

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 川井 利雄
 大山 謙一 仲真 晶子 毛受 優
 古井戸 良雄 井村 伸正
 (北里大学)

1 はじめに

前報において、我々は自動車排出ガス中の粒子状物質およびガス状物質、いずれにも発癌物質である可能性の高い変異原物質が存在することを報告した。しかし、発癌性汚染物質規制の面から自動車排出ガス対策をたてるためには、変異原物質を同定し、それら物質の発癌性や生成条件等を明らかにしていく必要がある。そこで本年度は自動車排出ガスに含まれるガス状物質を取り上げ、変異原物質の検索を行ったので報告する。

一方、自動車排出ガス中のガス状物質と粒子状物質の変異原活性は、異なった菌株、実験条件下に測定されており、これらを比較することが排出ガスの変異原性を総合的に把握するためには不可欠であるにもかかわらず、直接の比較が困難であった。そこで排出ガス中の一成分であるホルムアルデヒドを一例として取り上げ、これが気相に含まれる場合および溶液中に存在する場合に示す変異原活性を同一菌株を用いて測定し比較を試みたので、その結果も併せて報告する。

2 検討方法

(1) 使用菌株

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 TKJ5211 (*his B met uvr A10*), DNAポリメラーゼI欠損株 TKJ8201 (*his B met pol A151*) の3株を用いた。検体が気相に存在する場合は、前報同様にフィルター上にまいた spore を検体を含む気相に曝露することにより検討を行った。また、ホルムアルデヒド溶液を検体として使用する場合は、上記 TKJ8201 株の栄養細胞および

Scheffer 培地を用いて作った spore 液により検討を行った。

(2) 検体・調製法および変異原性試験方法

自動車排出ガス中のガス状成分のなかから、主要な成分として、窒素化合物2種、炭化水素5種、アルデヒド化合物4種、一酸化炭素および二酸化イオウ計13種を選び、変異原性の試験を行った。表1にこれら検体名・濃度・変異原性の有無および前報で報告したガソリン車排出ガス(生排出ガスを清浄空気でCVS装置により5.4倍に希釈)の曝露開始時におけるこれら被検物質の濃度を示した。検体は通常液体であるものも全てガス状態とし希釈した後、フィルター上にまいた3菌株の spore をこれらのガスに一定時間曝露した。曝露後、容器内の被検ガスを滅菌清浄空気で置換し、フィルターを取り出した。なお、検体の希釈には滅菌清浄空気をういたが、NOガスだけは空気中の酸素で容易にNO₂に転換するため曝露前後に容器の空気を完全に滅菌N₂ガスで置換し、希釈もN₂ガスで行った。フィルター上の spore は滅菌蒸留水に懸濁し、最少培地上で培養後生菌数、復帰変異コロニー数を測定した。

また、ホルムアルデヒドは気相に含まれる場合はフィルター上の spore に室温で30分間接触させ、上記と同様の方法により検討を行った。溶液に含まれる場合は栄養細胞および spore の各菌液中に一定量添加して30分間37°Cで振盪培養し、菌体を洗浄してホルムアルデヒドを除去した後、最少培地上で培養し、変異原性を検討した。

表1 枯草菌 spore による自動車排出ガス成分の変異原性

		被検ガス濃度	HA 101株 (野生株)	TKJ 5211株 (uvrA)	TKJ 8201株 (polA)	被検自動車排出 ガス濃度
窒素酸化物	NO	50-3,000 ppm	-	-	-	270 ppm
	NO ₂	50-1,000 ppm	-	-	+	
一酸化炭素	CO	250-1,000 ppm	-	-	-	416 ppm
二酸化イオウ	SO ₂	50 ppm	-	-	-	-
炭化水素	パラフィン系	メタン	1,000 ppm	-	-	316 ppm
	オレフィン系	エチレン	100%	-	-	
	アセチン系	アセチレン	100%	-	-	
	芳香族	ベンゼン	8,000 ppm	-	-	
		キシレン	10-15%	-	-	
アルデヒド	ホルムアルデヒド	50-3,000 ppm	+	+	+	推定濃度 (2-30 ppm)
	アセトアルデヒド	8,500 ppm	-	-	-	
	アクロレイン	2.5-8%	-	-	+	
	ベンズアルデヒド	2%	-	-	-	

3 結果および考察

表1に示すように、枯草菌の spore を直接気体に曝露する試験法により変異原性が検出された。このうちNO₂ の変異原性については前報でも触れたが、本年度は曝露時間・濃度をかえて、より詳細な検討を試みた。図1に250, 500, 1,000 ppmの3段階の濃度のNO₂ ガスに対する曝露時間と突然変異率の関係図2に1時間, 2時間曝露におけるNO₂ ガス濃度と突然変異率の関係を示した。図1・2から曝露時間が長い程、濃度が高い程突然変異率が上昇するとの結果が得られた。しかし、突然変異率と曝露時間・ガス濃度との間の正確な量-反応関係を見出すには今回の実験だけでは不十分であり、個々のガス状物質の変異活性を定量的に把握し比較するためには、今後さらに実験を重ねてデータを集積し整理する必要がある。次のNOガスは図3に示す通り致死作用も微弱であり、用いた条件下では変異原性はまったく検出されなかった。磯村ら¹⁾は培養動物細胞に対するNOの変異原性を報告しているが、今回の結果からNOは少なくとも前報で報告した枯草菌 spore に対して自動車排出ガスが示した変異原性の原因物質とは考えられない。COは主要な汚染物質で排出ガス中の含有量も多いが、図4に示す通りわずかな致死作用を示すのみでまったく変異原性を示さなかった。次のSO₂、炭化水素類のいずれにつ

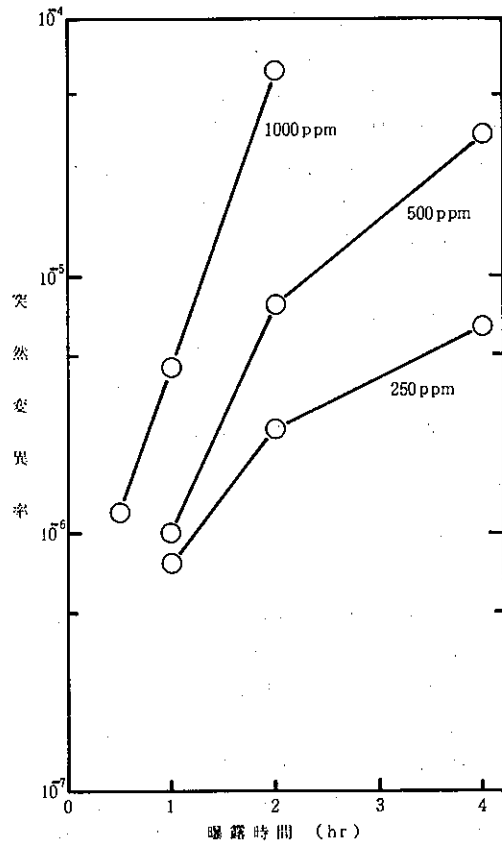


図1 NO₂ の変異原性 (曝露時間の影響) (TKJ8201株)

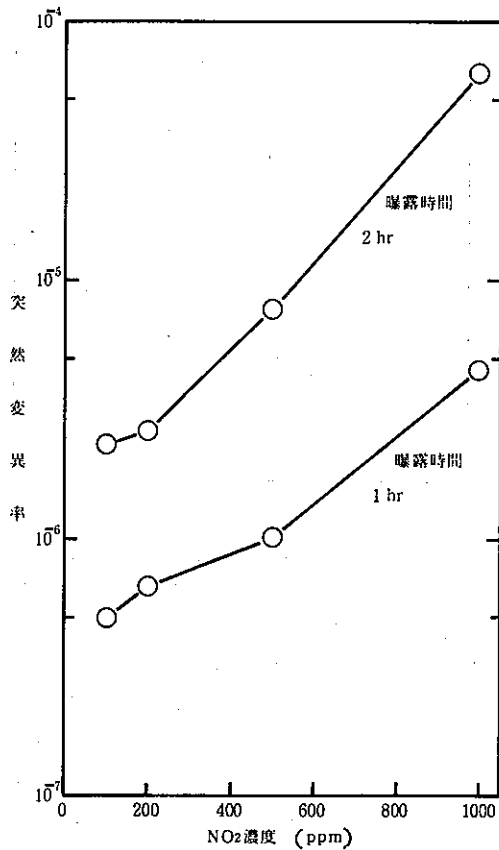


図2 NO₂ の変異原性 (曝露濃度の影響) (TKJ8201 株)

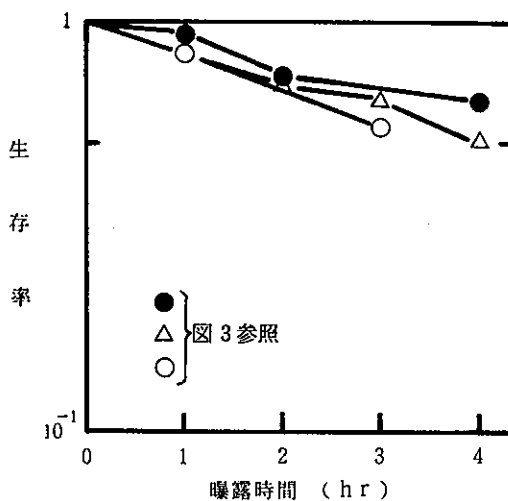


図4 COガスの枯草菌に対する致死作用

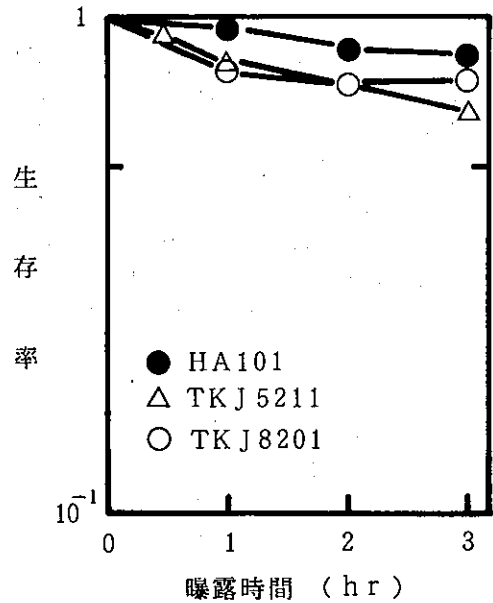


図3 NOガスの枯草菌に対する致死作用

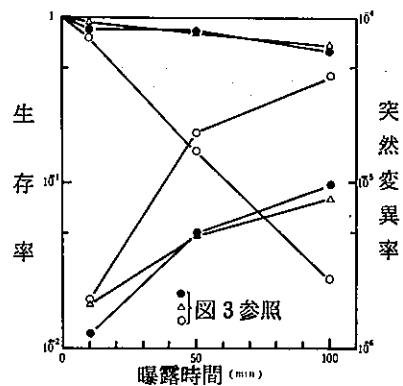


図5 ホルムアルデヒドガスの変異原性

いても変異原性は検出されなかった。しかしこれら炭化水素類には代謝活性化によって変異原性を獲得するものが含まれる可能性もあり、早急に代謝活性化の段階を取り入れた検出法の開発を行う必要がある。最後のアルデヒド化合物の中では、ホルムアルデヒドとアクロレインに変異原性が検出された。そのうちホルムアルデヒドは使用した3菌株全てにおいて図5に示す通り変異原性が検出された。アクロレインの変異原性は2.5倍以上というかなり高濃度域でTKJ8201株のみで検出された(図6)。これらアルデヒド化合物について、我々は昭和52年度にサルモネラTA

100株を用いたAmes法(-S9mix)により今回の実験に使用した検体中ホルムアルデヒドだけが弱い変異原性を示すことを報告²⁾している。今回使用した枯草菌がTA100株と同様塩基交換型の突然変異を生ずる菌株であることから、変異原性の検出されたホルムアルデヒドが塩基交換型のdirectな変異原であることが確認された。ただ、枯草菌の方がアクロレインの変異原性も検出でき、ホルムアルデヒドについてもサルモネラ菌を使用した場合よりははっきりした量-反応関係が得られることからこのタイプの変異原に対しより高い感受性を持つことが推測される。以上3つの変異原が検出されたが、検出された濃度と排出ガスに含まれる濃度の関係、および検出に使用した菌株の性質から推定される各変異原のDNA修復活性に対する依存性から判断して自動車排出ガスに含まれる総ガス状成分が示す変異原性の主因はNO₂と考えられる。

図7に気相および溶液中に含まれるホルムアルデヒドの変異原性をsporeと栄養細胞を用いて検討した

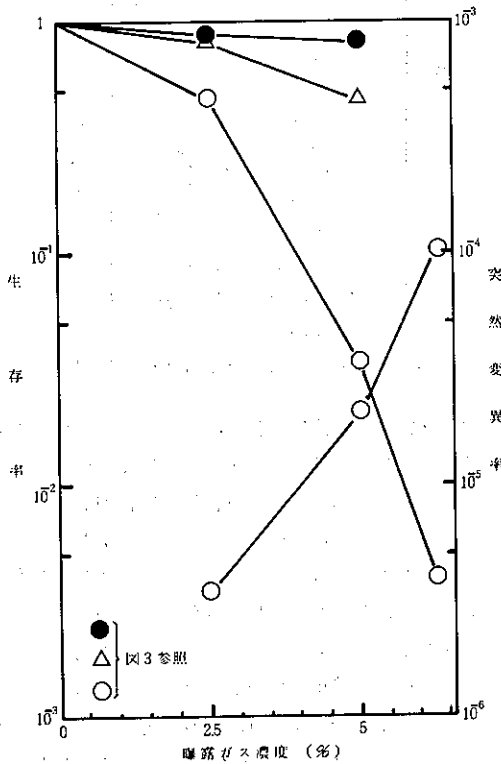


図6 アクロレインガスの変異原性

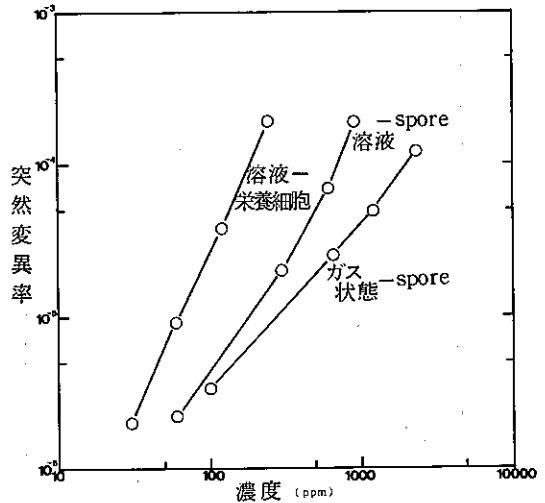


図7 TKJ8201株(spore, 栄養細胞)によるガス・液体状態のホルムアルデヒドの突然変異性

結果を示した。なお菌株は前述の実験(図5)で一番強い変異原性を示したTKJ8201株を用いた。その結果同濃度での突然変異率は、溶液を栄養細胞で試験>溶液をsporeで試験>ガス状の検体をsporeで試験、の順に低くなった。ただし、ここに用いた3種類の試験条件下で得られた結果を定量的に比較するためには、各条件下での被検化合物のsporeへの吸着量等について、さらに詳細な検討が必要とされよう。変異原性試験においてsporeが栄養細胞より感受性が低いことは既に知られている³⁾が、sporeを用いた本実験により10⁻⁴程度の突然変異率が認められたという事実は、自動車排出ガスに含まれるガス状成分が充分注目に値する変異活性を持つことを示している。今後はディーゼル車等についても排出ガスの変異原性に関して残された種々の課題を検討する予定である。

おわりに、本実験についてご指導、ご協力下さった当所大気部に謝意を表します。

参考文献

- 1) 磯村 一郎ほか：ガス状大気汚染物質の細胞毒性と突然変異能，大気汚染研究，11，59，(1976)。
- 2) 佐々木 裕子ほか：環境汚染物質の突然変異性，公害研究所報告書(社会科学・保健編)，111，(1977)。
- 3) Tanooka, H. et al: Mutation Induc-

tion with UV- and X-Radiations in
Spores and Vegetative cells of

Bacillus subtilis, Mutation Res. 49, 179,
(1978).