

都市大気粉じん中に存在する 酸化ストレス誘導キノンの測定と毒性評価

(研究助成金 70万円)

研究代表者 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授 鳥羽 陽
[北里大学大学院薬学研究科修士課程修了]

研究目的

近年、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症といったアレルギー疾患が特に若年層や都市部で増加している。その原因として挙げられる要因の一つに大気汚染がある。WHOの報告によれば、2012年の大気汚染による死亡者は世界で約700万人に上り、世界にとって大気汚染は依然として唯一最大の環境健康リスクである。特に燃焼排出源に由来する微小粒子状物質 (PM_{2.5}) やガス状物質の関与が指摘され、粒子の周囲に吸着して存在する有機化学物質が呼吸器疾患を悪化させる可能性がある。また、黄砂を含む大陸から飛来する粒子による越境大気汚染の健康影響も懸念される。

PM_{2.5}は、様々なサイズの粒子で構成され、中でもナノ粒子 (粒径100 nm以下) は容易に肺の最深部の肺胞まで達し、肺胞での呼吸運動により循環器系に移行すると推定され、粒子表面に吸着する有害化学物質の毒性が強く発現する可能性がある。産業的、意図的に生産されるナノ粒子自体の物理的作用による健康影響が取りざたされているが、燃焼により非意図的に大気環境中に存在する環境ナノ粒子中の毒性物質の評価は十分ではない。近年ディーゼル排ガス等の燃焼に由来するPM_{2.5}中に活性酸素種 (ROS) を生成する酸化ストレス誘導キノン類が同定され、キノン類が代謝される過程でスーパーオキシドといったROSを産生し、その産生に関わるレドックスサイクルにおいて触媒的に働くため、微量でも動脈硬化などの循環器疾患の進展やアレルギー性疾患 (喘息など) の悪化、発がんに関与する可能性が指摘されている。キノン類の燃焼における一次生成や大気内二次生成の可能性が指摘され、大気中の粒子状物質から数種が同定されている。しかしながら、都市大気におけるキノン類のナノ粒子を含む

粒径分布、環境動態や発生源、各粒径ごとのROS産生能に対する寄与度は不明である。従って、粒径ごとのキノン濃度とROS産生に関する毒性との関係を明確にすることは、環境粒子の健康影響を評価する上で重要である。

本研究では、日本国内の3都市（東京、大阪、金沢、北九州）で夏季、冬季及び黄砂期に大気粉じんをナノ粒子（PM_{0.1}）まで粒径別に捕集し、分級別にキノン類、金属類、発生源マーカーを測定し、同時に粒径別に各種*in vitro*アッセイによりROS産生能に関する毒性評価を行い、ROS産生毒性に対するキノン類の寄与や金属類の活性に対する相加相乗作用の評価、及び発生源解析を行うことを目的とする。

研究実施計画の概要

- 1) PM_{2.5}と心肺疾患や肺がんによる死亡率と関係することは免疫学的調査により判明しており、粒子中の有機物質が肺の炎症、喘息の悪化や肺がんを引き起こす際に酸化ストレスが関与する。体内環境への移行や肺胞沈着率の異なる粒子径ごとにキノン類によるROS曝露リスクを評価することは、大気粒子の健康影響を解明する上で有用な情報をもたらす。具体的に、以下の項目に従って研究を実施する。
- 2) 粒子の捕集は、東京（九段下）、大阪（東成区）、金沢（角間町）、北九州（八幡西区）の4か所で行う。
- 3) 粒子の捕集方法は、PM_{0.1}大気サンプラー（Furuuchi et al., *Aerosol. Air Qual. Res.*, 10, 185-192 (2010)) を使用し、40 L/minでテフロン（石英繊維）フィルターまたは慣性フィルターに大気粒子を6段階（>10 μm, 10~2.5 μm, 2.5~1.0 μm, 1.0~0.5 μm, 0.5~0.1 μm, <0.1 μm）の粒径に分級して24時間ごとにフィルターを交換し、冬季（平成28年1月）、黄砂期（4-5月）、夏季（8月）にそれぞれ1週間捕集する。
- 4) テフロン（慣性）フィルターに捕集した粒子状物質は、恒量秤量して粒径別に粒子濃度を算出する。
- 5) テフロン（慣性）フィルター試料について有機物質の分析を行い、1~5環の37種のキノン類を申請者の開発によるGC-MS/MS法により定量する。また、木材燃焼マーカーであるレボグルコサンをGC-MSで、主要な多環芳香族類（PAH）、多環チオフェン類（石炭燃焼マーカー）及びそのニトロ体（ディーゼル排ガスマーカー）を蛍光検出HPLCで測定する。粒径ごとに測定して各化合物の粒径分布を解析する。
- 6) 石英繊維フィルターに捕集した試料について、有機炭素（OC）及び元素状炭素（EC）をカーボンエアロゾル分析装置（Sunset）によりIMPROVE法で測定して発生源解析を行う。
- 7) 無機元素は、捕集した石英繊維フィルターについて蛍光X線分析法で測定する。
- 8) ROS産生能*in vitro*測定には、ジチオスレイトール（DTT）アッセイ及びA549細胞によるDCFDAアッセイを用いる。各キノン類の活性値（毒性係数）を測定してから、有機物質の定量に用いた各種抽出物について活性評価を行い、キノンの毒性係数を用いて各物質の寄与度と粒径別肺胞沈着率

を考慮した毒性等量を算出する。次に、無機物画分について、水抽出物、及び抽出していない捕集済みフィルターについてROS産生能を評価する。さらに、有機物及び無機物画分の併用下でROS産生能に対する相加相乗効果を評価し、キノン類の酸化還元サイクルへの遷移金属等の触媒としての作用の有無を確認する。

I 背景

近年、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症といったアレルギー疾患が特に若年層や都市部で増加している。その原因として挙げられる要因の一つに大気汚染がある。WHOの報告によれば、2012年の大気汚染による死亡者は世界で約700万人に上り、世界にとって大気汚染は依然として唯一最大の環境健康リスクである。大気汚染物質の1つである大気中の粒子状物質（PM）は、自動車排ガスや工場からの排気、作物残渣の焼却、木材燃焼、タバコなどの燃焼発生源、あるいは大気内反応による二次生成等から生成する大気中の重要な汚染物質である。PMへの曝露と罹患率や死亡数の増加との間には関連性があり、喘息や慢性閉塞疾患（COPD）、肺癌などの呼吸器疾患だけでなく、心筋梗塞、心不全、脳血管障害などの循環器疾患を招くことに関心が高まっている。また、高齢者や妊婦、幼児や先天性疾患を持つ人々は、特に健康への悪影響が大きいことも示されている。PMへの曝露時間に関わらず、呼吸器の炎症、免疫応答、自律神経系の乱れが増強することも観察されているが、PMが健康に悪影響を及ぼす仕組みについての詳細は未だ不明確である。最近の研究で、活性酸素種（ROS）産生や細胞の酸化ストレスと関係していることが分かってきている。

酸化ストレスはスーパーオキシドラジカル（ $O_2^{\cdot-}$ ）や過酸化水素、ヒドロキシラジカルのような活性酸素種（ROS）の過剰生成あるいは抗酸化能力の欠損などにより、生体内の酸化反応・抗酸化反応のバランスが前者に傾くことで引き起こされる。通常、ROSは生体内において、グルタチオンなどの抗酸化物質や抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼにより消去されるが、そのバランスが崩れ、酸化ストレスにさらされると、ROSは核酸や蛋白質、脂質を酸化変性させ、細胞機能を障害し、癌や呼吸器疾患、循環器系疾患などを引き起こす。実際に、PMやディーゼル排ガス粒子を細胞に曝露させる *in vitro* 試験において、PMの曝露と細胞への酸化ストレスと関連性が見出されており、PMの酸化ストレス誘導能に寄与する原因物質の究明が必要である。

PMの健康影響が議論される中で、特に微小粒子状物質（ $PM_{2.5}$ ）の関与が指摘され、粒子の周囲に吸着して存在する有機化学物質が呼吸器疾患を悪化させる可能性が考えられている。大気中の粒子状物質の中で、超微小粒子あるいはナノ粒子（粒径100 nm以下）は、 $PM_{2.5}$ （粒径 $2.5\mu m$ 以下）よりもさらに小さく、容易に肺の最深部の肺胞まで達し、肺胞での呼吸運動により循環器系に移行すると推定され、粒子表面に吸着する有害化学物質の毒性がより強く発現する可能性がある。しかしながら、 $PM_{2.5}$ に含まれる化学物質の粒径別濃度や毒性に関する評価はほとんど行われていない。

PMに含まれる代表的な有機物として、多環芳香族炭化水素類（PAH）やその誘導体が報告されてお

り、酸化体の一種であるPAHキノン類（PAHQ）は、PAHと同様に不完全燃焼により生成し、大気中に放出され、いくつかのPAHQについて大気中PMやガス相の濃度が報告されている。一次発生源として、ディーゼル粒子がPAHQの特異的な発生源である可能性が示される一方で、オゾンやラジカル種による大気内反応による二次生成も報告されている。しかしながら、燃焼由来の一次生成及び大気内反応による二次生成、いずれについても十分な理解が進んでいない。

PAHQは生体内において、レドックスサイクルを介して、ROSを過剰生成することが報告されている（図1）。レドックスサイクルには2種類の還元反応があり、一電子還元反応ではNADPH-シトクロムP450還元酵素等によりPAHQから不安定なセミキノンラジカルが生成し、キノンに再酸化される際に分子状酸素存在下で $O_2^{\cdot-}$ を生成する。一方の二電子還元反応では、NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1) やaldoketo reductase (AKR) などの還元酵素により二電子還元を受け、ヒドロキノン体やカテコール体が生成し、 $O_2^{\cdot-}$ と反応することでセミキノンラジカルと過酸化水素が生成する。

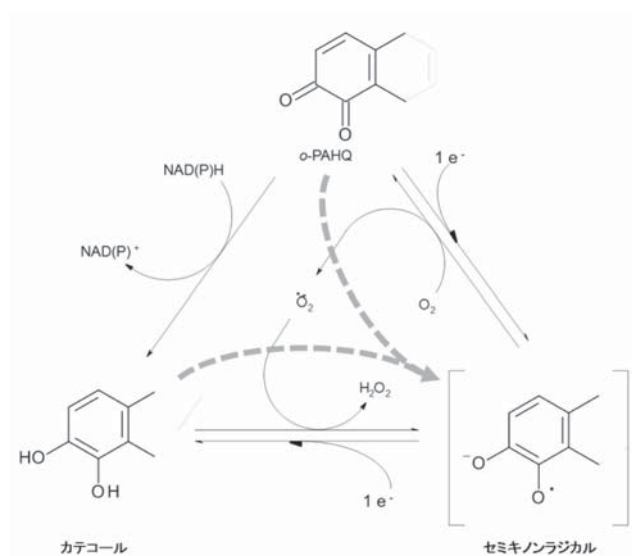


図1 o-PAHQのレドックスサイクル

る。また、カテコール体とPAHQとの不均化反応によってもセミキノンラジカルが生成し、セミキノンラジカルはキノンに再酸化されて $O_2^{\cdot-}$ を生成する。この反応過程においてPAHQは触媒的に作用し、ROSの過剰産生を引き起こす。PAHQが生体内でROSを過剰生成し、酸化ストレスを誘発する可能性があることから、PAHQはPMの曝露と関連する疾患の原因物質ではないかと疑われている。

大気中のPMから数種のPAHQが同定されているが、都市大気におけるPAHQのナノ粒子を含む粒径分布、環境動態や発生源、各粒径ごとのROS産生能に対する寄与度は不明である。従って、粒径ごとのPAHQ濃度とROS産生に関する毒性との関係を明確にすることは、PM粒子の健康影響を評価する上で重要である。本研究では、日本国内の東京と大阪において夏季及び冬季に大気中のPMをナノ粒子（PM_{0.1}）まで粒径別に捕集し、分級別にPAHQ濃度を測定し、同時に粒径別にジチオスレイトール（DTT）アッセイによりROS産生能に関する毒性評価を行い、ROS産生毒性に対するPAHQ類の関与について解析することを目的とした。

II 方 法

1. 大気サンプリング

粒子の捕集は、東京（九段下）及び大阪（東成区）の2か所で実施した。捕集方法は、PM_{0.1}大気サンプラー（図2）を使用し、40L/minでテフロンバインダーフィルター（T60A20）または繊維状の慣性フィルターに大気中の粒子状物質を6段階（ $>10\mu\text{m}$ 、 $2.5\sim 10\mu\text{m}$ 、 $1.0\sim 2.5\mu\text{m}$ 、 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ 、 $0.1\sim 0.5\mu\text{m}$ 、 $<0.1\mu\text{m}$ ）の粒径に分級して24時間捕集した。捕集期間は冬季（12-1月）と夏季（8月）にそれぞれ1週間とした。捕集後のフィルターは、粉じん濃度、PAHQ濃度、ROS産生能の測定に使用した。

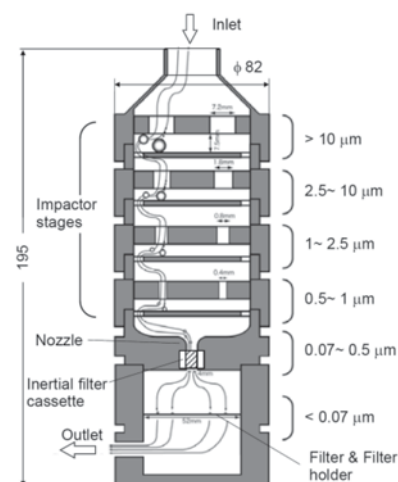


図2 PM_{0.1} 大気サンプラー

2. 大気粒子試料の抽出と誘導体化

各粒径別の大気粒子を捕集したフィルター試料を三角フラスコに入れ、内部標準物質として6種類の重水素化PAHQを添加し、試料が十分浸る量のジクロロメタンを加えて20分間超音波抽出した。抽出液をろ紙でろ過してからジメチルスルホキシドを加え、ジクロロメタンを留去した。次にトルエンと5%塩酸-飽和塩化ナトリウム溶液を加えてボルテックスで攪拌した後に6,000 rpmで遠心することで分離した二層のうち上層のトルエン層を分取した。水層に再びトルエンを加え、繰り返し抽出して1度目の抽出液と合わせた。抽出液を減圧濃縮して得られた濃縮液を窒素ガスで脱気したアセトニトリルに溶解してねじ蓋付き試験管に入れ、亜鉛粒、ジチオスレイトール（DTT）と誘導体化試薬（BSA+TMCS+TMSI）を添加し攪拌してから80°Cで30分間反応させてトリメチルシリル（TMS）誘導体とした。反応後、ヘキサン及び水を加えて反応を停止させてから二層分離させ、上層のヘキサン層を分取した。水層にさらにヘキサンを加えてもう一度抽出した。抽出液を乾固しヘキサン（200 μL ）に再溶解してから遠心式フィルター（孔径0.45 μm ）でろ過し、GC-MS/MSでの分析用検体とした。

3. GC-MS/MSによるTMS誘導体化PAHQの分析

TMS誘導体化PAHQの分析は、Thermo Fisher Scientific社製GC-MS/MS（TSQ Quantum GC）システムを用いた。カラムはDB-5MS（30m \times 0.25mm i. d., 0.25 μm , J&W）を使用し、50-310°C（25°C/min, 7分間維持）の昇温プログラムで分析した。その他のGC条件は、注入口温度250°C、スプリットレスモード、注入量1 μL とした。MS条件は、EIモード、イオン源温度300°C、インターフェース温度280°Cとし、イオン化電圧は70eVとした。定量は、[M]⁺イオンをプリカーサーイオンとして最も強度の高いプロダクトイオンを用いた選択反応モニタリング（SRM）モードで測定した。測定対象とした40種のPAHQの構造と名称を図3に示した。

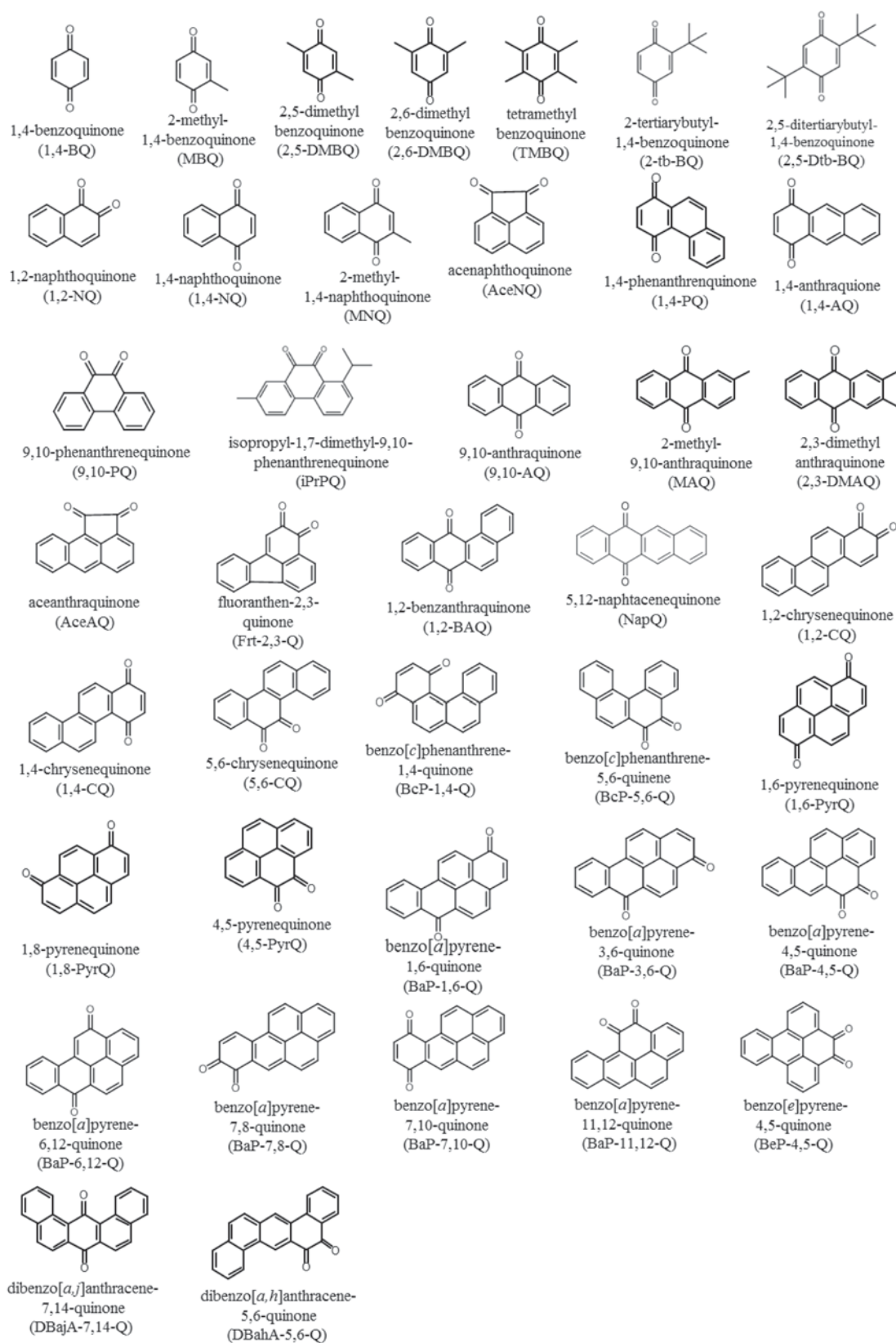


図3 解析対象としたPAHQの構造式

4. ROS産生能を評価するためのDTTアッセイ

0.1Mリン酸緩衝溶液を37°Cに加温後、窒素ガスにより脱気してから褐色バイアル瓶 ($n=6$) に移し、再び加温 (5分) した。DTT+PAHQ (DTTとPAHQを添加した0.1Mリン酸緩衝液試料) ($n=3$) とDTT ブランク (DTTのみ添加した緩衝液) ($n=3$) を37°Cに加温しながら振盪させ、反応時間0, 5, 10, 15分後に反応液を採取して10%トリクロロ酢酸により反応を停止させた。未反応のDTTを1 mM 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) と反応させ、生成物である2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB) の412 nmにおける吸光度を測定し、参照試料の吸光度を差し引いた。参照分を差し引いた吸光度からTNBを定量し、DTT量に換算した。0分, 5分, 10分, 15分に対するDTT濃度 (μM) の直線グラフにおいて、DTTとPAHQ標準物質, あるいはDTTと粒径別PM抽出物の傾きとブランクの傾きとの絶対値の差をDTT消費速度とした。

III 結果と考察

1. 粒径別粒子状物質 (PM) 濃度

図4に東京及び大阪で捕集された粒径別PM平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) を示す。各粒径を合計したPM_{2.5}濃度は、東京の夏季で9.7~43.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 冬季で10.5~31.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。一方、大阪の夏季では2.6~15.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 冬季で8.0~25.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。季節間で比較すると、東京では夏季の方が高く、大阪では冬季の方が高かった。夏季では東京、大阪間での差が大きかったが、冬季では東京、大阪間での差が小さかった。東京の夏季の結果において、環境基準の日平均値 (35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) を超えた日が2日間あり、他の日も年平均値 (15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) を超える日が多かった。粒径別の濃度分布は、両都市においてPM_{0.5-1.0}画分及び粗大側のPM_{2.5-10}画分にピークを示した。また、降雨が観測された日には、湿性沈着によりPM濃度の低下が観察された。

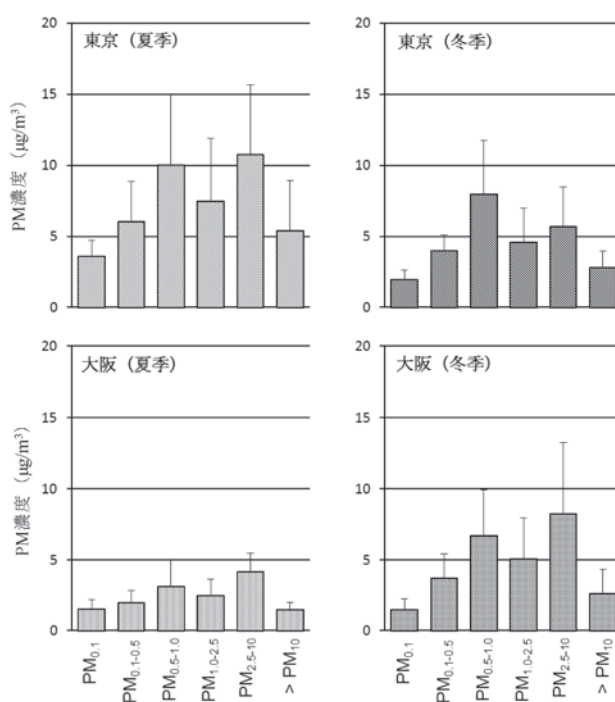


図4 東京と大阪で捕集された粒径別PMの濃度

2. 粒径別PAHQ濃度

図5に東京及び大阪で捕集された粒径別PM試料中のPAHQ総濃度の平均 (pg/m^3) を示す。ブランクの影響が大きいBQ類を除いた総PAHQ濃度は、東京の夏季で580~932 pg/m^3 、冬季で179~462 pg/m^3 であった。一方、大阪の夏季では179~367 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、冬季で360~1016 pg/m^3 であった。東京の夏季で高濃度となったのは、二次生成由来のPAHQ濃度が上昇したことが考えられる。PAHQの粒径分布について、両地点、いずれの季節においても $\text{PM}_{2.5}$ 以下に分布が集中しており、特に $\text{PM}_{0.5-1.0}$ もしくは $\text{PM}_{1.0-2.5}$ 画分にピークが観察された。PMの粒径分布には3つの濃度ピークが存在し、凝縮や凝固によって形成され、 $0.15\sim 0.5\mu\text{m}$ にピークを持つ蓄積モード付近のサイズ

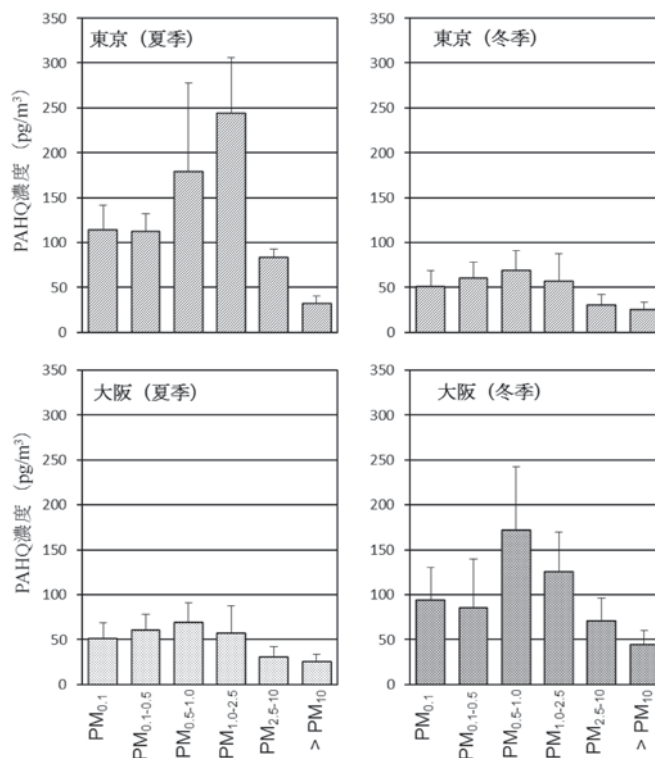


図5 東京と大阪で捕集された粒径別PM中PAHQ濃度

の粒子にPAHQが高い濃度で分布することが分かった。両都市間のPAHQの組成は類似しており、 $9,10\text{-AQ} > 7,12\text{-BAQ} > \text{MAQ} \approx \text{BaP-6}, 12\text{-Q} > 9,10\text{-PQ} \approx 4,5\text{-Pyr-Q}$ の順に濃度が高かった。夏季と比較すると3環の9,10-AQやMAQ, 9,10-PQの濃度が上昇していた。これは気温が低いことで3環PAHQがガス層から粒子層へ移行したことが考えられる。また大きな差が見られたPAHQは7,12-BaAQとBaPQ類であり、夏季の濃度が大幅に高かった。これらは日射量の多い夏季で二次生成が亢進したことが理由として考えられる。濃度の高い9,10-AQ, MAQ, 4,5-Pyr-Qは自動車標準粉塵やトンネル内で高い濃度が測定され、MAQは自動車由来であるという可能性が過去に報告されている。また、7,12-BaAQは実験的に二次生成が確認されている。一部のPAHQが高濃度に存在する背景には、親化合物であるPAH自体の反応性が高いことが考えられ、PAHQの発生源として燃焼由来の一次生成と大気内反応による二次生成が複合的に影響しており、濃度の高いPAHQは特に二次生成の寄与が大きいと考えられる。一方、BcP-1,4-Q, 1,2-CQ, BaP-7,10-Q, BaP-7,8-Qは、いずれの試料についても検出できなかった。このことは、燃焼や大気内反応の過程において、母核上の位置によって反応性に差があり、生成しにくいものと推定された。

3. 各PAHQのROS産生能の評価

PM試料の評価の前に、図3に示した各PAHQのROS産生能について評価した。ポジティブコントロールとして9,10-PQの強度を常時測定した結果、DTT消費速度は $0.89 \pm 0.07 \mu\text{M}/\text{min}$ ($n=114$, 5ヵ月以上)となり、RSDは10%以下と高い精度で評価することができた。Charrierらは、 $0.71 \pm 0.09 \mu\text{M}/\text{min}$ ($n=74$, 11ヵ月以上)と報告しており、助成者らのデータはその結果とも一致していた。各PAHQについて5段階の濃度でDTTアッセイを行い、濃度に対するDTT消費速度式を算出した。 y をDTT消費速度 ($\mu\text{M}/\text{min}$)、 x をDTT+PAHQ中のPAHQ濃度 (μM)としたときのグラフの傾きを酸化能の強度と定義して1,4-BQを1とした相対強度比で表した(表1)。評価に使用した各PAHQの濃度範囲は、活性強度に合わせて変化させた。各PAHQのROS産生能を評価した結果、*o*-PAHQ類は酸化能が高く、*p*-PAHQ類は酸化能が非常に低い傾向があった。*o*-PAHQ類の内、DBahA-5,6-Qが最も高い酸化能を示し、1,4-BQの1852倍の強度であった。従来、活性の強いPAHQとして9,10-PQがよく知られており、ディーゼル排ガスなどの環境試料中に存在することが報告されてきたが、DBahA-5,6-QやBeP-4,5-Q、また*p*-PAHQ類の内、2,5-DMBQ, 2,6-DMBQ, 2tb-BQについては、0分のDTT濃度が初期濃度より低下し、この傾向はPAHQ濃度を増加させるにつれて顕著に見られた。さらに0分、5分、10分、5分と時間が経過するにつれてDTTを消費したものの、PAHQ濃度とDTT消費速度に直線関係が得られなかった。以上のことから、レドックスサイクル以外のDTTとPAHQとが共有結合するマイケル付加反応も起こったと推定された。一方、未分類のPAHQ類の中ではBaP-6,12-Qが1,4-BQの976倍で酸化能が最も高く、AceAQはDTTの消費をほとんど示さず、不活性と判断した。PAHQには母核構造やケトン基の位置の異なる数多くの異性体が存在し、それぞれの物理化学的性質は類似しているが、ROS産生や細胞毒性が異なることが報告されている。ヒトA549細胞を用いた細胞毒性とROS産生を評価した*in vitro*実験では、特に*o*-PAHQsはROSを過剰産生して細胞生存率が著しく低下した。これまでに、本研究ほど多数のPAHQについてROS産生能を調査した例はなく、今後標準的な活性指標となり得る。

表1 PAHQのROS産生能の相対活性強度比

PAHQ	濃度範囲(μM)	速度式 ^{a)}	R ²	強度比
<i>o</i> -PAHQ				
DBahA-5,6-Q	0.01 - 0.03	y=34.821x	0.97776	1852
BeP-4,5-Q	0.0125 - 0.1	y=23.836x	0.9912	1268
9,10-PQ	0.0125 - 0.1	y=18.532x	0.9916	986
BaP-4,5-Q	0.025 - 0.125	y=17.361x	0.99859	923
BcP-5,6-Q	0.025 - 0.125	y=16.124x	0.97758	858
4,5-PyrQ	0.0125 - 0.1	y=15.58x	0.99418	858
5,6-CQ	0.05 - 0.25	y=8.6603x	0.97068	461
BaP-11,12-Q	0.025 - 0.15	y=7.9855x	0.98505	425
Frt-2,3-Q	0.025 - 0.125	y=5.9568x	0.98276	317
1,2-NQ	0.025 - 0.3	y=4.3959x	0.99345	234
iPr-7M-9,10-PQ	0.05 - 0.25	y=3.6432x	0.9775	194
BaP-7,8-Q	0.05 - 0.4	y=3.3563x	0.98797	179
1,2-CQ	0.5 - 4	y=0.4785x	0.97213	25
<i>p</i> -PAHQ				
1,4-AQ	0.15625 - 1.25	y=1.2297x	0.97126	65
1,4-NQ	0.25 - 1.25	y=0.7597x	0.98814	40
BaP-7,10-Q	0.3814 - 0.5085	y=0.6529x	0.99999	35
MNQ	0.5 - 3	y=0.5098x	0.98935	27
1,4-PQ	1 - 3	y=0.351x	0.97558	19
BcP-1,4-Q	0.625 - 5	y=0.2706x	0.96598	14
1,4-CQ	0.5 - 3	y=0.1535x	0.97016	8
NapQ	2 - 5	y=0.078x	0.94784	4
1,6-PyrQ	2.35 - 4.7	y=0.0677x	0.95258	4
2,5-Dtb-BQ	2.5 - 20	y=0.0614x	0.99221	3
TMBQ	2.5 - 20	y=0.0457x	0.93582	2
DBajA-7,14-Q	2.5 - 5	y=0.0408x	0.99914	2
MBQ	2.5 - 20	y=0.0201x	0.90013	1
1,4-BQ	2.5 - 20	y=0.0188x	0.95491	1
9,10-AQ	2.5 - 20	y=0.0099x	0.9461	0.53
MAQ	15 - 20	y=0.0067x	0.96685	0.36
DMAQ	15 - 20	y=0.0035x	0.99877	0.19
BaA-7,12-Q	5 - 20	y=0.0087x	0.90252	0.05
2,5-DMBQ	付加反応より活性算出不能			
2,6-DMBQ	付加反応より活性算出不能			
2tb-BQ	付加反応より活性算出不能			
Uncategorized PAHQ				
BaP-6,12-Q	0.01 - 0.12	y=18.34x	0.97258	976
BaP-3,6-Q	1.25 - 2	y=0.5127x	0.9519	27
AceNQ	10 - 20	y=0.0535x	0.90387	3
AceAQ	不活性			

4. 粒径別PMのROS産生能評価とPAHQの寄与の解析

粒径別PMの酸化能測定は、反応溶液中の粒子濃度を $10\mu\text{g/mL}$ 程度にPM抽出液を調製してDTTアッセイを行った。国内都市において分級捕集した大気試料では、各画分のPM絶対量が少なく、大阪の夏季試料しか酸化能を測定することができなかった。吸光度を測定するDTTアッセイは、試料濃度が低い場合や試料の活性が低い場合に感度不足で適用できないことがわかった。PM抽出物のDTT消費速度 ($\mu\text{M}/\text{min}$) をPM質量 (μg) で除することにより質量標準化DTT消費速度 ($\text{pmol}/\text{min}/\mu\text{g}$) に換算してPM質量あたりのROS産生能として算出した (図6)。各画分のROS産生能は、 $2.9\sim 30.8\text{ pmol}/\text{min}/\mu\text{g}$ であり、 $\text{PM}_{0.1-0.5}$ の画分の活性が最も高かった。 $\text{PM}_{2.5}$ のROS産生能では、より微小側の $0.5\mu\text{m}$ 以下の粒子の活性が重要であることが初めて明らかとなった。つまり $\text{PM}_{0.5}$ や $\text{PM}_{0.1}$ といった粒子が肺胞での呼吸運動により循環器系に移行してPAHQ等のROS産生物質の毒性がより強く発現する可能性がある。各PAHQのDTT消費速度式 (表4) にPM試料中の40種PAHQ濃度 (図5) を代入して算出したDTT消費速度の合計値を算出してPMのROS産生能に対して寄与度の高いPAHQを明らかにした。その結果、1,2-CQ, 9,10-PQ, 5,6-CQ, 4,5-PyrQ, DBahA-5,6-Qといった o -体と未分類のBaP-6,12-Qが全活性に対して2%以上の寄与を示し、特にBaP-6,12-Qは最大で52%の寄与を示した。ROS活性に関する粒径別評価は、各粒径のPAHQの濃度分布とは異なっており、PMに含まれる物質濃度と毒性活性を組み合わせた評価が重要であることが分かった。

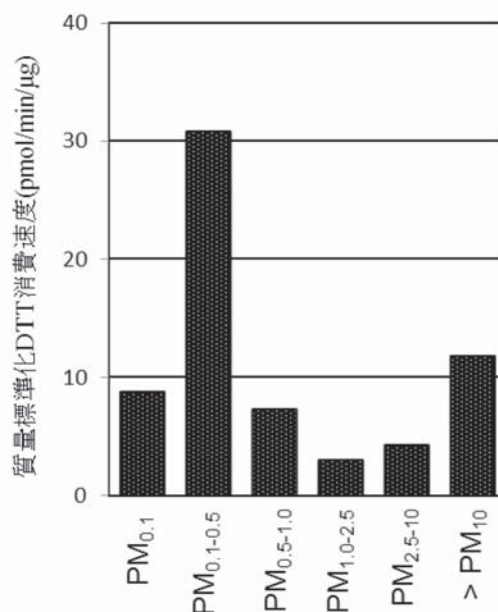


図6 大阪で捕集された粒径別PM抽出物のROS産生能

IV まとめ

東京及び大阪で捕集された粒径別PM試料中のPAHQを測定することに成功し、 $\text{PM}_{2.5}$ 以下の粒径にPAHQの分布が集中しており、特に $\text{PM}_{0.5-1.0}$ もしくは $\text{PM}_{1.0-2.5}$ 画分にピークが観察された。大気中PMをナノ粒子まで分級捕集すると、従来の分析法では感度不足で測定が困難であったが、助成者の開発によるGC-MS/MS法はナノ粒子の分析にも十分な感度を有していることから、PM粒子のROS産生に基づくPAHQの毒性評価研究に有用である。次に、40種のPAHQについてDTTアッセイによりROS産生能を評価した結果、 o -PAHQ類は酸化能が高く、 p -PAHQ類は酸化能が非常に低い傾向があった。粒径別PM抽出物についてROS産生能を評価したところ、 $\text{PM}_{0.1-0.5}$ の画分の活性が最も高く、 p -PAHQ等の寄与が大きかった。分級捕集したPM試料の濃度が低く、吸光度を測定するDTTアッセイでは感度不足で適

用できないケースが多かった。このことから、簡便、かつ高感度なROS産生能の評価方法の開発は今後の課題であると言える。ROS活性を含めた大気中PMの評価は、各粒径のPAHQの濃度分布とは異なっており、物質濃度と毒性活性を組み合わせた評価が重要であることが分かった。

V 謝 辞

本研究への助成を賜りました公益財団法人総合健康推進財団に深く感謝致します。