

米子市における大気浮遊粉じんの突然変異原性 ならびに多環芳香族炭化水素の季節変動

住田 導彦

Michihiko SUMIDA

The seasonal variations of mutagenic activities and polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates in Yonago

近年、我が国の部位別悪性新生物死亡率の年次推移をみると、気管・気管支および肺がんの急増が指摘されている¹⁾。Weiss²⁾は大気中の降下粉じん量とSO₂量と肺がん発生頻度との間には正の相関があることを報告し、清水ら³⁾は大気汚染と肺がん発生とは疫学的に密接な関係があることを指摘し、その他諸家は肺がん死亡率の増加のかなりの部分は大気汚染の増加によって説明できる可能性を報告している^{4~8)}。大気粒子状物質中の発がん関連物質あるいは環境変異原性物質としては Benzo(a)pyrene をはじめとする多環芳香族炭化水素 (PAH) の存在することが明らかになっており、70種以上の PAH 類物質の存在が確認されている¹²⁾。これらの物質は工業生産の発展とともに増大しているものと見られるが^{4,9~11)}、一方児玉ら¹³⁾によれば、近年、大気中の Benzopyrene 含量が逆に減少しつつあるということである。更にこれらの物質の含量については季節的依存性が認められることが諸都市において報告されている^{14~16)}。環境中のがん原性物質の検出法としては、がん原性物質が突然変異原性物質と高度に相関することに着目して、突然変異原性物質を迅速に検出する方法が試みられてきた、なかでも Ames らによって開発されたサルモネラ菌株の突然変異性で判定するスクリーニング法は高く評価されており、広く応用されている^{17~20)}。近年、大気浮遊粉じん物質中の突然変異原性物質の検出にも Ames 法が適用されてきており、これらの日内または季節変動についても言及されている^{21~26)}。今回著者は米子市

内の大気浮遊粉じんを季節的に捕集し、有機溶剤で抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって成分分析を行なうとともに Ames 法によって突然変異原性物質の分布を調査した。

材料と方法

1. 大気浮遊粉じんの捕集

季節的に大気浮遊粉じんを捕集し試料とした。すなわち、冬期分として1989年2月20日から3月3日の間の5日間、夏期分として7月3日から14日の間の5日間、秋期分として10月2日から13日の間の5日間に捕集したものを使用した。大気の捕集場所としては米子市の鳥取大学医療技術短期大学部屋上(地上14m)を選び、ハイボリュームエアサンプラー(柴田科学HVC-500型)を設置し、大気吸引流量を500ℓ/minとし、グラスファイバー濾紙(Toyo 110 mmφ)上に、一回分の捕集として24時間連続に行なった。試料濾紙は回収後直ちに粉じん量を秤量し、実験に供するまで-80°Cで密閉保存した。

2. 大気浮遊粉じん中の成分の抽出

捕集した試料濾紙を細切し、ソックスレー抽出器に投入し、ベンゼン・メタノール(1:1)液140 mlを加えて7~8時間抽出をした。この抽出液に無水亜硫酸ナトリウムを加えて脱水後、濾過した。濾液はロータリーエバポレーターを用いて、40°Cで減圧濃縮し、溶媒溜去後 dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、試料とした。

3. 大気浮遊粉じん中の多環芳香族炭化水素類の分析
大気抽出試料の10~20 μ l を HPLC (Simadzu COT-6A) に注入し、次の条件下で分析を行なった。

カラム: Shim-pack CLC-ODS (0.15 m \times 6.0 ϕ)

移動相: メタノール 85/水 15

温度: 30 $^{\circ}$ C

流量: 1.2 ml/min

検出器: 分光蛍光スペクトロモニター RF-535

測定蛍光波長: Ex 370 nm, Ek 426 nm

なお標準物質として Benzo(a) pyrene, Benzo(e) pyrene, Benzo(k) fluoranthene, Benzo(ghi) perylene (以下それぞれに B(a)P, B(e)P, B(k)F, B(ghi)P と略す), Fluoranthene (以上和光純薬) を用いた。

4. 大気浮遊粉じん抽出物質の変異原性試験

Ames らの方法によるプレインキュベーション法^{17~20)}で試験をした。使用菌株は *Salmonella typhimurium* TA-98 (frameshift 型変異株) および TA-100 (塩基対置換型変異株) である。試験手順としては試料溶液 0.1 ml に対し S-9 mix (オリエンタル酵母) 無添加系として、0.5 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を、また S-9 mix 添加系としてその混合液を 0.5 ml 加えて用意した。両系試料溶液に対して 37 $^{\circ}$ C, 15 時間振盪前培養した各菌懸濁液 (1~2 \times 10⁸ cfu/ml) 0.1 ml づつを加え、振盪温浴槽中で、37 $^{\circ}$ C, 20 分間プレインキュベート処理をした。これらの被検液に 0.5 mM L-ヒスチジン-D-ピオチン液の微量を含むソフトアガー 2 ml を加えて混合し、最少グルコース寒天平板培地上に重層して固め、37 $^{\circ}$ C, 48 時間培養後、平板上に生じたヒスチジン非要求株 (His⁺, 復帰変異) のコロニー数を数え、使用菌株のみの培養による対照 (自然復帰変異) の His⁺ コロニー数と比較した。変異原性の判定には、粉じん抽出試料処理による His⁺ コロニー数が対照のその 2 倍以上で、かつ dose-response の関係を示すものを陽性とした。なお変異原性発現のために S-9 mix の添加を必要としない突然変異剤に関する陽性対照として 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミドおよび 4-ニトロキノリン-1-オキソドを、突然変異原性発現のために S-9 mix の添加を必要とする突然変異剤に関する陽性対照として 2-アミノアントラセンおよびベンゾ(a)ピレンを用いて検討した。

結 果

1. 大気浮遊粉じん量

各季節に捕集した大気粉じん試料の 1 日当たりの濾紙 1 枚の粉じん平均量は冬期 0.085 g, 夏期 0.041 g, 秋期 0.063 g であった。

2. 大気浮遊粉じん抽出物質の成分

各季節における粉じん試料のそれぞれの成分分析結果を図 1 に示した。粉じんのベンゼン・メタノール抽出物質を濃縮し、DMSO に溶解して HPLC により分析すると、すべての試料中に標準物質の retention time と一致する B(e)P, B(k)F, B(a)P, B(ghi)P を検出することができた。

3. 大気浮遊粉じん抽出物質の Ames 試験

各季節における粉じん抽出物質について突然変異原性試験を行なった結果を表 1 に示した。即ち冬期においては菌株の変異様式の異なるにもかかわらず S-9 mix 無添加系変異が添加系変異より高い値を示した。夏期においては TA 98 の無添加系変異が高く、TA 100 では添加系変異が高い値を示した。秋期においては TA 98 では無添加系変異が高く、TA 100 では添加系変異が高い値を示した。各季節における抽出物質の希釈濃度と変異頻度の関係を図 2 および図 3 に示した。これによると冬期および秋期においては、両株の S-9 mix 添加および無添加系変異で顕著に dose-response curve を示した。夏期においては両株の S-9 mix 添加および無添加で弱い dose-response を示した。

考 察

我が国においては工場排煙、自動車の排気ガス、暖房などによる大気汚染は公衆衛生上の大きな問題であり、広範な実態研究とその改善対策が進められてきている。実際には大気汚染は全国的にみて 1967 年ごろがピークであり、1968 年大気汚染防止法の制定以来、汚染の低減化の努力により、徐々に改善されてきている。Waller²⁷⁾ が都市の大気から PAH の一種である B(a)P を検出して以来、特に B(a)P と肺がん発生の関係が重視されるようになった。我が国においても児玉¹³⁾、富田²⁸⁾等の研究者により北九州市、大阪市でそれぞれに大気中の B(a)P の測定調査を行なっている。本研究においては米子市の大気粉じんから測定季節を通して B(e)P, B(k)F, B(a)P, B(ghi)P を検出することができた。田端ら²⁹⁾は北九州市にお

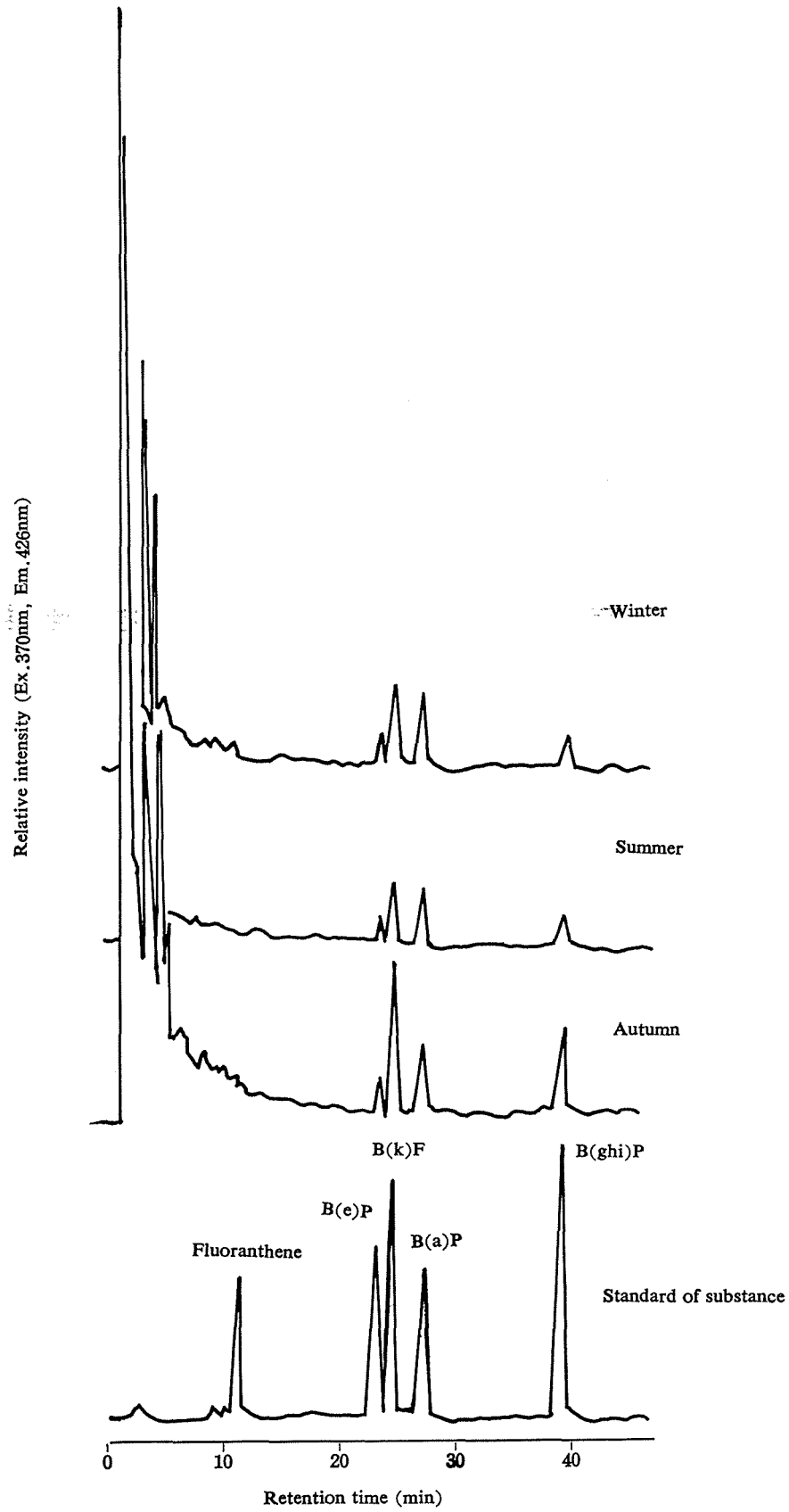


図 1. HPLC によるタール分の成分分析

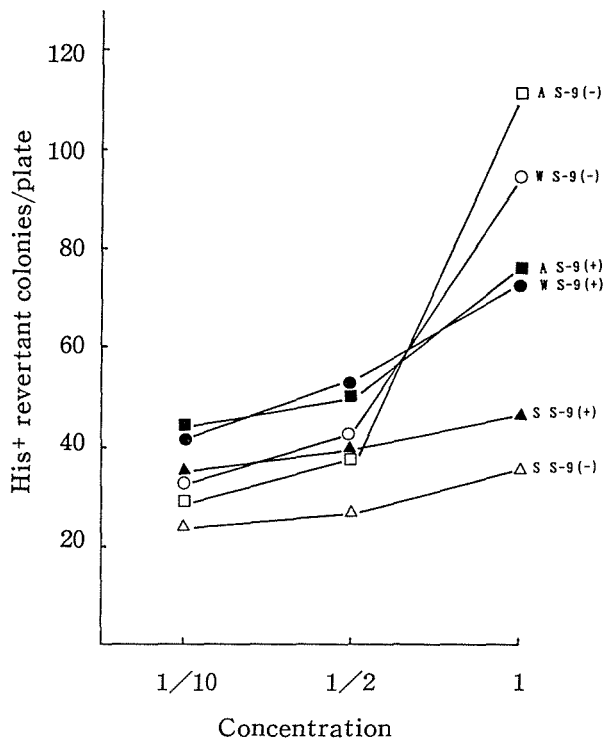


図 2. *S. typhimurium* TA 98 によるタール分の Dose-response curve

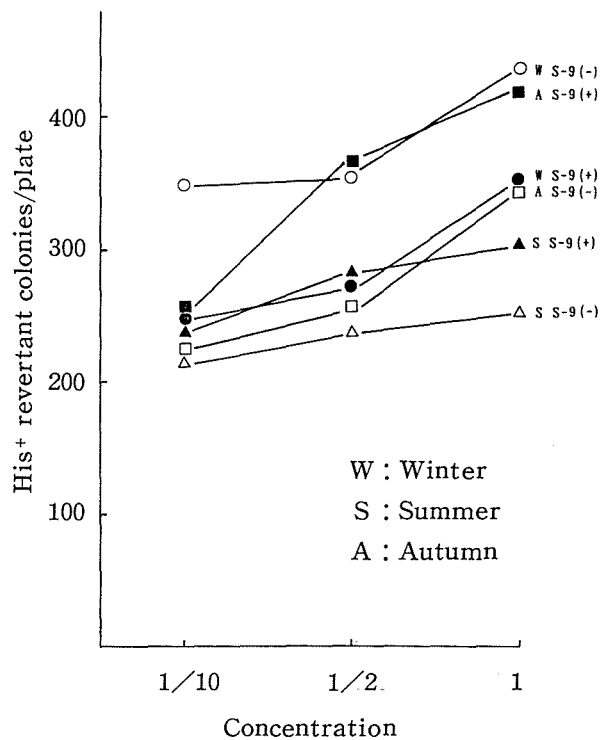


図 3. *S. typhimurium* TA 100 によるタール分の Dose-response curve

表 1. 大気浮遊粉じんの変異原性試験

Season	S-9 mix	<i>S. typhimurium</i> TA98				<i>S. typhimurium</i> TA100			
		Blank	× 1	× 5	× 10	Blank	× 1	× 5	× 10
Winter	+	36*	72 (36)	51 (15)	41 (5)	230	351 (121)	272 (42)	252 (22)
	-	21	95 (74)	41 (20)	32 (11)	206	432 (226)	358 (152)	355 (149)
Summer	+	36	42 (6)	40 (4)	37 (1)	230	305 (75)	284 (54)	252 (22)
	-	21	34 (13)	26 (5)	22 (1)	206	254 (48)	240 (34)	224 (18)
Autumn	+	36	76 (40)	52 (16)	43 (7)	230	410 (180)	357 (127)	243 (13)
	-	21	108 (87)	38 (17)	28 (7)	206	348 (142)	246 (40)	224 (18)

* cfu/plate, () 内の数値は Blank を差し引いたもの

+ : S-9 mix 添加

- : S-9 mix 無添加

いて Phenanthrene, Fluoranthene, Pyrene, Benzo(b)fluoranthene, B(e)P, B(A)P, B(ghi)P 等を検出し, PAH は秋季から冬季に高く, 春季から夏季に低い傾向を示すことを指摘している。角田¹⁶⁾は札幌市, 旭川市, 岩見沢市, で冬季, 夏季にそれぞれ B(a)P を検出し, 冬期に多いことを報告している。嵐谷ら³⁰⁾は北九州市において B(a)P, B(k)F, B(ghi)P を検出し, 菅ら³¹⁾は東京都において B(k)F, B(a)P, B(ghi)P を分離定量し, これらの PAH は冬期に高く, 夏期に低いこと, 更に日中より夜間が高い傾向があることを報告している。喜多³²⁾は栗東 I.C. の名神高速道路周辺において B(a)A, B(b)F, B(k)F, B(a)P, B(ghi)P を検出し, 大型車交通量と B(a)P 量との相関を具体的に認めている。著者が今回検出した PAH は上記の研究者が各都市で検出した成分と同一であるが, 比較的工場の少ない小都市である米子市においては他の地域と異なる点があり, 工場排煙によるよりも自動車, 暖房の排出ガスに由来するものと考えられる。

大気汚染とがん発生の関係は極めて複雑であり, 空気中の微量汚染物質のうちには DNA に直接作用して発がんを促すもの, B(a)P, dimethylnitrosamine のように DNA に間接作用して発がんに至るもの, SO₂, Phenol 等のように発がんの促進作用をするものなどがあるため, 両者の関連性を細部にわたって解明することが困難になっていると考えられる。都市化と肺がん発生率の間には顕著な関係があることはすでに知られているが, 具体的な研究対象として大気汚染物質とヒトの発がんとの関係を疫学的に研究するのは不可能に近いと思われる。その原因は発症に至る潜伏期間が非常に長いために両者の因果関係を明らかにすることが困難であり, しかもその間の生活様式の変化や固体差などが複雑に関連するからである。一方大気汚染物質による発がんの動物実験においては長期間の観察と高額な経費が必要とされる訳である。従って Ames 法^{17,18)}によりがん原性物質の細菌における突然変異原性証明法が開発されて以来, 大気浮遊粉じんの突然変異原性の検索が迅速に行なわれるようになり, その報告がなされている訳である^{21~23,26,33)}。季節的にみた米子市における大気浮遊粉じん中のタール分の変異原性試験の結果は季節により原因物質の分布が異なることが明らかになった。即ち冬期では細菌の突然変異発現のために高等生物細胞から代謝活性化を誘導する必要のない直接変異原物質 (direct-acting

mutagen) が多く存在しているのではないかと考えられる。一方夏期および秋期においては B(a)P のような細菌によって直接代謝されない間接変異原物質 (indirect-acting mutagen) と direct-acting mutagen の両方の存在が認められる。また大気浮遊粉じん中のタール分による細菌の逆突然変異率は夏期において低値を示しているのは, 大気浮遊粉じんの平均捕集重量が他の季節のものより比較的低値であることによるものと考えられる。後藤ら³⁴⁾は季節間ばかりでなく日内間においても粉じん中の変異原性が大きく変動することを報告している。また清水ら²³⁾は粉じん中の突然変異原性は年平均値からみて季節差が顕著にあり, 冬期に最高値を示すと報告している。Daisey ら³⁵⁾は冬期に突然変異物質の多い原因として環境中の particulate organic matter が秋から冬にかけて多く, 夏に少ないことを述べ, このことは地域暖房のための石油燃料使用量の差に由来するものと報告している。米子市においては冬期の家庭の暖房による分解産物や自動車の排気ガスなどにより大気浮遊粉じん中の direct-acting mutagen が増加するものと推論できる。

要 約

米子市における大気浮遊粉じん物質を季節別にハイボリュームエアサンプラーでグラスファイバー濾紙上に捕集した試料をベンゼン-メタノールで抽出し, 高速液体クロマトグラフィーによって成分分析をし, 一方 Ames 法で突然変異原性を調べた。

冬期, 夏期, 秋期の大気浮遊粉じん中のタール分の成分は Benzo(e)pyrene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Benzo(ghi)perylene であった。大気浮遊粉じん中のタール分の直接変異原性物質が frameshift 型および塩基対置換型の両方において冬期に高度に検出された。大気浮遊粉じんの平均捕集重量は夏期が最少であり, 直接および間接変異原物質の含量も最少であった。

文 献

- 1) 厚生統計協会, 国民衛生の動向, 厚生指針 36, No. 9, 57, 1989.
- 2) Weiss, W., Am. J. Public Health 68, 773, 1987.
- 3) 清水弘之, 富永祐民, 中川宣子, 石黒哲生, 大気汚染学会誌 14, 324, 1979.

- 4) 井上怜子, 岡本英子, 平山 雄, 杉田暉道, 日本公衛誌 **20**, 207, 1973.
- 5) 竹本和夫, 大気汚染研究 **10**, 763, 1976.
- 6) Menck, H.R., Casagrande, J, T. and Henderson, B.R., *Science* **183**, 210, 1974.
- 7) 清水忠彦, 大気汚染研究 **10**, 779, 1976.
- 8) 今井正之, 吉田克己, 笠間一男, 北島正義, 富田泰子, 大島秀彦, 日衛誌 **35**, 493, 1980.
- 9) 早津彦哉, 環境汚染物質と毒性, 無機物質編, 化学の領域 **126**, 165, 1980.
- 10) 中島泰知, 環境汚染物質と毒性, 無機物質編, 化学の領域 **126**, 173, 1980.
- 11) 松下秀鶴, 環境汚染物質と毒性, 有機物質編, 化学の領域 **129**, 115, 1980.
- 12) Lao, R.C., Thomas, R.S., Oja, H. and Dubois, L., *Anal. Chem.*, **45**, 908, 1973.
- 13) 児玉 泰, 石西 伸, 大気汚染研究 **10**, 10, 1975.
- 14) 松下秀鶴, 大気汚染研究 **10**, 723, 1975.
- 15) 松下秀鶴, 渡部亮一, 嵐谷奎一, 大気汚染研究 **9**, 602, 1974.
- 16) 角田文男, 北方産業衛生 **29**, 21, 1963.
- 17) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D., *Pros. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2281, 1973.
- 18) Maron, D.M. and Ames, B.N., *Mutation Res.* **113**, 173, 1983.
- 19) 矢作多貴江, 蛋白質核酸酵素 **20**, 1178, 1975.
- 20) 労働省安全衛生部化学物質調査課, 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, **25**, 53, 中央労働災害防止協会, 東京, 1980.
- 21) 北森成治, 堀川和美, 片岡恭一郎, 常磐 寛, 日本公衛誌 **29**, 37, 1982.
- 22) 清水英佑, 日本公衛誌 **24**, 581, 1977.
- 23) 清水英佑, 鈴木勇司, 林 和夫, 永山和之, 鈴木孝之, 秋山 巖, 崎谷寿子, 竹村 望, 慈恵医大誌 **97**, 785, 1982.
- 24) 大江 武, 日本公衛誌 **29**, 261, 1982.
- 25) 崎谷寿子, 林 和夫, 慈恵医大誌 **101**, 247, 1986.
- 26) 真鍋芽樹, 朝倉正登, 後藤 敦, 浅川富美雪, 実成文彦, 中嶋恭知, 四国公衛誌 **32**, 38, 1987.
- 27) Waller, R.E., *Brit. J. Cancer* **6**, 8, 1952.
- 28) 富田絹子, 瓦家敏男, 春木孝祐, 日本公衛誌 **20**, 525, 1973.
- 29) 田畑哲一, 末田新太郎, 重森仲康, 大気汚染学会誌 **14**, 143, 1979.
- 30) 嵐谷奎一, 吉川正博, 児玉 泰, 日衛誌 **41**, 617, 1986.
- 31) 菅 邦子, 石黒辰吉, 松下秀鶴, 大気汚染学会誌 **17**, 117, 1982.
- 32) 喜多義邦, 日衛誌 **44**, 673, 1989.
- 33) Tokiwa, H., Morita, K., Takeyoshi, H., Takeyoshi, K. and Ohnishi, Y., *Mutation Res.* **48**, 237, 1977.
- 34) 後藤純雄, 加藤幸彦, 折井章子, 田中一幸, 久松由東, 松下秀鶴, 大気汚染学会誌 **17**, 295, 1982.
- 35) Daisey, J.M., Kneip, T.J., Hawryluk, I. and Mukai, F., *Sci. Technol.* **14**, 1487, 1980.

Summary

Airborne particulate materials in Yonago were seasonally collected on a glassfiber paper fitted with a high volume air sampler. The particular tar extracted with a benzen-methanol solution, and then dissolved into dimethyl sulfoxide, was analysed by high pressure liquid chromatography and was examined for the potential mutagenesis by the Ames test.

Tar derived from airborne particulates collected in Winter, Spring and Summer consisted of Benzo(e)pyrene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene and Benzo(ghi)perylene.

Direct-acting mutagens in tar, which caused both frameshift type mutation and base substitution type mutation, were highly distributed in winter.

The mean weight of airborne particulate materials was least as well as the activity both of the direct- and the indirect-acting mutagen was lowest in summer.

(受付 1990. 2. 9.)