

発癌性ニトロアレーンの超高感度分析法 開発と大気内挙動と毒性に関する研究

金沢大学大学院自然科学研究科 / 薬学部教授

早川和一



1 はじめに

肺癌の要因としてまず喫煙があることは言うまでもないが、都市域で肺癌が

増加していることから大気質の悪化との関連が指摘されている。以前から、大気中に存在する発癌性/変異原性物質として、ベンゾ[a]ピレン (BaP) に代表される多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) が知られていたが、さらにニトロ多環芳香族炭化水素 (nitropolycyclic aromatic hydrocarbon, NPAH, ニトロアレーン) の存在も明らかにされた^{1,2)}。特に、1,3-ジニトロピレン (1,3-DNP), 1,6-DNP, 1,8-DNPや1-ニトロピレン (1-NP) などは、*S. typhimurium* TA98株やYG1024株を用いたAmes試験で強い直接変異原性を示す。しかし、これらの大気中濃度はBaPに比較するとはるかに低い。これまでに報告されたNPAH分析法の中では、感度の点か

ら見るとGC/MSと蛍光検出HPLCが優れており^{3,4)}、環境試料への適用例も報告されている。しかし、NPAHの大気内挙動を詳細に追跡するためには、いずれも感度不足であった。

著者らは、NPAHの還元体であるアミノアレーンが過シュウ酸エステル化学発光検出法に高い感受性を有することに基づいて、NPAHを還元し、生成したアミノアレーンをHPLCで分離検出するNPAH分析法を開発した。都市大気をサンプリングし、本法を応用した結果、種々のNPAHの発生源や大気内挙動、変異原性への寄与などが次第に明らかになってきた。本稿では、著者らの研究を中心に、NPAHの分析法開発と、それを応用した大気内動態解析並びに毒性に関する研究の現状を述べる。

2 NPAH分析法

NPAHは、そのニトロ基を還元するとアミノアレーンに変換される。このアミノアレーンが有する蛍光特性は蛍光検出HPLC分析に利用され

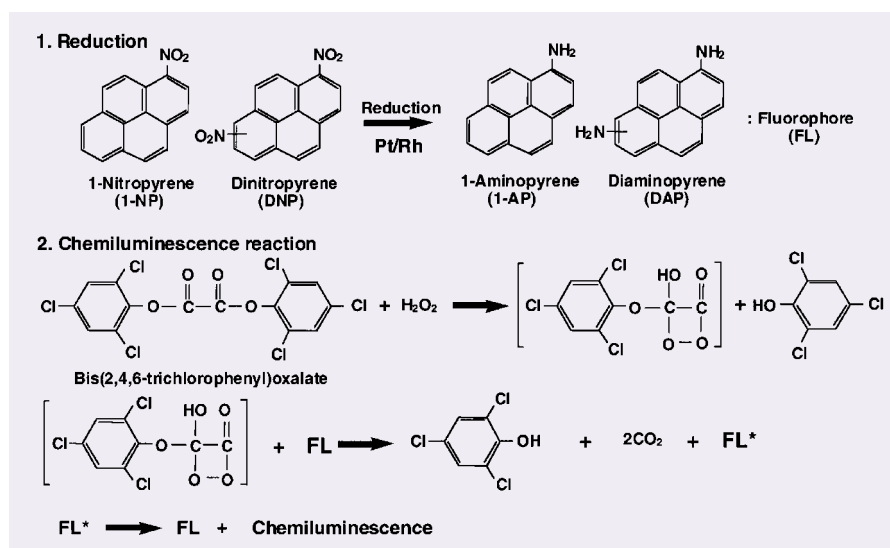


Fig.1 Reduction and chemiluminescence reaction mechanisms of nitroarene.

著者略歴

1974年 東京大学薬学部 卒業
1976年 東京大学大学院薬学系研究科修士課程 修了
1977年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程 1年修了退学
1977年 金沢大学薬学部 助手
1985年 金沢大学薬学部 助教授
1985-1987年 米国カンザス大学生物分析研究センター
1995年 金沢大学大学院自然科学研究科 助教授
1998年 金沢大学薬学部 教授
2001年 金沢大学大学院自然科学研究科 教授

受賞歴

1994年 日本薬学会 奨励賞
1996年 環境賞 (優良賞)

専門

生活環境物質の新規分析法の開発
環境中の発がん物質/環境ホルモンに関する研究
食品中の光学活性物質に関する研究
乱用薬物(覚せい剤)に関する研究

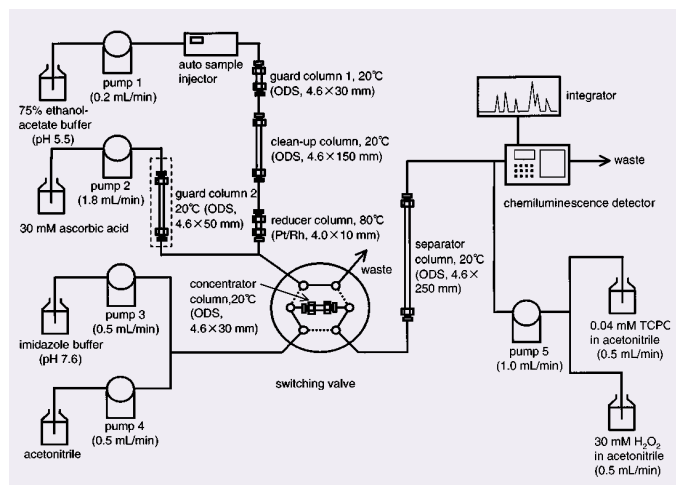


Fig. 2. Schematic diagram of the NPAH analysis system.

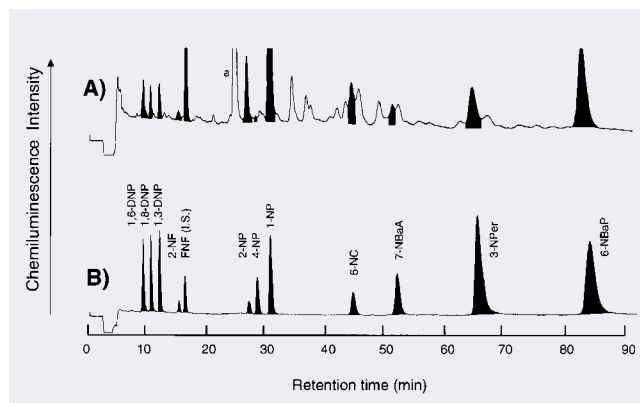


Fig. 3 Typical chromatograms of 1,3-, 1,6-, 1,8-DNPs and 1-NP in (A) airborne particulates and (B) NPAH standard.

てきた。一方、蛍光物質の高感度分析法の一つとして、過シュウ酸エステル化学発光検出HPLC法が開発され⁵⁾、カテコールアミンや種々の医薬品などの超高感度分析に応用された。さらに著者らは、いくつかのアミノアレーンが、化学発光試液として比較的安定で安価なビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレートと過酸化水素による過シュウ酸エステル化学発光法により超高感度検出できること(Fig. 1)⁶⁾を確認した。そこで、アミノアレーンの分離が良好なODSカラム(分析カラム)の直後に、これらビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレートと過酸化水素を導入して化学発光検出するHPLCシステムを試作し、NPAH分析法の開発をはかった。

NPAHはいくつかの方法によりアミノアレーンに還元することができる。このうち、NPAHのエタノール溶液に水硫化ナトリウム溶液を加えて沸騰水浴中で還流する方法が、既に蛍光検出HPLC法の前処理として報告されていた⁴⁾ことから、著者らも同法を用いることにした。また、

粉じん中NPAHの抽出・精製法を検討した結果、ベンゼン/エタノールを加えて超音波処理を施すことにより効率良く抽出され、これを水酸化ナトリウム水溶液、硫酸水溶液、水で順次洗浄することにより精製されることがわかった。そこで、粉じんのベンゼン/エタノール抽出液を減圧乾固後メタノールに再溶解し、これに水硫化ナトリウム溶液を加えて還流還元した。しかし、反応液の一部を化学発光検出HPLCシステムに分析カラムに注入したところ、1,3-, 1,6-, 1,8-ジアミノピレンや1-アミノピレンのピークは検出されないか極めて小さく、NPAHの検出感度は期待するほどには得られなかった。

その原因を検索したところ、まず、アミノアレーンは光に対して極めて不安定で、蛍光灯を使用した実験室内の操作でも速やかに化学変化を来たすことがわかった。また、金属に対しても不安定で、HPLCシステムの接液部の金属やガラス器具の材質に含まれる微量金属によっても化学変化することがわかった。そこで、全ての試料溶液の調製を遮光下で行

い、さらに還元処理後の試料溶液に安定化剤としてアスコルビン酸を添加した結果、上記アミノアレーンのピーク強度は著しく増強した。いずれの検出下限もサブfmolレベルに達し、従来の蛍光検出HPLCやGC/MSより約2桁高感度になった^{7,8)}。

しかし、予め水硫化ナトリウムにより還元処理を施すことは操作が煩雑で、時間もかかる。そこで、還元反応の金属触媒として知られるPt/Rhを用いて、HPLCのラインの中でNPAHの還元を行い、更に試料のクリーンアップも行うシステムの構築を企てた。即ち、Fig. 2に示すように、試料をサンプルインジェクタ(auto sample injector)より注入すると、試料中のNPAHは還元移動相(75% ethanol-acetate buffer, pH 5.5)に送られてガードカラム1を通過してクリーンアップカラム(ODS, 4.6 × 150 mm)内で妨害物質と分離する。妨害物質はそのまま廃棄するが、NPAHは還元カラム(Pt/Rh, 4.0 × 10 mm)に運ばれてアミノアレーンに還元される。アミノアレーンは水に由来する妨害物質をガードカラム2(ODS,

4.6 × 50 mm) で除去した濃縮移動相 (30 mM ascorbic acid) により濃縮カラム (ODS, 4.6 × 30 mm) の上端に濃縮される。次に、流路切り替えバルブ (switching valve) を回転すると、濃縮されたアミノアレーンのバンドは分離移動相 (imidazole buffer, pH 7.6 : acetonitrile; 1/1) により分離カラム (ODS, 4.6 × 250 mm) に導入される。ここでアミノアレーンは分離された後、化学発光検出器 (chemiluminescence detector) により検出される。

この方法では、従来までの1,3-, 1,6-, 1,8-DNP, 1-NPのほかに、2-ニトロフルオレン (2-NF), 2-, 4-ニトロピレン (2-, 4-NP), 6-ニトロクリセン (6-NC), 7-ニトロベンズ[a]アントラセン (7-NBaA), 3-ニトロペリレン (3-NPer) 及び6-ニトロベンゾ[a]ピレン (6-NBaP) なども内標準物質である2-フルオロ-7-ニトロフルオレン (FNF) と同時に、いずれも対応するアミノアレーンとして分離検出され、これら11種類以上のNPAHの一斉定量分析が可能になった。1,3-, 1,6-, 1,8-DNP, 1-NPの検出下限はサブ

f mole ~ f moleの範囲内にあり従来法と同レベルであった⁹⁾。

Fig. 3には、上述の方法で僅か数ミリグラムの金沢の市街地大気粉じんの抽出物から得られた分析クロマトグラム例 (A) と標準NPAHのクロマトグラム (B) を示した。対象化合物である11種類のNPAHのピークがいずれも検出された。さらに、実試料のクロマトグラムからいくつかの未知ピークも検出された。前述のように、過シュウ酸エステル化学発光検出法がNPAHに対する選択性が極めて高い方法であることを考えると、実試料から検出されたこれらの未知ピークはNPAHに由来するものである可能性が高い。例えば、2-NPの前の未知ピークaの保持時間は、9-ニトロアントラセン (9-NA) のそれに一致し、現在、同定を進めている。

3 大気内動態

一般に大気中に浮遊する粉じんは、ハイボリュームエアースンプラーを用いて大気を0.5 - 1.5 m³ min⁻¹の速度で吸引することにより、石英製などのフィルター上に捕集される。そこで、著者は、所属機関が所在する金沢市の市街地

幹線道路脇にハイボリュームエアースンプラーを設置し、2時間毎にフィルターを交換しながら大気粉じんを連続捕集した。それぞれのフィルターに捕集された粉じんを上述の方法で処理し、DNP類や1-NPを定量した。その結果、いずれの化合物の大気中濃度も、朝から晩に高く深夜に低い日内変動が観察された (Fig. 4)。これらの濃度推移が交通量の推移と強く関連したことから、DNP類や1-NPの主要排出源が自動車であることが明かになった¹⁰⁾。

次に、ディーゼル車とガソリン車の排ガス粉じん中のNPAHを分析すると、両者のDNP類の濃度には大差がないが、1-NPの濃度はディーゼル車排ガス粉じん中の方が著しく高かった。ディーゼル車はガソリン車と比較して排気中の粉じん量が極めて多いので、これを掛け合わせると、排気中ではいずれの化合物の濃度もディーゼル車の方が1桁から3桁以上高いことがわかった (Fig. 5)¹¹⁾。この組成の違いに基づいて上記地点における大気中のNPAH類の発生源を推定すると、自動車以外の発生源がないと仮定した場合、1,3-, 1,6-, 1,8-DNPと1-NPの排出源は、大部分がディーゼル車と試算された¹²⁾。

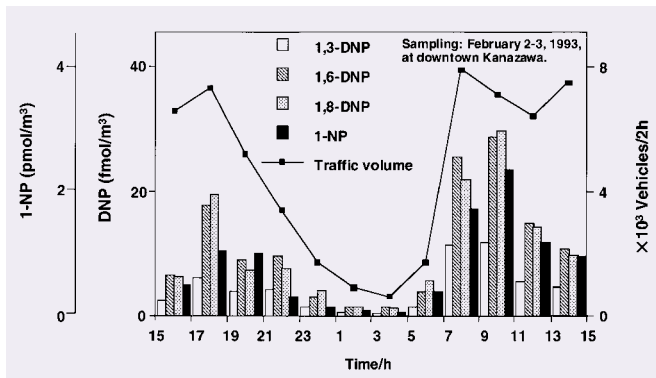


Fig. 4. Diurnal variations of 1,3-, 1,6-, 1,8-DNPs and 1-NP in urban air.

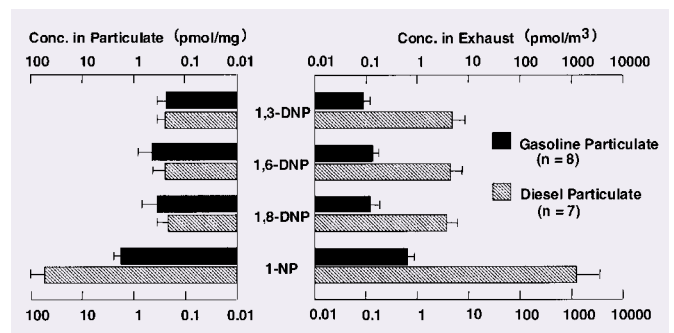


Fig. 5. A comparison of gasoline and diesel engine exhausts.

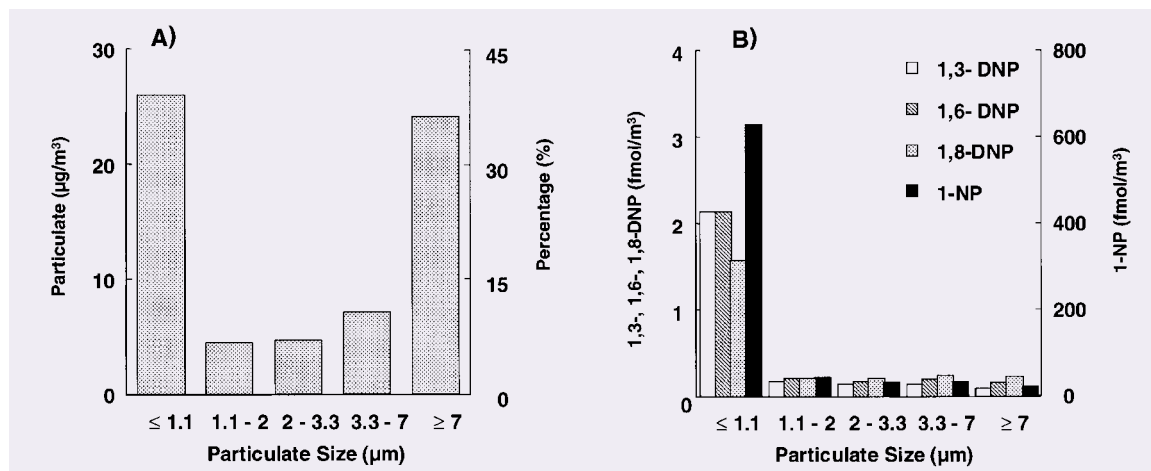


Fig. 6. Distributions of (A) particulates and (B) 1,3-, 1,6-, 1,8-DNPs and 1-NP in five particulate fractions.

4 変異原性への寄与

微細粉じんほど肺への沈積率が高くなることから、変異原物質が存在する粉じんの大きさは肺癌との関連で重要である。著者らは、アンダーセンハイボリュームエアサンプラーで大気粉じんを粒径別に5分画に分けて捕集し、本法とAmes試験法を適用した。その結果、粉じんは最も細かな粒子(1.1 µm以下)分画と最も大きな粒子(7 µm以上)分画とに大きく2極分布したが、DNP類、1-NP及び直接変異原性はいずれも前者に集中していた(Fig. 6)¹³⁾。ディーゼル車排ガス粉じんは、主に1.1 µm以下の微細粒子であることを考え合わせると、これらの結果は、都市大気中のNPAHが生体に及ぼす影響においては、ディーゼル車の寄与が極めて大きいことを示唆している。

前出のDNP類や1-NPに新たに定量できたNPAHも加え合わせると、ディーゼル車排ガス粉じん抽出物の直接変異原性への寄与は、YG1024株を用いて共存物質の影響がないと仮定すると、30%近くに達した¹⁴⁾。

さらに、最近、強い直接変異原性を示す3-ニトロベンツアントロンが大気中に存在することが報告されたが¹⁵⁾、これも本法で定量分析可能ながことがわかった。今後、同定が進み、新たに定量分析できるNPAHの種類が増加するにつれ、これまで明かでない部分が多い大気変異原性の本体が次第に解明されるはずである。

5 おわりに

NPAHに関する以上の事実は、従来から環境内動態が研究されてきたBaPなどのPAHに加えて、NPAHについても大気環境の広域且つ詳細な実態調査と排出源対策が必要なことを示している。さらに、最近著者らは、PAHの水酸化体のいくつかが大気環境ホルモンと同じ作用を有することを見出した^{16,17)}。これら化合物の新たな分析法が必要となってきた。

謝辞 本稿のまとめにあたり、協力いただいた金沢大学自然科学研究科博士後期課程2年唐寧氏に感謝します。

文献

- 1) H. Rosenkranz and R. Mermelstein., *Mutation Res.*, 114, 217-267 (1983).
- 2) 常盤 寛, 大気汚染学会誌, 27, 73-84 (1992).
- 3) X. Xu, J. P. Nachtman, S. M. Rappaport, E. T. Wei, *J. Appl. Toxicol.*, 1, 196-198 (1981).
- 4) 田辺 潔, 松下 秀鶴, 郭 錦堂, 今宮俊一郎, 大気汚染学会誌, 21, 535-544 (1986).
- 5) S. Kobayashi and K. Imai, *Anal. Chem.*, 52, 424-427 (1980).
- 6) K. Sigvardson, J. M. Kennishi, J. W. Birks, *Anal. Chem.*, 56, 1096-1102 (1984).
- 7) K. Hayakawa, R. Kitamura, M. Butoh, N. Imaizumi, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, 7, 573-577 (1991).
- 8) K. Hayakawa, M. Butoh, M. Miyazaki, *Anal. Chim. Acta*, 266, 251-256 (1992).
- 9) N. Tang, A. Toriba, R. Kizu, K. Hayakawa, *Anal. Sci.*, (in press).
- 10) K. Hayakawa, T. Murahashi, M. Butoh, M. Miyazaki, *Environ. Sci. Technol.*, 29, 928-932 (1995).
- 11) K. Hayakawa, M. Butoh, Y. Hirabayashi, M. Miyazaki, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 40, 20-25 (1994).
- 12) T. Murahashi, M. Miyazaki, R. Kakizawa, Y. Yamagishi, M. Kitamura, K. Hayakawa, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 41, 328-333 (1995).
- 13) K. Hayakawa, Y. Kawaguchi, T. Murahashi, M. Miyazaki, *Mutation Res.*, 348, 57-61 (1995).
- 14) K. Hayakawa, A. Nakamura, N. Terai, R. Kizu, K. Ando, *Chem. Pharm. Bull.*, 45, 1820-1822 (1997).
- 15) T. Enya, H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama, Y. Hisamatsu, *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2772-2776 (1997).
- 16) T. Hirose, K. Morito, R. Kizu, A. Toriba, K. Hayakawa, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu, Y. Masamune, *J. Health Sci.*, 47, 552-558 (2001).
- 17) 早川 和一, 小野田 優, 神谷 真紀子, 広瀬 敏治, 鳥羽 陽, 木津 良一, 環境ホルモン学会第5回研究発表会要旨集, p123, 広島(2002).