

A-7 フロン代替物質の開発と環境影響評価に関する研究

(1) フロン代替物質の開発と環境影響評価に関する研究

③ フロン代替物質の対流圏分解物質の環境影響評価に関する研究

研究代表者 国立環境研究所 彼谷 邦光

環境庁国立環境研究所

大気圏環境部 大気動態研究室 井上 元、 泉 克幸

化学環境部 化学毒性研究室 彼谷 邦光、 白石 不二雄

平成2～4年度合計予算額 18,630千円

〔要旨〕フロン代替物質の寿命を決めるOHとの反応速度決定に必要なレーザー誘起蛍光測定システムを開発し、我が国で開発されたペンタフルオロプロパノール（5FP）とOHラジカルとの反応速度定数 $[(8.8 \pm 1.1) \times 10^{-14}]$ を決定した。本装置は更に遅い反応の速度定数を測定することが可能であり、代替フロンやハロンとOHラジカルとの反応速度論的研究に活用できるものと期待される。

代替フロンやハロンの毒性を哺乳動物培養細胞を用いて評価するためのガス暴露装置の開発を目指し、*in vitro* で毒性が検出しにくいと云われているベンゼンの遺伝毒性を指標に装置に改良を加えた。本装置によって、代替フロンやハロンの細胞毒性、遺伝毒性が短時間に検出することができるようになった。

〔キーワード〕フロン、代替フロン、ペンタフルオロプロパノール（5FP）、培養細胞、細胞毒性、細胞遺伝毒性。

1. 序

代替フロンの開発にあたっては、フロンに類似した物性を持ち、安全性の高い物質の中で、対流圏寿命の短いもの、または対流圏寿命が長くても成層圏オゾン破壊する塩素原子を含まないものを選択する必要がある。後者の場合においても、温室効果を小さくするためには対流圏寿命が短い方が良い。

フロン代替物質の対流圏寿命は、OHラジカルとの反応速度によってほぼ決定される。従って、フロン代替物質の環境影響を評価するには、（1）対流圏におけるOHラジカルとの反応速度を求め、その大気中での寿命を評価すること、（2）その寿命からフロン代替物質排出源から消滅地点までの移動距離、その二次生成物濃度の予想を行

うこと、ことが重要である。また、フロン代替物質の開発にあたって、フロン代替物質に毒性がないことが重要な条件の一つである。フロン代替物質の毒性は動物を用いた急性毒性試験や慢性毒性試験で調べられているが、費用と時間がかかり過ぎることから、毒性評価を迅速に行う方法の開発が望まれている。

本研究では、我が国で開発されたフロン代替物質であるペンタフルオロプロパノール（5 F P）について、環境影響を評価するための前提条件となる大気中での寿命を見積もるためのレーザー誘起蛍光法の開発およびフロン代替物質および二次生成物の毒性を評価するための動物細胞を用いた迅速毒性試験法の開発を行った。

2. 実験方法

1) フロン代替物質とOHラジカル反応測定装置

ペンタフルオロプロパノール（ $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 5FP）とOHラジカルとの反応における



る速度定数を直接法によって求めるには、5 F P 過剰の条件においてOHラジカル自

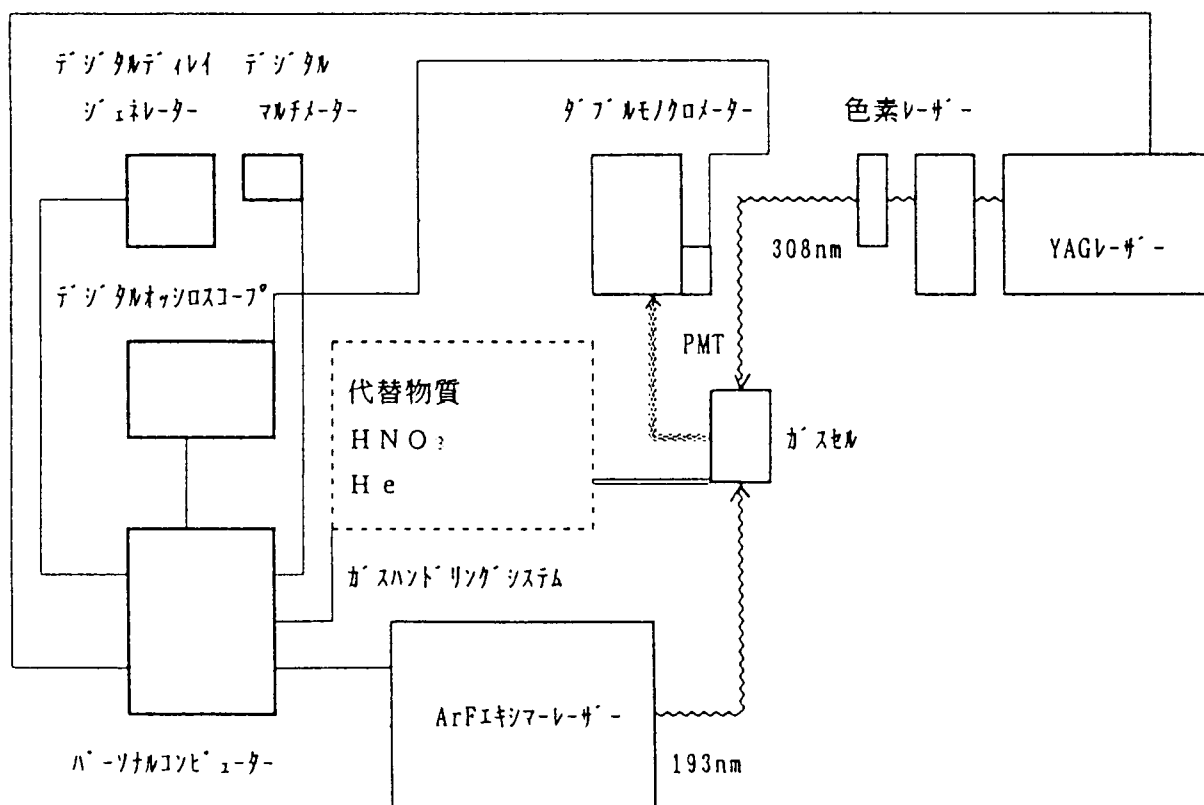


図1 フロン代替物質とOHラジカル反応速度測定装置ブロックダイアグラム

身の減衰速度を測定する方法と、OHラジカル過剰の条件において5 F Pの減衰を測定する方法があるが、本研究ではOHラジカルの減衰速度を測定することとし、装置に大幅な改良を加えた。このような測定を行う場合には、通常、サンプルを反応容器に流しながらレーザー照射を行う“流通法”が用いられるが、この場合には反応容器内での渦による拡散が大きくなる。そこで、サンプルガスの流れを止め、拡散速度を分子拡散の大きさまでに抑えた。この場合、サンプルセル内の全圧を高くすることが可能になるが、流通法と比較して、測定条件を安定させることおよび二次生成物の影響を除くことが困難になる。流通法を改良した本法では測定条件の設定をコンピューターを用いて自動制御することによって、低いOHラジカル濃度による測定の再現性を向上させた。

実験装置のブロックダイアグラムを図1に示した。ラジカルのソースとして硝酸(HNO_3)を用いた。これを5 F P及びブッファースガス(ヘリウム)と共に反応容器に封入した。これをArFエキシマーレーザー光(193 nm)を照射して硝酸を分解することによって、OHラジカルを発生させた。5 F Pと反応して時間と共に減少するOHラジカルの濃度をレーザー誘起蛍光法によって測定した。OHラジカルの励起にはYAGレーザー励起色素レーザーの第二高調波(308 nm)を用いた。励起されたOHラジカルの蛍光は二重分光器を通した後に光電子増倍管に代って検出し、その信号をデジタルオシロスコープを介してパーソナルコンピューターに導入した。

2) フロン代替物質の培養細胞をもちいた毒性試験装置

フロン代替物質として多くの化合物が開発されているが、これらの化合物がフロン代替物質となり得るか否かの判定基準の一つに毒性の有無がある。多くの化合物の毒性を簡便かつ、迅速に評価できる方法として培養細胞を用いる検索系の開発が望まれているが、フロン代替物質の多くは室温でガス体であること、脂溶性であること、薬物代謝酵素により毒性が出現する可能性が高いこと、毒性が弱いこと等が障害となり既存のin vitroの試験系での毒性評価が困難となっている。そこで、フロン代替物質のような特性を持つ化合物の細胞毒性と細胞遺伝毒性を迅速に評価する装置を開発した。

まず、濃度一定のガスを調整するためのシステムを開発した。フロン代替物質はin vitro試験では毒性が弱いことが予想されたので、比較的高濃度の暴露ガスが必要であった。そこで、ガス作成装置に用いているガスハンドリングラインに760 Torr迄測定できる真空ゲージを取り付け、テドラバッグにガス濃度として10%までの試料ガスを充填できる装置に改良した。また、培養細胞への暴露時間を6~24時間とするための改良も加えた。図2はガス暴露用培養角ビンを回転ドラムにセットした側面図である。培養角ビンの回転中にガスの導入と排出が可能で、ガスが長時間にわたり漏出することなく行える口栓を取り付けた。図3は培養細胞へのガス暴露装置の模式図である。前もって単層培養した細胞の入った培養角ビンに一定流量で対照ガス(清浄空気)と暴露ガス(試料ガス)を導入する装置である。培養角ビンの一面に張り付いた細胞は回転を受けながら培養ビン内に導入されたガスに培養液を介して接触する。

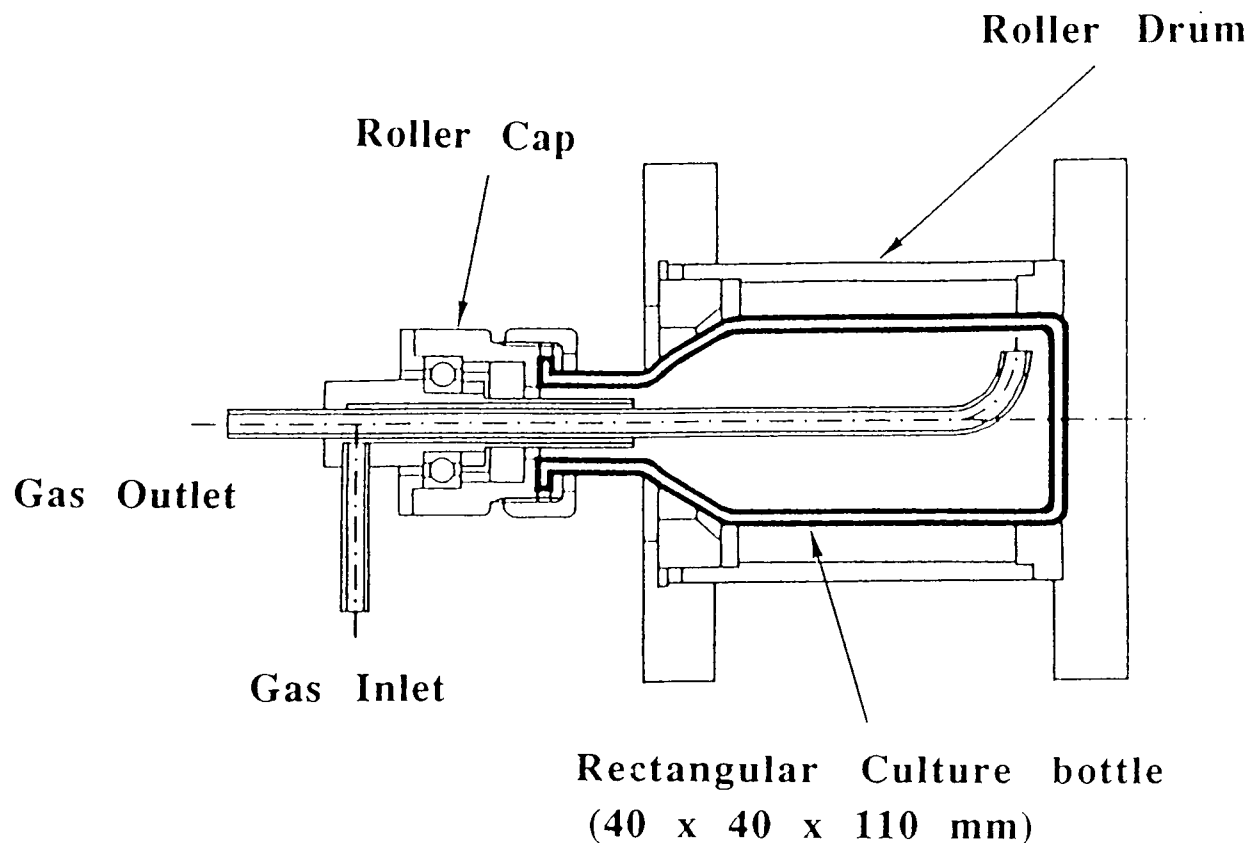


図 2. ガス暴露用培養角ビンと回転ドラム

概要；培養角ビン(127ml)は一面に培養細胞を単層培養し、暴露用溶液（S9混合液）と交換した後、回転をかけながらガスを導入できる特殊な口栓をとりつけ、回転ドラムにセットする。

3 実験結果と考察

1) 5FPとOHラジカルとの反応速度定数

OHラジカルの減衰速度は、エキシマーレーザーによるOHラジカルの生成と色素レーザーによるOHラジカルの検出の間の時間遅れの関数として、OHラジカルの蛍光強度をプロットすることによって得られた。時間の遅れはデジタルディレイジェネレータによって設定した。

5FPの圧力、HNO₃の圧力、時間遅れ、1サンプルに照射するレーザーパルス数、サンプルの交換およびその回数の設定、レーザー照射、データ処理等すべてをパーソナルコンピュータによって行った。単一の測定では十分なS/N比が得られないので、サンプルを交換して繰り返し測定を行うことにより、S/N比の向上を計った。このような測定を、5FPの分圧を変化させて行い、OHラジカルの減衰時定数の圧力依存性から反応速度定数を求めた。同様の測定を、サンプルの全圧を変化させて行い反応速度定数の安定性を確認した。この結果、一般には蛍光が消光しない1Torr程度の圧力領域で、 10^{-16} cc·molecule/secの反応速度まで測定可能になった。なお、この

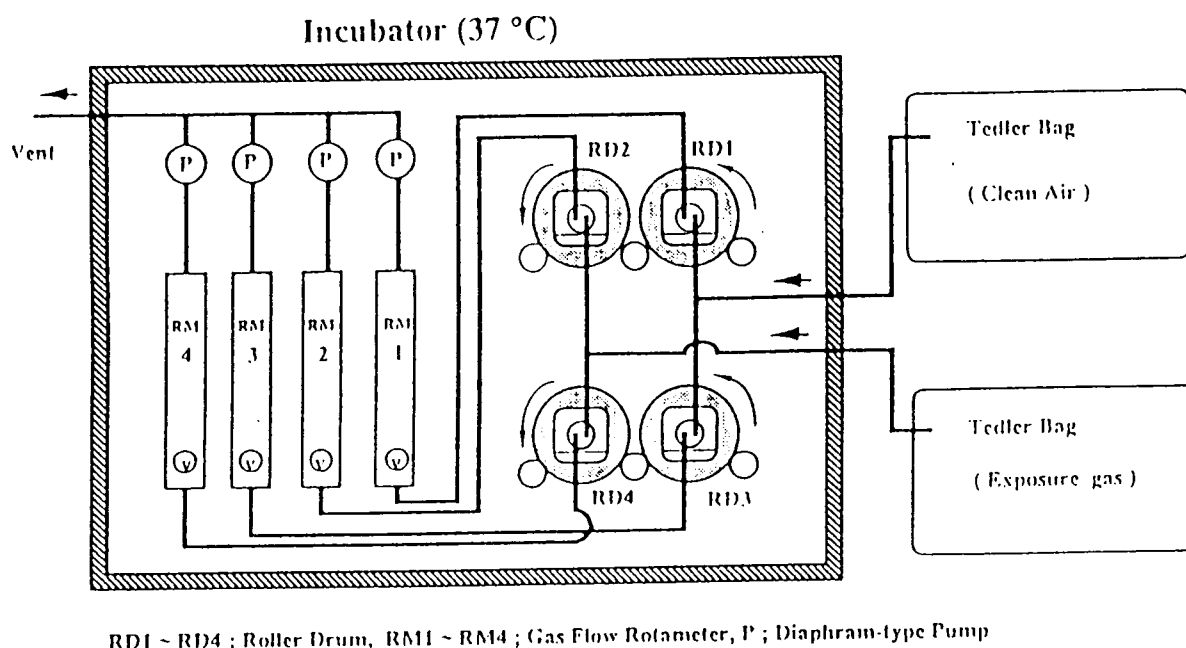


図3 . 培養細胞へのガス暴露装置

概要；①回転ドラム(RD1～RD4)をインキュベーター内の回転ピン培養装置に置き、口栓のガス導入部と排出部にテフロン管を配管する。②外部のガス導入管に対照用としての清浄空気のテドラー・バッグと暴露用ガスを調製して入れたテドラー・バッグを取り付ける。③ダイヤフラムポンプ(P)の吸引力によりRD1とRD3の培養角ピンには対照ガスを、RD2とRD4の培養角ピンには暴露ガスを導入する。④ガス流量はそれぞれの流量計(RM1～RM4)で100ml/分に調整する。⑤回転ドラムを0.5r. p. m. のスピードで回転させ、培養細胞にガス暴露を行う。

装置の性能を確認するために、速度定数が既に測定されている数種類の分子について速度定数の測定を行い、測定値の確認をおこなった。

この結果、5 F P と O H ラジカルの反応速度定数、 $(8.8 \pm 1.1) \times 10^{-14}$ cc·molecule/sec. が得られた。これは、5 F P から C F 2 を取り除いた分子構造を持つ類似物質 2、2、2-トリフルオロエタノールについて得られている速度定数、 9.55×10^{-14} (Timothy et al. J. Phys. Chem. 92, 5024, 1988) と同程度の値となっており、妥当な結果と考えられた。

2) ガス暴露装置の性能試験

急性毒性が比較的弱く、水に難溶性であり、しかも薬物代謝酵素により、その毒性(細胞遺伝毒性)が発現するベンゼンをモデル化合物としてガス暴露装置の試験を行った。ベンゼンはこれまで発癌性が指摘されてきたが、ベンゼンガスを用いたin vitroの系で、染色体異常や姉妹染色分体交換(SCE)誘発等の遺伝毒性を量一反応効果に基づいて証明した報告はない。従って、ベンゼンガスを用いて遺伝毒性の量一反応効果が見いだせれば、本装置の性能が十分であることの証明にもなる。

1～8%の濃度のベンゼンガスを培養細胞に暴露した場合の細胞毒性と細胞遺伝毒性（SCE）の濃度依存性を表1に示す。ガス暴露に際し、培養角ビン内に薬物代謝酵

表1. ベンゼンのガス暴露による細胞毒性（細胞増殖抑制率）と遺伝毒性（SCE誘発）

濃度 (%)	細胞増殖抑制率 (%)	SCE頻度/cell		
		対照	暴露	(正味誘発)
1	-8	9.28	9.52	{ 0.24 }
3	-25	9.26	9.44	{ 0.18 }
4	5	9.12	10.56	{ 1.44 }*
5	24	9.06	13.16	{ 4.10 }***
6	35	9.25	19.50	{ 10.25 }***
7	80	N.T.	強毒性のため観察できず	
8	178	N.T.		

*, *** ; 対照との間に有意差あり。

素を含むS9を加え、所定の濃度のベンゼンガスを30分間培養角ビン内に導入した。ベンゼンの導入後、さらに密閉状態で6時間暴露した。暴露後、新鮮な培養液と交換し、24時間培養することにより、細胞増殖抑制率、を指標とする細胞毒性とSCE誘発を指標とする遺伝毒性を調べた。ベンゼンは4%から濃度に依存して細胞増殖抑制が認められ、SCEの誘発も同様に濃度依存的に増加した。ベンゼンのガス体の暴露で細胞の遺伝毒性がin vitroの系で証明できたことは、本装置がフロン代替物質の毒性評価に十分耐えられるものであることを示すものと考えられた。

4 まとめ

本研究で開発したフロン等代替物質とOHラジカル反応速度測定装置は十分な性能を持っていることを確認することができた。この装置を用いて、和が国で開発され、OHラジカルとの反応速度が測定されていない5FPの反応速度定数を決定することができた。本装置は、更に遅い反応の速度定数を測定することが可能であり、本研究課題において有望な代替物質として開発された化合物を含め、種々のフロン等代替物質とOHラジカルとの反応速度定数の決定を行うことが可能となった。

また、フロン代替物質の毒性を検出して評価するシステムとして本研究で開発した方法はガス状物質の毒性を調べる装置としての特徴を備えている。モデル化合物として用いたベンゼンガスの細胞遺伝毒性が濃度依存的に検出されたことから、本装置の性能はフロン代替物質の毒性評価に十分役立つものと考えられた。