

論文

環境汚染物質の変異原活性に関する研究

大山 謙一 佐々木 裕子 宮 垣 融
若 林 明子 (多摩環境保全事務所)

要 旨

微生物を用いる変異原活性試験法を用いて大気中の浮遊粉じんや自動車排ガス等の変異原活性を調べ順次報告してきた。今回、大気汚染の癌原性等の検討の資料とするため、これらの結果をとりまとめた。

一連の研究から次のことが判明した。①東京の大気の変異原活性は高く、しかもその活性は23区から立川までほぼ同程度であった。②自動車排ガスも高い変異原活性を示し、ディーゼル車の活性はガソリン車のそれに比較して非常に高かった。③大気でも自動車排ガスでもガス体に比較して粉じんの変異原活性が高く、大気汚染を原因とする健康障害を減少させていくためには粉じん対策が特に重要であることが示唆された。

一方、土壌の変異原活性から大気の汚染状況を推察することは現段階では難しいと思われる。

1 はじめに

大気汚染による健康障害は、大きな社会問題となっている。東京都も「東京都環境管理計画」等において、大気汚染と健康影響との因果関係を科学的に解明するため、長期継続的かつ広範に各種の健康影響調査・研究を行うことにしている。従来からよく行われている動物実験による方法では、多額の経費と多数の実験動物を必要とすると同時に長い実験期間を要する。これを補完するために、短時間に経済的に実施できる微生物を用いる変異原活性試験が、癌原性のスクリーニング法として用いられるようになった。また、本試験は検体が少量で済み、多くの条件で試験が実施できるという利点もある。癌原物質の多くが変異原物質と一致するとの報告もあり、大気汚染物質の癌原性のスクリーニング法として優れた方法と思われる。そこで、筆者らは大気汚染物質の癌原性に関する研究の一環として本手法を用いて従来から、大気中の粉じん¹⁾、ガソリン車及びディーゼル車排ガス及び土壌^{2) 3) 4)}の変異原活性を調べ順次報告してきた。今回、これらの結果を取りまとめ考察を加えることによって、大気汚染の癌原性等の検討の資料とすることとした。

2 実 験

1) 材 料

ア. 供試物質

大気浮遊粉じんは図1に示した都内12地点で、ハイボリュームエアサンプラーを用い、24～72時間ガラス繊維ろ紙（東洋ろ紙GB-100R）あるいは石英ろ紙（Pallflex Type 2500）上に捕集した。ろ紙は秤量後ベンゼンで8時間ソックスレー抽出又はベンゼン—エタノール（4：1，V/V）で30分間超音波抽出を行い、抽出溶媒は減圧下で留去した。得られたタール



1. 旧東京都公害研究所（千代田区）
2. 都市衛生研究所（新宿区）
3. 江東区役所
4. 稲谷保健所（大田区）
5. 世田谷区役所
6. 板橋区産業文化会館（板橋区）
7. 荒川区役所
8. 江戸川区役所
9. 東京都立川合同庁舎（立川市）
10. 小川内貯水池（奥多摩町）
11. 小笠原支庁（父島）
12. 東京タワー（港区）

図1 測定地点

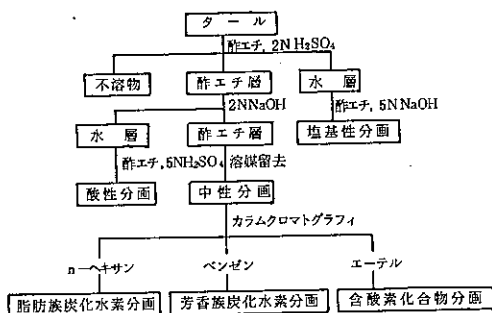


図2 タールの分画法

表1 実験車諸元

		排気量	排出ガス対策
ディーゼル車 A	渦室式, 乗用車	1,951 CC	54年規制適合
ディーゼル車 B	" , トラック	2,770 CC	52年 "
ガソリン車 A	乗用車	1,580 CC	未対策
ガソリン車 B	トラック	1,994 CC	57年規制適合

は直接あるいは常法に準じて3または5分画(図2)した後ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶かし、ろ過滅菌して用いた。

自動車排ガスは表1に示した自動車を各種走行条件(定速, 10モード, M-15, 都内実走行パターン)でシャーシダイナモメータ上で運転して得た。このうち排ガス中粉じんは希釈トンネルで調整後捕集し、大気浮遊粉じんと同様に処理して用いた。排ガス中ガス状成分は定容量サンプラーで希釈し、多段ろ紙で粉じんを除去して用いた。

自動車排ガスの主要構成ガス状成分については二酸化窒素(NO₂)、一酸化窒素(NO)、炭化水素5種、アルデヒド4種、一酸化炭素(CO)、二酸化イオウ(SO₂)を用いた。

土壌の実験では、採取場所を幹線道路沿道地点として境橋付近(五日市街道沿道)、小平霊園(新青梅街道)を、比較的交通量の少ない道路沿道地点として野火止用水放流口付近を選んだ。各地点とも車道から数m離れた3か所(各々の距離は約5m)を掘削し、地表から地下25cmまで3層に分けて直径5cm、高さ5

cmのステンレス製土壌採取カンで採取した。土壌は、乾燥後ろ紙上に広げ、小石等の夾雑物を取り除き、室温下のデシケーター中で10日間乾燥した。得られた乾燥土壌を乳鉢で粉砕し、ふるいに通して粉末状にした後、大気浮遊粉じんと同様に処理して用いた。

イ. 使用菌株

粉じん等の試験には Ames らにより分離され、改良された *Salmonella typhimurium* TA100 (塩基置換型変異株), TA98 (フレームシフト型変異株) 及び Rosenkranz らが TA98 から分離した TA98NR 株 (ニトロレダクターゼ欠損株), TA98/1.8DNP₆ 株 (ジニトロピレン活性化酵素欠損株) の4株を用いた。

ガス状成分の試験には枯草菌 (*Bacillus subtilis*) のヒスチジン要求性野性株 HA101, 除去修復欠損株 TKJ5211 (uvrA), DNAポリメラーゼ I 欠損株 TKJ 8201 (pol A) を用いた。

土壌の試験には, *Salmonella typhimurium* TA 98 (フレームシフト型変異株) 及び渡辺らが TA98 から遺伝子導入により作成した YG1024 (ニトロアレーン高感受性株¹⁰) を用いた。

ウ. S-9

雄ラットの腹腔内に PCB を注射して酵素を誘導した肝臓の遠心上清あるいはベンゾフラボンとフェノバルビタールで誘導した市販(キッコーマン(株)製)のものを用いた。

2) 方法

ア. 粉じん等の試験: S-9 による代謝活性化を併用するプレインキュベーション法を用いた。すなわち、小試験管に供試化合物の DMSO 溶液を 0.1ml, りん酸緩衝液または S-9 を 0.5ml 及び培養した菌液 0.1 ml を入れ 37°C 20 分間振とう培養を行った。次に、軟寒天を 2 ml 加え最小培地上に重層し、37°C で 48 時間培養した。生じたコロニーの数を数え、単位粉じんあるいは単位空気量当たりの誘発変異コロニー数を算出し変異原性の判定を行った。

イ. ガス状成分の試験: 枯草菌 3 株の芽胞の一定菌数をミリポアフィルター (0.22 μm) 上にまき乾燥させた。この芽胞を一定時間デシケーターもしくは、テトラバック内でガス曝露した後、滅菌蒸留水に懸濁した。最小培地上で培養後、生菌数及び復帰変異コロニー数を測定し、変異原性の判定を行った。

3 結果

1) 大気浮遊粉じん

旧公害研究所での結果では、5分画のタール全てで2菌株、±S-9で変異原活性が認められ、大気中に

多種類の変異原物質が存在することが示唆された。分画別の変異原活性は、芳香族炭化水素分画で最も高く、次いで脂肪族炭化水素分画で高かった。

図3に1982年12月、1983年2月、8月、10月、1984

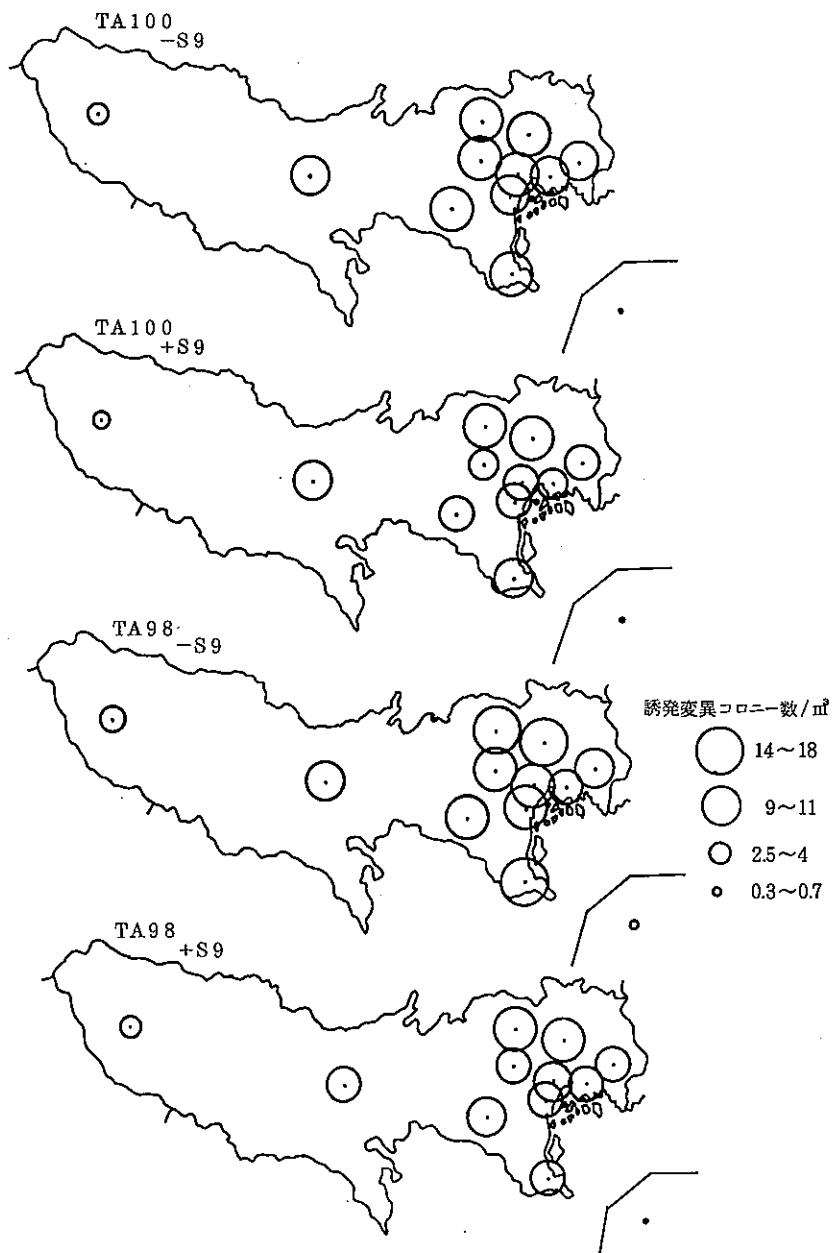


図3 都内12地点 年間平均変異原活性

(注) 測定地点, 図1参照

年4月、6月の合計6回の都内12地点での単位空気量当たりの平均変異原活性を示した。TA100、TA98両菌株間の変異原活性に余り違いは認められなかった。一方、代謝活性の有無では、S-9非存在下の変異原活性（直接変異原活性）の方は、殆どの地点でわずかに高い傾向が認められた。各地点の結果を比較すると、清浄対照地点（小河内、小笠原）を除く10地点は空気 m^3 当たり10rev（誘発変異コロニー数）前後であり、地域変動は変動係数16%（TA100-S9）～21%（TA100+S9）と少なかった。すなわち、都心から離

れた住宅地域まで同程度の汚染が及んでいることが分かる。また、小河内では空気 m^3 当たり2～4 revとかなり変異原活性は低い、粉じん重量当たりでは区部の平均の70～90%の変異原活性を示した。一方小笠原では単位空気当たりでも粉じん当たりでも変異原活性は区部の10%しかなく、変異原物質の汚染はかなり低かった。

次に、測定月ごと、地域ごとのTA98-S9、TA98N R、TA98/1.8DNP₆の単位空気量当たりの変異原性を比較する。TA98-S9の変異原活性は平均すると地

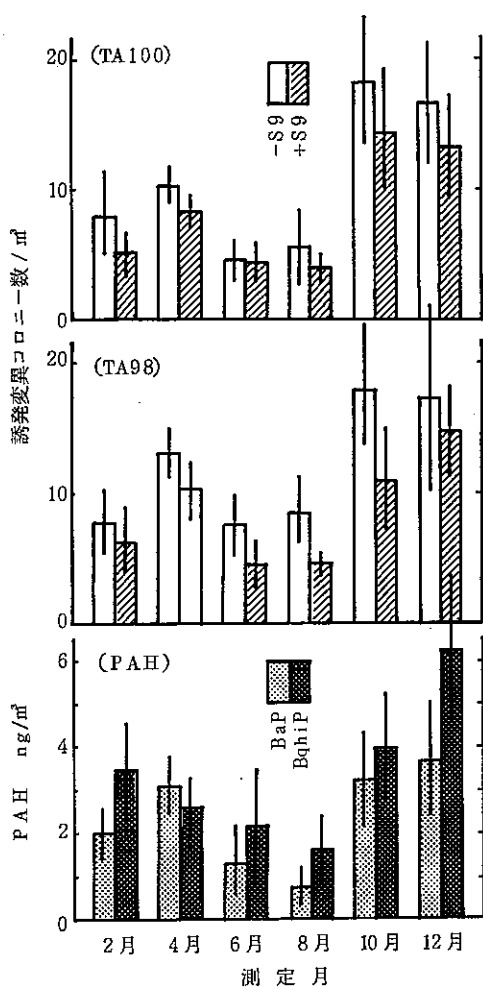


図4 都内区・立川の単位空気量当たりの月別推移

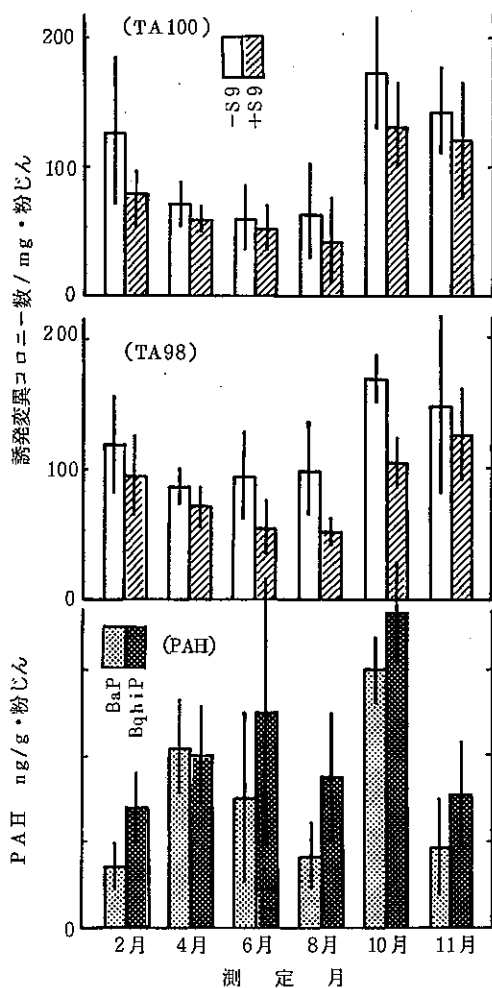


図5 都内区・立川の単位粉じん量当たりの月別推移

点ごとの差は殆どないが、季節ごとには幾分差が見られた。月ごとには10, 12月に高く、6月, 8月に低い傾向が見られた。TA98-S9とTA98NR, TA98/1.8DNP株の変異原活性を比較すると、TA98NR株で19~91%, TA98/1.8DNP株で検出限界以下~65%まで活性の低下が見られた。

清浄対照地点を除く10地点での変異原活性の季節変動をみると、単位空気当たりでは明確な傾向が見られなかったが、単位粉じん当たりでは2菌株±S-9のいずれも春~夏に低く秋~冬に高いという傾向が認められた(図4, 5)。

2) 自動車排ガス粉じん

図6に、検討した4台の車の定速走行での結果を示した。若干の例外を除き、概ね車速の上昇に伴って走行距離当たりの変異原性が上昇した。次に、加速・減速を繰り返す過渡走行と定速走行を比較すると、ガソリン車(図7), ディーゼル車(図8, 9)いずれも過渡走行時に変異原性が上昇し、走行条件が変異原活

性に大きく影響を及ぼした。

車種による比較では、図6~9に示したように、走行条件・規制対策の有無や排気量の多少の差は小さく、ガソリン車、ディーゼル車の違いのほうが大きかった。すなわち、ディーゼル車の変異原活性がガソリン車のそれに比較して非常に高いことが認められた。このディーゼル車の高い変異原活性は、排出粉じん量と有意に相関を示した(図10)。

しかしながら、ガソリン車とディーゼル車の粉じん量当たりの変異原活性を比較すると、表2に見られる通り顕著な違いは認められなかった。

変異原性はガソリン車ではTA98株で、ディーゼル車ではTA98, 100の両菌株で高い変異原性を示すことが多かった。一方、代謝活性化の有無ではいずれの車も直接変異原性の方が高い場合が多かった。

図11, 表3にタールを分画に分けた結果を示した。ガソリン車、ディーゼル車いずれも多種類の変異原物質の存在が認められ、中性分画、特に芳香族炭化水素

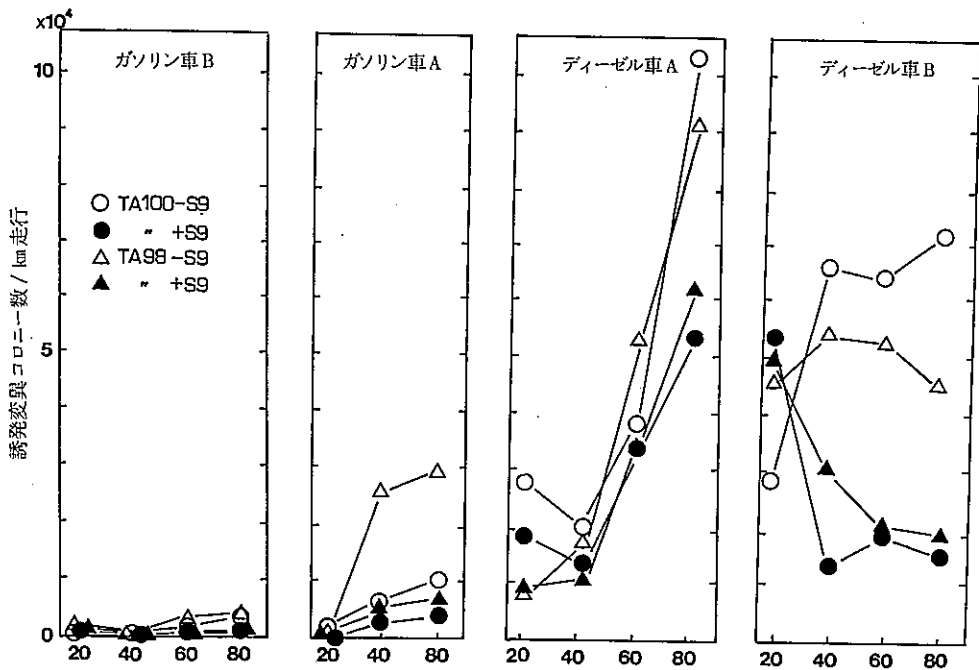


図6 定速走行時のガソリン車・ディーゼル車の変異原性

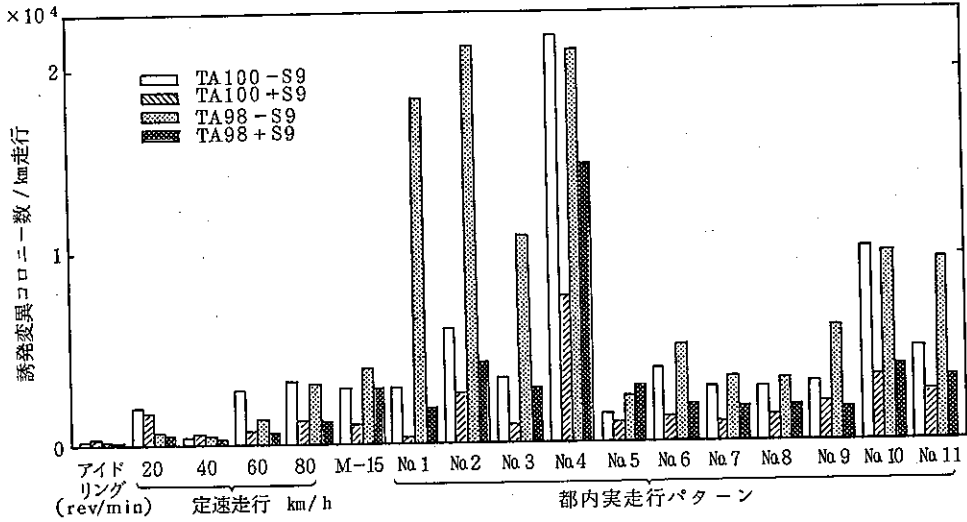


図7 ガソリン車の単位走行当りの排出変異原活性

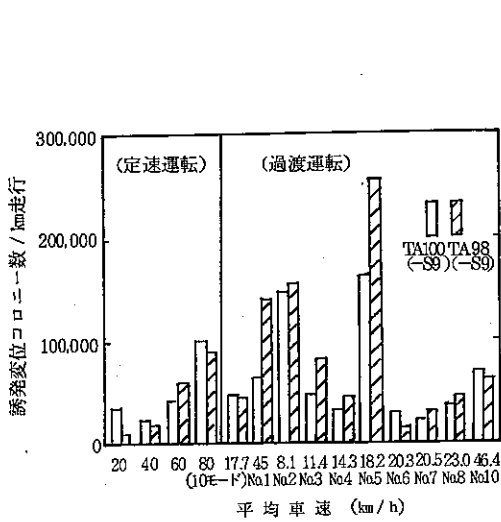


図8 ディーゼル車A 走行距離当り直接変異原性
注 No. 1~No.10は都内実走行パターンの番号

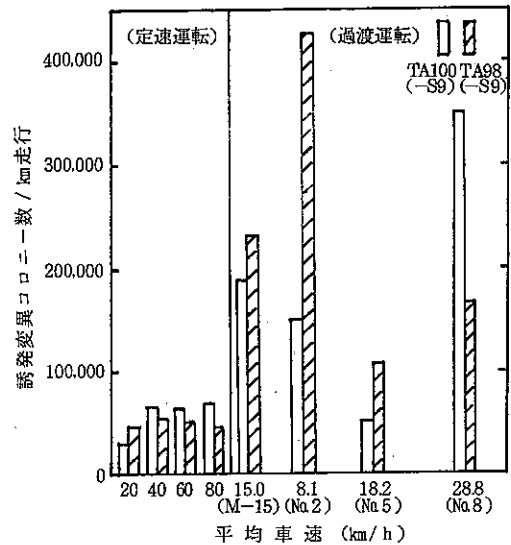


図9 ディーゼル車B 走行距離当り直接変異原性

表2 自動車排出ガスの粉じん重量当りの平均変異原活性

	粉じん (mg/km)	rev/mg・粉じん			
		TA100		TA98	
		-S9	+S9	-S9	+S9
ガソリン車B 57年規制	2.7±1.7	1980±2240	870±780	2950±2200	1400±1450
ガソリン車A 1,580 CC, 未対策	16±16	340±360	170±150	1150±1020	270±250
ディーゼル車A 1,951 CC, 54年規制	140±70	340±160	260±80	320±210	340±80
ディーゼル車B 2,770 CC, 52年規制	210±170	640±450	340±160	610±210	400±150

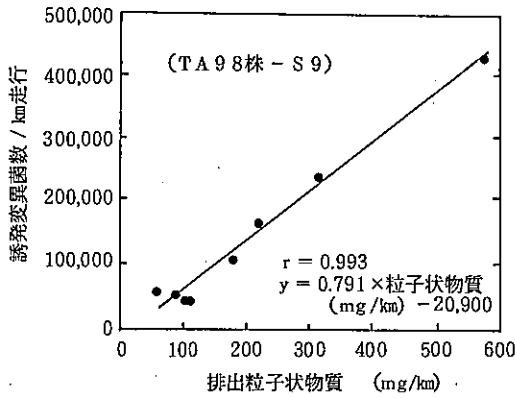


図10 排出粒子状物質と変異原性の関係

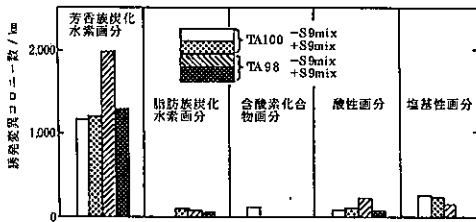


図11 ガソリン車A排出ガス粉じんの抽出物の5画分の変異原活性 (80km/h, 定速走行)

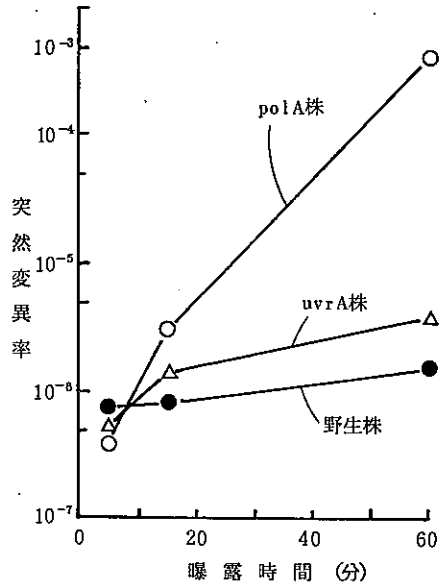


図12 ガソリン車A排出ガス成分の変異原性

表3 ディーゼル車排出ガス粉じんの抽出物の3画分の変異原活性 (定速走行, 誘発変異コロニー数/km)

車速 (km/h)	S9 mix	中性画分		塩基性画分		酸性画分	
		TA 100	TA 98	TA 100	TA 98	TA 100	TA 98
ディーゼル	-	1280	440	ND	ND	3170	540
	+	4060	2690	ND	ND	940	570
車 A	-	13190	14410	ND	2520	3300	ND
	+	17850	6980	ND	ND	1460	1650
(1951CC)	-	34940	25340	ND	ND	9120	5470
	+	38590	58560	ND	1730	4340	4010

ND: 不検出

分画が高い変異原性を示した。また、TA98株に対し、TA98NR、TA98/1.8DNP。での変異原性が低下した。

3) 自動車排ガス及び単独ガス

ガス状成分について芽胞を曝露させたところ、使用した3菌株に変異原性が見出され、特にpolA株で高い感受性が見られた(図12)。

次に個々のガスについて検討した結果を表6に示す。NO₂はpolA株で高い変異原性を示し、その値は

曝露時間と曝露濃度の増加に伴い強くなった。

一方、アルデヒド類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。ホルムアルデヒドは3菌株全てで、アクロレインでは曝露濃度2.5%以上という非常に高濃度で検出された。

4) 土 壤

深さによる土壌の変異原活性の変化を図13、14に示したが、TA98によるフレームシフト型の変異原活性

表4 枯草菌芽胞による自動車排ガス成分の変異原性

		被検ガス濃度	HA101株 (野生株)	TKJ5211株 (uvrA)	TKJ8201株 (polA)	被検自動車排 ガス濃度	
窒素酸化物	NO	50-3,000ppm	-	-	-	270ppm	
	NO ₂	50-1,000ppm	-	-	+		
一酸化炭素	CO	250-1,000ppm	-	-	-	416ppm	
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	-	-	-	316ppm
	オレフィン系	エチレン	100 %	-	-	-	
	アセチレン系	アセチレン	100 %	-	-	-	
	芳香族	ベンゼン	8,000ppm	-	-	-	
		キシレン	10-15%	-	-	-	
アルデヒド	ホルムアルデヒド	50-3,000ppm	+	+	+	推定濃度 (2-30ppm)	
	アセトアルデヒド	8,500ppm	-	-	-		
	アクロレイン	2.5-8%	-	-	+		
	ベンズアルデヒド	2%	-	-	-		

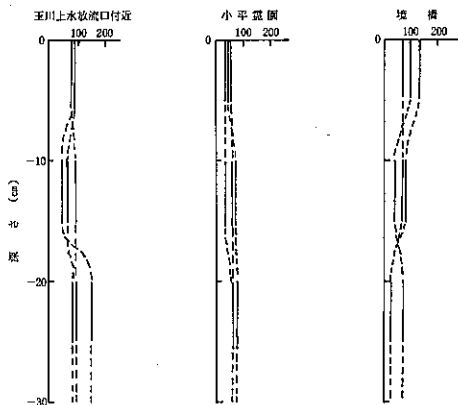


図13 深さによる土壌の変異原性の変化 (TA98) 誘発変異コロニー数/g

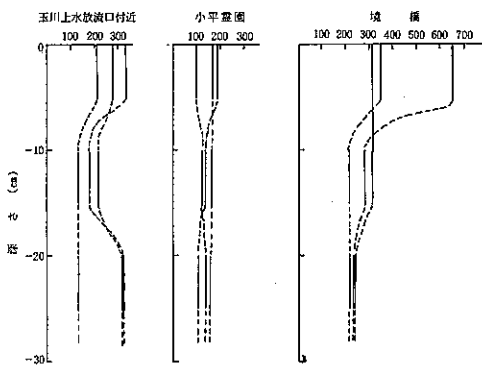


図14 深さによる土壌の変異原性の変化 (YG1024) 誘発変異コロニー数/g

は、3地点とも低い値を示した。しかし、YG1024による変異原活性は、TA98より数倍の強さを示した。

TA98によるフレームシフト型の変異原活性の土壌の深さによる変化は、3地点とも認められなかった。しかし、YG1024による変異原活性は、境橋において上層が下層より高い値を示した。

4 考 察

1) 大気浮遊粉じん

東京の大気中の変異原物質の活性は23区から立川までほぼ同程度で、住宅地域¹¹⁾と工場地域で変異原活性に大きな差のある福岡県などとは異なった。また、都心から約60km離れた山間部でも、粉じん当たりの活性は23区と余り変わらず、都心の浮遊粉じんがこの地域まで移流拡散してきていることを推測させた。

一方季節変動を見ると、秋～冬に高く、春～夏に低いという結果が得られた。原因としては粉じんに含まれる芳香族炭化水素化合物を分解する紫外線の強さや日照時間、拡散に係る風等気象条件も関与していると思われる。

また、大気中粉じんは、直接・間接の両変異原性を示したが、フレームシフト型(TA98)の直接変異原活性は、TA98NR株、TA98/1.8DNP₆株で活性が低下することから、ニトロアレン類によるものであることが示唆された。この推定は変異原活性が芳香族炭化水素分画で高いことも一致する。今回、フレームシフト型と同程度の塩基置換型(TA100)直接変異原活性が検出されたことから、未知の高活性変異原物質の存在も予測された。

2) 自動車排ガス

自動車排ガスの変異原性について、車種、排気量、走行パターン等様々な条件で検討した結果、ディーゼル車対策の必要性が強く示唆された。環境大気でも、浮遊粉じん量と変異原活性が有意の相関を示したが、ディーゼル車の場合においても、高い変異原性が排出粉じん量の多さによることが明らかになった。現在、ディーゼル車の粉じん規制が若干強められたが、更に対策が必要と考えられる。

また、いずれの車でも走行条件が変異原性に大きく影響し、特に加減速が変異原性を増加させることが明らかになった。そのため、交通の流れの改善も変異原

物質削減に有効と考えられる。

次に、自動車排ガス状成分の検討からは、ガス状成分にも変異原性があることが分かった。排ガス成分と検出菌株から、自動車排ガス状成分の変異原性は主にNO₂によるものであることが明らかになった。この点に加え、NO₂はPAHとの反応で容易にニトロアレン類を生成することが知られている。ニトロアレン類のうちいくつかについては癌原性も知られており、今回の検討で、自動車排ガス・環境大気いずれからも存在が認められた。このため、この面からも、NO₂削減が必要と考えられる。

ガソリン車とディーゼル車の排ガスの変異原活性を比較すると、走行距離当たりではディーゼル車のほうが著しく高いが、粉じん重量当たりでは両者は余り違わない。すなわち、ガソリン車の走行距離当たりの変異原活性の低い原因は、排出粉じん量が少ないためと思われる。ディーゼル車について、早急に粉じん量を削減する対策が望まれる。また、大気粉じんの場合と同様にTA98NR株とTA98/1.8DNP₆株ではTA98株に比べてかなり活性の低下が見られたことから、ニトロアレン類の存在が示唆された。

3) 土 壌

土壌の変異原性を調べることによって大気汚染状況を推察する目的で実験を行った。その結果、ニトロアレン高感受性株YG1024を用いた場合、表層と地下25cmの土壌の変異原活性に差が見られる場合があるが、上下層同時に測定することによって、土壌固有の変異原活性に煩わされずに、土の表面の降下物等の変異原活性を測定出来る可能性はあることが分かった。しかし、土壌の測定結果と大気汚染との因果関係を考察することは現段階ではまだ難しいと思われる。

5 おわりに

今回の一連の研究から大気中でも自動車排ガス中でもガス状成分に比較して粉じんの変異原活性が高いことが分かった。このことは、大気汚染を原因とする健康障害を減少させていくためには粉じん対策が非常に重要であることを示唆していると思われる。現在、この点を動物実験により確認しているところである。

本研究を行うにあたり、ご協力いただいた本研究所
大気部の皆様に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Sugimura, T. et. al. : Overlapping of Carcinogens and Mutagens, Fundamentals in Cancer Prevention, 1976, p.192-215
- 2) 佐々木裕子他 : 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—, 東京都公害研究所年報, 1980, p.233~235
- 3) 佐々木裕子他 : 環境汚染物質の変異原性に関する研究—東京都における浮遊粉じん調査—, 東京都公害研究所年報, 1984, p.249~254
- 4) 佐々木裕子他 : 環境大気の変異原性に関する研究—都内12地点の浮遊粉じん調査 II—, 東京都環境科学研究所年報, 1987, p.213~218
- 5) 佐々木裕子他 : 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—, 東京都公害研究所年報, 1981, p.270~274
- 6) 佐々木裕子ら : 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—, 東京都公害研究所年報, 1982, p.261~265
- 7) 佐々木裕子ら : 環境汚染物質の変異原性に関する研究—ディーゼル車排ガスの検討—, 東京都公害研究所年報, 1983, p.290~292
- 8) 佐々木裕子ら : 移動発生源の変異原性に関する研究—重量ガンリン車排出ガスの検討—, 東京都環境科学研究所年報, 1987, p.219~221
- 9) 大山謙一ら : 環境汚染物質の変異原性に関する研究—ディーゼルエンジン排出粉じんの変異原性—, 東京都環境科学研究所年報, 1989, p.236~237
- 10) 渡辺雅彦ら : ニロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示す *Salmonella typhimurium* TA98, TA100の新しい誘導株の樹立, 環境変異原研究, 1989, p.67~74
- 11) Tokiwa, H. et. al. : Mutagenic and Chemical Assay of Extracts of Airborne Particulates, *Mutation Res.*, 1980, 77, p.99-108