

# ディーゼル排気粒子の酸化能における 構成成分寄与の解析法の検討

Method for Analyzing the Contribution of Components of Diesel Exhaust Particles  
to Oxidative potential

古根村 綾乃\*<sup>1</sup>  
Ayano KONEMURA

阿久津 康生\*<sup>2</sup>  
Yasuo AKUTSU

堺 温哉\*<sup>3</sup>  
Haruya SAKAI

伊藤 剛\*<sup>4</sup>  
Tsuyoshi ITO

## Abstract

It has been suggested that diesel exhaust particles (DEP) adversely affect health by inducing oxidative stress. DEP is composed of numerous chemicals, and little information is available about which chemicals contribute most to the oxidative potential in DEP. In this study, we examine a method for estimating the oxidative potential of organic chemicals (not metals) in DEP by using EDTA. Benzoquinone (BQ) and NiCl<sub>2</sub> exhibit dose-dependent oxidative potential, but the effect of NiCl<sub>2</sub> (not BQ) is strongly suppressed by EDTA. Furthermore, oxidative strength of DEP is increased by EDTA. These results suggest that EDTA suppress redox of some metals such as zinc in DEP. This hypothesis is supported by the result that EDTA increases the oxidative strength of a BQ and ZnCl<sub>2</sub> mixture. In this study, we demonstrate that EDTA is useful for evaluating the contribution of chemicals to the oxidative potential of DEP.

## 1. はじめに

酸化ストレスは生体内で生成する活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の酸化損傷力と生体内の抗酸化能力との差として定義される。ROS は、エネルギー生産、生体異物への攻撃、不要な細胞の処理、細胞情報伝達などに際して生産され、機能的な役割を担っている。しかしながら、生体内の抗酸化能力で対応しきれない余剰の ROS の生産や、外部からの過剰な ROS の取り込みが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 を酸化、損傷し、生体の構造や機能を乱し、その結果、炎症、発がん、循環器疾患、神経変性疾患などのさまざまな疾患の原因となることが知られている。

大気中の微量粒子や、ディーゼルの排気粒子 (DEP) など自動車排気中の粒子状物質は酸化能を有していることが知られている。Li らは大気濃縮粒子 (concentrated ambient particles; CAPs) の酸化能を測定するとともに、ヒト気管支上皮細胞株に CAPs を曝露させ、抗酸化酵素ヘムオキシナーゼ-1 (heme oxygenase-1; HO-1) の産生について調べた<sup>1)</sup>。その結果 CAPs の酸化能と HO-1 産生の間には正の相関関係があり、物質の酸化能の測定から生体におけるストレス反応を推測できる可能性を示し、粒子状物質における酸化能の測定が健康影響評価において有用な情報であることを示した。

粒子状物質の酸化能の測定法はいくつか報告されているが、還元剤である Dithiothreitol (DTT) の消費量を指標とする DTT アッセイがよく用いられている<sup>2),3)</sup>。DTT アッセイは無細胞のアッセイ系で、特殊な機器を使用する必要もなく、安価で簡便に行える手法であり、物質の酸化能を評価

\*1 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部

\*2 株式会社 ジェー・イー・シー

\*3 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部  
農学博士

\*4 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部  
博士 (医学)

する際に適した手法である。しかし、DTT アッセイはシンプルな化学反応を利用した試験法であるため、わずかな環境の変化による影響を受けやすく、陽性対照の設定が必要である。また DEP には酸化能に係わる複数の成分が混在しているが、通常の DTT アッセイではどの成分がどの程度酸化能に寄与しているかを把握することは不可能である。本研究では、再現性が高く化学成分の寄与を解析可能な方法を確立することを目的に、下記を検討した。

- 1) 陽性対照の設定
- 2) EDTA による金属成分に特異的な酸化能の抑制作用
- 3) DEP の酸化能に対する EDTA の影響
- 4) ZnCl<sub>2</sub>, Benzoquinone 混合物に対する EDTA の作用

## 2. 方法

### 2.1 被験物質

標品：DEP 中で酸化能を示す物質として、キノン類、金属類が知られていることから、キノン類として Benzoquinone (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 和光純薬, 特級) を、金属類として NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (和光純薬, 99.9%) と ZnCl<sub>2</sub> (和光純薬, 特級) を被験物質とした。また、酸化能を示す陽性対照物質として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (和光純薬, 精密分析用; 関東化学, 特級; ナカライテスク, 等級 II) を供した。

DEP: DEP は日本自動車研究所 (JARI) の COPD 研究の際に採取した物を用いた<sup>4)</sup>。採取した DEP は試験に用いるまで -80°C で保管した。DEP を 50mg 秤量し、Dimethyl sulfoxide (DMSO; 和光純薬, 蛍光分析用) に懸濁させ、ボルテックスミキサーにより攪拌、超音波発生装置 (シャープ, UT-204) により 39kHz で 5 分間処理したものを 10mg/ml に調整し被験物質とした。また、Benzoquinone, NiCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> も DMSO で 10mg/ml に調整し、被験物質とした。

### 2.2 DTT アッセイ

DTT アッセイは基本的に Shima らの報告にしたがった<sup>5)</sup>。200nmol/ml の DTT (ナカライテスク, 分子生物学研究用) 溶液中に、DMSO に溶

解させた被験物質を 37°C で 30 分間、水浴中で反応させた (最終 0.5% DMSO)。その後、被験物質と DTT 混合液 1.0 ml に対し、16.6μl の DTNB (Dithiobis 2-nitrobenzoic Acid; ナカライテスク, 含硫蛋白質研究用特製) を添加し、10 分間静置した後に 96 穴プレートに 50μl/well ずつ分注し、マイクロプレートリーダー (日本バイオラッド, Model 680) により 405nm の吸光度を測定した。既知濃度の DTT 溶液の吸光度から検量線を作成し、被験物質による DTT 消費量を算出した。

### 2.3 金属キレーション剤の添加

金属キレーション剤として ethylenediaminetetraacetic acid · 2Na (EDTA; 和光純薬, 99.5%) を用いた。希釈した被験物質 500μl に最終溶液 5μM になるよう EDTA を 500μl 添加し、DTT アッセイに供した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 陽性対照の設定

一般的な DEP 標品がないことから、DTT アッセイの陽性対象として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が適当かどうかを検討した。

まず、メーカーの違いによる変動について検討を行った。代表的な 3 社より購入した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を、最終濃度が 13.8~220μM になるよう調整しアッセイを行った (Fig. 1)。

その結果いずれのメーカーの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> も、測定を行った全ての濃度においても DTT 消費量に大きな差異はなく、最も高濃度の 220μM における DTT 消費量はそれぞれ、135μM, 141μM, 139μM であり安定していた (平均 138 ± 3.07μM)。次に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の安定性を明らかにするため、常温開封後の当日、1 日後、8 日後に調整をしてアッセイを行った (Fig. 2)。その結果、220μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> では DTT 消費量にわずかに差異が認められたが、これ以下の濃度では DTT 消費量に明らかな変動は無かった。これらの結果から、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> はメーカーによる差異も無く、安定性もあることから、DTT アッセイの陽性対照として有用であることが明らかとなった。これ以後、それぞれの被験物質の酸化能は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等量として示す。

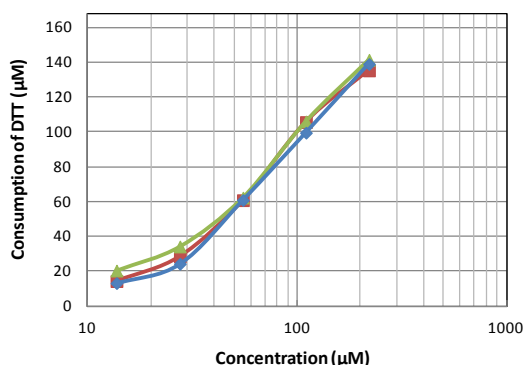


Fig. 1 Oxidative potential of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtained from three manufacture

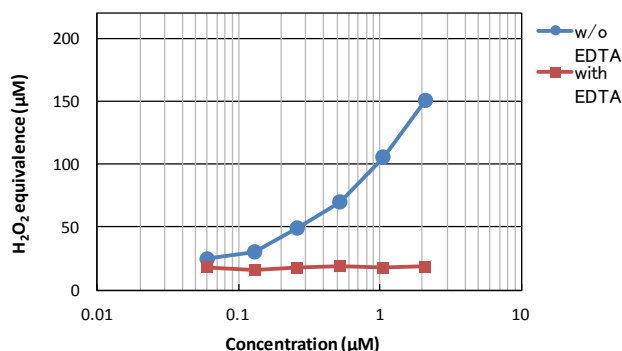


Fig. 3 Effects of EDTA on oxidative potential of NiCl<sub>2</sub>

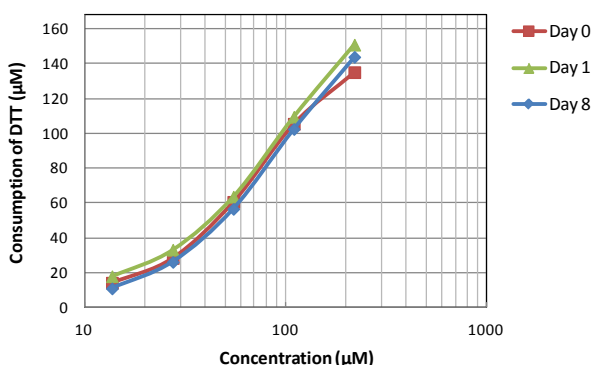


Fig. 2 Oxidative potential and its stability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

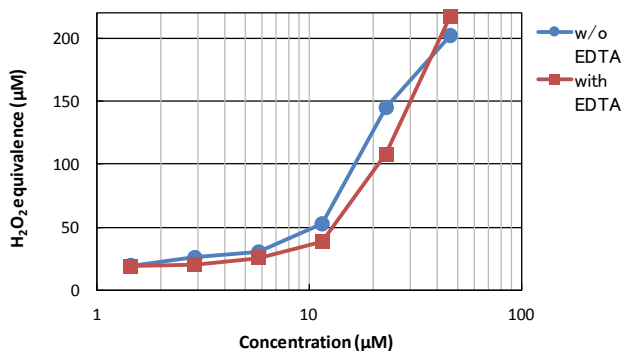


Fig. 4 Effects of EDTA on oxidative potential of benzoquinone (BQ)

### 3.2 EDTAによる金属成分に特異的な酸化能の抑制作用

EDTAによる金属特異的な酸化能の抑制作用について、NiCl<sub>2</sub>とBenzoquinoneを用いて検討した。NiCl<sub>2</sub>は0.06~2.1μMの間で濃度依存的な酸化作用を示したが、EDTAを添加することで酸化能は抑制され、2.1μMのNiCl<sub>2</sub>で150μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等量の酸化能があったものが、EDTAを添加することで18.7μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等量となり、NiCl<sub>2</sub>の酸化能が強く抑制された (Fig.3)。一方、Benzoquinoneによる酸化能は、1.44~46.3μMの間で濃度依存的な酸化能を示し、この酸化能はNiCl<sub>2</sub>とは異なりEDTAを添加しても抑制されることはなかった (Fig.4)。このことから EDTAが金属成分に特異的な酸化能の評価に有用であることが示された。

### 3.3 DEPの酸化能に対するEDTAの影響

DEPによる酸化能をFig.5に示す。DEPは0.78~25μg/mlの間で濃度依存的な酸化能を示し、DEP 6.25μg/mlの酸化能は36.3μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等量であった。この値は0.26μMのNiCl<sub>2</sub>、11.5μMのBenzoquinoneの酸化能に匹敵するものだった。しかしDEPの酸化能は、NiCl<sub>2</sub>やBenzoquinoneの場合とは異なり、EDTAを添加することでより強くなった。この傾向はDEP 12.5μg/ml以上から顕著になり、EDTA非添加時の12.5μg/mlと25μg/mlのDEPの酸化能はそれぞれ60.3μM、116μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等量だったが、EDTAを同時に添加させることでそれぞれ111μMと196μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等量に増加した。この結果から、DEPに含まれる還元作用を持つ金属類がEDTAによってキレートされ、DEPの酸化能が強まると推測された。

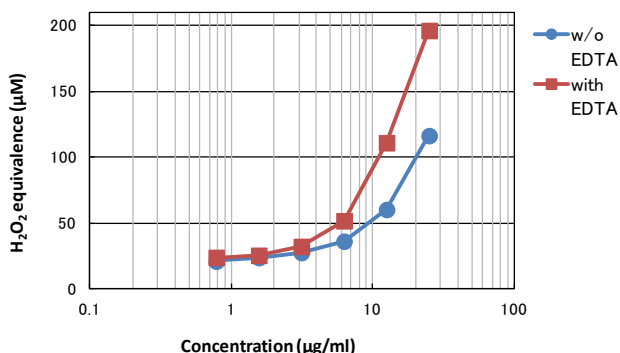


Fig. 5 Effects of EDTA on oxidative potential of DEP extract

### 3. 4 ZnCl<sub>2</sub>, Benzoquinone 混合物に対する EDTA の作用

本研究では、還元作用のある ZnCl<sub>2</sub> を Benzoquinone と混合し、この混合液における酸化能について検討した (Fig. 6)。その結果 Benzoquinone と ZnCl<sub>2</sub> の混合液は、EDTA の有無に係わらず濃度依存的な酸化能を示したが、EDTA を共存させることで酸化能は最高で 4.5 倍程度にまで増強された。このことから、EDTA の添加によって DEP の酸化能が増強されたのは (Fig. 5)、DEP 中に含まれる Zn など還元作用のある金属が EDTA によってキレートされ、その作用が抑制される可能性が示された。

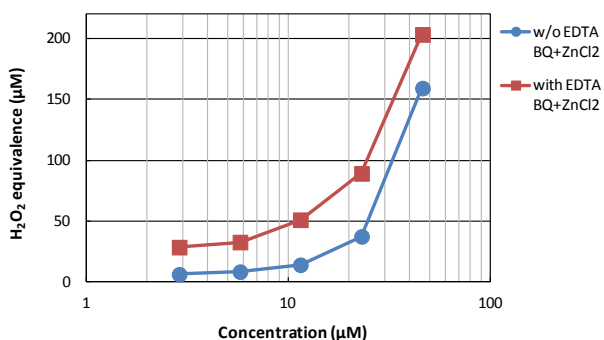


Fig. 6 Effects of EDTA on oxidative potential of benzoquinone (BQ) and ZnCl<sub>2</sub> mixture

## 4. まとめ

本研究では、物質の酸化能を評価する DTT アッセイにおいて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が製造元による酸化能の差もなく、安定性も高いことから、陽性対照に適していることを明らかにした。また、DTT アッセイにおいて、EDTA を被検物質と同時に添加することで、EDTA が金属とキレート形成し、金属による酸化還元作用を特異的に不活化することを示した。このことから、EDTA は DEP 構成物のうち、金属化合物による酸化作用の寄与を明らかにするのに有用であることを明らかになった。

### 参考文献

- 1) N. Li, et al. : Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage , Environmental Health Perspectives , Vol.111 , p.455-460 (2003).
- 2) N. Li, et al. : The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lungdisease and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles, Free Radical Biology & Medicine 44, p.1689-1699 (2008).
- 3) J. G. Ayres, et al. : Evaluating the Toxicity of Airborne Particulate Matter and Nanoparticles by Measuring Oxidative Stress Potential-A Workshop Report and Consensus Statement, Inhalation Toxicology 20, pp.75-99 (2008).
- 4) (財) 日本自動車研究所 : ディーゼル排気と慢性閉塞性肺疾患との関連調査報告書 (COPD 研究, 1989~1994)
- 5) H. Shima, et al. : Oxidative Ability and Toxicity of n-Hexane Insoluble Fraction of Diesel Exhaust Particles, Toxicological Sciences, Vol.91, pp.218-226 (2006).