防腐剤クレオソートによる 室内空気汚染と毒性評価

伏脇 裕一¹⁾, 森 康明¹⁾, 中島 大介²⁾, 後藤 純雄²⁾, 小野寺祐夫³⁾

¹⁾神奈川県衛生研究所 (〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋1-3-1)

²⁾国立環境研究所 (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

³⁾東京理科大学薬学部 (〒278-8510 千葉県野田市山崎2641)

[平成15年10月27日受理]

Environmental Toxicology Evaluation of Creosote as a Preservative

Yuichi FUSHIWAKI¹⁾, Yasuaki MORI¹⁾, Daisuke NAKAJIMA²⁾,
Sumio GOTO²⁾ and Sukeo ONODERA³⁾

¹⁾Kanagawa Prefectural Institute of Public Health
(1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253-0087)

²⁾National Institute for Environmental Studies
(16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506)

³⁾Tokyo University of Science
(2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510)

[Received October 27, 2003]

Summary

The concentrations and toxicological evaluation of indoor air pollution by creosote were investigated. In survey of houses where creosote was used as a preservative, total concentrations of seven principal ingredients of creosote ranged from 16 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ to 160 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. The cell proliferation obstruction rates for the samples extracted from indoor air of the living rooms in three houses ranged from 7.4 % to 15 %. These obstruction rates were higher than those estimated from the obstruction capabilities of ingredients of creosote in the levels found in the indoor airs, suggesting that there are other obstruction factor in indoor air samples. In a model box experiment in which a piece of wood painted with creosote was placed, both creosote concentrations and cell proliferation obstruction rates in air increased by increasing air temperature. No mutagenicity was detected in any of the seven ingredients of creosote within the range of the concentrations used in the experiment. Thus, the bioassay methods and the chemical analysis were both essential to evaluate the toxicity of creosote in indoor air exactly.

Key words: creosote, preservative, indoor air, cytotoxicity, Ames test

1. はじめに

建築資材等から放出されるホルムアルデヒド、トルエン等の化学物質や家庭内で使用されているナフタレン、*p*-ジクロロベンゼン等の防虫剤などの化学物質は、シックハウス症候群、化学物質過敏症、アレルギー症状等の健康障害の原因物質として社会的に注目されている。そこで、室内環境中での化学物質の汚染実態の把握のための調査が全国的に実施されている^{1,2)}。また、厚生労働省では化学物質の室内環境濃度の指針値を設定して、シックハウス対策を講じ始めている。しかし、現在行われている化学分析だけの調査では二百数十種類程存在すると言われている室内環境汚染化学物質を測定することは実際のところ不可能に近い。さらに、室内環境由来の化学物質による複合影響等の環境毒性評価は行われていないのが現状である。一方、室内環境汚染化学物質の中で発がん性等が疑われている防腐剤のクレオソートについては、欧米においては土壤汚染や地下水汚染が問題視されており^{3,7)}、また魚類への影響も指摘されているが⁸⁻¹⁰⁾、その汚染実態や人への影響等毒性学的な知見については十分に明らかにされていない。そこで、本研究においてはクレオソートを使用している住宅の室内環境濃度を測定すると共にバイオアッセイ法の一つとして培養細胞を用いた細胞増殖阻害性と変異原性を明らかにした。さらに、クレオソートが塗布された木片を用いたモデル実験を行いこれらの結果と併せて、クレオソートによる室内環境汚染の安全性の評価を試みた。

2. 実験方法

2. 1 調査対象室内環境汚染化学物質

クレオソートの主成分であるナフタレン、2-メチルナフタレン、ビフェニル、アセナフテン、フルオレン、フェナンスレン、アントラセンの7物質を調査対象とした。

2. 2 クレオソート使用住宅調査

防腐剤としてクレオソートを塗布した建材により住民が頭痛などの被害が発生した集合住宅の3住戸について、石英フィルター (QMA, Whatman) と Empore Disk SDB-XD を積層し、1500m³/min の速度で1階居間中央部の床上部分の空気を10m³以上採取した。この試料はGC/MSによるクレオソート成分濃度の測定と細胞増殖阻害性試験に供した。

2. 3 室内環境汚染化学物質の定量方法

空気を採取した Empore Disk SDB-XD をアセトンで湿潤することでクレオソート成分を抽出した後、1~5m³に濃縮した。定量はGC/MS装置を用いてSIM法で

行った。測定イオンは、ナフタレン (m/z128, 102), 2-メチルナフタレン (m/z142, 115), ビフェニル (m/z154, 153), アセナフテン (m/z153, 76), フルオレン (m/z166, 82), フェナンスレン (m/z178, 76), アントラセン (m/z178, 89) である。

2. 4 モデルボックスからのクレオソート成分の採取方法

ステンレス製モデルボックス (30×36×25cm) に、クレオソートが木片 (10×30×3cm) 1枚の片面に塗布されたものを置き密封した後、活性炭フィルターを通した空気を一定時間所定の温度で循環させることにより、10m³以上の空気を Empore Disk SDB-XD に採取した。この試料はGC/MSによるクレオソート成分濃度の測定、変異原性試験及び細胞増殖阻害性試験に供した。

2. 5 エームズ変異原性試験¹¹⁾

採取に用いた Empore Disk SDB-XD をアセトンで溶出した後、適宜濃縮しマイクロサスペンション法を用い、菌株として *S. typhimurium* TA98とTA100を使用し代謝活性時と非代謝活性時の条件下で行った。

2. 6 細胞増殖阻害性試験¹²⁾

24穴マルチプレートにDME/F12+1% ITES+2% FCS培地を用いてBALB/3T3 31-1-1細胞を5×10⁴cells/mlになるように調製した細胞浮遊液を0.5mlずつ播種した。24時間経過後濃縮した室内環境試料または室内環境汚染化学物質を添加した培地と交換した。播種3日後にホルマリンで固定した。クリスタルバイオレット法で染色後吸光度を測定し、その細胞数をコントロール群と比較して増殖阻害率を算出した。

3. 結果および考察

3. 1 集合住宅における室内環境調査結果

集合住宅3住戸について居間におけるクレオソート成分の測定結果をTable 1に示す。

クレオソートの主成分7物質の合計濃度ではC戸が160μg/m³と最も高く、次いでB戸130μg/m³、A戸16μg/m³の順であった。A戸の濃度が低かったのは、A戸のみ床下で測定したため、一階のすべての床下が構造上通じている状態となっていることから外気により希釈されたものと推察された。7物質の中ではC戸の2-メチルナフタレンが74μg/m³と最も高かった。AおよびB戸ではフルオレンがそれぞれ4.2μg/m³、35μg/m³、次に2-メチルナフタレンがそれぞれ3.3μg/m³、35μg/m³と高かった。ここで、調査した3住戸について室内空気的安全性の評価を試みた。ビフェニルについては、一日摂取許容量が0.125mg/kg/dayに設定されていることから、

この数値を基準として評価すると、体重50kgの人が一日15m³の空気を呼吸すると仮定したとき、一日摂取許容量に相当する室内濃度は $0.125 \times 50 \div 15 = 0.42 \text{ mg/m}^3$ (420 $\mu\text{g/m}^3$) となり、今回調査した最も高いビフェニルの室内濃度28 $\mu\text{g/m}^3$ (C 戸) では一日摂取許容量の約15分の1となる。したがって、ビフェニルについては特に問題となる値ではないことが判明した。しかし、他のクレオソート成分については、それらの物質の室内環境指針値等が定められていないことから、安全性の評価は困難である。今のところ対策としては、健康管理上できるだけそれらの濃度の低減化に努めることが必要である。一方、環境毒性面でのその汚染質を評価するための一手法として培養細胞を用いた増殖阻害性試験による検討を行った。3住戸における居間の室内空気を濃縮した場合の細胞増殖阻害率は7.4%から15%の範囲でそれぞれ増殖阻害が認められた。また、各クレオソート成分の細胞増殖阻害率を Table 2 に示す。各クレオソート成分の10ppm 暴露濃度で細胞増殖阻害率が13%から21%の範囲であり、その中でアセナフテンの細胞増殖阻害率が最も高かった。個々の化学物質単独で細胞増殖阻害性が認められる濃度は mg/l のオーダーである。一方、室内で検出された個々の化学物質濃度は数～数十 ppb のオーダーと比較的低濃度であるにもかかわらず、その濃度において細胞増殖阻害が認められたことになる。このことは、細胞増殖阻害は化学物質単独によって現れたのではなく、クレオソート成分及びそれ以外の室内環境汚染化学物質の複合的な影響によるものと推定される。本研究において、細胞増殖阻害性がクレオソート成分及び住居室内環境で認められたが、人への毒性面での影響がどのようなかたちで現われるのかの評価は明らかにできなかった。

3. 2 モデルボックス試験におけるクレオソート成分濃度

室内環境中における化学物質濃度は、住まわれている環境特に室温に影響されると考えられる。そこでクレオソートが塗布されたモデルボックスを用いて、そのモデ

Table 1 Principal ingredient concentration of creosote ($\mu\text{g/m}^3$)

Chemical	A	B	C
Naphthalene	1.3	13	14
2-methylnaphthalene	3.3	35	74
Biphenyl	2.4	22	28
Acenaphthene	2.6	24	22
Fluorene	4.2	35	20
Phenanthrene	0.84	0.60	3.0
Anthracene	0.98	0.81	3.4

ルボックスをインキュベータ内に設置し10℃、20℃および30℃の条件下で発生したクレオソート成分の濃度変化を検討した。それらの結果を Table 3 から 5 に示す。20℃ のモデルボックス中のクレオソート成分濃度は、10℃の時の濃度と比べて0.6から2.9倍になり、30℃のクレオソート成分濃度は、20℃の時の0.7から2.4倍を示した。フルオレンの20℃の濃度が10℃のそれと比べて低くなり、30℃で濃度の上昇がみられていたりするが、6物質のトータルで比較すると、10℃の時のトータル濃度は8.9 $\mu\text{g/m}^3$ 、20℃で16 $\mu\text{g/m}^3$ 、30℃で17 $\mu\text{g/m}^3$ と気中濃度は温度の上昇に伴い増加する傾向が示唆された。したがって、クレオソート成分は温度の上昇に伴って揮散し、気中の濃度を高めたものと考えられた。

3. 3 モデルボックス試験におけるクレオソートの細胞毒性

クレオソートが塗布されているモデルボックスを用いて、その空気の10m³以上を採取した試料について、その細胞増殖阻害率の用量反応曲線の一例を Fig. 1 に示す。そのままの試料では100%の阻害率を、2倍希釈では99%の阻害率を示したが、その後は良好な用量反応関係

Table 2 Cell proliferation obstruction rate of chemicals

Chemical	Obstruction (%)
Naphthalene	18
2-methylnaphthalene	13
Biphenyl	17
Acenaphthene	21
Fluorene	17
Phenanthrene	16
Anthracene	14

Table 3 Concentration of principal ingredient in creosote at 10℃

Chemical	Concentration ($\mu\text{g/m}^3$)
Naphthalene	1.7
2-methylnaphthalene	2.3
Biphenyl	1.9
Acenaphthene	1.6
Fluorene	1.3
Phenanthrene	0.1
Amount of air collection:16400L	

が得られた。

各種温度条件下でのモデルボックス試験におけるクレオソートの細胞増殖阻害率を Table 6 に示す。Table 6 より温度の上昇に従って増殖阻害率が上昇していった。このことは温度の上昇に伴ってクレオソート成分が揮散して細胞増殖に影響を与えたためと考えられた。

クレオソート成分の標準品と住環境試料では細胞毒性が認められたが、クレオソート各成分の濃度範囲では TA98 及び TA100 両菌株による Ames 変異原性は示さなかった。

今すぐに、高等生物への影響が現れるわけではないが、今後も生物に対する影響を注視することが必要である。今回の研究において、室内環境試料中の各種の化学物質濃度は高濃度を示してはいなかったが、住環境試料では細胞への増殖阻害としてその影響が現れていることから、環境質の評価にバイオアッセイ手法も加えて評価することが必要であることが示唆された。

4. おわりに

クレオソートに関する室内環境汚染実態とその成分の毒性についての研究から、以下の結果が得られた。

1. 防腐剤としてクレオソートを使用していた集合住宅

Table 4 Concentration of principal ingredient in creosote at 20℃

Chemical	Concentration($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Naphthalene	5.0
2-methylnaphthalene	5.4
Biphenyl	3.1
Acenaphthene	1.9
Fluorene	0.8
Phenanthrene	0.1
Amount of air collection:11600L	

Table 5 Concentration of principal ingredient in creosote at 30℃

Chemical	Concentration($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Naphthalene	3.6
2-methylnaphthalene	5.0
Biphenyl	3.2
Acenaphthene	2.6
Fluorene	1.9
Phenanthrene	0.2
Amount of air collection:15900L	

の調査では、クレオソートの主成分 7 物質についての合計濃度は $16\mu\text{g}/\text{m}^3$ から $160\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲であった。

2. 各クレオソート成分の 10ppm 暴露濃度で細胞増殖阻害率が 13% から 21% の範囲であった。
3. 3 住戸における居間の室内空気を濃縮した場合の細胞増殖阻害率は 7.4% から 15% の範囲であった。細胞増殖阻害は化学物質単独によって現れたのではなく、クレオソート成分及びそれ以外の室内環境汚染化学物質の複合的な影響によるものと推定された。
4. クレオソートが塗布された木片をモデルボックスに挿入した後、そのモデルボックスをインキュベータ内に設置し 10℃、20℃ および 30℃ の条件下で発生したクレオソート成分の濃度変化を検討したところ、クレオソート成分の気中濃度は温度の上昇に伴い増加する傾向が示唆され、クレオソート成分は温度の上昇に伴って揮散し、気中濃度を高めたものと考えられた。同様に細胞増殖阻害性についても温度の上昇に従って増殖阻害率が上昇した。
5. TA98 と TA100 の両株を用いた Ames 変異原性試験では、クレオソート各成分の濃度範囲では変異原性を示さなかった。
6. 室内環境汚染質の評価には、バイオアッセイ法を併用することにより、化学物質測定のための評価では不十

Fig. 1 Cell proliferation obstruction rate of creosote

Table 6 Cell proliferation obstruction rate of creosote at temperature

Temp.(℃)	Cell proliferation obstruction rate(%)
10	12
20	15
30	16

分なものが、より詳細に評価できるようになる。

謝 辞

本研究は2000年度大同生命財団による研究助成により行われた。ここに記して感謝致します。

要 約

クレオソートに関する室内環境汚染実態とその成分の毒性についての研究を行った。防腐剤としてクレオソートを使用していた集合住宅の調査では、クレオソートの主成分7物質が検出された。また、細胞増殖阻害が住戸における居間の室内空気について認められた。

クレオソートが塗布された木片をモデルボックスに挿入した実験において、各種温度条件下で発生したクレオソート成分の濃度変化を検討したところ、クレオソート成分の気中濃度は温度の上昇に伴い増加する傾向にあった。同様に細胞増殖阻害性についても温度の上昇に従って増殖阻害率が上昇した。しかし、Ames 変異原性試験では、クレオソート各成分の濃度範囲では変異原性を示さなかった。室内環境汚染質の評価には、バイオアッセイ法を併用することにより、化学物質測定のための評価では不十分なもの、より詳細に評価できるようになる。

文 献

- 1) 森 康明, 伏脇裕一, 節田節子, 後藤純雄, 小野寺祐夫, 松下秀鶴: 酸化チタン光触媒空気清浄機による室内空気中の揮発性有機化合物の除去効果, 室内環境学会誌, **3**, 13-21 (2000)
- 2) 森 康明, 辻 清美, 長谷川一夫: 住宅における揮発性有機化合物 (VOCs) 濃度の推移, 神奈川県衛生研究所報告, **31**, 109-111 (2001)
- 3) Sayles, G.D., Acheson, C.M., Brenner, R.C., Kupferle, M.J., Shan, Y., Zhou, Q., Meier, J.R. and Chang, L.: Land treatment of PHA-contaminated soil: Performance measured by chemical and toxicity assays. *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 4310-4317 (1999)
- 4) Phillips, T.M., Lee, H., Trevors, J., Liu, D. and Seech, A.G.: Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 132-139 (2000)
- 5) Ozretich, R.J., Ferraro, S.P., Lamberson, J.O. and Cole, F.A.: Test of Σ polycyclic aromatic hydrocarbon model at a creosote-contaminated site, Elliott Bay Washington, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 2378-2389 (2000)
- 6) Johansen, S.S., Arvin, E. and Mosbaek, H.: Heteroaromatic compounds and their biodegradation products in creosote contaminated groundwater. *Toxicol. Environ. Chem.*, **66**, 195-228 (1998)
- 7) Hyoetylaeinen, T. and Oikari, A.: Assessment of toxicity hazards of dredged lake sediment contaminated by creosote. *Sci. Total Environ.*, **243/244**, 97-105 (1999)
- 8) Hyoetylaeinen, T. and Oikari, A.: Assessment of the bioactivity of creosote-contaminated sediment by liver biotransformation system of rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **44**, 253-258 (1999)
- 9) Whyte, J.J., Herbert, K.L., Karrow, N.A., Dixon, D.G., Sivak, J.G. and Bols, N.C.: Effect of maintaining rainbow trout in creosote microcosms on lens optical properties and liver 7-Ethoxyresorufin-o-deethylase activity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **38**, 350-356 (2000)
- 10) Karrow, N.A., Dixon, D.G., Whyte, J.J., Bols, N.C., Boermans, H.J., Solomon, K.R. and Hontella, A.: Characterizing the immunotoxicity of creosote to rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*): a microcosm study. *Aquatic Toxicol.*, **45**, 223-239 (1999)
- 11) Mori, Y., Onodera, S., Takitani, S. and Matsushita, H.: A simple and sensitive method for detection of mutagens in water by a combination of solid phase extraction and microsuspension procedure. *J. Environ. Chem.*, **3**, 561-569 (1993)
- 12) 伏脇裕一: 平成13年度環境省請負業務結果報告書 水環境有害性総合指標検討調査, pp139 (2002)