

学位論文題名

ディーゼル排気粒子に含まれる心・血管作用原因物質の
探索と単離、定量に関する研究

学位論文内容の要旨

[背景と目的]

ディーゼル排気はディーゼルエンジンから排出されるガス状物質と粒子状物質の混合物である。これらは数千種類もの有機化合物を含んでいると言われ、都市部における環境汚染の主要因であると考えられている。ディーゼル排気粒子(diesel exhaust particles:DEP)による生物作用に関する多くの研究がなされており、肺がん、アレルギー性鼻炎、気管支疾患、内分泌腺機能障害などの健康影響が報告されている。しかし、これらの研究は、活性本体の特定も、DEPの十分な精製もないまま行われていたため、定量的評価を困難にしていた。これらの生物影響を定量的に評価し、DEPによる健康被害や環境に対する負荷を検討するためには、DEP中の生物活性物質を分離、同定し、それらの含有量を明らかにすることが不可欠である。

これまでの研究において、関らはヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノールを用いた連続的溶媒抽出とカラムクロマトグラフィーの繰り返しによる多段階分析法を開発し、ホルモン様作用を指標として多くの化合物の同定に成功している。本分析法によって同定されたニトロフェノール類には強い血管拡張作用を有することが見出された。これらのニトロフェノール類のいくつかはエストロゲンおよび抗アンドロゲン作用を有していることも見出されている。同様に、抗エストロゲン作用を有するヒドロキシフタル酸類も見出されている。これらの研究はDEP構成成分の単離・同定がDEPの健康に及ぼす影響を検討する上でいかに有効かつ有意義であるかを示したものであった。しかし、この多段階分析法は、各溶媒抽出層に同一化合物が混入しているなど単離に至る工程は複雑なものであり、分析法としての効率、精度あるいは定量性に大きな問題を抱えており、ディーゼル排気による生体影響を定量的に評価することは依然として困難なままであった。このため、従来法に代わる、より簡便かつ信頼性の高い新たな分析法の開発が必要であると考えた。

従来法によるこれまでの研究から、DEP成分は大きく1)中性画分、2)弱酸性画分、そして3)強酸性画分から成っていることが推察できる。この考えに基づき新規系統分析法として酸塩基抽出法を基軸とした分析法の開発に着手することとした。本研究は、DEPの簡便かつ定量的分析法を開発し、従来法によって単離されていたDEP中のニトロフェノール類の定量を行うとともに、従来不可能であったガス成分中のニトロフェノール類の定量も行うことにする。さらにDEP中の生物活性物質の探索も行い、本分析法の有用性を確立し、ディーゼル排気による生物影響研究の進展に寄与することを目的とする。

[材料と方法]

1. DEPとガス成分

ディーゼル排気の粒子状物質(DEP)及びガス成分は独立行政法人 国立環境研究所(茨城県つくば市)に採取を依頼した。

2. 機器

使用したガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)は、島津製作所製 GCMS-QP2010 であり、Zebron ZB-5ms キャピラリーカラム(0.25mm×30m)を用いた。カラム温度は80—250°Cで分析を行った。

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)は、LC-10A(島津製作所)、使用したカラムは Inertsil ODS-3 (分取 250×20mm、分析 250×4.6mm , GL Science)及び Lobar Si 60 (250mm×10mm , MERCK)である。検出波長は 254nm で行った。

¹H-NMR は、JEOL JNM-ECA500(500MHz)(日本電子)を使用した。

液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)は、LCMS-2010A(島津製作所)でカラムは Shim-pack FC-ODS (150mm×2mm、島津製作所)を使用した。

3. 方法

DEP を 1-ブタノール(n-BuOH)に溶解し、標準物質として 4-ニトロフェノール-2,3,5,6-d₄(pNP-d₄)を添加して1晩攪拌した。得られた n-BuOH 溶液を水、飽和炭酸水素ナトリウム(NaHCO₃)水溶液、10%水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液で順次抽出した。NaHCO₃ 抽出液及び NaOH 抽出液は塩酸で中和後、それぞれジクロロメタンで抽出して、H₂O 画分、NaHCO₃ 画分、NaOH 画分を得た。得られた各画分は分析目的に応じたクロマトグラフィに付した。

[結果]

塩基抽出法を基軸とした新規系統分析法を開発した。本分析法を用いて DEP 及びガス成分の分析を行い、以下の結果を得た。

1. DEP のニトロフェノール類を GC-MS 測定に付した結果、DEP 中のニトロフェノール類が従来考えられていたものより有意に高濃度であった。
2. 従来不可能であったガス成分中のニトロフェノール類の定量にも成功し、予想以上に多量のニトロフェノール類が含まれていることを明らかにした。
3. カルボン酸層に焦点を当て新規生物活性物質の探索を行った。その結果、8種類の新規化合物を同定し、その内の 4-メチルフタル酸と 3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸に血管拡張作用があることを明らかにした。

[考察]

今回新たに開発した系統分析法は化合物の酸性度の差を利用して DEP 含有化合物を荒分けし、各種のクロマトグラフィーによって分離、同定、定量を行うものである。本法によって、簡便な DEP 分析が可能となり、さらにガス成分にも応用することが可能であることが示された。その高い定量値から本法の分析法としての有用性が確認できた。

ニトロフェノール類は、強い生物活性を持つ上、揮発性も比較的高いので DEP のみならずガス成分中の含有量も求め、それらの総量による健康被害を評価しなければならないと考えられる。本分析法によって、DEP 及びガス成分中のニトロフェノール類を精度よく分離し、同定・定量することができた。その測定に際しては、ニトロフェノール類をメチルエステル誘導体に導き GC-MS 測定に付すことにより、直接測定に比しておよそ100倍の高感度測定を可能とした。その結果、DEP に含まれるニトロフェノール類は従来法の結果から考えられていたものよりはるかに高濃度であることが明らかとなった。ガス成分中のニトロフェノール分析にも初めて成功し、これについても予想以上のニトロフェノール類が含まれていることが分かった。これらの結果は、ディーゼル排気中のニトロフェノール類の生体影響の評価に有用な知見を与えることができたものと思われる。

DEP には依然として未知の生物活性物質が含まれている。NaHCO₃ 画分を焦点とし、新規の生物活性物質の探索を行った結果、8種の新規化合物の同定に成功し、そのうちの2種に血管拡張作用を見出し、定量した。これらの生物活性はニトロフェノール類に比して弱いものの含量は比較的多く、その生体影響は無視することができないであろうと考えられる。

[結論]

DEP の主成分は燃料の酸化物であり、さらにその主体をなすものはフェノール類とカルボン酸類と考えられている。以上の結果より、これらの化合物を効率よく NaOH 画分と NaHCO₃ 画分に分離し、精度よく同定・定量できることを明らかにし、本分析法の有用性を確立することができた。さらに今回得られた分析結果は今後のディーゼル排気の影響研究にとっていずれも重要なものであった。

ディーゼル排気による生物影響の研究は今後ますます重要となると考えられ、本研究はそれらに対して十分な寄与をもたらすものであることが期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 関 興 一

副 査 教 授 玉 木 長 良

副 査 教 授 三 輪 聡 一

学位論文題名

ディーゼル排気粒子に含まれる心・血管作用原因物質の 探索と単離、定量に関する研究

ディーゼル排気は数千種類もの有機化合物を含んでいると言われ、都市部における環境汚染の主要因であると考えられている。ディーゼル排気粒子(diesel exhaust particles: DEP)による生物作用に関しては多くの研究がなされており、肺がん、アレルギー性鼻炎、気管支疾患、内分泌腺機能障害などの健康影響が報告されている。しかし、これらの研究は、活性本体の特定も、DEPの十分な精製もないまま行われていたため、定量的評価を困難にしていた。これまでの研究において、関らはヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノールを用いた連続的溶媒抽出とカラムクロマトグラフィーの繰り返しによる多段階分析法を開発し、いくつかの化合物の同定に成功している。しかし、この多段階分析法は、各溶媒抽出層への同一化合物混入を避けることができないため、単離に至る工程は複雑なものであり、分析法としての効率、精度あるいは定量性に大きな問題を抱えていた。このため、申請者は従来法に代わる、より簡便かつ信頼性の高い新たな分析法の開発が必要であると考えた。

従来法によるこれまでの研究から、DEP成分は大きく1)中性化合物、2)弱酸性化合物、そして3)酸性化合物から成る混合物と見なせるものと推察した。この考えに基づき酸塩基抽出法を基軸とした新規系統分析法の開発に着手することとした。すなわち、溶媒の塩基性の差(水、炭酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム)を利用して、DEPを中性化合物、弱酸性化合物(フェノール類)、酸性化合物(カルボン酸類)に大きく分画し、各分画をクロマトグラフィーに付すというものである。DEP及びガス成分について本分析法を適用した結果、1)DEP中のニトロフェノール類が従来考えられていたものより有意に高濃度であったこと、2)従来不可能であったガス成分中のニトロフェノール類の定量にも成功し、予想以上に多量のニトロフェノール類が含まれていることを明らかにしたこと、さらに3)カルボン酸層からは、8種類の新規化合物を同定し、その内の2種の化合物に血管拡張作用があることを明らかにしたこと等の成果を得た。以上のように、本研究は、DEPに含まれる生物活性物質を精度よく分離、同定できる系統分析法を開発し、種々の生物活性物質の分析に成功することにより、本分析法の有用性を確認することができた。さらに今回得られた分析結果は今後のディーゼル排気の生体影響研究および評価にとっていずれも有益なものであった。

学位論文公開審査は、平成21年2月3日午前10時10分より医学部臨床大講堂にて

行われた。主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約15分に渡って学位論文内容の発表を行った。その後、副査の玉木教授からディーゼル排気粒子の粒径やその吸収経路等についての質問があった。次いで副査の三輪教授からニトロフェノール類の血管作用とそのアッセイ法について、及び新規分析法と測定法に関して酸塩基抽出法の原理と意義、誘導体化測定の長所と短所等の質問があった。会場の出席者から測定データの再現性についての質問があった後、最後に主査から新規に単離した化合物の概要について、及び従来法と比較した新規分析法の長所についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究データや知見、過去の研究報告を引用し、将来的な構想も交えながら適切に回答した。質疑応答の時間は約15分間であった。

この論文は、数千もの化合物からなると言われる DEP の効率的新規系統分析法の開発を行うと共に、生理活性物質の単離を行い、その有用性を示したという点で高く評価され、今後の環境汚染原因物質の探索とその評価に有益な手法を提供するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。