979.5採取)	7.5	68	123	60	126	8	15	7	15

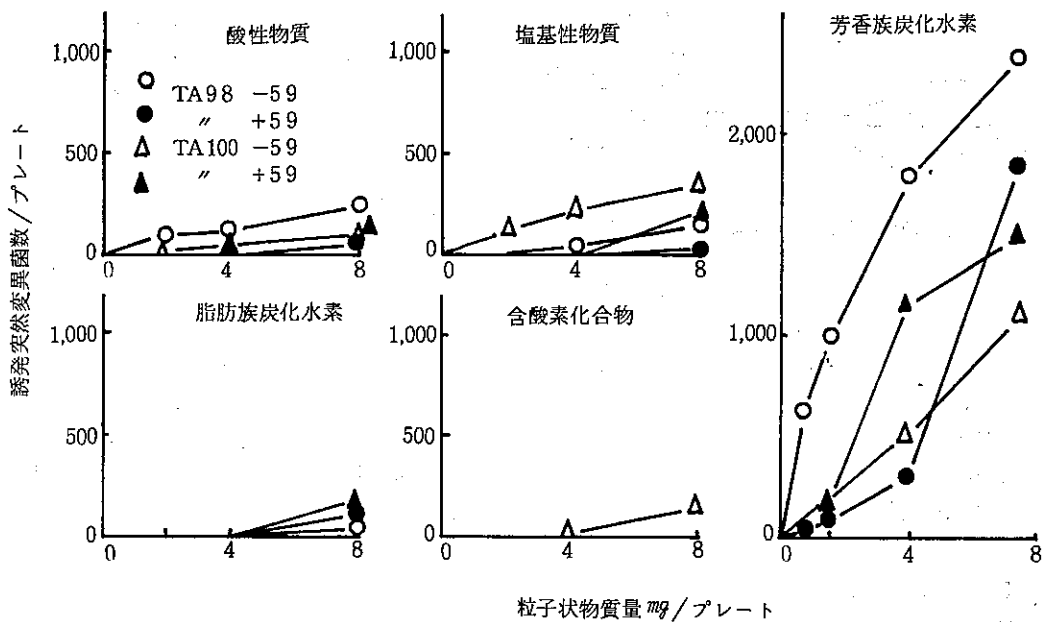


図3 自動車排出ガス分画別変異原性 (80 km/h)

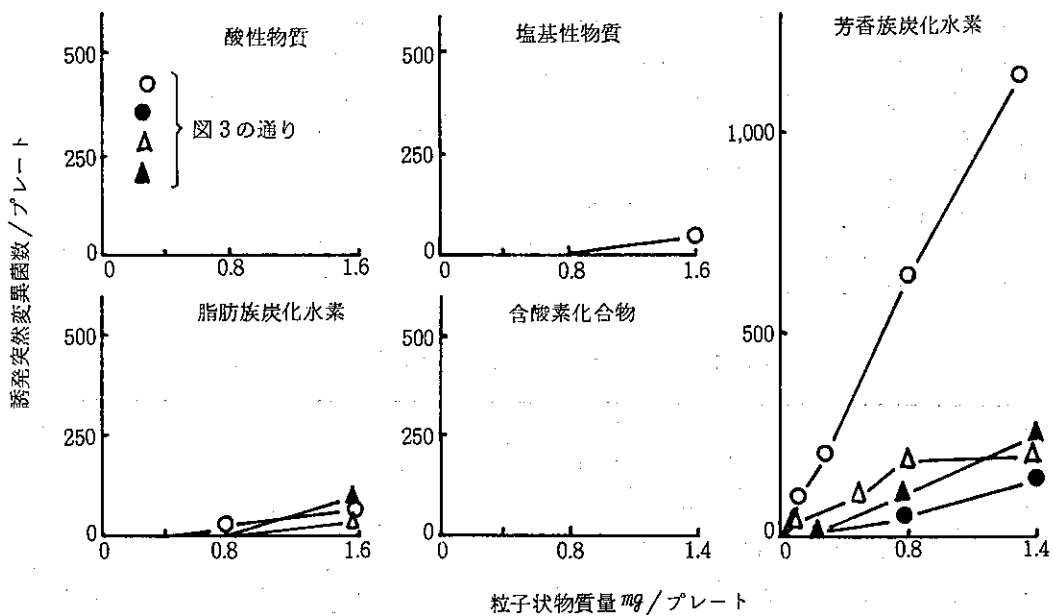


図4 自動車排出ガス分画別変異原性 (実走行パターン)

表 2 速度別自動車排出ガス粒子状物質変異原性

			コロニー数/粉じん mg				コロニー数/排出ガス m <sup>3</sup>			
			TA100		TA98		TA100		TA98	
			-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
芳香族画	定速走行 80 km/h	146	197	312	110	215	290	460	162	
	実走行パターン(平均車速8.4km/h)	246	442	712	90	75	135	217	27	
脂分族画	定速走行 80 km/h	—	11	10	8	—	16	15	12	
	実走行パターン ( " )	—	76	43	24	—	23	13	7	
塩分基性画	定速走行 80 km/h	39	27	19	—	57	40	28	—	
	実走行パターン ( " )	—	—	38	—	—	—	11	—	

注1. いずれも採取時間は1時間。採取粉じん量は80km/hが153mg, 実走行パターンが32mg。

れる。

自動車排出ガス状物質については、図5にsporeを曝露させた結果を示した。3菌株で調べたところ pol A株が高い感受性を示した。pol A株は除去修復依存型とアルキル化型(又はX線型)いずれの傷害にも感受性が高いことが知られている。そのため pol A

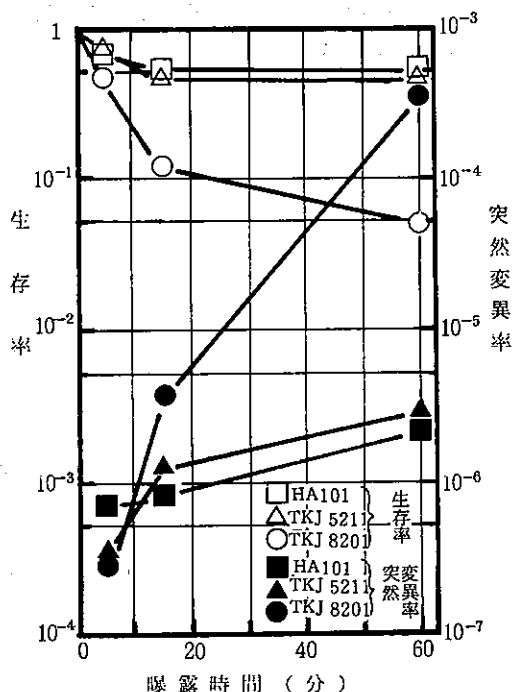


図5 自動車排出ガス突然変異試験結果

株のみで変異原性が検出されたことは、排出ガス中の変異原物質がアルキル化型である可能性を示している。なお、曝露ガスの初期濃度を表3に示したが、排出ガスの成分・化合物形態は排出後変化することが知られている。特に窒素酸化物の場合排出ガス中ではほとんどNOであるが、環境排出後急速にNO<sub>2</sub>などに転換する。そこで、図6に検体と同じ条件の排出ガス中の窒素酸化物の挙動を測定し、示した。図7は、uvr A株と pol A株のNO<sub>2</sub>曝露の結果である。この場合、排出ガスに比べれば弱い、pol A株で変異原性が検出された。自動車排出ガス中の変異原物質を検索するためには、個々の成分の変異原性を検討することも必要である。今回NO<sub>2</sub>に同じタイプの変異原性が検出されたこと、排出後NO<sub>2</sub>がかなり生成される(図6)ことなどから、NO<sub>2</sub>もその一つの原因と考えられる。

今回、自動車排出ガス中には粒子状物質だけでなく、ガス状物質にも変異原物質が存在することが認められた。しかし、変異原物質の正体、生成条件等不明な点も多い。自動車排出ガス対策の上でも、これら発癌物質である可能性の高い変異原物質を、今後もさらに検討していく必要がある。

表3 曝露自動車排出ガス濃度

(トヨペットコロナ1973年型未規制車)

	HC(ppm)	NOx(ppm)	CO(ppm)	CO <sub>2</sub> (%)
検体(初期濃度)	316	270	416	2.58
排出ガス濃度	1,910	1,480	2,394	13.58
希釈用空気濃度	4	2	1	0.05

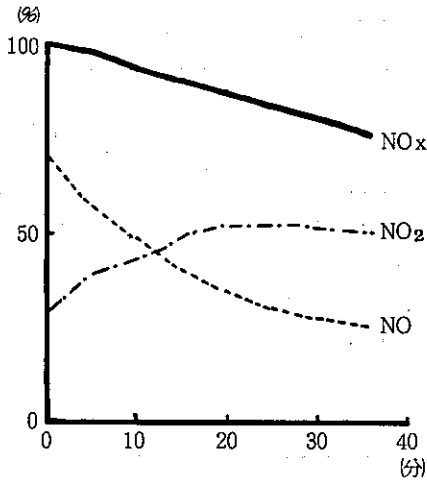


図6 自動車排出ガス中窒素酸化物時間変化

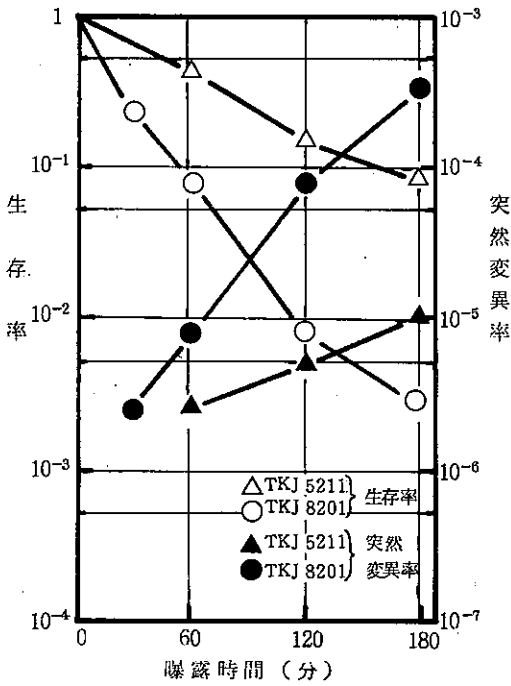


図7 NO<sub>2</sub> 突然変異試験結果

参考文献

- 1) Tanooka, H.: Application of *Bacillus subtilis* Spores in the Detection of Gas Mutagens: A Case of Ethylene Oxide, *Mutation Res.*, **64**, 433, (1979).
- 2) Sasaki, Y. *et al.*: Direct Mutagens in Gaseous Component of Automobile Exhaust Detected with *Bacillus subtilis* Spores, *Mutation Res.*, **79**, 181, (1980).
- 3) Wang, Y. *et al.*: Direct-acting Mutagens in Automobile Exhaust, *Cancer Lett.*, **5**, 39 (1978).
- 4) Ohnishi, Y. *et al.*: Detection of Mutagenic Activity in Automobile Exhaust, *Mutation Res.*, **77**, 229 (1980).
- 5) Pitts, J. N. *et al.*: Atmospheric Reactions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Facile Formation of Mutagenic Nitro Derivatives, *Science* **202**, 515 (1978).
- 6) 角田文男: 発癌性炭化水素による大気汚染に関する研究, 第2編, 自動車排出ガス中の発癌性炭化水素, 3,4-Benz pyreneに関する研究, *北方産業衛生*, **29**, 35 (1963).