

1A1139

二次生成有機エアロゾル (SOA) の細胞毒性

○ 古山昭子, 藤谷雄二, 高見昭憲, 平野靖史郎 (独立行政法人 国立環境研究所)

【目的】 我が国における都市部の光化学大気汚染はVOC (揮発性有機化合物: volatile organic compounds) 排出規制やNO_x (窒素酸化物) の排出抑制などの対策がなされているにもかかわらず顕著な改善がみられていない。人為起源や自然起源のVOCは大気中で光化学反応により光化学オキシダントや二次生成有機エアロゾル (Secondary Organic Aerosol: SOA) を生成する。SOAは大気中浮遊粒子状物質の主要成分でもあり、酸化生成物であるSOAは光化学オキシダントと同様に健康への影響が懸念されるが、その毒性影響についての検討はほとんどおこなわれていない。本研究では、排出量が多いVOCのなかで人為起源VOCであるm-キシレンと植物起源VOCであるα-ピネンを前駆物質として生成したSOAに着目し、吸入曝露した場合を想定して培養細胞に捕集SOAを曝露して毒性評価をおこなうことを目的とした。

【実験方法】 α-ピネンと m-キシレンを用いた SOA の生成系、生成条件、測定・捕集法、及び生成 SOA の性状については、本学会都市大気エアロゾル・健康影響分科会の講演要旨 (藤谷) を参照されたい。α-ピネン由来の SOA (p-SOA) は、α-ピネン 23ppm とオゾン 2.8ppm を 200L のテフロンチャンバーに導入して発生させた。m-キシレン由来の SOA (x-SOA) は、m-キシレン 5.3ppm と一酸化窒素 2.4ppm を 1000L のテドラーチャンバーに導入して紫外線を 5 時間照射して発生させた。生成した SOA はテフロンフィルターに捕集し、フィルターに粒子重量で 1mg/ml になるように培地を添加し、氷冷下で超音波法により生成物を抽出した。ブランクフィルターを同様に処理して抽出液を得て対照実験に用いた。細胞はラットの肺胞上皮株細胞 (SV40-T2) とマウスマクロファージ細胞株 (J774.1) を使い、10% 牛胎児血清加培地を加えて 24 時間培養した細胞に適宜希釈した各 SOA 抽出試料を添加して培養した後、解析を行った。細胞障害の指標として Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を用いて細胞増殖率を求め、培地中の乳酸脱水素酵素活性の測定をおこなった。酸化ストレスマーカーとしては、SOA 抽出試料を添加して培養した細胞から RNA を抽出してヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 遺伝子発現の変化を検出した。遺伝子発現は Perfect Real Time system 試薬 (TakaRa) と Thermal Cycler Dice RT system (TP800; TakaRa) リアルタイム RT-PCR 法により遺伝子の発現変化を検出し、比較 Ct 法で相対定量評価した。マクロファージ食食能は SOA を 24 時間曝露した細胞に 200nm 蛍光粒子 (Invitrogen) を添加してフローサイトメトリー (Guava easyCyte 8HT Base システム; Millipore) にて蛍光粒子の取り込みを測定することにより行った。SOA 曝露による活性酸素の発生は CellROX Deep Red Reagent (Life technologies) で、細胞の過酸化脂質は Liperfluor (DOJINDO) を用いて検出し、フローサイトメトリーで解析をおこなった。

【結果及び考察】 p-SOA、x-SOA とともに高濃度で同程度の細胞障害性を示し、24 時間曝露後の EC₅₀ は約 200µg/ml であり、10mM の N-アセチルシステイン (NAC) の添加により細胞障害性が低下した。低濃度の SOA 曝露ではそれぞれ細胞増殖の促進が認められた。100µg/ml の SOA をマクロファージへ 24 時間曝露した結果、p-SOA 曝露で顕著な粒子食食能の低下が、x-SOA 曝露で顕著な粒子食食能の増加が観察され、NAC の添加によりそれぞれの食食能の変化は対照群と同程度に抑えられた。活性酸素の発生と過酸化脂質の増加はごくわずかであったが、p-SOA 曝露で若干高い傾向にあった。一方で、肺胞上皮細胞への低濃度 (50µg/ml) 曝露時の HO-1 遺伝子発現は p-SOA と x-SOA でそれぞれ約 6 倍と約 120 倍の増加が認められた。

以上の結果から、人為起源と植物起源の VOC を前駆物質として生成される SOA は、光化学オキシダントと同様に細胞障害性を示すことがあきらかになった。酸化ストレスの誘導や細胞機能への影響は SOA の組成により異なることが示唆されたことから、様々な VOC を前駆物質として生成される SOA の曝露による影響評価や毒性発現機構の解明とともに SOA の化学組成分析を進めることが望まれる。