

pg-TEQ \cdot m $^{-3}$, ヒューストン: 0.04-0.055 pg-TEQ \cdot m $^{-3}$)³³⁻³⁷⁾と比較すると、北京の都市大気中のダイオキシン類は比較的、高い値であることがわかった。

3. 4 AhR 活性化に対する PAH 類及びダイオキシン類の寄与

AhR 活性化作用に対する PAH 類とダイオキシン類の寄与率を Table 3 に示した。3.1 で示したように、DR-CALUX アッセイを用いて北京および金沢の大気粉塵試料の毒性指標を CALUX-TEQ で示した結果、北京では 360 ~ 2,900 pg-TEQ \cdot m $^{-3}$ (平均値: 1,200 pg-TEQ \cdot m $^{-3}$)、金沢では 1.1 ~ 6.0 pg-TEQ \cdot m $^{-3}$ (平均値: 2.7 pg-TEQ \cdot m $^{-3}$) であった。この内、ダイオキシン類の指標である WHO-TEQ の寄与率は、北京では 0.05 %, 金沢では 0.07 % と、非常に低かった。一方 PAH 類の寄与率については、北京で 2.2 %, 金沢では 10.4 % となり、PAH 類はダイオキシン類よりも高い寄与を示した。PAH16 種の中では、両都市に共通して benzo[b]fluoranthene (data not shown) と indeno[1,2,3-*cd*]pyrene (data not shown) が高い寄与を示した。

3. 5 まとめ

中国・北京の大気は日本・金沢よりも高い AhR 活性化作用を示すことが明らかとなった。また、都市大気粉塵試料が示す AhR 活性化作用に対し、PAH 類はダイオキシン類と比較すると約 10 倍以上も高い寄与を示すことが明らかとなり、従来より AhR 活性化作用を示す大気汚染物質として着目されてきたダイオキシン類のみならず、PAH 類の関与も重要であることがわかった。また、大気粉塵中には、本研究で対象とした 16 種の PAH が少なくない上、大気中化学反応あるいは生体内での代謝反応によって、これらから生成したニトロ体、水酸化体、酸化体等の誘導体も数多く含まれている。これら誘導体の中には AhR 活性化作用を初めとし^{10,38)}、エストロゲン受容体などの内分泌攪乱作用³⁾や活性酸素種産生作用⁴⁾等の毒性作用を示すものがあることも明らかとなっている。以上より、各都市の AhR 活性化作用と PAH 類及びダイオキシン類の濃度・組成を考慮すると、PAH 類及び PAH 誘導体を含めた他の PAH 関連化合物の濃度・組成の差が、各都市の大気が示す AhR 活性化作用の差に影響していると考えられた。これらの化合物を対象とし、今後、解析を推進していく必要があると考えられる。

4. 結論

都市大気試料が示す AhR 活性において、中国・北京の大気は日本・金沢よりも高い AhR 活性を示した。また、ダイオキシン類よりも PAH 類の方が、寄与率が高いことが明らかとなり、特に PAH 類については、日本の大気は中国よりも高い寄与を示した。よって、AhR を介した都市大気毒性に PAH 類が大きく関与しており、測定した 16 種以外の PAH 類や PAH 誘導体を含めた PAH 関連化合物の濃度・組成の違いが、各都市大気が示す AhR 活性化作用の差に影響していると考えられた。

要約

PAH 類及びダイオキシン類は、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。両物質とも上述した毒性作用と関連性のある AhR に対する活性化作用を示す。そこで本研究では、中国・北京及び日本・金沢の大気粉塵試料(粗抽出液)を対象とし、DR-CALUX アッセイを用いた AhR 活性化作用と、大気粉塵中 PAH 類及びダイオキシン類の濃度・組成を調べることで、大気粉塵が示す AhR 活性化作用への PAH 類及びダイオキシン類の寄与と、都市による違いを明らかにすることとした。

DR-CALUX アッセイより算出した CALUX-TEQ は、北京が金沢より 400 倍も高い値を示した。また、PAH16 種及びダイオキシン類について、大気粉塵試料中の濃度を分析したところ、いずれも中国・北京の方が日本・金沢よりも高濃度であった。また、濃度・組成について、PAH 類には大きな違いが見られなかったものの、ダイオキシン類は発生源の違いなどから、両都市に大きな違いが見られた。さらに PAH 類について Theoretical-TEQ、ダイオキシン類について WHO-TEQ を算出し、大気粉塵試料の CALUX-TEQ に対する寄与を見積もったところ、PAH16 種はダイオキシン類よりも高い寄与を示した。このことから、都市大気毒性において、PAH 類はダイオキシン類よりも寄与が大きく、さらに対象とした 16 種以外の PAH 類や、PAH 誘導体を含めた他の PAH 関連化合物も AhR 活性化作用に関与しており、それらの濃度・組成の違いが、各都市大気が示す AhR 活性化作用の差に影響していると考えられた。

文献

- 1) Machala, M., Vondraek, J., Blaha, L., Ciganek, M. and Neca, J.: Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutation Research*, **497**, 49-62 (2001)
- 2) Iwanari, M., Nakajima, M., Kizu, R., Hayakawa, K. and Yokoi, T.: Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cell: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. *Arch. Toxicol.*, **76**, 287-298 (2002)
- 3) Hayakawa, K., Onoda, Y., Tachikawa, C., Hosoi, S., Yoshita, 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. *Journal of Health Sci.*, **53**, 562-570 (2007)
- 4) Motoyama, Y., Bekki, K., Chung, S.W., Tang, N., Kameda, T., Toriba, A., Taguchi, K. and Hayakawa, K.: Oxidative stress more strongly induced by ortho- than para-quinoid polycyclic aromatic hydrocarbons in A549 cells. *Journal of Health Sci.*, **55**, 845-850 (2009)
- 5) Zhang, S., Zhang, W., Wang, K., Shen, Y., Hu, L. and Wang, X.: Concentration, distribution and source apportionment of at-

Table 3 Contribution of PAHs and dioxins to the CALUX-TEQ of airborne particles

Compounds	Method	TEQ (pg \cdot m $^{-3}$)		% of CALUX-TEQ	
		Beijing	Kanazawa	Beijing	Kanazawa
Airborne particles	CALUX-TEQ	1,200	2.7	-	-
PAHs	Theoretical-TEQ	26	0.28	2.2	10.4
Dioxins	WHO-TEQ	0.49	0.021	0.050	0.074

- mospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in the southeast suburb of Beijing, China. *Environ. Monit. Assess.*, **151**, 197–207 (2009)
- 6) Li, Y., Jiang, G., Wang, Y., Cai, Z. and Zhang, Q.: Concentrations, profiles and gas-particle partitioning of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the ambient air of Beijing, China. *Atmos. Environ.*, **42**, 2037–2047 (2008)
 - 7) Behnisch, P.A., Hosoe, K. and Sakai, S.: Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environment International*, **29**, 861–877 (2003)
 - 8) 「ダイオキシン類に係る大気環境調査マニュアル」環境省 水・大気環境局 総務課ダイオキシン対策室 大気環境課 (平成20年3月)
 - 9) Takigami, H., Hosoe, K., Behnisch, P.A., Shiozaki, K., Mizukami, H., Ohno, M. and Sakai, S.: Validation study for practical bio-monitoring of waste PCB samples during their destruction treatment using DR-CALUX assay and PCB immunoassay. *Organohalogen Compd.*, **58**, 397–400 (2002)
 - 10) Bekki, K., Takigami, H., Suzuki, G., Tang, N. and Hayakawa, K.: Evaluation of toxic activities of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives using *in vitro* bioassays. *Journal of Health Sci.*, **55**, 601–610 (2009)
 - 11) Araki, Y., Tang, N., Ohno, M., Kameda, T., Toriba, A. and Hayakawa, K.: Analysis of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in gas/particle phases separately collected by a high-volume air sampler equipped with a column packed with XAD-4 resin. *Journal of Health Sci.*, **55**, 77–85 (2009)
 - 12) Tang, N., Hattori, T., Taga, R., Igarashi, K., Yang, X., Tamura, K., Kakimoto, H., Mishukov, V. F., Toriba, A., Kizu, R. and Hayakawa, K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulates and their relationship to emission sources in the Pan-Japan Sea countries. *Atmos. Environ.*, **39**, 5817–5826 (2005)
 - 13) Smith, D.J.T. and Harrison, R.M.: Concentration, trends and vehicle source profile of polynuclear aromatic hydrocarbons in the U.K. atmosphere. *Atmos. Environ.*, **30**, 2513–2525 (1996)
 - 14) Manolis, M., Manolis, T., Athanasia, T. and Euripides, G.S.: Gas-particle concentrations and distribution of aliphatic hydrocarbons, PAHs, PCBs and PCDD/Fs in the atmosphere of Athens (Greece). *Atmos. Environ.*, **36**, 4023–4035 (2002)
 - 15) Park, S.S., King, Y.J. and Kang, C.H.: Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmos. Environ.*, **36**, 2917–2924 (2002)
 - 16) Zhou, J., Wang, T., Huang, Y., Mao, T. and Zhong, N.: Size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban and suburban sites of Beijing, China. *Chemosphere*, **61**, 792–799 (2005)
 - 17) Wu, D., Deng, X., Bi, X., Li, F., Tan, H. and Liao, G.: Study on the visibility reduction caused by atmospheric haze in Guangzhou area. *Journal of Tropical Meteorology*, **13**, 77–80 (2006a)
 - 18) Van den Berg, M., Bimbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunstom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J. C., Rolaf van Leeuwen, F. X., Djien Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tilliott, D., Tysklind, M., Younes, M., Warm, F. and Zacharewski, T.: Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.*, **106**, 775–792 (1998)
 - 19) Lee, R.G.M., Coleman, P., Jones, J.L., Jones, K.C. and Lohmann, R.: Emission factors and importance of PCDD/Fs, PCBs, PCNs, PAHs and PM10 from the domestic burning of coal and wood in the U. K. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 1436–1447 (2005)
 - 20) Lohmann, R. and Jones, K.C.: Dioxins and furans in air and deposition, a review of levels, behaviour and processes. *Sci. Total Environ.*, **219**, 53–81 (1998)
 - 21) Callen, M.S., de la Cruz, M.T., Lopez, J.M., Murillo, R., Navarro, M.V. and Mastral, A.M.: Some inferences on the mechanism of atmospheric gas/particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) at Zaragoza (Spain). *Chemosphere*, **73**, 1357–1365 (2008)
 - 22) 橋本俊次 (代表者): ダイオキシン類による地域環境汚染実態とその原因解明に関する研究, 環境省地域密着共同研究報告書, 9–12 (2005)
 - 23) 佐々木裕子, 飯村文成, 津久井公昭, 吉岡秀俊, 東野和雄, 安藤晴夫, 柏木宣久: 東京湾におけるダイオキシン類汚染 (2) –組成検討–, 第10回環境化学討論会講演要旨集, 272–273 (2001)
 - 24) 佐々木啓行, 吉岡秀俊, 飯村文成, 山本 央, 阿部圭恵, 橋本俊次, 佐々木裕子: 東京都内大気中のダイオキシン類濃度についての考察, 東京都環境科学研究所年報, 108–114 (2005)
 - 25) Ishikawa, Y., Noma, Y., Mori, Y. and Sakai, S.: Congener profiles of PCB and a proposed new set of indicator congeners. *Chemosphere*, **67**, 1838–1851 (2007)
 - 26) Li, Y.M., Jiang, G.B., Wang, Y.W., Cai, Z.W. and Zhang, Q.H.: Concentrations, profiles and gas-particle partitioning of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the ambient air of Beijing, China. *Atmos. Environ.*, **42**, 2037–2047 (2008)
 - 27) Yu, L.P., Mai, B.X., Meng, X.Z., Bi, X.H., Sheng, G.Y., Fu, J.M. and Peng, P.A.: Particle-bound polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the atmosphere of Guangzhou, China. *Atmos. Environ.*, **40**, 96–108 (2006)
 - 28) Li, H.R., Feng, J.L., Sheng, G.Y., Lu, S.L., Fu, J.M., Peng, P.A. and Man, R.: The PCDD/F and PBDD/F pollution in the ambient atmosphere of Shanghai, China. *Chemosphere*, **70**, 576–583 (2008)
 - 29) Sin, D.W.M., Choi, J.Y.Y. and Louie, P.K.K.: A study of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the atmosphere of Hong Kong. *Chemosphere*, **47**, 647–653 (2002)
 - 30) Chang M.B., Weng Y.M., Lee T.Y., Chen Y.W., Chang S.H. and Chi K.H.: Sampling and analysis of ambient dioxins in Northern Taiwan. *Chemosphere*, **51**, 1103–1110 (2003)
 - 31) Park, J.S. and Kim, J.G.: Regional measurements of PCDD/PCDF concentrations in Korean atmosphere and comparison with gas-particle partitioning models. *Chemosphere*, **49**, 755–764 (2002)
 - 32) Government of Japan. Information Brochure Dioxins, 2005. <http://www.env.go.jp/en/chemi/dioxins/brochure2005.pdf>
 - 33) Kouimtzis, T.H., Samara, C., Voutsas, D., Balafoutis, C.H. and Müller, L.: PCDD/Fs and PCBs in air borne particulate matter of the greater Thessaloniki area, N. Greece. *Chemosphere*, **47**, 193–205 (2002)
 - 34) Lohmann, R., Harner, T., Thomas, G.O. and Jones, K.C.: A comparative study of the gas-particle partitioning of PCDD/Fs, PCBs

- and PAH. *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 4943-4951 (2000)
- 35) Abad, E., Martínez, K., Gustems, L., Gómez, R., Guinart, X., Hernández, I. and Rivera, J.: Ten years measuring PCDDs/PCDFs in ambient air of Catalonia (Spain). *Chemosphere*, **67**, 1709-1714 (2007)
- 36) Menichini, E., Iacovella, N., Monfredini, F. and Turrio-Baldassarri, L.: Atmospheric pollution by PAHs, PCDD/Fs and PCBs simultaneously collected at a regional background site in central Italy and at an urban site in Rome. *Chemosphere*, **69**, 422-434 (2007)
- 37) Correa, O., Rifai, H., Raun, L., Suarez, M. and Koenig, L.: Concentrations and vapor-particle partitioning of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in ambient air of Houston, TX. *Atmos. Environ.*, **38**, 6687-6699 (2004)
- 38) Ciganek, M., Neca, J., Adamec, V., Janosek, J. and Machala, M.: A combined chemical and bioassay analysis of traffic-emitted polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total Environ.*, **334**, 141-148 (2004)
- 39) Martin, V.B., Linda, S.B., Michael D., Mike D.V., William, F., Mark F., Heidelore, F., Helen, H., Annika, H., Laurie, H., Martin, R., Stephen, S., Dieter, S., Tohyama, C., Angelika, T., Jouko, T., Mats T., Nigel W. and Richard, E.P.: The 2005 world health organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Advance Access publication*, **93**, 223-241 (2006)

— 原 著 —

日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの観測

— 濃度レベルの把握と発生要因の検討 —

片山 裕規¹, 後藤 知子², 亀田 貴之^{3*}, 唐 寧³, 松木 篤⁴, 鳥羽 陽³, 早川 和一³Determination of particle-associated PAH-quinone in Japan and China:
study of the concentration levels and the occurrence processesYuki Katayama¹, Tomoko Goto², Takayuki Kameda^{3*}, Ning Tang³,
Atsushi Matsuki⁴, Akira Toriba³, Kazuichi Hayakawa³

1 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University,

2 Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University,

3 Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University,

4 Frontier Science Organization, Kanazawa University

Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan

*Corresponding author: (E-mail) kameda@p.kanazawa-u.ac.jp

Selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), nitrated PAH, and quinoid PAH (PAH-quinone) in airborne particles were simultaneously determined at Beijing, China, Osaka, Japan, and Wajima, Japan. The concentration of particle-associated 1,2-benzanthraquinone (benz[*a*]anthracene-7,12-dione; BAQ), a quinoid PAH, at Beijing was higher than that at Osaka and Wajima by factors of 35 and 200, respectively. Strong correlations between the BAQ and 2-nitropyrene concentrations in the summer and between the BAQ and 1-nitropyrene concentrations in the winter imply that atmospheric secondary reactions and primary emissions significantly contribute to the occurrence of atmospheric BAQ in the summer and winter, respectively. The concentration ratios of BAQ to benz[*k*]fluoranthene (BkF) in the summer were lower than those in the winter due to the instability of BAQ under sunlight. The BAQ/BkF ratio at Beijing in the Asian dust season was significantly higher than that in the regular spring season, suggesting that the secondary formation of BAQ is promoted by catalytic effects on the Asian dust surface.

Key words : Quinoid Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Atmospheric Secondary Formation, Asian Dust, East Asia

1. はじめに

今日我々を取り巻く環境中には、自然由来あるいは人為起源の多種多様な化合物が存在している。大気中には多環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PAH) やニトロ化多環芳香族炭化水素 (Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; NPAH) の存在が確認されており、これらの一部は強い発癌性、変異原性をもつことが知られている (IARC, 1989)。一方、PAHの酸化誘導体であるPAHキノンは、生体内でスーパーオキシドラジカル、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素種生成能を有し、細胞内で酸化ストレスを誘導することが知られている (Kishikawa et al., 2008; Sugimoto et al., 2005; Motoyama et al., 2009)。過度の酸化ストレスは、DNA損傷やタンパク質の酸化を起こし、がん、糖尿病、老化など人体に様々な障害を引き起こす要因の一つと考えられている (Hirano et al., 2003; Li et al., 2003; Finkel and Holbrook, 2000)。また、1,4-naphthoquinone が上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性化を介して気管支収縮作用を示すことや (Sumi and Kumagai, 2007)、9,10-phenanthrenequinone がアレルギー特異的

抗体の生成を増加させ気道炎症悪化作用を示す (Hiyoshi et al., 2005) ことなど、一部のPAHキノンが呼吸器・循環器系疾患やアレルギー性疾患に対して増悪作用をもたらすことも報告されている。

大気中PAHキノンの発生過程は、ディーゼル燃料燃焼など一次発生源からの直接排出 (一次生成) と、光やラジカル種の存在下でPAH類が酸化することによってできる二次生成に大別できる。例えば、ディーゼル燃料およびガソリンの燃焼排気から1,4-naphthoquinone、9,10-phenanthrenequinone、9,10-anthraquinone など9種のPAHキノンが検出されており (Jakober et al., 2007)、これは実大気中のPAHキノンが一部一次発生源に由来していることを示唆している。一方で、さまざまな条件下において、PAHを原料物質としたPAHキノンの生成が実験的に検証されており、PAHキノンがPAHの光およびオゾン酸化反応で生成すること、あるいはPAHのOHまたはNO₃ラジカル開始反応で生成することが報告されている (Shen et al., 2007; Fiorelli and Arce, 2005; Pal and Sharon, 2000; Fatiadi, 1967; Barbas et al., 1996; Wang et al., 2007)。また、

PAH キノンの大気内二次生成を観測により実証しようとする試みもなされている。例えば, Eiguren-Fernandez et al. (2008) は Los Angeles 沿岸部から内陸部への気塊の軌道に沿った地点で観測を行い, 9,10-phenanthrenequinone が大気中を移送中に phenanthrene から二次生成されることを報告している。

近年いくつかのグループにより PAH キノンの新規測定法開発が試みられているが (Cho et al., 2004; Ahmed et al., 2006; Lintelmann et al., 2006; Kishikawa et al., 2008), PAH キノンの実大気中濃度を測定した例は, 親化合物である PAH の測定例に比べて極めて少ない。とりわけ PAH キノンと, PAH や他のガス状汚染物質濃度等を包括的に測定・解析した例はほとんどないことから, その実大気内における動態についての知見はほとんど得られていないといつて良い。また, これまでに報告された大気中 PAH キノン濃度は主に欧米諸国における観測結果であり, 日本をはじめアジア地域における測定例は極めて少ない。例えば, 中国の都市部では大気中 PAH 濃度が日本の都市の数十倍も高いなど大気汚染の状況は深刻であるが (Tang et al., 2005), これらの地域における PAH キノンを測定した報告はない。そこで本研究では, 日本および近年大気汚染の著しい中国における大気中 PAH キノン濃度レベルを把握すること, さらに大気内動態を解明するための基礎的なデータを得ることを目的とし, 実大気中 PAH キノンの観測ならびに光やオゾンによる PAH の酸化反応による PAH キノンの生成を実験的に検討した。

2. 実験

2.1 全浮遊粒子状物質 (TSP) のサンプリング

TSP は, 幹線道路付近 (松ノ浜交差点; 大阪府泉大津市, 捕集期間: 2002年12月10日~11日 (冬, n=10), 2003年7月2日~3日 (夏, n=9)), 一般住宅地 (大阪府立大学; 大阪府堺市, 捕集期間: 2001年9月3日~4日 (夏, n=8), 2001年11月26日~27日 (冬, n=8)), 遠隔地 (金沢大学輪島大気観測ステーション; 石川県輪島市, 捕集期間: 2009年8月6日~9月3日 (夏, n=4), 2009年11月24日~12月29日 (冬, n=5)), 及び中国都市部 (中国科学院生態環境研究センター; 北京市, 捕集期間: 2008年3月17日~21日 (北京に大規模な黄砂が観測された黄砂期, n=4), 2009年3月9日~4月28日 (春, n=25), 2009年7月17日~9月26日 (夏, n=22), 2009年11月25日~12月4日 (冬, n=5)) の4ヶ所で, それぞれの期間にハイボリュウムエアースンプラー (Model 123, 紀本電子工業㈱) を用いて石英繊維フィルター (QR100, ADVANTEC) 上に捕集した。幹線道路付近ならびに一般住宅地でのサンプリングは, 連続した24~30時間の間に3時間毎に行った。遠隔地におけるサンプリングでは7日毎に, 中国都市部におけるサンプリングでは2日あるいは3日毎にフィルター交換を行なった。また中国都市部の冬および遠隔地のみ, アンダーセン式ハイボリュウムエアースンプラー (AH-600F, 柴田科学㈱) を用いて粒径を5段階 (<1.1 μm ,

1.1~2.0 μm , 2.0~3.3 μm , 3.3~7.0 μm , >7.0 μm) に分け粒子を捕集した。各段階の試料は個別に分析し, それらを各捕集期間毎にあわせて TSP 中濃度とし解析に用いた。

2.2 燃焼起源粒子のサンプリング

2.2.1 石炭燃焼排気粒子 (CEP) のサンプリング

家庭用石炭ストーブを用いて中国産石炭を燃焼させ, 煙突 (約4 m) 出口より上方50 cm 付近に吸引口を設置し, CEP をハイボリュウムエアースンプラー (Model 123, 紀本電子工業㈱) を用いて1000 L/min で吸引し, 2~3分毎に石英繊維フィルター (2500QAT-UP, PALLFLEX) 上に捕集した。

2.2.2 ディーゼル燃料燃焼排気粒子 (DEP) のサンプリング

DEP は既報 (Kameda et al., 2007) に従い, ディーゼルエンジン搭載車 (日産自動車製 Civilian U-BW40, 1994年製, エンジン形式: ED-35 ディーゼルエンジン, 総排気量: 3465 cc, 走行距離: 1800 km, 燃焼排気にかかわる触媒: なし) をエンジン回転数制御下のアイドリング状態 (1700 rpm) で稼働させることにより得た。エンジンスタートから十分に時間が経過した後, 容積約25 m³ の遮光されたチャンバー内に, 換気を行いながらディーゼル燃料燃焼排気を導入し, 環境大気により希釈した。環境大気中の NO_x (= NO + NO₂) および CO 濃度はチャンバー内における濃度の2%未満であり, 希釈ガスとして用いても問題ないと判断した。チャンバー内の CO および NO_x 濃度を監視し, これらの濃度が燃焼排気流入と換気による排出のつり合いにより定常状態となった後に粒子状物質の捕集を開始した。粒子状物質はハイボリュウムエアースンプラー (Model 120, 紀本電子工業㈱) を用いて石英繊維フィルター (QR100, ADVANTEC) 上に捕集した。捕集時の空気吸引流量は900 L/min とし, フィルター表面での二次生成を避けるために5分ごとにフィルターを交換した。

2.3 粒子試料からの可溶性有機画分の抽出

フィルター適量を細切し, ジクロロメタンで20分間超音波抽出を行い, 得られた抽出液をフィルターろ過してエバポレータで4~5 mL まで減容した。抽出液をメンブランフィルターでろ過した後, ろ液にジメチルスルホキシド (DMSO) 100 μL を加えてジクロロメタンを窒素気流下で留去し, アセトニトリル400 μL を加え HPLC 分析に供した。

2.4 PAH キノン, PAH, NPAH 測定

本研究では粒子状物質のみを捕集対象としたため, 蒸気圧が低く気相への分配が極めて小さい (Albinet et al., 2008) 1,2-benzanthraquinone (benz[a]anthracene-7,12-dione; BAQ) を測定対象 PAH キノンとした。同様の理由で, 気相への分配なるべく考慮せずすむ (Yamasaki et al., 1982) benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP) を測定対象 PAH とし, 参照として BAQ

の親PAHであるbenz[*a*]anthracene (BaA)ならびにBaAの異性体であるChrysene (Chr)も測定した。一部の試料についてはNPAH (1-nitropyrene; 1-NP, 2-nitropyrene; 2-NP, 2-nitrofluoranthene; 2-NF)の濃度も測定し、解析に用いた。BAQの濃度は、既報 (Kameda et al., 2009a) に従いインライン還元-蛍光検出 HPLC 法により測定した。PAHならびにNPAHの測定には、蛍光検出 HPLC および化学発光検出 HPLC をそれぞれ用いた。PAH, NPAH および BAQ の標準試薬は Sigma-Aldrich Co あるいは Chiron AS より入手した。

2.5 粒子表面を反応場としたBAQの生成反応実験

2.5.1 粒子へのBaA担持

土壌粒子は、中国敦煌市の市街地から約 100 km 離れた砂漠地帯において、深さ約 10 cm のところから採取し、ふるいにかけて粒径 38 μ m 以下の粒子のみを集めて 180°C で 2 時間の乾熱滅菌処理後、実験に供した。BET 比表面積は 18.16 m^2/g 、平均粒径は 21.53 μ m であった。グラファイト粒子 (BET 比表面積: 19.57 m^2/g , 平均粒径: 13.65 μ m) およびテフロン粒子 (PTFE, TLP-10F-1, BET 比表面積: 11.79 m^2/g , 平均粒径: 0.33 μ m) は、関東化学株式会社および三井デュポンフロケミカル株式会社よりそれぞれ入手した。各々の粒子 200 mg をナスフラスコに量りとり、20 μ M BaA (ジクロロメタン溶液) 10 mL を加えたのち、ふたを閉めよく混和した。溶媒はロータリーエ

バポレーターを用いて乾固させ、残った粒子をマイクロスピナルで回収し、反応用試料とした。BaA 添加量はすべての粒子において初期 BaA 濃度が 1 nmol/mg-粒子 (粒子表面積に対する理論上の BaA 被覆率 < 5%) となるように調節した。

2.5.2 粒子上 BaA への光照射反応

BaA を担持させた粒子 10 mg をシャーレ (内径 1.9 cm, 深さ 1.2 cm) に量りとり、これを純空気流通下においてブラックライトランプ (FL20S-BLB, 20W, TOSHIBA) 4 本を取り付けたバイレックス製の光照射装置内に静置し (シャーレ位置における紫外線強度: 約 600 μ W/cm²)、0–3 時間紫外線を照射した (n=3)。照射した紫外線強度は UV LIGHT METER UV-340 (CUSTOM) で測定した。反応後の粒子から生成物を以下に示す手順で抽出・濃縮した。まず粒子を擁するシャーレを内容積 50 mL のバイアル容器内に入れ、30 mL のジクロロメタンで 20 分間超音波抽出を行った。抽出液は 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、DMSO 100 μ L を添加したのち窒素気流下でジクロロメタンを留去後、アセトニトリル 400 μ L を加え、HPLC 分析に供した。

2.5.3 粒子上 BaA とオゾンとの反応

BaA を担持させた粒子 10 mg をシャーレに量りとりバイレックス製反応容器内に静置し、0–3 時間オゾンとの反応を行

Table 1 Concentrations of BAQ, selected PAHs, and NPAHs in CEP (Coal Exhaust Particles), DEP (Diesel Exhaust Particles), and ambient airborne particles collected in Beijing, Osaka and Wajima.

Compound	CEP		DEP		Beijing							
	Mean (n=3)	Range	Mean (n=4)	Range	Asian dust period		Spring		Summer		Winter	
					Mean (n=4)	Range	Mean (n=25)	Range	Mean (n=22)	Range	Mean (n=5)	Range
BAQ	2.1 ^a	0.09-3.2 ^a	0.39 ^a	0.32-0.48 ^a	32 ^b	24-37 ^b	12 ^b	4.6-35 ^b	4.8 ^b	1.5-8.0 ^b	101 ^b	66-134 ^b
PAHs												
Chr	4.6 ^a	0.06-9.0 ^a	0.32 ^a	0.26-0.37 ^a	28 ^b	21-33 ^b	20 ^b	5.5-92 ^b	5.5 ^b	1.6-11 ^b	112 ^b	88-136 ^b
BaA	1.0 ^a	0.04-1.6 ^a	0.16 ^a	0.12-0.19 ^a	18 ^b	14-20 ^b	11 ^b	2.3-64 ^b	2.5 ^b	0.71-5.9 ^b	77 ^b	62-98 ^b
BbF	1.5 ^a	0.06-2.5 ^a	0.26 ^a	0.21-0.30 ^a	36 ^b	28-46 ^b	28 ^b	6.0-131 ^b	13 ^b	3.0-25 ^b	139 ^b	101-191 ^b
BkF	0.64 ^a	0.03-1.1 ^a	0.09 ^a	0.07-0.10 ^a	11 ^b	8.3-14 ^b	8.7 ^b	2.1-37 ^b	4.1 ^b	0.92-8.2 ^b	42 ^b	30-58 ^b
BaP	1.3 ^a	0.04-2.1 ^a	0.18 ^a	0.14-0.21 ^a	19 ^b	14-23 ^b	12 ^b	2.9-63 ^b	3.6 ^b	1.2-7.5 ^b	73 ^b	54-95 ^b
Nitro-PAHs												
1-NP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
2-NF	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
2-NP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Particles ^c	N.A.	N.A.	2.3	1.9-2.8	717	300-1068	416	186-808	222	84-400	193	142-243
BAQ/BkF	3.3	2.9-4.0	4.4	4.0-4.7	2.9	2.6-3.6	1.7	0.55-3.4	1.5	0.45-3.6	2.4	2.0-3.0

Compound	Osaka				Wajima							
	Roadside		Residential area		Summer		Winter					
	Mean (n=9)	Range	Mean (n=10)	Range	Mean (n=8)	Range	Mean (n=8)	Range				
BAQ ^b	4.0	2.1-5.7	14	4.7-27	1.2	0.34-1.9	2.8	0.99-5.5	0.06	0.05-0.09	0.53	0.23-1.2
PAHs ^b												
Chr	7.3	3.2-13	8.0	4.6-21	1.1	0.40-1.9	3.8	1.0-7.8	0.07	0.04-0.10	0.23	0.11-0.56
BaA	3.2	1.0-5.6	3.4	1.8-9.5	0.38	0.17-0.67	1.9	0.28-4.9	0.02	0.01-0.03	0.09	0.04-0.22
BbF	7.9	3.6-16	8.5	4.3-19	2.2	0.89-3.7	4.6	1.1-8.6	0.09	0.07-0.13	0.34	0.15-0.78
BkF	2.6	1.3-4.4	4.6	1.8-8.6	0.72	0.29-1.2	1.8	0.35-3.4	0.03	0.03-0.04	0.11	0.05-0.24
BaP	2.8	1.4-4.2	8.3	2.4-33	0.82	0.26-1.6	1.6	0.41-3.4	0.06	0.04-0.07	0.14	0.06-0.29
Nitro-PAHs ^d												
1-NP	106	43-197	235	50-363	125	57-190	27	9.1-48	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
2-NF	289	72-647	44	21-84	195	63-423	46	15-87	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
2-NP	50	17-116	20	4.6-53	13	3.9-35	8.3	2.7-26	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Particles ^c	68	42-119	123	46-182	35	15-52	24	15-30	9.5	8.6-11	8.3	3.6-17
BAQ/BkF	1.7	0.93-3.0	3.1	2.3-4.9	1.7	0.93-3.0	1.9	0.92-2.2	1.8	1.6-2.1	4.8	4.3-5.3

N.A.: not available, ^a Given in units of nmol mg⁻¹, ^b Given in units of pmol m⁻³, ^c Given in units of μ g m⁻³, ^d Given in units of fmol m⁻³

Table 2 Correlation coefficients among BAQ, BkF, 2-NP, 2-NF and 1-NP.

	(a) Summer and Winter					(b) Summer					(c) Winter				
	BAQ	BkF	2-NP	2-NF	1-NP	BAQ	BkF	2-NP	2-NF	1-NP	BAQ	BkF	2-NP	2-NF	1-NP
BAQ	1.00					1.00					1.00				
BkF	0.88 **	1.00				0.85 **	1.00				0.89 **	1.00			
2-NP	-0.01	0.17	1.00			0.71 **	0.72 **	1.00			0.20	0.24	1.00		
2-NF	-0.25	-0.12	0.77 **	1.00		0.41	0.40	0.83 **	1.00		0.23	0.33	0.13	1.00	
1-NP	0.73 **	0.69 **	0.15	-0.03	1.00	0.21	0.40	0.08	0.17	1.00	0.82 **	0.76 **	0.48 *	0.20	1.00

* p < 0.05, ** p < 0.01

った (n = 3)。オゾン発生装置を用いて工業用酸素から生成させ、窒素を希釈ガスとして 3 ppmv の濃度で反応容器内へ連続的に供給した。反応容器内のオゾン濃度はオゾン濃度計 (MODEL 1200, DYLEC) を用いてモニターした。反応後の粒子は 2.5.2 と同様の手順で抽出・濃縮処理を施し、HPLC 分析に供した。

3. 結果と考察

3.1 実大気粒子ならびに燃焼排気粒子の分析

北京、大阪 (住宅地および幹線道路付近)、輪島の 4 地点で捕集した大気粒子および、燃焼排気粒子 (DEP, CEP) 中の平均 BAQ, PAH, NPAH 濃度を Table 1 に示した。大阪における試料捕集は 2001 年~2003 年に行われており、輪島および北京の捕集時期とは最大 8 年間の隔りがあるが、2008 年度に大阪府堺市の一般環境測定局 (浜寺局および若松台局) で 1 年間に渡って測定された BaP の平均濃度 (それぞれ 1.3 pmol/m³ および 0.9 pmol/m³; 堺市環境保全部, 2009) は、本研究で 2001 年に観測された濃度と同程度であったことから、観測地点における PAH 類濃度の経年変化は地点間の濃度比較に影響を与えないと判断した。地点ごとに比較すると、BAQ 濃度は北京 > 大阪 (幹線道路) > 大阪 (住宅地) > 輪島の順に高く、最も高かった北京の冬の BAQ 平均濃度は 101 pmol/m³ であり、輪島の冬の BAQ 平均濃度 0.53 pmol/m³ より約 200 倍も高いことが分かった。また、大阪の幹線道路付近における冬の BAQ 平均濃度 14 pmol/m³ と比較しても、北京の冬の BAQ 平均濃度は 7 倍以上高いことが分かった。他国の冬季における BAQ 濃度は例えば、フランスの rural site である Sollières で 0.1 - 11.7 pmol/m³ (Albinet et al., 2006), カリフォルニアで 3.9 ± 2.7 pmol/m³ (Chung et al., 2006), アテネ市街地で 0.93 ± 2.2 pmol/m³ (Andreou and Rapsomanikis, 2009) と報告されており、これらと比較しても北京の BAQ 濃度は極めて高いと言える。捕集期間ごとにその濃度を比較すると、北京における大気中 BAQ 濃度は、冬 (101 pmol/m³) > 黄砂イベント時 (32 pmol/m³) > 春 (12 pmol/m³) > 夏 (4.8 pmol/m³) の順に高く、同時に測定した PAH 濃度にも同様の大小関係が認められた。さらに大阪や輪島においても、大気中 BAQ および PAH 濃度は夏季よりも冬季のほうが高いという結果が得られた。この結果は、これまでに報告されている大気中 PAH 類濃度の季節変動の傾向とも一致していた (Sierra, 2006; Schnelle-Kreis et al., 2005)。

次に 3 時間毎の平均濃度が得られている大阪の試料の分析結果から、BAQ, NPAH および PAH 濃度間の相関を調べた。Table 2 に BAQ と、代表的な燃焼由来 (一次生成) PAH 類である BkF および 1-NP, さらに代表的な二次生成 NPAH である 2-NP および 2-NF との相関係数を示した。BkF は工場、自動車、暖房など様々な燃焼排出源に由来することが報告されている (Miguel et al., 1998; Tang et al., 2005)。一方 1-NP は比較的高温な燃焼条件の下で多く発生し、国内における主要な発生源はディーゼル燃料の燃焼であると言われている (Tang et al., 2005)。また 2-NP は主に OH ラジカルの開始反応により大気内で二次生成することが知られている (Atkinson and Arey, 1994)。OH ラジカルは大気中の光化学反応によって生成する短寿命の活性種であり、夜間の濃度はほぼゼロとなる。したがって 2-NP の生成は主に日中に起こると考えられる。一方 2-NF は OH ラジカルのほか、夜間に濃度が上昇する NO₃ ラジカルの開始反応によっても生成するため、日中だけでな

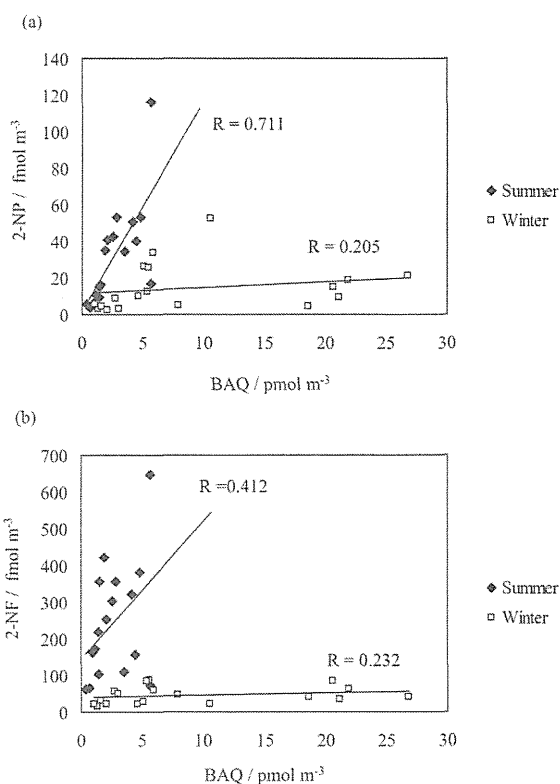


Fig. 1 Scatter plots between BAQ and 2-NP (a), and 2-NF (b).

く夜間においても二次生成される (Atkinson and Arey, 1994)。いずれの二次生成NPAHも燃焼起源粒子中からの検出報告はない。夏と冬の結果を合わせ、各化合物間の相関係数を求めると、BAQとBkF、およびBAQと1-NPとの間にはそれぞれ0.88および0.73と、高い値が得られた (Table 2 (a))。一方でBAQと2-NPおよび2-NFとの間の相関係数はそれぞれ-0.01、-0.25と非常に低いことから、BAQの大気内動態は燃焼起源からの直接排出と強い関連があるように見受けられる。しかし、BAQと2-NP、およびBAQと2-NF濃度間の散布図を描いてみると、それらの間の関係は夏と冬で大きく異なっていることが見てとれた (Fig. 1)。そこで得られた各化合物の濃度を夏と冬で分類し、それぞれの季節における化合物間の相関係数を求めたところ、Table 2 (b), (c) に示すようになった。夏はBAQと2-NPとの間に強い相関 ($r=0.71$) がみられた。一方、1-NPとの間には有意な相関が認められなかった。2-NPが光化学的な反応を経て生成することから、BAQの生成にも大気中の光化学反応が深く関与していることが示唆される。また1-NPとの相関は認められないものの、燃焼起源PAHであるBkFとの相関係数は0.85と高いことから、BAQの発生には発生源からの直接排出も少なからず寄与しているものと推察される。冬はBAQと2-NPおよび2-NFとの間の相関係数は0.20、0.23と低く、一方1-NPとの間には $r=0.82$ と強い相関が認められた。太陽光強度の低い冬には二次生成の寄与が相対的に小さくなり、一次生成、とりわけディーゼル排ガスの影響が強く現れたものと考えられる。以上の解析結果から、大気中BAQの発生源として、冬は一次生成、夏は二次生成の寄与が大きいことが推察された。

異なるPAH間の濃度比は、それらの発生源や大気内動態を解析するために有用な情報を与えることがある。例えばYunker et al. (2002) は、試料中のfluoranthene/(fluoranthene + pyrene) 濃度比が0.4–0.5の場合は石油燃焼、 >0.5 の場合は草や木材、石炭燃焼起源である可能性が高いこと、BaA/(BaA + Chr) > 0.35 の場合は石油や石炭などの燃焼起源である可能性が高いことなどを報告している。またTang et al. (2005) も、モニタリングPAHとその母核のPAHとの濃度組成比の比較が、粒子の発生源推定のための有用な指標であることを報告している。しかし、PAHキノンとPAHの濃度比がそれらの一次発生源推定の指標として有用であるか否かは明らかでない。そこで、本研究ではBAQとPAHとの比を観測地点間で比較し、その差異と発生源との関連について検討した。ここで用いるPAHは、化学的変化に対して安定なものが都合がよい。また気相への分配を考慮する必要のない高分子量のPAHが適している。BAQの親化合物であるBaAは光に対してあまり安定ではなく (Niu et al., 2007; Cvrčková and Ciganek, 2005)、また気-固の分配が温度に依存して大きく変化することが知られている (Yamasaki et al., 1982)。そこで比較的化学的に安定で、気相への分配がほとんどないBkFを採用した。求めたBAQ/BkF比を地点ごとに比較した結果をFig. 2に示す。

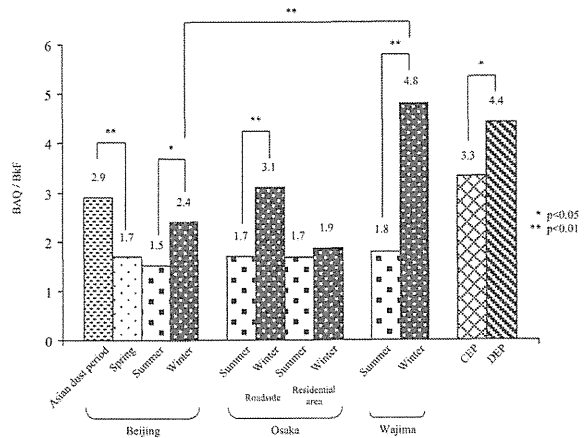


Fig. 2 Comparison of BAQ/BkF ratio among the different sampling periods in each sampling site.

各地点の冬のBAQ/BkF比は、北京で2.4、大阪の幹線道路付近で3.1、大阪の住宅地で1.9、輪島で4.8となり、輪島を除き中国と日本における濃度比に有意差は認められなかった。北京の主要エネルギー源は石炭であり、特に冬の暖房期には高濃度の大气汚染物質排出の一因となっている。一方、日本の主要な大气汚染源はディーゼル車等の自動車である。これらの事実から、BAQの一次発生源も二国間で異なることが予想される。Tang et al. (2005) は上記のNPAH/PAH濃度比がCEP中に比べてDEP中で著しく高いこと、中国と日本で捕集される大气粒子中のNPAH/PAH比は、それぞれの国における粒子の主要発生源の違いを反映して、日本における値が中国のそれより高くなることを見出している。そこで本研究でも同様に、CEPおよびDEP中のBAQ/BkF比を調べた結果、CEP中において3.3、DEP中において4.4と、両者の間の差は顕著には認められなかった。日本と中国における大气粒子中BAQ/BkF濃度比に差異が認められなかったのは、これらの比が発生源の違いを反映し難かったためと考えられる。

また、各地点における夏季と冬季のBAQ/BkF比を比較すると北京において冬(2.4) $>$ 夏(1.5)、大阪の幹線道路付近において冬(3.1) $>$ 夏(1.7)、住宅地において冬(1.9) $>$ 夏(1.7)、輪島において冬(4.8) $>$ 夏(1.8)となり、住宅地においては有意差が認められなかったものの、いずれの地点においても、BAQ/BkF比は冬季よりも夏季のほうが小さいという傾向がみられた。BAQおよびBkFの光分解速度定数(k_{BAQ} , k_{BkF})の大小関係は $k_{BAQ} > k_{BkF}$ であることが明らかになっている (Kameda et al., 2009b)。光分解速度定数の大きさは光の強度に比例することから、太陽光強度の強い夏季においては大気中BAQの光分解がより顕著に進行し、BAQ/BkF比が低くなったものと推察される。以上より、夏季のBAQ濃度が低い理由のひとつとして光分解の影響が示唆されるが、このことは「夏季のBAQ生成過程に占める二次生成の「寄与」が大きい」という先の結論を否定するものではない。一方で、北京において大規模な黄砂が観測された期間 (BAQ/BkF = 2.9) には、同じ春季であっても黄砂のほとんど観測されな

った期間 (BAQ/BkF = 1.7) と比べて有意に高い BAQ/BkF 比が得られた。このことより、北京の黄砂イベント時においては、黄砂粒子表面上で新たに BAQ が生成していたことが疑われる。

3.2 BAQ の生成反応実験

3.1 の結果を受け、黄砂粒子表面上における BAQ 二次生成に関する仮説を検証するために、主要な大気内生成過程と推測される光反応、およびオゾンとの反応による BaA の酸化反応

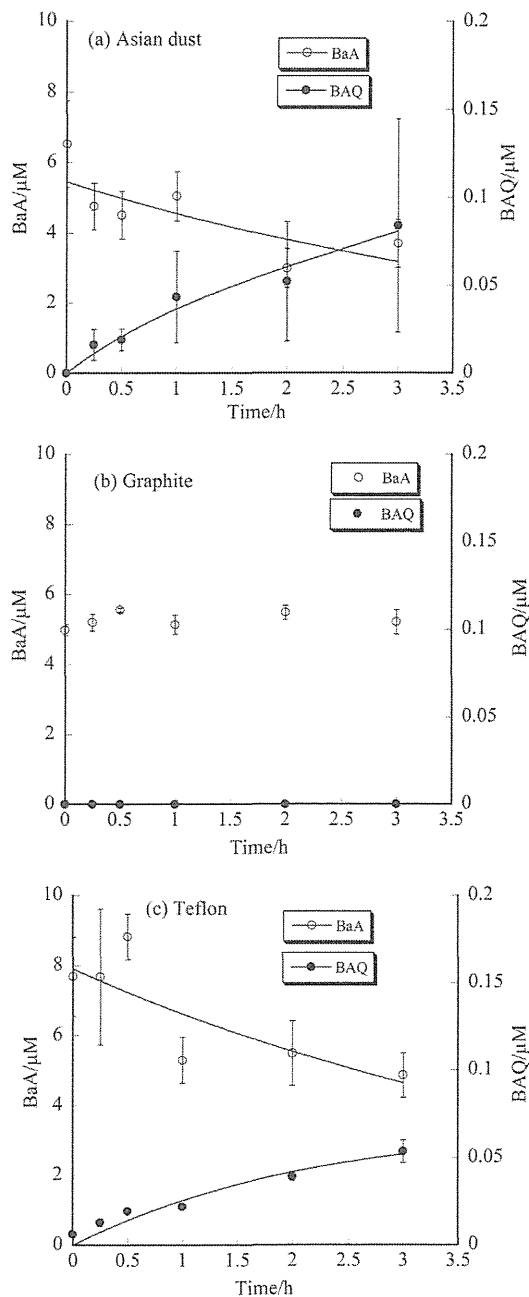


Fig. 3 Concentration of BaA and BAQ vs time of UV irradiation.

実験を行い、土壌粒子表面上における BAQ の生成速度や生成収率を、他の粒子表面上における反応の結果と比較した。参照粒子として、DEP, CEP 等に多く含まれるすすのモデルとしてグラファイト粒子、そして表面が不活性なテフロン粒子を用いた。

3.2.1 粒子上 BaA への光照射反応による BAQ の生成

BaA を塗布した土壌粒子、グラファイト粒子、およびテフロン粒子に対してそれぞれ光照射を行い、BAQ の生成および BaA の減衰の経時変化を調べた (Fig. 3)。以降、BAQ および BaA の濃度は、粒子からの抽出・濃縮処理後の溶液中濃度で示した。

土壌およびテフロン粒子上においては BAQ 生成が確認されたが、グラファイト上においては全く BAQ の生成はみられなかった。Behymer and Hites (1985) は、シリカゲルやアルミナ上よりもブラックカーボン上の方が、光に対して PAH は安定であったと報告している。Yokley et al. (1986) も、カーボンを含む粒子上では、PAH は光に対して安定化されると報告している。

ここで、各粒子表面上における BAQ の収率および光分解速度を求めるため、BAQ が BaA の光反応からのみ生成し、光反応によってのみ消失し、Fig. 4 に示すような一次反応が連続して起こる逐次反応が起こっていると仮定して解析した。光反応による PAH から PAH キノンの生成は多段階で進行することが提案されているが (Reyes et al., 2000)、いずれの反応が本反応全体の速度を支配しているかは明らかでない。ここでは BaA の分解過程が律速段階であると仮定し、反応全体を一次反応として取扱った。

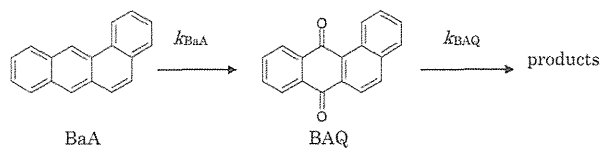


Fig. 4 Oxidation reaction of BaA and BAQ

反応の初期には、 $\ln(C_0/C)$ (C_0 : 初期濃度, C : 各時間分解後の濃度) と分解時間との間に直線関係が得られることから、その直線の傾きから実験的に求めた BaA の分解速度定数 k_{BaA} を用いて、それぞれの反応を速度式で表すと、

$$d[BaA]/dt = -k_{BaA}[BaA] \quad \dots (1)$$

$$d[BAQ]/dt = k_{BaA}[BaA] \times Y - k_{BAQ}[BAQ] \quad \dots (2)$$

このとき、 $[BaA]$, $[BAQ]$ はそれぞれ時間 t (h) における BaA 濃度, BAQ 濃度を示す。 Y は BAQ 初期収率, k_{BaA} , k_{BAQ} はそれぞれ BaA と BAQ の分解速度定数 (h^{-1}) を示す。

式 (1) より

$$[BaA] = [BaA]_0 \exp(-k_{BaA}t) \quad \dots (3)$$

反応開始時は BAQ 濃度 0 であるから、

$$[\text{BAQ}]_0 = 0 \quad \dots (4)$$

式 (3) を式 (2) に代入し、式 (4) の関係を使うと

$$[\text{BAQ}] = \frac{[\text{BaA}]_0 \times Y \times k_{\text{BaA}}}{k_{\text{BAQ}} - k_{\text{BaA}}} \{ \exp(-k_{\text{BaA}}t) - \exp(-k_{\text{BAQ}}t) \} \quad \dots (5)$$

となり、BaA の光反応によって生成する BAQ 濃度の時間変化は式 (5) で表される。実測による BAQ 濃度の経時変化を式 (5) に示す関数にフィッティングさせ各粒子上における BAQ の分解速度定数 (k_{BAQ}) および初期収率 (Y) を求めた (BAQ の生成が確認されなかったグラファイト粒子は除く)。その結果、テフロン粒子においては $k_{\text{BAQ}} = 1.64 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($= 0.06 \text{ h}^{-1}$)、 $Y = 0.011$ ($r = 0.96$) と値が得られたが、土壌粒子においては k_{BAQ} が負の値になってしまいフィッティングから適当な値を求めることができなかった。この理由として、多段階で進行する BAQ の生成反応の律速段階を BaA の分解過程と仮定し、一次反応で近似することが困難であったことが考えられる。

本実験では、砂漠土壌粒子上での光反応による BAQ 生成を速度論的に解析することはできなかったが、グラファイト粒子上では全く生成しなかった BAQ が土壌粒子上では生成していたことから、燃焼粉じんよりも、黄砂のような鉱物粒子上では、BaA の光酸化反応により BAQ が二次生成する可能性が相対的に高いということが示唆された。

3.2.2 粒子上 BaA とオゾンとの反応による BAQ の生成

3.2.1 と同じく BaA を担持させた砂漠土壌粒子、グラファイト粒子、およびテフロン粒子に一定濃度のオゾンを反応させ、BAQ の生成および BaA の減衰の経時変化について調べた (Fig. 5)。オゾンとの反応では、光照射反応においては生成の見られなかったグラファイト上においても BAQ の生成が確認された。また、オゾン濃度一定下において BaA の減衰は一次反応とみなせる (Albić-Juretić et al., 1990; Kahan et al., 2006; Perraudin et al., 2007) ことから、3.2.1 で行ったのと同様にして、フィッティングにより各粒子上における BAQ 分解速度定数 (k_{BAQ}) および初期収率 (Y) を求めた。土壌粒子では $k_{\text{BAQ}} = 5.47 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($= 0.20 \text{ h}^{-1}$)、 $Y = 0.052$ ($r = 0.96$)、グラファイト粒子では $k_{\text{BAQ}} = 9.63 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($= 0.35 \text{ h}^{-1}$)、 $Y = 0.013$ ($r = 0.99$)、テフロン粒子では $k_{\text{BAQ}} = 9.61 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($= 0.35 \text{ h}^{-1}$)、 $Y = 0.019$ ($r = 0.98$) となり、初期収率は土壌粒子においてグラファイト粒子の 3.8 倍、テフロン粒子の 2.8 倍高くなることが分かった。また、BAQ の生成がオゾン濃度一定下で一次反応に従うと仮定した場合、BAQ 生成速度の序列は $k_{\text{BaA}}Y$ で表すことができ、この値は土壌粒子上の反応で $7.83 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、グラファイト粒子上で $2.78 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、テフロン粒子上で $2.92 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ となり、土壌粒子上における生成速度が最も速いことが明らかとなった。現在のところ、土壌粒子上で BAQ の生

成が促進される理由は明らかでないが、土壌粒子を構成する粘土鉱物や金属酸化物が触媒として作用していることが推察される。日本国内では一般に春季にオゾン濃度が高くなることが知られており、その一部は中国大陸由来であるとも言われている (Tanimoto, 2009)。これらの事実と本実験の結果は、北京において大規模な黄砂が確認された時期には黄砂上で BAQ が二次生成され、大気中濃度に影響を与える可能性を支持するものである。

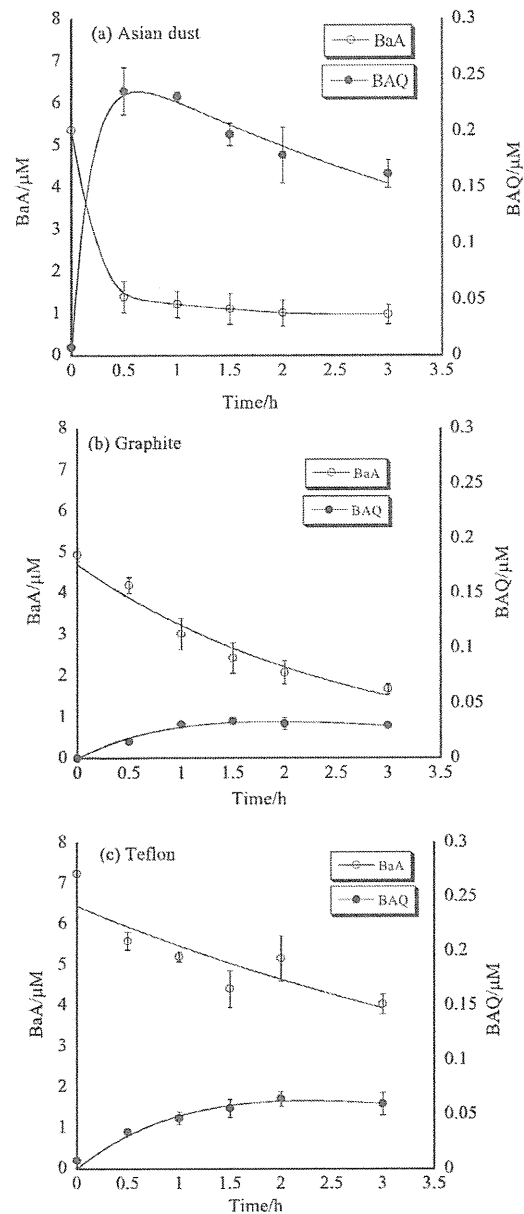


Fig.5 Concentration of BaA and BAQ vs time of reaction of BaA with O_3 .

4. 総括

中国の北京、および日本の大阪 (住宅地および幹線道路付近)、輪島における実大気粒子中 BAQ 濃度を測定したところ、最も高かった北京・冬の濃度は、輪島・冬の濃度の約 200 倍

高い値を示した。また BAQ/BkF 濃度比を比較したところ、いずれの地点においても夏季のほうが冬季よりも低いという結果になった。夏季には強い太陽光強度の影響により、BAQの光分解が BkF の光分解以上に促進され、BAQ/BkF 比が小さくなったものと考えられた。北京で大規模な黄砂が観測された時期においては、黄砂のほとんど観測されなかった春季よりも BAQ/BkF 比は高い値となった。室内反応実験により、中国砂漠土壌粒子表面に担持させた BaA からの BAQ 生成を、光照射およびオゾンとの反応によって調べたところ、参照とするグラファイト粒子、およびテフロン粒子よりも土壌粒子表面において反応が促進される傾向があることがわかった。このことから、黄砂期に BAQ/BkF 比が高くなる理由の一つとして、黄砂表面上における BAQ の二次生成が示唆された。

謝 辞

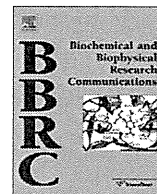
本研究は環境省の環境研究総合推進費 (RF-0905) および科研費 (新学術領域研究, 21200031) の支援により実施された。

(受稿日 2010.6.30) (掲載決定日 2010.9.17)

参考文献

- Ahmed, S., Fujii, S., Kishikawa, N., Ohba, Y., Nakashima, K. and Kuroda, N. (2006) Selective determination of quinones by high-performance liquid chromatography with on-line post column ultraviolet irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A*, **1133**, 76-82.
- Albinet, A., Leoz-Garziandia, E., Budzinski, H. and Villenave, E. (2006) Simultaneous analysis of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on standard reference material 1649a (urban dust) and on natural air samples by gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization. *J. Chromatogr. A*, **1121**, 106-113.
- Albinet, A., Leoz-Garziandia, E., and Budzinski, H. (2008) Nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of two French alpine valleys. Part 1: Concentrations, sources and gas/particle partitioning. *Atmos. Environ.*, **42**, 43-54.
- Alebić-Juretić, A., Cvitaš, T. and Klasinc, L. (1990) Heterogeneous polycyclic aromatic hydrocarbon degradation with ozone on silica gel carrier. *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 62-66.
- Andreou, G. and Rapsomanikis, S. (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated derivatives in the urban atmosphere of Athens. *J. Hazard. Mater.*, **172**, 363-373.
- Atkinson, R. and Arey, J. (1994) Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: Formation of atmospheric mutagens. *Environ. Health Perspect.*, **102**, 117-126.
- Barbas, J. T., Sigman, M. E. and Dabestani, R. (1996) Photochemical oxidation of phenanthrene sorbed on silica gel. *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1776-1780.
- Behymer, T. D. and Hites, R. A. (1985) Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on simulated atmospheric particles. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 1004-1006.
- Cho, A. K., Di Stefano, E., You, Y., Rodriguez, C. E., Schmitz, D. A., Kumagai, Y., Miguel, A. H., Eiguren-Fernandez, A., Kobayashi, T., Avol, E. and Froines, J. R. (2004) Determination of four quinones in diesel exhaust particles, SRM 1649a, and atmospheric PM_{2.5}. *Aerosol Sci. Technol.*, **38**, 68-81.
- Chung, M. Y., Lazaro, R. A., Lim, D., Jackson, J., Lyon, J., Rendulic, D. and Hasson A. S. (2006) Aerosol-borne quinones and reactive oxygen species generation by particulate matter extracts. *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 4880-4886.
- Cvrčková, O. and Ciganek, M. (2005) Photostability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) in dichloromethane and isooctane solutions. *Polycyclic Aromat. Compd.*, **25**, 141-156.
- Eiguren-Fernandez, A., Miguel, A.H., Lu, R., Purvis, K., Grant, B., Mayo, P., Di Stefano, E., Cho, A. K. and Froines, J. (2008) Atmospheric formation of 9,10-phenanthrenequinone in the Los Angeles air basin. *Atmos. Environ.*, **42**, 2312-2319.
- Fatiadi, A. J. (1967) Effects of temperature and of ultraviolet radiation on pyrene adsorbed on garden soil. *Environ. Sci. Technol.*, **1**, 570-572.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-247.
- Fioressi, S. and Arce, R. (2005) Photochemical transformations of benzo[*e*]pyrene in solution and adsorbed on silica gel and alumina surface. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 3646-3655.
- Hirano, S., Furuyama, A., Koike, E. and Kobayashi, T. (2003) Oxidative-stress potency of organic extracts of diesel exhaust and urban fine particles in rat heart microvessel endothelial cells. *Toxicology*, **187**, 161-170.
- Hiyoshi, K., Takano, H., Inoue, K.-I., Ichinose, T., Yanagisawa, R., Tomura, S., and Kumagai, Y. (2005) Effects of phenanthraquinone on allergic airway inflammation in mice. *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 1243-1248.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1989) Monographs on Evaluation of the carcinogenic risk to humans: Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes, Vol. 46. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol46/volume46.pdf>
- Jakober, C. A., Riddle, S. G., Robert, M. A., Destailats, H., Charles, M. J., Green, P. G. and Kleeman, M. J. (2007) Quinone emissions from gasoline and diesel motor vehicles. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 4548-4554.
- Kahan, T. F., Kwamena, N.-O. A. and Donaldson, D. J. (2006) Heterogeneous ozonation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons on organic films. *Atmos. Environ.*, **40**, 3448-3459.
- Kameda, T., Nakao, T., Stavarache, C., Maeda, Y., Hien, T.T.,

- Takenaka, N., Okitsu, K., and Bandow, H. (2007) Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitrate Polycyclic Aromatic Compounds in Diesel-engine Exhaust Particles from Combustion Process of Biodiesel Fuel, *Bunseki Kagaku*, **56**, 241-248 (in Japanese).
- Kameda, T., Goto, T., Toriba, A., Tang, N., and Hayakawa, K. (2009a) Determination of airborne particle-associated benz[a]anthracene-7,12-quinone using high-performance liquid chromatography with in-line reduction and fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 6758-6761.
- Kameda, T., Nakayama, Y., Goto, T., Koyanagi, T., Bandow, H., Fujimori, K., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K. (2009b) Photochemical degradation of selected nitro- and oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons on airborne particles under simulated solar UV-irradiation (*Airborne Particulates*, Ming Cheng and Wen Liu, eds., Nova Science Publishers, NY), pp. 291-307.
- Kishikawa, N., Ohkubo, N., Ohyama, K., Nakashima, K. and Kuroda, N. (2008) Chemiluminescence assay for quinones based on generation of reactive oxygen species through the redox cycle of quinone. *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1337-1343.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J. and Nel, A. (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.*, **111**, 455-460.
- Lintelmann, J., Fischer, K. and Matuschek, G. (2006) Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in particle matter using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1133**, 241-247.
- Miguel, A. H., Kirchstetter, T. W., Harley, R. A. and Hering, S. V. (1998) On-road emissions of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon from gasoline and diesel vehicles. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 450-455.
- Motoyama, Y., Bekki, K., Chung, S-W., Tang, N., Kameda, T., Toriba, A., Taguchi, K. and Hayakawa, K. (2009) Oxidative stress more strongly induced by *ortho*- than *para*-quinoid polycyclic aromatic hydrocarbons in A549 cells. *J. Health Sci.*, **55**, 845-850.
- Niu, J., Sun, P. and Schramm, K.-W. (2007) Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with fly ash particles under simulated irradiation. *J. Photochem. Photobiol., A*, **186**, 93-98.
- Pal, B. and Sharon, M. (2000) Photodegradation of polyaromatic hydrocarbons over thin film of TiO₂ nanoparticles; a study of intermediate photoproducts. *J. Mol. Catal. A Chem.*, **160**, 453-460.
- Perraudin, E., Budzinski, H. and Villenave, E. (2007) Identification and quantification of ozonation products of anthracene and phenanthrene adsorbed on silica particles. *Atmos. Environ.*, **41**, 6005-6017.
- Reyes, C. A., Medina, M., Crespo-Hernandez, C., Cedeno, M. Z., Arce, R., Rosario, O., Steffenson, D.M., Ivanov, I. N., Sigman, M. E. and Dabestani, R. (2000) Photochemistry of pyrene on unactivated silica surface. *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 415-421.
- 堺市環境保全部 (2009) 堺市大気汚染調査報告 (平成 20 年度)
- Schnelle-Kreis, J., Sklorz, M., Peters, A., Cyrys, J. and Zimmermann, R. (2005) Analysis of particle-associated semi-volatile aromatic and aliphatic hydrocarbons in urban particulate matter on a daily basis. *Atmos. Environ.*, **39**, 7702-7714.
- Shen, J., Zhang, S., Lian, J., Kong, L., and Chen, J. (2007) Benz[a]anthracene heterogeneous photochemical reaction on the surface of TiO₂ particles. *Acta Phys. Chim. Sin.*, **23**, 1531-1536.
- Sienra, M. del R. (2006) Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter. *Atmos. Environ.*, **40**, 2374-2384.
- Sugimoto, R., Kumagai, Y., Nakai, Y. and Ishii, T. (2005) 9,10-phenanthrenequinone in diesel exhaust particles downregulates Cu,Zn-SOD and HO-1 in human pulmonary epithelial cells: intracellular ion scavenger 1,10-phenanthroline affords protection against apoptosis. *Free Radical Bio. Med.*, **38**, 388-395.
- Sumi, D. and Kumagai, Y. (2007) Chemical biology of 1,2-naphthoquinone, a novel pollutant, that affects signal transduction pathways. *YAKUGAKU ZASSHI*, **127**, 1949-1956 (in Japanese).
- Tang, N., Hattori, T., Taga, R., Igarashi, K., Yang, X., Tamura, K., Kakimoto, H., Mishukov, V. F., Toriba, A., Kizu, R., and Hayakawa, K. (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulates and their relationship to emission sources in the Pan-Japan sea countries. *Atmos. Environ.*, **39**, 5817-5826.
- Tanimoto, H. (2009) Increase in springtime tropospheric ozone at a mountainous site in Japan for the period 1998-2006. *Atmos. Environ.*, **43**, 1358-1363.
- Wang, L., Atkinson, R. and Arey, J. (2007) Formation of 9,10-phenanthrenequinone by atmospheric gas-phase reaction of phenanthrene. *Atmos. Environ.*, **41**, 2025-2035.
- Yamasaki, H., Kuwata, K. and Miyamoto, H. (1982) Effects of ambient temperature on aspects of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 189-194.
- Yokley, R. A., Garrison, A. A., Wehry, E. L. and Mamantov, G. (1986) Photochemical transformation of pyrene and benzo[a]pyrene vapor-deposited on eight coal stack ashes. *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 86-90.
- Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D. and Sylvestre, S. (2002) PAHs in the Fraser River basin: A critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.*, **33**, 489-515.



Etiological role of cigarette smoking in rheumatoid arthritis: Nasal exposure to cigarette smoke condensate extracts augments the development of collagen-induced arthritis in mice

Shosuke Okamoto^{a,1}, Miki Adachi^{a,1}, Satomi Chujo^a, Kyohei Yamada^a, Kunihiko Akita^a, Saotomo Itoh^a, Takemasa Takii^a, Kazuichi Hayakawa^b, Kikuo Onozaki^{a,*}

^a Department of Molecular Health Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Mizuho 3-1, Nagoya 467-8603, Japan

^b Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2010

Available online 30 December 2010

Keywords:

Rheumatoid arthritis

Cigarette

Smoking

CIA

ABSTRACT

Cigarette smoking is a major environmental risk factor for rheumatoid arthritis (RA). However, the experimental bases supporting the etiological role of cigarette smoking in RA have not been fully provided. We have reported that cigarette smoke condensate (CSC), by means of subcutaneous injection into DBA/1J mice with collagen and complete Freund's adjuvant or intraperitoneal injection one day before immunization, augmented the development of arthritis in the mouse model of collagen type II-induced arthritis (CIA). However, these experimental procedures may not be appropriate for cigarette smoking. In this study, we nasally exposed mice to mainstream CSC and found that CSC augmented the induction and development of arthritis and antibody level against collagen. Histological examination confirmed the augmenting effect of CSC. These findings provide experimental bases supporting the etiological role of cigarette smoking in RA.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic disease with a chronic inflammatory condition in multiple joints. About 1% of the world's population is affected by the disease. The disease is characterized by a continuous proliferation of synoviocytes in inflamed synovia, formation of pannus and production of proinflammatory cytokines and chemokines by synoviocytes [1]. These cytokines contribute to the disease by production of proteases and reactive oxygen intermediates, induction of proliferation of synovial fibroblasts, cartilage degradation, infiltration of inflammatory cells and angiogenesis [2,3]. Fibroblast-like synoviocytes produce IL-1 α , IL-1 β and IL-6, and infiltrating macrophage-lineage cells produce IL-1 β and TNF α [4,5]. The critical role of these proinflammatory cytokines in RA has been verified in both RA patients and animal models of arthritis. Significant improvement of clinical features in RA patients have been reported following treatment with biologic agents, such as neutralizing anti-TNF α antibody [6], soluble TNF receptor [7], IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) [8] or neutralizing anti-IL-6 antibody [9].

However, the etiology of the disease has been remained unknown. Epidemiological studies indicate an association of cigarette smoking with disease outcome in patients with early inflammatory polyarthritis [10] the increase of rheumatoid factor and nodule formation in patients with RA [11], and a strong association between heavy cigarette smoking and RA [12]. Interestingly, the risk of smoking for the disease becomes quite high in individuals, either men or women, with shared epitope (SE) in HLA-DRB1 [13]. The risks for RA are 7.5 and 15.7 for individuals who have single and double SE genes, respectively, if they smoke as compared to non-smokers without SE. In addition, maternal smoking in pregnancy is a determinable factor of infant rheumatoid arthritis and other inflammatory polyarthritis [14]. Therefore, cigarette smoking is a solid environmental risk factor for RA. However, the experimental bases supporting the epidemiological studies have not been fully provided.

We have reported, for the first time, that cigarette smoke condensate (CSC), by means of subcutaneous injection into DBA/1J mice with antigen and complete Freund's adjuvant augmented the induction and development of arthritis in the mouse model of collagen type II-induced arthritis (CIA). Intraperitoneal injection of CSC one day before immunization also augmented the development of the arthritis, indicating the systemic effect of CSC [15]. However, these experimental procedures may not be appropriate for cigarette smoking. In this study, we nasally exposed mice to

* Corresponding author. Fax: +81 52 836 3419.

E-mail address: konozaki@phar.nagoya-cu.ac.jp (K. Onozaki).

¹ These authors contributed equally to this work.

mainstream CSC and found that CSC augmented the development of arthritis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Polymyxin B was purchased from SIGMA–ALDRICH Co. (St. Louis, MO, USA). Bovine type II collagen was from KOKEN Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Incomplete Freund adjuvant (ICFA) and *Mycobacterium butyricum* were from BD (Tokyo, Japan). Endotoxin test kit, Endospore ES-24S Kit was from SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION (Tokyo, Japan). Detection limit was 0.001 EU/ml, where one EU indicates 0.1 ng/ml of *Escherichia coli* O55:B5-derived endotoxin.

2.2. Preparation of cigarette smoke condensate (CSC)

CSC was prepared as described previously [16]. A common American brand of cigarette was used in this study. Each cigarette was 84 mm long, 25 mm in circumference, and had a charcoal filter that adsorbs normally 9 mg of tar, and 0.8 mg of nicotine. Particulate matters from mainstream smoke were collected using a cigarette smoke collection apparatus as described previously with several modifications [17]. Briefly, cigarette smoking was performed in a glass chamber (40 cm high × 25 cm i.d.). Cigarettes were smoked at a condition of 90 ml of puff volume per 5 s, once every 15 s. The mainstream smoke was collected on a glass fiber (Shibata, Tokyo, Japan, T60A20 55 mm). This filter system is effective for the collection of only the particulate matter. After the cigarettes were consumed, the weights of the filters with trapped particulate matter were determined, and the particulate matter was extracted by sonication with benzene/ethanol (1/3, v/v) four times for 15 min. The extract was filtered and evaporated to dryness under reduced pressure, and then the residue was redissolved in ethanol (cigarette smoke condensate: CSC). The yield of mainstream CSC was 9.25 mg per cigarette. One mg of CSC did not contain endotoxin as determined by Endotoxin test.

2.3. Animals

Specific pathogen-free DBA1/J male mice were purchased from Charles River, Kanagawa, Japan, and the mice were kept in a specific pathogen-free condition. Standard laboratory food and water were available to the mice ad libitum. This study was approved by the animal ethics committee of Nagoya City University.

2.4. Collagen -induced arthritis

Bovine type II collagen (CII) (3 mg/ml) solution in 0.01 M acetic acid was emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA), which consists of incomplete Freund's adjuvant (ICFA) supplemented with *M. butyricum* (8 mg/ml). Mice were subcutaneously injected with the antigen emulsion (100 µl) at several sites into the base of the tail. After 3 weeks, the mice were boosted with the antigen by intraperitoneal injection of 100 µl CII in 0.01 M acetic acid at the concentration of 0.75 mg/ml. CSC was solubilized with ethanol, and diluted with phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBS-Tween), 400 µg/ml polymyxin B and 1% BSA. BSA was added to prevent precipitation of CSC. Seven and one days before immunization, mice were nasally administered 20 µl solution containing varying amount of CSC. As a control vehicle alone was administered.

2.5. Assessment of clinical disease activity

The severity of clinical disease activity in the mice was determined by examining each of the four paws and scoring on a scale

of 0–4, as follows: 0 = normal joint, 1 = erythema and swelling in one finger, 2 = erythema and swelling in more than two fingers or one big joint, 3 = swelling with below 4 mm thickness and erythema in one entire paw, 4 = swelling with over 4 mm thickness and erythema in one entire paw and joint rigidity. The total score for clinical disease activity was based on all four paws and was a maximum of 16 for each mouse.

2.6. Histology

Mice were sacrificed on day 40 and hindpaws were removed, skinned, fixed in 4% formalin, decalcified, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin.

2.7. Measurement of antibody against collagen type II

The level of anti-collagen II antibody in serum was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Sera were collected by retroorbital bleeding, using a capillary tube. Bovine type II collagen was diluted at a concentration of 5 µg/ml with PBS containing 0.1% BSA, and immunoplates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 100 µl of the antigen solution, and incubated overnight at 4 °C. The plates were washed three times with PBS-Tween, and blocked with PBS containing 0.1% BSA. After incubation for 1 h at room temperature, the plates were washed three times with PBS-Tween. One hundred µl of serum obtained from each mouse, diluted 1:10,000 with PBS containing 0.1% BSA, were added to the wells. After 1 h incubation at room temperature, the plates were washed five times with PBS-Tween. One hundred µl of peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (H + L) (Zymed, San Francisco, CA), 1:4000 dilution (Zymed), was added. After 1 h incubation at room temperature, the plates were washed seven times with PBS-Tween. One hundred µl of substrate solution (KP, MD) was added, and incubated for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 26 µl of 6 N sulfuric acid. The reaction product was measured by determining the absorbance at 450 nm with reference 595 nm using a microplate photometer (Bio-Rad Model 3550).

2.8. Statistic analysis

Differences between group means were assessed by Mann-Whitney test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Mainstream CSC augments induction and clinical development of arthritis in mouse

In order to examine the effect of mainstream CSC on collagen-induced arthritis, varying doses of CSCs were nasally administered into mice 7 and 1 day before immunization, and mice were immunized with bovine type II collagen emulsified with CFA on day 0, boosted with the antigen alone on day 21, and then the development of arthritis was measured. Mice aged 4 weeks were used for the experiment because in the younger mice the incidence and clinical score of arthritis were relatively low as compared to older mice, allowing us to determine the effect of CSC. We have previously shown that mice not immunized or immunized with antigen emulsified with incomplete Freund's adjuvant (ICFA) or treatment with CSC alone did not develop arthritis during the course of the experiment. However, the mice immunized with antigen in CFA (control) developed arthritis with the duration of time. In contrast, treatment with 20 µg CSC per mouse augmented the induction and clinical development of arthritis, and the treatment with 100 or 200 µg CSC per mouse further augmented

(Fig. 1A). Although the difference of scores between positive control and CSC-treated groups were not statistically significant, based on mean value CSC at any doses augmented the clinical development of arthritis (Fig. 1B). The mean body weight of CSC treated mice was low as compared to control mice, although the difference was not statistically significant (Fig. 1C). The serum antibody level against collagen type II was measured. As shown in Fig. 1D, the antibody level was elevated by the treatment with CSC.

3.2. Histologic evaluation

Histologic evaluation of joints of mice was performed on day 40 at the same experimental condition with Fig. 1. The finger joints of the positive control mice exhibiting mild arthritis had moderately destroyed cartilage and subchondrial bone accompanied by infiltration of inflammatory cells, which is in contrast to normal mice (Fig. 2A and B). More severe destruction of the joints accompanied by a large number of inflammatory cells was observed in mice treated with CSC (Fig. 2C).

3.3. One time exposure to CSC is sufficient to augment the induction and clinical development of arthritis

In the previous experiment mice were exposed to CSC twice on day -7 and -1 before immunization. In order to determine whether two times exposure is necessary for the augmenting effect of CSC, mice were nasally exposed to main stream CSC once on day -1 before immunization and its effect was compared to that of mice exposed twice on day -7 and -1. As shown in Fig. 3A, only one time exposure to mainstream CSC one day before immunization augmented the induction of arthritis comparably to two times exposure to CSC. One time exposure to CSC also significantly augmented the clinical development of arthritis and antibody

induction against collagen comparably to two times exposure (Fig. 3B and C).

4. Discussion

In this study we showed, for the first time, that nasal exposure of mice to mainstream CSC augmented the induction and clinical development of arthritis in collagen-induced arthritis. In our previous report we added CSC into the emulsion of antigen and CFA in order to chronically expose the mice to CSC, which is thought to mimic the daily intake of cigarette. However, CSC might have directly modified the antigen. In addition, smokers are exposed to cigarette smoke at the remote site from synovium. Therefore, we administered intraperitoneally CSC one day before immunization, and found that CSC also exhibited the augmenting effect, excluding the direct effect of CSC on antigen. Rather the findings suggested the systemic effect of CSC on mice. Nasal exposure of mice to CSC is more relevant to cigarette smoking, and our present study indicated the effectiveness of the nasal exposure of CSC as well. Interestingly, only one time nasal exposure to CSC on one day before immunization exhibited the augmenting effect. Therefore, only brief exposure to cigarette smoke may become a risk factor for induction of arthritis in a certain condition, and chronic exposure expands the risk for arthritis.

Our study is in contrast to the report showing that cigarette smoke and nicotine exposure delayed development of collagen-induced arthritis in mice [18]. This may be because nicotine is known to inhibit the production of proinflammatory cytokines from macrophages [19]. However, even brief exposure (for 1 h) to second hand smoke is able to increase serum level of proinflammatory cytokines for at least 3 h after exposure [20]. Therefore, cigarette smoke, even if it contains nicotine, is able to induce proinflammatory cytokines *in vivo*. Or the discrepancy may be

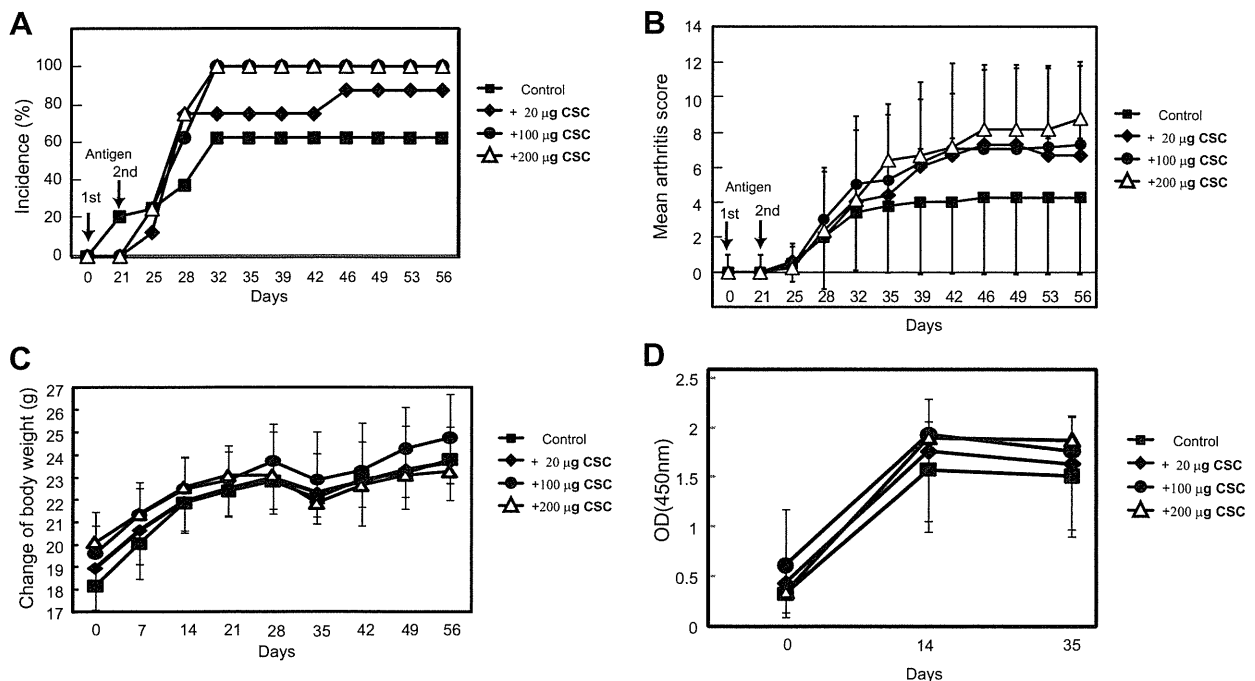


Fig. 1. Mainstream CSC augments the induction and clinical development of CIA in mice. DBA1/J mice (6 weeks, male, $n = 8$) were subcutaneously immunized with CII emulsified with CFA. Seven and one days before immunization, mice were nasally administered with 20 μ l solution, each containing vehicle, 10, 50 or 100 μ g CSC. After 3 weeks, all the mice were boosted by an intraperitoneal injection of CII, and then clinical development of arthritis was determined. Serum was collected from each mouse at indicated time, and antibody level (IgG) against collagen type II was determined by ELISA as described in Section 2. (A) Arthritis incidence. (B) Arthritis score. (C) Body weight change. (D) Antibody level against collagen. Each point and vertical bar represents mean \pm SD. of 8 mice per group. * $P < 0.05$; significantly different from the positive control value.

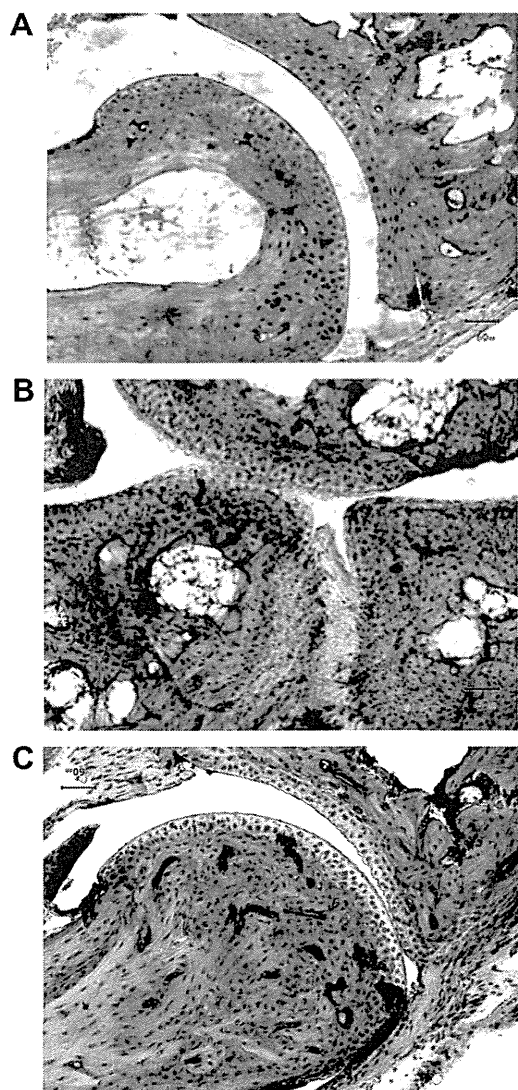


Fig. 2. Historic changes of tarsal joints. All sections stained with H and E. A–C are sections of finger joints of representative mice from the experiment described in Fig. 1. A, Synovitis of non-immunized mice. B, Synovitis of mice immunized with CII emulsified with CFA. C, Synovitis of mice immunized with CII emulsified with CFA and administered with CSC (200 μ g per mouse). Original magnification, 40 \times .

due to the experimental conditions. We collected the particulate matter in the smoke from cigarette equipped with a charcoal filter while Lindblad exposed mice with smokes from unfiltered cigarette. Therefore, CSC we used may contain less amount of nicotine than unfiltered smoke, and the balance between the active molecule and nicotine may be important for augmenting the induction of RA. If it is the case, the cigarette containing less amount of nicotine, such as nicotine less brand, may be more hazardous in induction of RA.

The active molecule in CSC responsible for the augmenting effect remains to be clarified. CSC may contain endotoxin (LPS), which is able to induce proinflammatory cytokines from macrophages, subsequently it may contribute to the augmenting effect. However, 1 mg of CSC did not contain LPS (detection limit 0.001 EU). In addition, we avoided the effect of undetectable level of LPS by adding polymyxin B into the CSC preparation. Therefore, the active molecule is not endotoxin. We have previously reported that polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) such as 3-MC, B[a]P and TCDD up-regulated IL-1 β mRNA in RA patient-derived human fibroblast-like synoviocyte line MH7A [21]. We also reported that

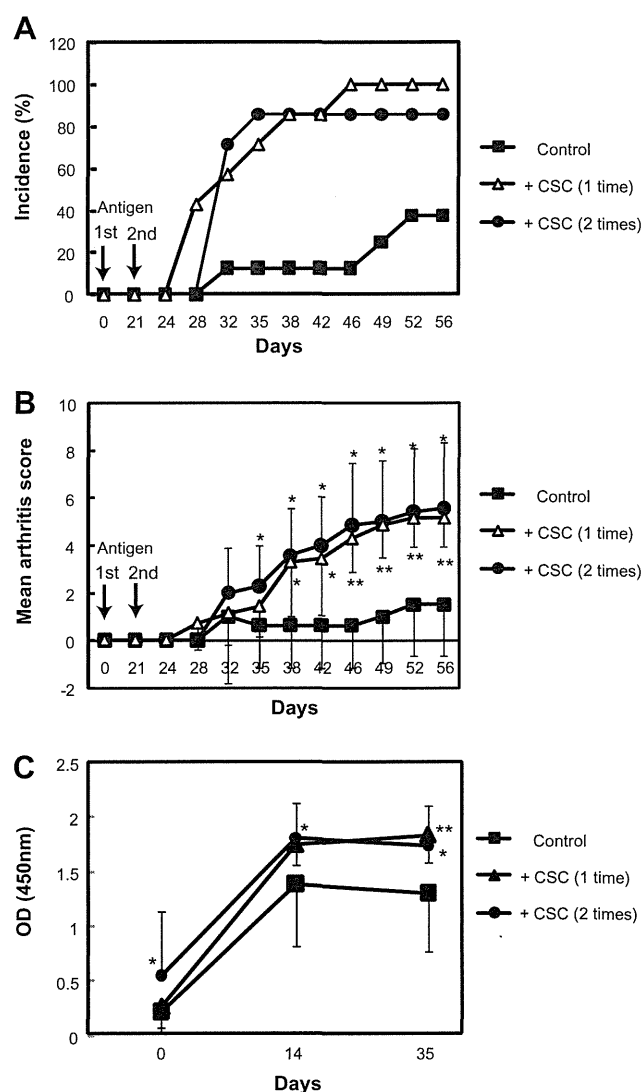


Fig. 3. Exposure of mice to mainstream CSC one day before immunization augments induction and clinical development of CIA. DBA1/J mice (6 weeks, male, $n = 8$) were subcutaneously immunized with CII emulsified with CFA. Seven and one day or one day before immunization, mice were nasally administered with 20 μ l solution, containing 100 μ g and 200 μ g CSC, respectively. After 3 weeks, all the mice were boosted by an intraperitoneal injection of CII, and then clinical development of arthritis was determined. Mice administered with vehicle on seven and one day before immunization was as used as control. (A) Arthritis incidence. (B) Arthritis score. (C) Antibody level against collagen. Each point represents mean \pm SD of eight mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; significantly different from the positive control value.

CSC induced IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 production in the cells [22]. As the effect of CSC *in vitro* was partially inhibited by an antagonist for the aryl hydrocarbon receptor (AhR), PAH as well as other compounds are thought to contribute to the augmenting effect *in vitro*. This may also be true for the effects of CSC *in vivo*. In human higher AhR mRNA and protein levels were expressed in RA synovial tissue than osteoarthritis (OA) tissue, and AhR expression was up-regulated by TNF α [23]. However, DBA1/J mice used in this study are nonresponders to PAH because their AHR is different from those of susceptible mice [24], suggesting that active molecule in this study is different from PAH.

Currently about 1% of the world's population is affected by the disease. Nevertheless, studies on document, excavation, examination of skeletons and paintings suggest that RA has not been found until 17 century in old world (Europe) [25–29]. Guillaume Baillou

(1558–1616) and Thomas Sydenham (1624–1689) first identified RA and distinguished it from the related disease, such as gout and rheumatic fever. Therefore, the reason why RA has not been found in the old world until 17 century is a big mystery [29,30], and RA is thought to be imported from the new world (America), where RA was present from 3000 to 5000 years ago [26]. Tobacco was also imported from the new world to the old world [31]. Rothschild, Turner and DeLuca suggested tobacco one of the candidates that could be responsible for the appearance of RA in Europe [26]. A number of infectious agents have been suspected of triggering RA, including Epstein-Barr virus [32], parvovirus B19 [33], rubella [34], human T-cell leukemia virus type 1 [35] and some bacteria such as *Erysipelothrix* [36], *Proteus* [37], *Mycobacteria* [38], *Candida albicans* [39] and *Porphyromonas gingivalis* [40]. However, only cigarette smoking fulfils the requirements by both the epidemiological study and historical contexts. In our study mainstream CSC, as low as 20 µg per mouse, augmented the induction and development of arthritis. As the yield of mainstream CSC was 9.25 mg per cigarette, the dose of mainstream CSC (20 µg per mouse) is reachable if individual with 60 kg body weight takes only six cigarettes in assuming that all the smokes were adsorbed. Actually heavy smokers daily intake much more cigarettes and the number reaches up to uncountable level for a long period of time. Therefore, significant amount of CSC can be accumulated over a long period of time.

Although further studies are needed to clarify the mechanism and the molecular entity of augmenting effect of CSC on induction and development of arthritis, our findings provide experimental bases supporting the etiological role of cigarette smoking in RA.

Acknowledgments

This work was supported in part by Grant-in-Aids for Scientific Research (C) from Japan Society for the Promotion of Science and a grant from the Smoking Research Foundation.

References

- [1] G.R. Burmester, B. Stuhlmüller, G. Keyszer, R.W. Kinne, Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis?, *Arthritis Rheum* 40 (1997) 5–18.
- [2] W.P. Arend, J.M. Dayer, Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 38 (1995) 151–160.
- [3] Z. Szekanez, R.M. Strieter, S.L. Kunkel, A. Koch, Chemokines in rheumatoid arthritis, *Springer Semin. Immunopathol.* 20 (1998) 115–132.
- [4] G. Buchan, K. Barrett, M. Turner, D. Chantry, R.N. Maini, M. Feldmann, Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha, *Clin. exp. Immunol.* 73 (1988) 449–455.
- [5] G.S. Firestein, J.M. Alvaro-Gracia, R. Maki, Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis, *J. Immunol.* 144 (1990) 3347–3353.
- [6] P.E. Lipsky, D.M. van der Heijde, E.W. St Clair, D.E. Furst, F.C. Breedveld, J.R. Kalden, J.S. Smolen, M. Weisman, P. Emery, M. Feldmann, G.R. Harriman, R.N. Maini, Anti-Tumor Necrosis Factor. Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group, Influximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis, *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 1594–1602.
- [7] L.W. Moreland, Soluble tumor necrosis factor receptor (p75) fusion protein (ENBREL) as a therapy for rheumatoid arthritis, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 24 (1998) 579–591.
- [8] E.F. Daniel, Anakinra: Review of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis, *Clin. Therapeu.* 26 (2004) 1960–1975.
- [9] E.H. Choy, D.A. Isenberg, T. Garrood, S. Farrow, Y. Ioannou, H. Bird, N. Cheung, B. Williams, B. Hazleman, R. Price, K. Yoshizaki, N. Nishimoto, T. Kishimoto, G.S. Panayi, Therapeutic benefit of blocking Interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 3143–3150.
- [10] B.J. Harrison, A.J. Silman, N.J. Wiles, D.J. Scott, D.P. Symmons, The association of cigarette smoking with disease outcome in patients with early inflammatory polyarthritis, *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 323–330.
- [11] T. Tuomi, M. Heliövaara, T. Palosuo, K. Aho, Smoking lung function, rheumatoid factors, *Ann. Rheum. Dis.* 49 (1990) 753–756.
- [12] D. Hutchinson, L. Shepstone, R. Moots, J.T. Lear, M.P. Lynch, Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA, *Ann. Rheum. Dis.* 60 (2001) 223–227.
- [13] L. Padyukov, C. Silva, P. Stolt, L. Alfredsson, L. Klareskog, A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 3085–3092.
- [14] J.J. Jaakkola, M. Gissler, Maternal smoking in pregnancy as a determinant of rheumatoid arthritis and other inflammatory polyarthropathies during the first 7 years of life, *Int. J. Epidemiol.* 34 (2005) 664–671.
- [15] S. Chujo, S. Okamoto, R. Sunahara, M. Adachi, K. Yamada, H. Hayashi, T. Takii, K. Hayakawa, K. Onozaki, Cigarette smoke condensate extracts augment collagen-induced arthritis in mice, *Int. Immunopharmacol.* 10 (2010) 1194–1199.
- [16] M. Kamiya, A. Toriba, Y. Onoda, R. Kizu, K. Hayakawa, Evaluation of estrogenic activities of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 1017–1027.
- [17] G. Grimmer, K.W. Naujack, G. Dettbarn, Gaschromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. Aza-arenes, aromatic amines in the particle and vapor phase of mainstream and sidestream smoke of cigarettes, *Toxicol. Lett.* 35 (1987) 117–124.
- [18] S.S. Lindblad, P. Mydel, I.M. Jonsson, R.M. Senior, A. Tarkowski, M. Bokarewa, Smoking, nicotine exposure delay development of collagen-induced arthritis in mice, *Arthritis Res. Ther.* 11 (2009) R88.
- [19] N. Sugano, K. Shimada, K. Ito, S. Murai, Nicotine inhibits the production of inflammatory mediators in U937 cells through modulation of nuclear factor-kappaB activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252 (1998) 25–28.
- [20] A.D. Flouris, G.S. Metsios, A.E. Carrillo, A.Z. Jamurtas, K. Gourgouliani, T. Kiropoulos, M.N. Tzatzarakis, A.M. Tsatsakis, Y. Koutedakis, Acute and short-term effects of secondhand smoke on lung function and cytokine production, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 79 (2009) 1029–1033.
- [21] A. Tamaki, H. Hayashi, H. Nakajima, T. Takii, D. Katagiri, K. Miyazawa, K. Hirose, K. Onozaki, Polycyclic aromatic hydrocarbon increases mRNA level for interleukin 1 beta in human fibroblast-like synoviocyte line via aryl hydrocarbon receptor, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 407–410.
- [22] M. Shizu, Y. Itoh, R. Sunahara, S. Chujo, H. Hayashi, Y. Ide, T. Takii, M. Koshiko, S.W. Chung, K. Hayakawa, K. Miyazawa, K. Hirose, K. Onozaki, Cigarette smoke condensate upregulates the gene and protein expression of proinflammatory cytokines in human fibroblast-like synoviocyte line, *J. Interferon Cytokine Res.* 28 (2008) 509–521.
- [23] S. Kobayashi, H. Okamoto, T. Iwamoto, Y. Toyama, T. Tomatsu, H. Yamanaka, S. Momohara, A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 47 (2008) 1317–1322.
- [24] M. Ema, N. Ohe, M. Suzuki, J. Mimura, K. Sogawa, S. Ikawa, Y. Fujii-Kuriyama, Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 27337–27343.
- [25] B.M. Rothschild, Rheumatoid arthritis at a time of passage, *J. Rheumatol.* 28 (2001) 245–250.
- [26] B.M. Rothschild, K.R. Turner, M.A. DeLuca, Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the Late Archaic Period of Alabama, *Science* 241 (1988) 1498–1501.
- [27] C.L. Short, The antiquity of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 17 (1974) 193–205.
- [28] E.L. Altschuler, Parvovirus B19 and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a case for historical reasoning, *Lancet* 354 (1999) 1026–1027.
- [29] T. Abe, History of collagen disease and rheumatoid disease, in: N. Miyasaka (Ed.), *Collagen Disease – Rheumatoid Disease*, Asakura Press, Tokyo, 2001, pp. 2–5.
- [30] K. Onozaki, Etiological and biological aspects of cigarette smoking in rheumatoid arthritis, *Inflamm. Allergy Drug Targets* 8 (2009) 364–368.
- [31] G. Borio, The history of Tobacco. HISTORY NET, 1997, <http://www.historian.org/bysubject/tobacco1.htm>.
- [32] N. Balandraud, J. Roudier, C. Roudier, Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis, *Autoimmun. Rev.* 3 (2004) 362–367.
- [33] B.J. Cohen, M.M. Buckley, J.P. Clewley, V.E. Jones, A.H. Puttick, R.K. Jacoby, Human parvovirus infection in early rheumatoid and inflammatory arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 45 (1986) 832–838.
- [34] A.J. Tingle, M. Allen, R.E. Petty, G.D. Kettys, J.K. Chantler, Rubella-associated arthritis. I. Comparative study of joint manifestations associated with natural rubella infection and RA 27/3 rubella immunisation, *Ann. Rheum. Dis.* 45 (1986) 110–114.
- [35] K. Nishioka, I. Maruyama, K. Sato, I. Kitaiima, Y. Nakajima, M. Osame, Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I, *Lancet* 1 (1989) 441.
- [36] G. Trautwein, D. Seidler, L.C. Schulz, W. Drommer, R. Weiss, K.H. Böhm, Immunopathology, pathogenesis of chronic erysipelas polyarthritis of Swine, *Z. Rheumatol.* 35 (1976) 217–239. German.
- [37] A. Ebringer, T. Rashid, C. Wilson, Rheumatoid arthritis: proposal for the use of anti-microbial therapy in early cases, *Scand. J. Rheumatol.* 32 (2003) 2–11.
- [38] P. Lydyard, G. Tsoulfa, M. Sharif, B. Broker, M. Smith, G.A. Rook, Immunity to heat shock proteins in rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Rheumatol. Suppl.* 5 (1990) 69–74.
- [39] S. Hida, N.N. Miura, Y. Adachi, N. Ohno, Effect of *Candida albicans* cell wall glucan as adjuvant for induction of autoimmune arthritis in mice, *J. Autoimmun.* 25 (2005) 93–101.
- [40] E.D. Rosenstein, R.A. Greenwald, L.J. Kushner, G. Weissmann, Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis, *Inflammation* 28 (2004) 311–318.

自動面積測定法によるキンギョのウロコを骨の モデルとしたアッセイ法の改良

北村敬一郎^{1*}・中野 淳²・川部季美²・早川和一²・佐藤雄亮¹・根本 鉄¹
大嶋雄治³・島崎洋平³・遠藤雅人⁴・服部淳彦⁵・鈴木信雄⁶

2010年9月16日受付, Received 16 September 2010

2010年12月6日受理, Accepted 6 December 2010

Improvement in Efficiency and Accuracy of Goldfish Scale Assay with Automatic Area Measurement

Kei-ichiro KITAMURA^{1*}, Jun NAKANO², Kimi KAWABE², Kazuichi HAYAKAWA²,
Yusuke SATO¹, Tetsu NEMOTO¹, Yuji OSHIMA³, Youhei SHIMAZAKI³, Masato ENDO⁴,
Atsuhiko HATTORI⁵ and Nobuo SUZUKI⁶

Abstract

Teleost scale is a calcified tissue that contains osteoclasts, osteoblasts, and bone matrix, all of which are similar to those found in mammalian membrane bones. We have developed an *in vitro* model system using goldfish scale as a bone model. This system can detect the activities of osteoclasts and osteoblasts with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and alkaline phosphatase (ALP) as the respective markers. In the present study, we have improved this method by normalization of enzymatic activity with scale areal correction using image processing software. This methodological improvement made the system considerably efficient and accurate, and made it possible to measure TRAP and ALP activities even with the small scale of 0.5 mg or less. In addition, our new method minimized the influence of scale size on measurements of enzymatic activity.

Key Words: scale, unit weight activity, unit area activity, osteoclasts, osteoblasts
キーワード: ウロコ, 単位重量活性, 単位面積活性, 破骨細胞, 骨芽細胞

¹金沢大学医薬保健研究域保健学系 〒920-0942 石川県金沢市小立野5-11-80 (Faculty of Health Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, 11-80 Kodatsuno 5 chome, Kanazawa, 920-0942 Japan)

²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 (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, 920-1192 Japan)

³九州大学大学院農学研究院海洋生命化学講座 〒812-8581 福岡県福岡市博多区箱崎6-10-1 (Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 10-1 Hakozaki 6 chome, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan)

⁴東京海洋大学海洋科学部海洋生物資源学科 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7 (Department of Marine Biosciences, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, 5-7 Konan 4 chome, Minato-ku, Tokyo, 108-8477 Japan)

⁵東京医科歯科大学教養部生物学教室 〒272-0827 千葉県市川市国府台2-8-30 (Department of Biology, College of Liberal Arts and Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 8-30 Kohnodai 2 chome, Ichikawa, Chiba, 272-0827 Japan)

⁶金沢大学環日本海域環境研究センター臨海実験施設 〒927-0553 石川県鳳珠郡小木町△4-1 (Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, 4-1 Ogi, Housu-gun, Ishikawa, 927-0553 Japan)

*連絡著者 (Correspondence author)

I. はじめに

魚類のウロコは、骨芽細胞、破骨細胞および骨基質タンパクを持ち(Yamada 1961, 1971; Bereiter-Hahn and Zylberberg, 1993; Nishimoto *et al.*, 1992; Lehane *et al.*, 1999), 哺乳類の膜性骨同様に添加的石灰化により軟骨が関与しないで直接骨化する。既にわれわれは、この魚類のウロコを骨モデルとし、その破骨細胞と骨芽細胞活性をそれらのマーカー酵素である酒石酸耐性酸ホフターゼ(TRAP)およびアルカリホフターゼ(ALP)により(Vaes 1988; Dimai *et al.*, 1998), 別々に測定できるアッセイ系を開発している(Suzuki *et al.*, 2000; Suzuki and Hattori 2002)。これまでこのアッセイ系を用い、1960年代半ばから船底や漁網への貝類や海藻類の付着を防ぐための防汚剤(Boyer, 1989; Fent, 1996)として広く・大量に使用されたトリブチルスズによる沿岸海域の汚染の骨代謝への影響評価(Suzuki *et al.*, 2008)を評価した実績がある。さらに、魚の泳ぎや低強度超音波による機械的刺激が骨芽細胞活性を促進することなどを示してきた(Kitamura *et al.*, 2010a; Kitamura *et al.*, 2010b)。

一方、1個体のキンギョからアッセイに使えるウロコは、100枚程度しか得られず、従来のウロコの重量当たりの酵素活性測定では一枚一枚のウロコ重量測定に多大な時間を要した。また、小さなウロコの重量測定は困難であり、TRAPやALP活性測定値が小さなウロコでは相対的に大きくなるなどの傾向が見られ、できるだけ同程度の大きさのウロコを使用してきた。そこで、今回、米国立衛生研究所(NIH)から提供される画像処理ソフトImage Jを用い、迅速かつ正確にウロコの面積当たりで酵素活性を測定できる方法を開発した。

II. 材料と方法

1) キンギョ

面積補正法開発のために体長約12cmのオスのキンギョ(*Carassius auratus*)を6個体(東川養魚場, 奈良県大和郡山市)使用した。すべての実験内容は、金沢大学動物実験倫理規程に従い実施した。

2) ウロコの面積補正法によるTRAPおよびALP活性測定の改良

2-1) ウロコの採取

キンギョを0.03% m-アミノ安息香酸エチルメタンシルホネート(ナカライテスク株, 京都市, 日本)水溶液で麻酔後、側線鱗の上および下の各3行より左右対称に各行16枚ずつ別々に抜去し(図1), 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したLeibovitz's L-15培地(11415, Invitrogen, Auckland, NZ, USA)へ移した。そして、左側面のウロコを重量法で、右側面のウロコを面積法でそれぞれTRAPおよびALP活性を測定した。

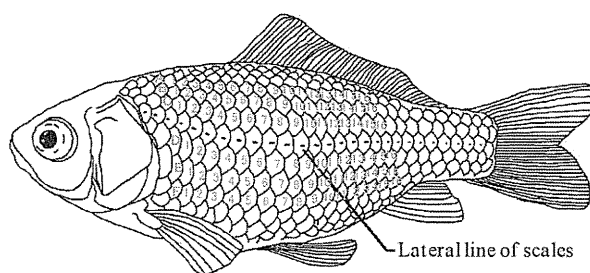


図1 ウロコのサンプリング位置。酵素活性の重量・面積補正法: 左側面のウロコを重量法で、右側面のウロコを面積法でそれぞれTRAPおよびALP活性測定するため、左右側線上のウロコの上・下各3行(A~F行)のウロコを抜去した。

Fig. 1 Schematic of sampling location for scale removal. Scale sampling for development of alternated measurement in TRAP and ALP activities: 192 scales (numbered scales) were collected from 6 horizontal lines (from A to F) of scales along the lateral line of scales on both side of the body. TRAP and ALP activities on the left side of scales were measured with weight correction method and on the right side of scales were measured with areal correction method.

2-2) TRAP活性の吸光度測定

ウロコを生食水で洗浄後、pH 5.3の酸性酒石酸緩衝液(20 mM 酒石酸含有0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液)100 μ l ずつが入った96穴マイクロプレートの各ウエルの中へ1枚ずつ入れた。ウロコを入れた直後に、マイクロプレートをマイナス80℃で凍結・保存した。室温で解凍後20 mM p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを含むpH 5.3の酸性酒石酸緩衝液100 μ l ずつ各ウエルへ加えて、20℃で30分間反応させた後、3 N NaOHを50 μ l ずつ各ウエルへ加えて反応を止めた。ウエル内をピペッティングで攪拌後、150 μ l ずつ新しい96穴マイクロプレートへ移した。反応時にウロコを入れなかったウエルの溶液をブランクとし

て、405 nmで吸光度を測定した。

2-3) ALP活性の吸光度測定

ALP活性の吸光度測定は、アルカリ緩衝液 (1mM 塩化マグネシウム, 0.1 mM塩化亜鉛を含む, pH 9.5 の100 mM トリス・塩酸緩衝液) を酸性酒石酸緩衝液に換えて使用した。その他の条件は、TRAP活性測定と同様条件で行った。

2-4) ウロコの面積測定

吸光度測定のために反応液を新しいプレートへ移した後、残った反応液を除き、0.4 %のメチレンブルー液を各ウェルへ100 μ l ずつ加え5分以上染色した。その後染色液を取り除き、生食水で洗浄後、透明なポリプロピレンシート上に96穴マイクロプレートと同じ配置で染色されたウロコを並べた。ポリプロピレンシート上の余分な水分をペーパータオルで除去した。その後ウロコが剥がれないようにポリプロピレン製のホルダーに挟み込み、イメージスキャナー (CanoScan LiDE 600F, キヤノン(株), 日本) により解像度300 ドット/インチ (dpi) のJPEG画像としてウロコ画像を取り込んだ (図2)。

アメリカ国立衛生研究所 (NIH) から提供されている画像処理ソフトウェア「Image J」により、ウロコ画像のコントラストを最大化 (Brightness/contrast : 図3) し、着色ウロコ以外のノイズ画像を除去後、カラー分離 (Split channels : 図4) を行って、2値化画像に変換して各ウロコのドット数を自動カウントし

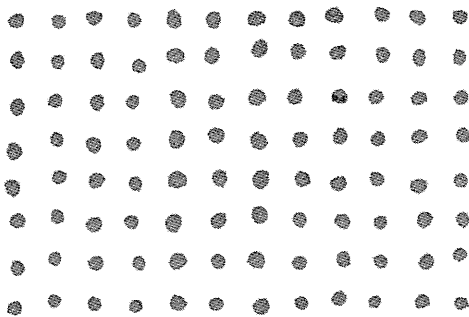


図2 イメージスキャナーで取り込まれたウロコ画像。ウロコは、メチレンブルーで5分間染色後、生食水で洗浄し透明なポリプロピレンシート上に96穴マイクロプレートと同じ配置で並べられ、イメージスキャナーでその画像を取り込んだ。

Fig. 2 A representative stained-scale image captured by an image scanner. After scales were stained with methylene blue, it were washed with saline and arranged in a 96-well plate-like array on a polypropylene sheet. Then the image of these arranged scales was taken with an image scanner.

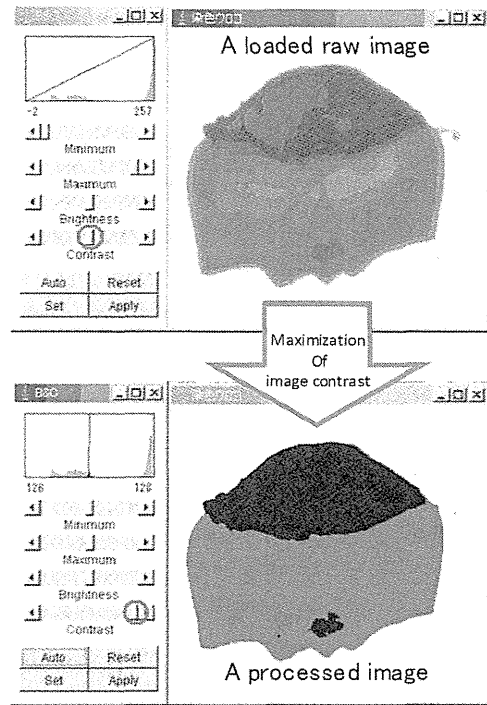


図3 画像コントラストの最大化。画像処理ソフトウェア「Image J」により、ウロコ画像のコントラストを最大化し、着色ウロコ以外のノイズ画像を除去した。

Fig. 3 Maximization of image contrast. Dragging the slider of contrast to right side to maximize the contrast of the scale image. Then, almost all noise components on the image except scale are eliminated.

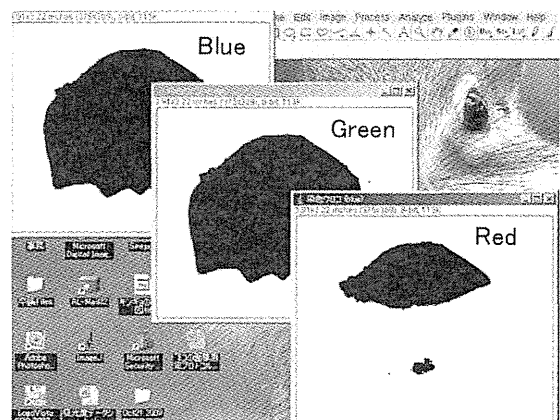


図4 2値化画像へ変換。「Image J」の「split channels」コマンドで画像を3原色の画像に分離することにより2値化画像へ変換する。2値化画像へ変換後「measure」コマンドで指定位置 (ウロコ) 画像が占めるドット数をカウントする。

Fig. 4 Image binarization. An original image file is separated into trichromatic color images (red image file, green image file, and blue image file) to convert an image into binarized image, using "split channels" command. Generally, green image file suit a wide range of images for an accurate area measurement. Then, area measurement is automatically processed by clicking the mouse cursor on each scale of green image file.