タイヤ抽出物の変異原性に対するゴム添加剤の共存効果

山口孝子, 山内あい子, 山崎裕康, 垣内靖男
神戸学院大学薬学部

Effect of Rubber Additives on Mutagenicity of Tire Extracts

TAKAKO YAMAGUCHI, AIKO YAMAUCHI, HIROYASU YAMAZAKI and YASUO KAKIUCHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe-Gakuin University, 518,
Arise, Ikawadani, Nishi-ku, Kobe,
651-21, Japan

(Received March 26, 1992)

We investigated the mutagenicity of rubber additives used in tire and tire extracts. Thiuram and dithiocarbamate type rubber vulcanization accelerators showed mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* TA100 and some tires contain these additives, whereas no significant mutagenic activity was found in the tire extracts. These results suggested that the mutagenic activity of accelerators might be inhibited by other tire components such as the activators or the antioxidants.

This paper describes the effects of activators and antioxidants on the mutagenic activity of accelerators.

N-Isopropyl-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine (IPPD), widely used as an antioxidant, inhibited the mutagenic activity of thiuram and dithiocarbamate type accelerators when added together. On the other hand, addition of UV irradiated IPPD to these accelerators resulted in no inhibitory effect on the mutagenic activity of these accelerators. Activators had no effect on the mutagenic activity of these accelerators.

In order to confirm interaction between accelerators and antioxidants, tire extracts were separated into fractions corresponding to these additives by silica gel column chromatography and each fraction was subjected to the Ames test. The accelerator (Zn-DMDTC) fraction had mutagenic activity while the antioxidant (IPPD) fraction was non-mutagenic.

These observations demonstrated that IPPD inhibits or reduces the mutagenic activity of thiuram and dithiocarbamate type accelerators when they are combined such as in tire processing.

Keywords — rubber additive ; tire extract ; interaction ; antimutagenic effect ; mutagenicity

緒 言

大気中には様々な浮遊粒子状物質が存在しており、道路付近の大気中には自動車タイヤの摩耗により発生したタイヤトレッド摩耗粉じんの存在が報告されている。¹⁻⁴⁾ 陸上輸送手段としてのトラック及び一般自動車の増加に伴い、タイヤトレッド摩耗粉じんの環境への飛散が懸念され、その挙動や分析法等については多くの報告がなされている。⁵⁻¹⁰⁾

著者らは、タイヤ由来の粉じんが生体に及ぼす影響を考慮するためにタイヤに使用されているゴム添加剤に注目し、その変異原性についての検討を行ってきた。その結果、加硫促進剤として使用されているものの中には変異原性を有するものがあることが判明した。¹¹⁾ しかし、市販タイヤからゴム添加剤を抽出し、その分画の変異原性を調べたところ、著明な変異原活性が認められなかった。¹¹⁾ これらの結果から、タイヤ抽出物中では添加剤間の相互作用が起

こり、加硫促進剤の変異原活性が抑制されている可能性が考えられたため、今回この点について検討した。

実験方法

1. 試薬 加硫促進剤であるテトラメチルチウラムジスルフィド(TMTD, 大内新興化学), ジメチルジチオカルバミン酸亜鉛(Zn-DMDTC, 住友化学), ジエチルジチオカルバミン酸亜鉛(Zn-DEDTC, 住友化学), エチルフェニルジチオカルバミン酸亜鉛(Zn-EPDTC, 住友化学)は工業用として使用されている製品を用いた。加硫促進剤は酸化亜鉛(丸石製薬, 局方品)及びステアリン酸(ナカライテスク, 試薬特級)を用いた。その他の試薬は特別なものを除いて試薬特級を用いた。変異原性試験には, フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導したラット肝臓S9(オリエンタル酵母)とS9 mix用コファクター(オリエンタル酵母)を用いた。試料の溶解にはスペクトル用ジメチルスルホキシド(DMSO, 同仁化学)を使用した。陽性対照試薬としてベンゾ(a)ピレン(ナカライテスク)および4-クロロメチルビフェニル(Aldrich)を用いた。また, カラムクロマト用シリカゲルとしてWakogel C-200(和光純薬工業)を使用した。

2. 市販タイヤ中のゴム添加剤の抽出 乗用車用タイヤ5種類(国内5社製品)のタイヤトレッド部分を切り取り, 液体窒素で冷却しながら粉碎し, 12メッシュのふるいを通してタイヤトレッド試料とした。これを共栓フラスコに入れ1gにつき10mlのアセトンを加え, 既報¹¹⁾に準じた超音波抽出法により添加剤抽出物を得た。

3. 変異原性試験 *Salmonella typhimurium* TA 100を試験菌株として使用し, Amesらの方法¹²⁾に従って行った。試料はDMSOに溶解し, 1用量につき2または3プレートずつ試験してその平均値から試料の試験値を求めた。

統計的な有意性はStudentの*t*検定により検討し, 用量依存的なコロニーの増加が得られ, 変異コロニーが自然復帰コロニーの2倍以上認められた時, 変異原性陽性とみなした。¹³⁾

4. 加硫促進剤変異原性に及ぼす他のゴム添加剤の影響 加硫促進剤であるテトラメチルチウラムジスルフィド(TMTD), ジメチルジチオカルバミン酸亜鉛(Zn-DMDTC), ジエチルジチオカルバミン酸亜鉛(Zn-DEDTC)及びエチルフェニルジチオカルバミン酸亜鉛(Zn-EPDTC)(30 µg/plate)に対し

て老化防止剤としてタイヤに汎用されている*N*-イソプロピル-*N'*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン(IPPD)及び加硫促進剤として用いられている酸化亜鉛またはステアリン酸を各々(1–15 µg/plate)共存させて変異原性試験を行った。また, 老化防止剤は紫外線, 熱及びオゾンなどによるゴムの老化(劣化)を防ぐ目的で配合されているが, タイヤの長期使用やタイヤ由来の粉じんとして環境中に存在する際には太陽からの紫外線を受け, そこに含まれている老化防止剤の分解(抗酸化作用の消失)も考えられる。そのため, 加硫促進剤に紫外線照射したIPPDを共存させた場合についても調べた。IPPDはエタノール溶液(1 mg/ml)とし, ポリカーボネート製のチューブに入れ, 殺菌灯(ナショナルGL-15ランプ, 波長253.7 nm)を用い20 cmの距離から72時間紫外線を照射した後, エタノールを蒸発乾固し紫外線処理したIPPDとして処理前IPPD換算量で試験に用いた。

5. シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる抽出物中のゴム添加剤の分離及びその分画ごとの変異原性 内径14 mm長さ40 cmのクロマト管にWakogel C-200を20 g充填し, 1 gのタイヤからの抽出物をベンゼン1 mlに溶解してカラムに注入した。流速0.5 ml/minでベンゼン120 ml, つづいてテトラヒドロフラン120 mlで溶出して6 ml毎の分画を集めた。IPPDの検出は各溶出画分に対して3倍量のリンモリブデン酸テトラヒドロフラン溶液(200 µg/ml)を加えて発色させ, 600 nmでの吸光度を測定した。Zn-DMDTCは各溶出画分に対し同量の0.005%硫酸銅テトラヒドロフラン溶液を加え, 430 nmでの吸光度を測定することにより検出した。また, 各画分はロータリーエバポレーターで減圧乾固後, 200 µlのDMSOに溶解して変異原性試験に用いた。

結果及び考察

1. 添加剤間相互作用による加硫促進剤変異原性に及ぼす影響

変異原性を示した加硫促進剤¹¹⁾の中からタイヤゴムへの使用例の多いTMTDを選び, 老化防止剤として汎用されているIPPDを共存させて試験した場合, TMTDの変異原活性はIPPDの用量に比例して抑制された。この作用はS9 mix非存在下でより強く認められた。TMTDはS9 mixの添加によって変異原活性が増強する¹¹⁾ため, IPPDの抑制作用が非存在下で強く見られたものと考えられた。

さらに、S9 mix の添加により、IPPD 自身も酸化され変異原活性の抑制作用が低下した可能性も考えられた (Fig. 1). このことから、以下の実験は S9 mix 非存在下で行った。しかしながら、加硫促進剤である酸化亜鉛やステアリン酸を共存させた場合には、それ自身が変異原性を示さない量において、¹¹⁾このような抑制作用は認められなかった (Table I).

Fig. 1. Effect of IPPD on Mutagenic Activity of TMTD in *Salmonella typhimurium* TA100.

TMTD (30 $\mu\text{g}/\text{plate}$). The number of spontaneous revertants (112 (-S9), 131 (+S9)/plate) has been subtracted.

TABLE I. Effects of Rubber Vulcanization Activators on Mutagenic Activity of Tetramethylthiuram Disulfide in *Salmonella typhimurium* TA100 without S9mix

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		Revertants/plate
TMTD	ZnO	
30	0	307 $\pm$ 12
30	20	336 $\pm$ 10
30	50	300 $\pm$ 16
30	100	310 $\pm$ 7
TMTD	Stearic acid	
30	0	267 $\pm$ 5
30	20	238 $\pm$ 14
30	50	227 $\pm$ 17
30	100	271 $\pm$ 24

Each value represents the mean $\pm$ S. E. of triplicate experiments.

Solvent control and positive control values were 116 $\pm$ 3 and 271 $\pm$ 4, respectively.

Positive control; 4-(Chloromethyl) biphenyl 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$.

さらに、この IPPD による加硫促進剤の変異原活性抑制作用が IPPD の老化防止剤としての特性である抗酸化作用による可能性が考えられたため、TMTD に紫外線照射した IPPD を共存させ変異原性試験を行ったところ、IPPD による変異原活性抑制作用は著明に減弱した (Fig. 2). また、TMTD に IPPD を共存させ試験した時の生菌数についても同時に調べたところ、変異原活性の抑制が見られた用量で有意な生菌数の減少は認められず、IPPD による TMTD の変異原活性抑制は細胞毒性作用に基づくものではないと考えられた (Fig. 2). さらに、Zn-DMDTC,

Fig. 2. Effect of UV Irradiated IPPD on Mutagenic Activity of TMTD in *Salmonella typhimurium* TA100.

TMTD (30 $\mu\text{g}/\text{plate}$). Mutagenic activity of TMTD (—) and survivals (-----) were plotted.

Fig. 3. Effect of IPPD on Mutagenic Activity of Rubber Vulcanization Accelerators in *Salmonella typhimurium* TA100.

Rubber vulcanization accelerators (30 $\mu\text{g}/\text{plate}$).

Zn-DEDTC, 及び Zn-EPDTC についても IPPD との相互作用を検討したところ Fig. 3 においてオープンカラムに示したように無処理の IPPD が共存した場合には加硫促進剤の変異原活性(斜線のカラム)は著明に抑制され, 紫外線処理した IPPD ではクロードカラムに示したように抑制作用はほとんど認められなくなった (Fig. 3). これらの結果より, IPPD による加硫促進剤変異原活性抑制作用は IPPD の抗酸化作用に起因する可能性が示唆された.

2. シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるタイヤ抽出物中のゴム添加剤の分離とその変異原活性

変異原性を有する加硫促進剤に IPPD が共存するとその変異原活性が抑制されることが判明したため, さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりタイヤ抽出物中のゴム添加剤の分離分画を行い, その分画ごとの変異原活性を調べた. この結果は Fig. 4 に示したが, タイヤ抽出物のひとつにおいて分画 6—10 に有意な変異原活性が認められた. この分画は標準 Zn-DMDTC の溶出分画と一致していた. その他の分画には変異原活性は認められなかった. また, この抽出物の Zn-DMDTC 溶出分画 (Fr. 6—10) と IPPD 溶出分画 (Fr. 26—30) を合わせて

TABLE II. Mutagenic Activity of Tire Extracts in *Salmonella typhimurium* TA100 without S9 mix

Tire extract	Net revertants/g tire	
	Before fractionation	After fractionation ^{a)}
A	0	922
B	0	0
C	0	0
D	0	0
E	0	0

a) Tire extracts were separated into TMTD fraction and others by silicagel column chromatography, and the TMTD fraction was used for this assay.

試験すると Fr. 6—10 の変異原活性は消失した. しかしながら, 他の抽出物 (B—E) については同様に分画しても変異原活性は認められなかった (Table II).

この結果は, タイヤ試料に用いられている加硫促進剤が異なり, 変異原性が認められたタイヤのみにジチオカルバメートあるいはチウラム系の加硫促進剤が使用されていた可能性が考えられた.

総 括

交通量の著しい増加に伴ない, 都市幹線道路付近

Fig. 4. Silica-gel Column Chromatogram of Tire Extract and Mutagenic Activity of the Fractions.

Conditions: Wakogel C-200 (1.4 × 40 cm),
Benzene 120 ml → Tetrahydrofuran 120 ml,
Flow rate: 0.5 ml/min.

には自動車タイヤの摩耗により発生したタイヤトレッド摩耗粉じんが存在しており、これらによる健康影響が懸念される。

タイヤ中に使用されているゴム添加剤の中には変異原性を有するものがあるため、市販タイヤ抽出物の変異原性を調べたが有意な変異原活性は認められなかった。このことから、抽出物中では添加剤間の相互作用が起こっている可能性が考えられたため、タイヤ抽出物をさらに各添加剤に分画し検討した結果、老化防止剤として汎用されている IPPD が加硫促進剤の変異原性を抑制することが判明した。さら

に、IPPD を紫外線処理すると、その抑制作用が消失することが明かとなった。IPPD をはじめとするフェニレンジアミン系の老化防止剤は熱、紫外線、オゾン等によってゴム炭化水素から生じるラジカルによって起こるゴムの老化を防止する。¹⁴⁾ しかしながら、長期使用によるタイヤの劣化に伴い老化防止剤の分解¹⁵⁾ も考えられることや摩耗により環境中に放出されるタイヤ由来の粉じん量を考え合わせると、特に交通量の激しい地域ではこれらの生体に及ぼす影響は無視できないと思われ、今後さらに検討を加える必要があると考えられる。

引用文献

- 1) R.N. Thompson, C.A. Nau, C.H. Lawrence, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **27**, 488 (1966).
- 2) J.A. Cardina, *Rubber Chem. Technol.* **46**, 232 (1974).
- 3) S.H. Cadle, R.L. Williams, *J. Air Pollut. Control Assoc.*, **28**, 502 (1978).
- 4) W.R. Pierson, W.W. Brachaczek, *Rubber Chem. Technol.*, **47**, 1275 (1974).
- 5) 豊沢真一, 越智寿幸, 竹内善彦, 井上秀成, 白井恒雄, 柳沢三郎, 大気汚染学会誌, **13**, 101 (1978).
- 6) 豊沢真一, 竹内善彦, 藤村 満, 井上秀成, 白井恒雄, 柳沢三郎, 日化, **1**, 124 (1978).
- 7) 黒崎裕人, 北嶋永一, 丸山隆雄, 谷中隆明, 大気汚染学会誌, **21**, 60 (1986).
- 8) 北嶋永一, 漆山佳雄, 谷中隆明, 新潟公害研報告, **8**, 24 (1983).
- 9) 豊沢真一, 梅沢洋二, 生駒一光, 亀山裕司, 白井恒雄, 柳沢三郎, 分析化学, **26**, 38 (1977).
- 10) 東 俊作, 井上秀成, 白井恒雄, 柳沢三郎, 大気汚染学会誌, **16**, 163 (1981).
- 11) 山口孝子, 山内あい子, 山崎裕康, 垣内靖男, 衛生化学, **37**, 6 (1991).
- 12) D.M. Maron, B.N. Ames, *Muta. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 13) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 東京, 1990, p.240, p.244.
- 14) 後藤邦夫編, “増補プラスチックおよびゴム用添加剤実用便覧,” 化学工業社, 1987, p.1041.
- 15) Jitka Rotschova, Jan Pospisil, *J. Chromatogr.*, **211**, 299 (1981).