

Micro forward - mutation 法の高感度化に関する研究

高 木 敬 彦

Micro forward - mutation 法の高感度化に関する研究

高 木 敬 彦

1990

| | | |
|-----|---|----|
| I | 序 論 | 1 |
| II | 実験方法 | 7 |
| 2.1 | 試験菌株 | |
| 2.2 | Micro forward-mutation法の高感度化法 (Ultramicro forward-mutation法の概要) | |
| 2.3 | 試薬および器具 | |
| 2.4 | 試料の採取 | |
| 2.5 | 変異原性試験試料の調製 | |
| 2.6 | 変異原性試験 | |
| 2.7 | 多環芳香族炭化水素(PAH)の分析法 | |
| III | 結 果 | 18 |
| 3.1 | Micro forward-mutation法の高感度化の検討 | |
| 3.2 | Ultramicro forward-mutation法の検出感度の検討 | |
| 3.3 | Ultramicro forward-mutation法の再現性の検討 | |
| 3.4 | 室内空気の短時間捕集試料へのUltramicro forward-mutation法の適用 | |
| 3.5 | 室内および室外空気の変異原物質の時間変動 (2時間毎) | |
| 3.6 | 喫煙による室内汚染と空気清浄器の効果 | |
| 3.7 | 個人曝露試料の変異原性 | |
| IV | 考 察 | 26 |
| 4.1 | Micro forward-mutation法の高感度化の検討 | |
| 4.2 | Ultramicro forward-mutation法の検出感度の検討 | |
| 4.3 | Ultramicro forward-mutation法の再現性の検討 | |
| 4.4 | 室内空気の短時間捕集試料へのUltramicro forward-mutation法の適用 | |
| 4.5 | 室内および室外空気の変異原物質の時間変動 (2時間毎) | |
| 4.6 | 喫煙による室内汚染と空気清浄器の効果 | |
| 4.7 | 個人曝露試料の変異原性 | |
| V | 総括および結論 | 34 |
| VI | 謝 辞 | 39 |

英文要旨

付 図 (Fig.1~18)

付 表 (Table 1~13)

I 序 論

化学工業を含む産業の急速な発達・普及に伴って、環境は多種多様な化学物質に汚染されつつあり、ヒトや動物^{1,4)}への危険性が指摘されてきている。これらの汚染には有害化学物質の工場等からの漏洩あるいは排出によるものばかりではなく、廃棄物の処理過程、焼却過程および環境中での化学反応によって生成される新たな有害化学物質によるものも加わっている。これら有害化学物質の中で、今後ますます問題化してくると思われるものに変異原物質がある。この変異原物質は、細胞の突然変異を誘発する物質であり、人体には遺伝毒性や発癌性として関係し、また、環境中の諸種の生物に対しては突然変異の出現などに関係する物質であると考えられている。これらは化石燃料の燃焼などによって発生するものも多く、現在のような大量エネルギー消費の時代にはその発生が大きな問題である。よって、正確な実態調査やそれに基づく発生源の追求、さらに規制等の防止対策が強く望まれている。

我々はこれらの環境中の変異原物質を食物、飲料水、呼吸をとおして絶えず体内に摂取している。ヒトにとって食物、水、空気の摂取は生存の必須条件であり、食物および水の1日の必要量はそれぞれ1~2kg/日、1~3l/日とされている。両者は滅菌処理や加工などにより、より安全なものとすることや、安全性に問題があると考えられた場合は廃棄することができる。しかし空気の必要量は7~20m³/日であり、しかもその体内取込み

を1～2分間以上停止することができないため、我々は好むと好まざるとにかかわらず、自分の置かれた環境の空気を呼吸し続けなければならない¹⁵⁾。このため、環境空気は大きくヒトの健康に関わってくる可能性がある^{43)・67)}。特に1日の大部分(80～90%)^{23)・54)}を過ごす室内^{26)・50)}は近年、建築技術の向上によりその密閉度が高くなった。そのため冬期では外気の汚染と無関係な室内汚染状況が出現しやすい。よって、これらの中に変異原物質がどの程度存在し、日常生活を通じてこれらをどれだけ取り込んでいるかを知ることは、近年、急増しつつある肺癌対策の一環としても重要である^{1)・67)}。室内空気は喫煙、暖房等の汚染源の有無やその使用頻度、室内での活動状況および換気による外気の流入の影響を受け、その汚染状態は経時的に変化すると考えられる。さらにヒトは同一の室内に24時間とどまることは少なく時間帯によって家庭、職場または学校と移動を繰り返して生活することも考慮すると、室内空気の変異原性の検討は24時間連続採取試料の評価だけでは不十分であり、在室時間や勤務時間ごとの曝露評価、すなわち、室内の変異原物質の動態による汚染実態を短時間単位で調べることが重要である。しかし、これに関する報告は現在までみあたらない。

一方、個々人に対する変異原物質曝露量は地域性や個人の行動の多様化により変化すると推測される。これは環境中の変異原物質の発生の原因とされる産業構造や社会構造が地域によって異なることや、同一地域でも個々の人の生活様式は様々であり、しかもそれらは経年的に

変化するためと考えられている。よって、個人曝露量を直接測定して正確な健康影響評価も行うべきであり、そのため環境汚染物質の人体曝露量の高精度測定法の開発が強く望まれている。現在では環境空気中の数種類の発癌物質への個人曝露量の測定法として、携帯可能な個人サンプラーによる採取試料を用いた化学分析法^{48), 49), 68)}が開発されつつあるが、汚染物質全体の生物学的評価に、より適した変異原性試験法に関する研究はまだされていない。

変異原物質（変異原性）を検出する試験法は現在まで数多く開発⁶⁶⁾されているが、これらのうち、微生物を用いる方法は動物細胞などを用いる方法と較べて、その容易さや経済性から広く用いられている。この微生物による変異原性試験法は現在2つに大別されている。1つは、いわゆるrec-assayと呼ばれるもので変異原物質などで細菌のDNAに誘起した損傷を野生株とDNA修復欠損株との致死感受性の差として調べる方法であり、もう一つはSalmonella sp. やEscherichia coli等の栄養要求株を用い、化学物質などの変異原性を復帰変異で調べる方法である。後者のうちSalmonella typhimuriumを用いるAmes法^{4), 73)}は特に広く用いられ、その基礎的研究もかなりなされている。この方法は手間や費用ではrec-assayに劣るものの、1)変異原性の定量の面では優れている、2)変異の型まで分かる、3)発癌性と相関が高い、4)短期間に多数の物質を取り扱うことが可能である、などの利点がある。しかし、Ames法はヒスチジン要求株(his⁻)からヒスチジン非要求株(his⁺:野生株が持つて

いる性質)への復帰突然変異(reverse mutation)を利用する試験系であり、使用する菌株は遺伝子内の1カ所の特定部位に変異原物質が作用した時に限って突然変異の検出が可能であることから、変異原物質の種類に対する検出幅が狭いという欠点も有している。これらの欠点を補うため、TA100株(塩基対置換型)やTA98株(フレームシフト型)など多種の菌が開発されており、通常の試験には、TA100、TA98株のほかTA1535、TA1537およびTA1538の5菌株の併用が必要とされている⁶⁾。

Ames法をはじめとする微生物を用いた試験法はその普及にともなって、環境中の変異原物質の存在の実態を徐々に明らかにしているが、化学分析法に較べて検出感度が低く、比較的多量に得られる大気などの試料や強い変異原物質が含まれる試料に対しては変異原性評価⁹⁾、

10)、16)、33)、34)、36~38)、53)、56)、69)、71)は可能であるものの、室内空気試料や個人曝露試料等、環境中のごく微量にしか存在しない試料や微量にしか採取できない試料については検出不可能になる方法が多く、その安全性のチェックは十分されないままになっていた。

一方、微生物を用いる変異原性試験法の中でAmes法などの復帰変異をみる系の他に、前進突然変異を感知する試験系がある。この前進突然変異は、通常の生物種に認められる一般的突然変異であり、ほ乳動物細胞を用いた変異原性試験の場合、その多くは前進突然変異を感知するものである。この試験系は復帰突然変異と較べてその種類や標的遺伝子が多く、Ames法が塩基対置換型やフレームシフト型のみを検出するのに対し、前記2型だけで

なく欠失型等、あらゆる種類の変異原物質に対して検出が可能であり、その検出幅が広い点に特徴がある⁵⁷⁾。しかし、この前進突然変異による検出系は、薬剤耐性獲得の有無などにより変異原性をみるため、突然変異を起こした菌株を起こしていない菌株と選別するための薬剤 (genetic marker) などを必要とする。このため薬剤の種類、薬剤濃度およびその添加の時期などに関して、手法的煩雑さを伴うのが欠点であった。

1978年頃から、この前進突然変異の検出系にAmesらの作成した *Salmonella* sp. 利用する方法が開発され、比較的良好な検出能を有していることが報告された^{58~61)}、⁶³⁾、⁶⁴⁾。すなわち、米国MITのSkopeck およびThillyらのグループはカリフォルニア大学のAmes博士らによって開発された菌株から8-アザグアニン抵抗性検出に優れている *Salmonella typhimurium* TM677株を開発して報告した⁶⁴⁾。同論文でSkopeckらは開発されたTM35およびTM677の両菌株とAmes法の5種の菌株 (TA100、TA98、TA1535、TA1537 およびTA1538) とを用いて塩基対置換型の変異を誘起する変異原物質6種、フレームシフト型の変異を誘起する変異原物質6種および両者の性質を持つ変異原物質4種の合計16種の代表的変異原物質に対する変異原性試験検出能を比較し、TM35株およびTM677株が、両菌株共に塩基対置換型とフレームシフト型の変異原物質を検出可能であることやTM677株はAmes法の上記5菌株と同等の検出感度を有していると報告している。すなわち、*Salmonella typhimurium* TM677株を用いる前進突然変異検出系は、Ames法と同等の検出感度

を有しているうえ、複数の菌株を必要としないことから被験試料の必要量が少なく、相対的に高感度であるといえる^{3,9)}。また、Skopecckらの方法は生菌数も同時に測定するため(Ames法は測定せず)、試験の際の各試験管またはバイアルに投与する菌液中の生菌数や試料の毒性等の影響も同時に判定できる利点も合わせて有する。近年、Lewtasらは、このSkopecckらの方法を改良し、検出能を相対的に約10倍高感度化したmicro forward-mutation法を開発し、室内空気(約100m³)の変異原性測定への適用を報告した^{11), 12)}。しかし、この方法の検出感度では室内空気の経時変動や個人曝露試料等の変異原性測定が不可能である。このため、さらに微量試料に対応しうる高感度変異原性試験法の開発は汚染実態のより詳細な把握に必要不可欠である。

著者はこの研究が環境衛生学上非常に重要であり、今後の環境汚染の実態把握に大きく貢献するものと考え、短時間に採取した微量試料に対応でき、変異原性の時間変動等、室内汚染の詳細な実態の追求や個人曝露試料等の測定を可能にする試験法を検討した。すなわち、本研究でLewtasらのmicro forward-mutation法を改良し、さらに高感度化した試験法を開発を行い、その検出感度、再現性および様々な微量空気試料への適用を検討した。

II 実験方法

2、1 試験菌株

本研究では Skopeck らによって開発された Salmonella sp. (1) serovar typhimurium TM677 株を用いた。すなわち、Skopeck らは Ames らによって開発された菌株で、塩基置換型の変異原物質を検出する TA1535 株の自然復帰コロニー (his^+) から 8-アザグアニン抵抗性検出に優れている TM35 株を選び出した。8-アザグアニン抵抗性は、ほ乳類の培養細胞で変異原性を調べる際に指標としてよく用いられている。

Skopeck らは、さらに変異原物質に対する検出感度を上げるため TA2000 株の R-factor プラスミド (pKM101) を TM35 株に導入して TM677 株を開発した。Salmonella sp. を用いた試験系では次の原理で変異原性の有無を判定している。すなわち、8-アザグアニンは細胞内に入ると、酵素 (キサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ) により代謝され核酸に取り込まれるが、このことにより細菌は死滅する⁵⁷⁾。しかし、化学物質などにより突然変異が起こると、この酵素活性は欠損し、代謝が行われなくなるため 8-アザグアニンに対して抵抗性を有するようになる。このためシャーレ内で抵抗性を有したものがコロニーとなるからその数を計測することにより変異原性を調べることができる。

今回用いた TM677 株は米国環境保護局 (US EPA) より凍結乾燥した菌を入手し、これを国立公衆衛生院 (地域環

境衛生学部)においてニュートリエントアガー培地で培養(37℃、48時間)した後、陽性対照として癌・変異原物質を用いて、それに対する活性を確認した。そのコロニーをニュートリエントブロスで増菌培養(37℃、16時間)した。この培養液とジメチルスルフォキシド(以下DMSO)をそれぞれ800 μ lと70 μ lずつ滅菌チューブに入れて瞬時凍結させ、これを-80℃のディープフリーザー内に保存した。そして、この凍結菌を試験毎に取り出し1本ずつ用いた。

2、2 Micro forward-mutation 法の高感度化法 (Ultramicro forward-mutation 法の概要)

Skopecckらが報告した8-アザグアニン抵抗性の検出に優れている*Salmonella typhimurium* Tm677株を用いて行う前進突然変異検出系は、Ames法と同等な検出感度を有しているうえ、被験試料が少なくすむ。この系を利用してLewtasらが開発したmicro forward-mutation法の検出感度は、現在最も高感度とされているため、この方法を改良して、さらに高感度化した変異原性試験法の開発を行った。

試験法の開発に際し考慮したのは以下の4点である。

1) 試料が微量になるに従い、反応液量(試料および菌液)も少量化するため、反応させる両液をできる限り効果的に混合する必要がある。そこで、操作に用いるマイクロピペットのチップの大きさも考慮し、底部を内側に少し盛り上げる工夫をした内容積100 μ lのガラス製

のバイアル（テフロン製キャップ付）を特注し作製した（Fig. 1）。ここでガラスを用いたのはガラスがプラスチックに較べて濡れ易く、反応液の混合がガラスを用いれば十分行い得ると考えたからである。また、内壁は常に親水性に保つように洗剤だけでなく有機溶媒を併用して洗浄を行った。これは反応液が $10 \mu\text{l}$ と微量なため、親水性でなければ表面張力により、内壁に点状に付着したままとなり回転培養の際、反応が円滑に行われなからである。またマイクロバイアルの蓋を長さ 20mm 、直径 5mm のテフロン製の栓に代えて気密性をよくするとともにその操作を簡単にした。ここで蓋をテフロン製にしたのは有機溶媒や高圧蒸気滅菌に耐えられるようにするためである。

なお、培養の際は傾けて回転培養し、反応液が回転と同時に一点に集中してよく混合できるようにした。

2) 微量試料を扱う際、操作中の誤差が結果に大きく影響するため、できる限り注意を払う必要がある。本法は試料および菌液の総量を $10 \mu\text{l}$ にして試験に用いるため再現性の向上を考慮し duplicateで行うようにした。また、反応液が非常に微量であることから前培養後、その反応液 $10 \mu\text{l}$ に滅菌ナトリウムリン酸緩衝液（以下PBS）を $90 \mu\text{l}$ 加えてよく混ぜ、液を増量し操作しやすいようにした。そして、そのうちの $80 \mu\text{l}$ を変異原性測定用、 $10 \mu\text{l}$ を生菌数測定用としてそれぞれ小試験管およびボトルに分注した。

3) Skopeckらの方法およびLewtasらの方法はその手法の中で培地に反応液（変異原性測定用の場合は試料お

よび菌液、生菌数測定用の場合は菌液のみ)を含むソフトアガー(軟寒天)をまく場合、マイクロピペットによる操作が主である。しかし、ソフトアガーが量的(2,500 μ l)に多く小試験管の使用が可能である場合、小試験管に分注してまく方が操作が簡易であることや多人数で行う場合、試験時間の短縮につながるため本法はできるだけ小試験管を用いた。

4) 生菌数の測定の際、SkopeckやLewtasらの変異原性試験法は菌の均一性を保つのが難しい粘性のあるソフトアガー中から所定量を取り出すのに対し、本法は前培養後、菌の均一性がより高いと考えられるPBS(水溶液)から取り出すようにした。これを15mlのPBSの入ったボトルで菌液を希釈してから3本の試験管に分注して生菌数を測定した。これにより移す際の誤差は少なくなると考えた。

以下、開発した本法の手順をFig.2に示す。まずTM677株の凍結菌0.8mlを試験当日にディープフリーザーから取り出し、37℃のウォーターバスで素早く溶かした。これをL字管に入れ、さらに培養液であるminimal E medium(以下M.E.: 1l当りの組成は以下のとおり glucose 20g, MgSO₄7H₂O 2g, citric acid 20g, K₂HPO₄ 100g, NH₄H₂PO₄ 19.2g, NaOH 6.6g, biotin 12.2mg, deionized H₂O 1,000ml)を8ml加えて3時間振とう培養した。次に、これをM.E.でさらに10倍希釈し、検体(0.2 μ l DMSO溶液)を入れた試料用マイクロバイアルにこの菌液の所定量(S9mix無添加系では10 μ l, S9mix添加系では菌液7.9 μ l と S9mix 2.1 μ l)を加えた。この試料

入りマイクロバイアルをローターを用い、37℃で2時間傾けて回転させて前培養し、検体と菌液を反応させた。培養後、この試料入りマイクロバイアルに90 μ l の滅菌PBSを加えマイクロピペットでよく混合したのち80 μ l をアルミキャップ付滅菌済小試験管に移した。この小試験管に8-アザグアニンを含むソフトアガー 2.5mlを入れ、ミキサーを用いてよく振り混ぜたのち、培地（アガープレート）上に重層し、これを変異原性測定用とした。

一方、試料入りマイクロバイアルの残液から10 μ l を抜き取り、これをPBS 15mlの入った滅菌済ボトル（直径2.5cm×高さ5.5cm）に移した。そしてよく混ぜ合わせたのち、50 μ l ずつ分取して3本のアルミキャップ付滅菌済小試験管に入れ、8-アザグアニンを含まないソフトアガーを2.5mlずつ入れてよく混ぜ合せ、それぞれのアガープレートに重層し、これを生菌数測定用とした。培養には通常のインキュベーターを用い、37℃で44時間培養を行ってから出現したコロニーを計測³⁵⁾し、得られた変異コロニー数および生菌コロニー数から次式を用いて突然変異率(Mutation frequency)を算出した。

$$\text{突然変異率} = \text{変異コロニー数} / (\text{生菌コロニー数} \times 2400)$$

2、3 試薬および器具

栄養無機塩のSALT溶液の調製には国産化学社製の特級の硫酸マグネシウム7水和物、クエン酸水素2カリウム

リン酸水素アンモニウムナトリウム 4水和物を用いた。プレート作成は BBL 社の寒天および MERCK 社製 d-ビオチンを用いた。菌の前培養液の M.E. の調製には国産化学社製の特級の試薬（本文参照）を用いた。変異原性（菌の抵抗性）検出試薬としては Sigma Chemical 社製の 8-アザグアニンを用いた。変異原性試験の感度比較のための試薬および陽性対照試薬としては、Koch Light 社製の pure grade のベンゾ(a)ピレン（以下 BaP）、4-ニトロキノリン-1-オキシド（以下 4NQO）および半井化学薬品社製の特級の 9アミノアクリジン（以下 9AA）を用いた。また室内空気および個人サンプラーから採取した浮遊粒子中の有機成分の抽出には、和光純薬工業社製の残留農薬試験用のベンゼンとエタノールを用いた。溶液調製には和光純薬工業社製の残留農薬試験用のジクロロメタンを用いた。

ブレインキュベーションに用いる機器には大洋科学社製の小型回転培養機（ローテーター）を用いた。変異原性試験に用いた約 100 μ l のガラス容器（試料用マイクロバイアル）は遠藤サイエンス社（株）に特注し加工した品を用いた。空気清浄器には市販品（松下電器産業株式会社製 MS-200）を用いた。また、空気浮遊粒子の採取の装置にはダイレック社製（DL-200-20 型）のものを用いた。個人サンプリングの装置には紀本電子工業社製モデル MP-1 および柴田科学器械工業社製のモデル MP-14CF を用いた。

2、4 試料の採取

室内空気浮遊粒子の採取は47mmのフィルターホルダー（ステンレス製）に石英繊維フィルターをセットし、室内空気を20 l/minの流量で24時間および1~2時間吸引することにより行った。大気浮遊粒子の採取は20×25cmの石英繊維フィルターを用い、ハイボリウムエアサンプラーで24時間吸引することにより行った。

空気清浄器は、試料空気を約7000Vの静電場に導いて浮遊粒子を帯電させ、これを逆の電荷をもつ帯電フィルターに採取すると共に炭素繊維フィルターでさらに空気中の汚染物を除去する方式のものであった。なお帯電および炭素繊維フィルターはテスト直前に新しいものと取り換えた。試験は次の方法で行った。まず、国立公衆衛生院の居室（気積：約67m³）のドアと窓を開放し、立型扇風機を約1時間作動させて室内空気を外気と置換させたのち、窓を密閉し、居室の入口に近い位置に設置した2台の低騒音サンプラーで室内浮遊粒子を各20 l/minの流量で1時間吸引採取する。次に室の中央で2本ずつ、合計10本のタバコを約50分間にわたって国際喫煙モード^{22)・72)}（1パフ：35ml、2秒間、すいがら長：30mm）で機械喫煙させながら、立型扇風機で室内空気を混合させつつ、浮遊粒子を喫煙開始から1時間採取する。この後直ちに空気清浄器を作動させながら、室内空気浮遊粒子を1時間ずつ4回採取することを繰り返した。また、対照試験として空気清浄器を作動させない場合の浮遊粒子も、上記と同様の操作で採取した。このようにして2台の低騒音サンプラーから得られた各組2枚の浮遊

粒子試料を1つに合わせて超音波抽出し、それを用いて変異原性と多環芳香族炭化水素(PAH)3種、ベンゾ(a)ピレン(BaP)、ベンゾ(k)フルオランテン(以下BkF)、ベンゾ(ghi)ペリレン(以下BghiP)の測定を行った。

個人サンプラーによる空気浮遊粒子の採取には25mmφのフィルターホルダー(テフロン製)に石英繊維フィルターをセットし、環境空気を1~7日間、1.5~2.0l/minの流量で24時間吸引することにより行った。サンプラーを携帯する被験者は、冬期は相模原市および東京都の喫煙者2名、非喫煙者2名の計4名および喫煙者3名、非喫煙者4名の計7名とし、夏期は同地域の喫煙者2名、非喫煙者3名の計5名とした。サンプラー携帯時にはフィルターホルダー(テフロン製)を胸元付近に取付け、就寝時にはフィルターホルダーをベットと同じ高さの位置の寝室に置いた。

サンプリング後のフィルターは採取面を内側にして半分に折り、アルミホイルで包み、チャック付きのポリ袋に入れ有機溶媒による抽出操作を行うまで冷凍庫(-80℃)に保存した。

2、5 変異原性試験試料の調製

石英繊維フィルターに採取した浮遊粒子中の有機成分(タール状物質)の抽出は、ベンゼン-エタノール(3:1;v/v)を用いる超音波抽出法⁸⁾で行った。すなわち浮遊粒子を採取したフィルターを刻んで細片とし、これを栓付三角コルベン(100ml)に入れ、ベンゼン-エタノ

ールをホールピペットを用いて50ml正確に加えてよく振り混ぜ、気泡を除いた後、20分間超音波抽出を行い、その抽出液の45mlをホールピペットで分取した。この抽出液を、前もってベンゼン-エタノールで洗浄した東洋ろ紙No.5Cでろ過して粒子を除き、得られたろ液を32~35℃で約3mlにまでロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。このようにして得た濃縮液をスピッツ型共栓小試験管に移し、溶媒を短時間で揮散させるため溶媒臭が無くなるまで室温で窒素ガスを通して溶媒を留去したのち、これを変異原性試験直前まで冷凍庫(-80℃)内に保存した。

本研究では種々検討した結果、次の方法で試料の調製を行った。すなわち、調製には溶媒交換法を用い、その溶媒としてジクロロメタンを用いた。これはベンゼン-エタノールで抽出を行った場合、本来なら同じ溶媒で調製を行うべきであるがエタノールが残留した場合、菌への悪影響が懸念される。また、エタノールを用いずにベンゼンだけで調製を行うとエタノール抽出成分が溶液状にならないなどの問題が残るためである。これに対しジクロロメタンは、1)ベンゼンより揮発性がある、2)ベンゼン-エタノール抽出成分を溶液状にできる、などの利点をもつ。これにより溶媒交換法で稀釈系列を作る場合その調製時間が短縮されることや窒素ガスを使用せずに溶媒交換が行える。これはバイアルが100 μ lと微量であることを考慮すると、ガス圧による溶液の飛散の危険性を押さえられるので、より正確な実験が行える利点も有する。

試料調製は、まず冷凍庫から出した被験試料を室温に戻したのち、氷上においたステンレス製ラックに立てて並べた。これは溶液調製に用いるジクロロメタンが室温ではすぐに揮散してしまうため、試験管の温度を下げておきジクロロメタンの揮散を押さえるためである。次にそれぞれの被験試料（試験管）に氷冷したジクロロメタンを $120 \mu\text{l}$ ずつ入れ、素早く混ぜて試料を溶解させ、再度氷冷した。そして、前もってマイクロシリンジで $0.2 \mu\text{l}$ のDMSOを分注しておいた試料用マイクロバイアルに被験試料のジクロロメタン溶液（S9mix添加系には 20 、 10 、 5 、 $2.5 \mu\text{l}$ ：毒性が強く現れやすいS9mix無添加系には 5 、 $2.5 \mu\text{l}$ および 1.25 、 $0.625 \mu\text{l}$ 相当量のジクロロメタン稀釈液）を正確にマイクロピペットで分注した。このマイクロバイアルを 30°C のホットプレート上に並べジクロロメタンを完全に除去して得られたタール状物質のDMSO溶液を本法に供した。

大気浮遊粒子試料の有機成分の抽出は後藤らの方法⁷⁾⁸⁾に従って調製した。

2、6 変異原性試験

変異原性試験は *Salmonella typhimurium* TM677 株を用いた ultramicro forward-mutation 法で行った。また、検出感度比較を行うための試験法として、Lewtasらの micro forward-mutation 法および Amesらの変異原性試験の変法である preincubation 法を用いた。使用菌株は、*Salmonella typhimurium* TM677、TA100、TA98の3種で

あった。本法およびLewtasらの方法ではS9の濃度は9.8% (インキュベーション時の濃度)、Ames法のそれは通常の濃度すなわち、10%(preincubation時の濃度で7.1%)とした。なお、S9は3試験方法ともAmesらの方法³⁾に従い、PCB(KC-500)で酵素誘導したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製したものをを用いた。

2、7 多環芳香族炭化水素の分析法

浮遊粒子試料中の多環芳香族炭化水素(PAH)は、2.5にしろした超音波抽出液の一部を液-液分配法でclean-upし、逆相型高速液体クロマトグラフ蛍光法で分離分析した^{6,5)}。ここで測定した多環芳香族炭化水素(PAH)は代表的発癌物質であるBaPをはじめとしてBkF, BghiPの3種であった。

Ⅲ 結 果

3、1 Micro forward-mutation 法の高感度化の検討

Lewtas らの試験法は市販の試料バイアルを用いて通常行われている。しかし、これらを用いて微量試料を扱う試験を行うことが可能か否かが不明であるため、本研究では市販されているバイアルを用いて菌液(TM677株)と被験試料(9AA)の混合液の総量の少量化を検討した。すなわち、混合液の量を $1,000 \mu\text{l}$ 、 $100 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{l}$ 、 $1 \mu\text{l}$ と少量化して変異原性試験を行った。その結果を Fig.3 に示す。Fig.3 から、総量 $100 \mu\text{l}$ で行った結果は $1,000 \mu\text{l}$ で行ったものと同様な試験結果が得られること、 $10 \mu\text{l}$ では $100 \mu\text{l}$ で行った変異原性(突然変異率)よりも低い値が得られること、 $1 \mu\text{l}$ では突然変異率がほとんど認められないことなどが分かった。次に、作製したマイクロバイアルを使用し、同様な試験を行った。その結果を Fig.4 に示す。Fig.4 から $10 \mu\text{l}$ (マイクロバイアル使用)で行った結果は $100 \mu\text{l}$ (市販バイアル使用)で行った結果とほぼ同様となった。

3、2 Ultramicro forward-mutation 法の検出感度の検討

開発した本法を用いて微量試料の変異原性を測定するにあたり、その実質的検出感度を把握する必要がある。そこで、高感度検出法と報告されている Lewtas らの micro forward-mutation 法と本法を比較した。試料として S9mix 添加系で BaP、S9mix 無添加系では 4NQO をそれ

ぞれ用いた。その結果をFigs. 5, 6に示す。Figs 5, 6より両法ともバイアル当りのBaP量、4NQO量と突然変異率との間にdose-response関係が認められた。そして突然変異率の値がコントロール（自然突然変異率）の2倍を得るのに必要な試料量はBaPでは約0.02 μ g（本法）、約0.20 μ g（micro forward-mutation法）、4NQOでは約0.1 ng（本法）、約1ng（micro forward-mutation法）であった。

次に環境空気の実試料に対する検出感度を検討するため大気浮遊粒子溶媒抽出物、室内空気浮遊粒子溶媒抽出物を用いてその変異原性を測定すると同時にLewtasらのmicro forward-mutation法でも同一試料を測定した。大気浮遊粒子には、昭和61年11月に麻布大学（相模原市）4階屋上で採取されたもの、米国ワシントン郊外の大気浮遊粒子であるNational Bureau of Standard（以下NBS）のUrban Dust、室内空気浮遊粒子は昭和63年12月に麻布大学4階談話室（有喫煙）で採取されたものをそれぞれ用いた。その結果をFigs. 7, 8, 9に示す。縦軸は突然変異率を示し、横軸はバイアル当りの試料投与量を示している。投与量は別途に行った大気試料の試験結果をもとに検討して求めた。Figs. 7, 8, 9から大気浮遊粒子溶媒抽出物、室内空気浮遊粒子溶媒抽出物は両法に対してS9mix添加の有無にかかわらず変異原性を示し、米国大気浮遊粒子溶媒抽出物はS9mix添加系のみで変異原性を示した。また、バイアル当りの投与量と突然変異率との間には良好なdose-response関係が認められた。今回はそれぞれ1例ずつであり採取日により変動があると考えられるが、本法で測定した場合、大気試料でその突然変異率がコントロール（自然突然変異率）の2倍を得るの

に必要な溶媒抽出物量は S9mix 添加系で約 $3 \mu\text{g}$ 、S9mix 無添加系で約 $2 \mu\text{g}$ 、NBS の大気試料では変異原性がコントロールの 2 倍を得るのに必要な粒子量は S9mix 添加系で約 0.11mg であった。また、室内空気では同じく 2 倍を得るのに必要な吸引空気量は S9mix 添加系で約 0.12m^3 、S9mix 無添加系では約 0.01m^3 であった。ここで室内空気を吸引空気量で表したのは、室内空気から得られる粒子量やその溶媒抽出量が微量であり、秤量するとその際の誤差がデータに影響すると考えたからである。このように本法を Lewtas らの方法と比較した場合、同等の試験結果を得るのに必要な試料量は、その約 1/10 である。さらに Ames 法も含めてコントロールの 2 倍の変異原性の値を得るのに必要な溶媒抽出量を大気試料で比較した結果を Table 3 に示す。Table 3 から、本法の場合 $3 \mu\text{g}(+S9\text{mix})$ 、 $2 \mu\text{g}(-S9\text{mix})$ 、Ames 法の場合 $205 \mu\text{g}(\text{TA}100+S9\text{mix})$ 、 $160 \mu\text{g}(\text{TA}100-S9\text{mix})$ 、 $169 \mu\text{g}(\text{TA}98+S9\text{mix})$ 、 $103 \mu\text{g}(\text{TA}98-S9\text{mix})$ 、Lewtas 法では $31 \mu\text{g}(+S9\text{mix})$ 、 $18 \mu\text{g}(-S9\text{mix})$ の量であり、本法は Ames らの約 1/100、Lewtas らの 1/10 の量であることが分かった。

3、3 Ultramicro forward-mutation 法の再現性の検討

開発した本法の再現性を把握することは重要であり、本法が生物学的測定法として適応し得るかどうか確認するため、BaP、4NQO を正確に 5 等分して試験に供し、それらによる試験結果の再現性を調べた。その結果を Table 1、さらにその 1 例として 4NQO の詳細なデータを Table 2 に示す。Table 1 から突然変異率の変動係数は

BaPでは13.1%、4NQOでは10.9%の結果が得られた。また、Table 2の4NQOの詳細なデータからmutant coloniesとsurvival coloniesに分けてみた場合、mutant coloniesで、その変動係数は9.7~14.2%、survival coloniesで5.0~6.0%とかなり良好な結果が得られた。また、本法の再現性を環境空気試料で把握するため、大気浮遊粒子溶媒抽出物を正確に5等分して試験に供して再現性を調べ、対照として採取日を異にする大気試料を用いてLewtasらの方法でも行った。その結果をTables 4,5に示す。Table 4から本法の大気浮遊粒子溶媒抽出物に対する突然変異率の変動係数は、S9mix添加系では13.9%無添加系で12.3%であり、Table 5からLewtasらの方法ではS9mix添加系で11.8%、無添加系では11.3%であった。

3、4 室内空気の短時間採取試料への

ultramicro forward-mutation法の適用

東京都4室の室内空気にLewtasらの方法を適用した結果、20 l/minの流量で24時間連続採取した試料（総吸引量28.8m³）で多少の変動はあるものの、dose-response関係(Fig.10)がみられ、変異原性検出の測定ができた。よって、3.2の結果を考慮するとultramicro forward-mutation法は約1/10の空気量で測定可能であり、20 l/minの流量で約2時間採取（約3m³相当）すれば測定に適用できることが示唆された。そこで、実際に室内で2時間採取した試料に本法を適用して、その実用性を調べた。すなわち、昭和62年11月に国立公衆衛生院談話室（有喫煙）にて室内空気浮遊粒子を20 l/minで2時間採

取し、2.5の方法で処理して得られた溶媒抽出物の変異原性を本法で測定した。結果をFig.11に示す。なお、この図で横軸に吸引空気量を示してある。Fig.11からS9mix無添加系の高濃度で毒性によるcolonyの減少がみられたものの、S9mix添加の有無にかかわらず、吸引空気量と突然変異率との間には良好なdose-response関係が認められた。また、同様の試験を香港の一般家庭の居間で採取した室内空気試料を用いて行った結果をTable 6に示す。Table 6から全ての家庭試料でdose-response関係が得られ、空気量 1m^3 当りの変異原性は平均突然変異率 10.82 ± 10.39 、 8.72 、 $5.62 \pm 3.83 (\times 10^{-4})$ (S9mix添加系)、 5.11 ± 5.61 、 4.60 、 $23.64 \pm 5.22 (\times 10^{-4})$ (S9mix無添加系)を示した。また川崎市の1家庭の台所、居間、食堂(それぞれ7試料)、書斎(3試料)およびその戸外(4試料)に適用した結果をTable 7に示す。Table 7から空気量 1m^3 当りの平均突然変異率は 7.84 ± 4.35 、 8.34 ± 5.77 、 4.86 ± 2.90 、 11.61 ± 3.13 、 $2.24 \pm 0.71 (\times 10^{-4})$ (S9mix添加系)、 7.32 ± 3.11 、 7.49 ± 3.24 、 9.47 ± 6.73 、 10.57 ± 2.97 および 9.37 ± 4.63 (S9mix無添加系)を示した。

3、5 室内および室外空気の変異原物質の経時変動 (2時間毎)

室内空気の変異原物質の経時変動を調べるための試料には、2.4の方法で昭和62年12月に国立公衆衛生院の談話室(有喫煙)と同室に近い戸外にそれぞれサンプラーをおき、同時に2時間毎に浮遊粒子を直径 47mm の石英繊維フィルターに採取(空気総吸引量: 2.4m^3)したものの

を用いた。採取試料は2.5の方法で抽出し、得られた溶媒抽出物の変異原性を測定した。結果をFig.12および13に、また、各時間帯ごとの喫煙量、在室者数、換気扇の状態も調査しTable 8に示してある。S9mix添加系(Fig.12)で室内空気の突然変異率は戸外のそれに較べてほぼ同程度であったのに対してS9mix無添加系(Fig.13)では、日中の突然変異率が戸外空気に較べて有意に高いことが分かった。時間帯別では8~18時で外気よりも高く特に9~11時では突然変異率が $212.57 \times 10^{-4} / \text{m}^3$ を示し、さらに15時以降でも高くなった。また、20~6時では室内および戸外ともS9mix添加系、無添加系であまり差はみられなかった。

3、6 喫煙による室内汚染と空気清浄器の効果

室内汚染の主要因の1つであるタバコ副流煙によって汚染された室内空気中の変異原物質が発生後どのような経時変化をするのか、またそれらの除去に有効とされる空気清浄器がどの程度有効かを調べた。Fig.14には室内における空気清浄器、立型扇風機、低騒音サンプラー、機械喫煙装置の位置を示してある。まず、喫煙による副流煙が室内空気の変異原性に対し、どのような影響を及ぼしているかを同室でタバコ10本喫煙させて調べた。その結果をTable 9に示す。Table 9から、10本喫煙させながら2時間採取した浮遊粒子の突然変異率は平均でBlank値に対し、S9mix添加系で15.6倍、S9mix無添加系で58.9倍であることが分かった。このように、S9mix無添加系では添加系の4倍もの突然変異率が検出されたことから、S9mix無添加系の突然変異率を指標として

2.4の方法に従い、喫煙による室内汚染の経時変動およびその汚染に対する空気清浄器の効果を調べた。測定結果をTable 10に示す。Table 10のA₁~A₆は喫煙前(Blank)喫煙時、喫煙後4時間(空気清浄器使用)までの室内空気を1時間ずつ採取したものであり、A₇~A₁₂は喫煙前(Blank)、喫煙時、喫煙後4時間(空気清浄器未使用)の室内空気を1時間ずつ採取したものである。Table 10からタバコ10本喫煙させた時の変異原性および多環芳香族炭化水素(以下PAH)濃度(Table 10のA₂およびA₈)は、Blank値(A₁およびA₇)に較べて著しい高値を示した。その後、突然変異率は経時的に減少した。また、BaP, BkF, BghiPの3物質の分析結果も同様な傾向を示した。

一方、変異原(突然変異率)物質の除去の度合いは空気清浄器を使用した場合に多く、3時間でBlank値よりも低くなるのに対して未使用の場合、同時間が経過してもBlank値の6倍の突然変異率、2~3倍のPAHと高い値を有することが分かった。

3、7 個人曝露試料の変異原性

本法の開発は約3m³の空気中に含まれる浮遊粒子の変異原性測定を可能にした。そこで、個人サンプラーで採取した環境空気浮遊粒子の変異原性を測定するため、2.4の方法で個人曝露試料を採取し本法を用いてその測定を行った。その結果をFigs. 15, 16(冬期の試料)およびFigs. 17, 18(夏期の試料)に示す。また、dose-responseの直線部分の一次回帰式から単位空気量(m³)当りの突然変異率を求めた結果を、Table 11(冬期)と

Table 12 (夏期) に示す。なお、図の横軸は吸引空気量で示してある。Figs. 15, 16 の A, B は非喫煙者、C (6 本/日), D (25 本/日) は喫煙者である。Figs. 15, 16 に示すように採取された冬期の試料は S9mix 添加の有無にかかわらず突然変異率と吸引空気量との間に dose-response 関係が認められた。また、Table 11 から 4 試料とも全て S9mix 無添加系が添加系よりも高く、喫煙者の試料は非喫煙者のそれより高い突然変異率を示すことを認めた。

一方、Figs. 17, 18 の E, F, G は非喫煙者、H (5 本/日) I (6 本/日) は喫煙者である。Figs. 17, 18 に示すように採取された夏期の試料は、喫煙者で S9mix 添加の有無にかかわらず、突然変異率と吸引空気量の間で dose-response 関係が認められるものの、非喫煙者では S9mix 無添加系で dose-response 関係のあまりみられない試料があった。Table 12 から冬期同様、喫煙者の試料が非喫煙者のそれよりも高い変異原性を示した。

また、昭和63年12月、東京都に在住する7人に個人サンプラーを携帯させ、1日毎に7日間採取し S9mix 無添加系で調べた。その結果を Table 13 に示す。Table 13 から喫煙者の7日間の 1m^3 当りの平均突然変異率は $48.4 \sim 81.1 (\times 10^{-4})$ であり、非喫煙者のそれは $5.84 \sim 11.2 (\times 10^{-4})$ であった。

IV 考 察

4、1 Micro forward-mutation 法の高感度化の検討

本研究では微量試料にも適用できる高感度変異原性試験法の開発のため Lewtas らの micro forward-mutation 法の高感度化を試みた。まず、Lewtas らが用いている市販のバイアルが、どこまで微量試料の試験に適用可能であるかを検討するため、市販のバイアル(4ml)を用いて、試料および菌液の総量の少量化の可能性を検討した。その結果 1,000 μ l (Skopeck 法)、100 μ l (Lewtas 法) では同等の変異原性試験結果を得たが、10 μ l では低く、1 μ l ではほとんど変異原性が認められなかった。すなわち、10 μ l では水分の気化や菌と被験試料の反応(曝露)時の両溶液の混合が不十分であったため、得られた結果が低くなったものと考えられた。また、1 μ l では両溶液の混合が不完全であるうえ反応時間中に水分が気化する割合が相対的に多く、試験結果に影響したものと考えられた。しかし、10 μ l の場合、形状をより工夫し内容積も小さくしたバイアルの作製や試験法の手技的な工夫により、これらの問題は解決できるものとし、さらにピペット操作上の難易度も考慮すると菌液と被験試料の混合液の最低量は10 μ l であると考えられた。10 μ l の場合、前述の如く通常のバイアルでは培養(回転)の際水分の気化や不十分な混合のため反応が円滑に行われないなどの問題があり、バイアルの改良が必要となる。そこでマイクロピペットのチップの大きさを考慮し、内容積 100 μ l のマイクロバイアル (Fig. 1) を特注して作製し、このマイクロバイアルを用いて同様な試験を行

った。すなわち、 $10 \mu\text{l}$ (マイクロバイアル使用)、 $100 \mu\text{l}$ (市販バイアル使用) を比較した結果、ほぼ同様な結果が得られた。よって、マイクロバイアルの作製は試料および菌液の総量を $10 \mu\text{l}$ にまで少量化でき、微量試料の変異原性測定が可能である。そこで様々な手技的工夫を行い、試験法の簡易化につとめ本法を開発した。

4、2 Ultramicro forward-mutation 法の検出感度の検討

本法の実質的検出感度を検討すると同時に Ames、Lewtas らの方法と検出感度の比較をした。その結果、Lewtas らの方法と本法を同一試料で比較した場合、同等の変異原性試験結果を得るのに必要な本法の試料量は、S9mix 添加の有無にかかわらず Lewtas らの方法の約 10% であった。このため本法は Lewtas らの方法より、相対的に約 10 倍高感度であることが示唆された。この結果をもとに環境空気試料で同様な実験を行った結果、試料の変異原性がコントロールの 2 倍を得るのに必要な本法の溶媒抽出物量は、Ames 法の約 1~2%、Lewtas らの方法の約 10% の量であること、さらに Figs. 7~9 に示すように、この試料量で十分良好な dose-response 関係があり、Lewtas らの方法とほぼ同等の変異原性試験結果を得られることが証明された。これらの事実は Ames 法がその変異原性評価に 2~5 菌株必要なことを考慮すると、試料量がより多く要求されるため、本法は相対的に Ames 法の約 100 倍以上、Lewtas らの方法の約 10 倍高感度であるといえる。これにより大気試料の変異原性試験を Ames 法で行う場合、約 400m^3 の空気量が必要であるとされているのに対し、

本法はその 1/100 以下の空気量、さらに Lewtas らの 1/10 の空気量で試験が可能になることを証明した。よって、本法は試料が微量で他の方法が検出不可能なものでも、その変異原性測定が十分可能なことが分かった。

4、3 Ultramicro forward-mutation 法の 再現性の検討

本法の再現性を検討した結果、化学物質では S9mix 添加系で 13.1%、S9mix 無添加系で 10.9% と 10% 台の変動係数を示した。さらに本法の再現性を大気試料で検討した結果、S9mix 添加系で 13.9%、S9mix 無添加系で 12.3% と 10% 台の変動係数を示した。また、Table 5 に示すように大気試料を用いて行った Lewtas らの方法の再現性も変動係数が約 10% 程度であることから、環境試料に対する本法の再現性は、 $10 \mu\text{l}$ と微量しか扱わないにもかかわらず、様々な手技的工夫により同等な結果を得られたことになる。なお、S9mix 添加系が無添加系に較べて若干高い値となったのは、S9 などの酵素の影響が疑われた。これは各バイアル内での酵素活性の差が試験結果にも変動をもたらしたと考えられる。

以上のことから、開発した本法は Ames、Lewtas らの方法よりも検出感度、再現性ともに生物学的測定法として環境中の微量にしか得られない試料の変異原性検出に有効であることが示唆された。そして、その開発は単に微量試料の測定というだけでなく、今後試験に必要な試料量が少なくすむことからサンプリングの省力化やそれにかかる費用の節約ができる。また、残余試料で複数回の試験や化学分析等の併用なども可能になることにより

データの信頼性の向上や同一試料での安全性評価が多方面からできる。

4、4 短時間採取した室内空気試料の変異原性

米国の室内空気の変異原性はLewtasらの方法により約100m³の空気試料に対し報告²⁸⁾されているが、本邦にはその適用例がない。そこでLewtasらの方法を用いて東京都の室内空気の変異原性を検討した結果、20 l/minの流量で24時間連続で吸引して採取(約30m³)すれば室内空気の変異原性が測定できることを証明した。よって、Lewtas法に較べて相対的に10倍高感度な本法は約2時間の採取空気量で変異原性を調べることが可能と考えられた。事実、香港や川崎市で2時間採取した一般家庭室内空気試料に本法を適用した結果、その実用性が認められた。

本法が短時間採取試料に適用できることは、さらに次の利点を有すると考えられる。それは、同一フィルター上に24時間連続して試料を採取するLewtasらの方法ではフィルター上での化学反応による試料の変性の危険性が懸念されるのに対し、本法は2時間単位で試料を保存できることから、その時間帯の試料をかなり正確に保てることにある。

4、5 室内および室外空気の変異原物質の経時変動 (2時間毎)

室内空気の浮遊粒子の濃度⁶²⁾は、喫煙量^{41), 51), 5270)}、在室者の人数および外気の流入等によって増加す

ることが報告^{17), 41), 42)}されており、室内空気浮遊粒子の変異原性もこれら室内の条件により変動することが考えられる。本研究では、室内空気浮遊粒子の変異原性を2時間毎に24時間(12回)測定すると同時に、隣接する外気の変異原物質の経時変動の測定も行った。また、各時間帯ごとの喫煙量、在室者の人数、換気扇の状態も調査した。室内空気の突然変異率が特にS9mix無添加系で高値を示すのはヒトの活動時間帯であり、9-11時において喫煙量(6本)、室への出入りの人数(13人)が他の時間帯に比べて多く、これらによる影響と考えられた。また、室内空気の突然変異率の上昇が2峰性を示すことからヒトの活動がその主な原因であるとうかがえた。さらに13時以降室内の突然変異率が急に上昇したのは外気の影響や室内での活動のほか、それまで稼動していた換気扇を止めたことによると考えられる。また、20~6時までの時間帯でS9mix添加系と無添加系を比較した場合大きな差がみられなかった。

今回の測定でヒトの活動時間帯ではS9mix無添加系がかなり高い。その主な原因として喫煙の影響が推測される。その理由として、1)喫煙により発生した副流煙中にはニトロ化合物が多く含まれる、2)ニトロ化合物の多くはS9mix無添加系で変異原性を現わす、3)本研究で行った結果(3.6参照)でも室内空気の変異原性に喫煙はS9mix無添加系に対して強く影響する、が考えられる。

室内空気の変異原性はこのように時間帯によりS9mix添加系の有無で変動がある。今回の測定は1日であり、個々の変異原物質の発生源がいかに室内空気に影響するかをみるには、今後様々な条件下での測定および検討を要すると思われる。

4、6 喫煙による室内空気汚染と空気清浄器の効果

最近、わが国に於いても室内汚染^{20), 21), 24), 25), 29, 30), 31), 45~47)}への関心が高まりつつあり、その汚染の浄化^{2), 55)}の一手法として空気清浄器¹³⁾が市販、普及しつつある。室内汚染の主要因の1つは喫煙であり、室内の粒子状物質濃度にかかなり関与していることは数多く報告されている^{27), 44), 51), 52), 62), 70)}。Table 9 に示すように室内空気試料の変異原性にも特にS9mix無添加系で寄与率が高かった。

一方、喫煙に供なって室内に発散された変異原物質がその後どのような経時的変化をするのか、また、これに対する空気清浄器の汚染物除去効果が経時的にどのように現れるのかを化学分析も併用して、変異原性試験で初めて検討した。前述の如くTable 10に示すA₂とA₈の試料採取は機械喫煙を行いながらのものであった。したがって、喫煙による室内汚染はA₂とA₁、またはA₈とA₇の測定値の差の約2倍に相当するものと推定される。このような考えのもとに室内空気の汚染に対する喫煙の寄与を発癌性の強いBaP³²⁾を例に算出すると、A₂、A₁の測定値からは

$$(9.49 - 0.75) \times 2 \times 67 = 1,170 (\text{ng} / 10 \text{本})$$

A₈、A₇の測定値からは

$(9.05 - 0.21) \times 2 \times 67 = 1,180 (\text{ng} / 10 \text{本})$ となり、タバコ副流煙中のBaP含量(ハイライト 1,070 ng / 10本 ジャスト 1,400 ng / 10本)³⁶⁾と値はほぼ一致した。そこで、このような方法で喫煙の室内汚染に対する寄与を推算すると、突然変異率に対しては11,900と10,700(平均 11,300) $\times 10^{-4}$ / 本、BkF濃度に対しては28と36(平均

32) μg / 本、BaP 濃度に対しては 117 と 118 (平均 118)
 μg / 本、BgHiP 濃度に対しては 130 と 144 (平均 137)
 μg / 本となり、喫煙は室内汚染にかなり大きな影響を
及ぼすことが示唆された。

一方、A₇ ~ A₁₂ の実験結果からタバコ副流煙に汚染され
た室内空気中の変異原物質は、空気清浄器を作動させ
ない場合でも 1 時間にほぼ 50% 前後の割合で減少した。
この原因の主なものとしては、タバコ副流煙粒子の沈降
吸着による除去があげられる。しかし、喫煙終了後、
4 時間経った時点でも Blank 値より PAH で 2~3 倍、変異
原性で 6 倍も高い値を保っていることは注目に値する。
これに対して空気清浄器を作動させた場合は、1 時間に
60~80% の割合で変異原物質が除去され、当該装置を 3 時
間作動させると、すべての値が Blank 値より低くなるこ
とが分かった。これらの結果は空気清浄器は室内浄化の
一手法として有効であることを強く示唆している。今後
さらに喫煙以外の発生源の影響、自然換気率の計測¹⁸⁾
や換気の室内汚染に及ぼす影響等を調べ、室内浄化に有
効な手法を明らかにしたいと考えている。

4、7 個人曝露試料の変異原性

本法により、夏期および冬期にかかわらず、個人サン
プラーで採取された試料の変異原性が測定できることを
実証した。喫煙者の試料は非喫煙者のそれに較べて高い
突然変異率を示すことや受動喫煙 (passive smoking)
者 (B) の突然変異率でも非喫煙者のそれに比べてその影
響をかなり受けていることが示唆された。また、非喫煙
者の場合、冬期の試料は 1 例ではあるが夏期の試料に較

べて高い突然変異率を示した。これは大気の変異原性が Ames 法によっても同様な結果⁹⁾を示すことから外気の汚染度との関係が考えられ、今後さらに検討する必要がある。

また、東京都在住の 7 人にサンプラーを携帯させ、1 日毎に 1 週間採取した試料では、喫煙者の平均突然変異率が非喫煙者のそれの約 8 倍高率であった。

一方、同一被験者でも採取日により、その曝露量は最高で 40 倍も異なり、かなり変動することも認められた。

変異原物質の個人曝露量は生活様式、地域差、行動範囲などによって大きく異なると考えられており、国際間で調査することを考慮すれば、この量や汚染質の差はさらに大きくなることが推測される。現在 WHO (世界保健機構) においても HEAL (Human Exposure Assessment Location) 計画の実施が検討⁴⁰⁾されており、個人曝露の実態調査の重要性は今後ますます指摘されていくと考えられる。本法はその調査を可能にし、個々人の正確な曝露実態を明らかにする手法としてその価値は非常に高い。

本研究では本法の個人曝露試料への適用の可能性を明らかにしたに過ぎないが、現在人数を増やしてサンプリングを実施しており、個々の曝露実態をさらに究明していきたいと考えている。また今後、粒子状だけでなくガス状物質にも変異原性^{5), 19)}があることから、その検討の必要もあると考えている。

室内空気の変異原性は、我々が日常生活の大部分を家庭、職場または学校などの室内やそれに準ずる空間で過ごしていることから、人体の健康に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。そのため室内空気の変異原性を指標とした汚染実態の検討は重要である。

室内空気は喫煙、暖房等の影響を受けるばかりでなく換気による外気の流入や人の活動によっても影響されると考えられる。すなわち、1)室内の変異原物質の量はその室にある発生源の有無、使用頻度および外気の影響によって異なる、2)発散された変異原物質は沈降、拡散、吸着、外気による稀釈によりその量は経時的に変化するなどである。さらにヒトの勤務時間や在室時間は一般に様々であり、これらを考慮すると短時間に採取された空気試料の変異原性測定および変異原物質の経時変動の調査が重要となってくる。

一方、変異原物質の個人曝露量は地域性や個々の行動の多様化により異なるため直接測定する必要がある。これらの測定に対し、現存の変異原性試験法では検出感度の低さからその調査が不可能であった。

本研究では、短時間に採取された室内空気浮遊粒子や個人曝露試料などの微量試料の変異原性測定に適用しうる高感度変異原性試験法の開発を行うため、Lewtasらのmicro forward-mutation法を改良し高感度化を試みた。

Forward mutation法はAmes法などの復帰変異(reverse mutation)と異なり遺伝子内のどの塩基に対しても起った突然変異を感知できるため、その変異原物質に対する

検出幅が広い点に特徴がある。また、使用する菌株が1菌株と少ないことから試験に用いる試料量が少なくてすむ利点を有している。本研究ではマイクロバイアルを複製し、手技的にも種々の工夫を行って微量試料に適用しうるようにした。そして本法の実質的検出感度、再現性を検討した結果、1)本法はAmes法やLewtas法に較べ、1~10%程度の試料量でほぼ同等の変異原性試験結果が得られた。2)本法の再現性は変動係数10%台であり、生物学的試験法として十分適用できることを実証した。本法はその検出感度から約3m³の空気量で変異原性試験が可能であり、実際に20 l/min流量で2時間吸引した一般家庭の室内空気試料に本法を適用した結果、dose-response関係が得られ、変異原性測定が可能であることが分かった。そこで、1日の変異原物質の経時的な実態解明のため、1日(24時間)を2時間毎に12回に分けて室内空気と隣接する戸外から試料を採取し変異原性を測定した。その結果、室内空気試料の変異原性はS9mix添加系では戸外とほぼ同等であるのに対し、S9mix無添加系では戸外よりも高く、特にヒトの活動に影響されることを認めた。また、夜間ではS9mix添加系の有無で差はみられなかった。次に本法を用いて室内空気の変異原性に大きく係わっているとされる喫煙に注目し、発散された変異原物質の経時的な影響やその浄化に有効とされる空気清浄器の効果を生物学的評価としての変異原性で初めて検討し、明らかにした。その結果、1時間喫煙(10本)するとその変異原性は時間の経過とともに沈降、拡散、吸着等によりかなり低下するものの、長くその汚染状態が続くのに対し空気清浄器を3時間稼働させるとその影響を完全に除去できることが分かった。このように本法は、

個々の発生源からの汚染物の影響を経時的に評価でき、今後室内の汚染実態を解明する上で大きく貢献するものと考えられる。また、本法の検出感度とヒトの呼吸量との関係から、変異原物質の個人曝露量の調査が可能となったため首都圏在住の16人（冬期11人、夏期5人）の協力を得て個人サンプラーを用い、流量 $1.5 \sim 2.0 \text{ l/min}$ で24時間の試料採取を1~7日間行い、それぞれの変異原性を測定した。その結果、喫煙者、非喫煙者にかかわらず吸引空気量と突然変異率の間に dose-response 関係が得られたことから、本法は個人曝露試料の変異原性測定に十分適用しうることが認められた。また、喫煙者の試料は非喫煙者のそれより平均で約8倍高いことや同一被験者でも採取日によりその曝露量は最高で40倍異なることが分かった。

本法は、高速液体クロマトグラフで分画された試料や尿などの生体試料への適用が考えられる他、今まで試料量の問題から従来の試験方法では1回の測定値しか得られなかったものが、本法により複数回の試験が行えるようになった。そのため再現性の確認ができ、データの信頼性がさらに得られるものと考えられる。

一方、多量のサンプリングが必要でなくなるためサンプリングの省力化や経費の節減ができる。さらに少量の試料でも、従来の変異原性試験法では不可能であった化学分析等の併用もでき、その安全性評価により大きな助けとなるなど、その有用性はかなり広い。

結 論

Lewtas らの micro forward-mutation 法を改良して Ultramicro forward-mutation 法を開発し、微量室内空気試料の変異原性を調べ、以下の結果を得た。

1) Ultramicro forward-mutation 法は、Lewtas 法の約 1/10、Ames 法や Skopeck 法の約 1/100 の試料量で変異原性の測定が可能であり、また、その再現性も変動係数が 10% 台と良好であった。

2) 本法は 2 時間採取の微量室内空気浮遊粒子 (2.4 m^3) の変異原性の測定が可能であり、一般家庭試料に適用した結果、居間や書斎で高い値が得られた。

3) 室内および隣接する戸外からの空気試料について変異原物質の経時変動を調べた結果、室内は S9mix 添加系で戸外とほぼ同様であったのに対し、S9mix 無添加系では戸外よりかなり高く、ヒトの活動時間と密接な関係のあることが認められた。

4) 喫煙による室内汚染と空気清浄器の効果を生物学的評価としての微生物を用いた変異原性測定によって初めて検討した結果、喫煙は室内の変異原物質濃度に大きな影響を及ぼすことや空気清浄器は変異原物質の除去に有効であることが認められた。

5) 個人曝露試料の変異原性を測定した結果、喫煙者は非喫煙者よりも、また冬期には夏期よりも高い曝露量を示した。さらに曝露量は採取日により大きく変動することが認められた。

ヒトは長時間、室内で生活しており、室内汚染は健康

と大きな係わり合いをもち、室内空気浮遊粒子の変異原性調査は今後ますます重要な課題になると考えられる。本研究において開発した ultramicro forward-mutation 法は室内空気浮遊粒子のような微量にしか採取することができない試料の変異原性の評価が可能であり、環境衛生学上有用であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文の校閲ならびに審査を賜った麻布大学獣医学部公衆衛生学第二講座教授、金内長司博士、同微生物学第一講座教授、田淵清博士、同薬理学講座教授、赤堀文昭博士および同名誉教授、村田元秀博士に心から感謝を捧げ、御礼申し上げます。

また、本研究に多大の御支援と御指導を頂いた国立公衆衛生院地域環境衛生学部長、松下秀鶴博士、同環境健康室長、後藤純雄博士ならびに同学部室員の方々につつしんで拝謝致します。

文 献

- 1)阿部義昭(1983).大気汚染と肺癌の関連性,大気汚染学会誌,18
508-522.
- 2)安達修一・村松 学・青木 治・竹本和夫・木村菊二(1987).タバコ煙を主とした室内空気汚染物質の除去に関する研究,空気清浄,24,1-12.
- 3)Ames,B.N.,Durston,W.E.,Yamasaki,E.,and Lee,F.D.(1973).
Carcinogens are mutagens:a simple test system combining
liver homogenates for activation and bacteria for detection,
Proc. Natl.Acad.Sci.(U.S.A.),70,2281-2285.
- 4)Ames,B.N.,McCann,J.,and Yamasaki,E.(1975).Method for
detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/
mammalian-microsome mutagenicity test,Mutat.Res.31,347-
364.
- 5)荒木明宏・野口 忠・松島泰次郎(1988).ガス状物質の微生物を用いる変異原性試験,トキシコロジーフォーラム11,184-193.
- 6)De Serres,F.J.,Shelby,M.D.(1979).Recommendation on data
production and analysis using the Salmonella/microsome
mutagenicity assay,Mutant.Res.,64,159-165.
- 7)後藤純雄・河合昭宏・米川 徹・久松由東・松下秀鶴(1981).
大気浮遊粉じんの変異原性に及ぼす抽出溶媒の影響,大気汚染
学会誌,16,18-25.
- 8)後藤純雄・河合昭宏・米川 徹・松下秀鶴(1982).大気浮遊
粉じんの変異原性モニタリング用超音波抽出法,大気汚染学
会誌,17,53-57.

- 9)後藤純雄・加藤幸彦・折井章子・田中一幸・久松由東・松下秀鶴(1982).大気浮遊粉じんの変異原性の経日変動,大気汚染学会誌,17,295-303.
- 10)後藤純雄(1983).大気の変異原性のモニタリング法,トキシコロジーフォーラム,6,314-323.
- 11)後藤純雄・松下秀鶴,Williams,K.,Claxton,L.,and Lewtas,J.(1985).高感度変異原性試験法の開発(I)Forward mutation法のミクロ化 第14回日本環境変異原学会講演要旨集.
- 12)Goto,S.,Williams,K.,Claxton,L.and Lewtas,J.(1985).Evaluation of a micro-forward mutation assay in *Salmonella typhimurium* for application to complex ambient air particulate extracts,Environmental mutagenesis,7,39.
- 13)林 功(1975).静電式空気清浄装置の傾向,空気清浄,13,10-17.
- 14)林 正利・塚本利之(1977).環境汚染物質の生体影響の指標としての愛玩動物における体内分布の意義,日本公衛生誌,24,287-292.
- 15)林 裕造・黒木登志夫(1984).新しい発癌のメカニズムと評価,サイエンスフォーラム,P.380.
- 16)林 裕造・黒木登志夫(1984).新しい発癌のメカニズムと評価,サイエンスフォーラム,P.391-403.
- 17)福岡三郎(1981).自動車から排出される粒子状物質の排出量,空気清浄,19,57-63.
- 18)池田耕一(1985).換気量の測定法,空気清浄,24,12-21.
- 19)賀田恒夫(1983).ガス状物質の変異原性,トキシコロジーフォーラム,6,149-157.

- 20)香川 順 (1983).大気汚染の健康影響に関する疫学的知見と人体暴露研究結果の不一致, 大気汚染学会誌, 18,582-594.
- 21)香川 順 (1984).粒子状物質の人体影響, 空気清浄, 22,42-51.
- 22)片山博雄 (1980).肺癌の原因(特に喫煙)についての実験的研究, お茶の水医学雑誌, 28,3-26.
- 23)経済企画庁国民生活局国民生活調査編 (1975).生活時間の構造分析, 大蔵省印刷局, P.23-55.
- 24)木村菊二 (1976).室内の空気汚染について, 空気清浄14,23-31.
- 25)喫煙と健康に関する調査班 (1980).昭和55年度喫煙と健康に関する調査研究, P.215-217.
- 26)建設白書・資料編(1988).大蔵省印刷局, P.42.
- 27)Lefroth, G., Nilsson, L., and Alfheim, I. (1983). Passive smoking and urban air pollution. Salmonella/microsome mutagenicity assay of simultaneously collected indoor and outdoor particulate matter, In Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures, III, P.515-525.
- 28)Lewtas, J., Goto, S., Williams, K., Chuang, J., Petersen, B., and Wilson, N. (1987). The mutagenicity of indoor air particles in a residential pilot field study application evaluation of new Methodologies, Atmospheric Environment, 21,443-449.
- 29)前田和甫 (1982).大気汚染-特にOutdoor PollutionとIndoor Pollutionの関係, 保健の科学, 24,9.
- 30)松村年郎・村松学・亀谷勝治 (1983).室内空気汚染に関する研

究（第3報）室内空気中のホルムアルデヒド濃度について，日本公衛誌 30,303-208.

- 31)松村年郎・村松学・亀谷勝治・義平邦利・古田栄敬・山田久志 (1985).室内空気汚染に関する研究（第4報）ホルムアルデヒドの個人暴露濃度について，日本公衛誌 32, 287-295.
- 32)松下秀鶴(1976).ベンゾ(a)ピレンの発生経路と汚染の現状，油化学,25,137-146.
- 33)松下秀鶴(1979).大気汚染物質の実態とその変異原性，変異原性と毒性No.5, フジテクノシステム：16-32.
- 34)松下秀鶴(1980).燃焼や熱分解によって生ずる環境発がん物質，化学と工業,7,455-459.
- 35)松下秀鶴・後藤純雄・森田昌宏・林健児(1982).変異原性試験用自動コロニーカウンター計測値の補正方法に関する研究，大気汚染学会誌,17,177-186.
- 36)松下秀鶴(1983).生活環境，特に環境空気中の発がん関連物質について,47,184-191.
- 37)松下秀鶴(1983).ニトロアレーン類の生成，分布，変異原性，トキシコロジーフォーラム,6,356-384.
- 38)松下秀鶴(1983).都市大気浮遊粉じんの変異原性の経日変動パターン，環境変異原研究,5,46-49.
- 39)松下秀鶴・後藤純雄・高木敬彦（1988）.前進突然変異試験法による環境変異原物質の高感度検出，季刊「化学品安全」,6,9-19.
- 40)松下秀鶴(1988).人間暴露評価計画について，日本分析化学誌 (No 1)P.100.
- 41)三谷一憲・星野道雄（1971）.大気汚染物質の室内環境におよぼ

- す影響に関する研究，第2報都市某ビルのエア－フィルターに
付着した粉じんの金属成分について，名古屋市衛生研究所，18
87－94.
- 42)三谷一憲・土屋博信・近藤正人(1975).大気汚染物質の室内
環境におよぼす影響について，大気汚染研究，10,373－380.
- 43)宮本昭正・可部順三郎・前田和甫(1984).大気汚染と呼吸器
疾患(新訂)，ぎょうせい，43－55.
- 44)村松学・木村菊二(1975).喫煙による汚染物の発生量(窒素酸
化物および粒子状物質について)，大気汚染研究，10,375－383.
- 45)村松学(1982).室内空気汚染に関する研究－室内空気汚染の実
態と評価，日本公衛誌，29,31－35.
- 46)村松学(1986).室内空気汚染に関する研究，大気汚染学会誌
21，236－252.
- 47)村松学(1983).室内汚染濃度の変動とその測定例について，第
19回大気汚染学会講演要旨集，P.192.
- 48)森 忠司・吉川正雄・松下秀鶴(1986).NO₂の個人被曝量に及ぼ
す各種生活空間の影響，大気汚染学会誌，21,446－453.
- 49)森 忠司・松下秀鶴，Clara，Y.，S.，Frances，R.，Blanco，B.and
Monthip，S.T.(1987).東京都，バンコク，マニラにおける二酸
化窒素の個人被曝濃度の比較，大気汚染学会誌，22,237－243.
- 50)中島明子(1988).住宅白書，ドメス出版，P.137－142.
- 51)中村堯・檜崎正也(1971).喫煙に関する研究(喫煙による空気
汚染物発生量の検討，日本建築学会学術講演要旨集，P.251－
252.
- 52)檜崎正也(1976).喫煙と室内空気汚染，空気清浄，14,12－13.
- 53)西村哲治・加藤幸彦・松下秀鶴(1984).東京および東南アジア3

- 都市における土砂の変異原活性,環境変異原研究,6,185-189.
- 54)日本放送協会放送世論調査所編(1981).昭和55年度国民生活時間調査.
- 55)日本空気清浄協会(1987).室内における浮遊粉じん削減に係わる新技術の応用に関する研究,空気清浄,25,1-21.
- 56)大谷仁己・嶋田好孝・氏家淳雄・西村哲治・松下秀鶴(1985).大気浮遊粉じんの変異原性,20,463-469.
- 57)尾川博昭・大西克成(1979).ネズミチフス菌および大腸菌における forward mutationの検出系について,変異原性と毒性,8,37-47.
- 58)Pueyo,C.(1978).Forward mutations to arabinose resistance in *Salmonella typhimurium* strains, *Mutat.Res.*54,311-321.
- 59)Pueyo,C.,Frezza,D.,and Smith,B.(1979).Evaluation of three metabolic activation system by a forward mutation assay in *Salmonella*,*Mutat.Res.*183-194.
- 60)Pueyo,C.(1979).Natulan induces forward mutations to L-arabinose-resistance in *Salmonella typhimurium*,*Mutat.Res.*67,189-192.
- 61)Pueyo,C.,and Lopez-Barea,J.(1979).The-L-arabinose-resistance test with *Salmonella typhimurium* strain SV3 selects forward mutation at several genes,*Mutat.Res.*64,249-258.
- 62)呂俊民,前川甲陽,藤村満,(1976).浮遊粒子状物質による室内空気汚染,空気清浄,14,No.4,1-11
- 63)Ruiz-vazquez,R.,Pueyo,C.,and Cerda-Olmedo,E.(1978).A mutagen assay detecting forward mutations in an arabinose

- sensitive strain of *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.* 54, 121-129.
- 64) Skopeck, R.T., Liver, L.H., Kaden, A.B., and Thilly, G.W. (1978). Relative sensitivity of forward and reverse in *Salmonella typhimurium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4465-4469.
- 65) 高木敬彦・後藤純雄・郭 錦堂・杉田佐和子・村田元秀・Lewtas, J・松下秀鶴(1989). Ultramicro forward-mutation法を用いた微量室内空気浮遊粒子の変異原性, *大気汚染学会誌*, 24, 244-251.
- 66) 田島 太郎・賀田恒夫・近藤宗平・外村 晶編(1980). 環境変異原実験法, 講談社サイエンティフィック, 47-240.
- 67) 竹本和夫 (1976). 大気汚染による肺の病変、特に肺癌について, *大気汚染学会誌*, 10, 7663-769.
- 68) 田辺 潔・郭 錦堂・今宮俊一郎・松下秀鶴(1987). カラム濃縮-クロマトグラフィー-分光蛍光法による極微量空気浮遊粒子中のPAHの分析, *大気汚染学会誌*, 22, 334-339.
- 69) 玉川勝美・相原良之 (1987). 大気浮遊粉じんの変異原性の季節変動, *大気汚染学会講演要旨集*, P.442.
- 70) 田中誠・木村菊二 (1983). 喫煙、非喫煙時の室内空気環境の比較, *空気清浄*, 21, 34-41.
- 71) 寺西清・浜田耕吉・渡辺弘(1983). 大気中発癌物質の生物学的検査法, *大気汚染研究*, 25-31.
- 72) U.S. Department of Health and Human Services(1982). The Health Consequence of Smoking-Cancer-; U.S. Department Health and Human Services, A report of the Surgeon General.
- 73) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsusita, T., Sugimura, T., and

Okada, M. (1977). Mutagenicities of N-nitrosoamines of Salmonella, *Mutat. Res.* 48, 121-130.

A Study on High Sensitization of Micro Forward-mutation Assay

Yukihiko Takagi

Recently the frequency of lung cancer has increased and air pollution is noticed as one of the causes. Many kinds of mutagens and carcinogens are present in the natural environment. Mutagens are not only correlated with carcinogens but also are participants in hereditary virulence. Mutation assays using bacteria have been employed to examine these mutagens, because they have the following merits:

- 1) It is easy to judge the test results.
- 2) The cost of the assay is cheaper than that of other tests such as animal tests.
- 3) Since large instruments are not needed in the assay, the evaluation of the mutagenicity can easily be made in any locations.

The Ames assay is widely used as a representative of the mutation assays using bacteria.

Human exposure to mutagens and carcinogens in indoor air is a matter of concern, since we spend approximately 80% of our time indoors, either in our homes, workplaces or in schools. Indoor air pollution, however, is influenced not only by the influx of outside air but also by characteristic indoor sources such as smoking, cooking, heating, etc. Concentration of mutagens indoors fluctuates largely with many factors. It is very important to measure the mutagenicity of indoor airborne particulates, especially it's hourly variation and to monitor the personal exposure to airborne mutagens. The size of indoor air samples collected for a short time is very small. It is, therefore, impossible to assay the indoor air samples with the standard Ames assay, as the Ames assay requires a relatively large sample size such as outdoor air samples collected from a large volume of air.

Sensitivity of the forward mutation assay (Skopeck assay) to 8-azaguanine resistance is nearly the same as that of the Ames assay.

Lewtas(1987) developed a sensitive micro forward-mutation assay using Salmonella sp.(1) serovar typhimurium strain TM677 by the modification of the original assay by Skopeck and showed it's usefulness for the mutagenicity survey of indoor environment. She confirmed that this assay is applicable to the measurement of mutagenicity of indoor air particulates collected at a flow rate of 20 l/min for 24hr. This assay is presently considered to be the most sensitive developed so far of the mutation assays using bacteria. However, no assays have been established for detecting mutagenicity of such a small sample size as indoor air samples collected for a short time under 24hr. Therefore, it is necessary to develop a more sensitive mutation assay in order to survey mutagenicity of air particulates indoors in more detail and also to measure personal exposure to airborne mutagens.

The present study was carried out to improve the micro forward-mutation assay (Lewtas assay) for evaluation of mutagenicity of indoor airborne particulates which were collected in a short time and airborne particulates which were collected by personal air samplers.

The results obtained are summarized as follows.

A highly sensitive ultramicro forward-mutation assay using *Salmonella typhimurium* strain TM677 was developed by the modification of the preincubation step of the micro forward-mutation assay. That is, the volume of solution in the preincubation step was reduced to $10\ \mu\text{l}$, 1/10 of that of the micro forward mutation assay. The difficulty due to this volume reduction was overcome by the use of dichloromethane in solvent exchange for a test sample preparation and a $100\ \mu\text{l}$ of newly reduced test vial with a teflon stopper in the preincubation step.

A validity test of the ultramicro forward-mutation assay was carried out using BaP, 4NQO, benzene-ethanol extract from an outdoor airborne particulates (collected in Sagamihara city and in Washinton D.C.) and indoor airborne particulates (collected at Azabu University in Sagamihara). Particulates in air indoors and outdoors were collected on a quartz fiber filter using low and high volume air

samplers with an air flow rate of 20 and 1000 μ /min for 24hr. Organic components were extracted from the particulates by an ultrasonic extraction method using benzene-ethanol (3:1 v/v) and dried up under a reduced pressure. The organic components were stored at -80°C until use. On the day of the mutagenicity test, the extracts were redissolved in dichloromethane, and subjected to mutagenicity assays after a solvent exchange to dimethylsulfoxide. The ultramicro forward-mutation assay gave 10 times higher sensitivity than that of the Lewtas assay (micro forward mutation assay) and about 100 times higher than that of the Ames (preincubation) assay. Repeatability of this assay was nearly the same as that of the micro forward-mutation assay, that is, the coefficient of variation of the mutation frequency for BaP and 4NQO and airborne particulate extracts were about 10% in the test condition of both the presence and absence of S9mix.

The ultramicro forward-mutation assay was applied to the measurement of mutagenic activity of indoor air samples collected for 2hr in

general homes in Hong-Kong, Tokyo and Kawasaki-city. It was found that this assay had the potentiality to measure mutagenicity of airborne particulates collected from about 3m^3 of air which correspond to the air volume of 2hr indoor air sampling at a flow rate of 20 l/min. This assay was also applied for the measurement of hourly variation (every 2hr) of mutagenic activity of airborne particulates indoors and outdoors. The results revealed that mutagenic activities indoor were nearly the same with those outdoors in the night time, but were enhanced largely in the day time and that the mutagenic activity indoors in the absence of S9mix was well correlated with human activity. It was also found that indoor air pollution by carcinogens and mutagens was largely affected by cigarette smoking and that an air cleaner proved to be very effective in the reduction of the indoor air pollution by mutagens from cigarette smoking.

A preliminary survey on personal exposure to airborne mutagens was performed in order to confirm the utility of the ultramicro forward-mutation assay. Four subjects (2 non-smokers and 2 smokers) in

winter and five subjects (3 non-smokers and 2 smokers) in summer each carried a personal sampler and collected airborne particulates at a flow rate of 1.5 ~ 2.0 l/min for 24hr. The results demonstrated that smoking enhanced remarkably a personal level of exposure to airborne mutagens. 7 subjects (4 non-smokers and 3 smokers) each carried a personal sampler everyday for one week in winter. Mutagenic activity within the same subject changed about 40 times, depending upon the sampling of the day.

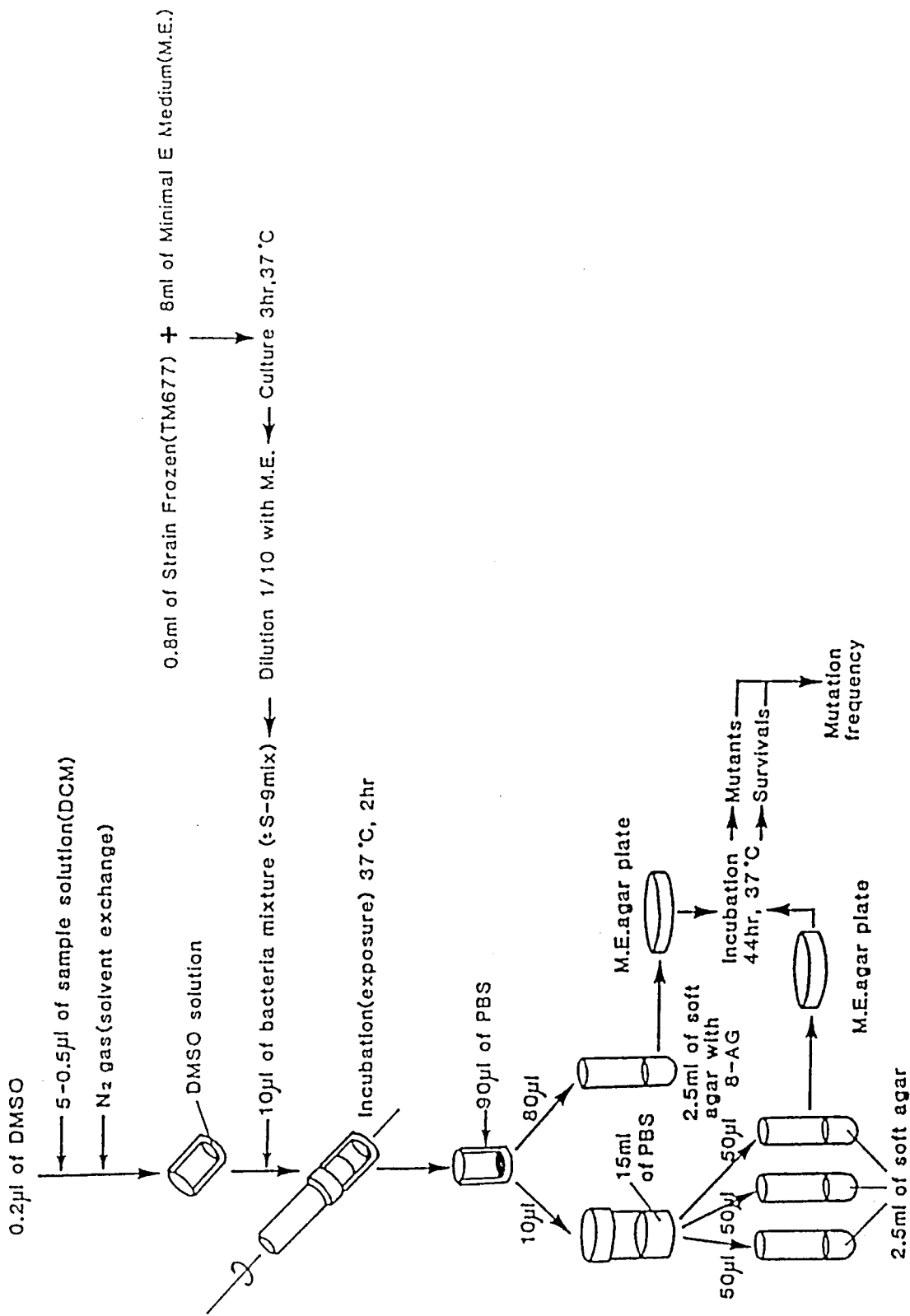
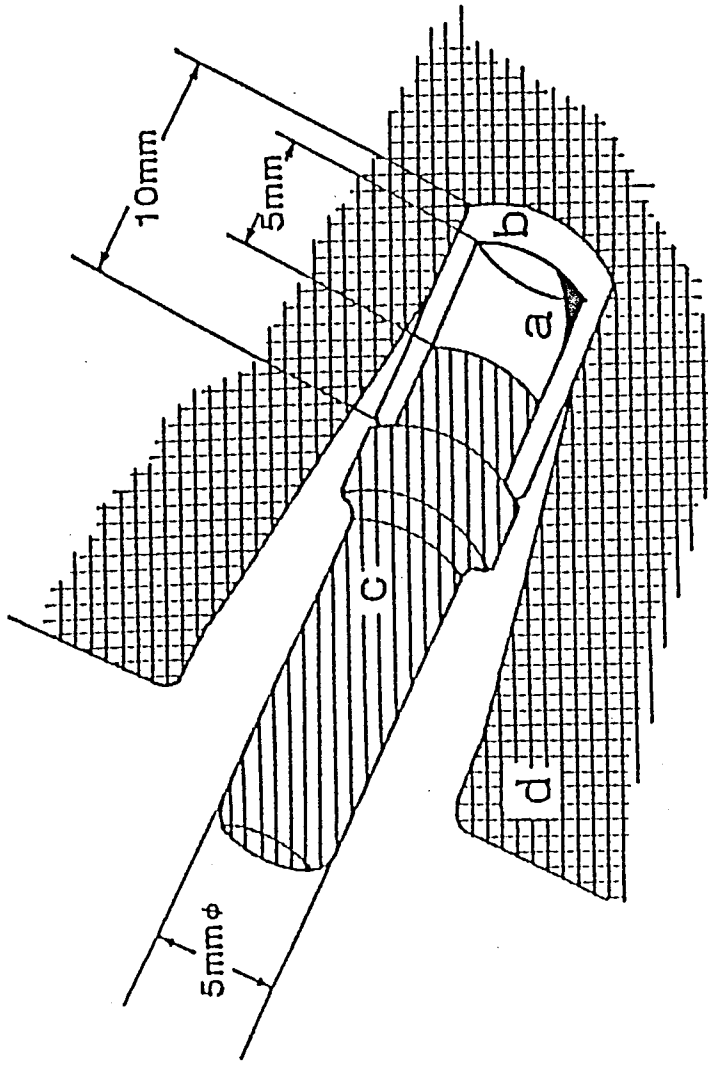


Fig. 1 Scheme of ultramicro forward-mutation assay.



- a) Mixture solution
- b) Micro vial
- c) Teflon cup
- d) Polystyrene vial holder

Fig. 2 Schematic diagram of incubation with micro vial.

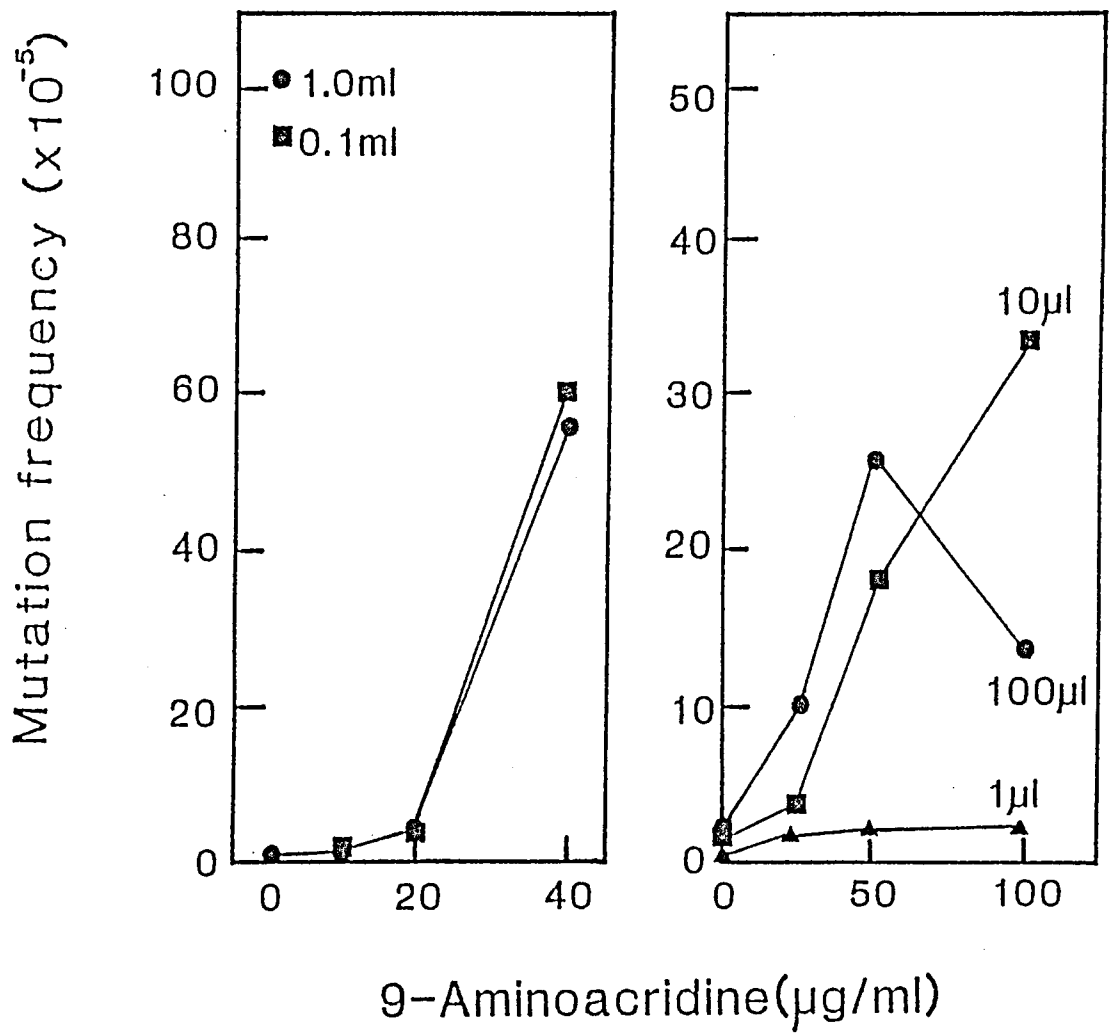


Fig. 3 Selection of the solution volume in the preincubation step.

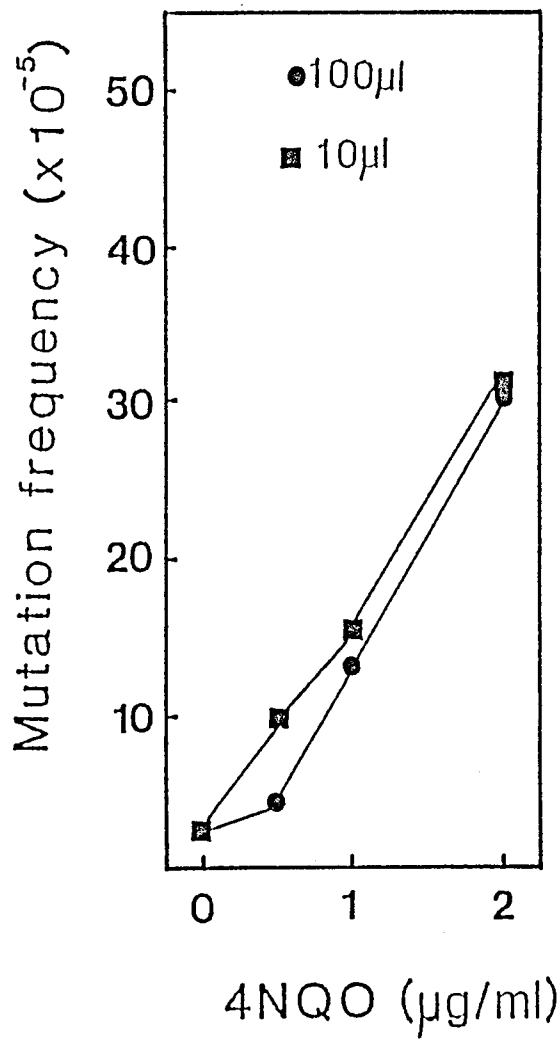


Fig. 4 Selection of the solution volume in the preincubation step.

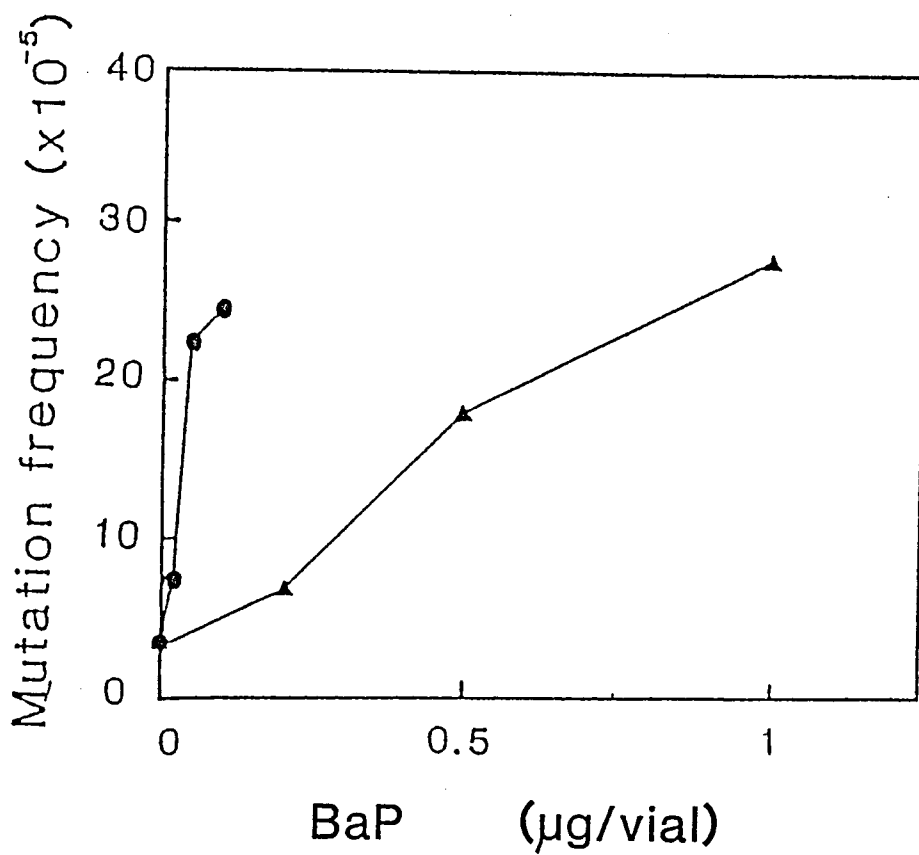


Fig. 5 Comparison of mutation frequency for BaP by the ultramicro forward-mutation assay and the micro forward-mutation assay.
●: Ultramicro forward-mutation assay
▲: Micro forward-mutation assay

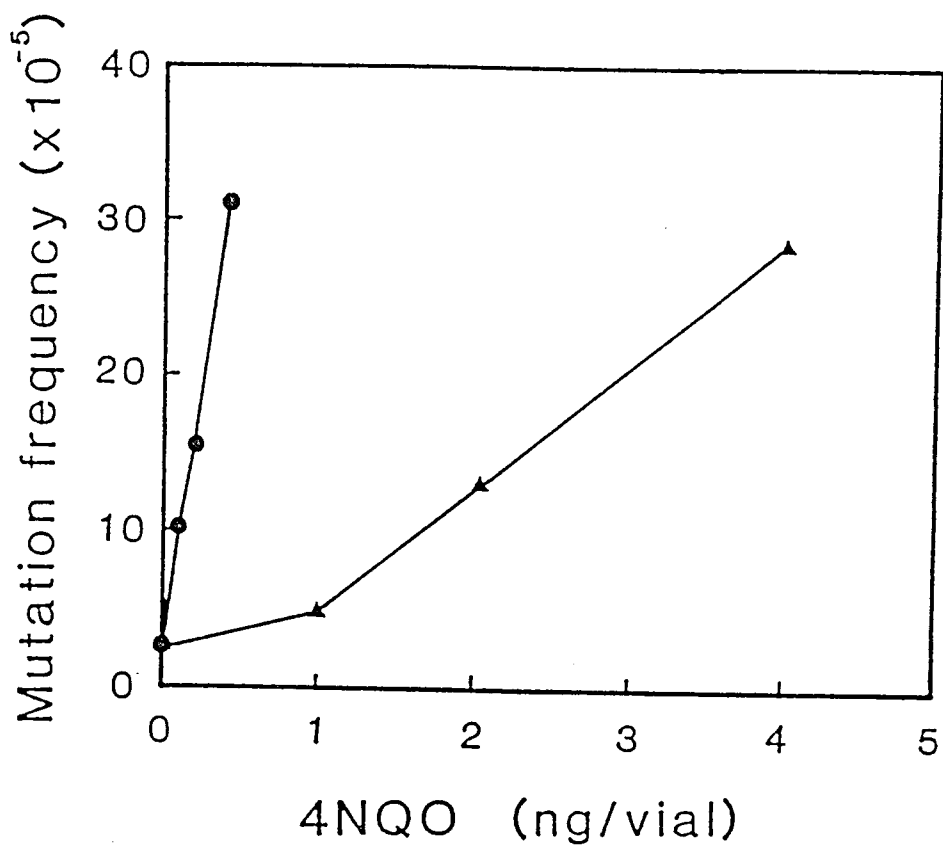


Fig. 6 Comparison of mutation frequency for 4NQO by the ultramicro forward-mutation assay and the micro forward-mutation assay.

- : Ultramicro forward-mutation assay
- ▲: Micro forward-mutation assay

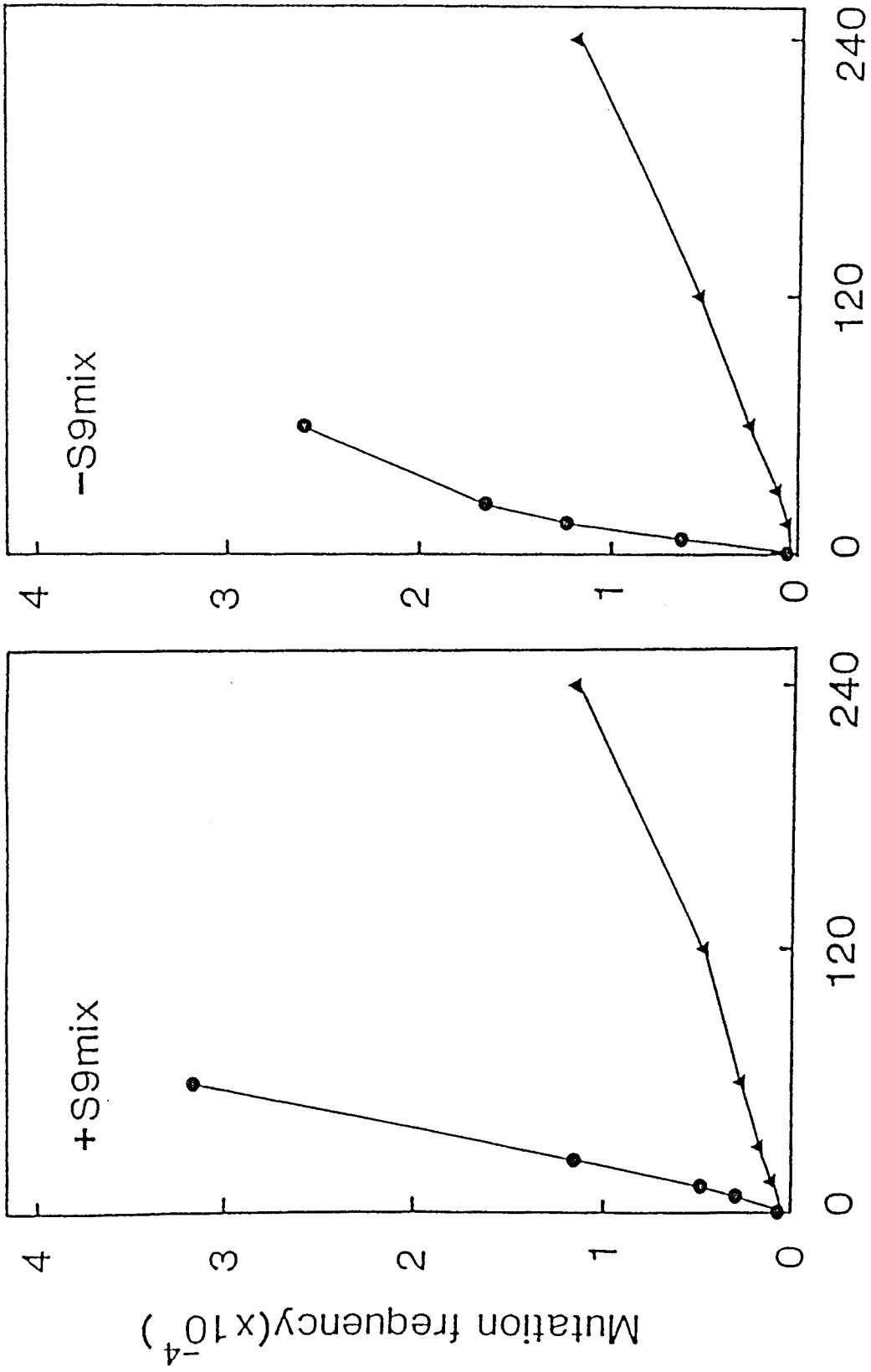


Fig. 7 Comparison of mutation frequency for airborne particulate extracts in Sagamihara by the ultramicro forward-mutation assay and the micro forward-mutation assay.

●: Ultramicro forward-mutation assay
▲: Micro forward-mutation assay

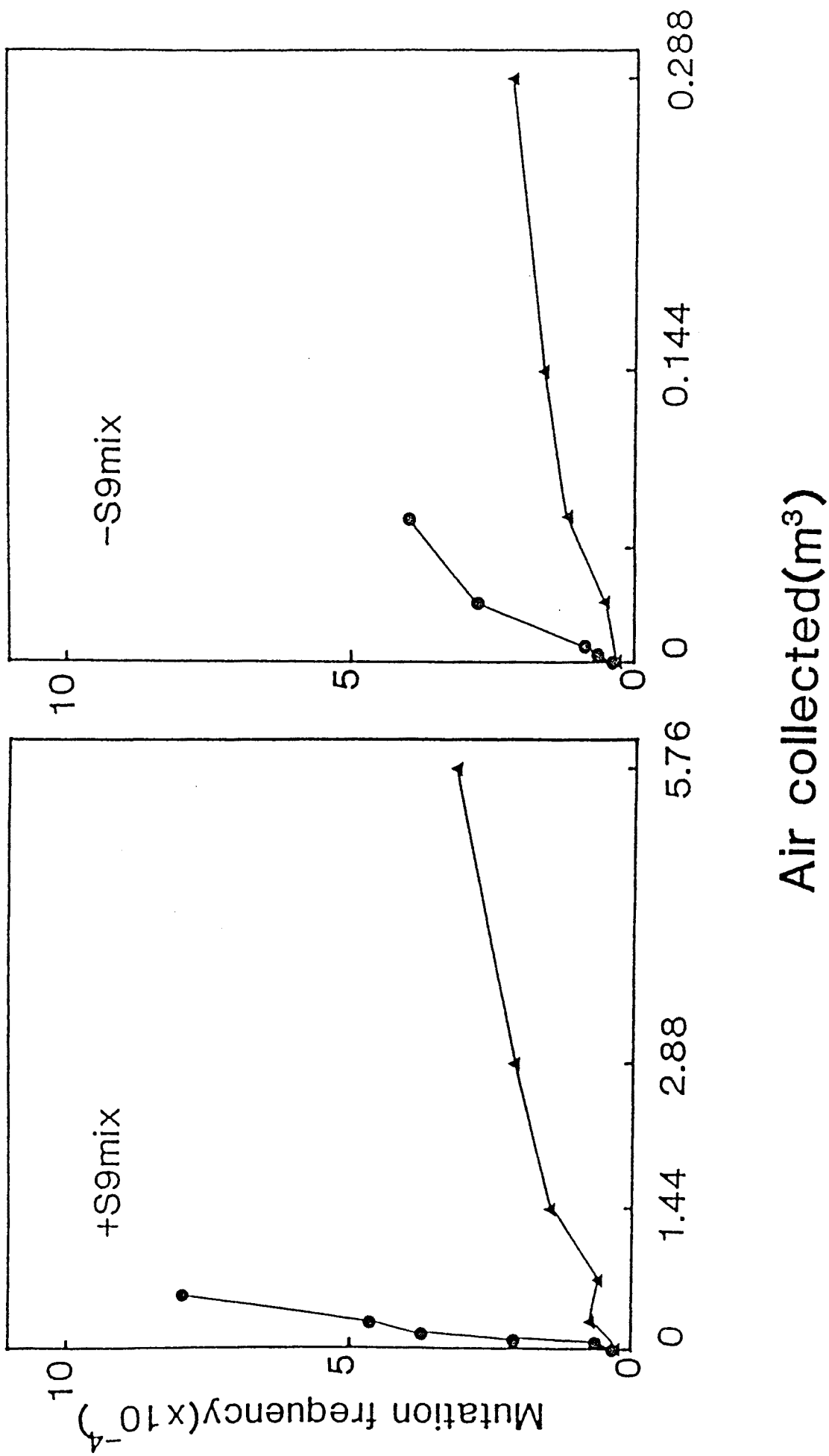


Fig. 9 Comparison of mutation frequency for indoor airborne particulate extracts in Sagamihara by the ultramicro forward-mutation assay and the micro forward-mutation assay.
 ●: Ultramicro forward-mutation assay
 ▲: Micro forward-mutation assay

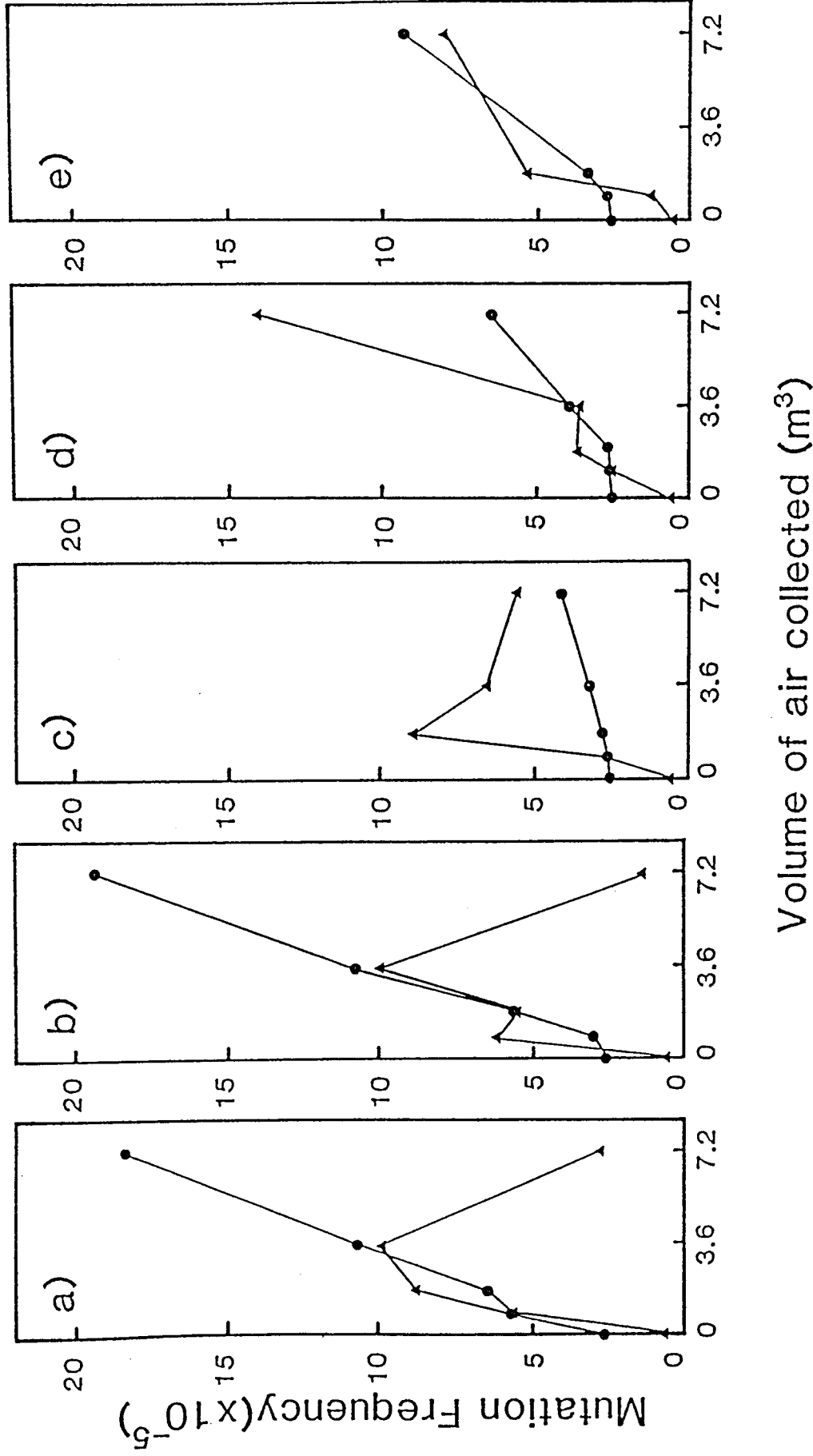


Fig.10 Dose-mutagenic frequency relationship for indoor and outdoor airborne particulate extracts in Tokyo.
 a)-d): indoor sample, e): outdoor sample
 ●: +S9mix, ▲: -S9mix

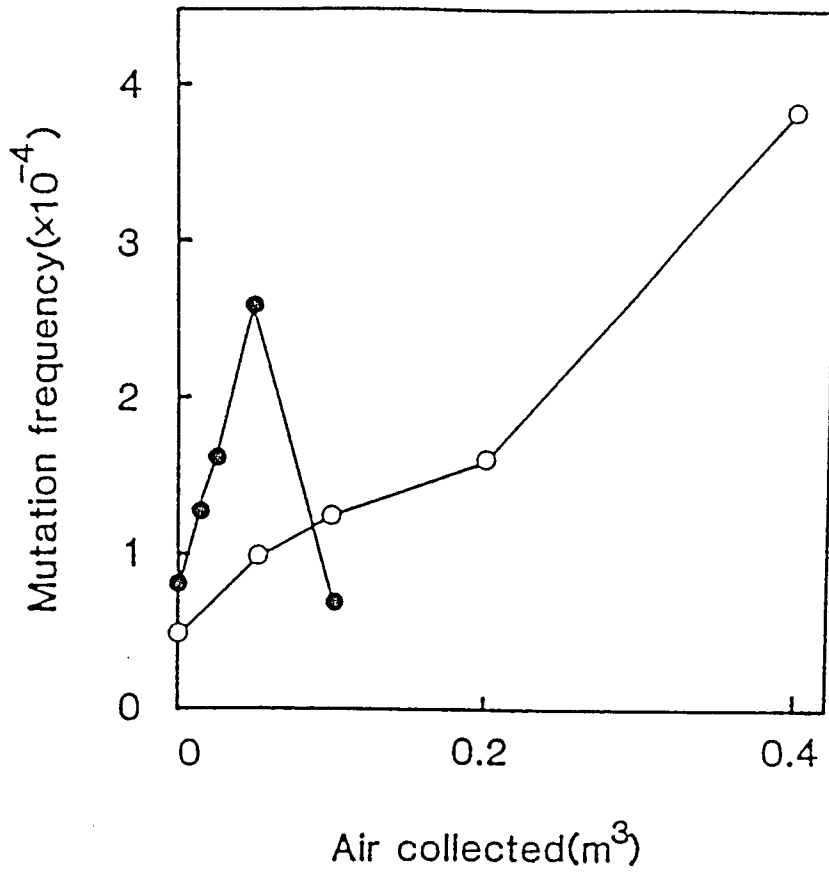


Fig.11 Dose-mutation frequency relation for indoor airborne particulate extracts in Tokyo.
 ○:+S9mix, ●:-S9mix

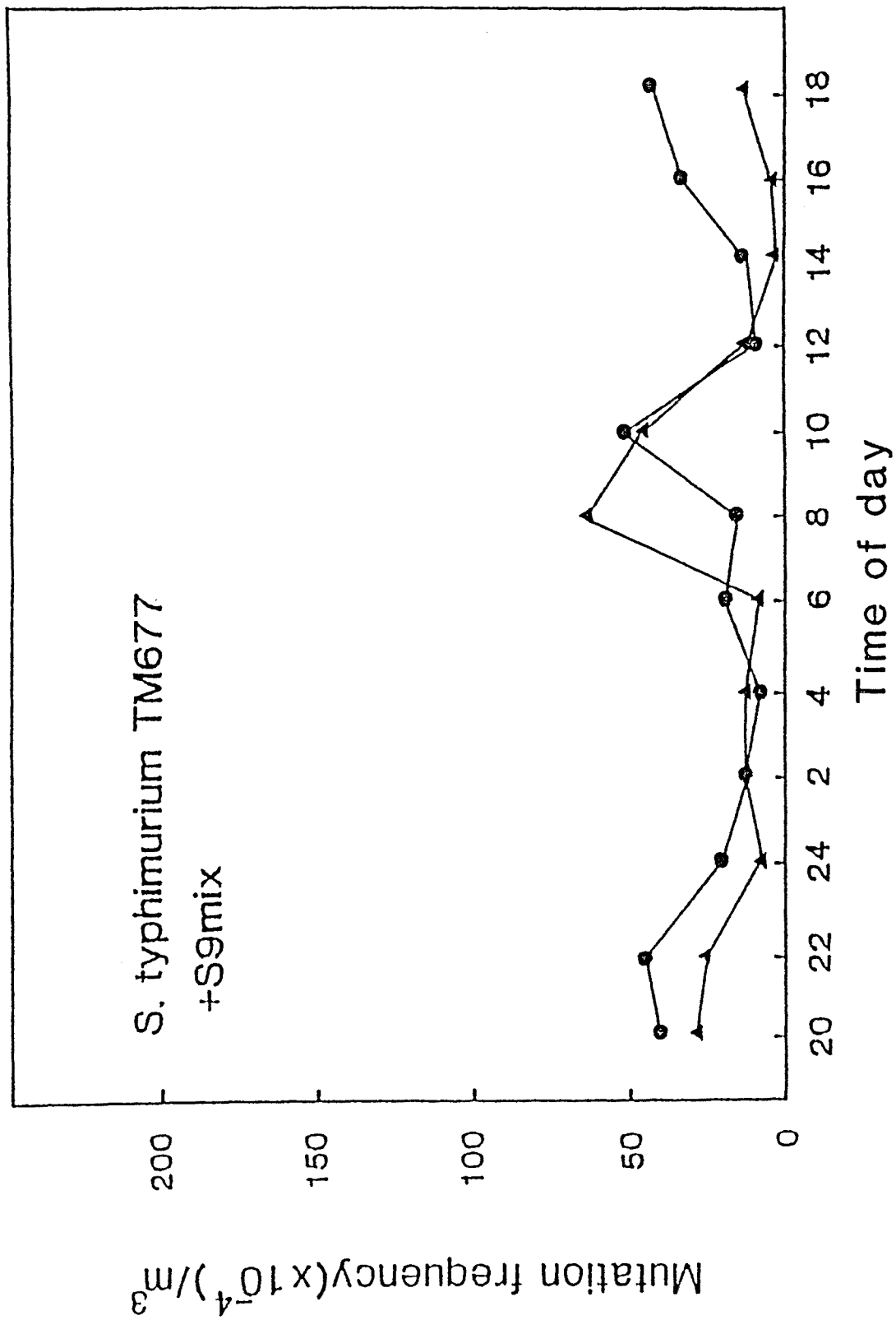


Fig.12 Hourly variation of mutagenic activities of indoor and outdoor air in Tokyo by the ultramicro forward-mutation assay.
 ●:Indoor, ▲:Outdoor

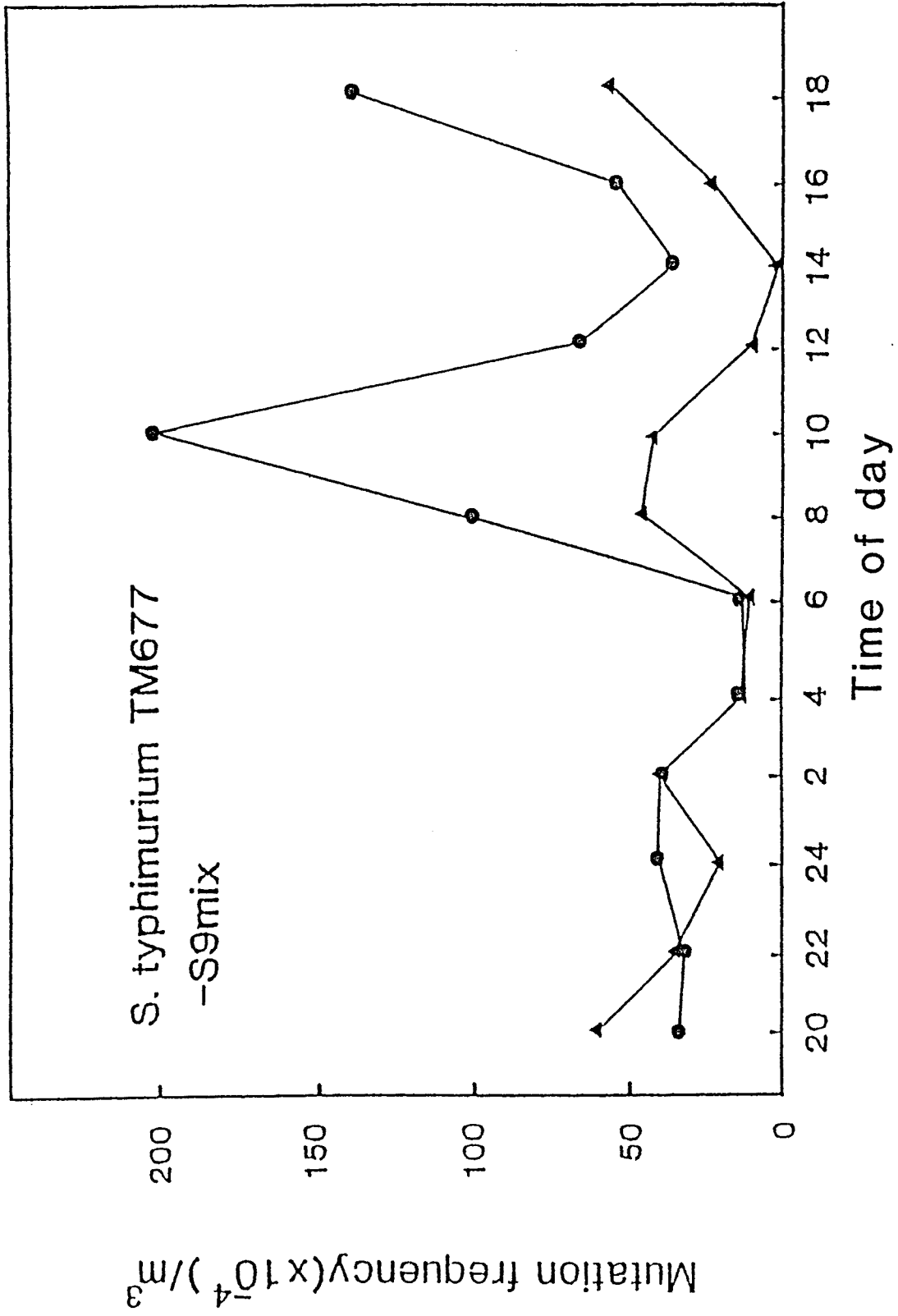


Fig.13 Hourly variation of mutagenic activities of indoor and outdoor air in Tokyo by the ultramicro forward-mutation assay.
●:Indoor, ▲:Outdoor

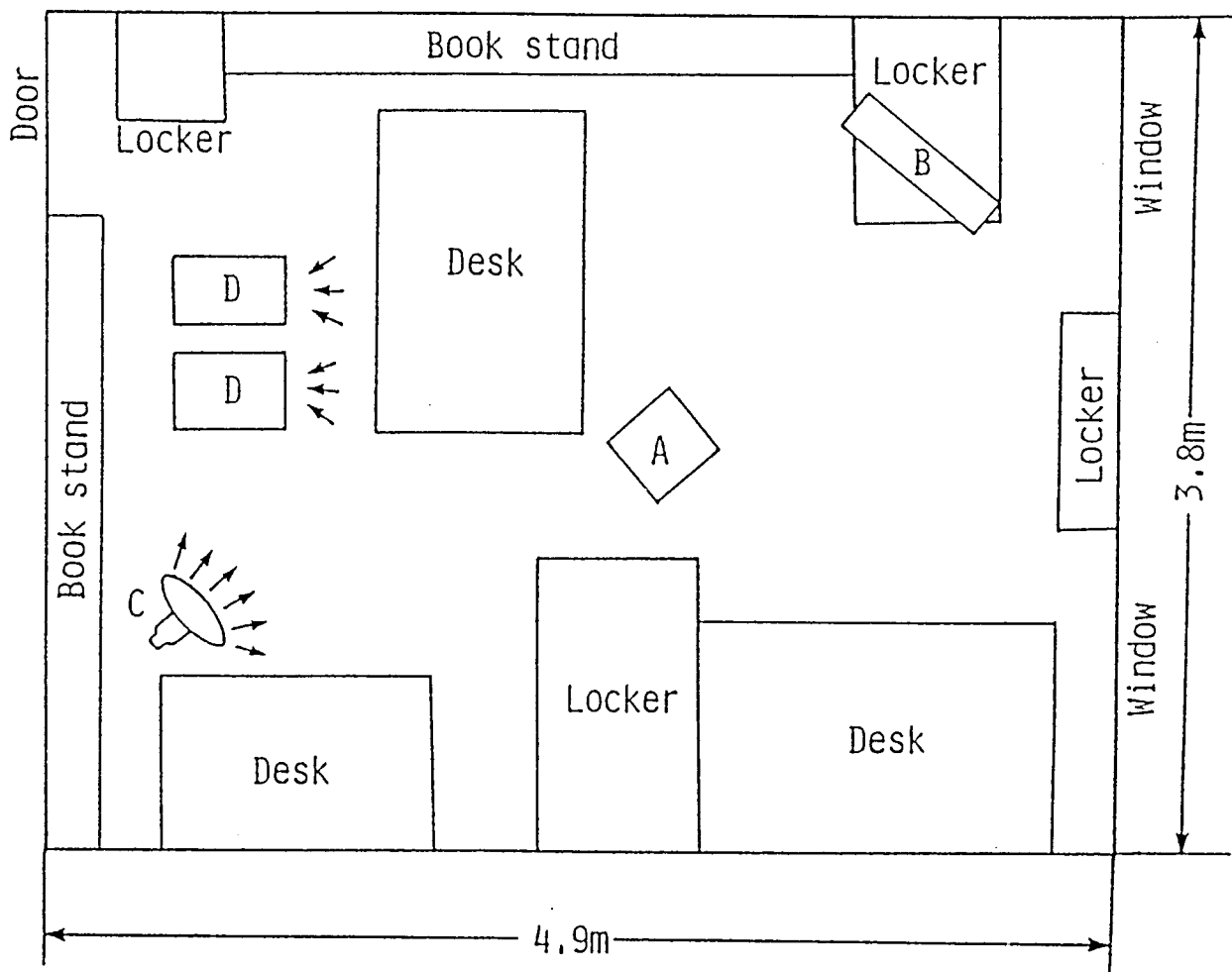


Fig.14 Outline of the room tested
 A: Smoking machine, B: Air cleaner
 C: Electric fan, D: Sampler

+S9mix

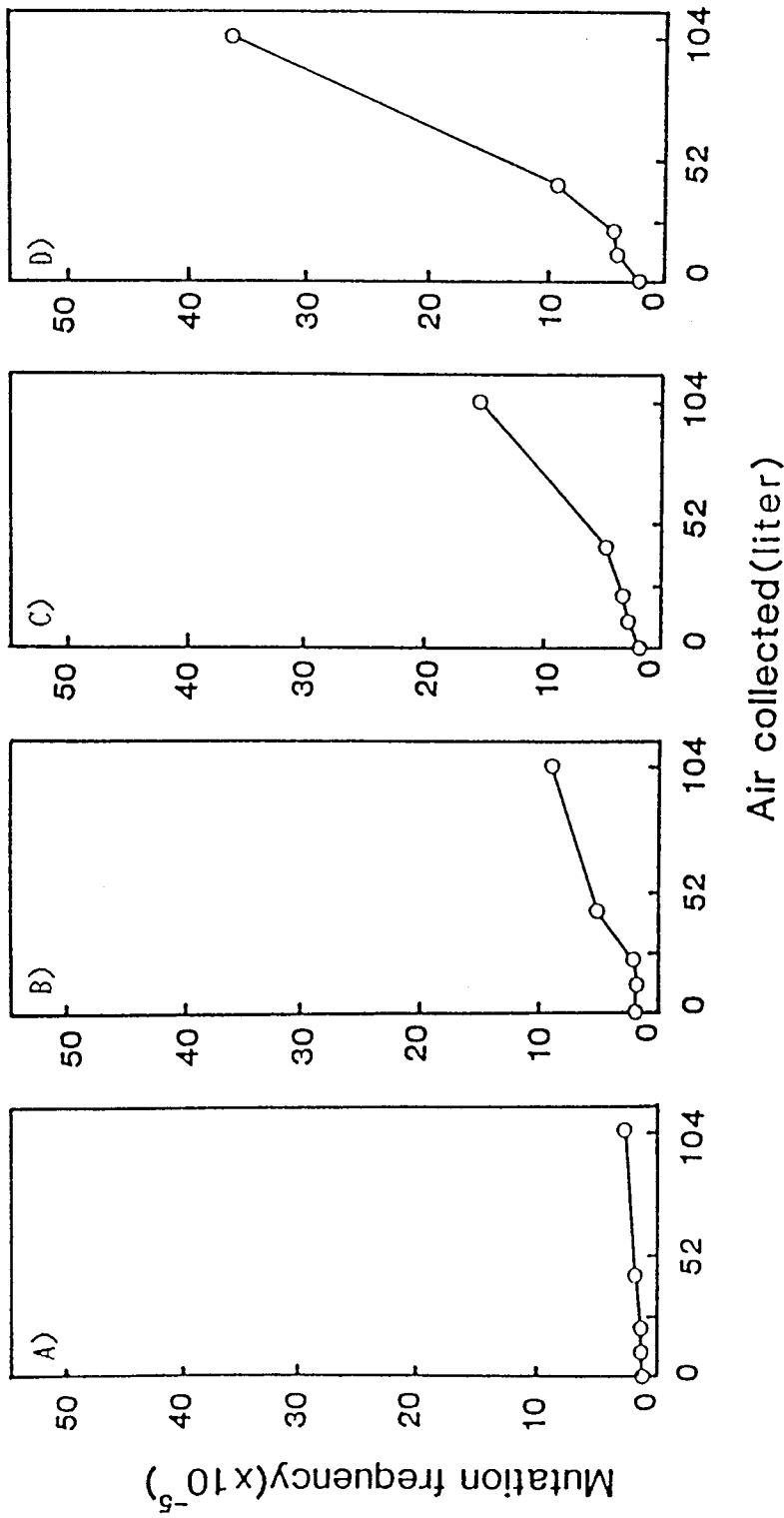


Fig.15 Mutation frequency of organic extracts from particulates collected by personal air samplers in Sagami-hara and Tokyo in winter. A),B):Non-smoker, C),D):Smoker

-S9mix

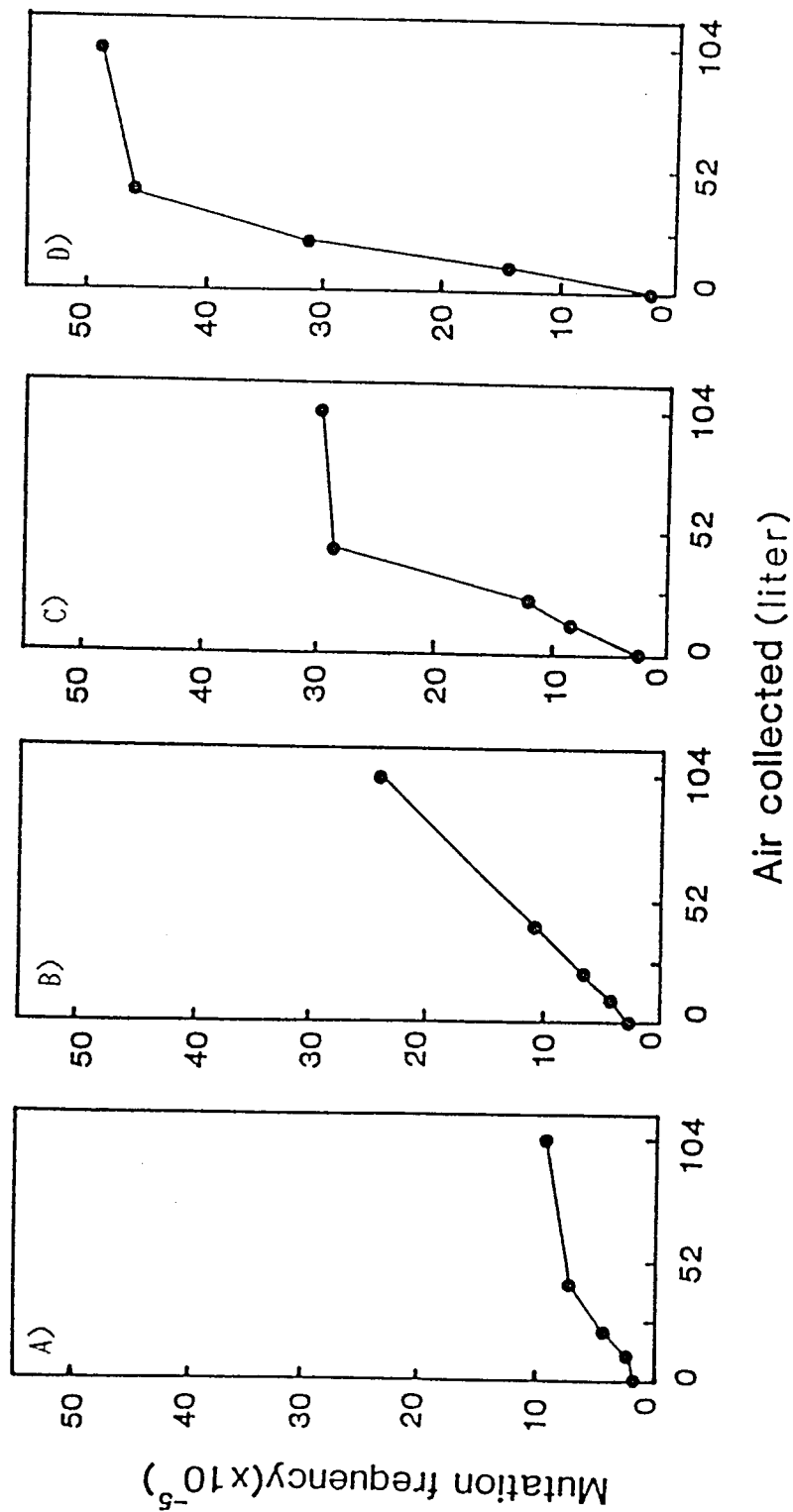


Fig.16 Mutation frequency of organic extracts from particulates collected by personal air samplers in Sagamihara and Tokyo in winter. A),B):Non-smoker, C),D):Smoker

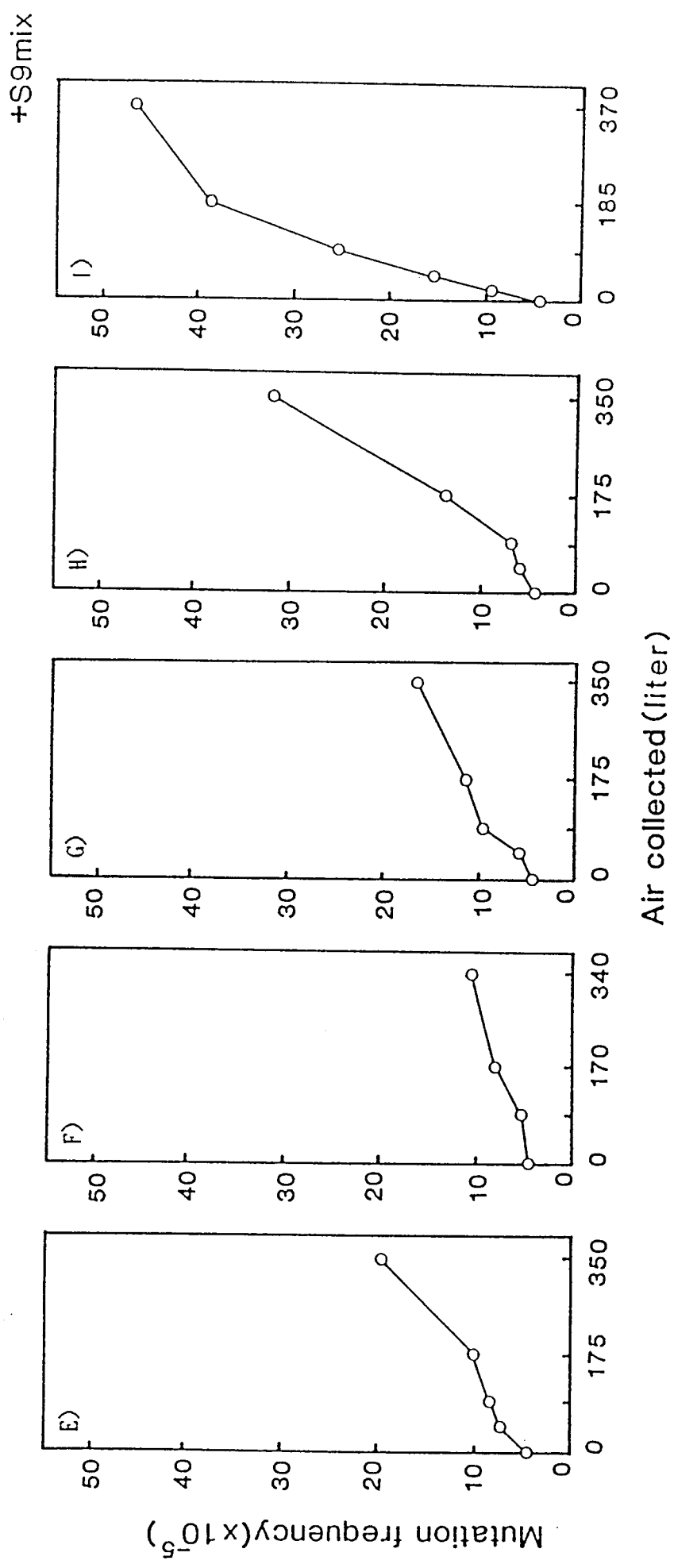


Fig.17 Mutation frequency of organic extracts from particulates collected by personal air samplers in Sagamihara and Tokyo in summer. E)-G):Non-smoker, H),I):Smoker

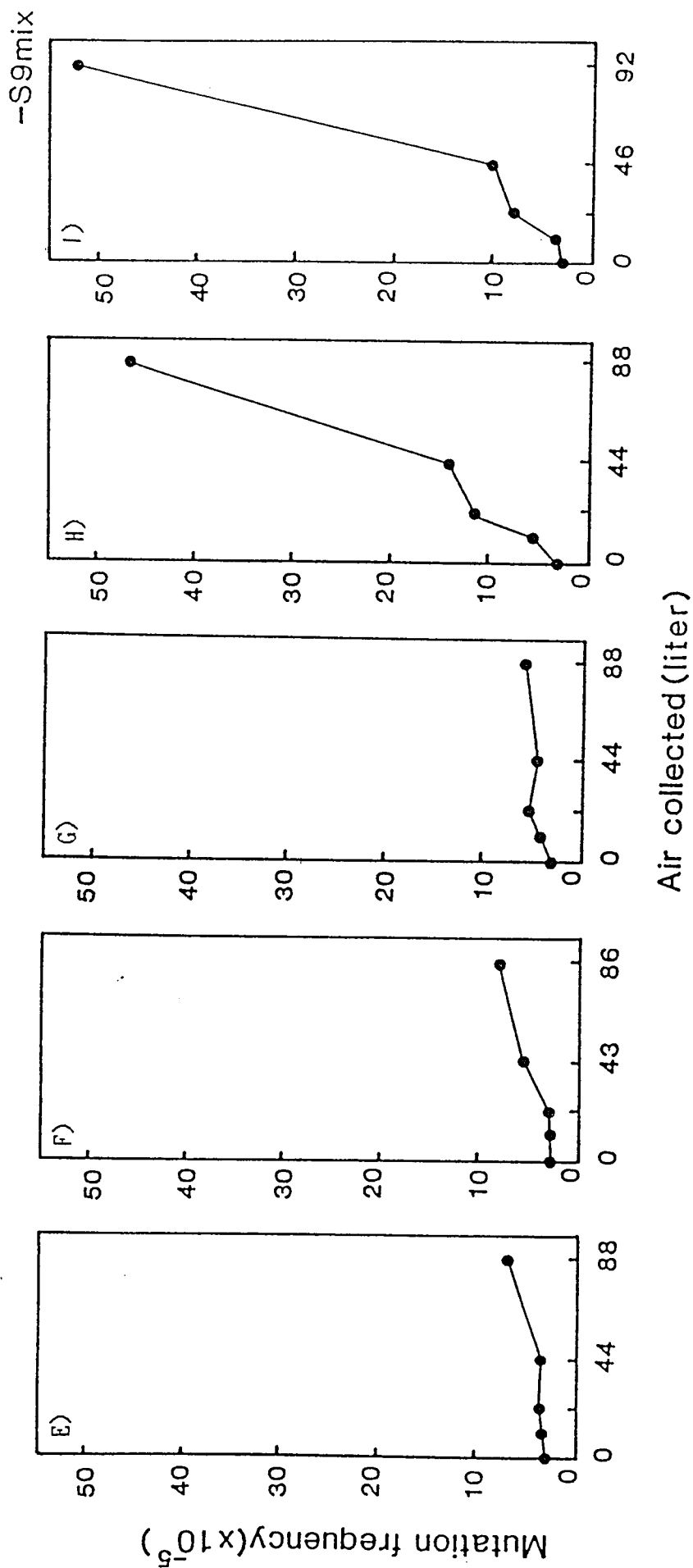


Fig.18 Mutation frequency of organic extracts from particulates collected by personal air samplers in Sagamihara and Tokyo in summer.
 E)-G):Non-smoker, H),I):Smoker

Table 1. Reproducibility of mutagenic activity of BaP(+S9mix)/ μg and 4NQO(-S9mix)/ng by the ultramicro forward-mutation assay.

| | <u>Specific mutation frequency($\times 10^{-3}$)*</u> | | | | | average | s.d.** | c.v.(%)*** |
|--------|--|------|------|------|------|---------|--------|------------|
| | <u>Number of test</u> | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| +S9mix | 2.39 | 2.24 | 2.45 | 3.08 | 2.40 | 2.51 | 0.33 | 13.1 |
| -S9mix | 1.10 | 0.89 | 0.84 | 1.00 | 0.90 | 0.95 | 0.10 | 10.5 |

*: Specific mutation frequency was calculated from the slope of the initial linear portion of each dose-response by least squares linear regression method.

**: Standard deviation

***: Coefficient of variation

Table 2. Reproducibility of mutagenic activity of 4NQO by the ultramicro forward-mutation assay.

| 4NQO(ng/vial) | Mutants/plate | Survivals/plate(average) | Mutation frequency($\times 10^{-5}$) |
|--------------------------|---------------------|--------------------------|--|
| 0.4 ng | 267 | 293, 271, 327 (297) | 37.5 |
| | 210 | 346, 328, 330 (335) | 26.1 |
| | 237 | 333, 325, 323 (327) | 30.2 |
| | 249 | 311, 317, 290 (306) | 33.9 |
| | 220 | 313, 333, 323 (323) | 28.4 |
| average \pm s.d., c.v. | 237 \pm 23 9.7% | (318 \pm 16), 5.0% | 31.2 \pm 4.5, 14.4% |
| 0.2 ng | 127 | 274, 260, 323 (285) | 18.6 |
| | 101 | 319, 320, 307 (315) | 13.4 |
| | 92 | 305, 292, 280 (292) | 13.1 |
| | 127 | 344, 350, 293 (329) | 16.1 |
| | 119 | 318, 305, 345 (323) | 15.4 |
| average \pm s.d., c.v. | 113 \pm 16, 14.2% | (309 \pm 19), 6.0% | 15.3 \pm 2.2, 14.3% |
| 0.1 ng | 85 | 325, 249, 342 (305) | 11.6 |
| | 86 | 337, 344, 306 (329) | 10.9 |
| | 67 | 330, 306, 307 (314) | 8.9 |
| | 74 | 280, 285, 307 (291) | 10.6 |
| | 70 | 366, 333, 283 (327) | 8.9 |
| average \pm s.d., c.v. | 76 \pm 9, 11.8% | (313 \pm 16), 5.1% | 10.2 \pm 1.2, 11.8% |
| 0 (DMSO) | 16 | 275, 279, 299 (284) | 2.3 |
| | 16 | 287, 321, 287 (298) | 2.2 |
| | 18 | 322, 314, 351 (329) | 2.3 |
| | 19 | 278, 266, 326 (290) | 2.7 |
| | 19 | 311, 295, 299 (302) | 2.6 |
| average \pm s.d., c.v. | 18 \pm 2, 11.1% | (301 \pm 17), 5.6% | 2.4 \pm 0.2, 8.3% |

s.d.: Standard deviation, c.v.: Coefficient of variation

Table 3. Comparison of sensitivity of three mutagenicity assays for airborne particulate extracts in Sagami-hara.

| | Minimum detectable amount(μg)* | | | |
|--------|---|----------------------------------|---------------------------------------|------|
| | Ultramicro <u>forward-mutation</u> | Micro <u>forward-mutation</u> | Ames method <u>(preincubation)</u> | |
| | TM677 | TM677 | TA100 | TA98 |
| +S9mix | 3 | 31 | 205 | 169 |
| -S9mix | 2 | 18 | 160 | 103 |

*:Amount of airborne particulate extract which gives twice response of control

Table 4. Reproducibility of mutagenic activity of airborne particulate extracts in Sagamihara by the ultramicro forward-mutation assay.

| | <u>Specific mutation frequency($\times 10^{-5}$) of extract(μg)*</u> | | | | | average | s.d.** | c.v.(%)*** |
|--------|---|------|------|------|------|---------|--------|------------|
| | <u>Number of test</u> | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| +S9mix | 1.43 | 1.20 | 1.12 | 1.00 | 1.33 | 1.22 | 0.17 | 13.9 |
| -S9mix | 6.02 | 6.60 | 5.73 | 5.25 | 4.77 | 5.67 | 0.70 | 12.3 |

*: Specific mutation frequency was calculated from the slope of the initial linear portion of each dose-response by least squares linear regression method.

**: Standard deviation

***: Coefficient of variation

Table 5. Reproducibility of mutagenic activity of airborne particulate extracts in Sagami-hara by the micro forward-mutation assay.

| | <u>Specific mutation frequency($\times 10^{-5}$) of extract(μg)*</u> | | | | | average | s.d.** | c.v.(%)*** |
|--------|---|------|------|------|------|---------|--------|------------|
| | <u>Number of test</u> | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| +S9mix | 10.3 | 10.8 | 8.72 | 11.7 | 9.54 | 10.2 | 1.2 | 11.8 |
| -S9mix | 14.1 | 17.9 | 15.9 | 17.4 | 14.2 | 15.9 | 1.8 | 11.3 |

*: Specific mutation frequency was calculated from the slope of the initial linear portion of each dose-response by least squares linear regression method.

** : Standard deviation

*** : Coefficient of variation

Table 6 Mutagenicity of airborne particulates obtained at living rooms of 3 homes in Hong Kong.

| Home | Date | Air vol.(m ³) | Mutation frequency($\times 10^{-4}$)/m ³ | | | |
|------|-------|---------------------------|---|-------------------|--------|------------------|
| | | | +S9mix | | -S9mix | |
| A | 10-14 | 28.8 | 7.76 | * ** | 1.22 | * ** |
| | 10-15 | 28.8 | 2.30 | 10.82 \pm 10.39 | 2.56 | 5.11 \pm 5.61 |
| | 10-16 | 28.8 | 22.40 | | 11.54 | |
| B | 10-17 | 28.8 | 8.72 | | 4.60 | |
| C | 10-25 | 28.8 | 10.40 | * ** | 29.96 | * ** |
| | 10-26 | 28.8 | 4.96 | 5.62 \pm 3.32 | 17.88 | 23.64 \pm 5.22 |
| | 10-27 | 28.8 | 4.38 | | 25.40 | |
| | 10-28 | 28.8 | 2.74 | | 21.32 | |

Air vol.: Air volume, *: Average, **: Standard deviation

Table 7. Mutagenicity of indoor airborne particulates in Kawasaki.

| Place | Date | Air vol.(m ³) | Mutation frequency(x10 ⁻⁴)/m ³ | |
|-------------|------|---------------------------|---|--------|
| | | | +S9mix | -S9mix |
| Kitchen | 7-18 | 27.94 | 10.66 | 5.06 |
| | 7-19 | 27.94 | 15.40 | 13.06 |
| | 7-20 | 27.92 | 8.08 | 5.50 |
| | 7-21 | 27.92 | 7.34 | 8.80 |
| | 7-22 | 27.82 | 3.38 | 6.64 |
| | 7-23 | 28.28 | 7.48 | 8.42 |
| | 7-24 | 28.05 | 2.52 | 3.76 |
| Living room | 7-18 | 28.80 | 6.90 | 4.90 |
| | 7-19 | 28.76 | 18.42 | 6.24 |
| | 7-20 | 28.80 | 3.04 | 6.90 |
| | 7-21 | 28.80 | 3.90 | 13.02 |
| | 7-22 | 28.78 | 5.72 | 5.64 |
| | 7-23 | 29.00 | 14.36 | 11.04 |
| | 7-24 | 28.90 | 6.02 | 4.70 |
| Study room | 7-18 | 28.80 | 15.20 | 13.94 |
| | 7-19 | 28.28 | 9.42 | 8.34 |
| | 7-20 | 28.94 | 10.22 | 9.44 |
| Out door | 7-21 | 29.15 | 2.46 | 9.38 |
| | 7-22 | 29.19 | 1.18 | 12.00 |
| | 7-23 | 29.09 | 2.54 | 12.08 |
| | 7-24 | 29.03 | 2.76 | 4.02 |
| Dining room | 7-27 | 28.43 | 2.32 | 3.80 |
| | 7-28 | 28.54 | 2.44 | 1.88 |
| | 7-29 | 28.82 | 10.56 | 3.38 |
| | 7-30 | 28.50 | 3.00 | 10.20 |
| | 7-31 | 28.80 | 6.24 | 16.14 |
| | 8- 1 | 28.20 | 5.12 | 19.24 |
| | 8- 2 | 28.95 | 4.36 | 11.62 |

Air vol.: Air volume, *: Average, **: Standard deviation

Table 8. Hourly variation of mutagenicity of airborne particulates in Tokyo.

| Time of day | Mutation frequency($\times 10^{-4}$) per m^3 air | | Number of cigarette smoked | Number of person | Exhaust fan on or off | | |
|-------------|---|--|----------------------------|------------------|-----------------------|----|-----|
| | $\frac{\text{Indoor}}{+S9mix}$ | $\frac{\text{Outdoor}}{-S9mix -S9mix}$ | | | | | |
| 19-21 | 41.41 | 33.74 | 29.37 | 60.02 | 6 | 7 | on |
| 21-23 | 45.62 | 33.91 | 25.58 | 35.68 | 2 | 3 | on |
| 23-1 | 21.58 | 41.13 | 8.00 | 21.20 | 3 | 2 | on |
| 1-3 | 12.80 | 39.36 | 13.93 | 41.14 | 2 | 2 | on |
| 3-5 | 8.17 | 13.10 | 13.21 | 14.67 | 0 | 1 | on |
| 5-7 | 18.47 | 14.74 | 8.68 | 10.83 | 0 | 0 | on |
| 7-9 | 15.02 | 99.37 | 64.17 | 47.46 | 3 | 2 | on |
| 9-11 | 52.09 | 212.57 | 46.83 | 42.54 | 6 | 13 | on |
| 11-13 | 9.92 | 66.86 | 12.06 | 9.76 | 5 | 12 | on |
| 13-15 | 12.23 | 36.38 | 3.13 | 2.71 | 3 | 3 | off |
| 15-17 | 34.19 | 54.10 | 3.90 | 23.23 | 3 | 8 | off |
| 17-19 | 43.40 | 140.20 | 14.27 | 58.24 | 3 | 7 | off |

Table 9. Mutagenicity of indoor airborne particulates in Tokyo.

| Number of test | Mutation frequency($\times 10^{-4}$)/m ³ | | | |
|-------------------|---|--------|--------|--------|
| | +S9mix | | -S9mix | |
| | Blank | 10cig. | Blank | 10cig. |
| 1 | 8.0 | 183.1 | 9.7 | 618.4 |
| 2 | 16.4 | 180.9 | 13.6 | 760.0 |
| Average | 11.7 | 182.0 | 11.7 | 689.2 |

10cig.: 10 cigarettes smoked

Table 10. Mutagenicity and PAH concentration of indoor airborne particulates in Tokyo.

| Sample | M.f. (X10 ⁻⁴)/m ² -S9mix | Concentration(ng/m ³) | | |
|-----------------------|--|-----------------------------------|------|-------|
| | | BkF | BaP | BghiP |
| A1 (Blank) | 71 | 0.49 | 0.75 | 1.35 |
| A2 (10 cig.) | 960 | 2.59 | 9.49 | 11.08 |
| A3 (Air cleaner on) | 630 | 1.90 | 7.33 | 9.37 |
| A4 (Air cleaner on) | 170 | 0.41 | 1.38 | 1.92 |
| A5 (Air cleaner on) | 62 | 0.20 | 0.31 | 0.53 |
| A6 (Air cleaner on) | 31 | 0.23 | 0.31 | 0.42 |
| A7 (Blank) | 15 | 0.16 | 0.21 | 0.36 |
| A8 (10 cig.) | 810 | 2.83 | 9.05 | 11.08 |
| A9 (Air cleaner off) | 570 | 2.23 | 8.57 | 10.51 |
| A10 (Air cleaner off) | 400 | 1.04 | 3.74 | 5.49 |
| A11 (Air cleaner off) | 290 | 0.46 | 1.45 | 2.63 |
| A12 (Air cleaner off) | 94 | 0.30 | 0.58 | 1.00 |

10 cig.: 10 cigarettes smoked M.f.: Mutation frequency
A2 and A8 air samples were collected during machinery smoking of 10 cigarettes according to the International smoking mode.
(Sampling time: 1 hr, smoking time: about 50min)

Table 11 Mutagenicity of organic extracts from particulates collected by personal air samplers in Sagamihara and Tokyo in winter.

| Sample | Mutation frequency($\times 10^{-4}$)/m ³ | |
|--------|---|--------|
| | +S9mix | -S9mix |
| A | 1.4 | 6.7 |
| B | 7.2 | 20.8 |
| C | 13.3 | 60.6 |
| D | 33.9 | 105.7 |

Table 11 Mutagenicity of organic extracts from particulates collected by personal air samplers in Sagamihara and Tokyo in winter.

| Sample | Mutation frequency($\times 10^{-4}$)/m ³ | |
|--------|---|--------|
| | +S9mix | -S9mix |
| A | 1.4 | 6.7 |
| B | 7.2 | 20.8 |
| C | 13.3 | 60.6 |
| D | 33.9 | 105.7 |

Table 12. Mutagenicity of organic extracts from particulates collected by personal air samplers in Sagamihara and Tokyo in summer.

| Sample | Mutation frequency($\times 10^{-4}$)/m ³ | |
|--------|---|--------|
| | +S9mix | -S9mix |
| E | 3.0 | 0.5 |
| F | 1.4 | 3.5 |
| G | 2.6 | 1.4 |
| H | 6.0 | 33.4 |
| I | 14.1 | 35.6 |

Table 13. Mutagenicity of organic extracts from particulates collected by personal sampler in Tokyo in winter.

| Sample/date | Mutation frequency($\times 10^{-4}$)/m ³ -S9mix | | | | | | | | | | |
|-------------|---|----------|----------|----------------|----------|----------|----------|--|--|--|--|
| | 12/15-16 | 12/16-17 | 12/17-18 | 12/18-19 | 12/19-20 | 12/20-21 | 12/21-22 | | | | |
| J | 74.7 | 66.6 | 27.0 | 39.3 | 58.7 | 47.5 | 25.3 | | | | |
| K | 156.0 | 49.1 | 56.1 | * 48.4±17.7 | 96.2 | 113.0 | 61.0 | | | | |
| | | | | ** 31.9 | | | | | | | |
| L | 53.6 | 59.3 | 104.0 | * 81.1±40.7 | 130.0 | 129.0 | 9.2 | | | | |
| | | | | ** 56.9 | | | | | | | |
| M | 5.1 | 8.9 | 16.9 | * 77.3±41.5 | 6.8 | 2.0 | 4.5 | | | | |
| | | | | ** 1.1 | | | | | | | |
| N | 6.1 | 4.5 | 12.5 | * 6.5±4.9 | 1.6 | 5.1 | 5.0 | | | | |
| | | | | ** 6.1 | | | | | | | |
| O | 5.2 | 13.3 | 7.5 | * 5.8±3.1 | 3.1 | 4.1 | 9.1 | | | | |
| | | | | ** 3.1 | | | | | | | |
| P | 3.1 | 21.6 | 18.8 | * 6.5±3.5 | 6.8 | 9.2 | 10.2 | | | | |
| | | | | ** 9.0 | | | | | | | |
| | | | | * 11.2±6.1 | | | | | | | |

*:Average, **:Standard deviation