

定量NMRを用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保

杉本 直樹^{a)} 多田 敦子^{b)} 末松 孝子^{c)} 有福 和紀^{d)}

Naoki Sugimoto

Atsuko Tada

Takeko Suematsu

Kazunori Arifuku

^{a)} 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
東京都世田谷区上用賀1-18-1

Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{b)} 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
東京都世田谷区上用賀1-18-1

Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{c)} 日本電子株式会社NM事業ユニットNMアプリケーショングループ
東京都昭島市武蔵野3-1-2

NM Application Group, NM Business Unit, JEOL Ltd.
1-2-3 Musashino, Akishima-shi, Tokyo 196-8558, Japan

^{d)} 日本電子株式会社データソリューション事業部総合企画推進室R&Dビジネス推進部
東京都昭島市中神町1156

R&D Business Promotion Department, General Planning and Promotion Office, JEOL Ltd.
1156 Nakagami-cho, Akishima-shi, Tokyo 196-0022, Japan

Summary

For the quantification of any compound in foods, chromatographic methods such as GC-MS and LC-MS are currently widely used. Reference materials are very important to ensure the reliability of analytical data. However, it is very difficult to obtain pure compounds and determine purities that are traceable to the International System of Units (SI). When reference materials for the target compounds are not obtained from the reagent manufacturers, we have no choice but to use reagents, or isolated or synthesized compounds as reference materials for which the purities are not known exactly. For all of these reasons, present chromatographic methods might result in degrading the reliability of analysis data. To improve the reliability of analytical data in the field of food chemistry, we are developing quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) as a simple absolute quantification method that is able to determine the purities of compounds or absolute content in foods with SI-traceability. qNMR is based on the fact that the signal intensities of a given NMR resonance are directly proportional to the molar amount of that

nucleus in the sample. If appropriate instrument settings have been made, any NMR user can apply NMR spectroscopy to quantitative analysis of any compound. To build up SI-traceable qNMR analysis and boost convenience, we chose 2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- α -sodium salt (DSS- α) and hexamethyldisilane (HMD) as qNMR reference materials after correction of the concentrations by using certified reference materials (CRMs) such as diethyl phthalate (DEP) and potassium hydrogen phthalate (PHP). Thus, qNMR can calculate the purity or content with SI-traceability from the ratio of the signal intensities of the target compound to the qNMR reference material. qNMR analysis requires no calibration curves and also it is rapid and simple with overall analysis time of only 10-20 min. In this review, several applications using qNMR analysis are shown: the absolute quantification for the reagents of natural compounds and reference materials for pesticides. We believe that qNMR will be one of the key technologies providing highly efficient metrological traceability to analytical data in the future.

1. はじめに

食品、健康食品などの機能性や有効性だけでなく、安全性

に関する国民の関心は高い。国民の安心・安全を確保するためには、食品分析により得られる分析値の信頼性は可能な限り高いものでなくてはならない。特に、食品中の食品添加物や残存する農薬などについては、食品の安全性を評価・確保

するために規制値の強化や分析のための公定法の設定が行われており、これに伴い、試験検査機関においては高度な分析法として分子認識能と微量分析に優れたガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) や液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) などの導入が必須となりつつある。

クロマトグラフ法による分析値の信頼性は、基本的に3つのファクター、1. 分析法 (公定法など)、2. 分析者・実務者の技術力、3. 定量用標準品 (標準物質) の純度、に依存しており、これらそれぞれの信頼性が確保されていることを大前提としている。1と2に関しては分析のバリデーションの実施と分析者自身の日々の技術力の向上によって一定以上の信頼性を確保することが可能である。しかし、3に関してはすべての測定対象と同一の化合物について計量学的に正確に値付けられた標準物質の供給・入手が現状では不可能であるため、標準物質が入手できない場合には代用品として用いた試薬や自ら単離精製した化合物等の純度の誤差が分析値の信頼性を大きく損なっている可能性を否定できないという問題を抱えている。さらに、食品中の測定対象とした化合物の生体活性や有効性、安全性の評価は対象化合物の含量値 (定量値) との関係に基づいて行われるため、図1に示すようなピラミッド構造から得られた評価結果の信頼性も実は十分に保証できていない場合もあり得る。この問題は、あまりにも基本的な問題ではあるが、有効な解決策がないために議論の場にすらほとんどあがらない。しかし、今後の食品分析の分野における分析値や評価値の信頼性の向上・確保のためには、この問題を解決する新たな方法論の構築が必須であると考えられる。

著者らは、上記の問題の抜本的な解決を目指し、その基盤技術として核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance : NMR) を用いた有機化合物の絶対定量法 (quantitative NMR : qNMR) の開発を行ってきた^{1,2)}。本稿では、qNMRの基本原則、また、これを利用した食品分析の分野における分析値の信頼性の確保・向上の必要性、具体的な応用例³⁻⁵⁾について述べる。

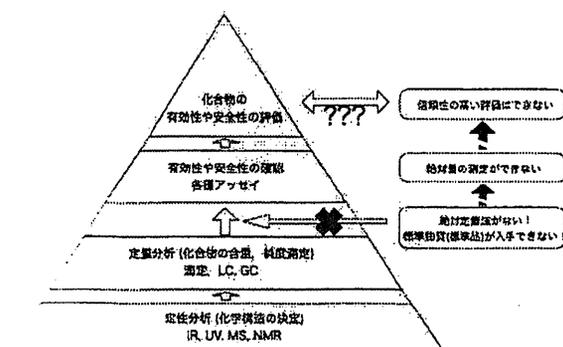


図1. 有機化合物の定量分析および有効性や安全性の評価における問題点

2. クロマトグラフ法とqNMRの違いとは?

ところで、世界中どこでもだれでも簡単に「長さ」を正確に測ることができる。なぜなら、だれもが「長さ」を測るための世界共通の「ものさし」を持っているからである。一方、有機化合物の純度や含量を正確に測定することはそう簡単ではない。「長さ」の測定と同じようにただ一つの「ものさし」さえあればよいというわけにはいかない。

有機化合物はその分子構造に起因した固有の物性値を持っている。物性値とは分子量、紫外可視吸収スペクトルなどであり、化合物の分子構造が違えば、それぞれの分子量、吸光係数をはじめ様々な物性値が化合物毎に異なることとなる。クロマトグラフ法は、これらの化合物毎の物性値の違いを利用しており、カラムによる分離と検出器による分子認識に類した分析法である。検出器の応答性は化合物毎に異なるため、測定対象の化合物が異なれば、そのすべてに対して一つずつ「ものさし」に相当する標準物質を用意する必要がある (図2左)。正確な「ものさし」、つまり計量学的に正確に値付けられ国際単位系 (International System of Units : SI) にトレーサブルな認証標準物質 (certified reference material : CRM) またはそれに準じたものを使用した分析結果でなければ、厳密な意味で分析値の信頼性を保証することができないことになる。このことから、有機化合物の標準物質の整備・供給体制の強化は継続的に行われている。しかし、測定対象となり得る化合物は人工的な化合物だけでも数十万以上、天然由来のものを含めれば、その数は無限であり、これらすべてについて正確に純度が値付けられた標準物質「ものさし」の供給が必要であり、従来法を用いては実現不可能であることは容易に想像できる。

そこで、化合物毎の物性値に基づく定量法では、上記の問題を抜本的に解決できないため、別の視点や技術からの定量法の構築を目指すこととした。有機化合物は炭素、水素、酸

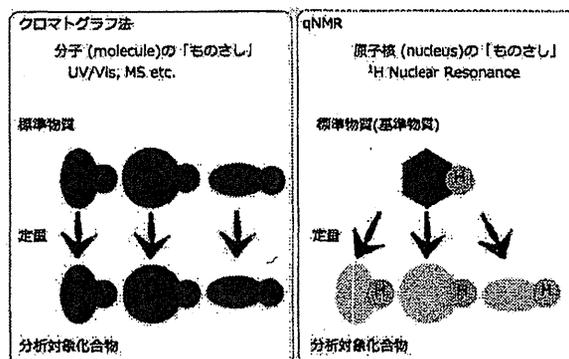


図2. クロマトグラフ法とqNMRの違い
クロマトグラフ法では分析対象化合物と同一の標準物質が必要。qNMRでは分析対象化合物と同一の標準物質を必要とせず、別の化合物を基準として水素の原子数の比から様々な化合物が定量できる。

素などが共有結合した分子である。異なる分子構造で異なる物性値を持つ分子であっても、構成する最小単位の原子だけをみれば、同種の原子同士は等価であるといえる。したがって、分子上の特定の原子の数を「ものさし」とした定量法が構築できるのでは？という考えに基づき、分子上の原子認識が可能であり、異なる分子上であっても原子の単位でみれば、同じ数の原子が等しい信号強度として観察・測定可能なNMRをその候補としてあげた。

NMRは既に化合物の構造を決定するための代表的な定性分析法の一つとして広く利用されている。(NMR現象の基本原理解については専門書を参照していただきたい) NMRスペクトルから得られる化学シフトやスピン結合などは、分子上の原子核の構造情報を反映している。¹H-NMRでは、化学シフトの異なる各シグナルの面積比は、分子上の各炭素に結合した水素原子の数の比に対応し、測定対象の化合物の分子構造に関わらず、すべて水素原子が定量的な信号として観測される。このことから、¹H-NMRにおいては水素の原子核を認識・定量的に測定可能であるので、化合物Aの特定の置換基上の水素のシグナル面積 (I_A) は、置換基上の水素の数 (H_A) × 化合物Aのモル濃度 (m_A) として観察される (式1の分子)。別の分子構造の化合物Bの特定の置換基上の水素のシグナル面積 (I_B) についても同様な関係式が当然成り立つ (式1の分母)。よって、2つのシグナルが異なる化合物 (A、B) に由来する場合には個々のシグナル面積と化合物のモル濃度は式1の関係式で表すことができる。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad (1)$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times P_{\text{std}} \quad (2)$$

ただし、 I =シグナル面積、 H =特定基のプロトン数、 m =モル濃度、 W =重量、 M =分子量、 P =純度%、sample=試料、std=基準物質。

さらに2つの化合物のうち、一方の化合物として純度が明らかなる基準物質 (std) を「ものさし」として用いれば、モル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物の純度あるいは含量を決定できる式2の関係が成り立つ。qNMRによる絶対定量は式2を利用し、純度あるいは濃度が既知の基準物質をあらかじめ加えた溶液中で測定対象の化合物の¹H-NMR測定を行い、得られたスペクトル上に観察される基準物質と測定対象の化合物に由来するシグナル面積、水素数および濃度比の関係から定量値を算出する方法である。これを言い換えるとqNMRでは、¹H-NMRの水素原子の認識能を利用して、基準物質と測定対象の化合物の水素の原子数の比を測定可能であるので、測定対象の化合物とは異なる一つの基準物質を「ものさし」とするだけで、あらゆる測定対象の化合物の純度や含量が算出可能となる (図2右)。

既述したように、クロマトグラフ法で有機化合物の正確な定量値を得るためには、測定対象の化合物毎に同一の標準物質「ものさし」が必須であるため、無限の数の「ものさし」の供給体制を整える必要がある。一方、qNMRを有機化合物の定量分析における「メートル原器」的なものとして位置づければ、一つのqNMR基準物質から無限の数の「ものさし」を校正することが可能となり、標準物質の供給体系も根本的に刷新することができる。また、「長さ」が世界中どこでもだれでも正確に測れるように、世界中で測定された化合物の純度、含量値、定量値などの測定値が一つのqNMR基準物質に紐付けられることとなり、国際的な室間精度の問題などが解決されると考えられる。

3. qNMRにおけるSIトレーサビリティの確保

従来の定性分析用の¹H-NMR測定条件では、分子上の水素原子の数が整数比で確認されれば、構造解析に必要な情報が十分に得られるのでNMR現象の定量性を犠牲にして検出感度を優先した測定条件に設定されている。一方、qNMRでは分析対象の化合物の分子上の原子の数に信号強度が正確に比例して観察されることが必須条件であるので、qNMR用に測定条件の最適化が必要である。そこで、NMRの定量性に関する報告のうち、信頼性が高いと考えられたPauliおよびSaitoらの報告⁹⁻¹⁰⁾を参考に測定条件の検証と最適化を行った。まず、パルス繰り返し時間の影響を検証した。図3には、パルス繰り返し時間と縦磁化の回復の関係を示したが、フリップ角を45°および90°に設定したところ、縦磁化が99.9%以上回復するためには、45°および90°ではシグナルのスピン-格子緩和時間 (T_1) の6倍~7倍以上になるようにパルス繰り返し時間を設定する必要があることが確認された。さらに、ラジオ波 (RF) パルスが観測中心から離れるほど強度が低下し、観測幅の両端では定量誤差を与えるため、測定対象のスペクトル範囲が観測幅の80%以内になるように-5 ppm~15 ppm

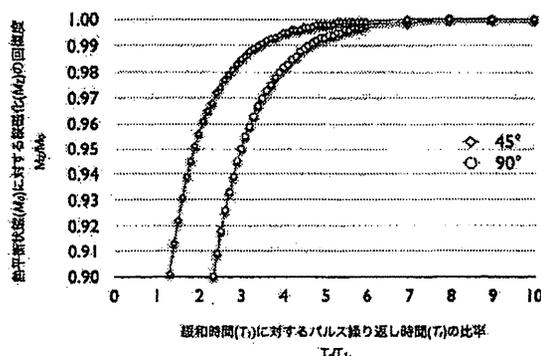


図3. パルス繰り返し時間と縦磁化の回復の関係

測定範囲とし、観測幅の両端での定量誤差の影響を避ける必要があった。また、シム調整を厳密に行い、良好なシグナル形状およびS/Nを得た上での測定が不可欠であった。これらの検討結果を踏まえ、最終的には得られたFID信号データを自動解析処理するためのqNMRスペクトル解析ソフトウェアを別途開発し、同一処理条件下で一元的に定量値を算出することが可能となった。

次にqNMR基準物質の選定を行った。qNMR基準物質の候補として既に多くの化合物が報告されている(図4)^{2),11),12)}。しかし、これまでに報告されたqNMR基準物質は重溶媒に対する溶解性を考慮する必要があるばかりでなく、測定対象の化合物のシグナルと重ならないものを選択して使用しなければならなかった。また、計量学的に正確に純度が値付けられたものはほとんどなく、これらを基準物質として得られた定量値の信頼性の確保が不可能であった。すなわち、qNMRによる

定量分析には利便性と信頼性に欠点が残されていた。そこで、qNMR基準物質として2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸-d₆ナトリウム塩(DSS-d₆)¹³⁾(水系用)およびヘキサメチルジシラン(HMD)¹⁴⁾(有機溶媒系用)を用いることとした。DSS-d₆とHMDは、テトラメチルシラン(TMS)と同様に0 ppm付近にシグナルを示すため、これらを基準物質として用いたqNMRスペクトルは通常の¹H-NMRスペクトルと同様に扱うことができる。水溶性化合物用にDSS-d₆、有機溶媒溶解性化合物用にHMDをqNMR基準物質としてそれぞれ一般化することによって、基準物質の選択の際の煩雑さが省かれるだけでなく、測定対象の化合物の純度、含量や品質を明確に表したqNMRスペクトルデータベースとしても有用となり、qNMRによる定量分析の利便性と信頼性が大幅に改善できると考えた。

しかしながら、qNMRの技術開発を開始した当初、計量学

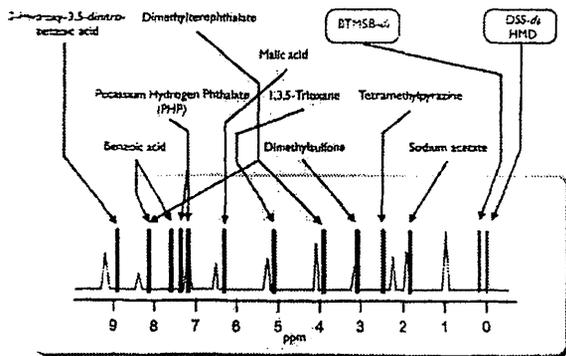


図4. qNMR基準物質の化学シフト値

定量NMR (qNMR) に関する論文中で既に報告されている様々な基準物質の化学シフト値。新たにqNMR基準物質として設定したDSS-d₆とHMDは0 ppmにシグナルを与える。HMDは液状であり秤量に注意が必要であるため、取り扱いが簡単で安定な固体のBTMSB-d₆が別途開発されている。

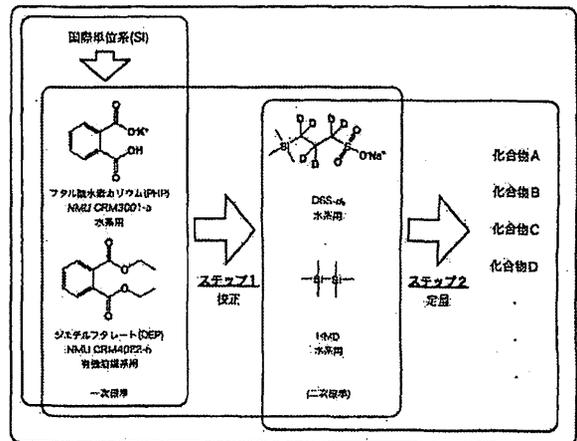


図5. qNMRにおけるSIトレーサビリティの確保

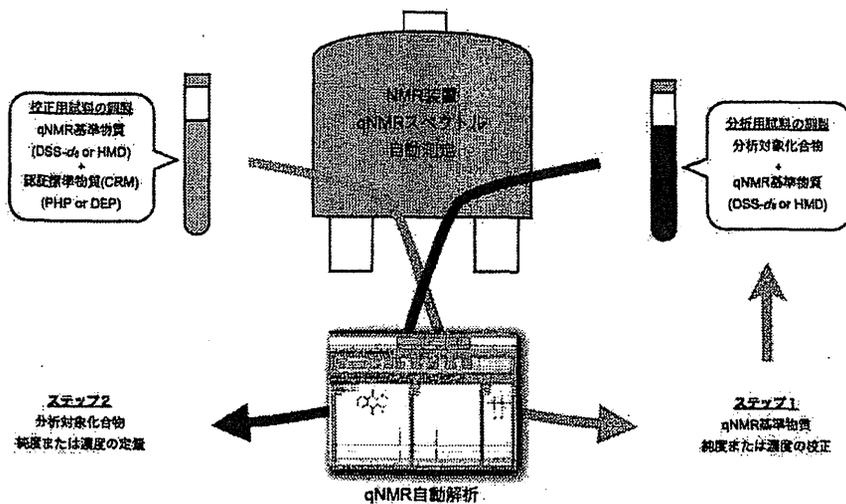


図6. qNMRによる定量分析のフロー

認証標準物質 (CRM) を用いてqNMR基準物質の正確な純度または濃度を値付ける (ステップ1)。次にqNMR基準物質を用いて分析対象化合物の純度または濃度の絶対量を求める (ステップ2)。すなわち、定量分析の結果は、qNMR基準物質を介してSIにトレーサブルな認証標準物質 (CRM) に紐付けられる。また、SIにトレーサブルなqNMR基準物質の供給が開始されれば、ステップ1の校正は省略できる。

的に正確に純度が値付けられたDSS- d_6 とHMDは流通していなかったため、厳密な純度値あるいは濃度値が要求されるqNMR基準物質としてそのまま用いることができなかった。そこで、qNMRによって得られる定量値の国際単位系 (SI) へのトレーサビリティが確保された認証標準物質 (CRM) であるNMIJ CRM 3001-a (フタル酸水素カリウム: PHP、水系用) またはNMIJ CRM 4022-b (ジエチルフタレート: DEP、有機溶媒系用) を一次標準として用い、qNMR標準液中のDSS- d_6 またはHMDの濃度を校正した後に、DSS- d_6 またはHMDを二次標準として測定対象化合物のqNMR測定を行う2段階の方式を用いることとした。すなわち、qNMRの基準物質としてDSS- d_6 およびHMDを用いた際の測定対象の化合物の定量値のSIトレーサビリティは、CRMであるPHPまたはDEPを介して実現した (図5)^{3,5)}。

図6には、qNMRによる定量分析の実際の手順を示した。まず、校正用試料としてqNMR基準物質とCRMを混合したものを調製して測定を行い、シグナル面積と濃度比の関係からqNMR基準物質の正確な純度または濃度を値付ける。次に、正確に値付けられたqNMR基準物質と分析対象化合物を混合したものを調製して測定と解析を行うことによって、分析対象化合物の純度または濃度の絶対量が求められる。(本稿が掲載される時点では、計量学的に正確に値付けられ、トレーサビリティ源としてそのまま使用可能なqNMR基準物質DSS- d_6 (水系用) と1,4-ビス (トリメチルシリル) ベンゼン- d_4 (1,4-BTMSB- d_4) (有機溶媒系) の供給が開始されている可能性が高い。なお、HMDは液状であり秤量に注意が必要であるため、取り扱いが簡単で安定な固体の1,4-BTMSB- d_4 が別途開発されている。これらを用いれば、図6のステップ1の校正作業は省略できる。) また、qNMRによる1測定当たりの所要時間は約10~20分であり、qNMRスペクトルの測定と解析を自動化することによって、だれでも簡便かつ迅速に定量分析を行うことが可能となった。さらに、得られた測定値は高い再現性を示し、不確かさは概ね1.0%以内に達し、qNMRによる定量分析の利便性と信頼性を大幅に向上させることができた。

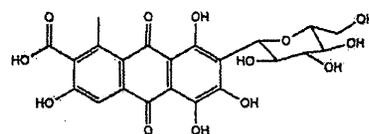
物質量の絶対値は、SIにトレーサブルな測定によって得られると定義されている。このような測定法は「一次標準測定法」¹⁰⁾と呼ばれている。「一次標準測定法」の資格を有する分析法は「一次直接法」と「一次比率法」に分類される。「一次直接法」は「物質量の基準となる他の化学物質を用いずに、自分自身で目的の化学物質の物質量を測れる方法 (絶対測定法)」であり、電量分析法、重量分析法および凝固点降下法がある。これらの分析法は物質量の絶対値が得られるが、一般に分析の迅速性に欠け、また分析できる物質の種類に限られる。一方、「一次比率法」は「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」であり、既に実用化されているものに滴定

法および同位体希釈質量分析法がある。したがって、qNMRは測定試料中にある水素原子の数、言い換えれば物質量にトレーサブルな測定値を得ることが可能な方法であり、原理的にも「一次標準測定法」の中の「一次比率法」としての資格を有する分析法であるといえる。

4. qNMRを用いた絶対定量の応用例

4-1. 天然赤色素カルミン酸の純度決定³⁾

qNMRの応用例として食品添加物として用いられているコチニール色素 (Cochineal extract) の主色素成分カルミン酸 (carminic acid (CA)) の純度決定を示す。現在、CAとしてその純度がラベル表示された試薬グレードのものが各メーカーより販売されているが、その値はメーカーが品質保証としてHPLC法または吸光度法により値付けただけであり、絶対純度を保証しているわけではない。図7には、CAの構造式と市販試薬AとBのラベルに記載されていた値とqNMRにより求められた絶対量 (%w/w) を示した。DSS- d_6 の δ 0 ppmに観察されるメチル基由来のシグナル面積値 (9H) に対する δ 6.50~7.00 ppm付近に観察されるCAの5位のシグナル面積値 (1H) のプロトン数と分子量の比の関係から絶対量 (%w/w) を求めた。その結果、試薬AおよびBはラベル表示に>70%および>95%と記載されているにも関わらず、それぞれの絶対量は21.3%および78.3%であることが明らかとなった。したがって、qNMRによるCAの絶対量の測定結果から、天然由来の有機化合物の試薬に記載されている値がその絶対量とはかけ離れている可能性が示唆された。またqNMRにより、あらかじめ絶対量を測定したものをHPLCの定量用の標準物質として用いることによって、食品中の天然有機化合物の定量分析の結果の信頼性が飛躍的に向上し、より真値に近い分析値が求められると考えられる。



カルミン酸 (carminic acid)

試薬会社	ラベル値	qNMR
A	>70% (LC面積百分率 %)	21.3%
B	>95% (分光光度法)	78.3%

図7. カルミン酸市販試薬のラベル値とqNMRによる絶対純度
ラベル値は試薬瓶またはカタログに記載されていたもの。

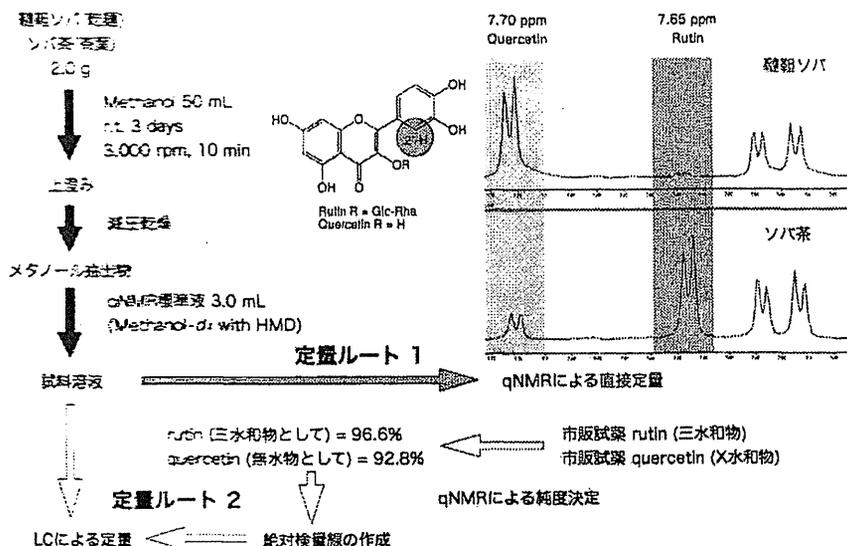


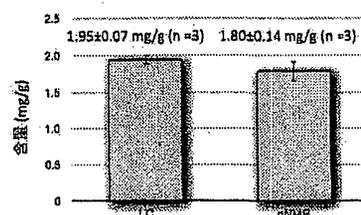
図8. ソバ中のルチンおよびケルセチンの定量分析
 定量ルート1: ソバのメタノール抽出液について直接qNMR測定を行い、2'-Hのシグナル面積からルチンおよびケルセチンを定量した。
 定量ルート2: qNMRによりルチンおよびケルセチンの試薬の純度決定をした後に、絶対検量線を作成してLCにより定量した。

4.2. ソバ中のルチンとケルセチンの絶対定量⁴⁾

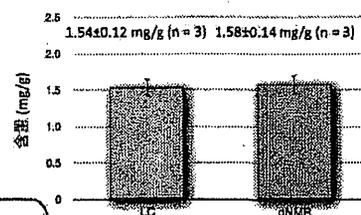
ソバ中のルチンおよびケルセチンの含量測定は、天然物化学あるいは食品分析学の実習課題として採用している大学も多く、その実習の手引き書には「LCにより市販試薬を標品とした絶対検量線法で定量すること」と記載されており、実習後、学生は何の疑いもなく「正確な定量値を求めた」とレポートを提出するだろう。しかし、クロマトグラフ法による定量分析の原理に基づけば、間違った定量値を報告していることになる。なぜなら、フラボノイドとして最も有名なルチンおよびケルセチンといえども正確に純度が値付けられた標準物質は存在しないだけでなく、市販試薬ルチンは三水和物として、ケルセチンはX水和物として主に供給されており、乾燥状態によって純度にばらつきが生じる可能性が否定できないためである。したがって、これらを標品としたLCによる定量分析では「およその値が求められた」とレポートした学生の方が実は優秀である。

そこでqNMRにより、ソバ茶中のルチンおよび韃靼ソバの乾麺中のケルセチンの絶対定量を試みた(図8)。ソバ茶および韃靼ソバの乾麺の抽出液についてqNMRスペクトルを直接測定し、ルチンおよびケルセチンに由来する δ 7.65 ppmおよび δ 7.70 ppmの2位のプロトンのシグナル面積からそれぞれの含量(mg/g)を求めた(図8定量ルート1)。その結果、ソバの茶葉中のルチン(三水和物として)が 1.80 ± 0.14 mg/g、韃靼ソバの乾麺中のケルセチン(無水物として)が 1.58 ± 0.14 mg/gと求められた(図9)。別にqNMRにより、あらかじめそれぞれの市販試薬の純度決定を行った後にLCによる絶対検量線を作成し(図8定量ルート2)、ソバの茶葉中のルチンおよび韃靼ソバの乾麺中のケルセチンの含量を求めたと

ソバ茶(茶葉)中のルチン(三水和物として)



韃靼ソバ(乾麺)中のケルセチン(無水物として)



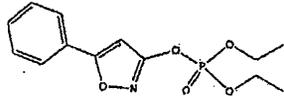
LCによる定量
絶対検量線が必要

qNMRによる直接
測定当たり10-2
絶対検量線の作成

図9. qNMRおよびLCによるソバ中のルチンおよびケルセチンの定量値の比較

ころ、得られた値は、qNMRによる定量値とほぼ一致した(図9)。この結果から、qNMRにより食品中の化合物の絶対量が正確に求められるだけでなく、測定対象の化合物のシグナルが分離していれば、クロマトグラフィーによる分離操作を必要としない点、測定対象化合物毎に検量線の作成を必要としない点において、ハイスループットな絶対定量分析法としても応用可能であることが示唆された。

一般に、食品中の生理活性物質や天然物に含まれる有効成分の定量分析では、自ら単離した有効成分や対応する市販試薬を標準物質の代用品として使う場合が多いが、その純度



イソキサチオンオキソン標準品 (isoxathion oxon std)

ロット	ラベル値	qNMR
Lot. 1	96.9% (GC-FID)	75.4%
Lot. 2	98.9% (GC-FID)	98.5%

図10. イソキサチオンオキソン標準品のラベル値とqNMRによる絶対純度
ラベル値は標準品の添付文書に記載されていたもの。

(あるいは濃度)の評価が不十分であることから定量値の信頼性は低い。qNMRはこのように適切な標準物質が得にくい場合にも信頼性の高い強力な定量分析法になり得ると考えられる。

4.3. イソキサチオンオキソン標準品の絶対定量⁵⁾

試薬メーカーより、有機化合物の「標準品」が販売されているが、標準品であっても開封後の純度は徐々に低下していくものも多いと考えられる。

そこで有機リン系農薬のうち、冷蔵保存しておいたイソキサチオンオキソン標準品2ロットについて、qNMRによる絶対定量を行った。その結果、図10に示すようにロット1とロット2の純度値は大きく異なり、ロット1が75.4%、ロット2が98.5%であり、ロット1のqNMRスペクトル上には分解物と推定されるいくつかのシグナルが観察された。この結果は、標準品として入手したものについても、適切な管理・保存が行われていなければ、その標準品としての純度と品質が維持できないことを示している。このようにqNMRは標準品などの絶対純度の確認や品質管理に応用可能であると考えられる。

5. まとめ

現在、食品分析においてクロマトグラフ法が一般的に用いられており、様々な物質の分析値が報告されている。しかし標準物質の存否から、今日においても得られた分析値の信頼性が厳密に確保されているとはいえないものも存在することは事実である。食品分析の信頼性を向上するためには、科学的な根拠に基づいた分析値のトレーサビリティの確保が今後の「鍵」となると思われる。qNMRは技術・操作的にも簡単かつ迅速な分析法であり、たった一つのqNMR標準物質「ものさし」を用いてあらゆる有機化合物の絶対量を算出できる。この点を活用すれば、最も基本的で重要な問題である標準物

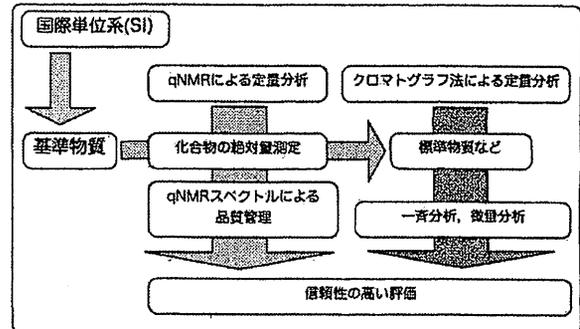


図11. qNMRの役割と分析値の信頼性の確保

質の供給・入手の問題を根本的に解消する方法の一つとなり得ると考えられる。また、食品化学の分野の研究にqNMRを導入し、既存の定量分析法と連携することによって、分析値だけでなく研究対象の化合物の有効性の評価を間接的にSIに紐付けることが可能となり、これまで漠然とした疑問の原因となっていた研究結果に対する信頼性の問題が解消されると考えられる (図11)。

6. おわりに

qNMRは、「NMR現象が定量的である」という古くから知られている原理に基づいているが、低分子化合物の定量分析法としては比較的新しい技術であり、方法論、技術的要素に関する検証、インフラなどの整備が現在進行形で行われている。継続的な基礎研究により、定量値の精度だけでなく、微量分析にも対応できるような検出感度のさらなる向上も期待できる。また、SIトレーサブルなqNMR標準物質の供給、qNMRに特化した安価なNMR装置の製品化、自動解析ソフトの開発も重要である。その上でバリデーションを行い、一般的かつ標準的な試験法の一つとして定着させることができれば、検査・試験機関や研究機関などにおいて幅広い分野での有機化合物の定量分析への活用が期待される。さらに、電気信号を基準としたERETIC (Electronic Reference To access In vivo Concentrations)-qNMRや多変量解析qNMRなどの応用技術の開発により、今後の分析化学の分野において様々な問題を解決する重要な次世代の基盤技術の一つとなると確信している。

本稿で述べたqNMR技術を実際の試験研究や業務に結びつけられれば、多様な分野で分析値の信頼性の向上が実現できることを想像してほしい。また、読者自身からqNMR技術の新しい応用が発信されることで、食品分野だけでなく、分析化学に関連した研究活動全体の発展に繋がることを強く期待したい。

7. 追記

本稿で述べた内容は、現状の痕量分析により得られる定量値の信頼性に対して共通の懸念意識を持つ産官の研究機関の研究者がそれぞれの立場を超えて集まり、信頼性を確保した次世代の定量分析技術の構築を目指す、固定観念にとらわれず自由な発想に基づいた意見交換および情報収集を行った上で、それぞれの専門知識を持ち寄って目標を達成しつつある現在進行形の共同研究であることをここに記す。共同研究「qNMR標準化のための測定法の確立」、「qNMR普及のためのインフラの整備」ならびに「1対多型校正技術の研究開発」において、山田裕子氏、吉田雄一博士（和光純薬工業株式会社）、小池亮博士（花王株式会社）、井原俊英博士、齋藤剛博士（独立行政法人産業技術総合研究所）の研究成果の一部を含む。最後に、qNMRの技術開発に当たり、奇抜な発想による研究テーマに関わらず、当初からその必要性を理解して温かく見守っていただくと共に、本稿の執筆内容について貴重なご助言をいただいた佐藤恭子博士、山崎社博士、河村葉子博士、合田幸広博士、西村哲治博士（国立医薬品食品衛生研究所）に感謝の意を表したい。

引用文献

- 1) T. Ihara, T. Saito and N. Sugimoto. *Synthesiology*, 2, 12-22 (2009).
- 2) N. Sugimoto, R. Koike, N. Furusho, M. Tanno, C. Yomota, K. Sato, T. Yamazaki and K. Tanamoto. *Food Add. Contam.*, 24, 799-806 (2007).
- 3) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 伊藤澄夫, 山崎社, 河村葉子, 西村哲治, 食衛誌, 受理済 (2009).
- 4) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志, 山崎社, 河村葉子, 西村哲治, 第51回天然有機化合物討論会講演要旨集, 2009, pp. 31-36.
- 5) 田原麻衣子, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎社, 堀元憲一, 中澤裕之, 西村哲治, 食化誌, 16, 28-33 (2009).
- 6) U. Holzgrabe, I. Wawer and B. Diehl. "NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis", Elsevier, Amsterdam, 2008.
- 7) 竹内敬人, 角屋和水, 加藤敏代. "初歩から学ぶNMRの基礎と応用", 朝倉書店, 2005.
- 8) G. F. Pauli, B. U. Jaki and D. C. Lankin. *J. Natural Prod.*, 70, 589-595 (2007).
- 9) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura and T. Maeda. *Metrologia*, 41, 213-218 (2004).
- 10) T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose and T. Hirai. *Accred. Qual. Assur.*, 14, 79-86 (2009).
- 11) G. Shao, R. Kautz, S. Peng, G. Cui and R. W. Giese. *J. Chromatogr. A*, 1138, 305-308 (2007).
- 12) qNMR Quantitative NMR at UIC Chicago, URL: <http://tiger.uic.edu/~gfp/qnmr/>

tiger.uic.edu/~gfp/qnmr/

- 13) "分離分析化学事典", 日本分析化学会編, 朝倉書店, 2001, p. 350.

PROFILE

杉本 直樹

国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
第3室室長
薬学博士



1997年金沢大学大学院自然科学研究科博士課程修了（薬学博士）。同年国立衛生試験所（現、国立医薬品食品衛生研究所）入所、食品添加物部研究員。2005～2006年FDA（米國食品医薬品局）、CFSAN（食品応用栄養センター）にて、国際標準化を目指した食品添加物の複合分析法の開発研究に従事。2008年より、同研究所環境衛生化学部第3室室長。

多田 敦子

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
第2室主任研究官
理学博士



1995年お茶の水女子大学大学院家政学研究科修士課程修了。同年国立がんセンター研究所入所、変異原物質探索研究に従事。1999年お茶の水女子大学大学院より博士号（理学）取得。2003年より国立医薬品食品衛生研究所、食品添加物部第2室研究員。2004年、同研究部主任研究官。天然由来食品添加物の成分解析と分析法の開発研究に従事。

末松 孝子

日本電子株式会社
NM事業ユニットNMアプリケーショングループ
研究員
工学博士



1997年九州大学大学院工学研究科博士課程単位取得後退学（合成化学専攻）。1998年工学博士取得。同年日本電子株式会社入社。入社以来、核磁気共鳴装置の応用研究に従事。

有福 和紀

日本電子株式会社データソリューション事業部
総合企画推進課P&Dビジネス推進部
次長
工学学士



1985年福岡大学工学部卒業。同年日本電子データソリューション株式会社（現：日本電子株式会社）入社、NMR解析ソフトに関する研究開発に従事。1994年NMR測定・処理に関する研究開発に従事し、核磁気共鳴装置を製作。2004年メタボローム解析について研究に従事し、メタボローム解析ソフトウェアを製作。

多環芳香族炭化水素から見た海洋油汚染

はや かわ かず いち どり ぼ あきら
 早 川 和 一 鳥 羽 陽
 かめ だ たか ゆき すず のぶ お
 亀 田 貴 之 鈴 木 信 雄

今から14年前の冬、日本海でタンカーが沈没し、流出したC-重油が日本海側沿岸に大量に漂着した。それまで原油の回収に効果を発揮した手法や機材も、原油より遥かに粘度が高いC-重油には殆ど機能せず、回収は人力作業に頼った。漂着した油は、岩や礫・石の海岸、特に手前に岩礁を有する遮蔽海岸に長期残存する傾向があった。C-重油に含まれる多環芳香族炭化水素類を指標にして、油の異同識別や汚染状況の把握が行われた。C-重油で汚染した海水を清浄海水に混ぜてヒラメの卵を飼育したところ、孵化した稚魚に脊柱彎曲が現れた。酵母 two-hybrid 法を適用して調べた結果、水酸化多環芳香族炭化水素の中に強い攪乱作用を有する化合物があり、さらに構造活性相関があることがわかった。また、最近、日本海が多環芳香族炭化水素類の汚染の現状調査を開始した。

キーワード：海洋汚染、油流出、内分泌攪乱物質、多環芳香族炭化水素

1. はじめに

1997年冬、大しけの日本海でタンカー「ナホトカ号」が沈没し、大量のC-重油が日本海に流出した。流出した油は日本海側沿岸に漂着し、甚大な被害を与えた(図1)。著者らは、事故直後からC-重油が漂着した石川県と福井県の海岸の汚染と回復の状況を2年余りにわたって追跡調査した。C-重油に含有される多環芳香族炭化水素(Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAH)類を指標物質として、風化重油塊や海岸砂、海水、魚肉中の濃度を継続測定するとともに、海岸性状と脆弱性の関係を論文にまとめて発表した¹⁾。その後、著者らの研究は海岸から実験室に移り、魚などの海洋生態系に及ぼすC-重油の影響について研究を続けた。かつての汚染海岸にも、最近では暫く足を運んでなかった。ところが、ナホトカ号の事故から13年余りが経過した2010年4月20日、突然、米国メキシコ湾沖に浮かぶ原油掘削施設が爆発炎上し、大量の原油が海洋に流出したニュースが世界を駆け巡った。著者も連日のようにインターネットの関連サイトを覗いた。事故現場が米国メキシコ湾沿岸から80 km 沖合いで、しかも海面から1500 mの海底で

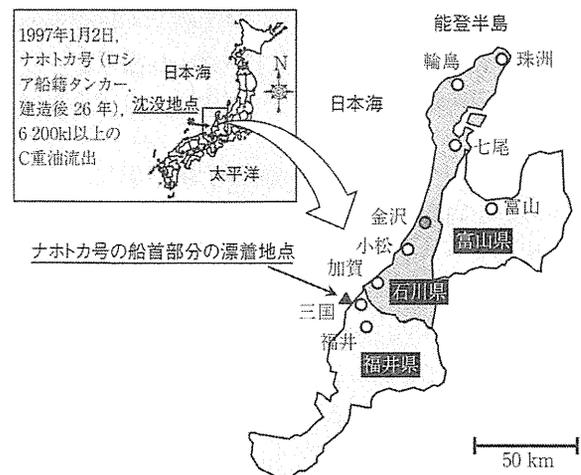


図1 日本海重油流出事故

あったことから原油の流出を止めることは容易ではなく、ようやくパイプ出口を塞ぐことに成功したのは5か月後であった。この間、メキシコ湾に流出した原油は毎日数千kl以上といわれている。こうした大規模な油流出事故は、忘れた頃に世界のどこかで繰り返されている(表1)。メキシコ湾の原油流出事故が発生したために、著者らがまとめたナホトカ号油流出事故後の汚染環境の回復に関する上述の研究論文¹⁾が、その後世界で発表された油汚染関係論文の中で引用件数が最も多い論文になってしまった。誠に不思議な巡り合わせを感じる。

ナホトカ号油流出事故現場には、地元住民や自衛隊、さらに事故を知った多くのボランティアが週末に

† 金沢大学 医薬保健研究域 薬学系：〒920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: hayakawa@p.kanazawa-u.ac.jp

†† 金沢大学 環日本海域環境研究センター：〒927-0553 石川県鳳珠郡能登町小木

表1 過去34年間に起こった10万トン以上または3000万米ガロン以上の油流出事故

事例	場所	発生日	流出量(トン)
2010年メキシコ湾原油流出事故	米国(メキシコ湾)	2010年4月20日	180万以上
湾岸戦争	イラク(ペルシャ湾)、クウェート	1991年1月23日	75万~110万
Ixtoc I 油田	メキシコ(メキシコ湾)	1979年6月3日 ~1980年3月23日	45万4000~48万
アトランティックエンブレス号と エージアン・キャプテン号衝突	トリニダード・トバゴ	1979年7月19日	28万7000
フェルガナ峡谷油田	ウズベキスタン	1992年3月2日	28万5000
ノールズ油田	イラン(ペルシャ湾)	1983年2月4日	26万
ABT サマー号炎上	アンゴラ(アンゴラ沖)	1991年5月28日	26万
カストロ・デ・ベルバー号炎上	南ア共和国(サルダンハ湾)	1983年8月6日	25万2000
アモコ・カディス号の座礁	フランス(ブルターニュ半島)	1978年3月16日	22万3000
ハーベン号爆発炎上	イタリア(地中海, ジェノヴァ付近)	1991年4月11日	14万4000
オデッセイ号沈没	カナダ(ノバスコシア州沖合)	1988年11月10日	13万2000
シー・スター号衝突	イラン(オマーン湾)	1972年12月19日	11万5000
Irenes Serenade	ギリシャ(ピロス)	1980年2月23日	10万
ウルキオラ号座礁	スペイン(ア・コルーニャ)	1976年5月12日	10万
トリー・キャニオン号座礁	イングランド(シリー諸島)	1967年3月18日	8万~11万9000

阪神や中京地区から駆けつけた。こうした人々の必死の努力でC-重油で覆われた砂浜海岸は見事にきれいになった。阪神・淡路大震災以後、多くの人々が、改めて災害時におけるボランティア活動の大切さを知ることになった。海岸の清掃作業が一段落するとともに、地元では水産業や観光産業への風評被害の拡大を食い止めようと、早期に終息宣言がなされ、これとともに、事故調査に関わった多くの研究者も波が引くように離れていった。しかし、調査研究を長期にわたって続けなければわからない点も少なくない。油漂流挙動のシミュレーション技術、バイオレメディエーション技術、魚などの海洋生態系あるいはヒトの健康に及ぼす影響などの研究が、その後も静かに続けられている。本稿では、大規模な油による海洋汚染について、特に、油残留海岸特性、海洋生態系(動物)に影響を及ぼす油の毒性について、著者らのこれまでの研究成果も踏まえながら、関連研究を紹介する。

2. ナホトカ号 C-重油流出事故の概要

1997年1月2日、ロシア船籍タンカー「ナホトカ号」が、日本海の隠岐諸島沖を航行中に折からの大しげに遭遇した。その結果、建造後26年を経過した船体は真二つに折れ、本体は海底に沈み、船首部分は流されて福井県安島付近の海岸に漂着した。このため、ナホトカ号に積載していた6000kL以上のC-重油が、本体及び船首部分から漏出し、日本海側1府8県の沿岸に漂着した。とりわけ石川県と福井県の沿岸には大量のC-重油が漂着して、甚大な被害を与えた^{1,2)}。

原油には多くの化合物が含まる。その主成分は炭化水素化合物であり、脂肪族飽和炭化水素(パラフィ

ン)系と脂肪族不飽和炭化水素(オレフィン)系、脂環式飽和炭化水素(シクロパラフィン)系、芳香族炭化水素系に大別される。精製過程で蒸留温度が低い方から、LPG、ナフサ、灯油、軽油、重油、アスファルトなどに分離される。さらに重油は、沸点の低い方からA-重油~C-重油に分溜される。従って、原油と重油は、例えばパラフィンやPAH類の種類が異なるので、これを指標に汚染油の異同識別が行われている³⁾。C-重油は揮発しにくい画分で、粘度も高い。ナホトカ号から流出したC-重油は、岩・礫・石の海岸ではムース状となって海面を覆い、砂浜では砂交じりの油塊となって砂浜に打ち上げられた。こうした漂着油物の回収用に、当初、多くの柄杓が集められた。しかし、ひとたび漂着油物をすくった柄杓は、逆さまにしてもムース状の油塊がこびりついたままで、海水だけが落ちる有様であった。一方、海洋には漂着油の拡散を防止するためにオイルフェンスが設置されて、米国から最新式の油回収船まで投入されたが、これらの機材の多くは原油を対象に設計されたものであったため、原油より遥かに粘度が高いC-重油の回収には十分な性能を発揮したとは言い難かった。海洋油流出事故でもC-重油に対する危機対策が殆どない中で起こったナホトカ号事故では、漂着油の回収は、結局、人力による地道な作業に頼ることとなった^{1,2)}。

3. C-重油漂着海岸の性状と残留特性(脆弱性)

ナホトカ号のC-重油が漂着した海岸の性状とC-重油の残存期間の関係を明らかにするために、著者らは、事故1年及び2年後に、石川県能登半島先端狼煙灯台付近から福井県三国町サンセットビーチまでの海

岸線を実際に歩いて、汚染の程度を目視観察した。能登半島は岩や礫・石の海岸が多いのに対して、それ以外（この地域を加賀と呼ぶ）の海岸線は殆んど砂浜である。その結果、加賀の砂浜海岸からはC-重油は短期間に消失したが、能登半島の岩や礫・石の海岸、特に手前に岩礁を有する遮蔽海岸には、1、2年後も依然大量のC-重油が残存している場所が多いことがわかった（図2）。得られた海岸の性状と油残留特性の関係（図3）⁴⁾は、米国 National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) から報告されている脆弱性海岸マップの傾向と一致している⁵⁾。この結果を契機に、わが国でも海洋油流出事故の危機管理対策の一つとして、同様の脆弱性海岸マップ作成の取り組みがな

されている。予めマップ上で海岸線の特徴を知っておけば、ひとたび事故が発生したら、脆弱性の高い海岸に機材と人力を投入することにより、ナホトカ号事故のような油の長期残留による被害の拡大を防ぐことが可能になる。

4. C-重油と PAH

上述した様に、原油には PAH 類が含まれている。PAH は環数が増すほど分子量が大きくなり揮発性は低下する。灯油には揮発性が高い2環の naphthalene は含まれるが、3環以上の PAH は殆んど含まれない。A-重油には2～4環までの PAH が含まれている。これに対して、ナホトカ号が積載していたC-重油には、



A. シャク崎海岸、1998.3.5



B. 川浦海岸、1998.3.6

図2 1年後の汚染海岸

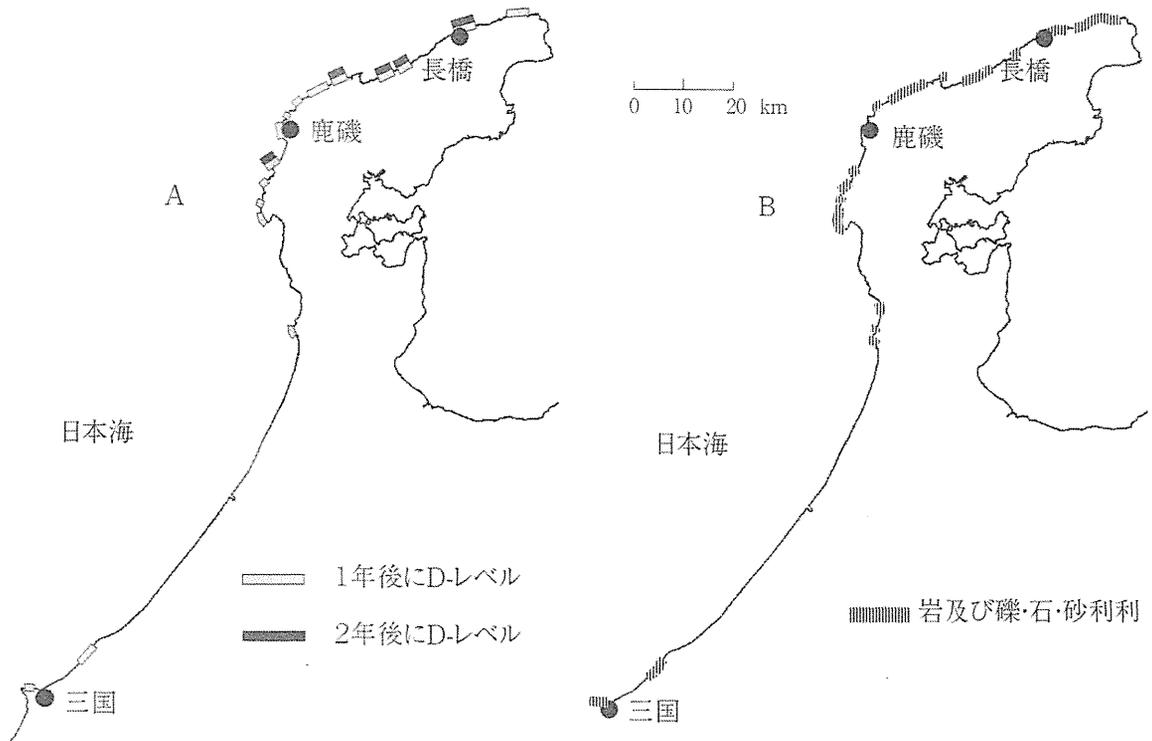


図3 (A) C-重油残留区域と (B) 岩及び礫・石・砂利区域の関係

5, 6 環の難揮発性 PAH も多く含まれている (図 4)⁴⁾. このうち benzo[a]pyrene (BaP) は、古くから発癌性 / 変異原性 PAH として知られており、ナホトカ号事故直後は、C-重油の生態系やヒトの健康に及ぼす影響として、専ら発がん性や変異原性の観点から調査研究が進められた^{6,7)}.

C-重油回収現場では作業員の中に死亡者が出て、C-重油成分との関連が疑われたが、その死因は発癌性とは全く関連がなかった。また、作業員の中に、目や喉への刺激や血圧上昇、気分が悪くなるなどの不調を訴えた者も出た。これらの死因や症状の原因は特定には至らなかったが、C-重油に含まれる揮発性の高い成分の影響が推察された。ナホトカ号 C-重油には naphthalene など揮発性が高い成分も含まれており (図 4)、作業員の体が温まれば、着衣に付着した油からもこうした成分が揮散して作業員が被曝し易くなったことが推察される。おくれればながら、油流出事故緊急時の環境影響の調査手法が環境庁からまとめられている⁸⁾.

5. 内分泌攪乱物質 (環境ホルモン)

ナホトカ号事故後これまでの調査では、C-重油に汚染された海域に生息する魚やカニに癌は見つかったとの報告はなかった。しかし、ナホトカ号 C-重油に汚染された海水を清浄海水に 2.5% 混ぜて、この中でヒラメの卵を飼育したところ、孵化した稚魚の 65% に脊柱彎曲が現れたことが報告された⁹⁾。しかし、こ

の重大な現象の原因については、解明されないまま今日に至っている。

ナホトカ号油流出事故の前年、米国で 1 冊の本が出版され、世界に大きな衝撃が走った。著書名は "Our Stolen Future", 和文名「奪われし未来」、著者は動物生態学者のシーア・コルボーンら 3 名である。この本は、地球上の至る所で野生動物に、個体数の減少やオスのメス化、奇形の増加などの異常が見られるようになってきたが、それが内分泌攪乱物質 (Endocrine Disruptors, いわゆる環境ホルモン) によって引き起こされたことを報告した。一見様々に見える生態系の異常を、内分泌攪乱という統一的な概念で説明した本著は、環境問題に関わる代表的な啓発書の一つになった¹⁰⁾。これを切掛けに欧州や米国で国際会議が相次いで開催され、にわかに内分泌攪乱物質に関する取り組みが始まった。わが国でも、研究班が急遽組織されて環境庁 (現在の環境省) を中心にその取り組みが始まった¹¹⁾。

内分泌攪乱物質の定義として、欧州委員会の「生体の恒常性、生殖発生あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合、そしてそのホルモン作用そのものあるいはその排泄などの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」がよく引用される。1998 年、環境省は内分泌攪乱作用の疑いのある物質として、優先して調査研究を進める必要性の高い 67 物質 (その後 65 物質に見直し) をリストアップ (SPEED'98) した (表 2)¹¹⁾。そのうちの

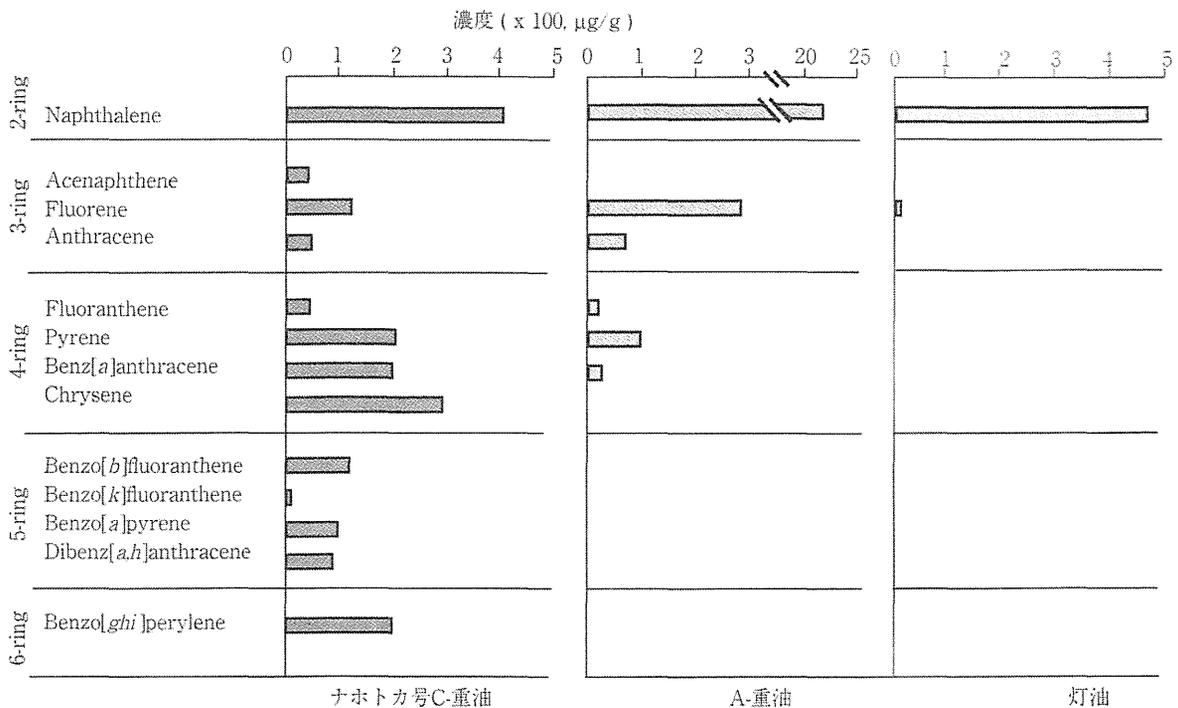


図 4 ナホトカ号 C-重油、A-重油及び灯油に含まれる多環芳香族炭化水素

表2 内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の例

I. 工業原料 (熱媒体, 難燃剤, 界面活性剤, 可塑剤)

○ポリ塩化ビフェニール類 (PCBs) ○ポリ臭化ビフェニール類 (PBBs) ○アルキルフェノール ○ビスフェノール
○フタル酸ジ-2-エチルヘキシル ○フタル酸ブチルベンジル ○フタル酸ジ-n-ブチル ○フタル酸ジシクロヘキシル
○フタル酸ジエチル ○2,4-ジクロロフェノール ○アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル ○ベンゾフェノン ○4-ニトロトルエン

II. 農薬類

○ヘキサクロロベンゼン ○ペンタクロロフェノール ○2, 4, 5-トリクロロフェノキシ酢酸
○2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 ○アミトロール ○アトラジン ○アラクロール ○シマジ ○ヘキサクロロシクロヘキサン
○エチルパラチオン, パラチオン ○カルバリル ○クロルデン, オキシクロルデン及び trans-ノナクロル
○1, 2-ジプロモ-3-クロロプロパン ○DDT 及びその代謝物 (DDT, DDE and DDD) ○アルドリン ○エンドリン
○ディルドリン ○エンドスルファン ○ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド ○マラチオン ○メソミル
○メトキシクロル ○マイレックス ○ニトロフェン ○トキサフェン, カンフェクロル ○トリフルラリン

III. 船底塗料, 魚網防汚剤類

○有機スズ

IV. 重金属類

○水銀 ○カドミウム ○鉛

V. 非意図的生成化学物質類

○ダイオキシン類 (ポリ塩化ダイオキシン及びポリ塩化ジベンゾフラン)
○ベンゾ [a] ピレン

環境庁リスク対策検討会監修: 環境ホルモン, 環境新聞社, 1997.

1/2 は農薬類で, この中には内分泌攪乱物質問題が出る遙か以前から生態系への影響が指摘されていた DDT やドリン系農薬などが含まれている. 次に種類が多い工業製品には, 熱媒体, 難燃剤, 界面活性剤, 可塑剤として広く使用されているポリ塩化ビフェニール類やアルキルフェノール類, フタル酸エステル類などがある. さらに非意図的生成化学物質には, 石炭, 石油など化石燃料の燃焼時に生成するダイオキシン類と PAH 類の一つである BaP がリストアップされている.

6. PAH の代謝活性化と内分泌攪乱作用

上述の SPEED'98 には PAH の中から BaP のみがリストアップされていたが, その内分泌攪乱作用の発現機序は必ずしも全てが明らかになっていたわけではない. 著者は, たまたまこのリストを目にした時, これを解析することが, 上述のヒラメの稚魚に現れた脊柱彎曲現象の謎を解く鍵になると考えた.

BaP は動物体内に入るとアリル炭化水素受容体 (別名ダイオキシン受容体) に結合し, その結果, 水酸化代謝酵素 P450 が誘導される. 次いで BaP は P450 の働きによって水酸化される. 著者は, 生成した PAH の水酸化体 (OHPAH) の中に, 人工女性ホルモンである diethylstilbestrol (DES) と構造が類似するものがあることに気付いた. 従って, 「OHPAH の中にはエストロゲン受容体に強く結合して, さらにエストロゲンホルモンの働きを攪乱するものがある」との仮説を設けた (図5). そして酵母 two-hybrid を用いたアッセイ系を導入して, BaP と 12 種類のモノ水酸化体 (OHBaP) を手始めに, エストロゲン様作用 / 抗エストロゲン作用を調べた. その結果, OHBaP の中

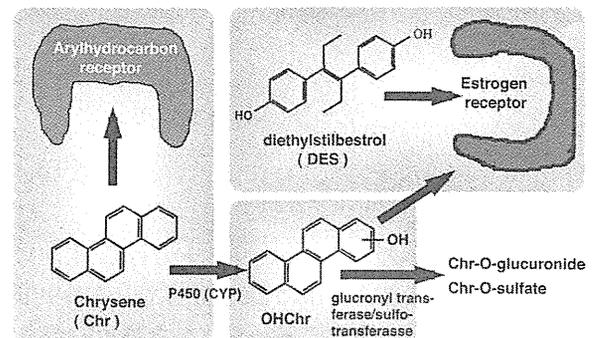


図5 多環芳香族炭化水素の代謝とエストロゲン受容体への結合

にエストロゲン受容体に結合して, エストロゲン様作用または抗エストロゲン様作用を示すものがあった¹²⁾. さらに, 他の2~6環のPAHとそのモノ水酸化体を片端から購入して揃え, その作用を調べたところ, PAHは全く作用を示さなかったが, 予想通り他のOHPAHの中にはもっと強いエストロゲン様作用または抗エストロゲン様作用を示すものが見出された. エストロゲン様作用は, 4環の長方構造を有する4-hydroxybenzo[a]pyrene (4-OHBaA) や2-, 3-または10-hydroxychrysene (2-, 3-, 10-OHCh) がとりわけ強かった. 一方, 抗エストロゲン作用は, やはり4環構造の2-, 3-hydroxybenzo[c]phenanthrene (2-, 3-OHBcPh) がとりわけ強かった (図6). 強いエストロゲン様活性が認められたOHPAHのL/B比 (平面PAHの長軸 (Length) と短軸 (Breadth) の長さ比) とO-H距離 (水酸基と最も離れた水素間の距離) は, いずれも女性ホルモン17β-estradiol (E2) やDESに近似して狭い範囲にあった. また, 強い抗エストロゲン活性が認められたOHPAHのL/B比と

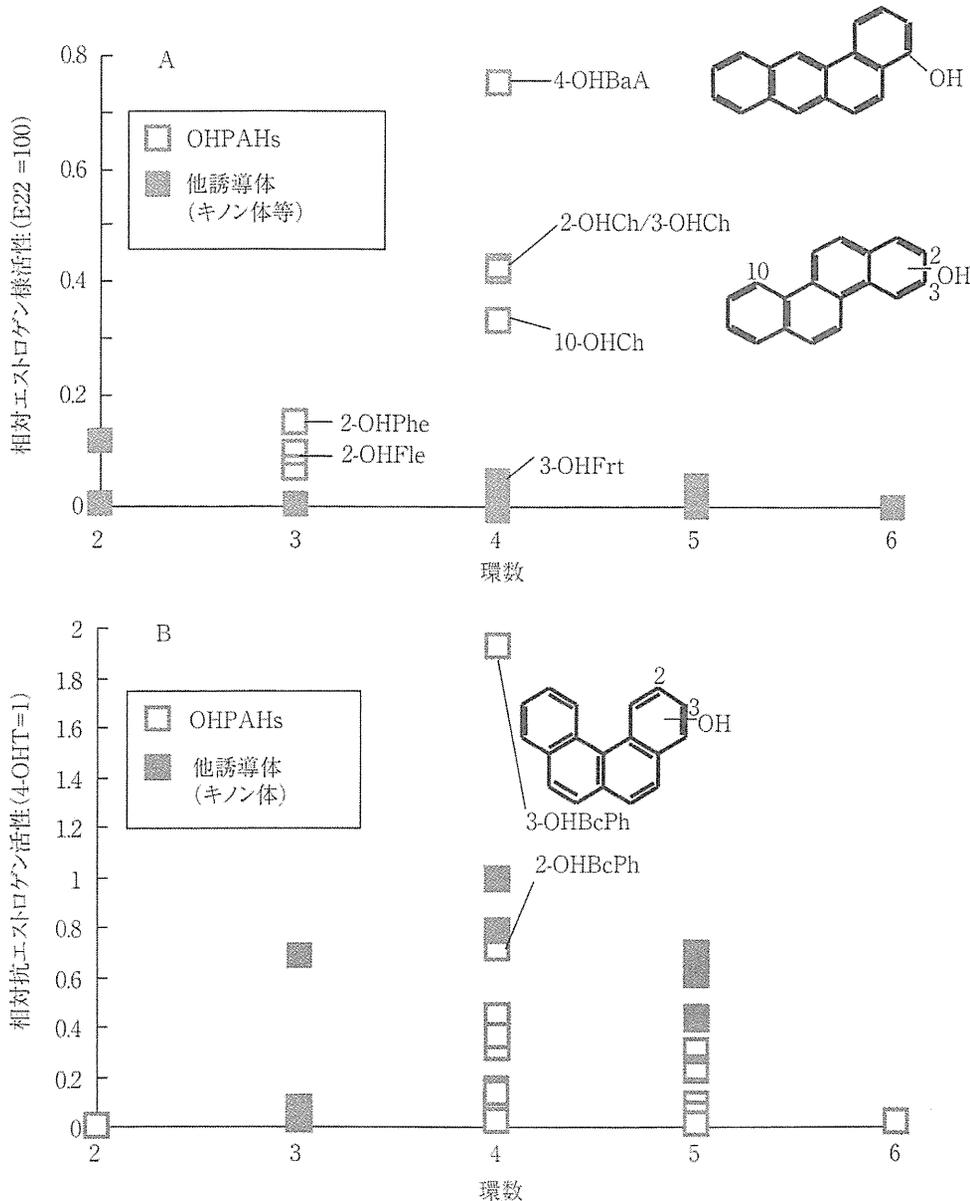


図6 PAH誘導体の環数と(A)エストロゲン様作用及び(B)抗エストロゲン作用の関係
 OHPhe: hydroxyphenanthrene. OHFle: hydroxyfluorene. OHFrt: hydroxyfluoranthene.
 OHCh: hydroxychrysene. OHBaA: hydroxybenzo[a]anthracene. OHBcPh: hydroxybenzo[c]-
 phenanthrene

O-H 距離は、それより異なる少し広い範囲にあった(図7)。これより、OHPAHの構造と内分泌攪乱作用の間に構造活性相関があることが初めて明らかとなり、OHPAHがエストロゲン受容体に結合することが活性発現の要件になっていることを示唆している^{13,14}。このことは、作用発現の有無を化合物の構造から推定可能なことを意味している。

骨に対する化学物質の影響を調べるために、骨と同様の骨芽細胞と破骨細胞とを有する魚のウロコが代わりに用いられる。そこで著者らは、これを用いてPAHの影響を評価することにした。因みに、エストロゲン様作用が強かった4-hydroxybenzo[a]-pyreneについて調べた結果、骨芽細胞と破骨細胞の

働きはいずれも低濃度で影響を受け、その強さは内分泌攪乱作用が指摘されているbisphenol Aよりも強いことが明らかになってきた¹⁵。PAHの内分泌攪乱作用については、まだその発現機序の一部が明らかになったに過ぎないが、PAHの解毒に働くはずの代謝が、内分泌攪乱作用を呈するOHPAHを体内で合成することは無視することはできない。魚のウロコで明らかになった事実は、C-重油によるヒラメ稚魚の脊柱彎曲の機序を解明する突破口になるかもしれない。

7. 日本海のPAH及びPOPs調査

ご承知のようにPAH類は化石燃料の燃焼でも生成する大気汚染物質の一つである。このため、著者らは

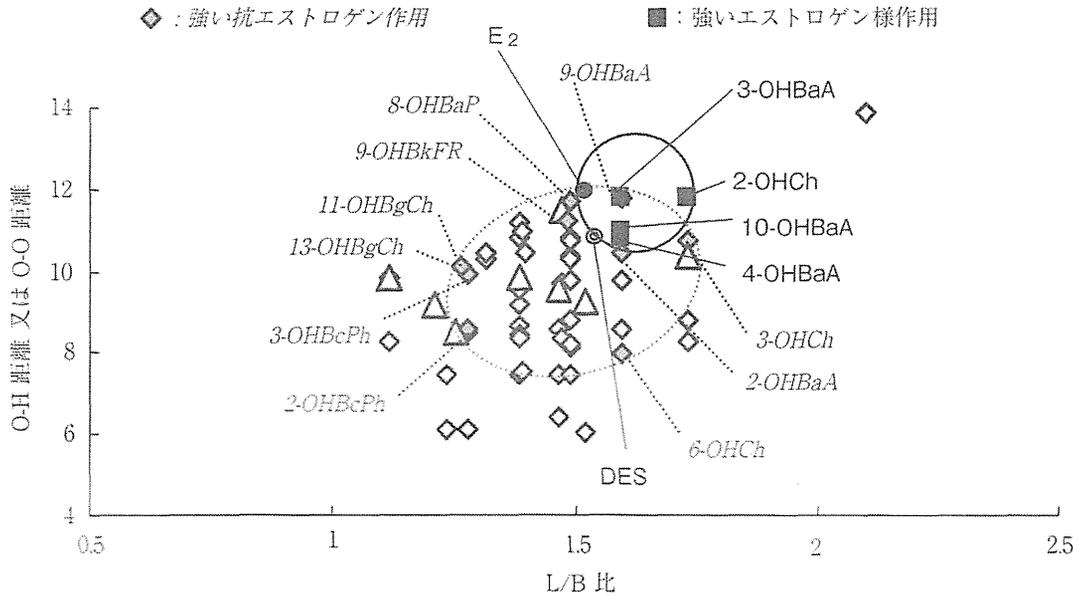


図7 強いエストロゲン様活性又は抗エストロゲン活性を示す OHPAH の構造 L/B 比：平面 PAH の長軸 (Length) と短軸 (Breadth) の長さ比。O-H 距離：水酸基と最も離れた水素間の距離 OHBkFR：hydroxybenzo[f]fluoranthene。OHBgCh：hydroxybenzo[g]chrysene 他は本文及び図6に同じ

1990年代に、国内研究者と協力して、主要都市で大気粉塵を捕集・分析するモニタリングネットワークを構築している。ハイボリュームエアサンプラーを札幌、東京、富山、金沢、北九州に設置し、毎季節2週間ずつ、フィルターを毎日交換して大気粉塵を捕集し、著者らが開発した分析法を用いて PAH 類を分析した。次いで、2001年からは、わが国だけでなく、日本海を囲む中国、韓国及びロシアの研究者と国際モニタリングネットワークを形成して、日本とこれら諸国の10余りの地点で大気中の PAH 類の濃度、組成を継続調査している。その結果、中国の都市における大気中 PAH 濃度は、日本や韓国の都市の大気より遥かに高く、それが日本列島に長距離輸送されており、この間に大量の PAH 類が日本海の海水中に移行している可能性のあることがわかった。そこで2008年からは、国内外の大学・研究機関に所属する船舶だけでなく、客船やフェリーなどの商業船にも採水器や観測器を搭載して、日本海の海水サンプリングを開始し、その中の PAH 類や難分解性有機汚染物質 (POPs) の測定を行っている。調査を開始してまだ日が浅くデータが十分揃っているとは言い難いが、東シナ海方面から対馬海峡から日本海を通過して日本海に流入する PAH 類の量も多いと推定されるなど、日本海における PAH 類の挙動が少しずつ明らかになってきた。

8. おわりに

日本海ナホトカ号 C-重油流出事故で著者らは、油

流出事故がひとたび起こると、その被害は広範囲に長期間に及ぶことを経験し、危機管理対策の大切さを知った。それから13年が経過して、昨年起こった米国メキシコ湾の原油流出事故は、再びその重要性を認識させた。確かに、脆弱海岸マップの作成やコンピュータを用いた油移動シミュレーションモデル、界面活性剤、回収装置、バイオレメディエーションなどの技術開発は進んできた。こうした技術開発に比較して、長期間の地道な研究を続けなければならない生態系への影響は研究者の数も少なく成果も出にくい。しかし、わが国の大切な海洋資源を保全するためには、海洋の汚染が動物や植物に及ぼす作用を明らかにし、その影響を未然に防止することは大切である。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費、環境省地球環境総合推進費、厚生労働省科学研究費、鉄鋼業環境保全技術開発基金などの助成を得て行われました。また、試料のサンプリングに協力いただいた多くの方々に感謝します。

参考文献

- 1) 福井新聞社、ナホトカ号事故から船首回収まで 重油汚染。1997。
- 2) 石川県環境安全部消防防災課、ロシアタンカー油流出災害の記録。1998。
- 3) 剣持堅志、荻野泰夫、松永和義、森 忠繁、緒方正名、油汚染時における化学成分のスクリーニング分析、環境

- 化学, 7, 561-576 (1997).
- 4) Hayakawa, K., Nomura, M., Nakagawa, T., Oguri, S., Kawanishi, T., Toriba, A., Kizu, R., Sakaguchi, T., Tamiya, E., Damage and recovery of coastlines polluted with C-heavy oil from Nakhodka. *Water Res.*, 40 (5), 981-989 (2006).
 - 5) NOAA HAZMAT, 2002. Environmental sensitivity index guidelines Version 3.0, NOAA Technical memorandum NOS OR&R 11.
 - 6) 早川和一, 木津良一, 安藤京子, 村橋 毅, 東 成見, 山本茂樹, 長谷川幸司, 中浜慶子, 山下克美, 松本 健, 後藤純雄, ナホトカ号流出重油及び汚染環境試料中の芳香族炭化水素と毒性, *環境化学*, 7, 545-552 (1997).
 - 7) 後藤純雄, 峯木 茂, 杉田和俊, 遠藤 治, 村山留美子, 内山巖雄, 田中基裕, 早川和一, ナホトカ号重油流出事故により海岸に漂着した重油の変異原性及び PAH 含量について, *環境化学*, 7, 553-560 (1997).
 - 8) 環境庁水質保全局監修, 財団法人国際エマエックスセンター編, 油流出事故 環境影響調査のためのガイドンス, 2000.
 - 9) 日刊スポーツ新聞, 1997年2月9日.
 - 10) Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J. P., Our stolen future, *A Plume Book*, New York, USA, 1997; 和訳 奪われし未来, 翔泳社, 東京都, 1997.
 - 11) 環境状況リスク対策検討会, 環境ホルモン 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 環境新聞社, 1997.
 - 12) Hirose, T., Morito, K., Kizu, R., Toriba, A., Hayakawa, K., Ogawa, S., Muramatsu, M., Masamune, Y., Estrogenic/antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives. *J. Health Sci.*, 47 (6), 552-558 (2001).
 - 13) Hayakawa, K., Onoda, Y., Tachikawa, C., Hosoi, S., Yoshida, M., Chung, S. W., Kizu, R., Toriba, A., Kameda, T., and Tang, N. Estrogenic/antiestrogenic activities of polycyclic aromatic hydrocarbons and their monohydroxylated derivatives by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, 53 (5), 562-570 (2007).
 - 14) Hayakawa, K., Onoda, Y., Tachikawa, C., Yoshita, M., Toriba, A., Kameda, A., Tang, N., Interaction of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogen receptor. *Polycycl. Aromat. Comp.*, 28 (4&5), 382-391 (2008).
 - 15) Suzuki, N., Hayakawa, K., Kameda, T., Toriba, A., Tang, N., Tabata, M. J., Takada, K., Kondo, T., Omori, K., Hattori, A., Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit both osteoclastic and osteoblastic activities in the teleost scales. *Life Sci.*, 84, 482-488 (2009).

中国・北京及び日本・金沢の大気が示す AhR 活性化作用への PAH 類及びダイオキシン類の寄与

戸次 加奈江¹⁾, 滝上 英孝²⁾, 鈴木 剛²⁾, 唐 寧³⁾,
鳥羽 陽³⁾, 亀田 貴之³⁾, 早川 和—³⁾

¹⁾金沢大学自然科学研究科 環境化学専攻 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

²⁾独立行政法人 国立環境研究所 循環型社会・廃棄物研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

³⁾金沢大学医薬保健研究域薬学系 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

[平成22年 9 月22日 受付, 平成22年12月24日 受理]

The Contributions of PAHs and Dioxins to Aryl Hydrocarbon Receptor Binding Activity of Airborne Particles in Beijing, China and Kanazawa, Japan

Kanae BEKKI¹⁾, Hidetaka TAKIGAMI²⁾, Go SUZUKI²⁾, Ning TANG³⁾,
Akira TORIBA³⁾, Takayuki KAMEDA³⁾ and Kazuichi HAYAKAWA³⁾

¹⁾Division of Environmental Science and Engineering,
Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University
(Kakuma, Kanazawa, Ishikawa 920-1192)

²⁾Research Center for Material Cycles and Waste Management,
National Institute for Environmental Studies
(16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506)

³⁾Division of Pharmaceutical Chemistry and Biology,
Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University
(Kakuma, Kanazawa, Ishikawa 920-1192)

[Received September 22, 2010; Accepted December 24, 2010]

Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and dioxins have several toxic properties, including mutagenicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. PAHs mainly originate from the burning of petroleum and coal, while dioxins originate mainly from waste incineration and agrochemicals. Both PAHs and dioxins have aryl hydrocarbon receptor (AhR) binding activity which is related to toxicity of PAHs and dioxins.

In this study, we evaluated AhR binding activity of airborne particles collected in Beijing, China and Kanazawa, Japan by DR-CALUX and the contribution of PAHs and dioxins to this activity. AhR binding activity of airborne particles in Beijing (1,200 ng·m⁻³) was four hundred times higher than in Kanazawa (2.7 ng·m⁻³). The composition of PAHs didn't show large difference in Beijing and Kanazawa. The contribution of the PAHs to CALUX-TEQ was higher than dioxins and especially high in Kanazawa (10.4%). These results suggest that PAHs show large contribution to the toxicity of airborne particles, and other kinds of PAH and PAH related compounds will also contribute to that toxicity. The difference of concentration and composition of these compounds result in the different level of toxicity of airborne particles in each city.

Key words: Dioxin, PAH, DR-CALUX, CALUX-TEQ

1. はじめに

多環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAH) 類やダイオキシン類は、化石燃料の使用に起因して発生する環境汚染物質の一つであり、様々な疾患との関係性が指摘されている。これ

らの毒性は、主に受容体かつ転写因子である Ah 受容体 (AhR) の活性化を介して誘導されるため¹⁾、PAH 類やダイオキシン類の毒性の強さは多くの場合 AhR の活性化ポテンシャルと相関する。AhR が活性化されると生体異物応答領域 (XRE) を介して様々な遺伝子の発現が誘導されるが、特によく知られているのは CYP1 A1 など

の薬物代謝酵素である²⁾。PAH 類は薬物代謝酵素により代謝を受け体外に排出されやすくなるが、水酸化体や酸化体など、より毒性の強い代謝産物となることがある^{3,4)}。一方、ダイオキシン類はこれら薬物代謝酵素による代謝を受けにくい、生体内に長く蓄積しやすい。

環境中にはダイオキシン類の異性体が多く存在し、各異性体により毒性が大きく異なる。そのため、ダイオキシン類が低濃度であっても、その異性体が示す毒性が高ければ、結果として健康影響は大きくなるなど、単に蓄積量だけで毒性を評価するのは難しい。この様な理由から、ダイオキシン類の毒性評価には毒性等価係数 (TEF) および毒性等量 (TEQ) の概念が用いられる。TEF はダイオキシン類の中で最も毒性の強い 2,3,7,8-TCDD を 1 とした場合の、各異性体の相対的な毒性の強さである。また TEQ は、各異性体の濃度に TEF を乗じた値の総和で、この TEQ は各異性体の毒性の強さを考慮したダイオキシン類の総量になる。現在、世界各国でこの TEQ を用いて、ダイオキシン類の耐容一日摂取量などの指標が設定されている。一方で様々な毒性の強さを持った PAH 類も環境中には無数に混在しているのにも関わらず、ダイオキシン類とは異なり代謝を受けやすいため、その毒性の強さ、毒性の種類、体内半減期などが変化しやすく、ダイオキシン類と同様の評価はされていない。しかしながら、PAH 類は大気粉塵中などにダイオキシン類と混在していること^{5,6)}、AhR の活性化を介して毒性を発揮するものが多いことなど、これらには共通の指標を用いたりリスク概念が必要であると考えられる。

これまでに、XRE 制御下で発現するルシフェラーゼにより簡便に AhR の活性化を解析することが可能である DR-CALUX (Dioxin Responsive-Chemical Activated Luciferase gene expressions) アッセイを用い、TCDD を 1 とした場合の各種 PAH 類の相対毒性値として算出した CALUX-TEF が報告されている⁷⁾。本研究では、PAH 類やダイオキシン類の含有量が異なる中国 (北京) と日本 (金沢) の 2 つの都市の大気試料を用い、DR-CALUX アッセイから大気粉塵の毒性を TCDD に対する相対値 (CALUX-TEQ) で算出した。また、都市による大気毒性の違いを明らかにするため、化学分析により都市大気粉塵中の PAH 類およびダイオキシン類の濃度・組成を調べ、WHO-TEF 及び CALUX-TEF よりそれぞれ WHO-TEQ と Theoretical-TEQ を算出し、上記の CALUX-TEQ に対する寄与を算出した。

2. 研究手法

2.1 大気粉塵試料

大気粉塵は、中国・北京 (中国科学院生態環境研究センター、5 階屋上) と日本・金沢 (金沢大学角間キャンパス自然科学研究棟、3 階ベランダ) の 2 都市において、ハイボリウムエアサンプラー (柴田科学株式会社、HV-700 F 型) を用いて、石英繊維フィルター (パルフレックスプロダクツ、2500 QAT-UP 8" × 10" in) 上に捕集した。中国・北京では春季 2008 年 3 ~ 4 月に、日本・金沢では同じ春季の 2008 年 5 ~ 6 月に、それぞれサンプリングを行った。24 時間ごとにフィルター交換をしながら 10 日間連続で粉塵捕集を行い、採取した試料は密封し、DR-CALUX アッセイ及び化学分析に供するまで -4℃ の遮光条件下で保存した。10 日間の平均粉塵濃度は中国・北京で 289 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ 、日本・金沢で 33 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ であり、北京の方が金沢よりも約 10 倍高濃度であった。

2.2 抽出及びクリーンアップ

大気粉塵を捕集した各石英繊維フィルターは、捕集面積の 1/2 を

DR-CALUX アッセイによる AhR 活性化作用の評価に、1/4 を化学分析による PAH 類とダイオキシン類の測定にそれぞれ用いた。

DR-CALUX アッセイに適用する大気粉塵捕集フィルターは、5 mm 角に細切後、ベンゼン-エタノール (3:1, V/V = 30 mL:10 mL) による超音波抽出を 2 度行った。得られた粗抽出液は、ろ紙 (東洋, No.6 直径 125 mm) およびメンブランフィルター (関東化学, HLC-DISK13 直径 13 mm 孔径 0.45 μm) で順にろ過し、エバポレーターで 1 mL に濃縮した。これを 300 μL の DMSO に転溶してアッセイに供するまで 4℃ 条件下で保存した。

PAH 類及びダイオキシン類の化学分析に適用する大気粉塵捕集フィルターはダイオキシン類分析用の公定法に従って、それぞれトルエン (300 mL) -ソックスレー抽出を行い、得られた粗抽出液を同量ずつ分取して混合したコンポジット粗抽出液を用いて化学分析を実施した。PAH 類の分析については、上記コンポジット粗抽出液にクリーンアップスパイク (和光純薬工業^株, PAH16 種の同位体化合物 ¹³C) を添加し、1 mL まで濃縮した抽出液を分析に供した。ダイオキシン類については、コンポジット粗抽出液に、クリーンアップスパイク (関東化学工業 (株), PCDDs/DFs:19 種, Co-PCBs:14 種) の同位体化合物 ¹³C) を添加後、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムによるクリーンアップを行い、次にシリンジスパイク (関東化学工業 (株), PCDDs/DFs:3 種, Co-PCBs:1 種) を添加し、分画により分析試料を調製した⁸⁾。

2.3 DR-CALUX

大気粉塵中の AhR 結合活性作用の測定は、DR-CALUX アッセイを用いた既報に従い実施した^{9,10)}。大気粉塵試料の粗抽出液の希釈溶液を細胞に 24 時間曝露し、得られたルシフェラーゼ発光量から、AhR 活性化作用を 2,3,7,8-TCDD 相当に変換した値を CALUX-TEQ とし、最終的には単位体積量あたりで算出した ($\text{pg}\cdot\text{TEQ}\cdot\text{m}^{-3}$)。

2.4 PAHs 及びダイオキシン類の濃度分析

U.S. EPA 指定の PAH16 種及びダイオキシン類の濃度分析は、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (gas chromatograph-high-resolution mass spectrometer; GC/HRMS) (Agilent Technologies HP-6890, Auto Spec-Ultima, Waters/MICROMASS) を用い、EI-SIM 法で実施した⁸⁾。PAH 類の分析において、分離カラムには DB-5MS (60 m × 0.25 mm i.d., Agilent Technologies) を用いた。カラムの温度条件は 150℃ (15℃/min) → 200℃ (8℃/min) → 300℃ (25 min), 注入口温度は 150℃ → 310℃ (100℃/min) とした。ダイオキシン類の分析には SP-2331 (60 m × 0.32 mm i.d., 0.20 μm , SPELCO) と DB-17 HT (30 m × 0.32 mm i.d., 0.15 μm , Agilent Technologies/J&W) を用いた。各カラムの温度条件は、SP-2331 では 160℃ (1 min, 6℃/min) → 220℃ (0 min, 3℃/min) → 260℃ (30 min), 注入口温度は 160℃ → 280℃ (0 min, 100℃/min), DB-17 HT では 130℃ (1 min, 20℃/min) → 200℃ (0 min, 3/min) 250℃ (0 min, 5℃/min) → 300℃ (3 min), 注入口温度は 130℃ → 310℃ (100℃/min) とした。

3. 結果および考察

3.1 AhR 結合活性

DR-CALUX アッセイを用いて両都市の大気粉塵が示す AhR 活性化作用について CALUX-TEQ 値を算出した結果、北京では 360 ~ 2,900 $\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$ (平均値: 1,200 $\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$)、金沢では 1.1 ~ 6.0 $\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$ (平均値: 2.7 $\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$) であった。北京は金沢よりも約 400 倍も高い活性値を示し、両都市間の粉塵濃度差以上に大きな差

を示した。

3. 2 PAH 濃度分析

本研究は、大気中浮遊粒子状物質に吸着した粒子状 PAH を分析の対象としたため、ハイボリュームエアサンプラーに石英繊維フィルターのみを用いたことより、主にガス態で存在する 2, 3 環の芳香族化合物については分析対象外としている¹¹⁾。

本研究では、U.S. EPA が指定する PAH16 種を分析の対象とした。PAH16 種のコンポジット粗抽出液中における大気粉塵重量あたりの濃度を Table 1 に示した。PAH16 種の濃度は、日本・金沢 (22,000 ng·g⁻¹) に比べて中国・北京 (180,000 ng·g⁻¹) は約 8 倍高かった。その中で、北京では benzo[b]fluoranthene (41,000 ng·g⁻¹) が最も高濃度であり、次に indeno[1,2,3-cd]pyrene と benzo[ghi]perylene が高い値を示した。一方、金沢で最も高濃度を示したものは benzo[b]fluoranthene (3,300 ng·g⁻¹) で、これに fluoranthene (2,900 ng·g⁻¹), indeno[1,2,3-cd]pyrene (2,700 ng·g⁻¹), pyrene (2,600 ng·g⁻¹), benzo[ghi]perylene (2,600 ng·g⁻¹) が比較的高濃度で続き、北京と金沢とは濃度に大きな差が見られたものの、組成に大きな違いは見られなかった。北京で高濃度に検出された 3 種の PAH 類は、上海やロシアのウラジオストクでも同様に高濃度検出されており、発生源は明らかでないものの共通する特定の発生源が存在する可能性がある¹²⁾。一方で、金沢において高濃度であった pyrene はディーゼルエンジンなどを発生源とする場合に高濃度検出されることが報告されていることから¹²⁾、金沢で検出された PAH 類の一部はディーゼル排ガスを発生源とすることが考えられた。

さらに本研究で得られた大気粉塵あたりの PAH16 種濃度に関して、他の都市における過去の報告と比較するため、大気量あたりに換算した。その結果、北京では 54,000 pg·m⁻³、金沢では 740 pg·m⁻³ となり、他の都市と比較すると、北京の大気中における PAH16 種は、イギリス・バーミンガム (21,000 pg·m⁻³)¹³⁾ や

ギリシャ・アテネ (3,500 pg·m⁻³)¹⁴⁾ などの欧州の都市、中国を含むアジアの他の都市、韓国 (89,300 ~ 74,300 pg·m⁻³)¹⁵⁾、天津 (239,000 ~ 540,000 pg·m⁻³)¹⁶⁾、瀋陽 (18,000 ~ 68,000 pg·m⁻³)¹⁷⁾ と比較すると同程度あるいは高い値を示したが、金沢はいずれの国、都市よりも低かった。次に、CALUX-TEF (DR-CALUX において、2,3,7,8-TCDD の活性を 1 とした場合の比活性)¹⁸⁾ を PAH 類の化学分析結果に乗じて、PAH 類による理論的な TEQ (Theoretical-TEQ) を算出した結果、北京では 26 pg·m⁻³、金沢では 0.28 pg·m⁻³ となり、北京は金沢の約 100 倍もの高値を示した。興味深いことに、北京と金沢における PAH 類の総量の差 (約 8 倍) に比べ、Theoretical-TEQ で算出した方がより差が顕著 (約 100 倍) になった。

3. 3 ダイオキシン類濃度

本研究では PCDD, PCDF, PCB の中でも特に毒性が強く、WHO-TEF が定められている 29 種類のダイオキシン類を分析の対象とした。これらダイオキシン類について、両都市の大気粉塵のコンポジット抽出液 (北京: 36.6 mg·mL⁻¹, 金沢: 6.0 mg·mL⁻¹) 中における大気粉塵重量あたりの濃度を Table 2 に示した。PCDD/Fs の総濃度については、中国・北京では 27,000 pg·g⁻¹、日本・金沢では 240 pg·g⁻¹ の結果が得られ、中国・北京の方が日本・金沢よりも 2 桁程度高い値を示した。中国・北京で高濃度を示したダイオキシン類は 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (6,600 pg·g⁻¹), OCDF (5,900 pg·g⁻¹), OCDD (2,500 pg·g⁻¹), 1,2,3,4,7,8-HxCDF (2,000 pg·g⁻¹) であり、大気粉塵中のダイオキシン類の総量における PCDFs が占める割合は 88 % と非常に高かった。一方、日本・金沢では、OCDD (12,000 pg·g⁻¹) が最も高濃度を示し、続いて 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (510 pg·g⁻¹) が高い濃度を示した。その他の異性体は 180 pg·g⁻¹ 以下、あるいは検出下限値未満であった。このように中国で PCDFs が高濃度検出された傾向は、主に自動車や産業活動における工場排ガスなどの影響や、特に北京では、燃焼温度が比較的低温である石炭由来の粉塵が多いこと¹⁹⁾ などに

Table 1 16 PAH (prioritized by the U.S. EPA) concentration and theoretical CALUX-TEQ for the six PAHs

Compounds	Ring number	CALUX-TEF(gram base) ^a EC ₅₀	Concentration (ng·g ⁻¹)		Theoretical-TEQ (pg 2,3,7,8-TCDD g ⁻¹)	
			Beijing	Kanazawa	Beijing	Kanazawa
Naphthalene	2	-	800	720	-	-
Acenaphthylene	3	-	230	< 300	-	-
Acenaphthene	3	-	59	< 300	-	-
Fluorene	3	-	380	< 300	-	-
Anthracene	3	-	730	< 300	-	-
Phenanthrene	3	-	5200	1300	-	-
Pyrene	4	-	12000	2600	-	-
Fluoranthene	4	-	13000	2900	-	-
Benz[a]anthracene	4	0.00015	12000	830	1800	120
Chrysene	4	-	16000	1600	-	-
Benzo[b]fluoranthene	5	0.0012	41000	3300	49000	4000
Benzo[k]fluoranthene	5	0.00066	11000	1200	7300	790
Benzo[a]pyrene	5	0.00032	17000	1700	5400	540
Dibenz[ah]anthracene	5	0.0013	4100	360	5300	470
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	6	0.00089	25000	2700	22000	2400
Benzo[ghi]perylene	6	-	25000	2600	-	-
Total 16 PAHs*	-	-	180000	22000	-	-
Total theoretical CALUX-TEQs*	-	-	-	-	91000	8300

^a Quoted from ref. 39)

*The total concentration means the sum of compounds that were over quantitative limit.

起因するものと考えられ²⁰⁻²²⁾、廃棄物焼却排ガスの組成とも類似する²³⁾。このように、一般に、大気中のダイオキシン類は、PCDDsよりもPCDFsの濃度が高い傾向にある²⁴⁾が、日本・金沢のダイオキシン類濃度については、OCDDが特異的に高かった。このような傾向は、近辺に焼却炉が存在する日本国内の他の都市においても報告されており、炉の燃焼状態によって、OCDDが特異的に高濃度排出されていることが推定されている²⁴⁾。

コプラナー PCBについては、中国・北京においてPCDD/Fsに比べると全体的に低濃度であった。一方、日本・金沢においては分析を行ったほとんどのPCBについて検出下限値以下であったが、PeCB#118のみ検出された。PeCB#118は、過去に日本国内で使用されていたコンデンサー等に含まれるPCB製剤中の主要異性体であり²⁵⁾、環境中に蓄積したものに由来する可能性が考えられた。

次に、これらダイオキシン類の濃度およびWHOが定めるWHO-TEFを用いて、北京および金沢の大気粉塵試料におけるWHO-TEQを算出した。Table 1に示したように、北京では0.49 pg-TEQ·m⁻³、金沢では0.021 pg-TEQ·m⁻³となった。これらの値は、日本の大気中ダイオキシン類の環境基準値(0.6 pg-TEQ·m⁻³)よりも低かった。また、これまでの報告より、中国の都市(北京:0.018~0.64 pg-TEQ·m⁻³、上海:0.0022~21 pg-TEQ·m⁻³、広州:0.057~1.3 pg-TEQ·m⁻³)²⁶⁻²⁸⁾、日本を含む他の東アジア諸国の都市(香港:0.018~0.43 pg-TEQ·m⁻³、韓国:0.018~0.43 pg-TEQ·m⁻³、台湾:0.056~0.35 pg-TEQ·m⁻³、日本:0.083~0.55 pg-TEQ·m⁻³)²⁹⁻³²⁾、欧米の都市(ギリシャ:0.04~0.12 pg-TEQ·m⁻³、マンチェスター:0.026~0.22 pg-TEQ·m⁻³、ロンドン:0.062~0.18 pg-TEQ·m⁻³、スペイン:0.01~0.36

Table 2 Dioxin concentration and WHO-TEQ in airborne particles collected from Beijing in China and Kanazawa in Japan

Compounds	WHO-TEF ^a	Concentration (pg g ⁻¹)		WHO-TEQ (pg g ⁻¹)	
		Beijing	Kanazawa	Beijing	Kanazawa
2,3,7,8-TeCDD	1	17	< 89	17	< 89
1,2,3,7,8-PeCDD	1	120	< 89	120	< 89
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	140	< 180	14	< 18
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	220	< 180	22	< 18
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	170	< 180	17	< 18
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	1200	1100	12	11
OCDD	0.0003	2500	12000	0.8	3.6
2,3,7,8-TeCDF	0.1	350	< 89	35	< 8.9
1,2,3,7,8-PeCDF	0.03	1100	< 89	33	< 2.7
2,3,4,7,8-PeCDF	0.3	350	< 89	110	< 27
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	2000	< 180	200	< 18
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	1600	< 180	160	< 18
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	200	< 180	20	< 18
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	1300	< 180	130	< 18
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.1	6600	510	660	51
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.1	1300	< 180	130	< 18
OCDF	0.0003	5900	600	1.8	0.18
TeCB #77	0.0001	190	< 180	0.019	< 0.018
TeCB #81	0.0003	21	< 180	0.0062	< 0.054
PeCB #126	0.1	240	< 180	24	< 18
HxCB #169	0.03	83	< 180	2.5	< 5.4
PeCB #123	0.00003	24	< 180	0.00073	< 0.0054
PeCB #118	0.00003	420	240	0.013	0.0072
PeCB #105	0.00003	330	< 180	0.010	< 0.0054
PeCB #114	0.00003	< 21	< 180	< 0.00063	< 0.0054
HxCB #167	0.00003	76	< 180	0.0023	< 0.0054
HxCB #156	0.00003	320	< 180	0.010	< 0.0054
HxCB #157	0.00003	110	< 180	0.0033	< 0.0054
HpCB #189	0.00003	210	< 180	0.0063	< 0.0054
Total PCDDs*	-	4400	13000	200	180
Total PCDFs*	-	21000	1100	1500	51
Total PCDD/Fs*	-	25000	14000	1700	230
Total Coplanar PCBs*	-	2000	240	27	0
Total PCDD/Fs, Coplanar PCBs*	-	27000	14000	-	-
Total WHO-TEQs *	-	-	-	1700	230

a Quoted from ref. 39)

*The total concentration means the sum of compounds that were over quantitative limit.