

## 財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

平成 23 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 唐 寧  
所属機関名： 金沢大学  
所属部署名： 医薬保健研究域 職名： 助教  
所在地： 石川県金沢市角間町  
電 話： 076-234-4458 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

### 2. 研究テーマ

中国上海市における多環芳香族炭化水素／ニトロ多環芳香族炭化水素の大気汚染と生殖発生毒性との関連に関する基礎研究

### 3. 研究組織：

日本側研究者氏名：	唐 寧	職名：	助教
所属機関名：	金沢大学	部署名：	医薬保健研究域
中国側研究者氏名：	呉 慶	職名：	准教授
所属機関名：	復旦大学	部署名：	公共衛生学院

### 4. 当該研究における発表論文等

1. Xiao, W.S., Zhang, J., Liang, J.R., Zhu, H.Y., Zhou, Z.J. and Wu, Q., Adverse effects of neonatal exposure to 3,3', 4,4', 5,5'-hexachlorobiphenyl on hormone levels and testicular function in male sprague-dawley rats, *Environmental Toxicology*, in press.
2. Tang, N., Tokuda, T., Izzaki, A., Tamura, K., Ji, R.N., Zhang, X.M., Dong, L.J., Kameda, T., Toriba, A. and Hayakawa, K., Recent change in atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in Shenyang, China, *Environmental Forensics*, Submitted.

## 中国上海における多環芳香族炭化水素／ニトロ多環芳香族炭化水素の大気汚染と

### 生殖発生毒性との関連に関する基礎研究

研究者氏名	唐 寧
日本所属機関	金沢大学医薬保健研究域助教
研究者氏名	呉 慶
中国所属機関	復旦大学公共衛生学院准教授

#### 要 旨

上海は中国内陸最大の商業、金融及び工業都市であり、30年ほど前に始まった改革・開放政策のシンボルでもある。本研究では、上海で選ばれた代表的な3地点で、アンダセン式ローボリュームエアースンプラーを用いて夏と冬に、大気中粒子状物質を粒径別に捕集し、強い発がん性／変異原性／内分泌かく乱性を有する多環芳香族炭化水素 (PAH) 及びニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) の汚染実態とそれらの主要発生源を明らかにした。

3地点の大気中総 PAH, NPAH の平均濃度等は、夏ではそれぞれ  $8.0 \sim 9.9 \text{ pmol/m}^3$ ,  $97 \sim 272 \text{ fmol/m}^3$  であり、冬ではそれぞれ  $35 \sim 61 \text{ pmol/m}^3$ ,  $551 \sim 694 \text{ fmol/m}^3$  であった。また、これら PAH, NPAH は季節、地点によらず 80%以上が呼吸器経路で肺胞まで沈着できる微細粒子画分 ( $< 2.1 \mu\text{m}$ ) に存在した。さらに、PAH, NPAH の幾つかの組成比を用いて解析したところ、上海の大気中 PAH, NPAH の主要発生源は夏と冬ともに自動車であることを明らかにした。一方、PAH, NPAH の生殖発生毒性をより正確に評価するために、今後、ダイオキシンのような他汚染物質との同時モニタリングの必要性が見出された。

**Key Words** 多環芳香族炭化水素, ニトロ多環芳香族炭化水素, ベンゾ[a]ピレン, 生殖発生毒性, 大気汚染

#### 緒 言:

13億人を超える人口を擁する中国では、改革・開放政策をとってから30年間、急速な経済成長を遂げた一方で、環境問題が深刻化している。申請者は、これまでに中国の東北部都市（瀋陽、撫順、鉄嶺）の市街地で大気粉じんを捕集して、主に石炭、石油などの化石燃料の不完全燃焼に由来する発がん性／変異原性多環芳香族炭化水素 (PAH) 及びニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) の発生と挙動を解析してきた。その結果、中国の上記都市の大気中 PAH, NPAH 濃度はいずれも日本の都市（札幌、金沢、富山、東京、北九州）より高いこと、特に冬に著しく高いことが分かった。石炭ストーブや自動車排ガス粉じんの PAH, NPAH 組成解析から、その主原因が中国の東北地方で冬暖房として石炭を多量に消費するためであることがわかった<sup>1)</sup>。しかし、冬暖房を使用しない南の地方の大気中 PAH, NPAH の汚染レベルや主要発生源等については、殆んど把握されていない。さらに、PAH, NPAH の中には、エストロゲン系やアンドロゲン系の作用をかく乱するものがあることが次第に明らかとされてきた<sup>2)</sup>。そこで、本研究では、上海の都心部と住宅地域の計3地点で夏と冬に大気粉じんを粒径別に捕集し、PAH, NPAH を分析することにより、上海の大気中これらの汚染レベルと主要発生源を把握し、更に生殖発生毒性との関連に関する基礎検討を行った。

#### 対象と方法:

##### 大気試料のサンプリング (Figure 1)

- ★ 昌邑 (Changyi) : 上海市浦東新区崂山東路10号, 幹線道路近傍, 地上20m
- ★ 宝山 (Baoshan) : 上海市宝山区密山東路宝林五村45号, 郊外に近い住宅地, 地上15m
- ★ 東安 (Dongan) : 上海市徐〜い区東安路130号, 都心に近い住宅地, 地上15m

上記3地点に、アンダセン式ローボリュームエアースンプラー (AN-200) を設置し、夏季 (8月2~16日) 及び冬季 (2月10~24日) に大気試料を粒径別 (> 7.0 µm, 7.0-2.1 µm, <2.1 µm) にフッ素樹脂バインダーガラスフェルター (TX40HI20WW) 上に捕集した。なお、捕集フェルターは2日間ごとに交換した。

#### 分析方法

捕集したフェルターは、PAHの内部標準物質 (ピレン-d<sub>10</sub>, ベンゾ[a]ピレン-d<sub>12</sub>) 及びNPAHの内部標準物質 (2-フルオロ-7-ニトロフルオレン) を添加し、著者が所属する研究室で開発した所定の方法<sup>3)</sup>に従って処理をし、最終的にエタノールに溶解して検液とした。NPAHは、化学発光検出/HPLC法<sup>3)</sup>を、PAHは、蛍光検出/HPLC法を用いて分析した。

NPAHとして、1,3-ジニトロピレン (1,3-DNP), 9-ニトロアントラセン (9-NA), 1-ニトロピレン (1-NP), 6-ニトロクリセン (6-NC) 及び6-ニトロベンゾ[a]ピレン (6-NBaP) の5種類を分析対象とした。一方、PAHは4環以上の構造をもつフルオランテン (FR), ピレン (Pyr), ベンゾ[a]アントラセン (BaA), クリセン (Chr), ベンゾ[b]フルオランテン (BbF), ベンゾ[k]フルオランテン (BkF), ベンゾ[a]ピレン (BaP), ベンゾ[ghi]ペリレン (BgPe) およびインデノ[1,2,3-cd]ピレン (IDP) の9種類を分析対象とした。

#### 生殖発生毒性試験

交尾後0.5日、1.5日と2.5日に雌マウスの卵管から1, 2及び8細胞期胚をそれぞれ採取し、2,3,7,8-四塩素化ダイオキシン (PCDD) を含むM16培養液中で12時間及び24時間培養した後、2, 8細胞期胚及び胚盤胞胚の形成率をそれぞれ計測した。また、AhR, Arnt及びCYP1A1mRNA発現量を半定量RT-PCR法で比較を行った。PCDD曝露胚を仮親に移植し、着床率と妊娠14日の胎児重量を測定した。さらに、PCDD共存下によるBaP-DNA付加体の形成についても検討した。

#### 結果:

##### 大気中PAH, NPAH濃度

Table 1は各サンプリング地点の大気中PAH, NPAH平均濃度 (n=1~5) を示す。Changyiの大気中総PAH, 総NPAH濃度は、夏ではそれぞれ9.5 pmol/m<sup>3</sup>と272 fmol/m<sup>3</sup>であり、冬ではそれぞれ35 pmol/m<sup>3</sup>と551 fmol/m<sup>3</sup>であった。Baolinの大気中総PAH, 総NPAH濃度は、夏ではそれぞれ9.9 pmol/m<sup>3</sup>と175 fmol/m<sup>3</sup>であり、冬ではそれぞれ38 pmol/m<sup>3</sup>と601 fmol/m<sup>3</sup>であった。Donganの大気中総PAH, 総NPAH濃度は、夏ではそれぞれ8.0 pmol/m<sup>3</sup>と97 fmol/m<sup>3</sup>であり、冬ではそれぞれ61 pmol/m<sup>3</sup>と694 fmol/m<sup>3</sup>であった。いずれの地点においても冬高夏低の季節変動を示した。夏期に3地点の大気中総PAH濃度に大差が見られなかったが、大気中総NPAH濃度は都心に位置し、幹線道路に

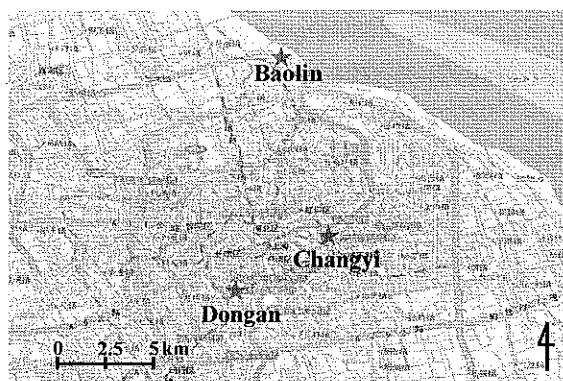


Figure 1 A map of Shanghai

Table 1 Atmospheric concentrations of PAH and NPAH at each site in Shanghai

Compound	Changyi		Baolin		Dongan		
	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	
PAH (pmol/m <sup>3</sup> )	FR	1.1	2.8	1.3	3.7	0.8	7.0
	Pyr	1.1	2.5	1.2	3.4	0.8	5.6
	BaA	0.3	1.6	0.4	1.9	0.3	5.0
	Chr	0.8	3.1	0.9	3.6	0.6	9.2
	BbF	1.7	7.6	1.6	7.4	1.4	9.8
	BkF	0.6	2.4	0.6	2.6	0.5	4.1
	BaP	0.5	2.4	0.8	3.3	0.7	5.7
	BgPe	2.2	8.0	2.0	7.6	1.8	9.0
	IDP	1.3	4.7	1.2	4.6	1.2	5.9
Total PAHs	9.5	35	9.9	38	8.0	61	
NPAH (fmol/m <sup>3</sup> )	1,3-DNP	2.2	2.8	1.1	2.7	1.0	3.0
	9-NA	43	263	7.9	164	14	312
	1-NP	165	121	128	175	34	204
	6-NC	55	148	34	234	41	162
	6-NBaP	6.4	16	3.7	25	7.0	13
	Total NPAHs	272	551	175	601	97	694

fmol/m<sup>3</sup>であった。Donganの大気中総PAH, 総NPAH濃度は、夏ではそれぞれ8.0 pmol/m<sup>3</sup>と97 fmol/m<sup>3</sup>であり、冬ではそれぞれ61 pmol/m<sup>3</sup>と694 fmol/m<sup>3</sup>であった。いずれの地点においても冬高夏低の季節変動を示した。夏期に3地点の大気中総PAH濃度に大差が見られなかったが、大気中総NPAH濃度は都心に位置し、幹線道路に

も近い Changyi で比較的に高かった。一方、冬季に3地点の大気中総 PAH, 総 NPAH 濃度ともに、都心に近い住宅地域の Dongan で高値が観測された。

#### 大気中 PAH, NPAH の粒径分布

Figure 2 は3地点における大気中 PAH, NPAH の粒径別に存在する割合を示す。いずれの地点においても、季節によらず、大気中 PAH, NPAH は、約80%以上が微小粒子 (< 2.1 μm) 側に、約10 ~ 15%が粒径 2.1 ~ 7 μm に存在したことに對し、粗大粒子 (> 7 μm) 側にわずかに数パーセントしか存在しなかった。

#### 大気中 PAH, NPAH の主要発生源

大気中 PAH, NPAH の主要発生源及びそれらの挙動を推定するために、いくつかの PAH, NPAH の濃度比がしばしば用いられる。文献値によると、[1-NP]/[Pyr]比は、自動車では0.36<sup>1)</sup>、石炭燃焼施設では0.0008<sup>1)</sup>であり、[BaA]/([Chr]+[BaA])比は、自動車では0.22 ~ 0.64<sup>4, 5)</sup>、石炭燃焼施設では0.5<sup>1)</sup>であり、[IDP]/([BgPe]+[IDP])比は、自動車では0.35 ~ 0.70<sup>6)</sup>、石炭燃焼施設では0.33であった。Table 2 に示されるように、本研究で得られた上海3地点の夏季と冬季の大気中[1-NP]/[Pyr]比、[BaA]/([Chr]+[BaA])比と[IDP]/([BgPe]+[IDP])比は、いずれも自動車に近かった。

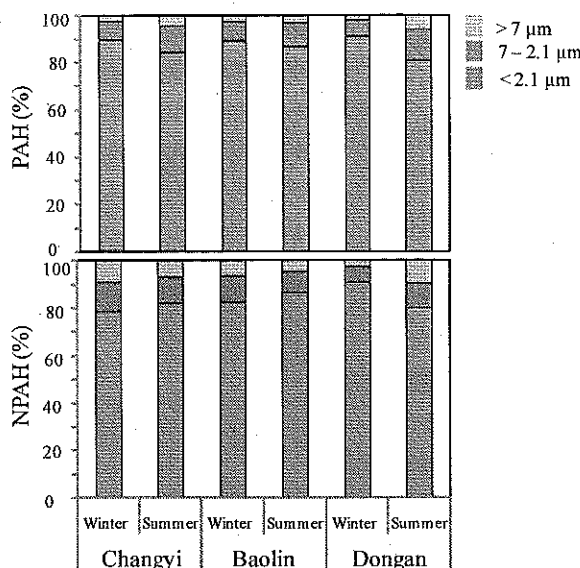


Figure 2 Atmospheric PAH and NPAH concentrations in three different size fraction at three in Shanghai

Table 2 Concentration ratios of PAH and NPAH in the atmosphere at each site in Shanghai, and in particulates from automobile and coal combustion system

	Changyi		Baolin		Dongan		Automobile	Coal combustion <sup>1)</sup>
	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter		
[1-NP]/[Pyr]	0.15	0.05	0.10	0.05	0.04	0.04	0.36 <sup>1)</sup>	0.0008
[BaA]/([BaA]+[Chr])	0.26	0.33	0.31	0.35	0.33	0.35	0.22 - 0.64 <sup>4, 5)</sup>	0.5
[IDP]/([IDP]+[BgPe])	0.37	0.37	0.38	0.38	0.40	0.40	0.35 - 0.70 <sup>6)</sup>	0.33

#### PCDD 曝露の影響

2 および 8 細胞期胚および胚盤胞胚の形成率は各群 80%以上であり、TCDD 曝露による影響はみられなかった。AhR, Arnt mRNA は1細胞期胚で検出できたが、2細胞期では検出できず、8細胞期に再び発現し、胚盤胞胚期にそのレベルは上昇した。AhR, Arnt mRNA レベルには TCDD 曝露群と対照群の間に差はみられなかった。CYP1A1 mRNA は対照群胚の各ステージに発現していなかった。TCDD 曝露群によっても、1 および 2 細胞期胚では発現誘導はみられなかったが、胚盤胞胚期では顕著な上昇が認められた。これらの TCDD 曝露胚と対照胚を同一の仮親の左右子宮にそれぞれ移植して妊娠 14 日目に解剖したところ、着床率と胎児重量に TCDD 曝露による影響は見られなかった。さらに、Figure 3 に示されるように、PCDD 共存下における BaP 曝露

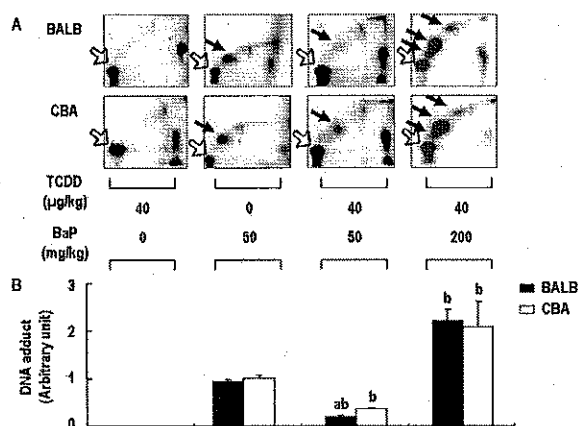


Figure 3 A representative result of DNA adduct formation. (A) Autoradiogram of B[a]P-DNA adducts detected by two-dimensional thin-layer chromatography using the <sup>32</sup>P-post labeling method. (B) Results are expressed as the mean ± SE (n = 3).

Figure 3 に示されるように、PCDD 共存下における BaP 曝露

による BaP-DNA 付加体は、低濃度 (BaP; 50 mg/kg, PCDD; 40 µg/kg) 曝露では、BaP 単独曝露より生成量が低かったが、高濃度 (BaP; 200 mg/kg, PCDD; 40 µg/kg) 曝露では、マウスの種類 (BALB 種と CBA 種) によらず曝露濃度依存的に生成量が高かった。

#### 考 察 :

上海は中国東沿岸部に位置し、中国内陸最大の商業、金融、工業都市である。常住人口は約 2,000 万人、面積は約 6,340 km<sup>2</sup> である。改革・開放政策をとってから約 30 年間、上海は、航空、鉄道、道路、海運等、中国で最も交通が発達している都市の一つとなった。2009 年に上海の GDP は全国の約 4.5% を占め、自動車保有台数は約 280 万台であった<sup>7)</sup>。しかし、その一方で、急速な経済発展に伴って、環境汚染は深刻化となり、大きな社会問題にまで発展した。

大気中 PAH, NPAH は主に石炭、石油等の化石燃料の不完全燃焼や有機物の熱分解に由来して発生する。その中、強い発がん性/変異原性/内分泌かく乱性を有するものが多く存在する。国際がん研究機関 (IARC) によりヒトへの発がん性が認められるとされるグループ 1 に BaP, ヒトへの発がん性が疑われるとされるグループ 2B に 1-NP, BaA, BbF, BkF, Chr などが位置づけられている。今回、上海市環境保護局に公表されている大気汚染指数 (API) に基づき、選択した代表的な 3 地点の大気中 PAH, NPAH 濃度は、瀋陽 (PAH: 41 pmol/m<sup>3</sup> NPAH: 403 fmol/m<sup>3</sup>), 北京 (PAH: 20 pmol/m<sup>3</sup> NPAH: 267 fmol/m<sup>3</sup>) などの北部の都市より低いものの、日本の金沢 (PAH: 2.6 pmol/m<sup>3</sup> NPAH: 27 fmol/m<sup>3</sup>) より、それぞれ約 3 倍と 2 倍高かった。また、上海の大気中 PAH, NPAH 濃度が沿道や都心に近い地点で高かったこと、組成が自動車のそれらに近似していたことと主に燃焼由来とされている微小粒子側 (80%以上) に存在したことから、上海の大気中 PAH, NPAH の主要発生源は自動車であることが明らかにされた。

一方、PAH, NPAH のほかにも、大気中に汚染物質が多種多様に存在する。本研究で捕集した大気試料から抽出された PAH, NPAH を含む有機可溶性画分はマウスを用いる動物実験に十分な量が得られなかったが、標準物質を用いる動物への曝露実験の結果より、共存物質による相乗効果が認められたため、今後、ダイオキシン類を含め、より多種類の環境汚染物質を同時にモニタリングする必要があると考えられた。

#### 参考文献 :

- 1) Tang, N., Hattori, T., Taga, R., Igarashi, K., Yang, X.-Y., Tamura, K., Kakimoto, K., Mishukov, V.-F., Toriba, A., Kizu, R. and Hayakawa, K., 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, 2005.
- 2) Kizu, R., Ishii, K., Kobayashi, J., Hashimoto, T., Koh, E., Namiki, M. and Hayakawa, K., Antiandrogenic effect of crude extract of C-heavy oil, *Mater. Sci. Eng.: C*, 12, 97-102, 2000.
- 3) Hayakawa, K., Kitamura, R., Butoh, M., Imaizumi, N. and Miyazaki, M., Determination of diamino- and aminopyrenes by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Anal. Sci.*, 7, 573-577, 1991.
- 4) Sicre, M.A., Marty, J.C., Saliot, A., Aparicio, X., Grimalt, J. and Albaiges, J., Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: Occurrence and origin, *Atmos. Environ.*, 21, 2247-2259, 1987.
- 5) Simcik, M.F., Eisenreich, S.J. and Lioy, P.J., Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan, *Atmos. Environ.*, 33, 5071-5079, 1999.
- 6) Rogge, W.F., Hildemann, L.M., Mazurek, M.A., Cass, G.R. and Simoneit, B.R.T., Sources of fine organic aerosol. 2. Noncatalyst and catalyst-equipped automobiles and heavy-duty diesel trucks, *Environ. Sci. Technol.*, 27, 636-651, 1993.
- 7) 上海市統計局 (<http://www.stats-sh.gov.cn/2008shjtj/index.asp>).

作成日 : 2011 年 3 月 10 日