

ピレンキノンの大気粒子中濃度と酸化能評価

Evaluation of atmospheric concentration and oxidative potential of particle-associated pyrenequinones

(京都大学) ○亀田 貴之*, 大久保 力斗*, 東野 達*

Abstract

Atmospheric quinoid polycyclic aromatic hydrocarbons (QPAHs) have been shown to have adverse health effects as redox-active species in particulate matters (PM). Several QPAHs are known to be very reactive in the dithiothreitol (DTT) assay, but it is unclear if pyrenequinones, their parent pyrene is one of the most abundant PAHs in the atmosphere, contribute to the loss of DTT in PM extracts. Herein by employing the DTT assay, we evaluated oxidative potentials of three pyrenequinone isomers (4,5-Pyrenequinone (4,5-PyQ) and a mixture of 1,6-/1,8-Pyrenequinones (1,6-/1,8-PyQ)) along with 9,10-Phenanthrenequinone (PQN), 1,2-Naphthoquinone (1,2-NQN), and 1,4-Naphthoquinone (1,4-NQN), DTT loss rates of which were examined previously. Our results demonstrate that the DTT consumption by ortho type QPAHs is fast, particularly by 4,5-PyQ. The order of DTT loss rate by the QPAHs tested in this study is as follows: 4,5-PyQ ~ PQN > 1,2-NQN > 1,6-/1,8-PyQ ~ 1,4-NQN.

はじめに

近年粒子状物質 (PM) の毒性に関する多くの研究の関心が、PMによる生体内活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) の生成に向けられている。ROSとは生体内に含まれる酸素分子がより反応性の高い化合物 (スーパーオキシドラジカル、ヒドロキシラジカルなど) に変化したものである。PMに含まれる酸化還元性を示す化合物が酸素分子に電子を受け渡すことで連鎖反応が起こり、ROSを過剰に生成するということが報告されている。このような生体内でのROSの過剰生成、あるいはそれらを消去する抗酸化能力の欠損により、生体内の構造や機能を担っている脂肪、蛋白質・酵素や、遺伝情報を担うDNAが酸化、損傷され、生体内の構造や機能を乱しその結果炎症、発がん、循環器疾患、神経変質疾患などの様々な疾患の要因となることが知られている¹⁾。

DTT (Dithiothreitol) アッセイは細胞を使わずにPMの酸化能を定量的に評価できる測定方法で、PM中の酸化性物質によるDTT消費速度をPM酸化能の指標とする。PMの酸化能に寄与している物質として、銅やマンガンといった金属や多環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAH) のキノン体 (PAHキノン) が報告されているが、酸化能に対する寄与物質の全てが明らかになっているわけではない。本研究では、これまでに報告のなかったピレンキノン異性体[4,5-Pyrenequinone (4,5-PyQ) 及び1,6-/1,8-Pyrenequinone (1,6-/1,8-PyQ) 混合物]についてのDTTアッセイを行い酸化能を評価するとともに、それらの実大気中濃度をもとに、大気粒子酸化能に対する寄与を見積もった。

実験方法

DTT アッセイ

37 °Cに保たれた浴槽に浸漬させたコニカルチューブ内で DTT 溶液と、各被検試料を混合し反応させた。所定の反応時間経過後に溶液を所定採取し、5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB) 溶液と混合して、生成した 5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid (TNB) を紫外 - 可視分光光度計を用い定量した (測定波長: 412 nm)。本実験では PyQ 異性体に加え、これまでに酸化能に関する報告がなされている 9,10-Phenanthrenequinone (PQN), 1,2-Naphthoquinone (1,2-NQN), 及び 1,4-Naphthoquinone (1,4-NQN) についても DTT アッセイの対象とした。

大気粒子中PAHキノン分析

実大気PM試料として2015年11月7日および8日に京都市左京区の京都大学で捕集されたものを使用した。いずれの大気粒子試料も、ハイボリュウムサンプラー (柴田科学製HV-1000R) を用いて石英繊維フィルター (Advantec製QR100, 203×254 mm) 上に捕集した。粒子捕集時の空気吸引量は900 L/minとし、フィルター1枚につき6時から18時までの12時間の捕集を行った。これら大気粒子試料は、京都大学大学院医学研究科の金谷久美子氏より提供された。

大気粒子を捕集したフィルターに内部標準物質を添加し、200 mLのジクロロメタン (DCM) により粒子中の有機画分を20分間超音波抽出した。得られた抽出液にジメチルスルホキシドを100 µL添加し、ロータリーエバポレーターにより約5 mLまで減容したのち、窒素気流下でDCMを留去し、メタノールを400 µL加え試料溶液とした。得られた試料溶液を、インライン還元-蛍光検出HPLCあるいはプレカラム誘導体化-蛍光検出HPLCによる分析に供した。

* Takayuki Kameda, Rikito Okubo, Susumu Tohno, Graduate School of Energy Science, Kyoto University, Yoshidahonmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

結果と考察

Fig.1に、本研究で対象とした5種のPAHキノンのDTT消費速度を示す。なおここでは、反応開始から10分間における各PAHキノンによるDTT消費量を求め、1,4-NQNによるDTT消費量で規格化した値をDTT相対消費速度と定義した。4,5-PyQのDTT相対消費速度が5.7と、対象とした化合物の中で最も高かった。この値は、PAHキノンの中でこれまで最もDTT消費速度が速いと考えられてきたPQNの活性に匹敵することがわかった（PQNのDTT相対消費速度：5.5）。一方1,6-/1,8-PyQのDTT相対消費速度は1.5と遅く、1,4-NQNと同等であった。今回試験の対象としたPAHキノンのDTT消費速度の序列は4,5-PyQ～PQN>1,2-NQN>1,6-/1,8-PyQ～1,4-NQNとなり、これまでに報告されている通り、芳香環の隣り合った炭素（オルト位）それぞれに酸素が二重結合した構造を持つ化合物の活性が高い結果となった。

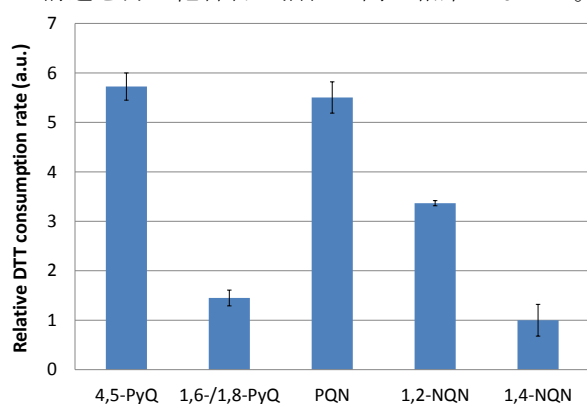


Fig. 1 Consumption rate of DTT via the reaction with quinoid PAHs tested in this study.

京都で捕集したPM中のPQNおよびPyQ異性体濃度をFig.2に示す。4,5-PyQの濃度はPQNよりやや低いものの、3種のPyQ異性体の中では最も高濃度となることがわかった。

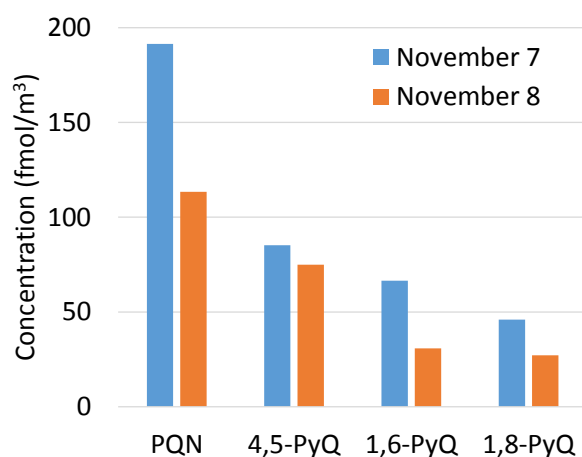


Fig. 2 Atmospheric concentrations of quinoid PAHs in Kyoto on Nov. 7 and 8, 2015.

NIST SRM1648a（大気粉塵標準物質）に含まれるPAHキノンの濃度²⁾をもとに、それぞれのPAHキノンの実大気における酸化能への相対的な寄与度を評価した。酸化能寄与度は、大気粉塵中における

個々のPAHキノンのモル濃度にFig. 1で示したDTT消費速度を掛け合わせ、PQNの値で規格化して求めた。各PAHキノンの酸化能相対寄与度をFig. 3に示す。DTT消費速度、大気中濃度ともに高い4,5-PyQの酸化能寄与度が最も高く、これまで大気の酸化能に大きく寄与すると考えられてきたPQNの寄与度を凌駕するほどとなることが分かった。一方1,6-/1,8-PyQの大気酸化能への寄与は低く、1,2-NQNのそれと同程度であった。

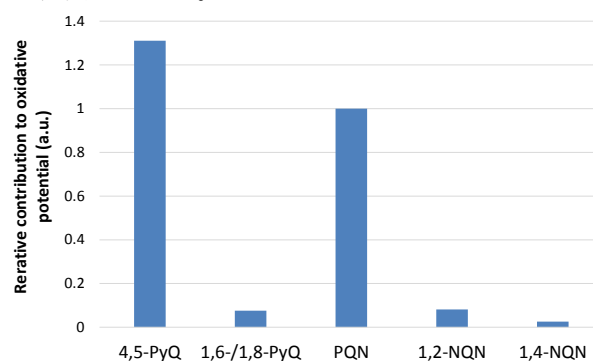


Fig. 3 Relative contribution of quinoid PAHs to the atmospheric oxidative potential.

大気PM中の金属およびPAHキノン化合物濃度の測定結果をもとにした試算によると、PQNの大気酸化能に対する寄与率は17%と報告されている³⁾。この結果に本研究で得られた結果を加味し、各PAHキノンの大気酸化能への寄与率を再構成したところ、4,5-PyQの寄与率はおよそ18%と見積もられた（Fig. 4）。PQNと4,5-PyQの寄与率の合計は約32%となり、これら2物質のみで大気PM酸化能のおよそ1/3が説明できることとなる。このように、4,5-PyQはPMの酸化能に対する寄与が大きく重要な物質であることが、本研究により初めて明らかとなった。

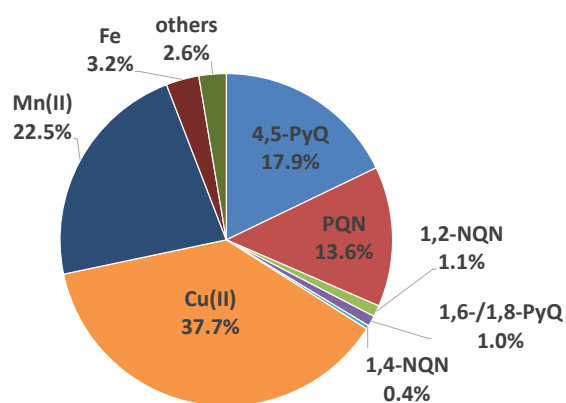


Fig. 4 Estimated contributions of quinoid PAHs and metals to DTT consumption in atmospheric PM.

References

- 1) Kumagai, Y. et al, *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 483-489 (2002).
- 2) Toriba, A. et al, *J. Chromat. A*, **1459**, 89-100 (2016).
- 3) Charrier, J. G. and Anastasio, C., *Atoms. Chem. Phys.*, **12**, 9321-9333 (2012).