

B-35 沿道植物中での大気中ピレン代謝産物の測定

東京大学大学院工学系研究科 ○森下賢一

同上 長谷川聖

同上 花木啓祐

1. はじめに

大気汚染、その中でも自動車による汚染を考える上で、多環芳香族炭化水素類 (PAHs) による汚染が重要な位置を占めている。伊永ら(1999)によると PAHs の多くは、発がん性や発がん促進性、突然変異誘発性を持つことが知られ、ダイオキシン類と同じ非意図的生成物として注目されている。さらに、代表的な PAHs であるベンゾ[a]ピレン (B[a]P) は、内分泌攪乱物質である可能性も疑われている。

臼井(2003)によると、脂溶性物質が植物細胞内に入った場合、第Ⅰ・Ⅱ相での代謝反応を受け、水溶性が高まった後、第Ⅲ相で液胞中に運搬されたり、高分子となり細胞壁に取り込まれたりして隔離される。

これまで、街路沿いの葉に捕捉されている PAHs の測定を行った中島ら(1995)の研究や Giessing *et al.*(2003)、Stroomberg *et al.*(2004)による動物の体内に含まれている PAHs 代謝物を測定している例はあるが植物の葉中に含まれる PAHs 代謝物を測定している例はない。そこで、PAHs の代表例として大気中濃度の高い pyrene を挙げ、沿道植物の葉から第Ⅰ相の代謝反応で生成した 1-OH pyrene を測定することで植物に取り込まれた PAHs がどのような fate を辿っているのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 実験方法

2.1 測定方法の検討

表1. 1-OH pyreneのHPLC/FL設定条件

最初に、1-OH pyrene を測定する際の HPLC/FL の設定条件を検討した。HPLC/FL の測定のためには、①蛍光波長、励起波長、②カラムの種類・長さ、温度、③移動相の種類・流速、割合、④インジェクター注入量の条件を検討する必要がある。この中で、励起波長、蛍光波長、カラムの種類・温度、移動相の種類は Jongeneelen *et al.*(1987)と Nakajima *et al.*(1995)の論文を基に決定した。カラムの種類・長さ、移動相の流速・割合、インジェクター注入量の最適な条件を 1-OH pyrene 標準物質 (250mg, キシダ) を測定することによって求めた。表1に考慮した条件を示す。1-OH pyrene が夾雑物と分離できること及び検出限界が充分大きくなることを検討し、条件6を測定条件として選択した。

条件	カラムの長さ(cm)	移動相の流速 (mL/min)	移動相の割合 (メタノール:超純水)	インジェクター注入量(μL)
1	25 ¹⁾	0.8	最初5分間46:54、5分間かけて94:6として、その状態を保つ	100
2	15 ²⁾	0.8	最初5分間46:54、35分間かけて94:6として、その状態を保つ	100
3	15 ²⁾	0.8	最初5分間46:54、25分間かけて94:6として、その状態を保つ	100
4	25 ¹⁾	0.8	最初5分間46:54、25分間かけて94:6として、その状態を保つ	100
5	15 ³⁾	0.8	最初5分間40:60、25分間かけて94:6として、その状態を保つ	100
6	25 ¹⁾	0.8	最初5分間40:60、25分間かけて94:6として、その状態を10分間保つた後、40:60に戻し15分間流す	100

1) ULTRON VX-ODSカラム250×4.6mm (Shimadzu製)、2) ULTRON VX-ODSカラム150×4.6mm (Shimadzu製)、3) Nova-Pak C18カラム150×4.6mm (Waters製)

HPLC/FL (RF-10A, Shimadzu) を用い、1-OH pyrene、pyrene それぞれ表 2 のように条件を設定して測定を行った。また、移動相の gradient は、pyrene の場合は、アセトニトリル：超純水の割合を最初 10 分間 40:60、20 分間かけて 90:10 とし、その状態を 10 分間保った後、40:60 に戻し 15 分間流した。カラムは ULTRON VX-ODS カラム 250×4.6mm (Shimadzu) を使用し、メタノールは高速液体クロマトグラフ用 (キシダ)、アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用 (Wako) を使用した。

2.2 サンプルの採取と試料の作成

実際に、植物葉中に吸収された pyrene の代謝産物の存在を確認するために、2005 年 2 月に一日交通量 36,666 台 (平成 11 年度) の沿道にて採取したオオムラサキツツジ (*Rhododendron oomurasaki*) 及びヘデラ・カナリエンシス (*Hedera canariensis*) の葉を用い、1-OH pyrene の測定を行った。また、オオムラサキツツジと同じ場所にある土を採取し同様に測定を行った。

表2. HPLC/FLの設定条件

	1-OH pyrene	pyrene
励起波長	242nm	321nm
蛍光波長	388nm	390nm
カラムの種類	ODSカラム	ODSカラム
カラムの温度	40℃	30℃
カラムの長さ	25cm	25cm
移動相の種類	メタノールと超純水	アセトニトリルと超純水
移動相の流速	0.8mL/min	1.0mL/min
インジェクター注入量	100μL	100μL

採取した葉は 3~5cm の長さに切り、20g (×2)、を 250mL のポリカーボネート製の遠沈管 (NALGENE) にステンレス球 (直径：22mm) 3 つとともに入れた。葉は液体窒素によって二時間凍結した後、シェーカーで 10 分間細かく砕いた。細かく砕いた葉 15g または土を 50mL のポリプロピレン製の遠沈管 (IWAKI) に (葉は 15g を 2 つの遠沈管に計 30mg) 取る。それを -20℃ にて水分を凍らせた後、凍結乾燥機に一日静置し、水分を飛ばす。葉を 100mL のバイアル瓶にそれぞれ乾燥重量 2.5g 取り、メタノール 15mL を加える。土は、同様に乾燥重量 3.0mg 取り、メタノール 20mL を加える。それらを、30 分、160W、duty cycle 50% で超音波抽出 (SONIFIER 450, BRASON) を行う。

夾雑物除去のために親水性 PTFE 濾紙 (孔径 1.0μm、直径 47mm、ADVANTEC) で吸引濾過し、これを 1.5mL のバイアル瓶に移し、測定サンプルとして高速液体クロマトグラフィーの蛍光分析器 (HPLC/FL) にて測定を行った。

3. 結果及び考察

図 1、2 にオオムラサキツツジの葉で測定した 1-OH pyrene、pyrene のクロマトグラム、図 3、4 にヘデラ・カナリエンシスの葉で測定した 1-OH pyrene、pyrene のクロマトグラムを示した。

pyrene に関しては、それぞれ乾燥重量あたりの濃度で、オオムラサキツツジの葉には 380ng/g、ヘデラ・カナリエンシスの葉には 363ng/g 存在した。中島ら (1995) の研究によると 1~2 月の街路樹の葉に含まれる pyrene の濃度はオオムラサキツツジ (*Rhododendron oomurasaki*)、サクラ (*Prunus yedoensis*)、モッコク (*Ternstroemia gymnanthera*) の葉で 200~1200ng/g であり、今回得られたオ

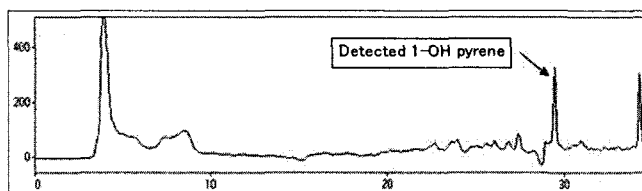


図1. オオムラサキツツジの葉での1-OH

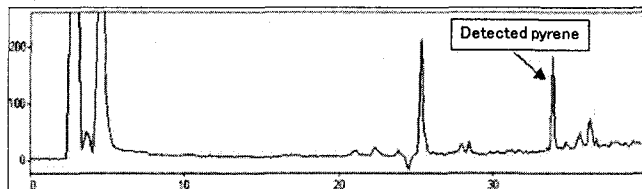


図2. オオムラサキツツジの葉でのPyrene

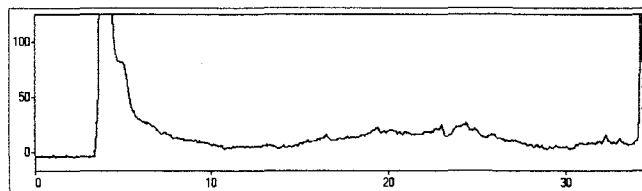


図3. ヘデラ・カナリエンシスの葉での1-OH Pyrene

オムラサキツツジとヘデラ・カナリエンシスの葉中濃度は同オーダーであった。

1-OH pyrene に関しては、オオムラサキツツジの葉には乾燥重量あたりで 36.6ng/g 含まれており、ヘデラ・カナリエンシスの葉と土では検出限界 (2 μ g/L) 以下であった。

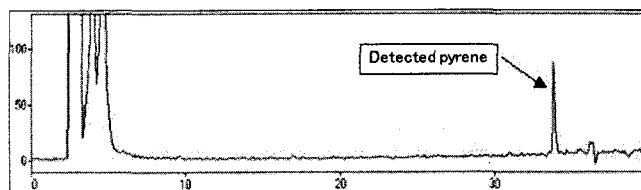


図4. ヘデラ・カナリエンシスの葉でのPyrene

以上より、今回の沿道植物を用いた測定では、オオムラサキツツジの葉でのみ 1-OH pyrene が検出された。土からは 1-OH pyrene が検出されなかったことから、1-OH pyrene は根から吸収され葉で観察されたものではなく、葉に吸収された pyrene が代謝されて生成したものであることが推察できる。オオムラサキツツジの葉と同程度の pyrene 濃度であったヘデラ・カナリエンシスの葉から 1-OH pyrene が検出されなかったことから、①オオムラサキツツジのほうが代謝能が高く 1-OH pyrene の生成量が多い、②オオムラサキツツジの方が 1-OH pyrene の蓄積性が高いことが推察される。

4. 結論と今後の課題

今回の測定によって沿道のオオムラサキツツジの葉から 1-OH pyrene を検出することが出来た。これにより、大気中に存在する PAHs が植物の葉に吸収された場合に代謝されることを示した。本研究ではあくまで、葉中にて、1-OH pyrene が検出されることを示した第一報であり、葉中での 1-OH pyrene の挙動に関しては、今後検討すべき事柄もあり、本章でそれらについて挙げ、今後の課題とする。

1) 他の植物での 1-OH pyrene の検出可能性

今回は、オオムラサキツツジでのみ 1-OH pyrene が検出された。大気中 PAHs が植物に吸収されたときの fate を評価するために他の植物で 1-OH pyrene が検出されるのか確認する必要がある。

2) 1-OH pyrene の生成にかかる時間及び葉中に保持される時間

大気中 PAHs の fate を評価する場合、pyrene が吸収されてから 1-OH pyrene が生成するまでの時間が分からなければならない。また、1-OH pyrene が生成してから葉中にどの程度の時間保持されるのか、さらに水溶化が進み他の抱合体になるのか分からなければ正確に PAHs の fate 評価を行うことができない。

3) 葉中 1-OH ビレン濃度の季節変動

大気中の PAHs 濃度は季節により変動するため、葉中 1-OH pyrene 濃度も季節により変動するものと考えられる。大気中 PAHs の fate を確認するために、1-OH pyrene 濃度の季節変動を把握する必要がある。

引用文献

伊永隆史ら, 分析化学, 48, 631-636.

臼井健二, 雑草研究, 48 別号, 2-5.

中島大介ら, 環境科学会誌, 8, 317-324.

Giessing, A.M.B. et al., *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1107-1114.

Stroomberg, G.J. et al., *Comparative Biochemistry*, Part C 138, 129-137.

Jongeneelen, F.J. et al., *J.Chromatography*, 413, 227-232.

Nakjima, D. et al., *Chemosphere*, 30, 401-418.