

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月14日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510010

研究課題名（和文） 含酸素PAH類の大気内二次生成機序ならびに環境動態解明と生体影響評価

研究課題名（英文） Atmospheric secondary formation and health effect of oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons

研究代表者

亀田 貴之（KAMEDA TAKAYUKI）

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：50398426

研究成果の概要（和文）：本研究では、環境中に排出された多環芳香族炭化水素（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons：PAH）類の大気内反応により二次生成する、含酸素PAH誘導体の生成機構ならびに環境動態を明らかにするために、模擬大気実験系を用いた実験ならびに実大気観測を行うとともに、バイオアッセイによってそれらによる生体影響の評価を試みた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the secondary formation and behavior of oxidized polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives in the atmosphere and to evaluate adverse health effects induced by the compounds. We performed both chemical reaction experiments of PAHs in the air using a reaction-chamber and atmospheric observations in order to investigate the secondary formation of oxidized PAHs and their impact on human health.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：大気環境科学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：含酸素PAH，二次生成，生体影響

1. 研究開始当初の背景

大気中浮遊粒子状物質から検出される多環芳香族炭化水素（PAH）やそれらのニトロ化体（NPAH）は、大気の間接変異原性および直接変異原性の寄与物質として問題視されている。近年、動物に対する曝露実験により、ディーゼル排ガスへの曝露が生殖系に異常をきたすことが報告され、燃焼排ガスに内分泌かく乱作用を有する化合物が含まれることが示されたが、この作用本体の一つとして、PAH類がエストロゲン様/抗エストロゲン作用あるいは抗アンドロゲン作用などの

内分泌かく乱活性に寄与していることも明らかにされている。

従来これらのPAH類は、ディーゼル内燃機関等における化石燃料の不完全燃焼により一次的に排出されるものが大半であるとされてきた。ところが近年では、PAH置換体の中に一次排出起源からは見出されない異性体も環境中に存在し、それらの大気中濃度が一次排出異性体の濃度をはるかに凌駕するケースがあることが分かってきた。このような例はNPAHについて比較的よく研究されており、大気中におけるPAHと窒素酸化

物との反応によって二次生成した結果であると考えられている。

一方、PAHの水酸化体(OHPAH)や酸化体(OPAH)は強い内分泌かく乱活性や活性酸素種生成能、アレルギー誘導活性などを有するが、これらに関する生成過程は明確にされていない。一部のOHPAH・OPAHは、PAH・NPAHを凌ぐほどの高濃度で大気中に存在することが報告されており、それらについてもNPAH同様大気中の二次生成反応により母核のPAHから生成することが予想される。しかしながら、その反応機構および環境大気内動態などは全く不明のままである。

2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえると、強い内分泌かく乱活性等を有するOHPAH/OPAH等含酸素PAHの生成過程を明らかにし、大気内動態を把握することは、これらの生体への影響を評価する上で非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、PAH誘導体の中でも水酸化体及び酸化体に焦点を絞り、その発生過程並びに大気内挙動を明らかにし、内分泌かく乱作用などに関わる生体影響の評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NPAHの光酸化反応による含酸素PAH誘導体の生成

①1-nitropyrene (1-NP) への光照射実験

1-NPのメタノール溶液(10 μM) 1 Lを2重反応ガラス管(パイレックス製、内管外径60 mm、外管内径80 mm)の外側部分(体積約1.3 L)に投入し、ブラックライトランプ(FL20 s-BLB, 20W, TOSHIBA, 波長範囲300~400 nm, 極大波長350 nm) 6本を取り付けた光照射装置内に静置し、2時間紫外光を照射した。本照射装置により、反応管表面に照射される紫外光の絶対光量は 5.2×10^{16} photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。反応中の温度上昇を防ぐため、照射中は照射装置全体に室内空気を送風した。反応中の照射装置中温度は $26 \pm 2^\circ\text{C}$ であった。反応後に2重反応ガラス管より反応溶液を2 mL採取し、適宜希釈してHPLCでの測定に供した。

②1-NP分解生成物の精製

液々分配および順相HPLCを用いて、得られた分解生成物の単離・精製を行った。

③ 1-NP分解生成物の同定

得られた1-NP分解生成物を、LC-MS/MS, $^1\text{H-NMR}$ および化学発光検出HPLCを用いて同定した。

(2) 含酸素PAH類の光分解反応速度定数の導出

①OPAHへの光照射実験

10 μMの9種OPAH(アセトニトリル溶

液) 15 mLをメスシリンダーを用いて量り、これをガラス管(パイレックス製、内径100 mm、内容量3 L)に入れた。これをCell-production Roller Apparatus (BELLCO CLASS INC, 和研薬株式会社)を用いて回転させながら、 N_2 ガスを導入してアセトニトリルを留去し、試料をガラス反応管内壁に塗布した。これをブラックライトランプ10本を取り付けた光照射装置内に静置し、0~10時間の各時間紫外線を照射した。各時間の紫外線照射後、室温まで冷却したガラス管にアセトニトリル15 mLを加え、5分間回転させ管壁の試料を回収し、反応物質の残存濃度をUV検出HPLCにより測定した。

(3) 粒子表面におけるOPAHの生成反応実験

黄砂粒子表面におけるOPAH二次生成を検証するために、主要な大気内生成過程と推測される光反応、およびオゾンとの反応によるbenz[a]anthracene (BaA)の酸化反応実験を行い、黄砂表面上におけるbenz[a]anthracene-7,12-quinone (BAQ)の生成速度や生成収率を、他の粒子表面における反応の結果と比較した。参照粒子として、ディーゼル排気粒子(DEP)、石炭燃焼排気粒子(CEP)等に多く含まれるすすのモデルとしてグラファイト粒子、そして表面が不活性なテフロン粒子を用いた。

①粒子へのBaA塗布

粒子200 mgをナスフラスコに量りとり、20 μM BaA(ジクロロメタン溶液) 10 mLを加えたのち、ふたを閉めよく混和した。溶媒はロータリーエバポレーターを用いて留去し、残った粒子をミクロスパーテルで回収し、反応用試料とした。BaA添加量はすべての粒子において初期BaA濃度が1 nmol/mg粒子になるように調節した。なお、ここで用いた黄砂粒子とは中国敦煌市の市街地から約30 km離れたクムタグ砂漠(Kumtagh Desert)の東端(北緯: 40.00° , 東経: 94.45°)で深さ約10 cmのところから採取したものであり、ふるいにかけて38 μm以下の粒子のみを集めて2時間、 180°C で乾熱滅菌処理後、実験に用いた。

②粒子上BaAへの光照射反応

BaA塗布済みの粒子10 mgをミニシャーレ(内径1.9 cm、深さ1.2 cm)に量りとり、これを純空気雰囲気下においてブラックライトランプ(FL20S-BLB, 20W, TOSHIBA) 4本を取り付けた光照射装置内に設置し(ミニシャーレ設置位置における紫外線強度: $600 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)、0~3時間紫外線を照射した。照射した紫外線強度はUV LIGHT METER UV-340 (CUSTOM)で測定した。反応後の粒子から生成物を以下に示す手順で抽出した。まずミニシャーレごとバイアル(容量50 mL)内に

投入し、ジクロロメタン 30 mL で 20 分間超音波抽出した。抽出液は 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、DMSO 100 μL を添加したのち窒素ガス存在下ジクロロメタンを留去後、エタノール 400 μL を加え 500 μL の最終溶液とし、HPLC 分析に供した。

③粒子上 BaA とオゾンとの反応実験

BaA 塗布済みの粒子 10 mg をミニシャーレに量りとり、暗所にて反応容器内に設置し、0~3 時間オゾンとの反応を行った。オゾンは N_2 を希釈ガスとし O_2 からオゾン発生装置を用いて生成し 3 ppm の濃度で反応容器内へ供給した。反応容器内のオゾン濃度はオゾン濃度計 (Ozone monitor MODEL 1200, DYLEC) を用いてモニターした。反応後の生成物は上記②と同様の手順で抽出し、HPLC による分析に供した。

(4) 大気粒子中の OPAH 分析・動態解析

代表的な OPAH として BAQ を選び、その黄砂表面生成の可能性を観測により検証した。

①大気粒子のサンプリングおよび分析

中国北京および石川県輪島においてアンダーセンハイボリウムエアサンプラーを用い、5 段 (<1.1 μm , 1.1 - 2.0 μm , 2.0 - 3.3 μm , 3.3 - 7.0 μm , >7.0 μm) に分級捕集した実大気粒子中の BAQ 濃度を、インライン還元-蛍光検出 HPLC 法により測定し、環境省の黄砂飛来情報ページ (<http://soramame.taiki.go.jp/dss/kosa/>) から得た黄砂濃度と、大気中 BAQ 濃度との関連について検証した。また、benzo[k]fluoranthene (BkF) など関連 PAH 類濃度の測定も同時に行い、BAQ の大気内動態解析に用いた。

(5) 反応生成物の毒性評価

1-NP および BaA の光/オゾン反応生成物に対して、酵母 two-hybrid アッセイ法によりその内分泌かく乱活性を評価した。

細胞への影響の評価はコントロールベクター (pGBKT7-53 及び pGADT7-T) を導入した *Saccharomyces cerevisiae* Y190 株 (以下 Y190p53-SV40LT) を用いた。アンドロゲン作用の評価は、AR リガンド結合ドメイン GAL4 の DNA 結合領域 (GAL4-DBD) と hAR の融合蛋白を産生するプラスミドと、GAL4 の転写活性化領域 (GAL4-AD) と AR のコアクチベーターである TIF2 の融合蛋白を産生するプラスミドを導入した *S. cerevisiae* Y190 株 (以下 Y190AR) を用いて、以下の要領で行った。また、エストロゲン様作用の評価は、ER リガンド結合ドメイン GAL4-DBD と hER の融合蛋白を産生するプラスミドと、GAL4-AD とコアクチベーター TIF2 の融合蛋白を産生するプラスミドを導入した *S. cerevisiae* Y190 株 (以下 Y190ER) を用いた。

上記 SD 合成培地に Y190p53-SV40LT, Y190AR または Y190ER を植菌し、27°C で一晚培養した。この培養液を SD 合成培地によって適度に希釈したもの (600 μL) に試料溶液 (6 μL) を加えた後、27°C で 4 時間培養した。4 時間培養後、培養液を 14,000 rpm で 5 分間遠心分離した後に上清を除去した。沈渣に、Z-buffer に Zymolyase 20T を 1 mg/mL とするように加えた細胞溶解液を加えて激しく攪拌し、37°C で 30 分間放置した。30 分後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した ONPG solution (120 μL) を細胞溶解液に加え、27°C で適度な黄色の発色を示すまで放置し、次いで 1 M Na_2CO_3 溶液 (300 μL) を加えて反応を停止させた。この反応液を 14,000 rpm で 5 分間遠心分離した後に上清 (200 μL) を 96 穴マイクロプレートに移し、プレートリーダー (Multiscan JX: サーモバイオアナリシスジャパン) で 414 nm における吸光度を測定した。細胞毒性の評価では試料溶液と共に 0.1 μM 17 β -estradiol (E2) 或いは 10 nM 5 α -dihydrotestosterone (DHT) を添加し、その時の吸光度を陽性対照である E2 (0.1 μM) 或いは DHT (10 nM) 処理時の吸光度と比較した。

4. 研究成果

(1) NPAH の光酸化反応による含酸素 PAH 誘導体の生成

1-NP 光分解生成物分析の結果、標準品との保持時間の一致から、生成物中には 4 種類のヒドロキシニトロピレン異性体 (1-hydroxy-x-nitropyrene; 1-OH-x-NP, x = 2, 3, 6, 8) が含まれることが明らかとなった。また、これら異性体以外にも生成物のピーク (ピーク #1) が認められたため、ピーク #1 に該当する化合物 (化合物 #1) の同定を試みた。得られた 1-NP 光分解生成物中の、化合物 #1 に対応する成分を単離し、得られた化合物を LC-MS/MS, $^1\text{H-NMR}$ によって分析し、同定を行った。ヒドロキシニトロピレンの分子量関連イオン ($m/z = 262$, [M-H] $^+$) の他、特徴的なフラグメントイオン ($m/z = 232$, [M-H-NO] $^+$; $m/z = 216$, [M-H-NO $_2$] $^+$) が観察されたことより、化合物 #1 がヒドロキシニトロピレン異性体のひとつであることが推定できた。 $^1\text{H-NMR}$ 測定によって、化合物 #1 は 1-hydroxy-5-nitropyrene (1-OH-5-NP) であることが分かった。

(2) 含酸素 PAH 類の光分解反応速度定数の導出

紫外光照射に対して最も安定であったのは BAQ であり、一方 benzo[c]phenanthrene-5,6-quinone が最も不安定であることがわかった。実験系で得られた光分解反応の速度定数および量子収率と、実験系における照射光の

強度・波長分布から、対象とした OPAH 類の実大気中における分解速度定数および寿命を見積もることができた。その結果、検討した 9 種の含酸素 PAH 類の実大気中における分解速度定数は $8.0 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1} \sim 6.2 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ の範囲であり、大気内寿命は 5 時間～35 時間の範囲となった。これより、少なくとも一部の OPAH に対しては、NPAH と同様に光分解反応が、大気中の濃度を支配する重要な因子となり得ることが明らかとなった。

(3) 粒子表面における OPAH の生成反応実験

光照射による BaA の酸化反応では、ディーゼル排気粒子等に含まれるすすのモデル粒子であるグラファイト粒子上における BAQ 生成は確認されなかった。一方、土壌粒子および対照としたテフロン粒子上では BAQ の生成が確認された。また、オゾンと BaA との反応では、いずれの粒子上においても BAQ の生成が確認されたが、その生成速度および生成収率を比較したところ、BAQ の生成は土壌粒子上において最も有利に進行することが分かった (Fig.1)。

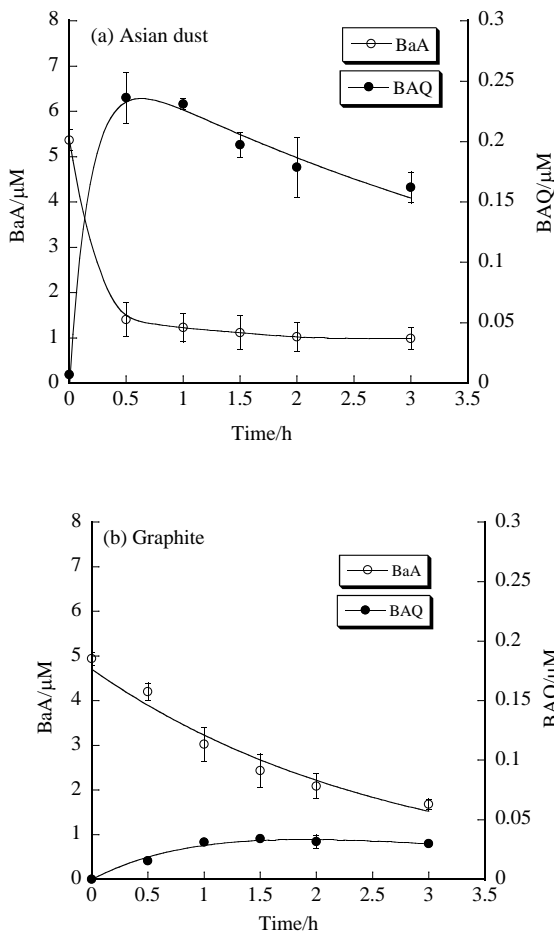


Fig.1 Concentration of BaA and BAQ vs time of reaction of BaA with O_3 .

(4) 大気粒子中の OPAH 分析・動態解析

OPAH の黄砂表面上二次生成を評価するために、BAQ/BkF 比と飛来黄砂濃度を比較したところ、北京では、黄砂が大量に飛来した期間に、 $>7.0 \mu\text{m}$ のフラクションにおける BAQ/BkF 比が著しく上昇していた。この結果は、自然起源の粗大粒子である黄砂上での BAQ 二次生成を示唆している。一方輪島では、黄砂飛来時を含む期間に、 $3.3\text{-}2.0 \mu\text{m}$ のフラクションで BAQ/BkF 比が著しく上昇した (Fig.2)。黄砂が日本に長距離輸送される際には、粒子径の大きい粒子は重力沈降により大気中から除去される。そのため、輪島において BAQ/BkF 比の上昇が観測されたフラクションは、北京の場合と比較して微小粒子側へシフトしたものと考えられる。本観測結果は、黄砂表面における OPAH の二次生成を示唆するものである。

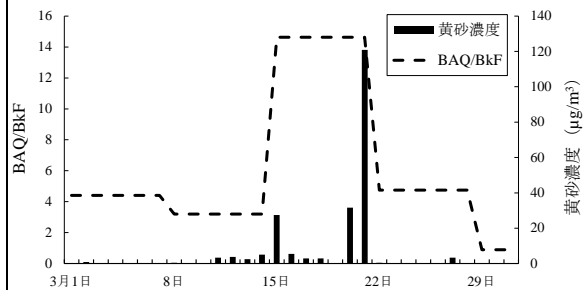


Fig.2 輪島における大気粒子 ($2.0\text{-}3.3 \mu\text{m}$) 中 BAQ/BkF 濃度比と黄砂濃度の日変動

(5) 反応生成物の毒性評価

酵母 Two-hybrid アッセイ法により、1-NP の光照射によって得られた 5 種水酸化ニトロピレンのエストロゲン/抗エストロゲン活性およびアンドロゲン/抗アンドロゲン活性などの内分泌かく乱活性を測定したところ、いずれの異性体も、強いエストロゲン・抗エストロゲン・抗アンドロゲン活性を示すことが初めて明らかとなった。一方、BaA の反応実験生成物は有意な内分泌かく乱活性を示さないことが分かった。しかしながら、実大気粒子中にはさまざまな PAH の酸化誘導体が含まれていることが推察され、それらによる影響を包括的に評価するためには、実大気粒子試料についての毒性を詳細に検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件)

- ① T. Kameda, K. Inazu, K. Asano, M. Murota, N. Takenaka, Y. Sadanaga, Y. Hisamatsu, H. Bandow, Prediction of rate constants for the gas phase reactions of triphenylene with OH and NO_3 radicals using a relative rate

- method in CCl₄ liquid phase-system, *Chemosphere*, **90**, 766-771 (2013). (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.09.071, 査読有)
- ② T. Kameda, A. Akiyama, A. Toriba, N. Tang, K. Hayakawa, Atmospheric formation of hydroxynitrofluoranthene from photochemical reactions of 2-nitrofluoranthene, *Polycyclic Aromat. Compd.*, **32**, 177-187 (2012). (DOI: 10.1080/10406638.2011.654307, 査読有)
 - ③ R. Li, T. Kameda, Y. Li, A. Toriba, N. Tang, K. Hayakawa, J.-M. Lin, Determination of Benzo[a]pyrene-7, 10-quinone in Airborne Particulates by Using a Chemiluminescence Reaction of Hydrogen Peroxide and Hydrosulfite, *Anal. Chem.*, **84**, 3215-3221 (2012). (DOI: 10.1021/ac2032063, 査読有)
 - ④ R. Li, T. Kameda, Y. Li, A. Toriba, N. Tang, K. Hayakawa, J.-M. Lin, Hydrogen peroxide-sodium hydrosulfite chemiluminescence system combined with high-performance liquid chromatography for determination of 1-hydroxypyrene in airborne particulates, *Talanta*, **85**, 2711-2714 (2011). (DOI: 10.1016/j.talanta.2011.08.005, 査読有)
 - ⑤ T. Kameda, A. Akiyama, A. Toriba, N. Tang, K. Hayakawa, Atmospheric formation of hydroxynitropyrenes from a photochemical reaction of particle-associated 1-nitropyrene, *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 3325-3332 (2011). (DOI: 10.1021/es1042172, 査読有)
 - ⑥ T. Kameda, Atmospheric chemistry of polycyclic aromatic hydrocarbons and related compounds, *J. Health Sci.*, **57**, 504-511 (2011). (DOI: 10.1248/jhs.57.504, 査読有)
 - ⑦ T. Kameda, A. Akiyama, M. Yoshita, C. Tachikawa, A. Toriba, N. Tang, K. Hayakawa, Mutagenicities and endocrine-disrupting activities of 1-hydroxy-2-nitropyrene and 1-hydroxy-5-nitropyrene, *J. Health Sci.*, **57**, 372-377 (2011). (DOI: 10.1248/jhs.57.372, 査読有)
 - ⑧ T. Kameda, A. Akiyama, A. Toriba, N. Tang, K. Hayakawa, Determination of particle-associated hydroxynitropyrenes with correction for chemical degradation on a quartz fiber filter during high volume air sampling, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **90**, 976-987 (2010). (DOI: 10.1080/03067310903359484, 査読有)

[学会発表] (計 36 件)

- ① 亀田 貴之, 安積 愛理, 福島 杏希, 唐 寧, 松木 篤, 小林 茉緒, 鳥羽 陽, 早川 和一, 黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素誘導体の二次生成, 第 21 回環境化

学討論会, 2012.7.11, ひめぎんホール (愛媛県) .

- ② 亀田 貴之, 片山 裕規, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川 和一, 黄砂表面における多環芳香族炭化水素酸化誘導体の二次生成, 第 53 回大気環境学会年会, 2012.9.12, 神奈川大学 (神奈川県) .
- ③ 亀田 貴之, 安積 愛理, 松木 篤, 唐 寧, 福島 杏希, 鳥羽 陽, 早川 和一, 越境輸送中の黄砂粒子表面におけるニトロ化多環芳香族炭化水素の二次生成, 第 52 回大気環境学会年会, 2011.9.14, 長崎大学 (長崎県) .
- ④ 亀田 貴之, 安積 愛理, 唐 寧, 松木 篤, 福島 杏希, 鳥羽 陽, 早川 和一, 黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素のニトロ化と越境輸送, 第 20 回環境化学討論会, 2011.7.14, 熊本県立大学 (熊本県) .
- ⑤ 亀田 貴之, 安積 愛理, 松木 篤, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川 和一, 越境輸送中の黄砂粒子表面におけるニトロ化多環芳香族炭化水素の二次生成, 日本薬学会第 131 年会, 2011. 3. 28, 静岡県立大学ほか (静岡県) .
- ⑥ 安積 愛理, 亀田 貴之, 松木 篤, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川 和一, 黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素のニトロ化と越境大気汚染の可能性, 第 51 回大気環境学会年会, 2010. 9.8, 大阪大学 (大阪府) .
- ⑦ 亀田 貴之, 後藤 知子, 鳥羽 陽, 唐 寧, 早川 和一, 日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの観測: 濃度レベルの把握と発生要因の検討, 第 19 回環境化学討論会, 2010.6.21, 中部大学 (愛知県) .

[図書] (計 2 件)

- ① T. Kameda, A. Akiyama, A. Toriba, N. Tang, K. Hayakawa, Hydroxylated Nitro Polycyclic Aromatic Compounds: Atmospheric Occurrence and Health Impacts, *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry, Occurrence and Health Issues*, (Guilherme C. Bandeira and Henrique E. Meneses, eds.), p. 235-264, Nova Science Publishers, NY (2012).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 臭気成分捕集用繊維状吸着材

発明者: 齊藤 満ほか 4 名

権利者: 日本フィルコン(株), 早川 和一,
亀田 貴之

種類: 特許権

番号: 特願 2010-173968

出願年月日: 平成 22 年 8 月 2 日

国内外の別：国内

名称：砂塵飛来有害物質及び微生物除去剤，
砂塵飛来有害物質及び微生物除去セルロ
ース繊維及び繊維構造物

発明者：山田 丸，亀田 貴之，ほか6名
権利者：金沢大学，ダイワボウホールディン
グス(株)，ダイワボウノイ(株)

種類：特許権

番号：特願 2011-155806

出願年月日：平成 23 年 7 月 14 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀田 貴之 (KAMEDA TAKAYUKI)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：50398426

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

早川 和一 (HAYAKAWA KAZUICHI)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：40115267

鳥羽 陽 (TORIBA AKIRA)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：50313680

唐 寧 (TANG NING)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90372490