

大気中の微小粒子状物質 (PM_{2.5}) の 生物化学的活性酸素産生能評価法の開発

代表研究者

鳥羽 陽

金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授



1. 研究目的

大気中の微小粒子状物質 (PM_{2.5}) は、肺の深部に到達して様々な健康影響を引き起こすことが報告され、PM_{2.5}と各種疾患との関係が疫学研究により確認されている。PM_{2.5}の濃度が25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 上昇するに伴い、全死亡で1.16倍、心肺疾患死亡で1.25倍、肺がん死亡で1.37倍増加することが報告されている。PM_{2.5}の重量濃度及びPM_{2.5}に含まれる有機物質や金属類の測定による発生源や毒性の評価が長い間行われてきたが、複合影響の結果としての健康リスクを従来の測定項目だけで直接評価することは困難である。PM_{2.5}の健康リスクを総合的に評価する指標の1つとして、活性酸素 (ROS) 産生能 (酸化能) の測定が行われるようになり、その測定には、dithiothreitol (DTT) の消費 (酸化) を指標とするDTTアッセイがよく用いられている。しかしながら、DTTアッセイは簡便であるものの、試料濃度が低い場合や試料の活性が低い場合に感度不足に陥り、試料の濃縮や多量の試料を要求するため、大気汚染の評価で要求される時間分解能を上げることが困難である。また、個人サンプラーのような低流量で捕集量の少ない試料には適用することができない。以上より、より高感度な酸化能 (ROS産生能) アッセイの確立が必要である。本研究では、高感度で簡便なROS産生能評価法を開発し、実環境で捕集したPM_{2.5}試料の生物化学的ROS産生能予測を行うことを目的とした。

2. 研究内容

従来のDTTアッセイは、DTTを含むリン酸緩衝液中に試験物質を添加して37°Cでインキュベートし、一定時間間隔で反応液を一部採取して酸性下で反応を停止させた後、試験物質により酸化消費された後のDTTの残量を dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) を発色剤として波長412 nmにおける吸光度を測定するものである。従来の消費されずに残存するDTTを測定する手法は、活性 (ブランクとの差) が小さい試料では検出が困難になり、アッセイ感度が低い原因となっているため、これまでとは逆に酸化された基質を対象として検出することによって高感度化を達成することとした。さらに、基質酸化体をシグナルに変換する際に、高感度化できる蛍光検出を利用することが望ましく、基質を蛍光シグナルに変換するために、基質酸化体を蛍光標識する方法を検討した。DTT酸化体にはアルコール性水酸基しかなく、標識化が困難であったため、本研究では標識化が可能な基質としてDTTの代わりに dihydrolipoic acid (DHLA) を使用した。DHLAは、DTTとほとんど同じ酸化還元電位 (DHLA: -0.32 V、DTT: -0.33 V) を有しており、DTTと同様に反応基質として利用できる。

DHLAがDTTと同様に電子供与体 (基質) として機能するか確認するため、従来のアッセイ法における反応基質をDHLAに変更し、代表的なROS産生物質である9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ)

をモデル物質とし、DHHLAとDTTの消費を比較したところ、DHHLAはDTTと同様に基質として十分に機能することが分かった。未反応の基質は、その後のアッセイ操作の過程で酸化される可能性があり、非特異的な基質の消費が起こると正しい結果を得ることができない。また、未反応の基質を無効化したとしても反応液中に残存しているとその後の誘導体化において蛍光性の誘導体を生じる可能性がある。未反応基質のチオール (SH) 基を化学修飾により無効化し除去するために、マレイミド基とSH基との反応による基質の除去方法を検討した。未反応基質を含む反応液にN-(2-aminoethyl)maleimideの水溶液を添加する液相反応とマレイミド修飾シリカ粒子 (SiliaBond Maleimide, SILICYCLE) を添加する固相反応を検討した結果、SH基を化学修飾してから未反応試薬やシリカ粒子、修飾基質を除去することができた。

本研究では、従来の残存する基質を測定対象とするのではなく、基質の消費 (酸化生成物) を蛍光として直接シグナル化した。DHHLAの酸化生成物であるリポ酸 (LA) には蛍光性がないため、分子内のカルボキシル基を誘導体化の標的とする蛍光誘導体化を検討し、蛍光誘導体化試薬として7-acetylamino-4-mercapto-2,1,3-benzoxadiazole

(AABD-SH) を選択した。AABD-SHはカルボキシル基を修飾でき、反応前の試薬の蛍光が微弱で誘導体化して初めて蛍光を発する発蛍光試薬であり、バックグラウンド蛍光を考慮する必要がないことが最大の利点である。まず検出対象のLAの誘導体化物を同定するため、標準物質のLAをAABD-SHを用いて誘導体化しAABD誘導体化LAを同定することに成功し、その誘導体化物の極大励起、蛍光波長は、それぞれ378 nmと525 nmであった。試料により消費された基質 (DHHLA) から生成した酸化体のLAを蛍光のシグナルとして検出し、時間-LA濃度のグラフにおける傾きから基質消費速度を算出するまでのアッセイの全ステップを確立できたため、実際のアッセイに適用した

ところ、基質消費に伴って時間依存的にLAの濃度が増加し、消費速度を算出することができた。

以上より、大気粒子の健康リスク指標として用いられているROS産生能 (酸化能) アッセイの反応基質として従来のDTTの代わりにジヒドロリポ酸 (DHHLA) を用い、一定時間試験物質と反応させた後に酸化生成したリポ酸 (LA) のカルボキシル基を蛍光誘導体化してその蛍光を測定することでLA生成量 (ROS産生能) を算出する、新たな高感度蛍光ROS産生能アッセイを開発することに成功した。

3. 発表 (研究成果の発表)

- 1) 鳥羽 陽、寺村優希、森井彩香、川井 萌、深川真夢、本間千春、唐寧、早川和一、大気粒子による活性酸素種産生に対する多環芳香族炭化水素キノン類の寄与評価。第60回大気環境学会 (東京、2019)。
- 2) 鳥羽 陽、長岡祐樹、深川真夢、Thaneeya Chetianukornkul、唐 寧、早川和一、タイのタクシー車内におけるPM_{2.5}曝露と粒子中の多環芳香族炭化水素類の特徴。フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー (京都、2019)。
- 3) 山崎 陸、川井 萌、唐 寧、早川和一、鈴木 亮、鳥羽 陽、加熱式たばこ煙中多環芳香族炭化水素キノン類の定量と酸化能への寄与。日本薬学会北陸支部第131回例会 (石川、2019)。
- 4) 川井 萌、寺村優希、本間千春、山崎 陸、唐 寧、早川和一、鈴木 亮、鳥羽 陽、大気粒子及び燃焼発生源粒子の酸化能に対する多環芳香族炭化水素キノン類の寄与評価。日本薬学会140年会、(京都、2020)。