

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590160

研究課題名(和文) 含硫黄多環芳香族化合物を指標とする越境大気汚染物質の人体曝露評価法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for assessing human exposure to cross-boundary air pollutions by polycyclic aromatic sulfur heterocyclic compounds as chemical markers

研究代表者

鳥羽 陽 (Toriba, Akira)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：50313680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：中国において大気汚染の主要な発生源となっている石炭燃焼由来の有機汚染物質で、黄砂を含め日本へ長距離輸送されている可能性が高いと推定される石炭燃焼マーカーとして含硫黄多環芳香族化合物(PASHs)を提案し、尿中代謝物を生体指標(バイオマーカー)とする石炭燃焼煙の人体曝露評価法を開発することを目的とした。代表的なPASHsの中からヒトへの曝露量が高いと予測できたdibenzothiophene (DBT)をマーカー候補とし、DBT投与ラット尿中から代謝物を同定し、代謝経路を明らかにすることに成功した。同定された主代謝物をバイオマーカー候補とし、実際にヒト尿試料から検出できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Polycyclic aromatic sulfur heterocyclic compounds (PASHs) are organic pollutants from coal combustion, which has become a major source of air pollution in China and are estimated to be a cross-boundary pollutant such as Asian dust. Urinary metabolites of PASHs as a biomarker for coal burning exposure were examined in this study. Dibenzothiophene (DBT) was predicted to have high exposures to humans in the tested PASH candidates. DBT metabolites from DBT administered rat urine were successfully identified and its metabolic pathway was elucidated. The analysis of human urine samples suggested the possibility of the metabolite excretion. It is concluded that the identified major metabolite is a convincing biomarker candidate for the biomarker of exposure to coal-burning smoke.

研究分野：生体分析化学

キーワード：バイオマーカー 石炭燃焼 越境汚染 曝露評価 アジア

1. 研究開始当初の背景

中国をはじめとするアジア諸国は一次エネルギーに占める石炭の割合が高く、世界の石炭消費量は年々増加している。一方で、国際がん研究機関は家庭用石炭燃焼による室内汚染を発がん性がある (Group 1) としているなど、不適切な石炭の使用は発がん物質等の汚染物質を放出するため、ヒトの健康に対する石炭燃焼煙の影響が懸念されている。石炭燃焼煙曝露とその健康リスクとの関係性を明らかにする上で、生体試料中の石炭燃焼マーカー代謝物をバイオマーカーとして測定することで個人曝露評価を行うモニタリングは有効な手段である。これまでにヒト尿中水酸化多環芳香族炭化水素やフッ化物をバイオマーカーとしたモニタリングが行われてきたが、いずれも石炭燃焼煙以外の曝露経路を有することから石炭燃焼煙の曝露レベルを正確に反映できるとは言い難く、十分な個人曝露量評価には至らなかった。

助成研究者らはこれまでに石炭燃焼マーカー候補物質として含硫黄多環芳香族化合物類 (PASHs) の評価を行い、PASHs の中でも特にガス相に多く分布する Dibenzothiophene (DBT) は大気中に高濃度で存在することが期待され、各種燃焼粉塵中で石炭燃焼煙中に高濃度で存在する点、大気中総 PASH 濃度と相関のある点でも有用な石炭燃焼マーカーになり得ることを明らかにした。この結果は、DBT の尿中代謝物が有用なバイオマーカーとなり得る可能性が高いことを示唆するが、DBT の代謝経路や尿中主代謝物については明らかとなっていない部分が多く、ヒト尿中から検出された研究例はない。そこで本研究では、DBT について *in vivo* 代謝実験を行い、尿中主代謝物候補物質を同定、定量することでバイオマーカー候補となり得る代謝物の決定し、ヒト尿中に排泄される代謝物の検出を試みた。

2. 研究の目的

- (1) 代表的な PASHs の中から曝露量が高いと予測できるマーカー候補を選択し、*in vivo* 実験により、尿中代謝物を同定し、代謝経路を明らかにする。
- (2) 同定された主代謝物をバイオマーカー候補とし、実際にヒト尿試料から検出するための分析法を開発して、尿試料中に排泄された代謝物を同定する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

雄 Wistar 系ラットに DBT、あるいは重水素化 DBT (DBT- d_8) を 10 mg/kg 体重で腹腔内投与し、24 時間ごとに 3 日間蓄尿した ($n=3$)。コントロール群についても同様に蓄尿した後、各尿試料を -30°C で冷凍保存し、分析用試料とした。

(2) ラット尿試料の前処理と分析

DBT sulfoxide および DBT sulfone の分析

尿試料はそれぞれ Sep-Pak plus C18 及び Sep-Pak plus Alumina A カートリッジで固相抽出の前処理を行った。得られた溶出液を減圧乾固した後、DBT sulfoxide 分析用はメタノールに再溶解し高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) に、DBT sulfone 分析用はトルエンに再溶解しスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) による分析に供した。

2-OHDBT および 2-OHDBT sulfone の分析

尿試料はそれぞれ加水分解酵素による脱抱合処理を行い、2-OHDBT 分析用は Sep-Pak plus C18 カートリッジで、2-OHDBT sulfone 分析用はトルエンによる液-液抽出の前処理を行った。得られた溶出液および有機層を減圧濃縮した後、トリメチルシリル (TMS) 誘導体化し、GC-MS による分析に供した。

還元処理した尿中 2-OHDBT の分析

脱抱合処理を行った尿試料について三塩化チタンを用いて還元処理を行った後、ヘキサンで液-液抽出の前処理を行った。得られた有機相を減圧乾固した後、TMS 誘導体化し、GC-MS による分析に供した。

(3) ヒト尿試料の前処理と分析

ヒト尿試料 5 mL に内標準物質として 2-hydroxyfluorene の ^{13}C 標識体を添加し、凍結乾燥した後、三塩化チタンを加えて還元した。ヘキサンで 3 回抽出して有機層を減圧乾固してから 1,2-dimethylimidazole-4-sulfonyl chloride (DMIS-Cl) により誘導体化した。誘導体化物を Sep-Pak plus Alumina A カートリッジで固相抽出を行い、溶出液を濃縮して検液とした。得られた 2-OHDBT の DMIS 誘導体は、LC-MS/MS を用いてポジティブ ESI 法でイオン化して SRM モードで分析した。

4. 研究成果

(1) 候補化合物の選定

石炭、木材、灯油、ディーゼル燃料の燃焼に伴って発生する粉じん中の PASH 濃度から、石炭燃焼時の PASH 放出量がディーゼル燃料、灯油、木材などと比べて数十~数百倍高く、差が明瞭であることを明らかにしている。また、都市大気中 PASHs 濃度を測定した結果、北京およびウラジオストクの冬季で石炭使用量の増大に伴う大気中 PASHs 濃度の著しい上昇が見られ、一方で年間を通して自動車排ガスが主要大気汚染源である金沢では季節間濃度変化はほとんど見られなかった。従って、PASHs が有用な石炭燃焼マーカーになり得ることが強く示唆された。中でも DBT (図 1) は大気中に特に高濃度で存在し、各種燃焼粉塵中で石炭燃焼煙中に多く存在する点、大気中総 PASH 濃度と相関のある点で最適な石炭燃焼マーカーであると考えられた。そこで、DBT を選択し、尿中主代謝物候補物質の探索を行った。代謝酵素 CYP 1A1 による DBT の *in vitro* 代謝実験の結果から、S 酸化体のスルホキシドとスルホン、骨格に水酸基が導入された水酸化体、水酸基の入った

S 酸化体を代謝物の候補化合物とした。

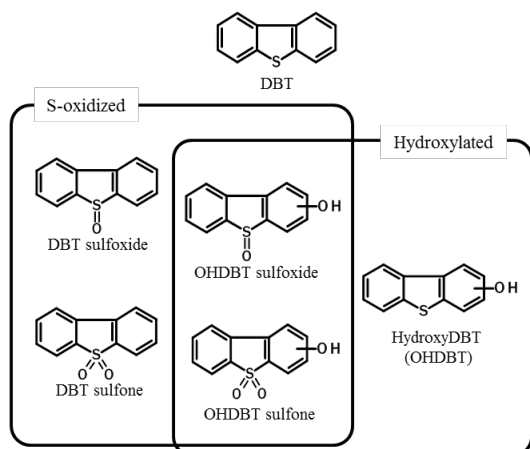


図1 Dibenzothiophene (DBT)及び代謝物候補化合物の構造

(2) ラット尿中代謝物の同定

DBT sulfoxide 及び sulfone の同定

尿中代謝物の同定は、非標識 DBT と重水素化 DBT の投与結果について、保持時間及び質量分析によるスペクトル情報を比較して行った。尿中主代謝物候補物質である DBT の S 酸化体について同定を行った。DBT sulfoxide の同定は、固相抽出により尿試料を前処理した後、LC-MS/MS で検出した。同定には、フラグメンテーションが起こりやすく高性能に優れたガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) の電子イオン化 (EI) 法を行うことが望ましいが、DBT sulfoxide は GC で分析する際に熱分解することが知られているため、LC-MS/MS を用いた。DBT sulfoxide の硫黄-酸素結合は強く分極しており、高極性化合物に有効なエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) でのイオン化が可能であった。DBT 投与後 24 時間蓄尿したラット尿試料中の DBT sulfoxide について、プリカーサーイオンを m/z 201.1 ($[M+H]^+$)、プロダクトイオンを m/z 183.9 ($[M-O]^+$) とした選択反応モニタリング (SRM) モードで分析したところ、標準物質と保持時間の一致するピークが観察された。そのピークについて、プロダクトイオンスキャン (EPI) モードで測定した結果得られた MS/MS スペクトルは、標準物質のスペクトルと一致した (図 2)。重水素化 DBT を投与したラット尿試料においても標準物質のスペクトルと比較して重水素の 8 マス分が付加したと推察される MS/MS スペクトルが得られた。以上より尿中 DBT sulfoxide を同定することに成功した。次に、DBT sulfone について、固相抽出により尿試料を前処理した後、GC-MS で測定したが DBT 投与ラットの尿中から検出されなかった。ラット肝ミクロソームによる代謝実験でも DBT sulfoxide の 10% 程度しか生成しなかったことから、尿中への排泄量が少なかったと考えられる。

水酸化 DBT (OHDBT) の同定

OHDBT は第二相でグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けると推定できるため、まず加水

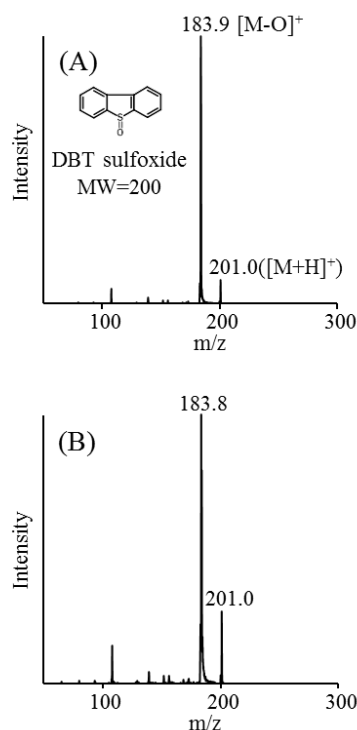


図2 DBT sulfoxideの標品(A)及びDBT投与ラットから検出されたピーク(B)のMS/MSスペクトル

分解酵素である β -グルクロニダーゼおよびアрилサルファターゼで脱抱合処理を行った後、固相抽出により精製した。購入が可能であった 2-OHDBT 標準物質を TMS 誘導体化し、GC-MS で高感度に検出できる m/z 272.0 ($[M]^+$) および 257.0 ($[M-CH_3]^+$) をモニタリングイオンとする SIM モードで検出した。その結果、双方のチャンネルで保持時間及び強度比が標準物質と一致するピークが観察され、重水素化体投与の尿中からも質量数がシフトした同様のピークが観察されたことから、2-OHDBT を同定した。加水分解酵素による脱抱合処理を行っていないラット尿試料について 2-OHDBT の分析を行ったところ、DBT 投与、重水素化体投与共に不検出であった。従って、検出された 2-OHDBT のほとんどがグルクロン酸抱合体、あるいは硫酸抱合体として尿中に存在することが推察された。

OHDBT sulfone の同定

OHDBT 同様に、*in vivo* 実験で報告のある 2-OHDBT sulfone について同定を試みた。購入可能な 2-OHDBT sulfone の標準物質がなかったため、過酸化水素を用いて 2-OHDBT を酸化して 2-OHDBT sulfone を合成した。OHDBT 同様、OHDBT sulfone も抱合化を受けると推定できるため、尿試料は精製前に脱抱合処理を行い、その後トルエンで液-液抽出して有機層を濃縮してから TMS 誘導体化し GC-MS で同定した。その結果、2-OHDBT sulfone の標準物質と溶出時間の一致するピークが DBT あるいは重水素化体投与ラット尿試料から検出され、主要なフラグメントイオンの強度比が標準物質と一致したことよ

り同定に成功した。

OHDBT sulfoxide の同定

2-OHDBT sulfoxide が DBT から 2-OHDBT sulfone への代謝の中間体となり得ることから、同定を行うこととした。定性能に優れた GC-MS の EI 法を用いることが望ましいが、DBT sulfoxide 同様、直接分析できない可能性があるため、脱抱合処理した尿中 2-OHDBT sulfoxide を還元し、2-OHDBT として間接的に検出した。尿中スルホキシド体の還元処理で汎用的に用いられている三塩化チタンを用いて還元した。この方法では 2-OHDBT sulfone は還元されないため、sulfoxide 体だけを特異的に還元できた。DBT 投与ラット尿試料を還元処理し、ヘキサンで液-液抽出して有機層を濃縮してから TMS 誘導体化し GC-MS で 2-OHDBT を測定した。還元処理を行うことで尿中 2-OHDBT が顕著に増加し、2-OHDBT sulfoxide の存在が示唆された。コントロールラットの尿中では還元操作を行っても 2-OHDBT は検出されなかった。

尿中代謝物の定量

同定に成功した代謝物のうち、定量可能であった DBT sulfoxide、2-OHDBT および還元処理を行った尿中の 2-OHDBT について定量を行った。還元処理を行った尿中 2-OHDBT の定量値から還元処理を行わなかった尿中 2-OHDBT の定量値を差し引くことで 2-OHDBT sulfoxide の定量値を算出した。DBT sulfoxide と 2-OHDBT の 72 時間総排泄量はそれぞれ 219.7 ± 138.5 ng, 205.7 ± 49.5 ng と同程度であったのに対して、2-OHDBT sulfoxide は 2575 ± 520.9 ng であったことから 2-OHDBT sulfoxide の尿中排泄量は DBT sulfoxide および 2-OHDBT のおよそ 10 倍程度であり、DBT の主代謝物であることが推察された。いずれの代謝物も投与後 24 時間で最も多く排泄され、その後は減少する傾向が見られた。尿中代謝物の定量結果より、2-OHDBT sulfoxide が DBT の尿中主代謝物である可能性が示唆された。以上の結果より示唆された、DBT の代謝経路を図 3 に示す。

(3) ヒトにおける尿中 DBT 代謝物の測定

バイオマーカー候補の選定

バイオマーカーとする代謝物は、対象化合物が試料中により高濃度に存在することが望ましく、還元処理を行った尿中の 2-OHDBT と 2-OHDBT sulfoxide の総量としての 2-OHDBT が最適な石炭燃焼煙曝露バイオマーカー候補であると判断した。大気中 DBT 濃度と本代謝実験より得られた尿中への排泄量を考慮すると、ヒト尿試料における還元後の 2-OHDBT 濃度は数 pM レベルと推定され、分析可能であることから、ヒト尿試料を還元して得られる 2-OHDBT が石炭燃焼煙曝露のバイオマーカー候補として最も有力であると結論づけた。

ヒト尿中 DBT 代謝物の分析

日本人男性尿試料 5 mL について、予め

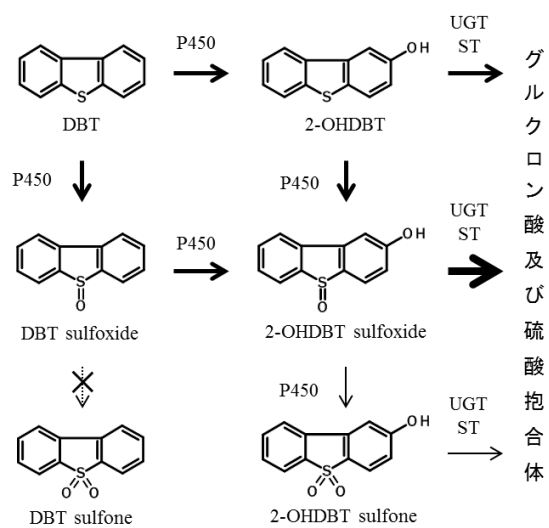


図3 本研究により明らかとなったDBTの代謝経路

2-OHDBT を添加した試料と内標準物質のみ添加した試料について、凍結乾燥した後に還元して DMIS 誘導体化を行って得られた反応物を固相抽出して LC-MS/MS で測定した結果、標準物質を添加しない試料で 2-OHDBT のピークが確認でき、標準物質を添加した試料では添加量のピークの増大が観察された。夾雑物の影響で回収率が 20%以下となり、回収率の改善と前処理法の再検討が課題として残ったものの、三塩化チタンで還元処理を行った尿中の 2-OHDBT を石炭燃焼煙曝露のバイオマーカーとして用いることで、個人レベルでの石炭燃焼煙の曝露評価を行うことができる可能性が示唆された。

以上をまとめると、本研究により以下の研究成果を得た。

- (1) DBT の尿中代謝物候補である S 酸化体および水酸化体の個々の分析法を開発し、DBT 投与ラット尿中から代謝物を同定すると共に、DBT の代謝経路およびことに成功した。
- (2) 尿中 DBT 主代謝物が 2-OHDBT sulfoxide の抱合体であることを初めて明らかとした。
- (3) 還元処理を行った尿中の 2-OHDBT は、ヒト尿中でも分析可能であることから、最適な石炭燃焼煙曝露バイオマーカー候補化合物と結論付け、実際にヒト尿試料から該当のピークが検出された。

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 5 件)

(すべて査読あり)

Watanabe, T., Hasei, T., Toriba, A., Hayakawa, K., Yamaguchi, T., (1 番目, 2 番目, 16 番目, 17 番目, 23 番目, 他 22 名)
Air pollution with particulate matter and

mutagenes: relevance of Asian dust to mutagenicity of airborne particles in Japan., *Genes Environ*, **36** (3), 120-136 (2014).

DOI:org/10.3123/jemsge.2014.013

Tang, N., Sato, K., Tokuda, T., Tatematsu, M., Hama, H., Suematsu, T., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., Factors affecting atmospheric 1-, 2-nitropyrenes and 2-nitrofluoranthene in winter at Noto peninsula, a remote background site, Japan., *Chemosphere*, **107**, 324-330 (2014).

DOI:10.1016/j.chemosphere.2013.12.077

Asahi, M., Kawai, M., Toyama, T., Kumagai, Y., Chuesaard, T., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K., Toriba, A., Identification and quantification of in vivo metabolites of 9, 10-phenanthrenequinone in human urine associated with producing reactive oxygen species., *Chem. Res. Toxicol.*, **27** (1), 76-85 (2014).

DOI:10.1021/tx400338t

Kakimoto, K., Nagayoshi, H., Takagi, S., Akutsu, K., Konishi, Y., Kajimura, K., Hayakawa, K., Toriba, A., Inhalation and dietary exposure to Dechlorane Plus and polybrominated diphenyl ethers in Osaka, Japan., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **99**, 69-73 (2014).

DOI:10.1016/j.ecoenv.2013.10.023.

Sugitate, K., Yamagami, T., Nakamura, S., Toriba, A., Hayakawa, K., Deoxidation of fenthion sulfoxide, fenthion oxon sulfoxide and fensulfothion in gas chromatograph/mass spectrometer, and the prevention of sulfoxide deoxidation by polyethylene Glycol 300., *Anal. Sci.*, **28** (7), 669-673 (2012).

DOI:10.2116/analsci.28.669

〔学会発表〕(計 13件)

鳥羽 陽, たばこ煙中多環芳香族炭化水素キノン類, 及び対応するジオール体(ヒドロキノン類)の分析, 日本薬学会第135年会, 2015.3.25-28, デザイン・クリエイティブセンター神戸, 神戸サンポホール, 神戸学院大学, 兵庫医療大学(兵庫県・神戸市).

本間千春, 鳥羽 陽, GC-MS/MSによる大気粉塵中多環芳香族炭化水素キノン類の定量と大気内挙動評価, 日本薬学会第135年会, 2015.3.25-28, デザイン・クリエイティブセンター神戸, 神戸サンポホール, 神戸学院大学, 兵庫医療大学(兵庫県・神戸市).

繁多敬久, 鳥羽 陽, 渡辺徹志, 志都市圏及び非都市圏における大気粉塵-表層土壌間の変異原性及び有機成分の関係, 日本薬学会第135年会, 2015.3.25-28, デザイン・クリエイティブセンター神戸, 神戸サンポホール, 神戸学院大学, 兵

庫医療大学(兵庫県・神戸市).

Kakimoto, K., Toriba, A., Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air Particulates in North-East Asia., International Conference of Asian Environmental Chemistry 2014, 2014.11.24-26, Bangkok (Thailand).

宇於崎和香, 鳥羽 陽, たばこ煙中多環芳香族炭化水素キノン類の測定, 日本薬学会北陸支部第126回例会, 2014.11.16, 金沢大学(石川県・金沢市).

クウリバリ スレイマン, 鳥羽 陽, 渡辺徹志, 北京及び日本海沿岸地域における大気粉塵中の成分の比較及び中国大陸からの越境輸送の影響, 日本薬学会第134年会, 2014.3.27-30, 熊本大学(熊本県・熊本市).

袴田真理子, 鳥羽 陽, 立山室堂の積雪層の陰イオンと多環芳香族炭化水素類の分析, 第30回イオンクロマトグラフィー討論会, 2013.11.28-29, 株式会社豊田中央研究所(愛知県・長久手市).

菅安幸次, 鳥羽 陽, 全国14地点で捕集した大気粉塵中多環芳香族炭化水素類の解析, 日本薬学会北陸支部第125回例会, 2013.11.17, 北陸大学(石川県・金沢市).

栗崎麻衣子, 鳥羽 陽, 石炭燃焼煙曝露バイオマーカー候補としての含硫黄多環芳香族化合物の代謝物探索, フォーラム2013:衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013.9.13-14, 九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市).

袴田真理子, 鳥羽 陽, 能登における多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素の長距離輸送解析, 日本薬学会第133年会, 2013.3.27-30, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

藤田浩祐, 鳥羽 陽, 渡辺徹志, 東アジア地域5地点における大気粉塵の化学成分及び変異原性の比較, 日本環境変異原学会第41回大会, 2012.11.29-30, 静岡県コンベンションアーツセンター(静岡県・静岡市).

北 将大, 鳥羽 陽, GC-MS/MSによる多環芳香族炭化水素キノン類の一斉分析法の開発と大気粉塵試料の分析, 日本薬学会北陸支部第124回例会, 2012.11.18, 富山大学(富山県・富山市).

北 将大, 鳥羽 陽, GC-MS/MSを用いた多環芳香族炭化水素キノン類の一斉分析法の開発と大気粉塵試料への適用, 日本分析化学会第61年会, 2012.9.19-21, 金沢大学(石川県・金沢市).

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学衛生化学研究室ホームページ

http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~eisei/j_home_framepage.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鳥羽 陽 (TORIBA, Akira)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：5 0 3 1 3 6 8 0