胎仔造血肝細胞を用いた姉妹染色分体交換および小核試験による ディーゼルエンジン排ガス影響の細胞遺伝学的検討

軽部 敏昭, 金 永煥, 川村 堅,

小田切 陽一, 片山 博雄, 竹本 和夫

埼玉医科大学公衆衛生学教室

Cytogenetic Analyses of Diesel Engine Exhaust by Sister Chromatid Exchange
and Micronucleus Tests with Mouse Fetal Liver Cells.

Toshiaki Karube, Young-Whan Kim, Ken Kawamura,
Youichi Odagiri, Hiroo Katayama and Kazuo Takemoto

Department of Public Health, Saitama Medical School, Saitama

The genotoxic effect of maternal exposure to diesel engine exhaust was studied by analyses of sister chromatid exchanges (SCEs) and formation of micronuclei with fetal liver cells. Fetal liver cells were obtained from pregnant ICR/JCl mice at the 16th day of gestation. Diesel engine exhaust was generated by running a small engine (YANMAR NSA-40CE, used as an electric generator, displacement: 269 cc). The concentrations of pollutants in the inhalation chamber were as follows; CO: 40-100 ppm, NO₂: 2-4 ppm, and particulates: 2-4 mg/m³. Maternal mice were divided into three groups: the long-term exposure group, the short-term exposure group and the non-exposed control. Mice of the long-term group were exposed to the exhaust 4 hours daily from day 0 to the 16th day of gestation. Mice of the short-term group were similarly exposed but only on the 15th and 16th days of gestation.

The number of SCEs of fetal liver cells was significantly increased in both the exposed groups. The long-term exposure group showed a significant increase in the number of SCEs in comparison with that of the short-term exposure group. In the micronucleus test with fetal liver cells, no significant change in the frequency of micronucleated cells was induced by exposure to diesel exhaust.

Key words: Diesel engine exhaust, Fetal liver cell, Sister chromatid exchange, Micronucleus test

ディーゼルエンジン排ガス, 胎仔肝細胞, 姉妹染色分体交換, 小核試験

はじめに

ディーゼルエンジンはその経済効率の高さのためトラック、バスや一部の乗用車にも用いられている。しかし、ディーゼル車は多量の粒子成分を排出し、それらの有機溶媒抽出物中にはニトロピレン類等の強力な変異原性・発癌性を示す物質の存在が知られその生体影響が大きな社会問題になっている^{1,2)}。しかしガス相の成分を含めたディーゼル排気の直接暴露による変異原性についての報告は少なく、哺乳動物の骨髓細胞を用いた姉妹染色分体交換 (Sister Chromatid Exchange, 以下 SCE) の解析

や小核試験ではほとんどの報告において対照群との間には認められていない³⁻⁷⁾。

SCE は染色体上の DNA 障害の鋭敏な指標とされ、変異原性・発癌性との関連からその試験法が注目されている。また小核試験は主にマウスなどの哺乳動物の骨髓中の赤芽球が脱核して成熟赤血球になる過程で、染色体切断または紡錘糸の形成障害を受け、赤血球中に小核として残存したものの頻度をみる試験であり、SCE と同様に細胞遺伝毒性の指標として広く用いられている。従来、SCE・小核の両試験共に *in vivo* の試験としては骨髓細胞を用いたものが一般的であるが、吸入暴露後の細胞遺

伝学的影響の検索方法としてはその感度の低さに問題が残る。このため、タバコの吸入暴露実験などにおいても骨髓細胞を用いた方法では SCE や小核試験で陽性の結果を得ることが非常に困難であるとされている⁸⁻¹²⁾。

我々はすでに従来の骨髓細胞を用いる SCE や小核試験に比べより鋭敏と考えられ、しかも直接的に妊娠中の環境の胎仔への影響を見ることができるとする造血胎仔肝細胞を用いた SCE の解析および小核試験を報告した。この中でタバコ煙の妊娠マウスへの暴露試験を行い胎仔肝 SCE において陽性の結果が得られ、この試験法が胎仔影響を見ると同時に吸入暴露による変異原性試験としても有効であることを確認した¹³⁾。今回、我々はディーゼルエンジン排ガスを妊娠マウスに直接暴露し、その胎仔肝細胞を用いて SCE および小核試験の検討を行ったので報告する。

方 法

10週齢の ICR 雌マウス（日本クレア）を用い、夕刻に雄マウスと同居させ、翌朝までの間に交配させ雄から分離した。膣栓を確認し、この日を妊娠 0 日として用いた。妊娠マウスはディーゼルエンジン排ガス長期暴露群 7 匹と短期暴露群 7 匹および無処置対照群 9 匹の 3 群に分けた。このうち長期暴露群 3 匹において、流産の徴候は認められなかったが妊娠しておらず実験から除外した。最終的に妊娠が確認でき実験に用いたマウスは、長期暴露群 4 匹、短期暴露群 7 匹、無処置対照群 9 匹であり胎仔数は妊娠マウス 1 匹あたり 9-12 匹であった。

ディーゼルエンジン排ガス暴露：ディーゼルエンジンはヤンマー NSA-40CE 発電機 (269 cc) を用い、1600 rpm のアイドリング時に排出されたガスを新鮮空気で 4-8 倍に希釈し、妊娠マウスを入れた暴露箱 (容量 376 l) へ導入した。暴露箱へのガス流入速度は 120 l/min とした (Fig. 1)。この条件下で、暴露箱内は CO 濃度が 40-100 ppm, NO₂ 濃度 2-4 ppm, 粒子状物質が 2-4 mg/m³, 平均粒子径が 0.3 μm になるように調整した。1 日の

Fig. 1 Schematic diagram of the diesel engine exhaust inhalation system. A: diesel engine, B: storage chamber, C: valve, D: flow meter, E: air filter, F: mixing chamber, G: inhalation chamber

暴露時間は 4 時間とし、長期暴露群には妊娠 0 日より 16 日まで 17 日間連日、短期暴露群には妊娠 15, 16 の両日のみ暴露を行った。Cole らの方法に基づき屠殺は妊娠 16 日に行い、最終暴露の 2 時間後に無菌的に胎仔を取り出した^{14,15)}。対照群のマウスも同時期に胎仔を取り出した。

SCE 標本の作製：Allen らの報告から、子宮内の胎仔の位置によって経胎盤影響に差がないと考え、一腹あたり 2 匹の胎仔を任意に取り出した¹⁶⁾。その肝細胞をメッシュで単離し、10 ml の 10% 胎仔ウシ血清加 RPMI 1640 培養液中に浮遊し、Bromodeoxyuridine を最終濃度が 20 μM になるように添加し、遮光下で 5% CO₂, 37°C の条件で培養した。24 時間後にコルセミド (Gibco, Grand Island, NY) を 0.02 μg 適下し、さらに 3 時間培養した。培養細胞を遠心操作で集めた後、0.075 M KCl に室温下で 25 分間放置。その後メタノール：酢酸 (3:1) 溶液で固定し、スライドガラス上に染色体標本を作製した。SCE の染色は Goto らの方法によった¹⁷⁾。母マウス一匹あたり 100 個の中期分裂像で SCE 数の観察を行った。

小核標本の作製：母マウス一腹あたり任意に抽出した三匹の胎仔から肝を取り出し、細胞を単離した後 5% 胎仔ウシ血清加 Hanks 液中に浮遊し、スメア標本を作製した。標本はメタノールで固定後ギムザ染色を行った。小核頻度は 1000 個の多染性赤血球中の小核保有細胞を算定した。

統計学的検定：統計の検定にあたっては、SCE 試験では Student's t test を、小核試験では binominal distribution test を用いた¹⁸⁾。

結 果

ディーゼル排ガス長・短期暴露群の 4 匹と 7 匹およびコントロール群の 9 匹の胎仔肝 SCE 値を Table 1 に示した。コントロール値はばらつきが少なく平均値は 5.57 ± 0.08 (mean $\pm$ S.E.) であった。また長期暴露群では 8.81 ± 0.16 (mean $\pm$ S.E.)、短期暴露群では 7.50 ± 0.12 (mean $\pm$ S.E.) であった。これらの SCE の平均値はいずれもコントロール 9 匹の平均値に比べ有意な上昇がみられた ($p < 0.01$)。また長期暴露群の SCE の平均値は短期暴露群と比べ有意の上昇を示した ($p < 0.05$)。一方多染性赤血球中の小核頻度を Table 2 に示した。コントロール群 9 匹の平均値は $0.78 \pm 0.28\%$ (mean $\pm$ S.E.) であった。またディーゼル排ガス長期暴露群では $0.75 \pm 0.48\%$ (mean $\pm$ S.E.)、短期暴露群では $1.43 \pm 0.48\%$ (mean $\pm$ S.E.) でありいずれもコントロール値と比べ変化はみられず、長期暴露群と短期暴露群との間にも差は

Table 1 Induction of SCEs in fetal mouse liver cells following maternal exposure to diesel engine exhaust.

Exposure period	No. of mice examined	No. of metaphases analyzed	SCEs/cell (mean $\pm$ S.E.)
Long-term ^a exposure group	1	100	8.37 $\pm$ 0.34
	2	100	9.48 $\pm$ 0.34
	3	100	9.19 $\pm$ 0.30
	4	100	8.21 $\pm$ 0.31
	Pooled mean	400	8.81 $\pm$ 0.16 ^{c,d}
Short-term ^b exposure group	1	100	7.34 $\pm$ 0.30
	2	100	8.25 $\pm$ 0.37
	3	100	6.86 $\pm$ 0.27
	4	100	6.91 $\pm$ 0.27
	5	100	7.34 $\pm$ 0.29
	6	100	6.97 $\pm$ 0.24
	7	100	8.86 $\pm$ 0.34
	Pooled mean	700	7.50 $\pm$ 0.12 ^c
Non-exposed control group	1	100	5.96 $\pm$ 0.25
	2	100	5.64 $\pm$ 0.25
	3	100	5.96 $\pm$ 0.23
	4	100	6.02 $\pm$ 0.28
	5	100	5.64 $\pm$ 0.24
	6	100	5.33 $\pm$ 0.22
	7	100	6.12 $\pm$ 0.25
	8	100	4.83 $\pm$ 0.21
	9	100	6.32 $\pm$ 0.26
	Pooled mean	900	5.75 $\pm$ 0.08

^a, Exposure was performed from pregnant day 0 to the 16th pregnant day. ^b, Exposure was performed on the 15th and 16th pregnant days. ^c, Significantly different from the control ($p < 0.01$). ^d, Significantly different from the short-term exposure group ($p < 0.05$).

みられなかった。

考 察

ディーゼルエンジン排ガスは都市近郊における自動車排ガスによる大気汚染の原因の一つであり、その抽出粒子成分の変異原性については Ames 試験等の *in vitro* 試験により数多くの研究がなされ、抽出タールおよびその成分である 1-ニトロピレンやジニトロピレン類などのニトロアレーン類において強い変異原性が証明されている¹⁹⁻²¹⁾。しかしながらディーゼルエンジン排ガスの生体影響を考える上においてはガス状物質を含めた総合的な変異原性・発癌性についての評価が不可欠である。発癌性の評価においては近年実験動物への吸入暴露によって肺腫瘍発生を直接証明した実験結果も報告されてい

る²²⁻²⁴⁾。これに対し変異原性の評価のためにはディーゼルエンジン排ガスを生体に直接吸入暴露した遺伝毒性の検討が重要であると考えられ、その目的からは SCE や小核試験などの *in vivo* 試験の活用が有効である。過去のディーゼルエンジン排ガスの直接暴露による SCE や小核試験の検討は EPA (米国環境保護局) や我国の Health Effects Research Program on Diesel Exhaust Emissions (HERP) において行われた数少ないデータが存在するが、SCE ではいずれの報告においても陽性の結果は得られておらず、小核試験で Pereira らによるチャイニーズハムスターへの 6 ヶ月間の慢性暴露実験によつての陽性報告のみである³⁻⁷⁾。一方、小田切はマウスへの 12 ヶ月以上の長期暴露によりディーゼル排ガスの小核誘発性を証明したが、新生仔マウスを使うことにより、より短

Table 2 Induction of MNPCEs in fetal mouse liver cells following maternal exposure to diesel engine exhaust.

Exposure period	No. of mice examined	MNPCEs ^a /1000 PCEs
Long-term ^b exposure group	1	2
	2	1
	3	0
	4	0
	Pooled mean	0.75±0.48 ^{d,e}
Short-term ^c exposure group	1	1
	2	0
	3	4
	4	1
	5	1
	6	2
	7	1
	Pooled mean	1.43±0.48 ^{d,e}
Non-exposed control group	1	0
	2	2
	3	1
	4	0
	5	1
	6	2
	7	0
	8	1
	9	0
	Pooled mean	0.78±0.28 ^d

^a, Micronucleated polychromatic erythrocytes. ^b, Exposure was performed on the pregnant day 0 to the 16th pregnant day. ^c, Exposure was performed on the 15th and 16th pregnant days. ^d, Mean±S.E.

^e, Not different from the control.

期（1ヵ月）の暴露期間でも小核誘発を認めることを報告した²⁵⁾。これらの実験結果は、動物を使った吸入実験での試験感度の低さの問題が大きいと考えられるが、宿主となる被検動物の感受性が高いものを利用することが一つの解決法になる可能性を示している。

マウスの胎仔肝細胞を使った SCE と小核試験は従来の骨髓細胞を使う方法に比べ高感度であるといわれ、妊娠環境の胎仔への影響を直接みることができると有用な方法になっている^{14,15)}。我々も以前に妊娠マウスにタバコの主流煙と副流煙を暴露した結果、胎仔肝小核試験では対照群と差はみられなかったが、胎仔肝 SCE の解析で陽性の結果を報告している¹³⁾。タバコ煙暴露による SCE の誘発はヒトのリンパ球を使ったモニタリングの

結果、喫煙者でより高い SCE 頻度を示すことがよく知られているが、動物への暴露実験ではその関係を証明することは非常に難しいといわれていた。これらの結果から我々は胎仔肝細胞における SCE の解析はタバコ煙以外の大気汚染物質の吸入試験にも高感度の実験系ではないかと考えた。

今回のディーゼルエンジン排ガス暴露実験においても、胎仔肝 SCE 試験は長期暴露と短期暴露のいずれの場合も統計学的に有意に高い SCE 頻度が認められ、一方小核試験ではいずれもその影響はみられなかった。この結果は胎仔肝 SCE 試験の方が小核試験に比べより好感度であることを示しており、タバコ煙暴露実験結果とも矛盾しない。しかし、タバコの実験を含め、今回の実験も妊娠中という特殊な状態で暴露を行っており、これがマウスにとって種々の生理的ストレスを引き起こし、これが胎仔に影響を及ぼしている可能性もあり、ディーゼルエンジン排ガスの特異的な影響ではない要素による SCE への関与も否定できない。

今回のディーゼルエンジン排ガスの暴露は我々が以前から行っているマウス肺発癌実験と同一に設定しており、実際の大気汚染に係わる環境基準より NO₂ や粒子状物質の濃度では10倍程度強いものであり、今回の実験で胎仔 SCE 値で異常がみられたことから直接的にヒトの胎児への影響を考察することは難しいが、ヒトのライフサイクルが長いことを考えれば決して無視できない結果であると思われる。小核試験においては陽性の結果が得られなかったが、タバコ暴露の時と同様であり胎仔肝での試験感度が十分でないためと考えられる。しかし小田切らの陽性とした報告では粒子濃度は今回の実験と同一であるが、成獣を用いた実験では12ヵ月間暴露で初めて陽性の結果になり、新生仔への暴露でも1ヵ月の期間を要していることから、妊娠前からの暴露などの、より長暴露期間でのディーゼルエンジン排ガス暴露を工夫する必要がある²⁵⁾。

結 語

妊娠マウスにディーゼルエンジン排ガスを短期と長期に分けて暴露し、胎仔造血肝細胞の SCE と小核の出現頻度を検討した。SCE 頻度では、短期・長期暴露の両群において対照群に比べ上昇がみられ、特に長期暴露群でその傾向が顕著であった。小核試験においては暴露群と対照群との間に差はみられなかった。今回行った高濃度でのディーゼルエンジン排ガス暴露では胎仔肝 SCE においてその影響が明らかになった。しかし、今回の実験法

においては母体へのストレスの影響も十分に考慮する必要があると思われた。

謝 辞

本研究は平成元年度文部省科学研究費(課題番号01771366)および第一回落合記念賞研究助成金によることを付記し感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨の一部は第60回日本衛生学会総会において発表した。

文 献

- 1) Pepelko, W.E. and Peirano, W.B.: Health effects of exposure to diesel engine emissions, *J. Amer. College. Tox.*, **2**, 253-306 (1983).
- 2) 大西克成, 木内武美: ディーゼル排出ガスの変異原性, *トキシコロジーフォーラム*, **6**, 335-355 (1983).
- 3) Pereira, M.A.: Metaphase analysis, micronuclei assay, and urinary mutagenicity assay of mice exposed to diesel emissions, *Environ. Int.*, **5**, 435-438 (1981).
- 4) Pereira, M.A.: In vivo detection of metagenic effects of diesel exhaust by short-term mammalian bioassays, *Environ. Int.*, **5**, 439-443 (1981).
- 5) Pereira, M.A.: Genotoxicity of diesel exhaust emissions in laboratory animals, *Dev. Toxicol. Environ. Sci.*, **10**, 265-276 (1982).
- 6) 吸入実験分科会編・飯島純夫, 竹下達也, 日暮 真: ディーゼル排気物質の生体影響, 385-387, HERP 研究会, 筑波 (1987).
- 7) 吸入実験分科会編・小泉直子, 二宮ルリ子, 喜田村正次: ディーゼル排気物質の生体影響, 393-401, HERP 研究会, 筑波 (1987).
- 8) Korte, A., Wagener, H.M. and Obe, G.: Simultaneous exposure of Chinese hamsters to ethanol and cigarette smoke: cytogenetic aspects, *Toxicology*, **20**, 237-246 (1981).
- 9) Madle, S., Korte, A. and Obe, G.: Cytogenetic effects of cigarette smoke condensates in vitro and in vivo, *Hum. Genet.*, **59**, 349-352 (1987).
- 10) Basler, A.: SCEs in lymphocytes of rats after exposure in vivo to cigarette smoke or to cyclophosphamide, *Mutat. Res.*, **102**, 137-143 (1982).
- 11) Benedict, W.F., Banerjee, A., Kangalingam, K.K., Dansie, D.R., Kauri, R.E. and Henry, C.J.: Increased sister-chromatid exchange in bone-marrow cells of mice exposed to whole cigarette smoke, *Mutat. Res.*, **136**, 73-80 (1984).
- 12) Odagiri, Y. and Takemoto, K.: Detection of cytogenetic effect of inhaled cigarette smoke by the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **164**, 277 (1986).
- 13) Karube, T., Odagiri, Y., Takemoto, K. and Watanabe, S.: Analyses of transplacentally induced sister chromatid exchanges and micronuclei in mouse fetal liver cells following maternal exposure to cigarette smoke, *Cancer Res.*, **49**, 3550-3552 (1989).
- 14) Cole, R.J., Taylor, N.A., Cole, J. and Arlett, C.F.: Transplacental effect of chemical mutagens detected by the micronucleus test, *Nature (Lond.)*, **277**, 317-318 (1979).
- 15) Cole, R.J., Cole, J., Taylor, N.A., Arlett, C.F. and Regan, T.: Short-term test for transplacentally active carcinogens: a comparison of sister-chromatid exchange and the micronucleus test in mouse foetal liver erythroblasts, *Mutat. Res.*, **113**, 61-75 (1983).
- 16) Allen, J.W., El-Vahass, E., Sanyal, M.K., Dunn, R. L., Gladen, B. and Dixon, R.L.: Sister-chromatid exchange analyses in rodent maternal, embryonic and extraembryonic tissues. Transplacental and direct mutagen exposures, *Mutat. Res.*, **80**, 297-311 (1981).
- 17) Goto, K.S., Maeda, I., Kano, Y. and Sugiyama, T.: Factors involved in differential giemsa-staining of sister chromosome, *Chromosoma*, **66**, 351-359 (1987).
- 18) Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O.: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, **9**, 527-549 (1970).
- 19) Morimoto, K., Kitamura, M., Kondo, H. and Koizumi, A.: Genotoxicity of diesel exhaust emissions in a battery of in-vitro short-term and in-vivo bioassays. In: *Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust*, (Editors: N.

- Ishinishi, A. Koizumi, R.O. McClellan, and W. Stöber), p. 85-101, Elsevier Science Publication (1986).
- 20) Pitts, Jr, J.N., Lokensgard, D.M., Harger, W., Fisher, T.S., Mejia, V., Schuler, J.J. Scorziell, G. M. and Katzenstein Y.A.: Mutagens in diesel exhaust particulate identification and direct activities of 6-nitrobenzo (a) pyrene, 9-nitroanthracene, 1-nitropyrene and 5H-phenanthro (4, 5-bcd) pyran-5-one, *Mutat. Res.*, **103**, 241-249 (1982).
- 21) Salmeen, I., Durisin, A.M., Prater, T.J., Riley, T. and Schuetzle, D.: Contribution of 1-nitropyrene to directacting Ames assay mutagenicities of diesel particulate extracts, *Mutat. Res.*, **104**, 17-23 (1982).
- 22) McClellan, R.O.: Health effects of diesel exhaust: a case study in risk assessment, *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **47**, 1-13 (1986).
- 23) Takemoto, K., Yoshimura, H. and Katayama, H.: Effects of chronic inhalation exposure to diesel exhaust on the development of lung tumors in diisopropanol-nitrosamine-treated F344 rats and newborn C57BL and ICR mice. In: *Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine Exhaust*, (Editors: N. Ishinishi, A. Koizumi, R.O. McClellan, and W. Stöber), p. 311-327, Elsevier Science Publication (1986).
- 24) 岩井和郎, 宇田川忠, 山岸正晴, 山田博之: ディーゼル排出物質の長期吸入暴露実験一肺および肺外臓器にみられた形態学的所見, *大気汚染学会誌*, **21**, 38-51 (1986).
- 25) 小田切陽一: 小核試験による空気汚染物質の細胞遺伝学的影響の検出, *大気汚染学会誌*, **23**, 97-107 (1988).
- (受付 1990年 8月18日 受理 1990年12月 7日)