

[報告]

PAH, NPAH, 変異原性および活性酸素種生成能から見た 北九州と鉄嶺の大気汚染比較

戸次 加奈江, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川 和一

金沢大学 大学院 自然科学研究科 衛生化学研究室

要 旨: 大気中には様々な有機汚染物質が含まれている。そのうち多環芳香族炭化水素 (PAH) およびニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) は、化石燃料などの燃焼に伴って発生し、ヒトの健康に影響をおよぼす物質である。環日本海域の4ヶ国、中国、ロシア、韓国、日本は、主要エネルギーの種類や生活様式、産業構造や事業所の設備などが異なり、その結果大気汚染のレベルと中身も大きく異なると推定される。そこで、本報では中国と日本の製鉄業を中心とする都市である鉄嶺と北九州を選び大気粉塵を捕集後PAH, NPAH, 変異原性, 活性酸素種 (ROS) 生成能を測定し化学物質と毒性の点から比較評価を行った。PAH, NPAH濃度は中国で高濃度を示し、冬高夏低の傾向が見られた。また変異原性は冬に高いが、ROS生成能は夏に高くなる傾向が見られ、変異原性とROS生成能には異なる原因物質が関与すると考えられた。PAH, NPAHとは異なる化合物の寄与も大きいことが考えられた。

キーワード: 多環芳香族炭化水素, ニトロ多環芳香族炭化水素, 変異原性, 活性酸素種.

(2007年12月12日 受付, 2008年1月31日 受理)

はじめに

大気中には人体に有害な様々な化学物質が存在しており、その中で化石燃料の燃焼により発生する多環芳香族炭化水素 (PAH) およびニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) には、発癌性、変異原性あるいは活性酸素種生成能を有するものが少なくない [1, 2]. 環日本

海域の4ヶ国、中国、ロシア、韓国、日本は、産業や経済が急速に発展しており、産業活動により大量の化石燃料が消費され、それに伴い二酸化炭素や酸性物質、燃焼粉塵などが大気中に排出されているが、粉塵中にはPAH, NPAHを始め、毒性を有する数多くの化学物質が含まれている。これらの国々では異なる種類の化石燃料が使用されており、中国、ロシアでは石炭、韓国、日本は石油が主要エネ

ルギーとなっている。また、生活様式、産業構造や事業所の設備の違いにより、大気粉塵中に含まれる化学物質の濃度組成も異なるものと考えられる。

さらに日本では、大気粉塵の主要因であるディーゼルエンジン排出粉塵中にも、多くのPAHやNPAHが含まれていることが明らかにされている [3]。

中国東北部に位置する鉄嶺は、近年では先端技術の導入により農業・工業が発展しており、農産物・石炭などの資源が豊富な製鉄を中心に第一次産業の割合が高い人口299万人、面積13,000 km²の都市である。また、九州北部に位置する北九州は、四大工業地帯の一つで、製鉄業で有名な北九州工業地帯があり、人口99万人、面積487 km²の都市である。本研究では、両都市とも製鉄を中心とする工業都市という点に着目し、変異原性、ROS生成量、PAHとNPAHの濃度、組成の類似性ならびに違いとその要因について、これまで実施したサンプリング、分析結果と変異原性結果の一部から比較考察を行った。

材料と方法

大気粉塵は、ローボリウムエアースンプラー AN-200 型(柴田科学株式会社)、ハイボリウムエアースンプラー 123VL型(紀本電子工業株式会社)またはHV-700F型(柴田科学株式会社)を用いサンプリングした。サンプリング時期は、北九州2004年8月4日、2005年2月8日、鉄嶺2003年7月17日、12月28日であり、測定時間は24時間である。それぞれのサンプリング場所について、北九州は住宅地に位置する産業医科大学屋上、鉄嶺は小学校校内にサンプラーを設置し、サンプリングを行った。

捕集フィルターはベンゼン:エタノール(3:1)で15分間超音波抽出し、抽出液をろ

紙(東洋No.6, 直径125 mm)およびメンブランフィルター(関東化学HLC-DISK13, 直径13 mm, 孔径0.45 μm)で順にろ過した。残ったフィルターにエタノール30 ml, ベンゼン90 mlを加え同様に抽出ろ過し、先の抽出液と合わせた。抽出液にジメチルスルホオキサイド(DMSO)を加え、溶媒を留去した後、残渣をアセトニトリルに溶解して、PAH分析用の検液とした。また、DMSOに溶媒置換し、Ames試験、Dithiothreitol(DTT) assay用の検液とした。

変異原性は、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* ヒスチジン要求性変異株が栄養非要求性へ復帰突然変異することを観察するAmes試験により調べた。検出系として、フレームシフト型変異の検出に特異性があるTA98株により直接変異原性、塩基対置換型変異の検出に特異性があるTA100株により間接変異原性を調べた [4]。ROS生成量の測定は、大気粉塵中のPAHキノンなどの求核物質が生体内タンパク質中のチオール基を消費して、レドックスサイクルを形成し、酸化還元反応が生じることによりROSが生成することから [5]、DTT assayによりチオール基の消費量を測定した。

分析対象としたPAHはUS Environmental Protection Agency(EPA)に環境汚染物質として測定すべき項目にリストアップされた16種類のPAHのうち、毒性の観点からヒトの健康に影響をおよぼしやすいとされる4環以上のフルオランテン(FR)、ピレン(Pyr)、ベンツ[a]アントラセン(BaA)、クリセン(Chr)、ベンゾ[b]フルオランテン(BbF)、ベンゾ[k]フルオランテン(BkF)、ベンゾ[a]ピレン(BaP)、ジベンゾアントラセン(DBA)、ベンゾ[ghi]ペリレン(BgPe)、インデノペリレン(IDP)の合計10種類であり、蛍光検出/(高速液体クロマトグラフィー) HPLC法により分析した。NPAHについては、変異原性の

強い1, 3-, 1, 6-, 1, 8-ジニトロピレン(DNP), 3-, 10-ニトロベンツアントラセン(NBA), 5-ニトロアセナフテン(NAc), 2-ニトロフルオレン(NF), 2-フルオロ-7フルオロフルオレン(FNF), 4-, 9-ニトロフェナントレン(NPh), 2-, 9-ニトロアントラセン(NA), 2-ニトロフルオランテン(NFR) + 2-ニトロピレン(NP), 1-, 4-NP, 1-, 3-ニトロフルオランテン(NFR), 2-ニトロトリフェナンスレン(NTP), 6-ニトロクリセン(NC), 7-ニトロベンツ[a]アントラセン(NBaA), 6-ニトロベンゾ[a]ピレン(NBaP), 1-, 3-ニトロペリレン(NPer)の合計23種類を分析対象化合物とし, これらを化学発光検出/HPLC法により一斉分析した[6].

結 果

鉄嶺と北九州における夏と冬のPAH,

NPAH, 変異原性, ROS生成量の比較をTable 1に示す. PAH濃度の季節の違いを見ると北九州は夏, 鉄嶺は冬に高濃度の特徴が見られた. 冬のPAH濃度は鉄嶺が北九州よりも約30倍高く, 間接変異原性についても鉄嶺の方が高かった. ROS生成量は, 両都市とも冬より夏の方が高い傾向にあり, 北九州は鉄嶺の2倍以上の濃度を示した. NPAH濃度の季節による違いを見ると, 鉄嶺では冬より夏の方が3倍以上も高く, 北九州でも若干高かった. また, 同じ夏であっても鉄嶺が北九州より100倍も高い結果となった. 直接変異原性については鉄嶺が冬より夏の方が高く, 北九州では冬の方が夏よりも高くなり, 逆の傾向が得られた. このように変異原性, ROS生成量, PAH, NPAH濃度との間に相互関係は見られなかった.

また, 両都市の夏, 冬のPAH, NPAHの粉塵中濃度をそれぞれ蛍光検出HPLC法, 化学

Table 1. Comparison of PAH, NPAH concentrations, mutagenicities and consumption of thiol group

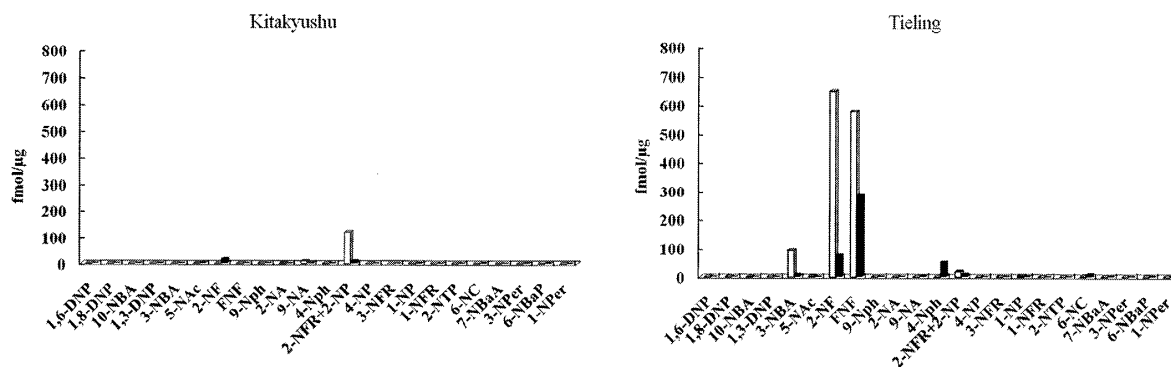
Place	Season	PAH (p mol/mg)	NPAH (p mol/mg)	TA98 (Rev./mg)	TA100+S9 (Rev./mg)	ROS (f mol/ μ g)
Tieling	Winter	4165	975	430	455	1.4
	Summer	1015	3626	1946	975	2.0
Kitakyushu	Winter	130	23	1754	164	1.2
	Summer	430	32	253	381	4.8

PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons, NPAH: nitropolycyclic aromatic hydrocarbons, TA98(Rev/mg): mutagenicity of *Salmonella typhimurium* TA98 (Revertants/mg), TA100 + S9(Rev/mg): mutagenicity of *Salmonella typhimurium* TA100 (Revertants/mg), ROS: reactive oxygen species

発光検出/HPLC法で分析した結果NPAHは、両都市とも冬より夏の方が高濃度の傾向にあった。PAHは、北九州では夏の方が高

かったが、鉄嶺では特に冬に高濃度であった (Fig. 1).

NPAH



PAH

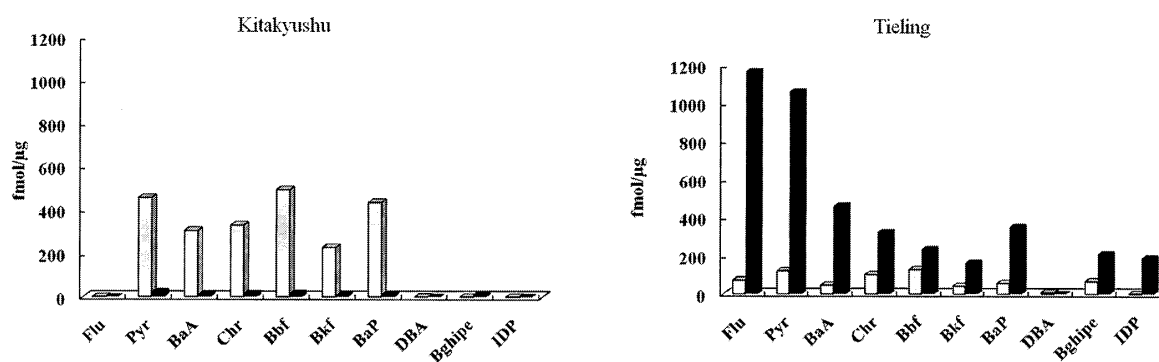


Fig.1. Concentrations of NPAHs and PAHs in airborne particulates.

FR: fluoranthene, Pyr: pyrene, BaA: benz[a] anthracene, Chr: chrysene, BbF: benz[b] fluoranthene, BkF: benz[k] fluoranthene, BaP: benz[a] pyrene, DBA: dibenzanthracene, BghiPe: benz[ghi]perylene, IDP: indenoperylene, 1,3-, 1,6-, 1,8-DNP: dinitropyrene, 3-, 10-NBA: nitrobenzanthracene, 5-NAc: nitroacenaphthene, 2-NF: nitrofluorene, FNF: 2-fluoro-7-fluorofluorene, 4-, 9-NPh: nitrophenanthrene, 2-, 9-NA: nitroanthracene, 2-NFR+ 2-NP: 2-nitroacenaphthene+ 2-nitropyren, 4-NP: nitropyrene, 1-, 3-NFR: nitroacenaphthene, 2-NTP: nitrotriphenanthrene, 6-NC: nitrochrysene, 7-NBaA: nitrobenz[a] anthracene, 6-NBaP: nitrobenz[a]pyrene, 1-, 3-NPer: nitroperylene.

□: Summer, ■: Winter.

考 察

北九州と鉄嶺はいずれも製鉄を中心とする工業都市という共通点を持つことから、大気浮遊粉塵中のPAH, NPAH濃度, 変異原性, ROS生成量につて、同様の傾向が見られることが予想された。しかし、都市によって大きな違いが認められた。PAH濃度は、北九州は夏、鉄嶺は冬に高濃度となり、冬のPAH濃度は鉄嶺が北九州より30倍も高く、PAH濃度と相関すると予想された冬の間接変異原性は予想通り、鉄嶺の方が北九州よりも高かった。ROS生成量は、両都市とも、冬より夏の方が高く、北九州は鉄嶺の2倍以上の濃度を示した。NPAH濃度の季節による違いを見ると、両都市とも冬より夏の方が高濃度であり、直接変異原性については鉄嶺のみ、NPAH濃度と同様の結果であった。

これらの要因として、両都市での主要エネルギー、生活様式、事業所の設備などの違いを考える必要がある。第一に日本と中国の主要エネルギーに違いがある。近年、産業の発展が著しい中国では多量の化石燃料を使用しており、一次エネルギーの約70%が石炭である。このため、北九州では石油、鉄嶺では石炭という異なる主要発生源によりPAH, NPAH組成が異なると考えられる[7]。また生活系の石炭燃焼施設では、排煙からの脱粒子が進んでいないことなどの要因を考慮すると、鉄嶺でPAH, NPAH濃度が高い原因が理解できる。これに対し日本では工場排煙に対する規制が厳しく、脱粒子対策が十分に行われている。しかし、北九州の夏にNPAHが高濃度となる要因としては、気温や太陽光などの気象条件、NO_x濃度、PAH濃度の影響により、2-NFやFNFなどの2次生成物質が高濃度生成されていること(Fig. 1)が理由の一つとして考えられる。

変異原性とROS生成量についても季節や都市の違いによって異なる傾向が見られた。変異原性について、PAHがNPAHの直接変異原性を抑制することが知られており、間接変異原性についても共存物質による抑制効果が働いている可能性がある。またPAH, NPAH以外にこれらの酸化物質であるキノン体がROS生成に関与している[8]、ROS生成量が夏の方が冬よりも高く、しかもPAH濃度の低い北九州の方が鉄嶺より高かった事実は、北九州ではPAH濃度は低いが、PAHキノン体の濃度が高い可能性も示している。従って、夏の太陽光によるPAHの分解反応とその生成物の同定定量が必要である。本調査に用いたサンプルは、溶液の残量などの関係上、限定された日時のものとなった。今後、データ数を増やすことで日本と中国の大気汚染の現状をより明確にし、PAHキノンの分析など、進めていく必要があると考えられる。

結 論

1. 同じ製鉄中心の工業都市である北九州と鉄嶺のPAH, NPAH濃度, 変異原性, ROS生成量の間には、都市と季節による濃度差や活性量の違いがあり、その要因として、主要エネルギーの違い、共存物質濃度の違い、PAH, NPAHの2次生成物質による影響などが考えられた。
2. 変異原性とROS生成から見た大気毒性には、必ずしもPAH, NPAHの濃度とは相関せず、2次生成物質であるPAHキノンなどの測定も必要と考えられた。
3. 大気粉じん調査、毒性試験評価を継続させ、大気環境における現状をより明確にする必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、大気粉じんの捕集にご協力して頂きました田村 憲治博士 (国立環境研究所)、酒井 茂克氏 (北海道環境科学研究センター)、狩野 文雄氏 (東京都保健安

全研究センター)、嵐谷 奎一教授 (産業医科大学)、橋場 久雄氏 (石川県保健環境センター)、Vasiliy F. Mishukov (ロシア科学アカデミー極東支部)、Hae Young Chung 教授 (釜山大学薬学部)、林 金明教授 (中国科学院生態環境研究中心) に深く感謝致します。

引 用 文 献

1. Durant JL, Busby WF Jr, Lafleur AL *et al* (1996): Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutat Res* 371: 123–157
2. Bolton JL, Trush MA, Penning TM *et al* (2000): Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13 : 135–160
3. Wada M, Kido H, Kishikawa N *et al* (2001): Assessment of air pollution in Nagasaki city: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives, and some metals. *Environmental pollution* 115 : 139–147
4. Ames BN, Mc Cann J & Yamasaki E (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31 : 347–364
5. Eaton P (2006): Protein thiol oxidation in health and disease. *Free Radic Biol Med* 40 : 1889–1899
6. Tang N, Taga R, Hattori T, Toriba A, Kizu R & Hayakawa K (2005): Simultaneous determination of twenty-one mutagenic nitropolycyclic aromatic hydrocarbons by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Proceedings of the 13th International Symposium Bioluminescence & Chemiluminescence*. World Scientific (London): 441–444
7. Lima ALC, Farrington JW & Reddy CM (2005): Combustion-driven polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment—A review. *Environmental Forensics* 6 : 109–131
8. Jarabak R, Harvey RG & Jarabak J (1998): Redox cycling of polycyclic aromatic hydrocarbon, *o*-quinones, metal ion-catalyzed oxidation of catechols bypasses inhibition by superoxide dismutase. *Chem Biol Interact* 115: 201–221

Comparison of Atmospheric Pollution of Kitakyushu and Tieling from the View Points of PAH, NPAH, Mutagenicity and Generation of Reactive Oxygen Species

Kanae BEKKI, Ning TANG, Akira TORIBA and Kazuichi HAYAKAWA

*Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University,
Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan*

Abstract : Airborne particulate matters contain many kinds of organic pollutants. Among them, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), nitropolycyclic aromatic hydrocarbons (NPAH) and quinoid PAHs were reported to have several human health effects. We collected airborne particulates in Kitakyushu, Japan and Tieling, China in summer and winter, and analyzed the PAH and NPAH to evaluate the direct- and indirect-acting mutagenicities and generating activities of reactive oxygen species (ROS). The concentrations of PAHs and NPAHs in Tieling were much higher than in Kitakyushu, with seasonal variations. The mutagenicity level was higher in winter while the ROS generation activity was higher in summer. These results suggest that concentrations of PAH and NPAH didn't correlate with mutagenicity and ROS generation activity. More studies are needed on the environmental behaviors of compounds other than PAHs and NPAHs, such as quinoid PAHs, and their biological activities.

Key words : PAH, NPAH, Mutagenicity, ROS.

J UOEH 30(1) : 39 - 45 (2008)