

ディーゼル車排出物の変異原性と細胞毒性

平良昌彦, 西 和子, 浅中美幸, 戸野谷千春, 藤井智子

(武庫川女子大学家政学部食物学科)

Mutagenicity and Citotoxicity of Diesel Exhaust

Masahiko Taira, Kazuko Nishi, Miyuki Asanaka,

Chiharu Tonoya and Tomoko Fujii

Department of Food Science

Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663

It is certain that some chemicals with direct mutagenicity exist in the soot of diesel vehicles. A new fractionation was attempted and 8 fractions, i. e., basic, acidic, hexane insolubles, ether insolubles, aromatics, transitional and oxygenates were verified. As a consequence, strong mutagenicity was found in the acidic fraction and its mutagenicity reduced by addition of S-9 mix.

The cytotoxicity which soluble fractions of diesel engine exhaust were examined by the plating efficiency method was found to be in the order of: hexane insolubles > ether insolubles > acidic > basic = paraffins = aromatics. Those fractions found to show direct mutagenicity by means of Ames test showed cytotoxicity, while those without direct mutagenicity showed no cytotoxicity.

緒 言

ディーゼル車はガソリン車に比べ、燃費、耐久性に勝っていることから、現在では小型車にまでディーゼル化の波が押し寄せている。しかし、排出微粒子の量は、ディーゼル車がガソリンの30~100倍にもおよんでいる。その粒子サイズは直径0.1~0.2 μ mと肺内沈着率が高く、また、大気浮遊物質の変異原活性もディーゼル車の通行量が多いとされている地区では高くなっていることが報告されている^{1, 2, 3}。

そのため、ディーゼル車の増加に伴う潜在的な健康への影響が懸念されている。

ディーゼル車排出物は、ベンゾ(a)ピレン(BaP)等の多環芳香族炭化水素やニトロアレーン、または、飽和脂肪族炭化水素等の有機物質の付着した粒子状物質を多量に含んでいる¹。

また、可溶性有機成分がガソリン車の平均50倍にも

達し、粒子重量の約15%を占めている。その成分には、直接変異原性を持つ物質が検出されている⁴。

そこで著者らは、ディーゼル車がおよぼす生体影響に関する研究の一環として、これら粒子状物質の変異原性をサルモネラ菌を用い、また、細胞毒性を哺乳動物の培養細胞を用いて検討した。

研究方法

1. 菌株⁵

Salmonella typhimurium TA 98, TA 100 (His⁻, raf, R, uvrB⁻)を用いた。

2. 細胞株⁶

HeLa-S3 細胞を用いた。

3. 排煤抽出物

ディーゼル車排煤32gを塩化メチレンで4時間ソックスレー抽出した後、液、液分配法及びカラム(ワコーゲルC-200, 和光純薬, 1.2×17cm)分画法で、塩基性、酸性、ヘキサン不溶性、エーテル不溶性、鎖状炭化水素、環状炭化水素、遷移炭化水素、含酸素炭

化水素の8種に分画 (Fig. 1)⁷した。減圧濃縮後、ジメチルスルホキシド (以下DMSO) で10mg/mlの濃度に溶解し、100℃, 30分間煮沸滅菌を行い、実験時に、変異原性試験においては滅菌DMSOで、細胞毒性の検定には細胞培養用培地 (10%血清添加) で適宜希釈したものを検体とした。

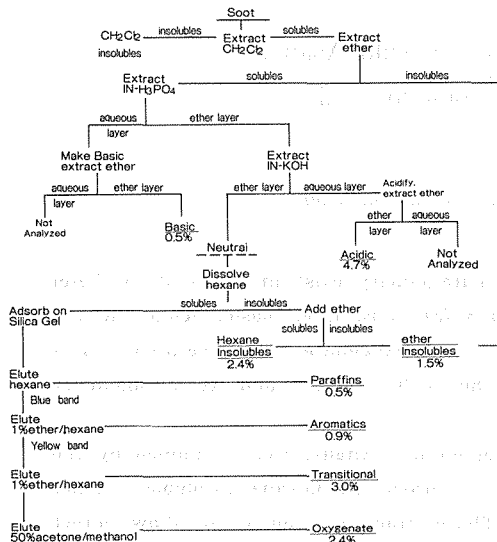


Fig. 1 Scheme for extraction of soluble organic fraction of diesel particulates.

4. 変異原性試験⁵

Ames法の改良法であるブレインキュベーション法により行った。代謝活性化のためには、PCB (KC-500) を投与した7週齢、雄ラット (Fisher系) の肝

Table 1 Composition of S-9Mix

Component	Preparation	per ml
S-9Mix fraction	liver homogenate 9000 × g supernatant	0.300ml
KCl	1.65M	0.020ml
MgCl ₂	0.40M	0.020ml
G6P	1.00M	0.005ml
G6PD	100units/ml	0.005ml
NADPH	0.10M	0.040ml
Na-PBS	0.25M	0.400ml
DW2		0.210ml

臓ホモジネートから S-9mix を調製 (Table 1) した。

5. 細胞毒性試験

Hela-S3 細胞を200個/50mm dish 播種し、37℃, 5%CO₂ ふ卵器中で24時間培養後、各検体をそれぞれ、100μg/ml, 70μg/ml, 50μg/ml, 30μg/ml, 10μg/mlの濃度で24時間作用させ、コロニーを形成させた。その後、常法通り固定、染色し、計測したコロニー数について相対コロニー形成率を求めた。

結果

1. 排煤抽出物の変異原性

分画物の割合は、ディーゼル車排煤当り、塩基性分画0.5%、酸性分画4.7%、ヘキサン不溶性分画2.4%、エーテル不溶性分画1.5%、鎖状炭化水素0.56%、環状炭化水素0.91%、遷移炭化水素3.0%、含酸素炭化水素2.4%であった。それぞれの変異原性を検討した結果を Table 2 に示した。酸性分画、ヘキサン不溶性分画、エーテル不溶性分画、含酸素炭化水素分画は、S-9mix の添加により減少がみられる変異原性を有していた。これらの4分画は、TA100よりもTA98に高い感受性を示し、変異原活性量に対する比率は73%を占めた。特に、酸性分画は、全体の43%を示した。

2. 排煤抽出物の細胞毒性

コロニー形成率の変化を Fig. 2 および Table 3 に示す。これによると、排煤抽出物の細胞毒性の強さは、

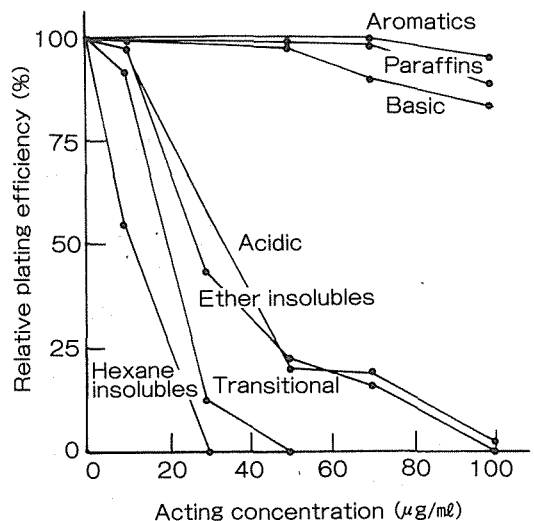


Fig. 2 Effects on plating efficiency by the addition of soluble fractions of exhaust soot.

Table 2 Mutagenicity on soluble organic fraction from diesel car soot

Fraction	Concentration $\mu\text{g}/\text{plate}$	Revertants/plate			
		TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
1. Basic	100	32	35	122	178
	10	18	246	67	153
	1	8	21	43	95
2. Acidic	100	898	233	660	164
	10	130	51	135	73
	1	26	12	40	30
3. Hexane insolubles	100	575	189	482	165
	10	110	65	133	78
	1	24	26	44	53
4. Ether insolubles	100	456	136	417	70
	10	76	46	115	55
	1	20	17	39	48
5. Paraffins	100	13	30	86	192
	10	12	32	57	145
	1	7	30	30	107
6. Aromatics	100	13	26	78	290
	10	10	25	51	205
	1	11	27	34	135
7. Transitional	100	492	522	418	985
	10	86	26	148	183
	1	18	9	58	55
8. Oxygenates	100	714	221	536	152
	10	87	36	72	80
	1	12	8	17	48

ヘキサン不溶性分画>遷移炭化水素分画>エーテル不溶性分画>酸性分画>塩基性分画=鎖状炭化水素分画=環状炭化水素分画の順であることがわかった。

考 察

大気汚染物質の主な、変異原性化合物は、ベンツ (a) ピレンに代表される代謝活性化を要する多環芳香族炭化水素 (PAH) であった^{8, 9, 10}。しかし、交通量の多い地区で採取された大気浮遊物の変異原性強度と、ベンツ (a) ピレン含有量との間に相関関係は認められていない^{11, 12}。また、大気浮遊物質中には、代謝活性化することにより変異原性が減少する化合物の存在も報告されている^{13, 14}。これらのことから、従来より検索されている化合物とは異なる代謝活性化を要しない新たな変異原物質の存在が予測される。

著者らは、自動車排煤抽出物の変異原性を検討した結果、代謝活性化せずとも変異原性を示す direct-mutagen の存在を確認した¹⁵。しかも、direct-mutagen を有する分画 (酸性分画、ヘキサン不溶性分画、

Table 3 Cytotoxicity and mutagenicity of soluble fractions of exhaust soot.

Fraction	Cytotoxicity* ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Mutagenicity**	
		-S-9	+S-9
Basic	>100	32	35
Acidic	35	898	233
Hexane insolubles	14	575	189
Ether insolubles	36	456	136
Paraffins	>100	13	30
Aromatics	>100	13	26
Transitional	22	492	522

* Active concentration of drugs showing a 37% survival rate (Do value).

**No. of revertants per plate at concentration of $100\mu\text{g}/\text{plate}$ and strain TA 98.

エーテル不溶性分画、含酸素炭化水素分画) の排煤総変異原量に対する比率は73%と高く、中でも酸性分画が全体の43%を占めていた¹⁶。この結果は、自動車排煤抽出物の変異原性の相当な部分が direct mutagen で占められている事を示唆している。

また、著者らの実験結果では、Pitts¹⁷、大西¹らの報告と同様、direct-mutagen を有する分画の変異原性がTA100菌株よりもTA98菌株に高い感受性を示しており、フレイムシフト型の変異を誘起する化合物であることがわかった。

一般に、direct-mutagen として知られている化合物には、エポキシド、パーオキシド、ヒドロパーオキシドがあげられる¹⁸。しかし、いずれも不安定な化合物であり、自動車排煤吸着物中での存在は考えにくい。

現在、ディーゼル排煤中で同定されている direct-mutagen は、3, 4-ジカルボン酸無水物¹⁹、6-ベンゾ (a) ピレン¹⁸、アルキル-9-フルオレン²⁰等ごくわずかである。

強い変異原の濃縮がみられる酸性細分画を行い、direct-mutagen である化合物の同定を試み、無水-1, 8-ナフタル酸、アントラセン-9-カルボン酸、アントラキノン、1-ナフトエ酸、2, 3-ナフトレンジカルボン酸を同定した²¹。

しかし、これらの化合物が direct-mutagen として

は非常に弱いことから、この分画中にはより強い変異原性を有する未同定の化合物の存在が十分に考えられる。

一方、PAHのハロゲンまたは、ニトロ誘導体の中には、代謝活性化をなくしても変異原性を示す、すなわち direct-mutagen となるものがある。また、発癌性および変異原性を示さないPAHがハロゲン化またはニトロ化されると、発癌性や変異原性を示すようになることが報告されている⁸。

そして、環境大気中においては、多種の PAH と NO₂ が存在するため、これが大気中で反応し、ニトロ化PAHとなる可能性が強⁸、またこのような反応は、実験的にすでに確かめられている¹⁷。

芳香族ニトロ化合物の変異原性強度はモノニトロ体よりもジニトロ体が強く、また、環数の増加にともなって強くなっている²²。

著者らは自動車排煤中の direct-mutagen をひきおこす物質は、フレームソフト型の変異を誘起する何らかの修飾された多環芳香族ニトロ化合物が主体であろうと考えている。

排煤抽出物の細胞毒性は、Table 3 に示すように、サルモネラ菌を用いた Ames 試験での変異原性結果とよく相関していた。

つまり、S-9mix を添加しない直接変異原性を示す分画には強い細胞毒性が認められるが、直接変異原性を示さない分画には細胞毒性も認められていない。

このことから、変異原性を示す物質と細胞毒性を示す物質は同一の化合物であるか、あるいは化合物としてはその性質が全く異なるもの、つまり、変異原性は示すが細胞毒性は示さない、あるいは、細胞毒性は示すが変異原性は示さない物質が同一分画内に存在するのいずれかと考えられるが、現時点ではその判断は困難である。

Clark らは²³、細胞毒性と変異原性は相関すると報告しているが、Li らは²⁴、その成分は異なると報告している。

また、Clark らは²³、血しょう蛋白、肝臓ホモジネート、スルフィドリル含有化合物が変異原性と細胞毒性の両方を減少させる事から、同じ化学成分の関与を示唆している。だが、これらの比較は、いずれもバクテリアでの実験結果と培養細胞での結果との比較であり、それぞれ異なった代謝系を有していることなどから、その考察は無理があり、難しい。

しかし、細胞毒性成分は分裂している細胞に突然変異をひきおこす成分を含んでいる²⁴ことなどから、最

終的なヒトへの影響という観点より考察した場合、重要な指標となるであろう。

このように、著者らの実験では、変異原性試験の結果と細胞毒性は相関していた。

しかし、V-79細胞を用いた体細胞突然変異試験によれば、ディーゼル排出物の変異原性は非常に弱く、S-9mix あるいはS-15mix の添加によりその変異原性は減少することが報告されている^{25, 26}。

また、細胞毒性が血清、S₉化合物等により減少することから、抽出物の毒性が簡単に無毒化されうること示唆した報告²⁷がある。

しかし、このようなことが体内でもおこり得るのかどうかは明らかではない。

要 約

ディーゼル排煤中の直接および間接に働く変異原の存在を明らかにした。

塩基性分画、酸性分画、ヘキサソ不溶性分画、エーテル不溶性分画、鎖状炭化水素、環状炭化水素、遷移炭化水素、含酸素炭化水素の8分画について検索したところ、酸性分画に強い変異原性を見出した。

コロニー形成法によるディーゼル車排出物の可溶性分画物の細胞毒性は、ヘキサソ不溶性分画> 遷移炭化水素分画> エーテル不溶性分画> 酸性分画> 塩基性分画=鎖状炭化水素分画=環状炭化水素分画であった。

Ames 法で直接変異原性のない分画には細胞毒性もなかった。

(本研究は(社)日本自動車工業会のディーゼル排気物質の生体影響に関する研究(HERP研究)の一部としておこなったものである。)

文 献

1. 大西克成, 常磐寬, 変異原と毒性, 7, 4~16, (1967)
2. 松下秀鶴, 変異原と毒性, 5, 16~32, (1979)
3. Ohnishi Y. et al, *Mutation Res.*, 77, 229~240, (1980)
4. 住野公昭, 三尾隆弥, 環境と人体Ⅲ, 東京大学出版会, 東京, 145~156, (1984)
5. Maron M. and Ames N., *Mutation Res.*, 113, 173~215, (1983)
6. Puck T. T. et. al., *J. Exp. Med.*, 103, 273~284, (1956)
7. Funkenbush, E. F. et. al., *SAE Tech Pap. SER*, 1~22, (1079)

8. 松下秀鶴, 化学の領域, 南江堂, 東京, 増刊129, 115~134, (1980)
9. 林 和夫, 他, 日衛誌, 32, (1), 67, (1977)
10. 松下秀鶴, 他, 大気汚染学会誌, 16, (1)44~53, (1981)
11. Tokiwa, H. et al., *Mutation Res.*,77, 99~108, (1980)
12. 常磐寛, 他, 変異原と毒性, 6, 15~24, (1979)
13. 河内卓, がん, 23, (6), 16~22, (1978) 16.
14. Talcott, R. and Wei, E., *J. Natl. Cancer Inst.*, 58, (2), 449~451, (1977)
15. 平良昌彦, 他, 日衛誌, 36, (1), 412, (1981)
16. 平良昌彦, 他, 日本公衆衛生学雑誌, 28(10), 480, (1981)
17. Pitts, J. N. et al., *Science*,202, 515~519, (1978)
18. Wang, Y. Y. et al., *Cancer Letters*, 5, 39~47, (1978)
19. Rappaport, S. M. et al., *Environmental Science & Tecnology*,14, 1505~1509 (1980)
20. Erickson, M. D. et al., *Journal of Chromatographic Science*,17, 449~454, (1979)
21. 住野公昭, 他, 日衛誌, 37, (1), 300, (1982)
22. 堀駿郎, 自動車工業会受託研究報告書, (1979)
23. Clark, C. R. et al., *Inhalation Toxicology Research Institute Annual Report*,177~182, (1980)
24. Li, A. P. et al., *Inhalation Toxicology Research Institute Annual Report*,252~255, (1979)
25. Rudd, C. J., *EPA Symposium on Health Effects of Diesel Engine Emissions Cincinnati, Ohio*, December,385~403, (1979)
26. 長谷川真樹子, 他, 日本環境変異原学会第9回発表会講演要旨集, 74, (1980)
27. Li, A. P. and Royer, R. E., *Annual Report of the Inhalation Toxicology Research Institute*,214~218, (1980)

(1989年9月16日受理)