

## 大気汚染物質に由来する 活性酸素・フリーラジカルの抑制

西澤 真裕\*

### はじめに

近年、ガンを始めとするほとんどの疾病に活性酸素・フリーラジカルが関係すると言われるようになった。生体中の活性酸素種は、呼吸によって取り込んだ酸素分子が水分子まで還元する際の間体として生成する。生体は、体内に侵入した細菌やウイルスなどの異物から身体を守るために、活性酸素種を生成して異物を処理する機能・機構を備えている。ところが、環境ストレスなどの外的要因によって活性酸素種が過剰に生成されると、自らの組織や細胞にまで損傷を与える事が分かってきた。このような、活性酸素種の生成機構には、酵素反応中の副生成と化学反応および物理エネルギーによる生成が知られている。後者は、遷移金属イオンや紫外線そして放射線などがその代表である。生体にとって有害とされるものと活性酸素種の生成との関係が研究されるにつれ、活性酸素種を生成するかどうかが生体にとって有害であるかどうかの指標とされるようになってきた。その結果、活性酸素種を生成するものは人体にとって有害であるとの認識が一般にも広まりつつある。

従来から生体にとって有害とされていたもので、近年になってその直接的要因が活性酸素種の生成であると証明される例が数多く存在する。大気汚染物質として広く知られる自動車排ガスはその一例である。1990年代以降、ディーゼルエンジンの固体排出物である粒子状物質が活性酸素種を生成

するという研究がなされ、その有害性が科学的に証明され始めた<sup>1,2)</sup>。とは言え、その対策として大気中に浮遊している粒子状物質をすべて除去することは不可能であり、かつ非現実的でもある。かといって、現代社会の物流や移動において重要な役割を果たしているディーゼルエンジン車両の利用を止めることも非現実的である。有効性のある最善策として、エンジン中での粒子状物質の生成を減少させることや大気中への排出を抑制することに加え、粒子状物質の生体への有害性を低減させることが考えられる。ここでは、我々の研究グループで行った、活性酸素フリーラジカルの計測による有害性評価法の確立と有害性低減法の開発に関する研究を紹介する。

### ディーゼルエンジンと粒子状物質

ディーゼルエンジンは、シリンダー内の高圧縮空気中で燃料(軽油および重油)を爆発的に自己発火させることによって駆動力を得ている。つまり、気化した燃料(ガソリン)を放電によって着火させるガソリンエンジンとは、燃焼機構が根本的に異なるエンジンなのである。ディーゼルエンジンは、その原理のために燃料に対して空気が過剰な状態が良い燃焼状態となる。よって、発進や急加速時にアクセルを踏み込むと、シリンダー内の空気過剰率の急低下を招く。その結果引き起こされた不完全燃焼によって、燃料中の炭素成分が重合化してススとなり、黒煙として大気中に排出される。対照的に、ガソリンエンジンでは過剰燃料は不完全燃焼ではなく未燃焼燃料としてそのまま排出されやすい。そのため、黒煙の排出はディーゼルエ

\* Nishizawa Masahiro / 高知工科大学 物質環境システム工学科

ンジン特有の問題とされている。

前述のように、ディーゼルエンジンから排出される粒子状物質は炭素成分の重合化によって形成されている。この粒子状物質が活性炭や炭化物粉末粒子と大きく異なる点は、炭素重合化合物以外の多くの物質および化合物が含まれている事である。そのため、花粉や粉塵を含めた一般の粒子状物質 (PM: Particulate Matters) と区別してディーゼルエンジンから排出される粒子状物質を特にディーゼル排出粒子 (DEP: Diesel Exhaust Particulate) と呼ぶこともある。DEPの表面に吸着している化合物は、主に燃料や潤滑油を起源とする有機化合物である。この他にも、燃料中に存在するイオウの酸化物や、極微量ではあるが金属成分も含まれている。

大気中に浮遊する粒子状物質の中でもDEPは粒子直径が特に小さくて、 $10\mu\text{m}$ 以下とも $2.5\mu\text{m}$ 以下とも言われている。そのため、DEPは、呼吸時に肺深部にまで到達し、呼吸器傷害の原因となる<sup>3)</sup>。渋滞の多い都市部に乗り入れたディーゼルエンジン車両は、発進や停止そして急加速を繰り返すことになるために大量の黒煙を連続して排出する。その結果、都市部の大気中には大量のDEPが浮遊そして滞留することになる。東京都は、都内を走るバスやトラックが排出するDEPを重大な大気汚染有害物質と捉え、「ディーゼル車NO作戦」と銘打ってディーゼルエンジン車両の走行・利用の規制に踏み切った。さらに中央環境審議会は、2005年以降のDEP排出規制を2003年規制の1/4から1/7と非常に厳しいものとし、DEPの大気中への放散抑制を目指している。

### DEPに由来するフリーラジカル

燃料を始めとする有機化合物は、燃焼過程で分子の化学結合が切断されるために有機フリーラジカルが発生することが知られている<sup>4)</sup>。その多くは、ラジカル電子(不対電子)が有機化合物分子の主要構成元素である炭素原子上に存在する炭素中心ラジカル( $\text{R}\cdot$ )である。よって、有機化合物の不完全燃焼生成物であるDEPには、炭素中心ラジカルが付着しているか、もしくは炭素重合化合物の一部が炭素中心ラジカルである可能性がある。この炭素中心ラジカルは、酸素分子( $\text{O}_2$ )と反応する

ことで生体にとって有害な過酸化ラジカル( $\text{ROO}\cdot$ )になる(式1)ことが赤池らによって報告されている<sup>5)</sup>。この反応は脂質過酸化反応機構の一部(式2)と同じ反応であり、炭素中心ラジカルが生体内に侵入した際の有害性を示すものである<sup>6)</sup>。



$\text{L}\cdot$  = 脂質ラジカル

$\text{LOO}\cdot$  = 脂質過酸化ラジカル

DEPによる生体傷害の要因物質に過酸化ラジカルがあるならば、DEP中には過酸化ラジカルの前段階物質である炭素中心ラジカルが存在するはずである。ラジカル分子は通常の有機化合物とは異なり、不対電子を持つために電子スピン共鳴 (ESR) という磁気共鳴分光法による高選択的な測定が可能となる。そこで、DEP中に炭素中心ラジカルが存在するかどうかをESR測定によって確かめることにした。国立環境研究所から提供されたDEPを異色粉末固体のままESRを測定した。得られたスペクトルは図1(a)に示す通りで、掃引パラメーターである磁場の337mT近傍で鋭信号が1本観測されるのみであった。ESRに関する過去の研究から、337mT付近に得られる信号は炭素中心ラジカルに由来するものであることが知られている<sup>7)</sup>。よって、DEP中に存在するフリーラジカルは炭素中心ラジカルであるとわかる。このESR信号は、図1(b)に示されるようにDEPの重量に比例して大きくなっている。このことは、DEP中の炭素中心ラジカルが不均一な付着物ではなく、燃焼過程で生じる本質的な生成物であることを意味している。

一方、DEPに由来するフリーラジカルには、炭素中心ラジカルの他に2次生成物である活性酸素種、スーパーオキシドラジカル( $\text{O}_2^-\cdot$ )とヒドロキシルラジカル( $\text{HO}\cdot$ )がある。これらは、DEPが水に懸濁されたときに生成することが報告されており、生体組織に付着した際に活性酸素種が生成することの証明となっている<sup>1,2,8,9)</sup>。 $\text{O}_2^-\cdot$ および $\text{HO}\cdot$ もまた不対電子を持つラジカルであるため、これらの検出もまたESR測定によって行われている。ただ、 $\text{O}_2^-\cdot$ および $\text{HO}\cdot$ は不安定ラジカル分子であるために、ラジカル捕捉剤と呼ばれる物

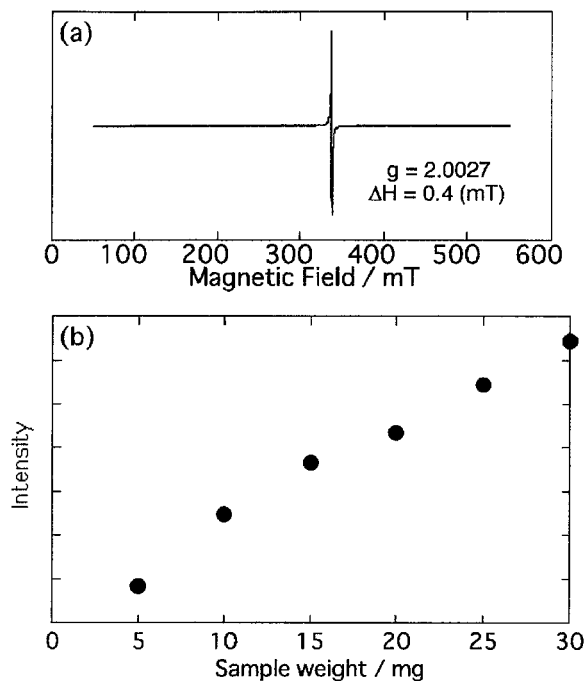


図1 (a)DEP 10mg中の炭素中心ラジカルESRスペクトル。(b)ESR信号強度のDEP重量依存性。DEPは国立環境研究所より提供されたものである。ESR測定は、粉末固体であるDEPを直径5mmの石英管に詰めて、室温下で行った。ESR信号強度は、スペクトルを2回積分した面積強度である。

質と反応させ、安定ラジカル分子に置き換えてから計測している。この手法は、ESR-スピントラッピング法と呼ばれているもので、活性酸素種の研究に一般的に用いられている手法である<sup>10)</sup>。

### DEP排出量削減装置と活性酸素・フリーラジカル

活性酸素酵素・フリーラジカルの計測による科学的な証明によってDEPの有害性が明白になるにつれ、大気中へのDEP排出量を削減する装置の開発が求められるようになった。現在、問題は残されているものの、自動車メーカーを中心に種々のDEP排出量削減装置が開発されている。ただ、いずれの削減装置においてもDEP排出量をゼロにすることは実現されていない。このことは、少量ながらも、DEPが大気中へ排出されることを意味している。しかも、これらの装置では、大気中に排出されたDEPの有害性はまったく変わっていないという問題がある。

この問題を解決するには、DEPの有害性も同時に低下させれば良いと考えられる。DEP排出量がゼロにならなくとも、有害性がなければ生体に悪影響は起こらないと考えられるからだ。DEPの有害性とは、過酸化ラジカルの前段階物質である炭素中心ラジカルの存在、そして $O_2^-$ ・および $HO\cdot$ を生成することにある。よって、過酸化ラジカルの消去ならびに $O_2^-$ ・および $HO\cdot$ の生成を抑制する機能を持つDEP排出量削減装置とすれば良い。ここで、炎症を始めとする生体傷害への寄与は $O_2^-$ ・よりも $HO\cdot$ の方がずっと大きいので、 $HO\cdot$ の生成抑制の方がより重要と考えられる。

我々の研究グループでは、湿式空気清浄機のシステムを応用したDEP排出量削減装置の評価を行ってきた。この削減装置は、装置内の処理溶液中に排気中のDEPを捕捉するものである。しかし、この原理ではDEPは装置内に蓄積されるだけである。そのため、蓄積されたDEPを安全に廃棄するための無害化処理、すなわち炭素中心ラジカルの消去ならびに $HO\cdot$ 生成の抑制処理が必要である。先の空気清浄機には、抗菌および消炎効果を持つヒノキチオールを含むヒノキ抽出油の水溶液を使用していた。DEPの処理にも、ヒノキ抽出水溶液を用いて炭素中心ラジカル消去ならびに $HO\cdot$ 生成抑制が実現できれば、理想的なDEP排出量削減装置となりうる。なお、ここでは、DEP排出量削減装置としての性能に関する詳細は省略するが、実験機では約90%の削減率を達成している。

### DEPに由来する活性酸素・フリーラジカルの抑制

DEP排出量削減装置内で、ヒノキ抽出油水溶液が炭素中心ラジカルを消去、そして $HO\cdot$ 生成を抑制する能力を持っているかどうかを確かめるため、ESR測定による検証実験を行った。50mgのDEPを500mlのヒノキ抽出油水溶液に懸濁させる。このような処理を施したDEPを自然ろ過でろ別、十分に風乾した後にESR測定を行った。

生体傷害要因である過酸化ラジカルの前段階物質である炭素中心ラジカルの消去について、ヒノキ抽出油水溶液処理の前後でESR測定を行った。図2は処理前後のESRスペクトルであり、信号の強

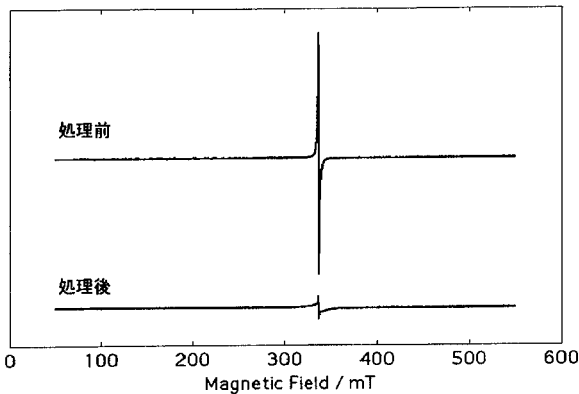


図2 DEP 10mg中の炭素中心ラジカルのESRスペクトル。ヒノキ抽出油水溶液による処理前と処理後と比較すると、信号強度が1/10以下になっている。なお、純水または水道水で処理を行っても信号強度は低下しない。

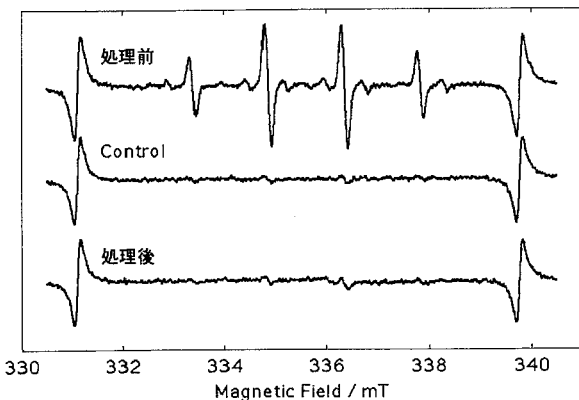


図3 スピントラッピング法によるHO·測定でのESRスペクトル。ヒノキ抽出油水溶液による処理前と処理後と比較すると、処理後は信号強度が1/10以下になっている。また、Control (DEP無し)と同程度であり、DEPによるHO·生成はほとんど起こっていないと考えられる。

度は炭素中心ラジカル量に対応する。これを見ると、ヒノキ抽出油水溶液によってDEP中の炭素中心ラジカル量が1/10以下まで消去されていることがわかる。さらに、DEPによるHO·生成に関しても同様に処理の前後で比較した。図3がESR-スピントラッピング法によるスペクトルである。これを見ると、DEPによるHO·生成が処理を施すことによって1/10以下にまで抑制されたことが分かる。

このように、ヒノキ抽出油水溶液を用いたDEP排出量削減装置を用いることによって、DEPの有

害性は1/10以下になった上にその排出量は1/10となり、全体としての有害性は1/100以下となりうるということがわかった。

## まとめ

DEP排出量削減装置の大きな問題点といえる「生体に対する有害性の低減」を解決したのは、有害性の原因である活性酸素種の生成抑制およびフリーラジカルの消去を実現したからである。植物抽出物にはビタミンやポリフェノールなどに代表される抗酸化物質が存在し、活性酸素・フリーラジカルを消去する機能を有している。これら抗酸化物質を効果的に利用することで、有害大気汚染物質による生体傷害は未然に防ぐことが可能となる。

## 参考文献

- 1) Sagai, M., Satto, M., Ichinose, T., Kodama, M., Mori, Y., *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 37 (1993).
- 2) Sagai, M., Furuyama, A., Ichinose, T., *Free Radical Biology & Medicine*, 21, 199 (1996).
- 3) Cheng, Y.S., Yeh, H.C., Mauderly, J.L., Moklen, B.V., *Am. Industrial Hygiene Assoc. J.*, 45, 547 (1984).
- 4) G.J. Mincoff, C.F.H. Tipper, *Chemistry of Combustion Reactions*, Butterworths & Co. Ltd. (1962).
- 5) Akaike, T., Sato, K., Ijiri, S., Miyamoto, Y., Kokno, M., Ando, M., Maeda, H., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294, 55 (1992).
- 6) Yagi, K., Ishida, N., Komura, S., Ohisht, N., Kusai, M., Kohno, M., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 183, 945 (1992).
- 7) M.M. Ross, M.R. Chedekei, T.H. Risby, S.S. Lestz, R.E. Yasbin, *Environmental International*, 7, 325 (1982).
- 8) Hiura, T.S., Kaszunowski, M.P., Li, N., Nel, A.E., *Journal of Immunology*, 163, 5582 (1999).
- 9) Han, J.Y., Takeshita, K., Utsumi, H., *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 516 (2001).
- 10) Janzen, E.G., *Acc. Chem. Res.*, 4, 31 (1971).