

# フローインジェクション分析を用いた DTT アッセイによる 微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>)の酸化能の測定

6BSKM004 熊井 夕貴  
指導教員 関根嘉香

## 1. 緒言

微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>)による健康影響が大きな社会問題となっている<sup>1)</sup>。PM<sub>2.5</sub>中に含まれるキノン類は細胞内で酸化還元サイクルを介して活性酸素の生成を助長し、酸化ストレスを引き起こすと考えられている<sup>2)</sup>。酸化ストレスの測定法としてジチオトレイトール(DTT)アッセイが広く用いられているが、日本における報告例は少ない。また、実用上の課題があり操作の簡易化が求められている。本研究では、フローインジェクション分析(FIA)に DTT アッセイを適用することで酸化能測定の簡易迅速化を行った。また、屋外大気中 PM<sub>2.5</sub> の酸化能を測定した。

## 2. DTT アッセイ<sup>2)</sup>

PM<sub>2.5</sub> 中のキノン類は DTT から酸素への電子伝達を触媒し、活性酸素を生成する<sup>3)</sup>。反応中で DTT は直鎖状の還元型からジスルフィド結合を有する酸化型になる。このときの還元型 DTT の消費速度を酸化能(Oxidative Potential :OP)とみなす。残存した還元型 DTT は発色試薬の 5,5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)を用いた吸光度測定によって分析される。

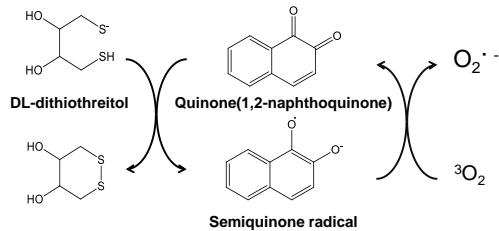


Fig.1 Chemical reaction between DTT and oxygen with quinone.

## 3. DTT アッセイの簡易迅速化

### 3.1 実験方法

#### 3.1.1 従来法<sup>4)</sup>

捕集後のフィルターを 10 mL の超純水で 30 分間超音波抽出後、0.5 mL の抽出溶液に 100 μM-DTT/0.1 M-リン酸緩衝溶液を 3 mL 加え、37°C で反応させた。一定時間ごとに反応溶液を 0.5 mL 採取し、0.5 mL の 10%-トリクロロ酢酸溶液を加え反応を停止させ、50 μL の 10 mM-DTNB/0.1 M-リン酸緩衝溶液と 0.4 M-トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン溶液(Tris)を 2 mL 加えて波長 412 nm における吸光度を測定した。

### 3.1.2 簡易迅速化 DTT アッセイ(本法)

DTT アッセイの簡易迅速化には FIA を適用した。FIA 装置図を Fig.2 に、操作方法を Fig.3 に示す。キャリア溶液として、10 mM-DTNB と 0.4 M-Tris の混合液を用いた。

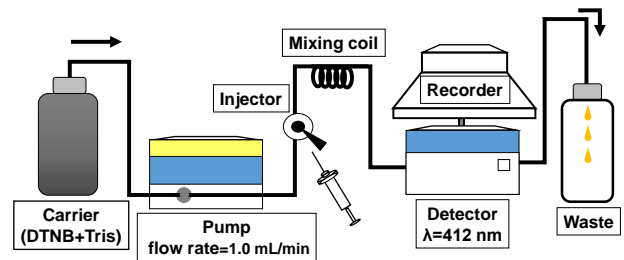


Fig.2 Schematic of the Flow Injection Analysis (FIA) for DTT assay.

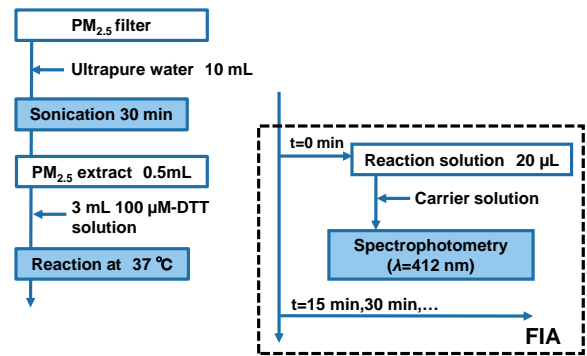


Fig.3 Flow chart of FIA based DTT assay method.

## 3.2 結果

### 3.2.1 DTT 濃度とピーク高さの関係

100 mL Tris 中に 2.5 mL の DTNB を加えたキャリア溶液では低濃度の DTT において water dip の影響を受けたが、この影響は DTNB の添加量を 500 μL に減らすことで相殺された。室温時に生じたベースラインの上昇はキャリア溶液を 4°C に冷却することで抑制された。また、DTT 濃度とピーク高さには良好な直線性が見られた(Fig.4)。

### 3.2.2 従来法と本法の比較

PM<sub>2.5</sub> を従来法と本法で測定したときの DTT 濃度の経時変化は従来法と本法で同傾向を示した。また、従来法と本法で測定したときの PM<sub>2.5</sub> の各 OP 間には相関関係が見られた( $r_{0.05,3}=0.893, p=0.04$ )(Fig.5)。

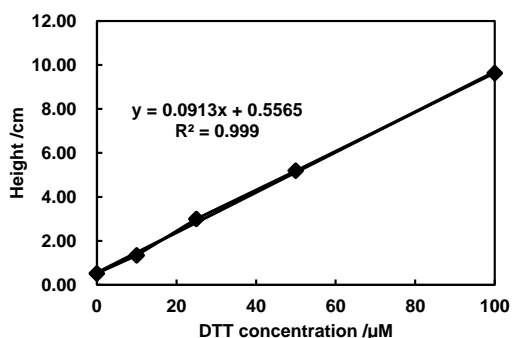


Fig.4 Relationship between DTT concentrations and peak heights obtained from FIA charts.

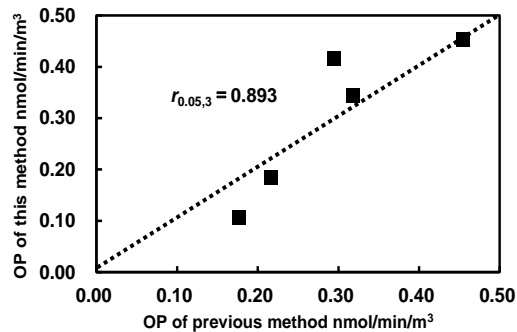


Fig.5 Comparison of measured OP between previous method and this method.

### 3.2.3 本法の利点

本法は従来法と比べ操作が簡便であり、従来法では必要な反応停止剤のトリクロロ酢酸溶液が不要となった。従来法では反応停止から分析を終えるのに10分要するが、本法では試料を送液してから分析を終えるまでの時間で30秒となった。

## 4. PM<sub>2.5</sub>の酸化能測定

### 4.1 実験方法

#### 4.1.1 PM<sub>2.5</sub>の捕集

東海大学湘南キャンパス17号館にて、2016年10月から週に最低1回、ハイボリウムエアサンプラー(柴田科学社製:HV-500R)を用いて恒量化済みの石英繊維製フィルター(アドバンテック東洋社製,QR-100)上に、流量500 L/minで24時間捕集した。捕集済みのフィルターを恒量化後、捕集前後のフィルターの重量差と通気流量からPM<sub>2.5</sub>濃度を決定した。

#### 4.1.2 酸化能の測定

酸化能の測定はFig.3と3.2に基づき行った。

### 4.2 結果および考察

屋外大気中PM<sub>2.5</sub>の濃度は6.0~76.4 μg/m<sup>3</sup>であり、うち日平均値35 μg/m<sup>3</sup>を超過した日を3回観測した。一方、酸化能は0.03~0.41 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>であった(Fig.6)。酸化能は冬から春にかけて増加し、春先に最大を示した。

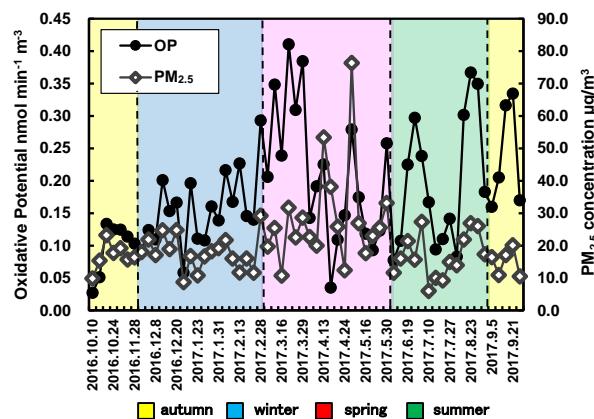


Fig.6 Variations in mass concentration of PM<sub>2.5</sub> and OP collected at the roof of university building (outdoor).

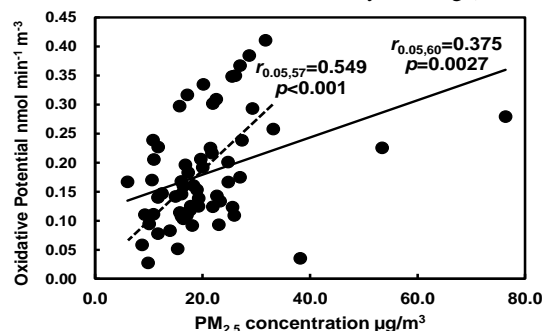


Fig.7 Relationships between PM<sub>2.5</sub> concentration and OP with and without high concentration episodes.

季節ごとに酸化能の平均をとると、春に酸化能が最も高くなり、夏>冬≧秋の順に酸化能が低くなった。また、PM<sub>2.5</sub>濃度と酸化能の関係をみると、PM<sub>2.5</sub>濃度と酸化能間には相関関係が見られ( $r_{0.05,60}=0.375$ ,  $p=0.0027$ )、日平均値超過日を除くとより高い相関関係となった( $r_{0.05,57}=0.549$ ,  $p<0.001$ )(Fig.7)。なお、日平均値超過日のPM<sub>2.5</sub>濃度が酸化能との相関関係を示さないのは、黄砂などの土壌粒子がPM<sub>2.5</sub>濃度の上昇には寄与したが、酸化能の上昇には寄与しなかったためであると考えられる。

## 5. まとめ

FIAを用いることでDTTアッセイの簡易迅速化が可能となった。また、屋外大気中PM<sub>2.5</sub>の酸化能は冬から春にかけて高くなり、日平均を超過した日を除くとPM<sub>2.5</sub>濃度と酸化能間に相関関係が見られた。FIAを用いたDTTアッセイは従来法に比べてより簡便であるため、PM<sub>2.5</sub>の酸化能測定の普及に効果を発揮するだろう。

### 【参考文献】

- 1) Sekine, Y., *Indoor Environment*, 17(1), 19-35(2014)
- 2) Cho, A.K., et al., *Environmental Research*, 99, 40-47(2005)
- 3) Kumagai, Y., et al., *Chemical Research in Toxicology*, 15, 483-489(2002)