衛生化学
EISEI KAGAKU
32 (5) 344-349 (1986)

アスファルトタールによるベンゾ[*a*]ピレンの変異活性抑制作用
ベンゾ[*a*]ピレン-3-水酸化酵素の阻害

玉川勝美,^a 三島靖子,^a 関 敏彦,^a 角田 行,^a
久松由東,^b 松下秀鶴^b
仙台市衛生試験所,^a 国立公衆衛生院^b

Inhibitory Effect of Mutagenic Activity of Benzo[*a*]pyrene by
Asphalt Tar Inhibition of Benzo[*a*]pyrene-3-Hydroxylase

KATSUMI TAMAKAWA,^a YASUKO MISHIMA, TOSHIHIKO SEKI,^a
AKIRA TSUNODA,^a YOSHIHARU HISAMATSU,^b
and HIDETSURU MATSUSHITA^b

Sendai Municipal Institute of Public Health,^a 2-5-10, Oroshimachi-higashi,
Sendai 983, Japan and National Institute of Public Health,^b 4-6-1,
Shiroganedai, Minatoku, Tokyo 108, Japan

(Received March 12, 1986)

The effects of asphalt tar and its components on the mutagenic activity of benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) were studied. The mutagenic activity of B[*a*]P was inhibited significantly by the addition of asphalt tar and its components especially by those containing neutral polycyclic aromatic hydrocarbon which was obtained by the fractionation according to the method of Hoffmann *et al.*

The above effects seemed to be due to the inhibition of the activating enzyme of B[*a*]P and it was demonstrated that the activity of B[*a*]P-3-hydroxylase was inhibited strongly by the neutral polycyclic aromatic hydrocarbon fraction of the asphalt tar in a competitive manner ($K_i=4 \mu\text{g/ml}$).

Keywords—asphalt tar; neutral polycyclic aromatic hydrocarbon; *S. typhimurium* TA98; benzo[*a*]pyrene; mutagenicity; benzo[*a*]pyrene-3-hydroxylase; competitive inhibition

はじめに

寒冷地における冬期のスパイクタイヤ粉塵公害は現在、大きな社会問題となってきた。特に、粉塵に含まれるアスファルト微粒子が発癌性など人の健康に重大な危険性を有しているのではないかと危がされている。

一般に、大気浮遊粉塵の場合には benzo[*a*]pyrene [以下 B[*a*]P と略する] 濃度は benzo(*ghi*)perylene や perylene など、他の多環芳香族炭化水素濃度との間に良好な相関関係があるといわれ、¹⁾ また、変異原性との間にも相関性のあることが報告されている。¹⁾

前報²⁾で、著者らは、仙台市内の夏と冬の道路堆積土砂について、その B[*a*]P 含有量と変異原性について検討を行った。

その結果、仙台市の堆積土砂の場合には土砂単位重量当たりの B[*a*]P 含有量は冬の方が夏より高いが、変異活性では逆に夏の方が高く、季節間では負の相関関係にあることを認めた。

その原因のひとつとして冬期の土砂にアスファルトタールが大量に含まれており、これが B[*a*]P 等の変異活性を抑制している可能性が示唆された。

また、アスファルトタールによる変異原性の抑制作用は、直接変異原である AF-2 には認められず、間接変異原である B[*a*]P にのみ認められたことから、S9 の活性阻害が原因のひとつと考えられた。

そこで、本報ではアスファルトタールによるこの B[*a*]P の変異活性の抑制作用について解析を試みた。

実験方法

1. 試薬類及び試料 試料としては、密粒度アスファルトコンクリート（加熱合材，ストレートアスファルト）を用いた。

アスファルトコンクリートからのアスファルトタールの抽出には、和光純薬工業製、残留農業分析用ベンゼン及びエタノールを用いた。分画用のシリカゲルは Wakogel S-1（和光純薬工業製）を用いた。ジエチルエーテルは過酸化物を含まない油脂試験用（関東化学製）を用いた。抽出したタールの溶解には和光純薬工業製のジメチルスルフォキシド（スペクトルゾール）（以下 DMSO と略する）を用いた。

変異原性試験用の S9 は、オリエンタル酵母より購入した。

変異原性試験用の陽性対照試薬としては、B[a]P（東京化成製）と AF-2（上野製薬製）を用いた。

B[a]P 水酸化酵素の活性測定に用いた試薬の内、硫酸キニーネ（特級）、牛血清アルブミンは和光純薬工業より、nicotineamide adenine dinucleotide phosphate, (reduced form) (NADPH) はオリエンタル酵母より購入した。

2. 器具及び装置 超音波発生装置（サニョウ SUW-150 型，BRAN-SONIC 12）蛍光分光光度計（日立 MPF-4 型）。

3. アスファルトタールの抽出 固体状のアスファルトコンクリート 50 g を粉碎後，ベンゼン-エタノール（3 : 1, v/v）500 ml を加え超音波抽出（20分）を行った。ろ紙（東洋ろ紙，2C）で吸引ろ過後，ろ過残さにベンゼン-エタノール（3 : 1, v/v）500 ml を加え，再度超音波抽出を行った。こうして得た2回分のろ液を合わせ 35—40℃ で減圧濃縮し，タールを得た（3.79 g）。

4. アスファルトタールの分画 Hoffmann と Wynder の方法³⁾（Fig. 1 参照）に従って，塩基性，酸性，中性の3つの画分及び不溶性画分に分画し，中性画分は更にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより，脂肪族，多環芳香族，含酸素族画分に分画した。各画分を減圧濃縮後，窒素気流により溶媒を除去，変異原性試験に供した。

5. 変異原性試験及び酵素実験用試料液の調製 アスファルトタール及び各タール画分の溶解は西村ら⁴⁾の方法に従って行った。

すなわち，タールにジエチルエーテル（1 ml/0.1 g タ

Fig. 1. Fractionation Procedure of Asphalt Tar

ール)を加え超音波処理(室温, 3分)し, タールを均一に分散させた. これに DMSO (1 ml/0.1 g タール)を加えよく攪拌した後, ロータリーエバポレーター (35—40°C)によりジエチルエーテルを留去した. この際, DMSO 不溶性のタールは濃縮容器の壁面に付着したので, DMSO 可溶性成分のみを DMSO で段階的に希釈し, 変異原性試験及び酵素実験用の試料として用いた.

6. 変異原性試験 試験菌株は *S. typhimurium* TA98 及び TA100 (以下 TA98 及び TA100 と略する)を用いた. 変異原性試験は Ames ら⁵⁾の方法を一部改良した矢作ら⁶⁾のプレインキュベーション法により行った. 各試料について2回ずつ行いその平均をとった.

7. 生菌数の測定 変異原性試験用の前培養液に寒天 (15 µg/l)を加えアガープレートの調製を行った.

生菌数の測定の際にはこれを変異原性試験のアガープレートの代わりに用い, 通常の変異原性試験と同様の操作を行い出現したコロニー数を測定した. 菌は滅菌した 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で 10^6 倍に希釈したものを用いた.

8. 蛋白質の定量法 牛血清アルブミンを標準蛋白質として用い, Lowry ら⁷⁾の方法により定量を行った.

9. B[a]P 水酸化酵素の活性測定法 Nebert ら⁸⁾の方法に準じた.

この方法は生成する 3-水酸化ベンゾ[a]ピレン (以下 3-OH-B[a]P と略する)の量を蛍光測定するものである.

反応系としては, トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 50 µmol, 塩化マグネシウム 3 µmol, 牛血清アルブミン 0.5 mg, NADPH 0.36 µmol, B[a]P 0.4—400 nmol, S9 蛋白質 23 µg を含み, 阻害実験の際にはこれに 0.1 ml のタールの試料液を加え合計 1.2 ml とした. S9 は 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を用い 100 倍に希釈し実験に供した.

はじめに B[a]P を除く反応混液を 37°C で5分間プレインキュベーションした後, B[a]Pを加え, 5分間反応した後, 冷アセトンを用い反応を停止した. 反応液を共栓付試験管に移し, ヘキサン 3 ml を添加, 5分間激しく振とうを行った. 850×g で5分間遠心後, その上清 1 ml を取り 1 N NaOH 4 ml を加え2分間激しく振とうを行った. これを 850×g で3分間遠心後, ヘキサン層をアスピレーターで吸引除去し, 残った NaOH 層を蛍光光度測定用の試料とし, 励起波長, 394 nm, 蛍光波長, 522 nm で測定した. 蛍光光度測定用の基準溶液としては, 1 µg/ml の硫酸キニーネ溶液を用いた (極大励起波長, 350 nm, 極大蛍光波長, 450 nm).

ここで, 1 µg/ml の硫酸キニーネのピーク高は 1 nmol/ml の 3-OH-B[a]P のピーク高の 1/2.7 倍に相当する.

結果及び考察

1. アスファルトタール各画分の組成

アスファルトタールのジエチルエーテル可溶性成分について, Hoffmann と Wynder⁹⁾の方法により分画して得た, 各画分の収量と収率(重量%)を Fig. 1 のかっこ内に示した.

2. アスファルトタール及び各画分の B[a]P の変異活性の抑制作用

アスファルトタールによる B[a]P の変異活性の抑制作用を Fig. 2 に示した.

B[a]P 5 µg の復帰変異コロニー数は285だったがアスファルトタールの添加量を増加させるに従って, 復帰変異コロニー数の減少が認められ, 50%阻害濃度は 0.8 mg/plate であった. また, この時, 菌の生育にはほとんど影響は認められなかった.

同様に, アスファルトタール中の各画分による B[a]P の変異原性の抑制作用を Table I に示した.

阻害作用は中性脂肪族画分<不溶性画分<中性含酸素画分<アスファルトタール÷中性画分<中性多環芳香族画分の順で強くなり, 中性多環芳香族画分がアスファルトタールの主要な阻害成分であることが考えられた.

Hermann⁹⁾はある種が多環芳香族炭化水素に B[a]P の変異原性に対する相乗作用や抑制作用のあることを報告している. 相乗作用は一般に縮合環が2—3個の多環芳香族炭化水素に認められ, 環の数が多くなるに従って抑制作用の強くなることを指摘している.

Fig. 2. Inhibition of Mutagenic Activity of B[a]P by Asphalt Tar

● mutagenicity, ○ survival.

The amount of B[a]P added was 5 µg in each plate.

TABLE I. Inhibition of Mutagenic Activity of B[a]P by Fractions Prepared from Asphalt Tar

Samples	Dose (mg/plate)	Net revertants/plate ^{a)}			Inhibition ratio ^{c)}
		Fraction alone (A)	Fraction+B[a]P ^{b)} (B)	(B)-(A)	
DMSO	-	0	285	285 (C)	1.00
Asphalt tar	0.25	0	211	211	0.74
	0.50	0	172	172	0.60
Neutral fr.	0.25	0	250	250	0.88
	0.50	0	168	168	0.59
N. Aliphatic fr.	0.25	0	362	362	1.27
	0.50	0	296	296	1.04
N. Polycyclic aromatic fr.	0.25	0	201	201	0.71
	0.50	36	194	139	0.49
N. Oxygenated fr.	0.25	9	235	207	0.73
	0.50	33	258	206	0.73
Insol. fr.	0.25	1	286	285	1.00
	0.50	0	224	209	0.73

a) Spontaneous revertants (19) was subtracted.

b) The amount of B[a]P added was 5 μ g/plate.

The ratio is defined as (B-A)/C where B is the mutagenicity for the mixture of B[a]P and each fraction, A is the mutagenicity of fraction alone, and C is the mutagenicity of B[a]P alone as reference.

また、B[a]P 1 μ g に対し、benzo[e]pyrene, naphthalene, anthracene などの比較的抑制作用の強い非変異原を添加した場合、添加量がプレート当たり 1—25 μ g 程度の低濃度域では B[a]P の変異活性に対し相乗効果が認められることを指摘している。

Fig. 2 の実験では、変異原として 5 μ g の B[a]P を用いているが、アスファルトタール量が 5 μ g—5 mg の比較的低濃度の範囲でも、特に、顕著な変異コロニーの増加傾向は認められなかった。

3. アスファルトタール及びアスファルトタール各画分の B[a]P 水酸化酵素活性阻害

前報²⁾で、このようなアスファルトタールによる変異原性の抑制作用が間接変異原である B[a]P のみに認められ、直接変異原である AF-2 には認められなかったことから、アスファルトタールが S9 の活性を阻害していることが推測された。

そこで、その作用機構を類推するための一助として、B[a]P 活性化酵素の 1 つである B[a]P-3-水酸化酵素についてアスファルトタールによって阻害されるか否か検討した。

酵素反応には市販の S9 (蛋白質量, 23 mg/ml) を 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で 100 倍に希釈したもの 100 μ l を用い、反応時間は 5 分間とした。

TABLE II. Inhibition of B[a]P-3-Hydroxylase Activity by Fractions Prepared from Asphalt Tar

Samples	Inhibition (%)
DMSO	0
Asphalt tar	52.8
Neutral fr.	62.3
N. Aliphatic fr.	11.8
N. Polycyclic aromatic fr.	80.2
N. Oxygenated fr.	49.1
Insol. fr.	25.5

Tar: 0.83 mg/ml, B[a]P: 33 μ M, enzyme protein: 23 μ g, incubation time: 5 min

アスファルトタール及び各画分による酵素阻害実験の結果を Table II に示した。

各画分の B[a]P-3-水酸化酵素の活性阻害の強さは中性脂肪族画分<不溶性画分<中性含酸素画分<アスファルトタール<中性画分<中性多環芳香族画分の順であり、変異原性の抑制作用の場合とほぼ同様の傾向にあることが明らかになった。

以上のことから、アスファルトタール中の主要な変異活性抑制物質は中性多環芳香族画分に含まれていること

が明らかになり、B[a]P 活性化酵素系の阻害による可能性が推測された。

このような、変異原性の抑制作用が実際に *in vivo* の系でもおこりうるのか否かについては明らかではないが、Cratbee¹⁰⁾ は、naphthalene, phenanthrene, anthracene など低分子量の多環芳香族炭化水素に化学発癌を抑制する作用のあることを指摘している。また、Duuren ら¹¹⁾ は、タバコタール中に含まれる phenol, eugenol, resorcin, hydroquinone などが B[a]P の発癌性に対して抑制的に働くことを報告している。

多環芳香族炭化水素にこのような変異原性の抑制作用が認められることは、当該物質による環境汚染を考えていく上で非常に興味深い。

4. 中性多環芳香族画分による B[a]P-3-水酸化酵素阻害様式

アスファルト中の主要な阻害成分である中性多環芳香族画分による酵素活性阻害の様式を明らかにするために、Lineweaver-Burk plot により解析を試みた (Fig. 3)。

その結果、中性多環芳香族画分は B[a]P の拮抗阻害剤として作用しているものと考えられ、その阻害定数 (K_i) は $4 \mu\text{g/ml}$ と計算された。また、中性多環芳香

Fig. 3. Lineweaver-Burk Plot of B[a]P-3-Hydroxylase in the Presence and Absence of Neutral Polycyclic aromatic Hydrocarbon Fraction

(I) control, (II) $42 \mu\text{g/ml}$, (III) $83 \mu\text{g/ml}$.

V: velocity of enzyme reaction, S: substrate (B[a]P in this experiment).

族画分の平均分子量を 200 とした場合には $K_i=20 \mu\text{M}$, 同じく 400 とした場合に $K_i=10 \mu\text{M}$ と推定された。

今回用いた酵素のミハエルス定数 (K_m) は $1.09 \pm 0.04 \mu\text{M}$, 最大速度 ($V_{\max}$) は $3.67 \pm 0.34 \text{ nmol/mg/m}$ であったことから当該物質は比較的強い酵素阻害能を有するものと考えられた。

Haugen ら¹²⁾ は、石炭から得られた油成分中の多環芳香族炭化水素がチトクローム P-450 のモノオキシゲナーゼ酵素系を阻害していること、更に、これらの物質が、酵素の活性中心あるいはその近傍に結合している可能性のあることを分光学的方法を用い推定している。

今回の結果から、アスファルトタールについても類似の酵素活性阻害作用が認められ、更に、kinetics の上から、これらの阻害が酵素の拮抗的阻害によることが明らかになった。

おわりに

アスファルトはその外見からしばしばコールタールやピッチと混同して考えられているが、物性や製造工程で大きな違いが認められる。

一般にアスファルトの製造工程ではクラッキングなど行われませんが、コールタールやピッチでは高温で炭素添加が行われており、アスファルトに比べ低分子化が進んでいる。

また、変異原性の有無に関してもコールタールには高い変異活性が認められており、その主要な変異原の同定も既に行われている¹³⁾ が、アスファルトタールについては、カットバックタイプ¹⁴⁾ を除き道路舗装用やライニングペイント用として広く用いられているストレートアスファルト、ブロンアスファルトから変異原性が認められたという報告は極めて少ない。¹⁵⁻¹⁸⁾

むしろ、アスファルトタールの場合には、間接変異原である B[a]P に対しては抑制作用を有することが明らかになり、その主要な阻害成分として中性多環芳香族画分が考えられた。

また、このような B[a]P の変異原性の抑制作用は B[a]P 活性化酵素系の阻害が原因である可能性が類推された。

B[a]P は代謝酵素により、NADPH と酵素の存在下で複数の代謝産物に分解される。これらの中で主たる活性代謝中間体は B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide といわれ、この中間体が生体高分子に結合して細胞に変異を誘発すると考えられている。^{19,20)} したがって、今後、B[a]P の変異活性の抑制作用を代謝酵素の活性阻害という点から直接的に証明するためには、B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide の生成酵素系に対する阻害作用

を調べる必要があると考えられる。

変異原物質間の直接的な、あるいは活性化酵素系を介した間接的な相互作用（相乗作用、抑制作用）については、このほかにも、種々の報告がなされている。

Nagao ら²¹⁾ は、norharman に B[a]P 等の変異原に対して相乗作用があることを報告しており、Fujino ら²²⁾ はその作用機構として、norharman が S9 中の薬物代謝酵素を阻害し、それによって活性中間代謝物が蓄積していることを指摘している。

また、最近、直接変異原である dinitropyrene の変異活性が B[a]P 等の多環芳香族炭化水素によって抑制されることが松下²³⁾ らによって指摘された。

また、後藤ら²⁴⁾ は、同じく直接変異原である trinitrobenzene の変異活性を pyrene が増強すること、また、trinitrocarbazol の変異活性は逆に、pyrene や B[a]P によって抑制されることを報告している。

これらの原因として、多環芳香族炭化水素と芳香族ニトロ化合物が電荷移動錯体を形成し、これによって変異原性が影響を受けている可能性を指摘している。

現在、環境汚染のモニタリングに Ames 試験を始めとする種々の変異原性試験が広く用いられているが、粗抽出試料を用い試験する場合には変異原物質の有無だけでなく物質間の相互作用についても十分に考慮し、評価する必要があると思われる。

引用文献

- 1) 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).
- 2) 玉川勝美, 高橋陽子, 三島靖子, 関 敏彦, 角田 行, 衛生化学, **31**, 329 (1985).
- 3) D. Hoffmann, E.L. Wynder, "Chemical Carcinogens ACS Monograph 173," American Chemical Society, Washington, D.C. 1976, pp.324—365.
- 4) 西村哲治, 後藤純雄, 加藤幸彦, 奥貫正美, 松下秀鶴, 大気汚染学会誌, **19**, 228 (1984).
- 5) B.N. Ames, W.E. Durston, E. Yamasaki, F.D. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2281 (1973).
- 6) T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, M. Okada, *Mutat. Res.*, **48**, 121 (1977).
- 7) D.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **192**, 265 (1951).
- 8) D.W. Nebert, J.E. Gielen, *Fed. Proc.*, **31**, 1315 (1972).
- 9) M. Hermann, *Mutat. Res.*, **90**, 399 (1981).
- 10) H.G. Cratbee, *Cancer Res.*, **90**, 399 (1946).
- 11) B.L. Van Duuren, B.M. Goldschmidt, *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**, 1237 (1976).
- 12) D.A. Haugen, M.J. Peak, *Mutat. Res.*, **116**, 257 (1983).
- 13) T. Kosuge, H. Zenda, H. Nukaya, A. Terada, T. Okamoto, K. Shudo, K. Yamaguchi, Y. Iitaka, T. Sugimura, M. Nagao, K. Wakabayashi, A. Kosuge, H. Saito, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1535 (1982).
- 14) J.M. Penalva, J. Chalabreysse, M. Archimbaud, G. Bourguineau, *Mutat. Res.*, **117**, 93 (1983).
- 15) M. Robinson, R.J. Bull, D. Chehil, R. Slater, J.R. Mier, *Toxicologist*, **2**, 88 (1982).
- 16) M. Shahin, F. Fournier, *Mutat. Res.*, **58**, 29 (1982).
- 17) 田村良三, 金田和子, 谷中隆明, 北島永一, 丸山隆雄, 新潟県公害研究所研究報告, **8**, 32 (1983).
- 18) 玉川勝美, 三島靖子, 関 敏彦, 角田 行, 公害と対策, **21**, 79 (1985).
- 19) I.B. Weinstein, A.M. Jeffrey, K.W. Jennette, S.H. Blobstein, R.G. Warvey, C. Harris, H. Autrup, H. Kasai, K. Nakanishi, *Science*, **193**, 592 (1976).
- 20) A.M. Jeffrey, I.B. Weinstein, K.W. Jennette, K. Grzeskowiak, K. Nakanishi, *Nature (London)*, **269**, 348 (1977).
- 21) M. Nagao, T. Yahagi, T. Kawachi, T. Sugimura, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, S. Mizusaki, T. Matsumoto, *Proc. Jpn. Acad.*, **53**, 95 (1977).
- 22) T. Fujino, A. Matsuyama, M. Nagao, T. Sugimura, *Chem.-Biol. Interact.*, **32**, 1 (1980).
- 23) 松下秀鶴, 田辺 潔, 遠藤 治, 高橋 清, 村田元秀, 李章鎬, 早野茂夫, 大気汚染学会誌, **21**, 204 (1986).
- 24) 後藤純雄, 河合昭宏, 高木敬彦, 遠藤 治, 村田元秀, 松下秀鶴, 大気汚染学会誌, **19**, 318 (1984).