

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「高感度質量分析計の開発と内分泌かく乱物質の分析」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

交久瀬 五雄(大阪大学 名誉教授)

主たる研究参加者

赤松 美紀(京都大学大学院農学研究科 教授)

和田 芳直(大阪府立母子保健総合医療センター研究所 所長)

上野 民夫(大日本除虫菊(株)中央研究所 顧問)

田村 淳(日本電子(株) 研究員(～平成17年3月))

井口 昌彦(浜松ホトニクス(株) 研究員(～平成15年3月))

3. 研究内容及び成果

内分泌かく乱作用が疑われている物質のほとんどは、分子量1,000以下の低分子化学物質である。

化学物質を感度良く検出・定量する方法としては、抗原-抗体反応を利用した分析法、吸光分析法等があるが、それらはある特定の物質に対してのみ有効であり、不特定多数の物質に対しては無力である。低分子物質の種類を問わず、感度良く測定する手法としてはガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)法がある。現在我国では、ダイオキシン測定の正式データは磁場型質量分析計で測定されたもの、とされている。GC-MS法は極めて強力な分析法ではあるが、多くの場合共試サンプルの濃縮・精製等の前処理が必要であり、前処理に多大な労力と費用が掛かっているのが現状である。GC-MS計の感度を10倍向上させる事が出来れば、同一前処理法での必要サンプル量は1/10になり、同一サンプル量の場合には前処理法の簡便化が期待出来る。

ある化学物質の内分泌かく乱作用の有無を論ずる場合、環境中での分解物、生体内での代謝産物等をも含めて議論する必要があるが、極微量の分析手法が欠如しているため、等閑視されているのが現状である。高感度質量分析計の開発、それを利用した高感度分析手法の確立は、作用物質本体の特定、作用機構の解明等にも貢献するものと期待される。

これらの背景から、本研究では①市販質量分析計の10倍以上高感度の磁場型質量分析計を開発する、②その代謝産物をも含めた化学物質の内分泌かく乱作用を検討し、構造活性相関を明らかにする、③高感度プロテオーム解析法を確立し、作用機構を解明する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1) 内分泌かく乱物質測定用高感度ガスクロマト質量分析計の開発(交久瀬グループ)

イオン源/縮小レンズ系/電場/磁場/ズームレンズ系/位置検出器で構成される磁場型質

量分析計を開発した。分解能2万、GC-MSとして用いた場合の感度はステアリン酸メチルで0.1ppb(0.1pg/ $\mu$ l)程度であり、市販質量分析計の感度を10倍以上上回る高感度質量分析計である事が確認された。

#### 1) 位置検出器

磁場型質量分析計では、イオンは電場と磁場で質量別に分離される。磁場強度を変えてイオンをスリットに集め、2次電子増幅管で信号に変えて検出する。スリットに集められたイオン信号のみが利用され、他のイオン信号は無駄に捨てられている事になる。写真乾板の様な位置検出器を用いれば、ある範囲内のイオンを同時に検出可能であり、高感度化が期待出来る。従来の写真乾板では、現像や黒化度測定等の煩雑な処理が必要であり、リアルタイムのデータが取れないという欠点があった。

イオンの位置と強度を同時に検出できるマイクロチャンネルプレート(MCP)、蛍光版、デジタルカメラ用CCDを組合せた2次元位置検出器を開発した。CCDは入力した光信号を蓄積して電気信号に換える事ができるため、CCD転送時間以外は有効にイオン信号を利用でき、ある程度の質量範囲内のイオンを同時に検出して時間積分する事により、感度が大幅に向上した。試作機には位置検出器と従来型スリット検出器の両者を装着し、検出器を上下させる事で真空状態を破らずに切替可能とした。

#### 2) イオン光学系

電場磁場等の主要部分は日本電子(株)JMS700(磁場先行型)の物を利用した。位置検出器には磁場を後方に配置する方が有利である。電場先行による不都合を以下のレンズ系を用いる事に依って改善した。

ターボレンズ系:電場先行配置によって1/5に低下した分解能を、イオン源出口直後に3つの四重極レンズで構成される縮小レンズ系(ターボレンズ系)を挿入する事に依って、磁場先行型と同程度に回復させた。従来の横方向の収束性に加え、縦方向の平行性が得られる様になった。

ズームレンズ系:位置検出器特有の問題として、ある質量範囲を詳しく見るための拡大像と広い範囲を見渡すための縮小像が必要となる。磁場通過後に質量分散を変える事が可能なズームレンズ系(四重極/八重極/四重極/六重極レンズで構成)を開発した。四重極の電圧変化で質量分散を変え、八重極で焦点面の湾曲を補正し、六重極でイオン収束面と位置検出器面とを一致させる、事に成功した。

#### 3) 性能評価

分解能:スリット検出器を用いた分解能検定では、ほぼ理論分解能通りの2万である事が確認された。位置検出器のズーム機能:Xeガスを用いてズーム機能を検定し、実測値が理論値にほぼ一致する事を確認した。

感度:GC-MS感度検定に繁用されているステアリン酸メチルを用いて較正曲線を求め、0.1pg/ $\mu$ l程度まで直線関係にある事を確認した。0.1pg/ $\mu$ l以下の場合には、メモリー効果(サンプルのGC壁面吸着・溶出)、カラムバック(近傍ピークからの雑音)が原因で、測定が困難にな

る事を明らかにした。

ビスフェノールA (BPA)を用いた実測: BPAはガス化を容易にするため、通常トリメチルシリル (TMS) 化してGCに供される。TMS化不用の実用測定可能濃度は1pg/ $\mu$ l程度である事を確認した。それ以下の濃度の場合には、質量分析計感度は十分であるが、メモリー効果、カラムバックによる信号嵩上げ、試薬由来のコンタミネーション等々に注意した測定が必要である事を明らかにした。

#### (2) DDT類縁体及び代謝物の性ホルモン受容体結合活性(赤松グループ)

内分泌かく乱物質の正確なリスク評価には、その代謝物、関連夾雑物をも含めた解析が必要である。

DDT類縁体の性ホルモン受容体結合活性は極めて微弱なものである事、化合物によっては代謝産物の結合活性が上昇する事、生体内では第I相代謝反応によって活性が上昇するが第II相代謝反応によって活性が低下する事、を明らかにした。

環境中に放出される内分泌かく乱物質としては、人工化学物質だけではなく、ヒトや家畜由来の天然女性ホルモン(エストラジオールE2)が重要であり、簡便な測定法が求められている。E2を固定化した表面プラズモンセンサー (SPRセンサー) を検出系として用いるnMオーダーの測定法を開発した。ラジオイムノアッセイに比べやや低感度であるが、洗浄操作等が不要で簡便な方法である。

内分泌かく乱作用の有無の予測に向けて、定性的ではあるが構造活性相関解析を行い、性ホルモン受容体結合に重要な役割を果す水素結合、疎水性相互作用等を明らかにした。

#### (3) 内分泌かく乱物質検定法の確立(上野グループ)

卵菌類遊走子の走化性を利用した内分泌かく乱物質検定法を確立した。自然界から採取された試料を直接測定でき、内分泌かく乱物質の環境中分布・動態を把握するための第一次試験として有効と思われる。

#### (4) ダイオキシン受容体関連分子の高感度プロテオーム解析(和田グループ)

視覚的感度限界である1ngまで解析可能な、ゲル電気泳動ベースの高感度プロテオーム解析法を開発した。分離部ゲル厚を1/2にして検出感度を10倍にし、ゲル長を2倍にして分離能向上を実現した。

ダイオキシン受容体(AhR)の無刺激及び活性化条件下での複合体プロファイリングを行った。タグを利用したプルダウン法で精製したAhR複合体をプロテオーム解析し、核内、ミトコンドリア膜、細胞質で会合する分子群多数と細胞内に数%しか存在しないと考えられている分子を幾つか同定した。二種類のタグを付加した遺伝子の細胞内導入とプロテオーム解析を組合せた手法は、細胞内の複雑なネットワークを解析する有効・強力な手法に成り得る事を明らかにした。AhR下流の遺伝子発現研究、AhRの新機能解析等に貢献するものと期待される。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

質量分析計の感度を飛躍的に向上させる事は容易ではないが、周到な計画と長年培った経験を基に、市販装置の10以上の感度を有する磁場型高感度質量分析計を開発した。類似の研究は国内外に殆ど無く、高く評価される。その過程で工夫・開発した位置検出器・ターボレンズ系・ズームレンズ系は、汎用性が高く、他の質量分析計の高感度化が可能である。開発した装置を用いた分析事例の蓄積が少なく、現状で実用面での評価を下す事は困難であるが、少数ではあるが実例で良好な結果が得られており、今後の展開が期待される。

研究成果は論文(国際誌47報、国内誌22報)、学会(国際学会22件、国内学会76件)発表されており、イオンビーム用縮小レンズ系/ズーム装置/質量分析計に関する特許が1件出願(日本出願)されている。

論文・学会発表が少なく、CREST成果としては残念な結果ではあるが、以下の状況を斟酌すべきものとする。装置開発を担当するグループの成果は開発物そのものであり、その性格から論文・学会発表が少ないのは止むを得ないものとする。他のグループは、高感度質量分析計の有効性検証とともに、高感度化によるブレイクスルーを目論んでいたが、機器開発完了までの間は既存装置を用いて検討せざるを得ず、十分な研究期間が無かった為、狙っていたような成果を挙げる事が出来なかったものと考えられる。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

ダイオキシンの公定測定法は、分解能1万以上の磁場型質量分析計を用いて測定する事になっている。

主たる目標は従来の磁場型質量分析計の高感度化であったが、分解能2万、従来品の10倍以上の感度を有する高感度質量分析計を開発した事は高く評価される。高感度化により、煩雑な前処理の軽減、試料の少量化が可能となり、環境汚染物質の測定等に大きく貢献するものと期待される。環境汚染物質の分析は社会的にも関心が高く、その為の技術開発として重要度は高く、目標を達成した事は高く評価される。高感度化と共に低価格化をも目標としていたが、既存品の頒布で生産数増加によるコストダウンが期待出来ず、達成が困難な状況に立ち至ったのは残念である。

新規開発したターボレンズ系、ズームレンズ系等の技術は、他の質量分析計(飛行時間型/TOFMS等々)にも応用可能であり、その感度向上が期待出来る。高感度化により、質量分析計の宇宙工学、半導体工学への応用等々、新たな展開が期待される。

当初の研究計画では開発した高感度質量分析計を用いて内分泌かく乱物質分析等での有用性を検証する事になっていたが、時間的(開発期間)、経済的(高価な試作品を複数作成する事の予算的制限)理由で、検討が始まったばかりであり、十分な成果が得られなかった事は残念である。そのためもあり、各グループが有機的連携を採って研究を進めたとは思えず、質量分析計開発一

本に絞った研究にすべきであったと思われる。機器が完成しなければ取り掛かれない研究が予定されていた事に対し、採択審査等の当初の段階から慎重に考慮すべきであった。この点に思いを致さなかった事を反省したい。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

宮下正弘氏は2003年、第3回環太平洋農薬科学会議で Poster Award 1<sup>st</sup> prize を受賞した。