

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

活性特異的濃縮基材と精密質量数による
内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法開発
(5-1552)

平成27年度～平成29年度

Development of an Endocrine Disruptor Screening System
Using Molecular Imprinting Materials and Exact Mass Spectrum

〈研究代表機関〉

国立研究開発法人国立環境研究所

〈研究分担機関〉

京都大学

平成30年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 活性物質多段階精密質量データベースの作成及び内分泌かく乱化学物質の迅速同定定量システム構築（国立研究開発法人国立環境研究所）	14
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-2 活性選択的濃縮基材の作製とそれを用いた一次スクリーニングシステム構築に関する研究（京都大学）	25
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
III. 英文Abstract	41

1. 成果の概要

課題名 5-1552 活性特異的濃縮基材と精密質量数による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法開発

課題代表者名 中島 大介（国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 曝露影響計測研究室 主席研究員）

研究実施期間 平成27～29年度

累計予算額 102,083千円（うち平成29年度：33,441千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード ヒトエストロゲン受容体結合活性、分子インプリント、液体クロマトグラフ-四重極型-飛行時間型質量分析計、精密質量、分子鑄型、活性濃縮基材

研究体制

- (1) 活性物質多段階精密質量データベースの作成及び内分泌かく乱化学物質の迅速同定定量システム構築（国立研究開発法人国立環境研究所）
- (2) 活性選択的濃縮基材の作製とそれを用いた一次スクリーニングシステム構築に関する研究（京都大学）

1. はじめに（研究背景等）

化学物質の内分泌系への作用に関する研究として、環境省はEXTEND2010(研究終了時にはEXTEND2016)を策定し、主として*in vivo*による環境リスク調査を推進している。一方で化学物質の持つ内分泌かく乱作用を評価するには、最終的に魚類や哺乳類の*in vivo*試験に供するため、1物質1億円ほど必要であり、その優先順位付けは極めて重要である。研究代表者らは、酵母を用いた迅速*in vitro*系による化学物質の一次スクリーニングを精力的に実施してきたが、これまでに評価できたのは約600物質にすぎない。したがって既存・新規化学物質の内分泌かく乱作用を迅速・簡易・安価に評価する方法の確立が求められている。

2. 研究開発目的

本研究の分担者らは、環境研究総合推進費（B-0806）において、分子鑄型を用いた水環境中微量汚染物質の選択的・高感度分析を達成してきた。従来の分子鑄型開発では、類縁物質の保持を防ぎ、目的の単一物質だけを如何に保持するかが課題であった。一方、この分子鑄型に化学物質が保持されるメカニズムは、内分泌かく乱作用のひとつである、「受容体結合活性物質が受容体と結合するメカニズム」と酷似している。異なるのは、受容体結合作用では本来のリガンドだけでなく、その類縁物質も受容体と結合してしまうことである。そこで本課題では、従来の分子鑄型開発の思想を逆転し、「リガンドと類似構造を持つ物質を広く保持する鑄型」を作製し、これへの保持力を分析化学的に測定することで受容体結合活性の一次スクリーニングを実現することを第一の目的とした。またこの分子鑄型を使用することで、環境媒体中に存在する内分泌かく乱物質の迅速同定定量を実現することが第二の目的である。代表者らが既に実施した約600物質の受容体結合活性結果から、陽性を示した物質の多段階精密質量データベースを構築しておき、環境試料をこの鑄型に通し、溶出させたピーク（活性物質）とマッチングさせることで迅速同定するシステムである。この系は実環境中において受容体結合活性(内分泌かく乱作用)を示す物質の種類及びその濃度の簡便測定を実現するものであり、曝露濃度側から*in vivo*試験に供すべき物質の優先順位付けに資するものである。以上のように、物質のハザード、環境中曝露濃度の両面から優先順位付けに貢献し、既存物質点検の加速に資することが本課題の全体目標である。

3. 研究開発の方法

(1) 活性物質多段階精密質量データベースの作成及び内分泌かく乱化学物質の迅速同定定量システム構築

約600物質に対し受容体結合活性試験を行った結果を基に、女性ホルモン様作用を示す物質の選定を行った。その結果、177物質がヒトエストロゲン受容体結合活性を示した。内訳としては本来の女性ホルモンである17beta-EstradiolやEstrinol、植物エストロゲン、合成女性ホルモン、BisphenolAなどの可塑剤、と多岐にわたる。これらの標準試薬をそれぞれ入手し、メタノールに溶解して標準溶液を調製した。測定機器としては精密質量を測定することが可能な液体クロマトグラフー四重極飛行時間型質量分析計(LC/QTOFMS)を使用し、スキャンモード(TOFモード)及びMSMSモード(QTOFモード)により測定を行った。LC/QTOFMSにはInertSustainC18カラムを分離カラムとして使用し、水-メタノール系の溶離液でグラジエント分析を行った。女性ホルモン様作用を示す177物質について保持時間及び多段階精密質量を測定した。測定の流れは以下の通りである。1) TOFモードで測定した際の分子量関連イオンピークの質量電荷比(m/z)及び保持時間を確認する、2) 1で得られた分子量関連イオンピーク及び保持時間を設定し、QTOFモードのTargeted MSMSを行う。コリジョンエネルギーを段階的に変化させ、それに伴って変化するプロダクトイオンを確認し、各物質の保持時間、プレカーサーイオンとなる分子量関連イオンピーク、プロダクトイオン、フラグメントパターンをデータベース化した。その結果を解析ソフトへ搭載し、環境水試料を測定した結果からhER結合活性物質を高精度に同定し、半定量するスクリーニング法を確立した。

さらにサブテマ2で作製した活性選択的濃縮基材通液前後の両者のクロマトグラムを減算し、差分ピークを検出するためのExcelアドオンを開発した。これはTOFモードで測定した2群のクロマトグラムについて保持時間と各ピーク強度の補正を行った上で減算し、有意差のあるピークを両者のクロマトグラム群から探し出すものである。サブテマ2で作製した活性選択的濃縮基材は女性ホルモン様作用を示す物質群を構造の特徴から選択的に吸着するものであるため、hER結合活性強度の強い物質は濃縮基材に吸着しアセトニトリルのような溶媒で溶出しきれない可能性がある。この差分ピーク検出ソフトウェアは活性選択的濃縮基材に強く吸着して溶出できなかった物質の探索に用いる。即ち通液前の環境水試料を測定した結果を“Sample”とし、その環境水試料を濃縮基材に通液した際に吸着されずに通過した試料の測定結果を“Blank”とした場合、「Sample(全ての物質) - Blank(濃縮基材に吸着されなかった物質)」の減算を行うことで、基材に強く吸着した物質を検出することができる。

また日本国内で50検体の環境水試料を採取し、それぞれを活性選択的濃縮基材に通液し基材の性能検証を行った。試料は関東地方、東海地方、近畿地方、九州地方の河川水や下水処理場からの排水である。その各試料をガラス繊維フィルタによりろ過し浮遊物質を除去した後、C18固相抽出ディスクで濃縮し、100倍濃縮した試料(C18)を加圧式シリンジポンプでカートリッジタイプのMIPに通液し、MIPに吸着したサンプル(Trap)、吸着されずに通過したサンプル(Pass)の3種の試料を生物活性試験及びLC/QTOFMS分析に供した。

最終形として高通水性化した耐圧カラムに充填したMIPと2種のスイッチングバルブを組み合わせ、全自動迅速同定定量オンラインシステムを組み、環境水試料に適用した。全自動システムにおけるバルブ1はMIPへ通液する試料や溶媒の選択に使用し、バルブ2はMIPへの試料の通液と濃縮した物質の溶出のための流路選択に使用した。バルブ2では、AポジションとBポジションに切り替え可能であるが、まずMIPとバルブ2の設定を検討した。これらの組み合わせをスイッチングバルブ制御用ソフトウェアで制御・管理し、オンラインシステムに組み込んだMIPに2~5 ml/minで試料や洗浄溶媒を通液するメソッドを構築した。このオンラインシステムに、サブテマ2から提供された通常のMIP、高通水性MIP2種(スポンジタイプ及びシリカゲル表面修飾タイプ)を接続し、自動分析を試行した。茨城県内で採取したヒトエストロゲン受容体結合活性試験で陽性を示した下水処理場排水を構築した全自動システムに適用した。

(2) 活性選択的濃縮基材の作製とそれを用いた一次スクリーニングシステム構築に関する研究

濃縮基材の合成と評価

基本的な活性選択的濃縮基材の合成のレシピとして、ポリマーマトリックスとしてPEG架橋剤、擬似鑄型分子としてエストリオール (E3)、親水性機能性モノマー、疎水性モノマー、多孔質化溶媒、ラジカル重合開始剤を全て混合し、溶液が均一になるまで攪拌した。その後、窒素バブリングを10分間行い、40 °Cで24時間重合を行った。得られたポリマーを粉砕器で粉砕し、ふるいを用いて25~105 μmに分級した後、種々の溶媒を用いて濃縮基材 (MIP) を洗浄し、鑄型分子と未反応物質を除去した。同様に、鑄型分子を含まないポリマー (Non imprinted polymer、NIP) も合成した。

得られたMIP、NIPは、バッチ吸着法及びSPEによって吸着性能を評価した。バッチ吸着法においては、ポリマー10 mgを17β-estradiol (E2)、E3、4-*tert.*-butyl phenol (4TBP) の100 ppb溶液10 mLに分散し、24時間攪拌した後の上澄み液をLC-MS/MSで分析することで、吸着した各溶質を定量した。固相抽出 (SPE) 評価については、100 mgのMIPを充填したカートリッジ及び市販のODSカートリッジ (Sep-Pak® Light C18、ウォーターズ) に対して、E2、4TBPの1.0 ppb溶液を100 mL通液し、アセトニトリル (0.5 mLずつ) を用いて吸着物を回収した。「素通り」及び「アセトニトリル分画」をLC/MS/MSを用いて分析し、各溶質濃度を定量した。また、ODSカートリッジとの比較実験の予備的検討として、SPEにおける操作方法について、圧力及び流量の違いによる回収率の違いを評価するとともに、溶出条件を詳細に評価することで、MIPとNIPでの吸着選択性についても合わせて実験を行った。圧力の違いについては、減圧方式と加圧方式をそれぞれ行い、各方式における流量を制御した。溶出条件については、MIP、NIPそれぞれのSPEカートリッジからのアセトニトリル分画中に含まれるE2、E3、4TBPをすべてLC/MS/MSで定量し、各分画に含まれる割合を比較した。

濃縮基材を用いた実試料濃縮とLC/QToFMS分析及びバイオアッセイ

試料は2018年1月4日9:50頃に土浦下水処理場 (36.084229N 140.217009E) からの放流水を3 Lのポリタンクに採取した。試料1000 mLをメスシリンダーで計量し、サンプリング後すぐにガラス繊維フィルタで浮遊物質の除去を行った。試料は固相抽出ディスクSDB (Empore SDB-XD 2242) で濃縮し、そのディスクを6 mLのメタノールで抽出し、窒素ガスで乾固させた。この乾固物に1 mLのメタノールを加えし溶解し、そのうち0.5 mLを分取し100 μLまで窒素ガスにより濃縮したものをSDB-ConcとしてLC/QToFMS分析及び生物活性試験へ供した。また、再溶解した残り試料0.5 mLを、超純水で50 mLにメスアップした。これを環境試料としてアセトニトリルと超純水でコンディショニングしたMIPカートリッジにロードした。コンディショニング・サンプルのロード・溶出時はMIPカートリッジの上部に50 mLのシリンジ (SS-50ESz) を繋ぎ、そのシリンジをシリンジポンプで加圧することで通液した。シリンジポンプ (株式会社YMC、YSP-201) は0.5 mL/minに設定した。MIPを素通りした試料を、再度固相抽出ディスクSDBで濃縮・抽出・乾固し100 μLにメタノールで再溶解したものをMIP-Passとした。また、MIPに吸着した物質は約6 mLのアセトニトリルで溶出し、乾固させたものに100 μLにメタノールを加え再溶解しMIP-Concとした。また、同試料を酵母ツーハイブリッドアッセイ (Y2H) を用いて評価し、human ERにおけるアゴニスト活性を、E2濃度として定量した。最後に、LC/QToFMSで検出された既知ER陽性物質の濃度をEG×10方式で定量し、バイオアッセイでの活性値への寄与率を考察した。

4. 結果及び考察

(1) 活性物質多段階精密質量データベースの作成及び内分泌かく乱化学物質の迅速同定定量システム構築

1. 多段階精密質量データベースの作成

本課題での最終目標のひとつは、ヒトエストロゲン受容体 (hER) 結合活性物質を特異的に捕集できる工学的基材を用いて環境水試料を濃縮し、その濃縮液を多段階精密質量測定に供し、活性既知の物質は

高精度に同定定量し、未同定の物質は構造推定を行うことである。そのためにまず活性既知の物質について多段階精密質量データベースを作成し高精度な同定の方法を確立した。今回我々が作成した精密質量データベースでは、その同定精度を向上させるため、可能な範囲で多段階の開裂情報があることが望ましい。使用する質量分析計は四重極飛行時間型質量分析計 (QToFMS) であることから、プレカーサーイオンとそれをコリジョンで開裂させたプロダクトイオンの2段階の精密質量情報が得られる。今回のデータベース作成は以下の手順で行った。まず、LC/QToFMSのTOFモードで分子量関連ピークを測定しプレカーサーイオンを決定し、その精密質量を得た。続いて、決定したプレカーサーイオンをコリジョンセルで開裂させるQTOFモードでMSMS測定を行い、フラグメントパターンを得た。測定モードについては、測定対象物質の構造からその多くがネガティブモードで検出可能であると推定されたため、まずネガティブモードで測定し、検出できなかったものをポジティブモードで測定した。いずれのモードでも検出できなかったものは、LC/MS/MSまたはGC/MS/MSでの検出条件を検討した。LC/QToFMSのTOFモード測定により、143のアゴニスト物質のうち121物質のプレカーサーイオンの精密質量 (小数点以下2桁まで) が得られた。このように、測定対象である147物質の精密質量測定を実施したところ、うち121物質がLC/QToFMSにより測定可能であることが判明した。LC/QToFMSで検出ができなかった物質はエレクトロスプレー (ESI) ではイオン化されない、またはイオン化効率が低い等、その化学構造に原因があると考えられる。続いてこれまでに測定して得られている各物質の保持時間とプレカーサーイオンを設定し、MSMSモードでプロダクトイオンスクリーンを行った。コリジョンセルにかかるエネルギーは10~50 eVの間で10 eVごとに変化させ、そのときのプレカーサーイオンとプロダクトイオンのシグナル強度からフラグメントパターンを確認した。以上の測定結果よりプレカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせに加え、コリジョンエネルギーの変動に伴うプレカーサーイオン及びプロダクトイオンの精密質量の変化をデータとして取得した。以上の結果を一物質毎のデータシートと一覧としてまとめ、Microsoft社製Excel及びAccess上でのデータベースを作成した (別添資料-1, -2, -3参照)。また34のアンタゴニスト物質のうち20物質についてもLC/QToFMSで検出が可能であったため、同様にデータベースを作成した。

2. 差分ピーク検出ソフトの作成

差分ピークを描く方法として、測定により得られたTotal Ion Chromatogram からAgilent 社製 MassHunter ソフトウェアのデコンボリューション機能により化合物毎の保持時間、ピーク体積、質量電荷比等の情報を得た。その情報をCSVファイルに出力し、保持時間と質量電荷比の齟齬をアライメント機能により補正した後、サンプルの各ピーク体積からブランク各ピーク体積を差し引いた。差分ピークを描画する際に本質的に必要な情報は、デコンボリューションにより抽出・アライメントされたピークのID (保持時間と質量電荷比) と差分強度であり、クロマトグラム同士の減算図作成は困難なうえに必須でないと考えた。そこで本ソフトウェアでは、差分ピークの簡易的なイメージ図としてクロマトグラムを棒グラフ化して表現することとした。この差分ピーク検出ソフトの性能検証のため環境水試料を用い、既知物質の添加及び未添加試料を調製してLC/QToFMS測定し、その添加物質を差分ピークとして検出することを試みた。河川水を用いてメソミル、ピリミカルブ、イマザリルのd体3種を添加し検証した。その結果、添加した物質のうち2種類を除き有意差のあるピークとして検出され (1種類はイオンサプレッションにより検出できなかった)、差分検出ソフトは簡便に2群間の差分を取ることが確認された。なお、1種類は添加したものの検出されず、イオンサプレッション効果によりピーク強度が減少したためと判断した。これまでMIPに捕集された物質はMIPから溶出して測定することしかできなかったが、本ソフトウェアの利用によってMIP通過前後のクロマトグラムから消失または減衰したピークを識別できるようになった。MIPに強く吸着して溶出してこないピークも識別が可能であり、本研究課題の遂行に有効な手段である。また本ソフトウェアは、平時と事故時の測定データからの異常ピーク検出等にも活用が可能である。

3. 50検体の環境試料を用いたMIPの性能検証

これまでの検討から、カートリッジタイプのMIPにおいてhER結合活性物質の80%を超える捕集率を確

認したが、環境試料では採取する場所や地域によって活性値が異なるだけでなく、それぞれが含有する化学物質の種類や組成が異なる可能性がある。したがって本基材が一般的に適用可能かどうか、多くの実試料で検討する必要がある。そこで、約50検体の未知環境試料を採取し、それぞれの試料ごとに酵母アッセイによるhER及びヒト・構成的アンドロスタン受容体（CAR）結合活性のスクリーニングとLC/QToFMSによる測定を行いMIP基材の性能検証を行った。MIPカートリッジの検証試験に用いた検体の内訳は、一般的な河川水や用水（河川水）36検体、下水処理場排水直下の環境水（STP排水）8検体、STP排水口から数百メートル下の河川水（STP河川水）3検体、及び熊本市街地地下水の観測用井戸水（地下水）2検体の合計49検体である。河川水36検体のC18固相による抽出物からhER結合活性は18検体（50%）で検出され、STP排水及びSTP河川水11検体からは河川水に比べて強い結合活性が全ての検体から検出された。C18固相抽出物を水溶液化してMIPカラムに通水したところ、C18固相抽出物で陽性を示した全試料でMIPカートリッジの吸着（Trap）画分でhER結合活性が検出され、通過（Pass）画分では2検体を除いてすべて陰性だった。なおPass画分で陽性を示した試料はいずれも下水処理場排水であり、hER活性が高いサンプルであった。hER結合活性のスクリーニングでは、C18固相抽出物とTrap画分で得られた結合活性の回収率（Trap/C18）は陽性試料の平均で97%であり、活性のほぼ全てがTrapに捕捉された。一方、比較のためにCAR結合活性も同試料を用いてスクリーニングしたところ、活性は全試料から検出され、Trap画分で得られた結合活性の回収率（Trap/C18）は平均して約50%に過ぎず、多くの試料でPass画分からもCAR結合活性が検出された。環境水試料中にhER結合活性物質とCAR結合活性物質が混在していると想定すると、今回のバイオアッセイのデータから、MIPはhER結合活性物質をほぼ選択的に捕集する一方、CAR結合活性物質の捕集は選択的でないことを示唆した。なおTrap画分からもCAR結合活性が検出されているのは、hER結合活性物質の多くがCAR結合活性を示すことによるものと考えられた。

また、LC/QToFMSによる各試料の測定を行い、MIPの精製効果を俯瞰する意味で、2つの指標を算出した。まず、MIP へのどのくらいの物質量が捕集されたか、という指標として[MIP に吸着された（Trap）試料から得られたピーク体積の総和] / [MIP通水前（C18）の試料から得られたピーク体積の総和]を算出した。これを「捕集率」とするが、約50検体の平均値は45.4%であった。すなわち、MIP に捕集された量は半分弱ということになる。一方、MIPに捕集されずに除去された物質量の指標として、[MIP に吸着されずに素通りした（Pass）試料から得られたピーク体積の総和] / [MIP 通水前（C18）の試料から得られたピーク体積の総和]を算出し、「除去率」とした場合、約50 検体を通して80%を超えるものが多く、その平均値は108%であった。MIP を通過させることによって環境試料が精製され、それぞれの試料測定の際のイオンサプレッション(夾雑物質によるイオン化の抑制効果)が低くなることから、Trap と Pass のピーク体積の和は、元のC18 を超える傾向にあることに注意する必要がある。いずれにしても、MIP による選択的精製とイオンサプレッションの抑制の両方の効果が認められた。

4. オンラインシステムの構築

50検体の環境試料を用いたMIPカートリッジによるhER結合活性の選択的捕集は確認できた。オンラインシステムの構築にあたりサブテーマ2より提供を受けた耐圧カラムにMIPを充填したカラムタイプMIPと、シリカゲル表面でMIPを生成させたハイブリット体MIPの性能をhER結合活性物質の標準混合溶液を用いて比較した。その結果、いずれのMIPカラムでもhER結合活性物質の回収率は概ね80%以上であり、MIPカートリッジと同程度の捕集性能を持つことが分かった。カラムタイプMIPとハイブリット体MIPの回収率を比較すると、カラムタイプMIPの方が高い回収率を示したが、MIPの含有量が多いためと考えられた。次に選択性について検討した。hER結合活性を示さない環境試料にhER結合活性が陽性を示す物質の標準溶液を添加し、カラムタイプMIPと選択的濃縮性能を持たないC18カラムに通液した後、アセトニトリルで溶出したものを濃縮してLC/QToFMSにより測定した。その結果、MIPカラムに通液した試料からはC18カラムのそれに対して検出されたピーク数は1/2程度と少なかったことから、MIPが選択的に活性物質を濃縮していると考えられた。また、添加したhER結合活性物質のピーク強度を各試料とで比較すると、MIPを通過した試料の方がピーク強度が大きく、MIPの精製効果によりイオンサプレッションが抑えられたと考えられた。以上の結果から、カラムタイプMIPはカートリッジタイプMIPと同程度の性能を持つこと示

された。

次に構築したオンラインシステムを使い、カラムタイプMIPからの溶出条件を検討した。アセトニトリル100%を1分間通液して溶出した後、水・メタノール系のグラジエント分析を開始するメソッドを確立した。このオンラインシステムを環境試料に適用した。

(2) 活性選択的濃縮基材の作製とそれを用いた一次スクリーニングシステム構築に関する研究 濃縮基材合成の最適化

hER模倣のMIPを合成するために、本研究では、以下の3つの項目について、MIP合成の最適化を行った。

1) タンパク質に類似する親水性マトリックスの選定、2) 水酸基と効果的に相互作用する機能性モノマーの選定、3) 局所的な疎水環境を構築するための疎水性モノマーの選定。これらの課題について、順次評価を行った。なお、MIP合成における鑄型分子には、ER活性が最も高いE2と構造が類似するE3を採用した。

1) 親水性架橋剤を最適化するために、PEGを基材としたジアクリレートとジメタクリレートを用いてポリマー粒子を合成し、得られたポリマー粒子に対するE2の吸着をバッチ吸着法によって評価した。予想された通り、エチレンオキシド数が増加するにつれて、E2の吸着が抑制されており、さらに、メチル基の有無に伴って、ジアクリレートでの吸着が抑制されていることが分かった。以上から、E2の非特異的な疎水吸着を抑制できる架橋剤として、PEG ジアクリレート ($n=9$) を架橋剤として選定した。

2) 親水性の機能性モノマーの選定を行った。通常、アルコール性あるいはフェノール性の水酸基は、カルボン酸やアミド基と水素結合を形成することが知られている。そこで、種々の酸性モノマーとアミドモノマーを含むポリマーを合成し、E2、E3に対するバッチ吸着評価を行った。E2、E3のいずれに対しても、メタクリル酸 (MAA) を用いたポリマーにおいて、高い吸着能が見られた。このことから、MAAにおけるカルボキシル基と水酸基との水素結合による相互作用の可能性が示唆された。そこで、これを確認するために、NMRを用いて水素結合の有無を評価した結果、それぞれの水酸基に帰属するピークの消失、アルコール性水酸基の根本のピークのカップリングの変化、が確認されていることから、E2内のそれぞれの水酸基は、カルボキシル基に対して強く水素結合していることが明らかとなった。以上から、以後の評価においては、MAAを最適モノマーとして使用した。

さらに、詳細なMIP合成の最適化のために、架橋剤のエチレンオキシド数、重合における多孔質化溶媒についても、検討を行った。その結果、架橋剤にPEG ジアクリレート ($n=4$) を用いた場合に高い選択性が得られた。これは、架橋剤のスペーサー部位が長すぎると、分子認識部位が緩くなりすぎたためであり、親水性、認識能発現の立場から、PEG ジアクリレート ($n=4$) が最適な架橋剤であると判断された。次に、重合時の多孔質化溶媒として、塩酸水溶液を含む溶媒と用いた場合に、高い選択性が見られた。これは、酸性条件にすることで、モノマーとして用いたMAAのカルボキシル基がプロトン化され、水素結合の発現が有利なためであると考えられる。さらに、後述の疎水性モノマー導入の際には、水環境があるときに疎水性モノマーと鑄型分子の相互作用が有利になると予想された。そのため、以後の評価では塩酸水溶液とジメチルホルムアミド (DMF) の混合溶媒を多孔質化溶媒として用いた。

3) 上記までの検討での最適化条件を基に、疎水性モノマーの検討を行った。架橋剤にPEG ジアクリレート ($n=4$)、機能性モノマーにMAA、多孔質化溶媒としてHCl aq./DMF、鑄型分子にE3を用いて、種々の疎水性モノマーを含むMIP及びNIPを合成し、E2、E3、4TBPに対する吸着能を評価した。phenoxy polyethyleneglycol acrylate (AMP) を含むMIPにおいてのみ、E3に対する吸着選択性が確認された。このことから、スペーサーを介した疎水性モノマーにおいて、自由度が高い疎水部位が構築され、その結果、高い選択性が得られたと予想される。次に、AMPを含むMIP、NIPを用いた溶質の吸着選択性評価の結果から、ER非活性の4TBPについては、いずれのポリマーでも同等の吸着が見られているのに対して、ER活性物質であるE2、E3では、MIPにおける高い吸着能が確認された。ここで、それぞれの溶質の疎水性を示すオクタノール/水分配係数、 $\log_{10}K_{ow}$ は、E2、E3、4TBPそれぞれについて、4.0、2.5、3.3であることから、MIPにおける吸着が疎水的な支配ではなく、分子選択的な吸着であることがわかった。

SPE条件の最適化

水環境試料の分析では、通常SPEによる濃縮操作が必要不可欠である。そこで、上記で最適化したMIPを用いて、SPEにおける吸着能を評価した。通常、SPEを行う際には、試料をロードする際の流量や圧力条件が最終的な回収率に大きく影響する。市販されているSPE吸着剤について、比較的広範囲の条件において同等の回収率が保証されているが、実験室レベルにおいては、検討が必要である。そこで、上記のMIPにおけるSPE条件を決定するために、流量と圧力に関する最適条件を検討した。圧力の調整としては、ダイヤフラムを用いた減圧方式、シリンジポンプを用いた加圧方式を採用し、それぞれにおける流量を制御しながら、10 ppbのE2、4TBPを含む試料をロードした。その後、アセトニトリルでの分画中の溶質濃度を定量し、各条件での回収率を比較した。その結果、予想された通り、回収率は、高流量<低流量、減圧<加圧において、高くなった。この理由として、作製したMIPには、ナノメートルレベルの微細な細孔が形成されており、さらに、その内部に分子レベルの認識部位が構築されている。そのため、できる限り溶液との接触効率を高くする必要があり、遅い流れの中で、細孔内部まで溶液が到達できる程度の圧力がMIP全体にかかる必要がある。以上のことから、SPEの試料ロードは低流量及び加圧条件が最適であると判断した。

次に、SPEでの吸着選択性を確認するために、MIP及びNIPを充填したSPEカートリッジを用いて、E2、E3、4TBPの吸着選択性を評価した。4回のアセトニトリル分画における各溶質の積算回収率を比較した結果、最終的な回収率としては、MIP、NIPにおいて大きな差を確認することはできなかった。しかしながら、各分画における溶出の割合を比較すると、NIPでは、1st分画にほとんどのE2、E3が溶出したのに対して、MIPでは、2nd分画以降での割合がわずかに大きくなっている。これは、MIPにおいて、E2、E3が強く保持されていることを示唆しており、潜在的な吸着能はMIPにおいて高くなったことを示したと考えられる。

これらのSPE評価結果から、MIPでの吸着選択性の確認とSPEの最適操作条件を決定した。そこで、一般的にhER活性試験の試料前処理として用いられているODSカートリッジとMIPカートリッジの比較を行った。溶質として、E2と4TBPを用いて濃縮を行い、上記と同じく少量のアセトニトリルで溶出した。溶出分画に含まれるそれぞれの溶質を、LC/MS/MSで定量した。MIP及びODSの結果から、ODSでは、単純な疎水性の強弱の違いで試料が濃縮されていたことが分かった。一方、MIPでは非活性の4TBPの吸着は抑えられており、それに対してE2は強く吸着されていることが示唆された。以上のことから、バッチ吸着評価と同様に、MIPはhER活性物質に対する吸着選択性を有していることが示唆された。

濃縮基材を用いた実試料前濃縮

上述において、新規に作製したMIPを用いたSPEによって、hER活性物質の選択的な濃縮の可能性が示唆された。そこで、その機能を実証するために、実試料として下水処理場の排水付近で採取した試料を用いたSPE濃縮を行った。SDBを用いた一般的な手法による濃縮を行い、その試料をMIP-SPEを用いて処理することで、濃縮分画試料のhER活性試験、LC/QToFMSによる物質同定を行った。SDBでの濃縮分画、MIPでの濃縮分画、MIPの素通り分画の略語は、それぞれ、SDB-Conc、MIP-Conc、MIP-Passとする。各分画の濃縮後の写真を比較すると、MIP-Concでは、SDB-Concに見られる着色がほぼ見られず、MIP-Passに抜けていることが分かった。これらの試料を用いて、まず、酵母ツーハイブリッドアッセイによるhER活性評価から、得られた活性値は、E2濃度に換算して、SDB-Conc、MIP-Concで、それぞれ、3.1 ppt、3.7 pptであった。つまり、MIP-Concにおいては、SDB-Concで確認された活性よりも120%の値を示している。これは、SDB-Concにおいて、多量の疎水性夾雑成分が、活性物質と複合化することによって、正確な活性シグナルを妨げていることが予想された。そこで、次に各分画のLC/QToFMS分析を行い、各分画に含まれる成分を比較した。

各分画でのMSクロマトグラム比較の結果から、MIP-Concでは、SDB-Concと比較して、ピーク量が25%程度まで減少していることが分かった。さらに、MIP-Concでは、既知のhER活性物質が複数確認されているが、SDB-Concでは、低濃度あるいは未検出であることが分かった。これらの結果から明らかのように、MIPを用いることで、疎水性の夾雑成分が大幅に除去され、hER活性値の向上、質量分析計におけるイオ

ンサプレッション等の検出妨害の抑制が可能となった。しかしながら、質量分析の結果から得られた活性物質の総量では、バイオアッセイにおける活性値を説明することが依然として困難である。つまり、MIPでの濃縮分画の中には、MSでは同定されていない活性成分が含まれている可能性が高く、さらなる検討が必要であると考えられる。

以上のように、本研究で得られた新規MIPは、hER活性選択的な吸着能を有しており、環境試料中の活性物質の選択的濃縮に極めて効果的であることが明らかとなった。現時点では、サブテーマ（1）のデータベースのみでは説明できないhER活性値が得られていることから、今後、本活性選択的濃縮基材を用いて、未知活性物質の同定を行うことで、新たな候補物質の探索に寄与すると予想される。また、同概念は、他の受容体結合物質に対しても応用可能であると期待され、環境スクリーニングの革新的な手法として活用されることが期待できる。

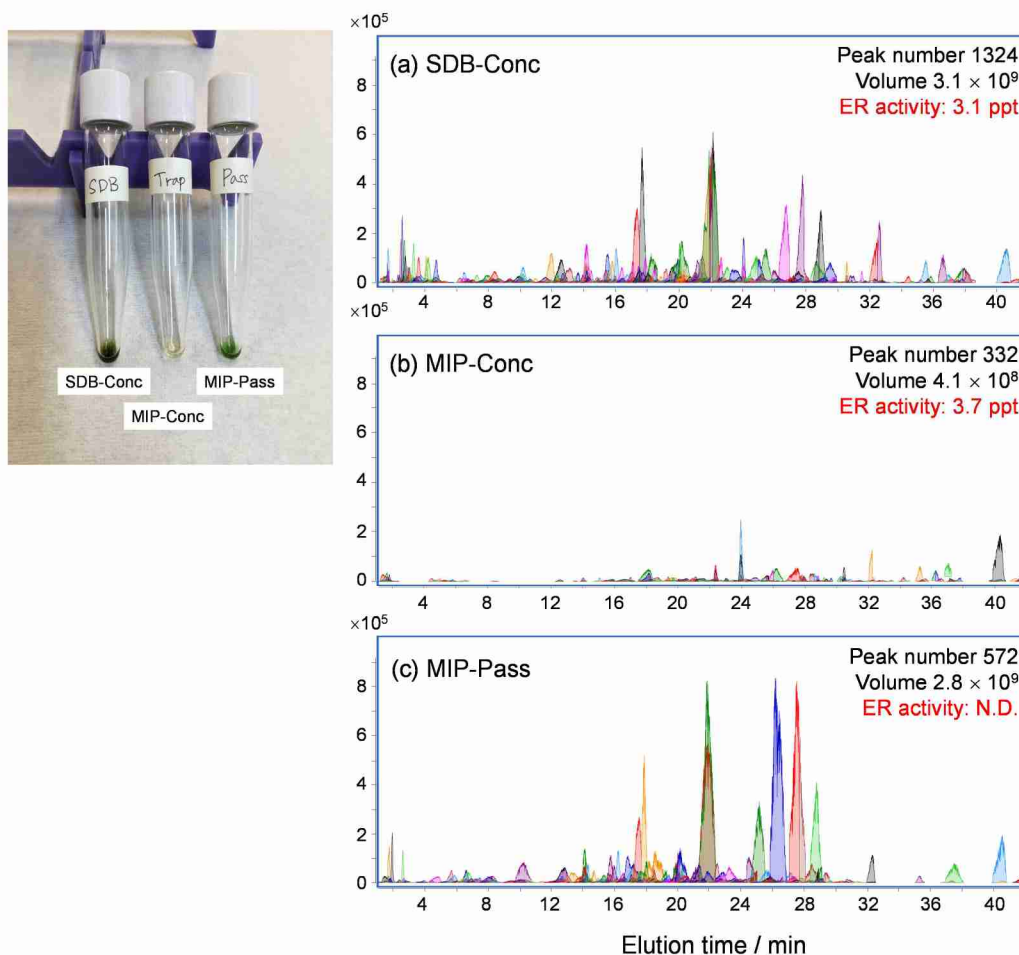


図. 濃縮分画のMS重ね書きクロマトグラム

(a) concentrated by SDB cartridge, (b) concentrated by MIP, (c) passed through from MIP. Each chromatograms are overwriting with all the peaks of the detected compounds.

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究で得られた活性選択的な濃縮基材は、既報の分子インプリント法に対して、親水性マトリックスと局所的な疎水環境を導入した、全く新規な吸着基材開発の概念である。この概念は、受容体などのタンパク質が発現する分子認識を模倣する手法として科学的な新規性が高い。また、既存の疎水性吸着剤と比較して、水環境試料の分析前処理として、通常問題となる非特異吸着を最大限抑制できることから、環境分析における分析対象物質の絞り込みと未知物質の同定などに寄与すると期待できる。そのため、環境研究における新たなツールとして環境汚染化学物質の探索研究に貢献できる。

また活性物質の同定に使用したフラグメントパターンの精密質量データを用いる高精度同定法では、従来の定量に使われているトリプル四重極型質量分析計によるMRM測定よりも誤同定（擬陽性）が生じにくい。本法による141種の陽性物質のデータを提示したことは、当該物質群の一斉分析において活用が期待され、これらの成果の学術的意義は高いと考えられる。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

本研究では、活性選択的な捕集基材を開発した。これを用いることにより、将来的に以下のことが実現する可能性がある。

- ① 生物学的なスクリーニングに替わる化学物質の迅速・安価な工学的評価
- ② 環境試料からの受容体結合活性物質の選択的に補足・濃縮。効率的な分析時のきょう雑物質除去
- ③ 環境試料等に適用し、捕集された物質には活性がある可能性が高く、これまで活性未知だった物質を新たに検出できる可能性がある。環境中から検出された未知ピークをLC/QToFMS等により化学同定することで、活性既知の物質を対象としたEXTEND2016に対し、下流側からの候補物質選定スキームを補完できる
- ④ 発生源における化学物質の網羅的除去技術

また本研究で提示したエストロゲン受容体結合活性物質の一斉分析法のパラメータは、環境実態調査等への活用も見込まれる。これにより、従来、代表的物質に限られていた環境中の活性物質の濃度測定から、網羅的一斉分析への転換が可能になる。なお今回構築した分析系では、未知物質の構造推定を考慮してLC/QToFMSを利用しているが、高い同定精度が得られる反面、LC/MS/MSによるMRM測定と比較して感度が劣るという課題がある。そこで、本研究を基礎として、MIPカラムを搭載した全自動前処理システムをLC/MS/MSに繋ぎ感度の向上を図れば、環境中の微量なエストロゲン受容体結合活性物質の定量にも活用可能である。

また本研究の中で作製した差分ピークの検出ソフトウェアは、同等の機能を有するものは存在しない新たなツールである。本研究ではMIPから溶出しきれていない物質の探索に用いることを目的としていたが、他の用途での活用も期待される。例えば河川の流出事故や災害時において、上流と下流試料の差分（位置的に異なる試料の差分）からの汚染源の特定、発災前後の差分（時間的に異なる試料の差分）からの異常検知やその要因物質推定などへの活用が期待される。

なお本研究で開発した活性選択的な吸着剤は、モデルとして用いたエストロゲン受容体に留まらず、現在問題となりつつある甲状腺ホルモン活性物質等への応用も可能である。今後、内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法として、現在の生物学的な手法に替わる簡易・低コストの手法として、公定法等への採用も期待できる。

6. 研究成果の主な発表状況

（１）主な誌上発表

＜査読付き論文＞

- 1) T. KUBO, S. ARIMURA, Y. TOMINAGA, T. NAITO, K. HOSOYA and K. OTSUKA: *Macromolecules*, 48, 4081–4087 (2015). “Molecularly Imprinted Polymers for Selective Adsorption of

Lysozyme and Cytochrome c Using a PEG-Based Hydrogel: Selective Recognition for Different Conformations Due to pH Conditions “

- 2) T. KUBO, K. KOTERASAWA, T. NAITO and K. OTSUKA: *Micropor. Mesopor. Mater.*, 218, 112–117 (2015).
“Molecularly Imprinted Polymer with a Pseudo-template for Thermo-responsive Adsorption/desorption based on Hydrogen Bonding”
- 3) T. KUBO, Y. MURAKAMI, M. TSUZUKI, H. KOBAYASHI, T. NAITO, T. SANO, M. YAN and K. OTSUKA: *Chem. Eur. J.*, 21, 18095–18098 (2015). “Unique Separation Behavior of a C60-fullerene Bonded Silica Monolith Prepared via an Effective Thermal Coupling Agent”
- 4) T. KUBO, Y. MURAKAMI, T. NAITO and K. OTSUKA: *Chromatography*, 36, 105–113 (2015).
“C60-Fullerene Bonded Silica Monolithic Capillary for Specific Separations of Aromatic Compounds”
- 5) T. KUBO, S. ARIMURA, T. NAITO and K. OTSUKA: *Mol. Imprinting*, 3, 18–25 (2015) “Selective adsorption of trypsin using molecularly imprinted polymers prepared with PEG-based hydrogels containing anionic functional monomers”
- 6) T. KUBO and K. OTSUKA: *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 81, 102–109 (2016) “Recent progress in molecularly imprinted media by new preparation concepts and methodological approaches for selective separations of targeting compounds”
- 7) T. KUBO and K. OTSUKA: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 130, 68–80 (2016) “Recent progress for the selective pharmaceutical analyses using molecularly imprinted adsorbents and its related techniques: A review”
- 8) T. KUBO, E. KANAOKA, T. MATSUMOTO, T. NAITO, T. SANO, M. YAN and K. OTSUKA: *ChemSelect*, 1, 5900–5904 (2016) “Specific Intermolecular Interactions by the Localized π -Electrons in C70-fullerene”
- 9) E. KANAOKA, T. NAITO, T. KUBO and K. OTSUKA: *Chromatography*, 38, 45–51 (2017) “Development of a C70-Fullerene Bonded Silica-Monolithic Capillary and its Retention Characteristics in Liquid Chromatography”
- 10) T. KUBO, S. ARIMURA, T. NAITO, T. SANO, K. OTSUKA: *Anal. Sci.*, 33, 1311–1315 (2017)
“ELISA-like label-free detection of lysozyme by using a fluorescent monomer-doped molecularly imprinted hydrogel”
- 11) T. KUBO, H. FURUTA, T. NAITO, T. SANO, K. OTSUKA: *Chem. Commun.*, 53, 7290–7293 (2017)
“Selective Adsorption of Carbohydrates and Glycoproteins via Molecularly Imprinted Hydrogels: Application to a Visible Detection by a Boronic Acid Monomer”
- 12) Mayuko Yagishita, Mya Thandar, Minoru Yoneda, Takehiro Suzuki, Tin Tin Win Shwe, Daisuke Nakajima & Nay Soe Maung: *Myanmar Health Sciences Research Journal*, 29, 91–96 (2017)
“Monitoring of Water Quality in Inle Lake, Myanmar”

(2) 主な口頭発表 (学会等)

- 1) T. Kubo, Y. Murakami, T. Naito and K. Otsuka: HPLC2015, Geneva, Switzerland, 2015
“Specific separations by a C60-fullerene bonded silica-monolithic capillary in liquid chromatography”
- 2) T. Kubo and K. Otsuka: The 8th Asia-Pacific Symposium on Ion Analysis, Makuhari, Japan, 2015
“Development of CE Methods for High Selective and Sensitive Analyses of Biomolecular Samples”
- 3) T. Kubo, M. Tsuzuki, T. Naito, M. Yan and K. Otsuka: 2nd Asian Symposium for Analytical Sciences, Kitakyusyu, Japan, 2015 “Specific Liquid Chromatographic Separations by a C60-fullerene Bonded Silica-monolithic Capillary Prepared via Perfluorophenyl Azide”

- 4) T. Kubo, S. Arimura, T. Naito and K. Otsuka: 43rd Symposium of HPLC and Related Techniques, Beijing, China, 2015 “Poly(ethylene glycol)-based Molecularly Imprinted Hydrogels for Selective Adsorption of Proteins”
- 5) T. Kubo, M. Tsuzuki, T. Naito and K. Otsuka: Pacificchem 2015 meeting, Honolulu, Hawaii, 2015 “Unique separations for aromatic compounds by a C60-fullerene bonded silica-monolithic capillary in liquid chromatography”
- 6) T. Kubo, S. Arimura, T. Naito and K. Otsuka: Pacificchem 2015 meeting, Honolulu, Hawaii, 2015 “Characteristic evaluation of PEG-based hydrogels for protein recognition using molecularly imprinting technique”
- 7) 久保拓也 (2015) 「C60-フラーレン固定化シリカ支持体の開発と分離場への応用」第8回資源・素材学会東北支部若手の会
- 8) 久保拓也 (2015) 「抗体医薬品精製のための高通液性多孔性アフィニティゲルの開発」Cat-on-Cat 新規表面反応研究センターシンポジウム2015
- 9) T. Kubo, E. Kanao, H. Kobayashi, T. Naito, M. Yan and K. Otsuka: HPLC2016, San Francisco CA, USA, 2016 “Specific retention behaviors of a C70-fullerene bonded silica-monolithic capillary in liquid chromatography”
- 10) T. Tanigawa, T. Nakano, D. Nakajima, T. Naito, T. Kubo and K. Otsuka: HPLC2016, San Francisco CA, USA, 2016 “Selective Separation of Estrogen-receptor Active Compounds by a Bio-mimic Adsorbent using an Enlarged Molecularly Imprinted Polymer”
- 11) 久保拓也, 金尾英佑, 小林宏資, 内藤豊裕, 大塚浩二 (2016) 「高次フラーレン固定化モノリスカラムの分離特性評価」日本分析化学会第76回分析化学討論会
- 12) 久保拓也, 中野朋彦, 谷川哲也, 内藤豊裕, 中島大介, 大塚浩二 (2016) 「新規分子インプリント法に基づくエストロゲン受容体活性選択的濃縮基材の開発」第25回環境化学討論会
- 13) 久保拓也, 金尾英佑, 内藤豊裕, 大塚浩二 (2016) 「C70フラーレン固定化シリカモノリスの分離能評価」第23回クロマトグラフィーシンポジウム
- 14) 中島大介, 久保拓也 (2016) 「エストロゲン様物質の網羅的検出手法の開発」環境ホルモン学会第19回研究発表会
- 15) 中島大介, 山崎美穂, 鎌田 亮, 柳下真由子, 中山祥嗣, 久保拓也, 松原亜由美, 今泉佳隆, 白石不二雄 (2016) 「約600化学物質の各種受容体結合活性スクリーニング」第25回環境化学討論会
- 16) 柳下真由子, 久保拓也, 谷川哲也, 山崎美穂, 白石不二雄, 中山祥嗣, 中島大介 (2016) 「エストロゲン受容体結合活性物質の多成分一斉分析用データベース開発」第25回環境化学討論会
- 17) 中野朋彦, 谷川哲也, 内藤豊裕, 中島大介, 久保拓也, 大塚浩二 (2016) 「エストロゲン受容体活性物質の選択的吸着を目的とした分子インプリントポリマーの開発」第25回環境化学討論会
- 18) 中野朋彦, 谷川哲也, 内藤豊裕, 中島大介, 久保拓也, 大塚浩二 (2016) 「エストロゲン受容体活性物質の選択的吸着を目的とした分子インプリントポリマーの開発 (2)」第10回平成夏季セミナー～ぶんせき秘帖 巻ノ十～
- 19) 中野朋彦, 谷川哲也, 内藤豊裕, 中島大介, 久保拓也, 大塚浩二 (2016) 「エストロゲン受容体活性物質の選択的吸着を目的とした分子インプリントポリマーの開発」CSJ化学フェスタ
- 20) T. Kubo, E. Kanao, T. Naito, K. Otsuka: 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2017 Jeju), Jeju Island, Korea, 2017 “Unique Separation Behaviors of Fullerene Bonded Silica Monolith in Liquid Chromatography “ (Invited)
- 21) T. Nakano, T. Tanigawa, T. Naito, D. Nakajima, T. Kubo, K. Otsuka: 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2017 Jeju), Jeju Island, Korea, 2017. “Development of a Molecularly Imprinted Polymer for Selective Separation of Estrogen-receptor Active Compounds”

- 22) Yagishita M., Thandar M., Suzuki T., Tin-Tin-Win-Shwe, Nakajima D., Maung N. S. : 45th Myanmar Health Research Congress, Yangon, Myanmar, 2017 “Monitoring of water quality in Inle Lake, Myanmar”
- 23) Nakajima D. : International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017: Assessing low-doses and cumulative effects of exposure to chemical mixtures, Ibaraki, Japan, 2017 “Detection and measurement of receptor binding substances in environmental water by integrated of biological and chemical approach”
- 24) T. Kubo, T. Nakano, T. Tanigawa, D. Nakajima, T. Naito, K. Otsuka: SETAC North America 38th Annual Meeting, Minneapolis, MN, USA, 2017. “Effective screening of the estrogen-receptor active compounds in environmental water using bio-mimic adsorbents prepared by molecular imprinting”
- 25) T. Tanigawa, T. Nakano, D. Nakajima, T. Naito, T. Kubo, K. Otsuka: SETAC North America 38th Annual Meeting, Minneapolis, MN, USA, 2017. “Selective separation of estrogen-receptor active compounds by a bio-mimic adsorbent using an enlarged molecularly imprinted polymer”
- 26) 柳下真由子, 山崎美穂, 白石不二雄, 磯部友彦, 中山祥嗣, 中野朋彦, 谷川哲也, 久保拓也, 中島大介 (2017) 「エストロゲン受容体結合活性物質特異的濃縮基材の環境水試料による性能検証」第26回環境化学討論会
- 27) 柳下真由子 (2017) 「ミャンマー、カンボジア、日本における内分泌かく乱化学物質のスクリーニング調査」日本衛生学会 若手研究者夏の集い
- 28) 久保拓也, 大塚浩二 (2017) 「多孔性材料を用いた分子選択的分離場の創成」日本セラミックス協会第30回秋季シンポジウム (招待講演)
- 29) 久保拓也 (2017) 「分子鑄型を用いたエストロゲン受容体活性物質の選択的吸着と環境水試料のスクリーニング」環境ホルモン学会第20回研究発表会
- 30) 中島大介 (2017) 「生物・化学・工学の統合的アプローチによる水環境中受容体結合活性物質の検出」環境ホルモン学会第20回研究発表会
- 31) 中野朋彦, 谷川哲也, 内藤豊裕, 中島大介, 久保拓也, 大塚浩二 (2017) 「エストロゲン受容体結合活性物質の活性選択的抽出を目的とした分子インプリントポリマーの開発」第77回分析化学討論会
- 32) 中野朋彦, 谷川哲也, 内藤豊裕, 久保拓也, 中島大介, 白石不二雄, 大塚浩二 (2017) 「分子インプリント基材を用いたエストロゲン受容体活性物質の選択的吸着と環境水試料のスクリーニング」第26回環境化学討論会

7. 研究者略歴

研究代表者

中島 大介

東京理科大学大学院薬学研究科博士課程修了、博士（薬学）。東京理科大学薬学部助手を経て、2001年より国立研究開発法人国立環境研究所。現在、環境リスク・健康研究センター 曝露影響計測研究室 主席研究員。

研究分担者

1) 中山 祥嗣

岡山大学大学院医学研究科博士課程社会医学専攻修了、博士（医学）。アメリカ環境保護庁招聘研究者を経て、2011年より国立研究開発法人国立環境研究所。現在、環境リスク・健康センター 曝露動態研究室 室長。

2) 久保 拓也

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 機能科学専攻修了、博士（工学）。東北大学 大学院環境科学研究科 環境科学専攻 助教を経て、2012年より京都大学。現在、京都大学大学院工学研究科 材料化学専攻 准教授。

II. 成果の詳細

II-1 活性物質多段階精密質量データベースの作成及び内分泌かく乱化学物質の迅速同定定量システム構築

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター	曝露影響計測研究室	中島 大介
環境リスク・健康研究センター	曝露動態研究室	中山 祥嗣

<研究協力者>

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター	曝露影響計測研究室	柳下真由子
----------------	-----------	-------

平成27～29年度累計予算額：52,354千円（うち平成29年度：17,009千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

内分泌かく乱化学物質の中でもヒトエストロゲン受容体 (hER) 結合活性物質に着目し、それらの迅速かつ正確なスクリーニング法の開発のため、多段階精密質量を用いてhER結合活性物質の一斉分析法の確立を目指した。hER結合活性物質は構造の違いにより、その活性強度は異なるため高精度な同定法が必要である。本研究では588種について行った生物活性試験の結果¹⁾、hER結合活性を示した177種の物質について多段階精密質量を液体クロマトグラフィー四重極型－飛行時間型質量分析計(LC/QToFMS)により測定し、フラグメントパターンを含めたデータベースを作成した。この多段階精密質量データベースにより同定精度を向上させることに成功し、これまでの誤判定を低減することが可能となった。また、様々な活性強度の環境試料を用いてサブ2より提供を受けたMIPカートリッジの選択的濃縮能を生物活性試験により評価した。その結果、概ね80%のhER結合活性を捕集していることが明らかになった。次にサブ2で作製したカラムタイプのMIPとスイッチングバルブを組み合わせることで、全自動前処理システムを構築した。これにより数千ものピークが存在する環境水試料から既知及び未知のhER結合活性物質の探索に資すると言える。

[キーワード] 液体クロマトグラフィー四重極型－飛行時間型質量分析計、多段階精密質量、差分ピーク、全自動前処理システム

1. はじめに

女性ホルモン様物質 (hER結合活性物質) の環境中濃度の実態把握に関してはノニルフェノールやビスフェノールAなどの代表的な数物質が対象となっていた。課題代表者らにより行われた588物質を対象とした受容体結合活性強度のスクリーニングの結果、hER結合活性を示す物質はその強度に幅はあるものの177物質存在することが示されている。そこで本サブテーマでは、まずこれら活性物質の一斉分析法を開発する。その際、一般的に行われている液体クロマトグラフィートリプル四重極型質量分析計

(LC/MS/MS) よりも高精度の同定能力がある液体クロマトグラフィー四重極型－飛行時間型質量分析計 (LC/QToFMS) を用いることとした。そのために既知のhER結合活性物質に関しては精密質量とフラグメントパターンを含むデータベースを作成し、高精度一斉分析法の確立を目指す。LC/QToFMSにより作成した多段階精密質量データベースは、保持時間とプレカースイオンによる一次スクリーニングと、MSMS測定によるフラグメントパターン比較による二次スクリーニングにおいて活用するものである。

また環境水試料をLC/QToFMSのスキアンモードで測定すると数千のピークが検出される。この数千の

ピークの中からhER結合活性物質を定量する場合、イオンサプレッション等の影響により感度や定量性の低下が懸念される。また、未認識の活性物質の探索は困難である。そこで、サブ2より提供を受けるhER結合活性物質の選択的濃縮が可能なMIPを活用し、先に開発する一斉分析法と組み合わせることにより、効率的かつ安価な精製と高精度同定定量を兼ね備えた分析計を開発する。

2. 研究開発目的

上述の背景を踏まえ、本研究では内分泌かく乱化学物質の中でもヒトエストロゲン受容体 (hER) 結合活性物質に着目し、それらの迅速かつ正確なスクリーニング法の開発のため、多段階精密質量を用いたhER結合活性物質の高精度一斉分析法の確立を目指した。hER結合活性物質として177種の様々な構造の物質を対象としたが、活性の特性から、構造上の類似性の高い物質が多い。そのため誤同定を生じる可能性が高く、多段階精密質量を用いた高精度一斉分析法が必要と判断した。この一斉分析法の確立のため、以下のとおり研究を進めた。1) 各hER結合活性物質の標準物質を用いた多段階精密質量、保持時間等のデータ採取による測定パラメータのデータベース化、2) 測定パラメータの同定・定量ソフトウェアへの搭載、3) 確立した同定・定量法を搭載したLC/QToFMSに、スイッチングバルブ及びサブ2より提供を受けたMIPカラムを接続した全自動分析システムの構築。上記の成果から、環境中のhER活性物質の実態把握とその活性寄与率の算出に資することが本サブテーマの目的である。

3. 研究開発方法

3-1. 分析機器と試薬

本研究での多段階精密質量データベースの作成及びhER活性物質のスクリーニングのための測定には、液体クロマトグラフ (Agilent 1260 Infinity LCシステム、Agilent Technology社製) 四重極-飛行時間型質量分析計 (Agilent 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOFシステム、Agilent Technology社製) を使用した。液体クロマトグラフ部は溶離液の送液用クォータナリポンプ (G1311B)、サンプル注入用のオートサンプラ (G1367E)、カラム恒温のためのカラムコンパートメント (G1367E)、QToFMSのマス軸補正のためのリファレンス溶液送液用アイソクラテックポンプ (G1310B) から構成されている。分離カラムには汎用性や分離能を考慮し、InertSustain C18 (2.1 mm I.D. x 150 mm, 5 µm, GLサイエンス) を採用した。溶離液はA: メタノール5,000 (残留農薬・PCB試験用、和光純薬) 及びB: 超純水 (LCMS用、和光純薬) をそれぞれ超音波発生装置と吸引ポンプで脱気してから使用した。分離のグラジエント条件は以下の通り。0-5分: 20%A → 5-10分: 20→50%A → 10-25分: 50→90%A → 25-35分: 90%A。流速は0.2 ml/min、注入量は2 µlとした。質量分析部は4 GHzの高分解能モードで使用し、イオン源はAgilent Jet Stream技術を搭載したエレクトロスプレーである。エレクトロスプレーの設定条件は以下の通りである。キャピラリー; 3500 V、ネブライザー; 35 psi、ドライガス流量; 8 L/min、ドライガス; 350°C、フラグメンタ; 100 V。リファレンス溶液は測定中常にスプレーされ、ポジティブモードではm/z 121.0509及び922.0098、ポジティブモードではm/z 112.9856及び966.0007のリファレンスマスでマス軸を補正している。また、質量分析部QToFMSのキャリブレーション (MS軸校正) は測定開始前に、チューニング (感度調整) は月に一度の頻度でキャリブレーション溶液を用いて行った。QToFMSはToFMSとして使用するTOFモードとコリジョンエネルギーをかけ開裂誘起をおこすMSMSモード (QToFMSとして使用) の2通りで使用した。得られたデータはAgilent Technology社製のデータ解析ソフト “Mass Hunter” により解析を行った。

3-2. 水試料の採取と前処理

日本国内において2016年8月から11月にかけて、河川水や下水処理場排水のような環境水試料を50検体採取した。各水試料はガロン瓶に採取、運搬した。各試料は3 Lを秤量し、ガラス繊維フィルタでろ過し浮遊物質の除去後、C18またはSDB固相抽出ディスクを用いて濃縮を行い、LC/QToFMS分析用、酵母アッセイ試験用、MIP通液用に分けた。

3-3. 受容体結合活性試験

受容体導入酵母アッセイのうち、ヒトエストロゲン受容体 α (hER)、構成的アンドロスタン受容体 (CAR) の導入酵母は、受容体のリガンド結合領域及び転写活性化因子GAL4のDNA結合領域の発現プラスミド (pGBT9-RLBD) と、コアクチベーターTIF2及びGAL4の転写活性化領域の発現プラスミド (pGAAD424-TF-2) を、レポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼを組み込んだ酵母Y190株に導入したものであり、試験手法は白石ら²⁾の既報にそれぞれ準じた。即ち、96穴黒色プレート上に段階希釈した被検試料に、グルコースを0.75%或いは1%となるように添加した改良SD培地 (トリプトファン及びロイシン無添加) で30℃、24時間培養した酵母を添加して、30℃、4時間の条件で曝露した (DMSO濃度1%)。この菌液に β -ガラクトシダーゼの化学発光基質AURORA GAL-XEと酵母溶解酵素Zymolase 100Tの混合液を添加し、37℃、1時間反応させた後にルミノメーター (Luminescencer-JNR, AB-2100, ATTO) を用いて発光促進液 (AURORA GAL-XE) の添加後の各ウェルの化学発光量を定量した。それぞれの希釈倍率における被検試料の発光量は、1ウェルあたり1秒間の積算値の2ウェル平均とした。この測定値から希釈倍率-発光曲線を作成し、直線的な増加を示す部分から溶媒対照の10倍の発光強度を示す濃度 (EC \times 10) を求めた。

3-4. MIPの評価方法

サブ2より提供されたカートリッジタイプのMIPの選択的吸着性能の評価は以下の通り行った。ガラス繊維フィルタで浮遊物質を除去した環境水試料は一度C18固相抽出ディスクで濃縮し、乾固した状態で冷凍保存しておき、試験直前に1%メタノール水溶液50 mlで再溶解して使用した。この試料を50 mlのテルモシリンジに入れ、カートリッジタイプのMIPに繋ぎ、シリンジポンプで加圧通液した。この時MIPを通過したサンプルを“Pass”とし、酵母アッセイとLC/QToFMS分析のために再度C18固相抽出ディスクで濃縮し各試験及び測定に供した。また、MIPに吸着した物質はアセトニトリル8 mlで溶出した後、窒素パーージし、“Trap”とした。

3-5. 差分ピーク検出ソフトの作成

サブ2で作製している分子鋳型を用いた活性特異的濃縮基材 (以後、MIPとする) はhER結合活性のメカニズムを模倣したものである。したがってMIPに捕捉される (“Trap”とする) 物質はhER結合活性を示す物質であると仮定できる。一方、MIPに吸着されずに素通りする (“Pass”とする) 物質はhER結合活性を示さない物質ということになる。本研究ではMIPにTrapされた物質をアセトニトリルなどの溶出溶媒で溶出した後、LC/QToFMS測定や酵母アッセイ試験に供することになるが、全ての物質を溶出できたかどうかは判断する手法がない。さらに、hER結合活性を模倣したMIPであるため、未知のhER結合活性強度が強い物質についてはMIPに強くTrapされ、溶出しきれないことも考えられる。それにはMIPに通水する前後のクロマトグラムを差分をとり、溶出しきれたか判別する必要がある。即ち、水試料 (Sample) と、MIPに通水した際に素通りした試料 (Blank) のそれぞれについて、LC/QToFMSのTOFモードで測定を行い、クロマトグラムだけでなく質量スペクトルを伴ったクロマトグラムの減算 (Sample - Blank) をすることができれば、MIPに捕捉されたピークを計算科学的に表現することが可能になる。差分ピークを検出するソフトウェアの概要は以下の通りである。

- ① SampleとBlankの各試料をLC/QToFMSにより繰り返し3回以上測定し、保持時間、質量電荷比、ピーク強度をそれぞれ得る。その際、ピーク強度補正のための内部標準物質データを含む。
- ② 複数個の各データ群の中でピークの保持時間及び質量電荷比の変動許容範囲を設定して、ピークの同一化 (アライメント) をする。アライメントの結果、減算に用いる全てのクロマトグラム上のピークがID (「保持時間@m/z」という表示形式とした) 毎に整理される。この時に測定毎の感度補正を内部標準物質のピーク強度により行う。
- ③ 繰り返し測定したデータから、有意差のあるピークのみが選択され、各試料のピークとする。このSample群とBlank群の各統合クロマトグラムにおける各ピークの減算を行う。
- ④ 減算結果は、横軸に保持時間、縦軸に差分強度 (エラーバー付) をとった棒グラフとして表示する。

また、ピークIDと差分の有意差との関係も表示する。

以上のソフトウェアの開発は外注によって行ったが、開発の段階でその都度ソフトウェアの試作品を用いてパラメータなどの条件等を外注先の担当者と充分議論を重ね、随時変更・修正を行った。

差分ピークを描く具体的な方法として、測定により得られたTotal Ion ChromatogramからAgilent社製Mass HunterソフトウェアのFind by Molecular Feature (MFE) 機能により化合物毎の保持時間、ピーク体積、質量電荷比等の情報を得た。その情報をCSVファイルに出力し、保持時間と質量電荷比の齟齬をアライメント機能により補正した後、サンプルのピーク体積からブランクピーク体積を差し引いた。また、差分ピークは簡易的にクロマトグラムを棒グラフ化して表現した。MFEはTotal ion chromatogram (TIC) から同位体イオンや付加イオンを考慮した上で、化合物ピークを自動的に検出しマスクロマトグラムを抽出するデータ解析手法の一つである。

3-6. オンライン化条件の検討および構築

サブテーマ1ではサブテーマ2より提供された、カラムタイプMIPを用いて全自動前処理システムを構築した。全自動システムには2種のスイッチングバルブ及びLC/QToFMSとは独立した送液ポンプを用意した。スイッチングバルブ1はMIPへ通液する試料や溶媒の選択に使用し、バルブ2はMIPへの試料の通液及びMIPからの溶出のための流路選択に使用した。バルブ2では、AポジションとBポジションに切り替え可能である。Aポジションではサンプル、洗浄用のアセトニトリル、平衡化用の超純水をMIPに一方方向に流すことができ、Bポジションではサンプルの通液方向とは逆向きの流路が確保されMIPの後段に分離カラムが直結する。これらの組み合わせをスイッチングバルブ制御用ソフトウェアで制御・管理し、オンラインシステムに組み込んだMIPに2~5 ml/minで試料や洗浄溶媒を通液するメソッドを構築した。このオンラインシステムに、サブテーマ2から提供された通常のMIPを耐圧カラムに充填したカラムタイプMIP、高通水性のハイブリッドタイプMIP2種（スポンジタイプ及びシリカゲル表面修飾タイプ）を接続し、自動分析を試行した。

4. 結果及び考察

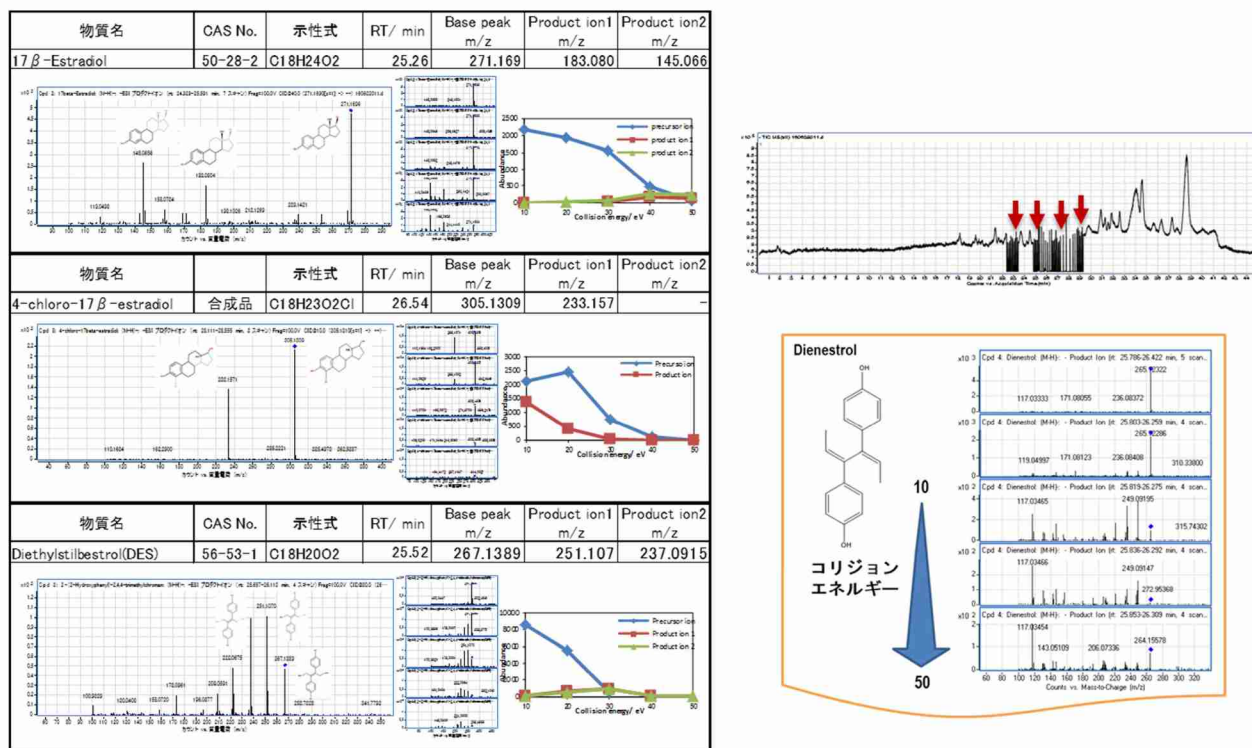
4-1. 多段階精密質量データベースの作成

ヒトエストロゲン受容体結合活性を示す177物質について多段階精密質量データベースを作成した。多段階精密質量データベースの作成にはLC/QToFMSを使用し、MSモードで分子量関連イオン（プレカーサーイオンとする）と保持時間を測定した後、MSMSモードでプロダクトイオンを測定し、各イオンの精密質量情報をデータベース化した。対象とした177物質の選定は生物活性試験の結果を基に行い、そのうち現在入手可能なものを選定した。今回のデータベース作成は以下の方針で行った。まずhER結合活性物質の標準溶液をLC/QToFMSのMSモードで測定しプレカーサーイオンと保持時間を決定した。そのプレカーサーイオンと保持時間を設定しMS/MSモードでフラグメントパターンを得た。測定モードは分子構造から多くがネガティブモードで検出可能と推定したため、まずネガティブモードで検出を試みた。ネガティブモードで検出されなかった場合はポジティブモード測定を試み、いずれのモードでも検出ができなかった物質はGC/MS/MSや他の検出法を検討した。以上の方針に従い測定を進めた結果、全物質の9割がネガティブモードで、残りの1割はポジティブモードで検出可能であった。

今回我々が作成しようとした精密質量データベースでは、その同定精度を向上させるため、可能な範囲で多段階の開裂情報があることが望ましい。使用したLC/QToFMSのMS/MSモードではプレカーサーイオンにコリジョンエネルギーをかけ開裂を誘起した際のプロダクトイオンが得られる。更なる分子開裂を実現するにはフラグメント電圧によるインソースフラグメンテーションが考えられる。そこで、分子構造が異なるいくつかの物質を用いてフラグメント電圧を100、125 及び150V と変化させプレカーサーイオンのインソースフラグメンテーションを確認し、その効果の比較を行った。その結果、メーカー推奨範囲内で今回変動させたフラグメント電圧の電圧幅では分子の開裂は顕著でなく、その効果は効果的ではなかった。そこで、コリジョンセルにおいてコリジョンエネルギーをかけたときのプロダクトイオ

ンをモニターすることとし、フラグメント電圧は100 Vに固定することとした。加えてコリジョンエネルギーをかけた時のフラグメントパターンをMSMSモードにより測定する際は、物質の開裂のし易さが物質毎に異なることを考慮しコリジョンエネルギーは10~50 eVまで10 eV刻みの5段階とした。MSMSモードにより測定したフラグメントパターンのうち各物質の分子構造とプロダクトイオンの精密質量を基に妥当なプロダクトイオンを1または2個選定を行い、プロダクトイオンとした。このプレカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせはLC/MS/MS分析を行う場合のMRMメソッドの構築の際に重要な情報となる。このように得られた情報は以下の様にデータベース化した。プレカーサーイオンと保持時間からなるcsvファイル形式のデータベース1、MSMS測定によるフラグメントパターンを含めたデータベース2。データベース2についてはAgilent Technology社製ソフトウェアPersonal Compound Database Library (PCDL) ファイル形式である。PCDLには標準溶液をMS/MS測定した際のフラグメントパターンを収載しておくことで、環境試料のMSMS測定により得られたフラグメントパターンと比較し、ヒット率をスコアで示すと共にフラグメントパターンを上下に並べ目視確認が可能である。

環境試料からデータベースに収載されたhER活性物質の探索はデータベース1と2を用い、2段階で行った。まずTOFモードで環境試料を一次スクリーニングし、プレカーサーイオンと保持時間からデータベース1検索を行う。そこで得られた候補物質についてMSMSモードで再度測定しコリジョンエネルギーによる分子開裂を誘起したときのフラグメントパターンをデータベース2 (PCDL) に収載したものと比較し、候補物質の絞り込みを行った。その結果、データベース1の一次スクリーニングにより得られた候補物質のうちフラグメントパターンの確認まで行った結果、誤同定であると分かった物質も存在した。データベース1と2の組み合わせることで、これまでのLC/MS/MSによるMRM測定より高精度同定が可能となった。これらのデータベースはMicrosoft社製Excel及びAccessファイル形式で公開頒布可能である。



図(1)-1 多段階精密質量データベースの一部

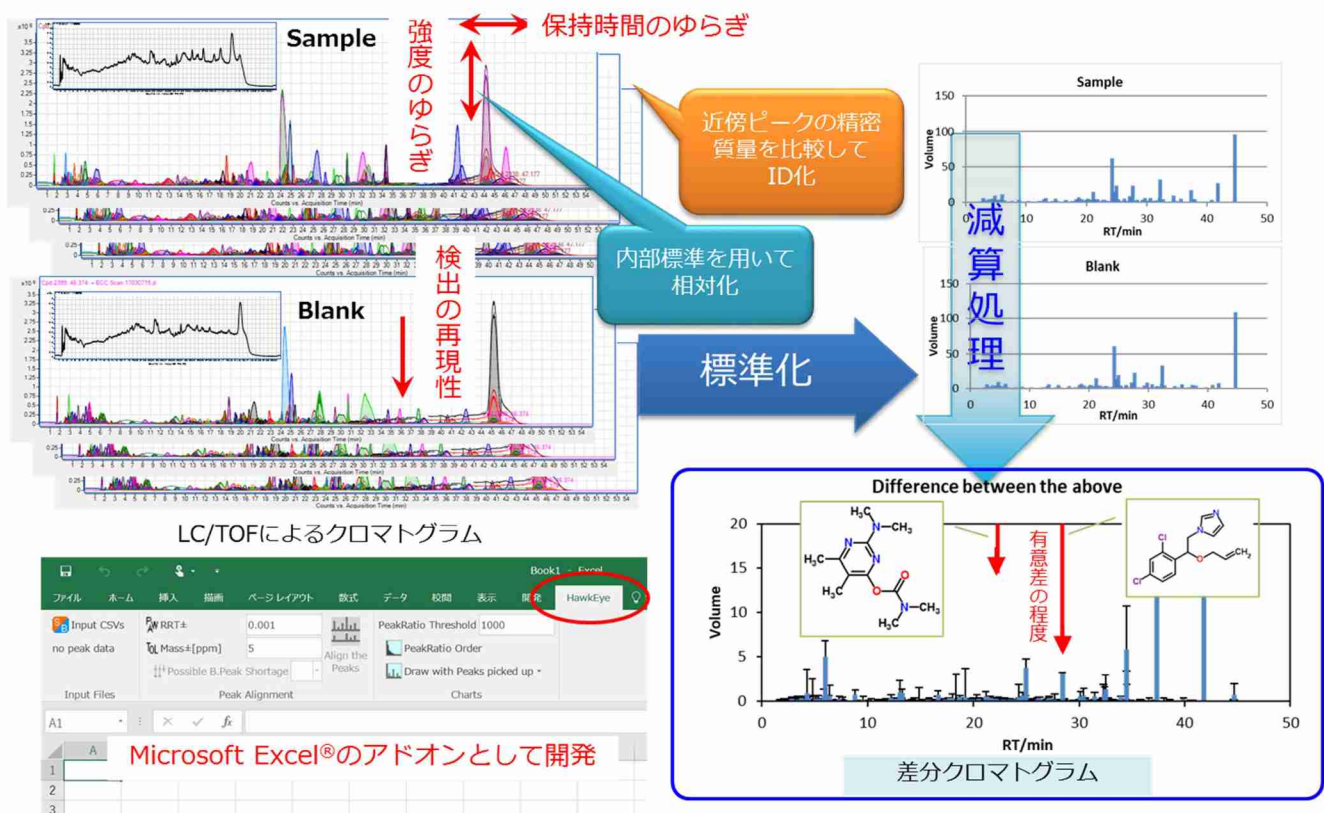
4-2. 差分ピーク検出ソフトウェアの作成

MIPに吸着したhER活性物質が溶出しきれたか確認する手法として、差分ピークの検出ソフトの開発を行った。このソフトウェアによりMIP通水前の試料を“Sample”、MIPに吸着されずに通過した試料を“Blank”として“Sample”-“Blank”の差分をとり、有意差のあるピークを検出することができる。このソフト

トウェアはMicrosoft社製のExcelのアドオンで操作するものである。インポートするデータはTOFモードで測定したクロマトグラムをAgilent Technology社製のMass Hunterソフトウェアによりピークの単一化をするアルゴリズム“Find by Molecular Feature”で各ピークの保持時間、精密質量、ピーク体積をCSVファイル形式にしたものである。このソフトウェアでは差分ピークを可視化するためクロマトグラムを横軸に保持時間、縦軸に差分ピークボリュームをとった棒グラフとして表現することとした。図(1)-2は差分ピーク検出ソフトウェアにより得られる結果である。赤矢印は有意差のあるピークを指し示したものであり、矢印の長さが有意差の程度を示している。

続いて、差分ピークの検出が正しく行われているか確認するため、環境水試料に内部標準物質の他にメソミル、ピリミカルブ、イマザリルのd体を添加する試料と添加しない試料を用意し、添加試料を“Sample”、未添加試料を“Blank”として繰り返し測定を行い、差分検出を行った。その結果、添加した3種のd体のうち2種を差分ピークとして検出することができた。有意差が認められず検出できなかった添加物質に関しては、イオンサプレッションによる感度の低下に起因するもので、LC/MS分析に共通する課題であるが、分離能の向上と移動相組成の工夫による感度向上が期待される。

これまでMIPに捕集された物質はMIPから溶出しきれないと見落としている可能性があったが、本ソフトウェアの利用によってMIP通過前後のクロマトグラムから消失、減衰したピークを識別できるようになり、本研究の遂行に有効な手段となった。開発した差分ピーク検出ソフトウェアを活用し、いくつかの環境実試料中のhER結合活性物質の探索を行った。その結果、有意差のあるピークの精密質量がいくつか挙げられた。これらの物質の構造推定については精密質量を基に示性式の候補を挙げ、Chemspider (<http://www.chemspider.com/>) で分子構造を検索することは可能である。しかし、構造決定に至るには標準物質を購入しクロマトグラム上で保持時間を、質量分析の結果及びhER結合活性強度の測定が必要である。



図(1)-2 差分ピーク検出ソフトウェアの概念図

4-3. 50検体の環境試料によるMIPの選択的捕集能の検証

これまでの検討から、MIPがhER結合活性物質の選択的な捕集効果を示したが、環境試料では採取す

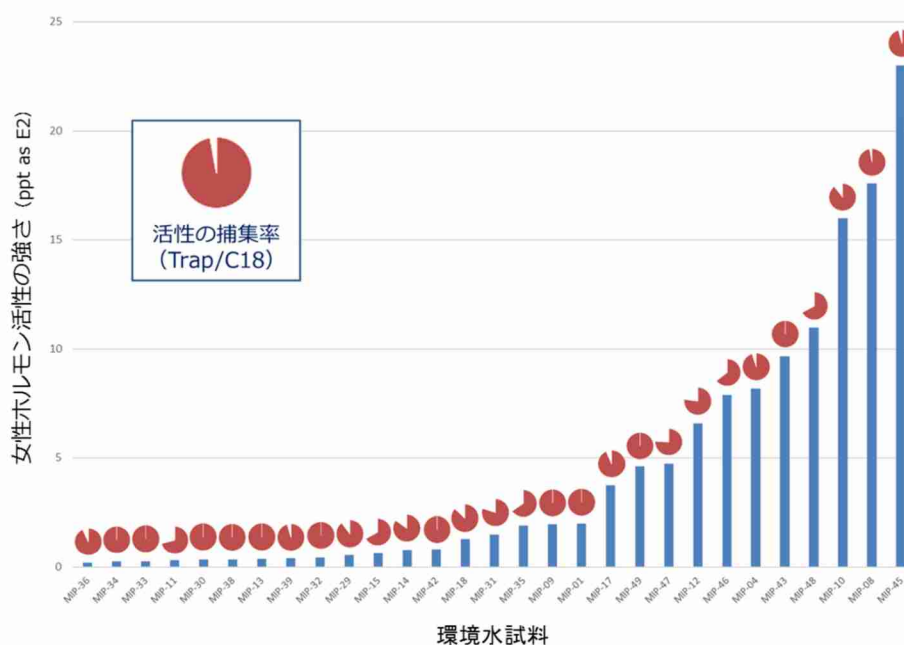
る場所や地域によって活性値が異なるだけでなく、それぞれが含有する化学物質の種類や組成が異なる可能性がある。したがって本基材が一般的に適用可能かどうか、多くの実試料で検討する必要がある。そこで、約50検体の環境試料を採取し、それぞれの試料ごとにMIP基材の性能検証を行った。

<酵母アッセイによるhER結合活性のスクリーニング>

MIPの検証試験に用いた49検体はそれぞれ、一般的な河川水や用水、下水処理場排水直下の環境水、下水処理場排水口から数百メートル下の河川水、及び熊本市街地地下水の観測用井戸水から採取したものである。採取した河川水の半数からhER結合活性が、また下水処理場排水はすべての検体からhER結合活性が検出された。各試料をC18固相抽出ディスクで濃縮した後、再溶解しMIPに通水したところ、hER結合活性を示した全試料でMIPの吸着(Trap)画分でhER結合活性が検出され、通過(Pass)画分では2検体を除いてすべて陰性だった。なおPass画分で陽性を示した試料はいずれも下水処理場排水であり、hER活性が高いサンプルであった。

<LC/QToFMSによる測定結果>

MIPによる精製効果を俯瞰する意味で、2つの指標を算出した。まず、MIPへどのくらいの物質量が捕集されたか、という指標として[MIPに吸着された(Trap)試料から得られたピーク体積の総和] / [MIP通水前(C18)の試料から得られたピーク体積の総和]を算出した。これを「捕集率」とするが、約50検体の平均値は45.4%であった。すなわち、MIPに捕集された量は半分弱ということになる。一方、MIPに捕集されずに除去された物質量の指標として、[MIPに吸着されずに素通りした(Pass)試料から得られたピーク体積の総和] / [MIP通水前(C18)の試料から得られたピーク体積の総和]を算出し、「除去率」とした場合、約50検体を通して80%を超えるものが多く、その平均値は108%であった。MIPを通過させることによってC18が精製され、それぞれの試料測定の際のイオンサプレッション(夾雑物質によるイオン化の抑制効果)が低くなることから、TrapとPassのピーク体積の和は、元のC18を超える傾向にあることに注意する必要がある。いずれにしても、MIPによる選択的精製とイオンサプレッションの抑制の両方の効果が認められた。



図(1)-3 環境水試料のhER活性強度とMIPによるその活性の捕集率

4-4. オンラインシステムの構築

オンラインシステムの構築にあたり、サブテーマ2から耐圧カラムに充填したカラムタイプMIPの提供

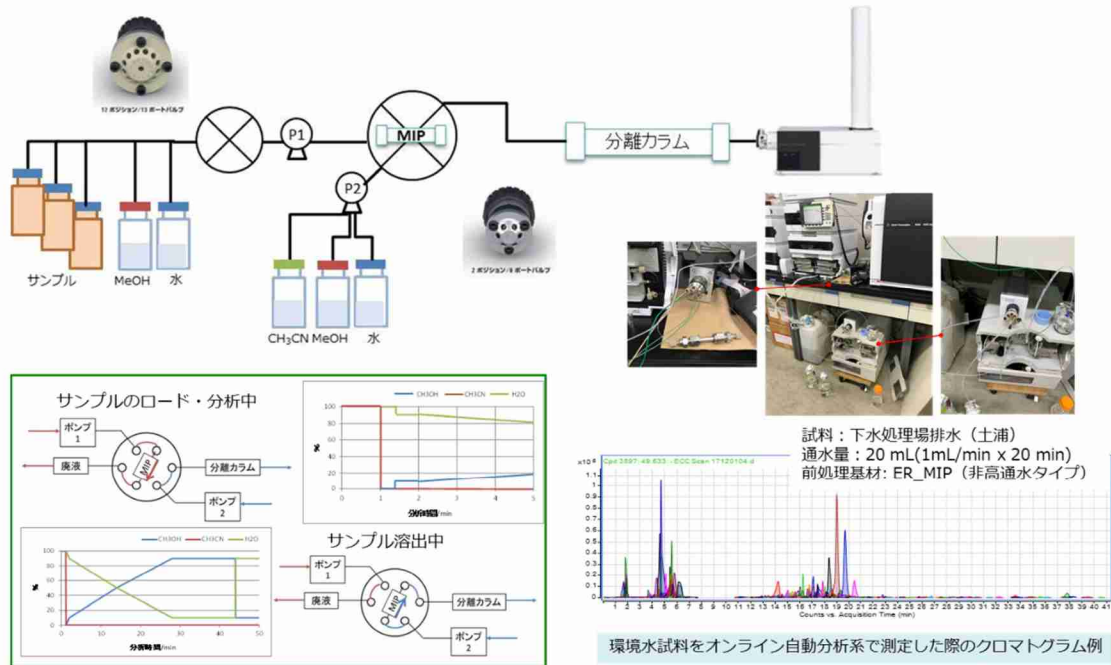
を受けた。まずこのカラムタイプMIPからのhER活性物質の回収率を確認した。カートリッジタイプのMIP使用時のhER活性物質の回収率は80%以上であった。10 mgのMIPが詰められたカートリッジタイプMIPと約0.5 gのMIPが詰められたカラムタイプMIPとでは、充填量（総表面積）が異なるもの選択性は同程度であると予想される。回収率の算出法は以下の通りである。カラムタイプMIPに100 ppbの70種のhER活性物質標準混合溶液をHPLCポンプで通液し、アセトニトリルで溶出した試料を濃縮しLC/TofMS測定に供した。この測定時にTofMSに注入される標準溶液の絶対量と計算上同量となるような標準混合溶液100 ppbを用意し、同様にLC/QTofMS測定を行った。その結果、MIPからのhER活性物質の回収率は80%以上であり、カートリッジタイプと同程度であった。

このカラムタイプMIPを用いてオンラインシステムの構築前に疑似オンライン分析を行った。方法としては単独のHPLCポンプを用いてhER活性物質標準混合溶液を通液したMIPカラムを、分離カラムの前端に繋ぎ溶出及び分析時のグラジエント条件を検討した。その結果、MIPカラムに標準溶液をAからBへ向かって通液した場合、MIPカラムの流路がBからAとなるよう分離カラムに繋ぐことで、わずかな時間と有機溶媒で溶出できることが分かった。つまり、オンラインシステムを構築する際にはBackflushで溶出することを考慮に入れる必要があることが分かった。

続いてオンラインシステムの構築に必要なスイッチングバルブを検討した。バルブの性能として必要とする条件は以下のとおりである。1) サンプルのロード方向と溶出方向の流路を逆向きにすることができること、2) 測定中に次のサンプルのロードをすることができること。以上のことを満たすには2種のバルブとLC/QTofMSとは別のLCポンプ、バルブを制御するソフトウェアが必要であることが分かった。これらの点を考慮し、6ポート2ポジションバルブおよび12ポジション13ポート溶媒切替バルブ、アイソクラティックポンプを用意した。またバルブの切替時にMS側のデータ取り込みを開始する、という外部からの接点を出すことができるようバルブの制御にはChemiStationソフトウェアを使用することとした。この制御ソフトはLC/QTofMSの通常の実行を行う制御ソフトとは異なるものである。上述のことを踏まえオンラインシステムを構築し（図(1)-4参照）、バルブスイッチングプログラムを組んだ。

構築したオンラインシステムは以下の通り。溶出はバックフラッシュで行うこと、溶出時と試料分離時にバルブ2は動かさないこと、溶出にはアセトニトリル100%を使用し、1分後に分離溶媒に切り替えるため、一旦ポンプ側で水100%に切り替え、その後メタノール濃度を上昇させたグラジエントを行うこととした。これらの組み合わせをスイッチングバルブ制御用ソフトウェアで制御・管理し、オンラインシステムに組み込んだMIPに2~5 ml/minで試料や洗浄溶媒を通液するメソッドを構築した。

このオンラインシステムに、サブテマ2から提供された通常のカラムタイプMIP（カラムタイプMIP）、高通水性MIP2種（ハイブリットタイプMIP：スポンジモノリス及びシリカゲル表面修飾タイプの2種類）を接続し、自動分析を試行した。まずhER活性物質標準混合溶液を使用してピーク形状や回収率を確認した後、茨城県内の下水処理場排水を使用し、構築した全自動分析システムに適用した。その結果、クロマトグラムのピーク形状は良好であり、数種類の物質が同定定量され、オンラインシステムによりMIPに吸着したhER結合活性物質の溶出およびそれらの分離が正確に行われていると判断することができた。今後は選択性や回収率の向上についての検討が課題である。



5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

活性物質の同定に使用したフラグメントパターンの精密質量データを用いる高精度同定法では、従来の定量に使われているトリプル四重極型質量分析計によるMRM測定よりも誤同定（擬陽性）が生じにくい。本法による121種の陽性物質のデータを提示したことは、当該物質群の一斉分析において活用が期待され、これらの成果の学術的意義は高いと考えられる。

(2) 環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

本研究で提示したエストロゲン受容体結合活性物質の一斉分析法のパラメータは、環境実態調査等への活用も見込まれる。これにより、従来、代表的物質に限られていた環境中の活性物質の濃度測定から、網羅的一斉分析への転換が可能になる。なお今回構築した分析系では、未知物質の構造推定を考慮してLC/QToFMSを利用しているが、高い同定精度が得られる反面、LC/MS/MSによるMRM測定と比較して感度が劣るという課題がある。そこで、本研究を基礎として、MIPカラムを搭載した全自動前処理システムをLC/MS/MSに繋ぎ感度の向上を図れば、環境中の微量なエストロゲン受容体結合活性物質の定量にも活用可能である。

また本研究の中で作製した差分ピークの検出ソフトウェアは、同等の機能を有するものは存在しない新たなツールである。本研究ではMIPから溶出しきれていない物質の探索に用いることを目的としていたが、他の用途での活用も期待される。例えば河川の流出事故や災害時において、上流と下流試料の差分（位置的に異なる試料の差分）からの汚染源の特定、発災前後の差分（時間的に異なる試料の差分）からの異常検知やその要因物質推定などへの活用が期待される。

6. 国際共同研究等の状況

国際共同研究名：化学物質による環境汚染と健康影響に関する共同研究（日本国国立環境研究所とミャンマー公衆衛生大学との間の化学物質による環境汚染と健康影響に関する共同研究についての覚書（LOA）に基づく共同研究）

協力案件名：インレー湖の水質に関する化学物質モニタリング

カウンターパート名：ミャンマー公衆衛生大学・Mya Thandar准教授, Nay Soe Maung学長（ミャンマー）

ミャンマー公衆衛生大学との覚書に基づき、ミャンマーにおける水質に関する共同研究を実施。主にミャンマー国シャン州に位置するインレー湖において、雨季と乾季に湖水を採取し現地で前処理をした後、本研究で開発した多段階精密質量データベースによるhER結合活性物質のスクリーニングを行った。ミャンマー側は調査地点の案内、交通手段の確保、実験室及びテクニカルスタッフの提供等を行い、国立環境研究所側は現地調査、化学分析を担当。

その結果、本来の女性ホルモンである17beta-Estradiolが検出された。これはインレー湖の湖上生活者のし尿由来の可能性がある。この調査は事前調査の段階であり、今後も継続的に調査研究を行う予定。

7. 研究成果の発表状況

（1）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Mayuko Yagishita, Mya Thandar, Minoru Yoneda, Takehiro Suzuki, Tin Tin Win Shwe, Daisuke Nakajima & Nay Soe Maung: Myanmar Health Sciences Research Journal , Vol. 29, No. 5, 91-96 (2017) “Monitoring of Water Quality in Inle Lake, Myanmar”

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 中島大介、柳下真由子、中山祥嗣、久保拓也; Endocrine Disrupter News Letter 研究最前線, Vol. 20, No.4, 10 (2018) “エストロゲン受容体結合を模倣した活性選択的分子鑄型の開発と機器分析への活用“

（2）口頭発表（学会等）

- 1) 中島大介、山崎美穂、鎌田 亮、柳下真由子、中山祥嗣、久保拓也、松原亜由美、今泉佳隆、白石不二雄 (2016) 「約600化学物質の各種受容体結合活性スクリーニング」 第25回環境化学討論会
- 2) 柳下真由子、久保拓也、谷川哲也、山崎美穂、白石不二雄、中山祥嗣、中島大介 (2016) 「エストロゲン受容体結合活性物質の多成分一斉分析用データベース開発」 第25回環境化学討論会
- 3) 中島大介、久保拓也 (2016) 「エストロゲン様物質の網羅的検出手法の開発」環境ホルモン学会第19回研究発表会
- 4) Yagishita M., Thandar M., Suzuki T., Tin-Tin-Win-Shwe, Nakajima D., Maung N.S. (2017) “Monitoring of water quality in Inle Lake, Myanmar” . 45th Myanmar Health Research Congress
- 5) 柳下真由子、山崎美穂、白石不二雄、磯部友彦、中山祥嗣、中野朋彦、谷川哲也、久保拓也、中島大介 (2017) 「エストロゲン受容体結合活性物質特異的濃縮基材の環境水試料による性能検証」 第26回環境化学討論会
- 6) 柳下真由子 (2017) 「ミャンマー、カンボジア、日本における内分泌かく乱化学物質のスクリーニング調査」日本衛生学会 若手研究者夏の集い
- 7) 中島大介 (2017) 「生物・化学・工学の統合的アプローチによる水環境中受容体結合活性物質の検出」環境ホルモン学会第20回研究発表会
- 8) Nakajima D. (2017) “Detection and measurement of receptor binding substances in environmental water by integrated of biological and chemical approach” International Conference on Environmental Health and

Environmental-related Cancer Prevention 2017: Assessing low-doses and cumulative effects of exposure to chemical mixtures

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はなし。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 市民公開シンポジウムの主催 「環境中の内分泌かく乱化学物質を探索するための新たなアプローチ」 (一般参加者80名/93名申込) 2016年9月27日、江戸東京博物館会議室
- 2) 市民公開シンポジウムの主催「化学物質の内分泌かく乱作用研究の最新動向」(一般参加者87名/107名申込) 2017年9月15日、AP浜松町
- 3) 国立環境研究所 夏の大公開での研究紹介 2015年7月18日 (参加者約4,400名) にて成果紹介
- 4) 国立環境研究所 夏の大公開での研究紹介 2016年7月23日 (参加者約5,200名) にて成果紹介
- 5) 国立環境研究所 夏の大公開での研究紹介 2017年7月22日 (参加者約5,486名) にて成果紹介
- 6) SATテクノロジー・ショーケース「受容体結合活性物質の多成分一斉分析用データベース開発」(2016年2月4日、参加者約625名) にて成果発表
- 7) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー「活性特異的濃縮基材と精密質量数による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法開発 (5-1552)」(2016年2月29日、聴講者数152名) にて講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

社会新報 2017年10月4日 社会民主党全国連合機関紙宣伝局発行

「国立環境研究所シンポ 化学物質の内分泌かく乱作用 ～研究の最新動向～」

(6) その他

特に記載すべき事項はなし。

8. 引用文献

- 1) Fujio Shiraishi et al. Screening for endocrine disrupting activities of 583 chemicals by yeast two-hybrid assay, *Toxicology*へ投稿済
- 2) 白石不二雄他、酵母Two-Hybrid Systemによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発、*環境化学*、10,57-64 (2000)

II-2 活性選択的濃縮基材の作製とそれを用いた一次スクリーニングシステム構築に関する研究

京都大学大学院工学研究科 材料化学専攻 久保 拓也

平成27～29年度累計予算額：49,729千円（うち平成29年度：16,432千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

内分泌攪乱化学物質の効率的なスクリーニング手法の開発を目的として、分子インプリント法に基づく分子鑄型技術を応用し、受容体結合物質の包括的な捕捉を可能とする活性選択的濃縮基材の開発を目指した。モデル受容体として、エストロゲン受容体（hER）を用いて、既報のX線構造解析から考え得るERにおける分子認識部位を模倣し、分子インプリントポリマー（MIP）を設計した。種々のMIP合成、評価の結果から、ポリエチレングリコール（PEG）を基材とする架橋高分子に対して、メタクリル酸（MAA）、疎水性モノマーを加え、同時に、擬似鑄型分子として、エストリオールを用いたMIPにおいて、ER活性物質に対する高い選択的吸着能を確認した。また、同MIPを用いて、実環境試料としての下水処理場排水の濃縮を行い、酵母を用いたバイオアッセイ、LC/QToFMSを用いた物質同定を行った結果、hER活性は従来法と比較して120%程度と同程度以上であったのに対し、濃縮された化合物数は25%に留まり、hER活性物質の効果的な精製が可能となった。さらに、MIPを用いて精製した試料では、従来法では確認されなかったhER活性物質が検出・定量された。これらの結果から、本研究で作製したMIPはhER結合活性物質のスクリーニングに有効であることが実証された。

[キーワード]

分子インプリント、内分泌攪乱化学物質、受容体、分子鑄型、活性濃縮基材

1. はじめに

1996年に「奪われし未来」が発刊されてから、生態系及び生体への内分泌攪乱化学物質の影響について世界中で研究が進められてきた^{1), 2)}。その結果、多くの化学物質における内分泌かく乱作用が確認され、環境中におけるそれらの化学物質のスクリーニング手法も提唱されつつある^{3), 4)}。しかし、基本的な生体での振る舞いや構造活性相関についての知見は依然として乏しく、米国環境保護庁、EU、環境省で推奨するスクリーニング手法は、生物学的な手法が全てであり^{5), 6)}、科学的に支持された定量性のある手法は未だ開発されていない。そのため、工学的手法に基づく定量、再現性に富むスクリーニング手法の開発が急務であり、生物試験に供する化学物質の優先順位を決定することが最重要である。

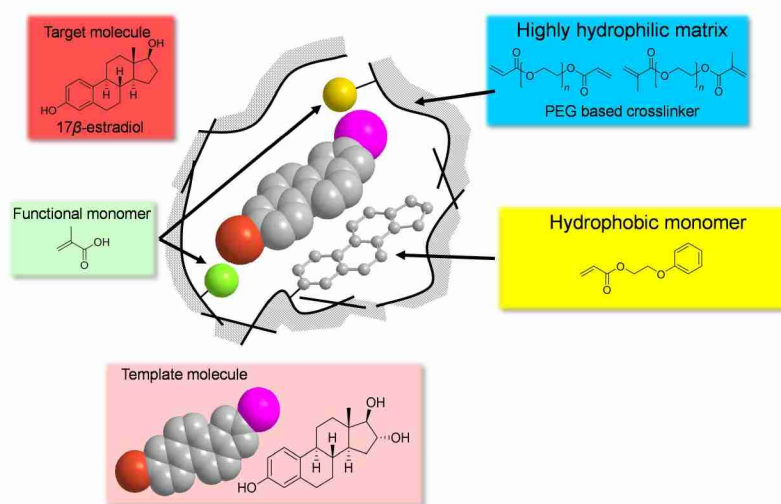
通常、環境中の内分泌攪乱化学物質のスクリーニングとして、*in vitro* のバイオアッセイなどを用いる場合には、汎用のオクタデシル基修飾シリカゲル（ODS）やスチレンジビニルベンゼン樹脂（SDB）等の疎水性吸着剤による前処理濃縮が採用されている。多くの受容体結合物質は、疎水性を示すため、この前処理によって濃縮が可能ではあるが、同時に疎水性の非活性物質も多量に濃縮される。その結果、バイオアッセイにおける活性値検出のエラーや質量分析等の機器分析における検出妨害を引き起こす。そのため、受容体結合物質を選択的に捕捉可能な新規吸着剤の開発が望まれている。

その候補として、分子インプリント法を用いた吸着剤（MIP）が上げられる^{7), 8)}。MIPは、簡便な操作によって人工的な分子認識材料を得ることが可能であり、受容体模倣の吸着剤として期待できる。一方で、現在までに報告されているMIPについては、そのほとんどが疎水性基材を用いた有機溶媒中での選択的分子認識であり、新たな概念に基づくアプローチが必要である。

上記の内分泌攪乱化学物質のスクリーニングにおける問題点と分子インプリント法の機能を背景に、本研究では、新着想活性特異的濃縮基材による一次スクリーニングシステムの構築を着想し、その活性基材の開発について、検討を行った。

2. 研究開発目的

本研究では、上記の背景の基、受容体を模倣した内分泌攪乱化学物質の簡便なスクリーニング手法の開発を目指し、モデル受容体としては、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質として最も報告例が多いヒトエストロゲン受容体 (hER) を選択し、hER模倣の活性選択的濃縮基材を作製することを目的とした。はじめに、本研究を実現するための戦略として、既に報告されているhER結合部位を基本とした分子認識部位を図(2)-1のようにデザインした。この新たな概念に基づくMIPの設計においては、通常のMIPとは異なる機能として、hERタンパク質マトリックスと同等の親水性マトリックスの採用、hER認識部位における疎水ポケットを模倣した局所的な疎水環境の導入、が鍵となる。さらに、hER活性物質に特有の水酸基と相互作用可能ないくつかの親水性基の導入も必要である。これらの要件を満たすために、種々のポリエチレングリコール架橋剤、疎水性モノマー、親水性モノマーを模索し、最適なMIP合成のレシピを評価した。また、実環境試料での実証を目的として、作製したMIPを固相抽出 (SPE) 剤として利用し、その吸着条件についても最適化を行った。最後に、環境試料を用いた濃縮を行い、従来法と比較した際の優位性を明らかにすることを最終目標とした。



図(2)-1. hERを模倣した活性選択的基材合成のデザイン

3. 研究開発方法

3-1 試薬と装置

MIPの合成及びクロマトグラフィーを用いた評価については、以下の試薬を用いた。

PEG dimethacrylate or diacrylate, phenoxy polyethyleneglycol acrylate (AMP), benzyl methacrylate (BMA), phenoxy ethylene glycol acrylate (PEA) (新中村化学) Methacrylic acid (MAA), acrylic acid (AA), trans-acetic acid (TAA), acrylamide (AM), E2, estriol (E3), 4-tert-butyl phenol (4TBP), 2,2'-azobis-2,4-dimethylvaleronitrile (ADVN), N,N-dimethylformamide (DMF), methanol, acetic acid, hydrochloric acid (HCl) (和光純薬) 純水は Milli-Q Direct-Q 3UV system (Merck Millipore) による精製水を用いた。

液体クロマトグラフータンデム質量分析系：LCMS-8030 (島津製作所)

LC/QToFMS装置：Agilent 1260 Infinity LC / Agilent 6540 UHD Accurate-Mass (アジレントテクノロジー)

核磁気共鳴装置：JNM-ECA500 (日本電子)

LC/MS/MS条件：移動相, methanol/water = 85/15 ; 流速, 0.2 mL min⁻¹ ; カラム, ChemcoPak ODS (2.1 mm i.d. × 150 mm) (ケムコプラス) ; 温度, 40 °C ; 検出, ESI negative

LC/QToFMS条件：カラム, Inert Sustain C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm) (GLサイエンス) ; 流速, 0.2 mL min⁻¹ ; 温度, 35 °C ; 移動相, 20% methanol (0 to 5 min), 20 to 50% methanol linear gradient (5 to 10 min), 50 to 90% linear gradient (10 to 25 min), 90% methanol (25 to 35 min) ; 検出, Q-TOF.

3-2 MIPの合成と評価

基本的なMIP合成のレシピとして、PEG架橋剤 (1.0 g)、E3 (112 μmol)、親水性機能性モノマー (448 μmol)、疎水性モノマー (112 μmol)、多孔質化溶媒 (1.0 mL)、ラジカル重合開始剤 (20 mg) を全て混合し、溶液が均一になるまで攪拌した。その後、窒素バブリングを10分間行い、40 $^{\circ}\text{C}$ で24時間重合を行った。得られたポリマーを粉砕器で粉砕し、ふるいを用いて25~105 μm に分級した後、種々の溶媒を用いてMIPを洗浄し、鋳型分子と未反応物質を除去した。同様に、鋳型分子を含まないポリマー (Non imprinted polymer、NIP) も合成した。

得られたMIP、NIPは、バッチ吸着法及びSPEによって吸着性能を評価した。バッチ吸着法においては、ポリマー10 mgをE2、E3、4TBPの100 ppb溶液10 mLに分散し、24時間攪拌した後の上澄み液をLC/MS/MSで分析することで、吸着した各溶質を定量した。SPE評価については、100 mgのMIPを充填したカートリッジ及び市販のODSカートリッジ (Sep-Pak® Light C18、ウォーターズ) に対して、E2、4TBPの1.0 ppb溶液を100 mL通液し、アセトニトリル (0.5 mLずつ) を用いて吸着物を回収した。素通り、アセトニトリル分画をLC-MS/MSを用いて分析し、各溶質濃度を定量した。また、ODSカートリッジとの比較実験の予備的検討として、SPEにおける操作方法について、圧力及び流量の違いによる回収率の違いを評価するとともに、溶出条件を詳細に評価することで、MIPとNIPでの吸着選択性についても合わせて実験を行った。圧力の違いについては、減圧方式と加圧方式をそれぞれ行い、各方式における流量を制御した。溶出条件については、MIP、NIPそれぞれのSPEカートリッジからのアセトニトリル分画中に含まれるE2、E3、4TBPをすべてLC/MS/MSで定量し、各分画に含まれる割合を比較した。

3-3 MIPを用いた実試料濃縮とLC/QToFMS分析及びバイオアッセイ

試料は2018年1月4日9:50頃に土浦下水処理場 (36.084229N 140.217009E) からの放流水を3 Lのポリタンクに採取した。試料1000 mLをメスシリンダーで計量し、サンプリング後すぐにガラス繊維フィルタで浮遊物質の除去を行った。試料は固相抽出ディスクSDB (Empore SDB-XD 2242) で濃縮し、そのディスクを6 mLのメタノールで抽出し、窒素ガスで乾固させた。この乾固物に1 mLのメタノールを加えし溶解し、そのうち0.5 mLを分取し100 μL まで窒素ガスにより濃縮したものをSDB-ConcとしてLC/QToFMS分析及び生物活性試験へ供した。また、再溶解した残り試料0.5 mLを、超純水で50 mLにメスアップした。これを環境試料としてアセトニトリルと超純水でコンディショニングしたMIPカートリッジにロードした。コンディショニング・サンプルのロード・溶出時はMIPカートリッジの上部に50 mLのシリンジ (SS-50ESz) を繋ぎ、そのシリンジをシリンジポンプで加圧することで通液した。シリンジポンプ (株式会社YMC、YSP-201) は0.5 mL/minと設定した。MIPを素通りした試料を、再度固相抽出ディスクSDBで濃縮・抽出・乾固し100 μL にメタノールで再溶解したものをMIP-Passとした。また、MIPに吸着した物質は約6 mLのアセトニトリルで溶出し、乾固させたものに100 μL にメタノールを加え再溶解しMIP-Concとした。また、同試料を酵母ツーハイブリッドアッセイ (Y2H) を用いて評価し、human ERにおけるアンタゴニスト活性を、E2濃度として定量した。最後に、LC/QToFMSで検出された既知hER要請物質の濃度をEC \times 10方式で定量し、バイオアッセイでの活性値への寄与率を考察した。

3-4 ハイスループット型MIP複合体の合成

従来のMIPでは、バルクで合成したMIPを破砕、分級することでSPE等の分離材として利用していた。しかし、破砕型の粒子は形状が不均一であり、さらに比較的小さな微粒子も含まれているため、通水時の圧力上昇が問題となる。そこで、実用的なSPEスクリーニングへの応用のために、高通水型のMIP基材の試作を行った。本検討では、MIP配合スポンジモノリスとMIP被覆型シリカゲル粒子の合成を行った。スポンジモノリスは、細孔径が10 μm 以上の貫通孔を有しており、また、エポキシ基を含む基材であるために合成後の加水分解によって親水性を付与することが可能である⁹⁾。シリカゲル粒子は、安価であり容易に入手することが可能で、その粒径サイズも広範囲にわたり市販されている。シリカゲル粒子表面には、化学的な修飾が可能なシラノール基が存在し、これを用いて新たにポリマー層を導入することが可能である。それぞれのハイブリッド体の合成について、以下の通り行った。

MIP配合スポンジモノリス

エチレンーグリジシジルメタクリレート共重合体 (100 g)、ペンタエリスリトール (300 g)、破碎型MIP (5 g) を150 °Cで均一になるまで混練し、外径が4.8 mmとなるように成型した。冷却後、プラスチック状の生成物を水中で超音波洗浄することで、MIP配合スポンジモノリスを得た。得られたモノリスをHPLC用カラムに充填し、通水性を評価した。

MIP被覆型シリカゲル

破碎型のシリカゲル粒子 (平均粒径30 μm)、10 gをテトラヒドロフラン内に分散し、メタクリロイルトリメトキシシランを十分量添加し、シランカップリングによってビニル基をシリカゲル粒子表面に導入した。次に、得られたシリカゲルをDMF中に分散し、PEG架橋剤 (1.0 g)、E3 (112 μmol)、親水性機能性モノマー (448 μmol)、疎水性モノマー (112 μmol)、ラジカル重合開始剤 (20 mg) を加えて、50 °Cで24時間反応した。得られたMIP被覆型シリカゲルをHPLC用カラムに充填し、通水性を評価した。

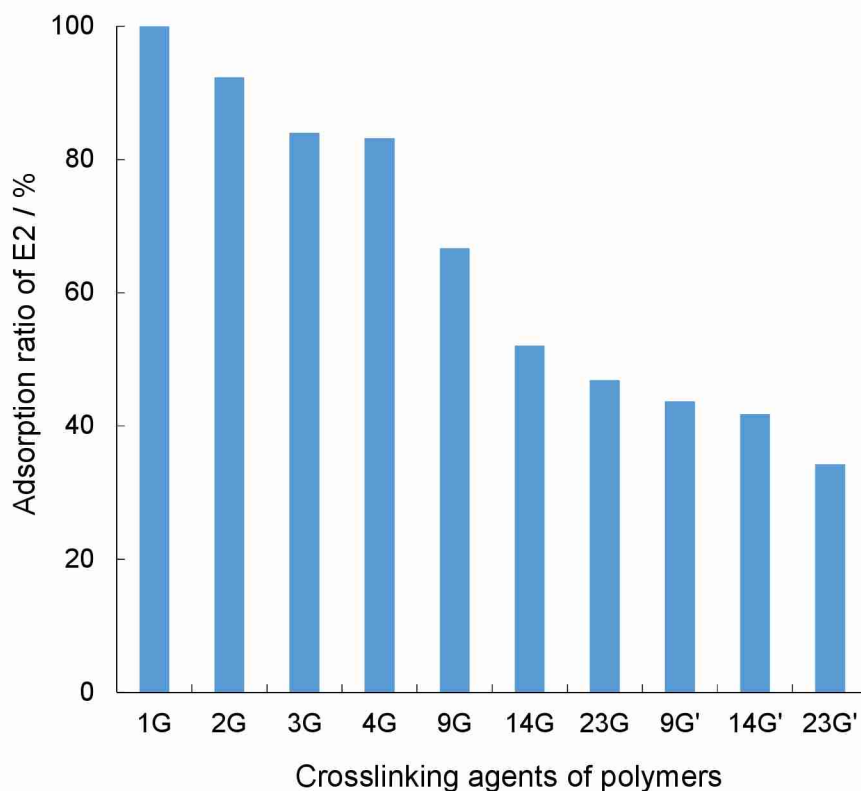
4. 結果及び考察

4-1 MIP合成の最適化

ER模倣のMIPを合成するために、本研究では、以下の3つの項目について、MIP合成の最適化を行った。

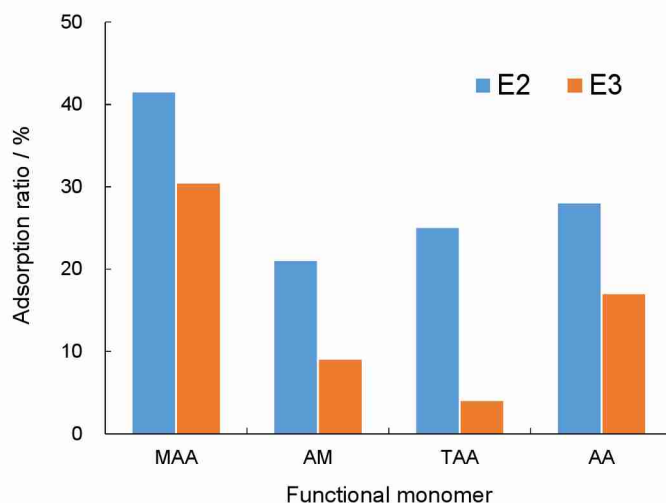
1) タンパク質に類似する親水性マトリックスの選定、2) 水酸基と効果的に相互作用する機能性モノマーの選定、3) 局所的な疎水環境を構築するための疎水性モノマーの選定。これらの課題について、順次評価を行った。なお、MIP合成における鋳型分子には、ER活性が最も高いE2と構造が類似するE3を採用した。

はじめに、親水性架橋剤を最適化するために、PEGを基材としたジアクリレートとジメタクリレートを用いてポリマー粒子を合成し、得られたポリマー粒子に対するE2の吸着をバッチ吸着法によって評価した。結果を図(2)-2に示す。ここで、エチレンオキシド数及び末端基の違いによって、(エチレンオキシド数) (ジアクリレート、 G' ; ジメタクリレート、 G) と表記する。図(2)-2の結果から、予想された通り、エチレンオキシド数が増加するにつれて、E2の吸着が抑制されており、さらに、メチル基の有無に伴って、ジアクリレートでの吸着が抑制されていることが分かる。以上から、E2の非特異的な疎水吸着を抑制できる架橋剤として、 $9G'$ を架橋剤として選定した。

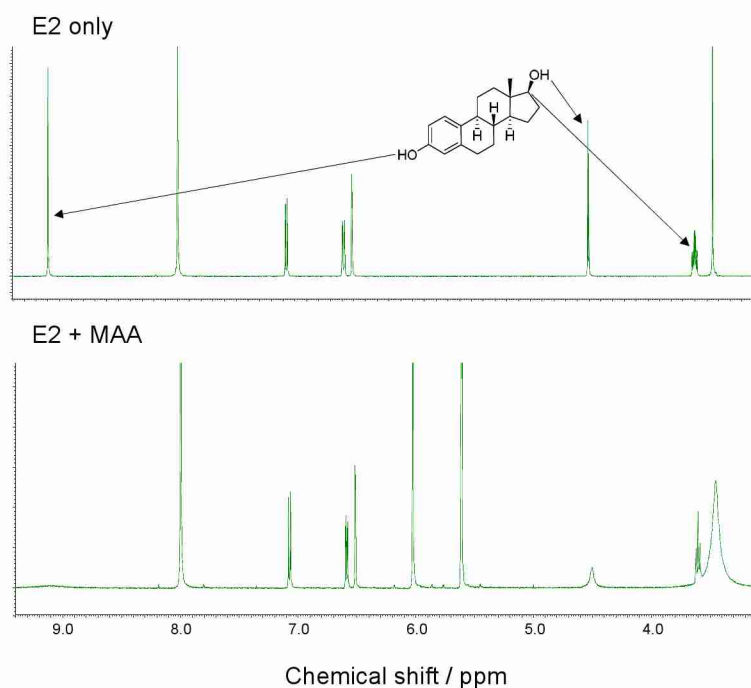


図(2)-2. 異なるPEG系モノマーで合成したポリマーに対するE2の吸着
 Crosslinkers are expressed in “number” and “G or G’”. G and G’ are indicated diacrylate and dimethacrylate, respectively.

次に、親水性の機能性モノマーの選定を行った。通常、アルコール性あるいはフェノール性の水酸基は、カルボン酸やアミド基と水素結合を形成することが知られている。そこで、種々の酸性モノマーとアミドモノマーを含むポリマーを合成し、E2、E3に対するバッチ吸着評価を行った。結果、図(2)-3に示した。図に示すとおり、E2、E3のいずれに対しても、MAAを用いたポリマーにおいて、高い吸着能が見られた。このことから、MAAにおけるカルボキシル基と水酸基との水素結合による相互作用の可能性が示唆された。そこで、これを確認するために、NMRを用いて水素結合の有無を評価した。図(2)-4は、E2及びE2 + MAAの¹H-NMRスペクトルを示している。これらのスペクトルから、それぞれの水酸基に帰属するピークの消失、アルコール性水酸基の根本のピークのカップリングの変化、が確認されていることから、E2内のそれぞれの水酸基は、カルボキシル基に対して強く水素結合していることが明らかとなった。以上から、以後の評価においては、MAAを最適モノマーとして使用した。

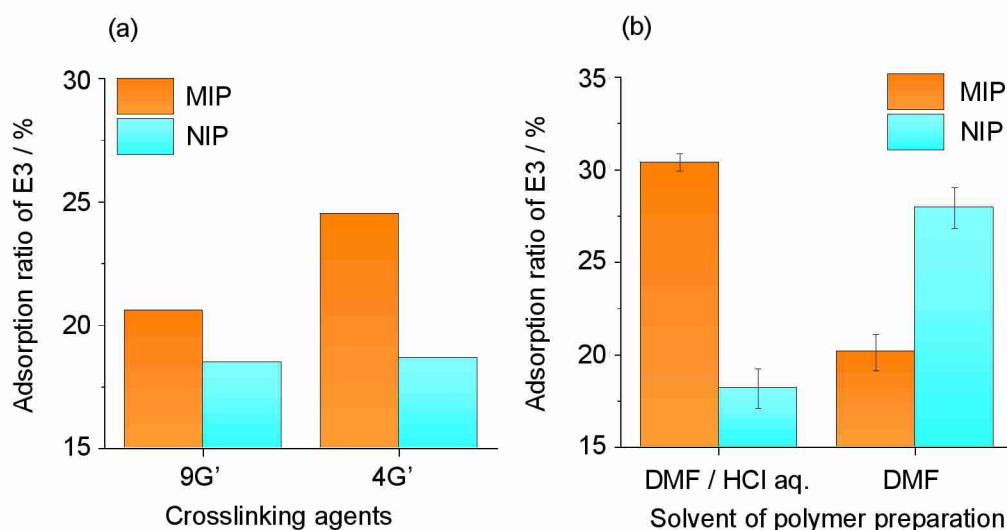


図(2)-3. 異なる親水性モノマーを含むポリマーに対するE2, E3の吸着
 MAA, methacrylic acid; AA, acrylic acid; TAA, trans-aconitic acid; AM, acrylamide.



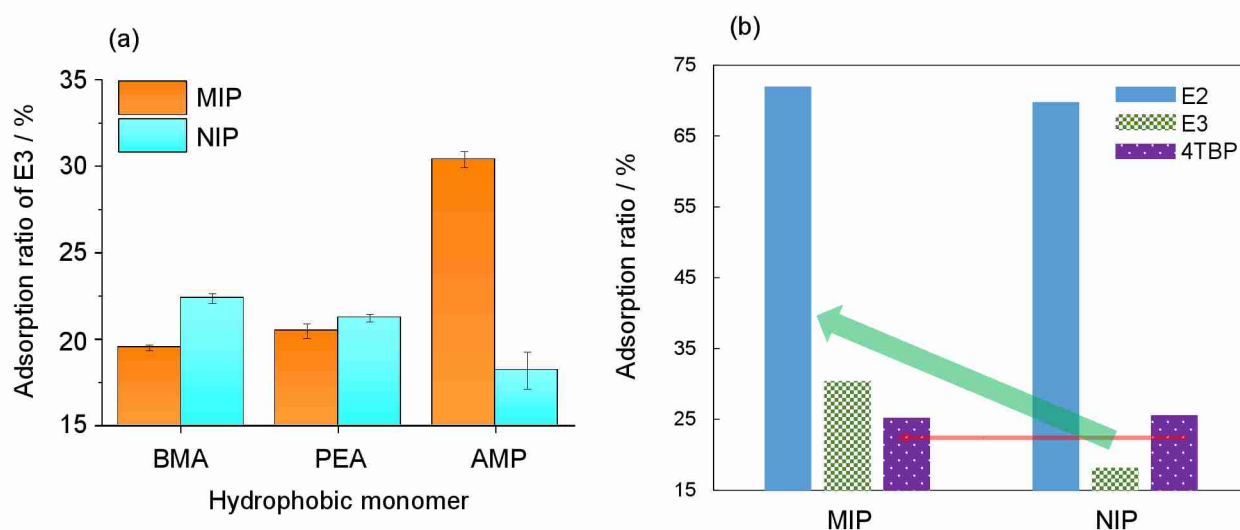
図(2)-4. E2及びMAA共存下でのプロトンNMRスペクトル
 $^1\text{H-NMR}$ spectra in DMF for E2 (upper) and E2 + MAA (bottom)

さらに、詳細なMIP合成の最適化のために、架橋剤のエチレンオキシド数、重合における多孔質化溶媒についても、検討を行った。図(2)-5 (a)(b)には、架橋剤の異なるMIP、NIPにおけるE3の吸着、多孔質化溶媒の異なるMIP、NIPにおけるE3の吸着をそれぞれ示した。(a)の結果から、架橋剤に4G'を用いた場合に高い選択性が得られた。これは、架橋剤のスペーサー部位が長すぎると、分子認識部位が緩くなりすぎたためであり、親水性、認識能発現の立場から、4G'が最適な架橋剤であると判断された。次に、(b)の結果から、塩酸水溶液を含む溶媒と用いた場合に、高い選択性が見られた。これは、酸性条件にすることで、モノマーとして用いたMAAのカルボキシル基がプロトン化され、水素結合の発現が有利なためであると考えられる。さらに、後述の疎水性モノマー導入の際には、水環境があるときに疎水性モノマーと鑄型分子の相互作用が有利になると予想された。そのため、以後の評価では塩酸水溶液とDMFの混合溶媒を多孔質化溶媒として用いた。



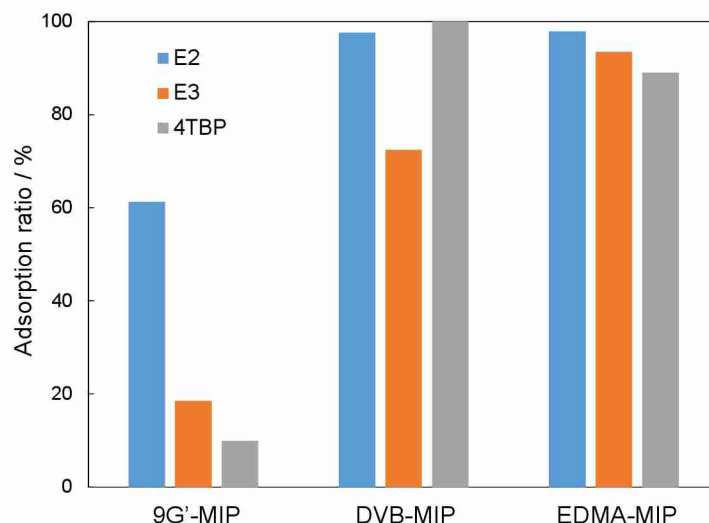
図(2)-5. MIP合成における架橋剤長さ(a) 及び 多孔質化溶媒 (b) の影響

最後に、上記までの検討での最適化条件を基に、疎水性モノマーの検討を行った。架橋剤に4G'、機能性モノマーにMAA、多孔質化溶媒としてHCl aq./DMF、鋳型分子にE3を用いて、種々の疎水性モノマーを含むMIP及びNIPを合成し、E2、E3、4TBPに対する吸着能を評価した。その結果、図(2)-6(a)に示すように、AMPを含むMIPにおいてのみ、E3に対する吸着選択性が確認された。このことから、スパーサーを介した疎水性モノマーにおいて、自由度が高い疎水部位が構築され、その結果、高い選択性が得られたと予想される。次に、AMPを含むMIP、NIPを用いた溶質の吸着選択性を図(2)-6(b)に示した。この結果から、ER非活性の4TBPについては、いずれのポリマーでも同等の吸着が見られているのに対して、ER活性物質であるE2、E3では、MIPにおける高い吸着能が確認された。ここで、それぞれの溶質の疎水性を示すオクタノール/水分配係数、 $\log_{O/W}$ は、E2、E3、4TBPそれぞれについて、4.0、2.5、3.3であることから、MIPにおける吸着が疎水的な支配ではなく、分子選択的な吸着であることがわかる。参考として、同様の吸着実験を既報のE2-MIPを用いて行くと、図(2)-7のように、基材の疎水性によって全ての溶質が吸着したことから、水試料を扱う場合に、本研究で得たMIPが好適であることが示唆された。



図(2)-6. 疎水性モノマーの影響とMIPにおける吸着選択性

(a) Adsorption of E3 in MIP and NIP prepared with hydrophobic monomers. BMA, benzyl methacrylate; PEA, phenoxy ethylene glycol acrylate; AMP, phenoxy poly(ethylene glycol) acrylate (n=2). (b) Adsorption selectivity in MIP and NIP.

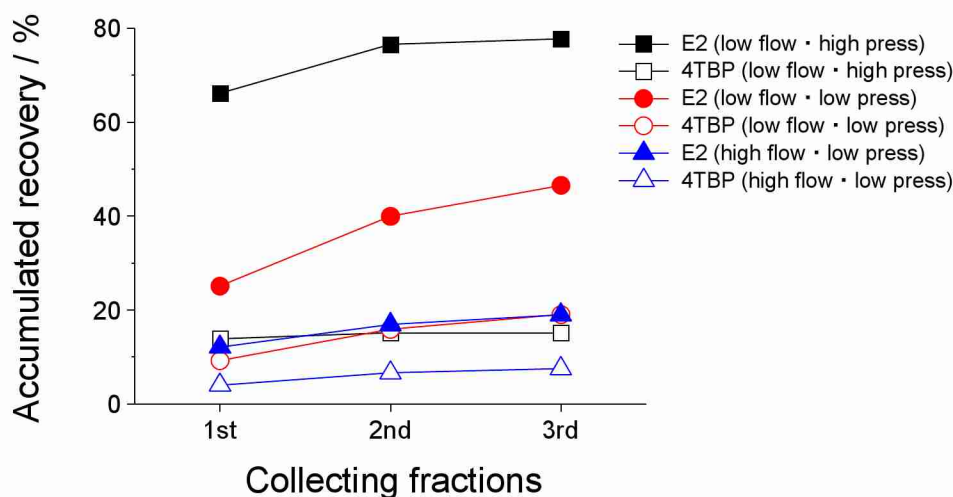


図(2)-7. 種々のMIPにおける吸着選択性

DVB, divinylbenzene; EDMA, ethyleneglycol dimethacrylate

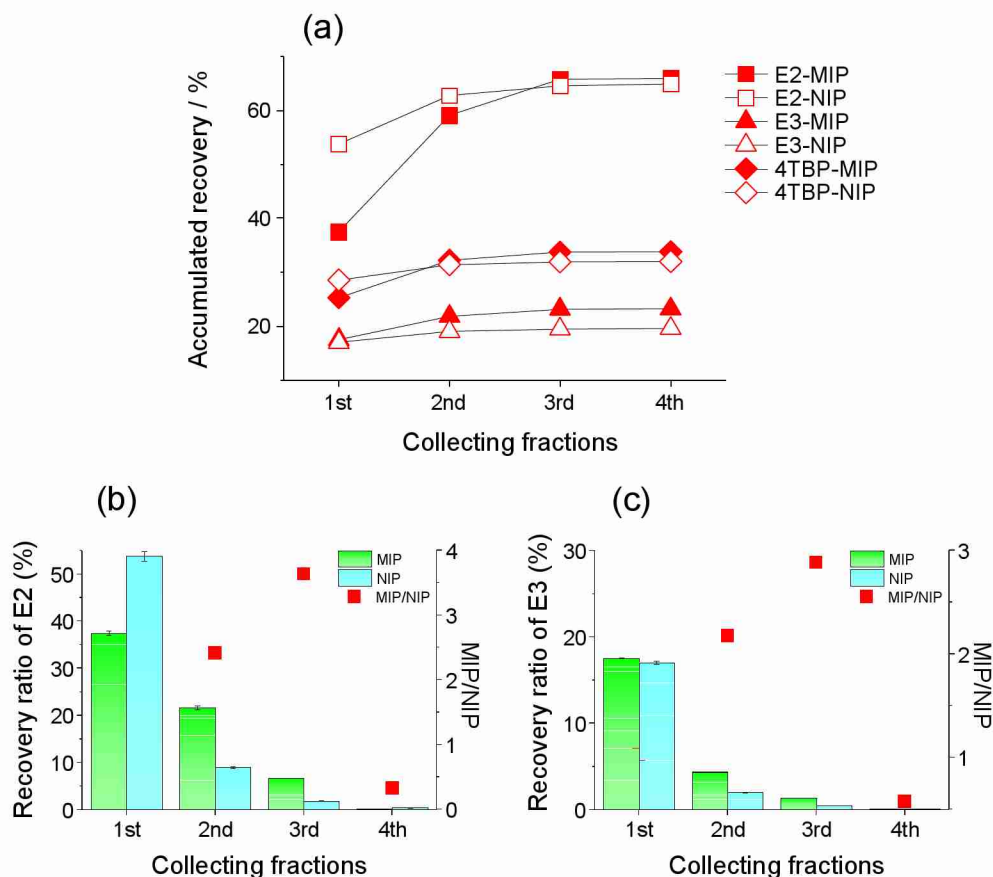
上述にも示したとおり、水環境試料の分析では、通常SPEによる濃縮操作が必要不可欠である。そこで、上記で最適化したMIPを用いて、SPEにおける吸着能を評価した。

通常、SPEを行う際には、試料をロードする際の流量や圧力条件が最終的な回収率に大きく影響する。市販されているSPE吸着剤について、比較的広範囲の条件において同等の回収率が保証されているが、実験室レベルにおいては、検討が必要である。そこで、上記のMIPにおけるSPE条件を決定するために、流量と圧力に関する最適条件を検討した。圧力の調整としては、ダイヤフラムを用いた減圧方式、シリンジポンプを用いた加圧方式を採用し、それぞれにおける流量を制御しながら、10 ppbのE2、4TBPを含む試料をロードした。その後、アセトニトリルでの分画中の溶質濃度を定量し、各条件での回収率を比較した。その結果を図(2)-8に示す。予想された通り、回収率は、高流量<低流量、減圧<加圧において、高くなった。この理由として、作製したMIPには、ナノメートルレベルの微細な細孔が形成されており、さらに、その内部に分子レベルの認識部位が構築されている。そのため、できる限り溶液との接触効率を高くする必要があり、遅い流れの中で、細孔内部まで溶液が到達できる程度の圧力がMIP全体にかかる必要がある。以上のことから、SPEの試料ロードは低流量及び加圧条件が最適であると判断した。



図(2)-8. SPEにおける試料ロード条件の最適化

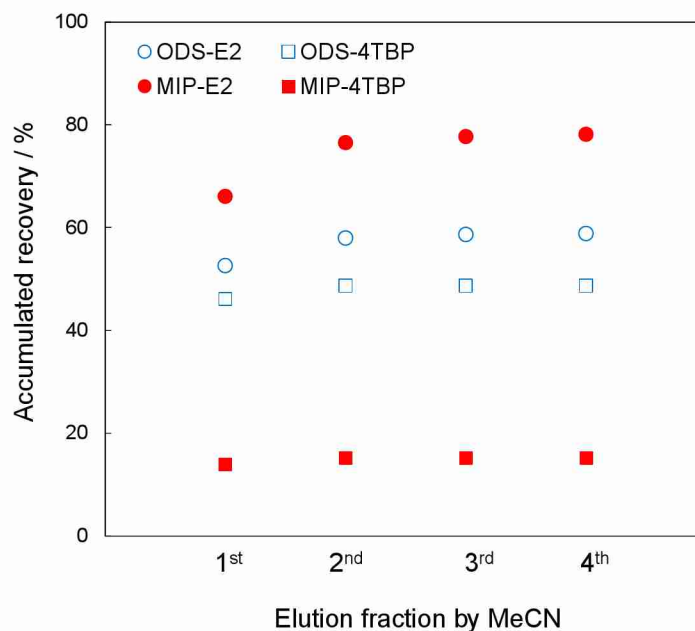
次に、SPEでの吸着選択性を確認するために、MIP及びNIPを充填したSPEカートリッジを用いて、E2、E3、4TBPの吸着選択性を評価した。4回のアセトニトリル分画における各溶質の積算回収率の結果を図(2)-9に示した。この結果から、最終的な回収率としては、MIP、NIPにおいて大きな差を確認することはできなかった。しかしながら、各分画における溶出の割合を比較すると、NIPでは、1st分画にほとんどのE2、E3が溶出したのに対して、MIPでは、2nd分画以降での割合がわずかに大きくなっている。これは、MIPにおいて、E2、E3が強く保持されていることを示唆しており、潜在的な吸着能はMIPにおいて高くなったことを示したと考えられる。



図(2)-9. SPE評価でのMIP、NIPにおける溶質の回収率

(a) 各分画での積算回収率, (b) E2全回収率における各分画での溶出量の割合, (c) E3全回収率における各分画での溶出量の割合

上記のSPE評価結果から、MIPでの吸着選択性の確認とSPEの最適操作条件を決定した。そこで、一般的にER活性試験の試料前処理として用いられているODSカートリッジとMIPカートリッジの比較を行った。溶質として、E2と4TBPを用いて濃縮を行い、上記と同じく少量のアセトニトリルで溶出した。溶出分画に含まれるそれぞれの溶質を、LC/MS/MSで定量した。MIP及びODSの結果を、図(2)-10に示した。予備検討として行ったMIP-SPEにおいて、圧力条件下での吸着が最良であったため、シリンジポンプを用いて濃縮を行った。図に示した結果から、ODSでは、単純な疎水性の強弱の違いで試料が濃縮されていたことが分かる。一方、MIPでは非活性の4TBPの吸着は抑えられており、それに対してE2は強く吸着されていることが示唆された。以上のことから、バッチ吸着評価と同様に、MIPはER活性物質に対する吸着選択性を有していることが示唆された。

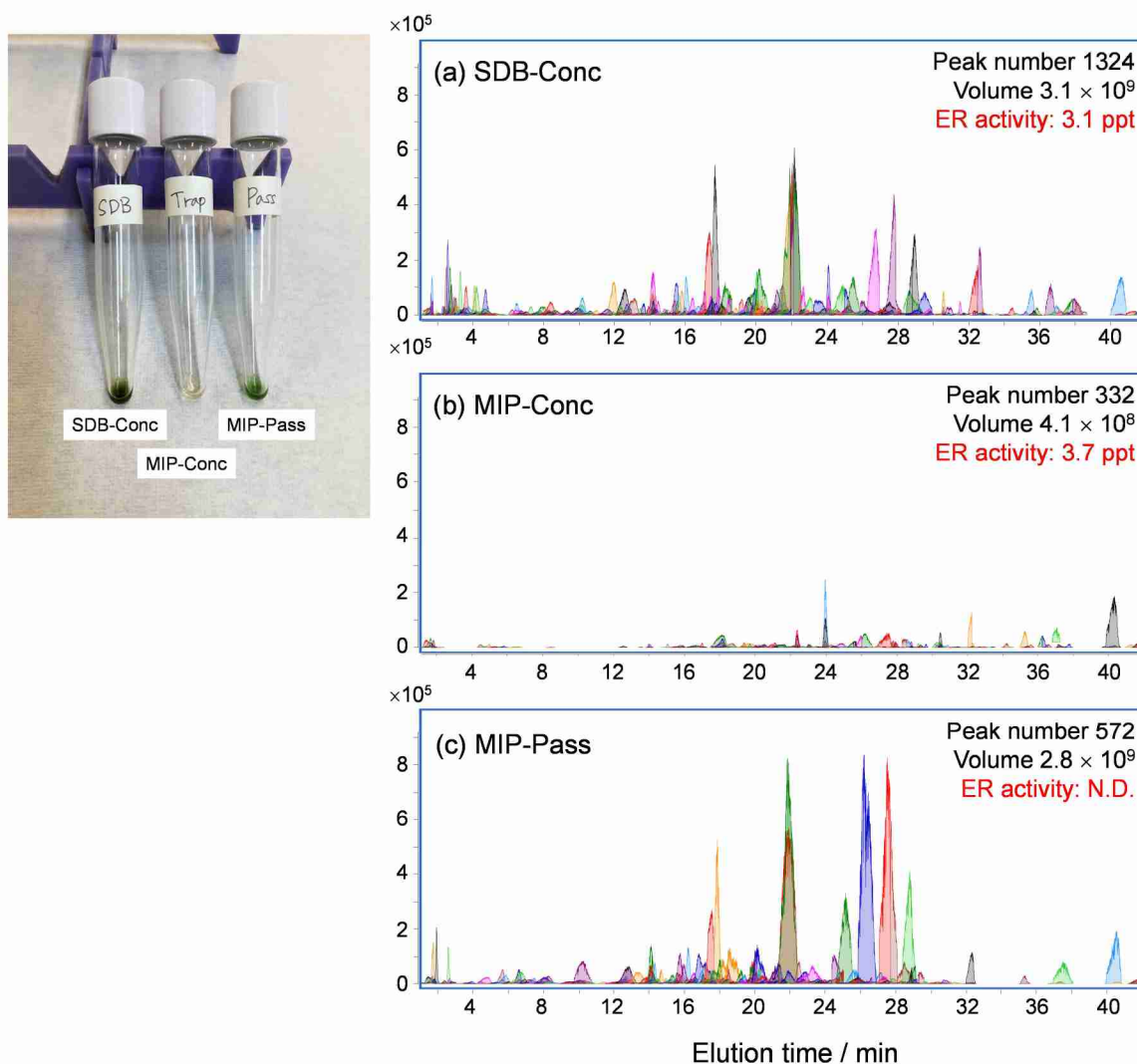


図(2)-10. MIP及びODSを用いたSPE評価結果

100 mg-packed MIP cartridge and Sep-Pak® Light C18 (130mg) were used for SPE. E2 and 4TBP of 100 ppb (100 mL) was passed through each cartridge and collected with acetonitrile (MeCN) at 0.5 mL fractions.

4-2 MIPを用いた実試料前処理

4-1において、新規に作製したMIPを用いたSPEによって、hER活性物質の選択的な濃縮の可能性が示唆された。そこで、その機能を実証するために、実試料として下水処理場の排水付近で採取した試料を用いたSPE濃縮を行った。SDBを用いた一般的な手法による濃縮を行い、その試料をMIP-SPEを用いて処理することで、濃縮分画試料のhER活性試験、LC/QToFMSによる物質同定を行った。SDBでの濃縮分画、MIPでの濃縮分画、MIPの素通り分画の略語は、それぞれ、SDB-Conc、MIP-Conc、MIP-Passとした。図(2)-11には、各分画の濃縮後の写真を示している。MIP-Concでは、SDB-Concに見られる着色がほぼ見られず、MIP-Passに抜けていることが分かる。これらの試料を用いて、まず、酵母ツーハイブリッドアッセイによるhER活性評価から、得られた活性値は、E2濃度に換算して、SDB-Conc、MIP-Concで、それぞれ、3.1 ppt、3.7 pptであった。つまり、MIP-Concにおいては、SDB-Concで確認された活性よりも120%の値を示している。これは、SDB-Concにおいて、多量の疎水性夾雑成分が、活性物質と複合化することによって、正確な活性シグナルを妨げていることが予想された。そこで、次に各分画のLC/QToFMS分析を行い、各分画に含まれる成分を比較した。各分画で検出された成分を全て重ね書きしたクロマトグラムを図(2)-11に示した。また、同クロマトグラム内には、検出されたピーク数とピーク容量も合わせて記載した。



図(2)-11. 濃縮分画のMS重ね書きクロマトグラム

(a) concentrated by SDB cartridge, (b) concentrated by MIP, (c) passed through from MIP. Each chromatograms are overwriting with all the peaks of the detected compounds.

表(2)-1. LC/QToFMS分析で検出された化合物と換算活性値

Compounds	SDB-Conc (ppt)	MIP-Conc (ppt)	hER EC $\times 10$ (nM)	ER activity ¹⁾ (conversion by E2, ppt)
equol	N.D.	6.0×10^2	2.5×10^2	0.29
6,8-dichlorogenistein	N.D.	10	9.1×10^3	1.0×10^{-4}
E2	0.30	0.60	0.12	0.60
estrone	1.4	3.2	0.72	0.53
total				1.4

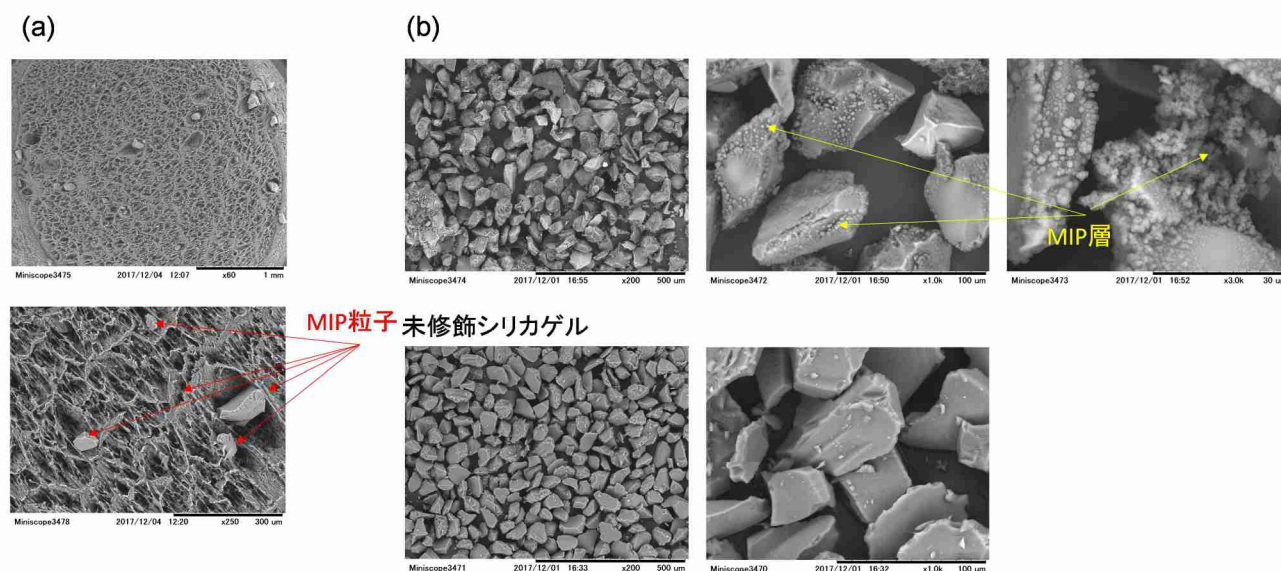
1) hER activity was estimated as the conversion to E2 concentration toward each detected compound from MIP-Conc.

これら結果から、MIP-Concでは、SDB-Concと比較して、ピーク量が25%程度まで減少していることが分かる。さらに、表(2)-1に示すように、MIP-Concでは、既知のER活性物質が複数確認されているが、SDB-Concでは、低濃度あるいは未検出であることが分かる。これらの結果から明らかのように、MIPを用いることで、疎水性の夾雑成分が大幅に除去され、hER活性値の向上、質量分析計におけるイオンサプレッション等の検出妨害の抑制が可能となった。しかしながら、表(2)-1のように、質量分析の結果から、得られた活性物質の総量では、バイオアッセイにおける活性値を説明することが、依然として困難である。つまり、MIPでの濃縮分画の中には、MSでは同定されていない活性成分が含まれている可能性が高く、さらなる検討が必要であると考えられる。

4-3 ハイスループット型MIP複合体の合成

図(2)-12 に得られたMIP配合スポンジモノリス及びMIP被覆型シリカゲル粒子の走査型電子顕微鏡写真(SEM)を示す。まず、スポンジモノリスの断面の写真から導入したMIP粒子が存在することがわかる。さらに、作製したカラムの通水性評価では、10 mL/minの流量を用いた際の圧力が1 Mpa以下であり、既存の高通水性分離材と比較しても高い通水性を示すことが明らかとなった。次に、MIP被覆型シリカゲル粒子のSEM画像から、未修飾シリカゲルと比較して、ポリマー層が形成されていることがわかる。さらに、HPLCによる通水性評価ではスポンジモノリスと同等の通水性が得られた。

しかしながら、いずれの複合体においても選択性の確認は行っておらず、MIPに起因する吸着能は十分でない可能性もある。また、スポンジモノリスでは、長時間の使用によって急激な圧力の増加が確認された。これらのことから、MIP配合量の増加と基材の最適化を行う必要がある。



図(2)-12. MIP配合型スポンジモノリス，シリカゲル粒子のSEM画像
(a) MIP配合型スポンジモノリス (b) MIP被覆型シリカゲル粒子

以上のように、本研究で得られた新規MIPは、hER活性選択的な吸着能を有しており、環境試料中の活性物質の選択的濃縮に極めて効果的であることが明らかとなった。現時点では、サブテーマ(1)のデータベースのみでは説明できないhER活性値が得られていることから、今後、本活性選択的濃縮基材を用いて、未知活性物質の同定を行うことで、新たな候補物質の探索に寄与すると予想される。また、同概念は、他の受容体結合物質に対しても応用可能であると期待され、環境スクリーニングの革新的な手法として活用されることが期待できる。さらに、MIP配合量及び基材の調整を行うことで、より高性能のハイスループット型MIP基材の合成が可能になることが示唆された。今後、これらの新規基材を利用したハイスループット受容体結合活性物質スクリーニング手法開発が期待できる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究で得られた活性選択的な濃縮基材は、既報の分子インプリント法に対して、親水性マトリックスと局所的な疎水環境を導入した、全く新規な吸着基材開発の概念である。この概念は、受容体などのタンパク質が発現する分子認識を模倣する手法として科学的な新規性は極めて高い。また、既存の疎水性吸着剤と比較して、水環境試料の分析前処理として、通常問題となる非特異吸着を最大限抑制できることから、環境分析における分析対象物質の絞り込みと未知物質の同定などに寄与すると期待できる。そのため、環境研究における新たなツールとして環境汚染化学物質の探索研究に貢献できる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はなし。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究では、活性選択的な捕集基材を開発した。これを用いることにより、将来的に以下のことが実現する可能性がある。

- ① 生物学的なスクリーニングに替わる化学物質の迅速・安価な工学的評価
- ② 環境試料からの受容体結合活性物質の選択的に補足・濃縮。効率的な分析時のきょう雑物質除去
- ③ 環境試料等に適用し、捕集された物質には活性がある可能性が高く、これまで活性未知だった物質を新たに検出できる可能性がある。環境中から検出された未知ピークをLC/QToFMS等により化学同定することで、活性既知の物質を対象としたEXTEND2016に対し、下流側からの候補物質選定スキームを補完できる
- ④ 発生源における化学物質の網羅的除去技術

本研究で開発した活性選択的な吸着剤は、モデルとして用いたhERに留まらず、現在問題となりつつある甲状腺ホルモン活性物質等への応用も可能である。将来的には内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法として、現在の生物学的な手法に替わる簡易・低コストの手法として、公定法等への採用も期待できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はなし。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) T. KUBO, S. ARIMURA, Y. TOMINAGA, T. NAITO, K. HOSOYA and K. OTSUKA: *Macromolecules*, 48, 4081-4087 (2015).
“Molecularly Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Lysozyme and Cytochrome c Using a PEG-Based Hydrogel: Selective Recognition for Different Conformations Due to pH Conditions“
- 2) T. KUBO, K. KOTERASAWA, T. NAITO and K. OTSUKA: *Micropor. Mesopor. Mater.*, 218, 112-117 (2015).
“Molecularly Imprinted Polymer with a Pseudo-template for Thermo-responsive Adsorption/desorption based on Hydrogen Bonding”
- 3) T. KUBO, Y. MURAKAMI, M. TSUZUKI, H. KOBAYASHI, T. NAITO, T. SANO, M. YAN and K. OTSUKA: *Chem. Eur. J.*, 21, 18095-18098 (2015).
“Unique Separation Behavior of a C₆₀-fullerene Bonded Silica Monolith Prepared via an Effective Thermal

Coupling Agent”

- 4) T. KUBO, Y. MURAKAMI, T. NAITO and K. OTSUKA: *Chromatography*, 36, 105-113 (2015).
“C₆₀-Fullerene Bonded Silica Monolithic Capillary for Specific Separations of Aromatic Compounds”
- 5) T. KUBO, S. ARIMURA, T. NAITO and K. OTSUKA: *Mol. Imprinting*, 3, 18-25 (2015)
“Selective adsorption of trypsin using molecularly imprinted polymers prepared with PEG-based hydrogels containing anionic functional monomers”
- 6) T. KUBO and K. OTSUKA: *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 81, 102-109 (2016)
“Recent progress in molecularly imprinted media by new preparation concepts and methodological approaches for selective separations of targeting compounds”
- 7) T. KUBO and K. OTSUKA: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 130, 68-80 (2016)
“Recent progress for the selective pharmaceutical analyses using molecularly imprinted adsorbents and its related techniques: A review”
- 8) T. KUBO, E. KANAO, T. MATSUMOTO, T. NAITO, T. SANO, M. YAN and K. OTSUKA: *ChemSelect*, 1, 5900-5904, 2016
“Specific Intermolecular Interactions by the Localized π -Electrons in C70-fullerene”
- 9) E. KANAO, T. NAITO, T. KUBO and K. OTSUKA: *Chromatography*, 38, 45-51 (2017)
“Development of a C70-Fullerene Bonded Silica-Monolithic Capillary and its Retention Characteristics in Liquid Chromatography”
- 10) T. KUBO, S. ARIMURA, T. NAITO, T. SANO, K. OTSUKA: *Anal. Sci.*, 33, 1311-1315 (2017)
“ELISA-like label-free detection of lysozyme by using a fluorescent monomer-doped molecularly imprinted hydrogel”
- 11) T. KUBO, H. FURUTA, T. NAITO, T. SANO, K. OTSUKA: *Chem. Commun.*, 53, 7290-7293 (2017)
“Selective Adsorption of Carbohydrates and Glycoproteins via Molecularly Imprinted Hydrogels: Application to a Visible Detection by a Boronic Acid Monomer”

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) T. Kubo, Y. Murakami, T. Naito and K. Otsuka: HPLC2015, Geneva, Switzerland, 2015 “Specific separations by a C₆₀-fullerene bonded silica-monolithic capillary in liquid chromatography”
- 2) T. Kubo and K. Otsuka: The 8th Asia-Pacific Symposium on Ion Analysis, Makuhari, Japan, 2015
“Development of CE Methods for High Selective and Sensitive Analyses of Biomolecular Samples”
- 3) T. Kubo, M. Tsuzuki, T. Naito, M. Yan and K. Otsuka: 2nd Asian Symposium for Analytical Sciences, Kitakyusyu, Japan “Specific Liquid Chromatographic Separations by a C₆₀-fullerene Bonded Silica-monolithic Capillary Prepared via Perfluorophenyl Azide”
- 4) T. Kubo, S. Arimura, T. Naito and K. Otsuka: 43rd Symposium of HPLC and Related Techniques, Beijing, China, 2015 “Poly(ethylene glycol)-based Molecularly Imprinted Hydrogels for Selective Adsorption of Proteins”
- 5) 久保拓也 : 第8回資源・素材学会東北支部若手の会 (2015) 「C₆₀-フラーレン固定化シリカ支持体の開発と分離場への応用」
- 6) 久保拓也 : Cat-on-Cat 新規表面反応研究センターシンポジウム2015 (2015) 「抗体医薬品精製のための高通液性多孔性アフィニティゲルの開発」
- 7) T. Kubo, M. Tsuzuki, T. Naito and K. Otsuka: Pacificchem 2015 meeting, Honolulu, Hawaii, 2015 “Unique separations for aromatic compounds by a C₆₀-fullerene bonded silica-monolithic capillary in liquid chromatography”
- 8) T. Kubo, S. Arimura, T. Naito and K. Otsuka: Pacificchem 2015 meeting, Honolulu, Hawaii, 2015
“Characteristic evaluation of PEG-based hydrogels for protein recognition using molecularly imprinting technique”

- 9) 久保拓也, 金尾英佑, 小林宏資, 内藤豊裕, 大塚浩二: 日本分析化学会第76回分析化学討論会 (2016) 「高次フラーレン固定化モノリスカラムの分離特性評価」
- 10) 久保拓也, 中野朋彦, 谷川哲也, 内藤豊裕, 中島大介, 大塚浩二: 第25回環境化学討論会 (2016) 「新規分子インプリント法に基づくエストロゲン受容体活性選択的濃縮基材の開発」
- 11) 久保拓也, 金尾英佑, 内藤豊裕, 大塚浩二: 第23回クロマトグラフィーシンポジウム (2016) 「C70フラーレン固定化シリカモノリスの分離能評価」
- 12) T. Kubo, E. Kanao, H. Kobayashi, T. Naito, M. Yan and K. Otsuka: HPLC2016, San Francisco CA, USA, 2016 “Specific retention behaviors of a C70-fullerene bonded silica-monolithic capillary in liquid chromatography”
- 13) 久保拓也, 大塚浩二: 日本セラミックス協会 第30回秋季シンポジウム (2017) 「多孔性材料を用いた分子選択的分離場の創成」 (招待講演)
- 14) T. Kubo, E. Kanao, T. Naito, K. Otsuka: 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2017 Jeju), International Convention Center, Jeju Island, Korea (2017) “Unique Separation Behaviors of Fullerene Bonded Silica Monolith in Liquid Chromatography“ (Invited)
- 15) 久保拓也: 環境ホルモン学会第20回研究発表会(2017) 「分子鋳型を用いたエストロゲン受容体活性物質の選択的吸着と環境水試料のスクリーニング」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はなし。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 市民公開シンポジウムの催 「環境中の内分泌かく乱化学物質を探索するための新たなアプローチ」 (一般参加者80名/93名申込) 2016年9月27日、江戸東京博物館会議室
- 2) 市民公開シンポジウムの主催「化学物質の内分泌かく乱作用研究の最新動向」(一般参加者87名/107名申込) 2017年9月15日、AP浜松町
- 3) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー 「活性特異的濃縮基材と精密質量数による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法開発 (5-1552)」 (2016年2月29日、聴講者数152名) にて講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はなし。

(6) その他

- ・ 中野朋彦: 第25回環境化学討論会 RSC学生ポスター賞

8. 引用文献

- 1) Elsner, M.; Hoelzer, K., Quantitative Survey and Structural Classification of Hydraulic Fracturing Chemicals Reported in Unconventional Gas Production. *Environ. Sci. Technol.* 2016, 50, 3290-3314.
- 2) Bhatnagar, A.; Anastopoulos, L., Adsorptive removal of bisphenol A (BPA) from aqueous solution: A review. *Chemosphere* 2017, 168, 885-902.
- 3) Hectors, T. L. M.; Vanparys, C.; Van Gaal, L. F.; Jorens, P. G.; Covaci, A.; Blust, R., Insulin Resistance and Environmental Pollutants: Experimental Evidence and Future Perspectives. *Environ. Health Perspect.* 2013, 121, 1273-1281.
- 4) Browne, P.; Judson, R. S.; Casey, W. M.; Kleinstreuer, N. C.; Thomas, R. S., Screening Chemicals for Estrogen Receptor Bioactivity Using a Computational Model. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 8804-8814.

- 5) Wheeler, J. R.; Panter, G. H.; Weltje, L.; Thorpe, K. L., Test concentration setting for fish in vivo endocrine screening assays. *Chemosphere* 2013, 92, 1067-1076.
- 6) Zhao, Y. B.; Wang, C.; Xia, S.; Jiang, J. Q.; Hu, R.; Yuan, G. X.; Hu, J. Y., Biosensor Medaka for Monitoring Intersex Caused by Estrogenic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 2413-2420.
- 7) Liu, J.; Yin, D.; Wang, S.; Chen, H. Y.; Liu, Z., Probing Low - Copy - Number Proteins in a Single Living Cell. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 13215-13218.
- 8) Bertolla, M.; Cenci, L.; Anesi, A.; Ambrosi, E.; Tagliaro, F.; Vanzetti, L.; Guella, G.; Bossi, A. M., Solvent-Responsive Molecularly Imprinted Nanogels for Targeted Protein Analysis in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 6908-6915.
- 9) Kubota, K.; Kubo, T.; Tanigawa, T.; Naito, T.; Otsuka, K. New platform for simple and rapid protein-based affinity reactions. *Sci. Rep.* 2017, 7, 178

III. 英文Abstract

Development of an Endocrine Disruptor Screening System Using Molecular Imprinting Materials and Exact Mass Spectrum

Principal Investigator: Daisuke NAKAJIMA

Institution: National Institute for Environmental Studies (NIES)
16-2 Onogawa, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8506, JAPAN
Tel: +81-29-850-2984 / Fax: +81-29-850-2870
E-mail: dnakaji@nies.go.jp

Cooperated by: Kyoto University

[Abstract]

Key Words: Endocrine disrupting chemicals, Human-estrogen receptor binding chemicals, Molecularly imprinted polymer, Liquid-chromatography/quadrupole-time of flight mass spectrometry, Accurate mass

We studied endocrine disrupting chemicals, especially human estrogen receptor (hER) binding activity, which shows different activity strengths due to molecular structure. As a result of screening the hER binding activity of 600 substances for several receptors prior to the study, about 150 substances showed this activity. We aimed to establish a method for simultaneously analyzing hER binding chemicals, and to search for unknown hER binding chemicals. In sub-theme 1, we developed a rapid and high-accuracy screening method for hER binding chemicals by fragmentation pattern with accurate mass. In sub-theme 2, we aimed to develop a selective substrate that enables comprehensive capture of receptor binding substances by applying molecular template technology based on a molecularly imprinted method.

In sub-theme 1, accurate masses of fragmentation pattern of hER binding chemicals were measured by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC/QTOFMS) and a database was built. By using this database, we improved the accuracy of identifying hER binding chemicals, thus reducing false-positive identification.

In sub-theme 2, a molecularly imprinted polymer (MIP) was designed by mimicking a molecular recognition site at hER which had been conjectured from a previously reported X-ray structure analysis using a human estrogen receptor as a model receptor. MIP was prepared using polyethylene glycol (PEG) as a crosslinked polymer, estriol as a pseudo template molecule, methacrylic acid (MAA) as a polar recognition site, and a hydrophobic monomer. The MIP showed highly selectivity for hER active substance. The selective concentration ability of MIP cartridges provided from sub-theme 2 using environmental samples was evaluated. As a result of a bioassay using yeast and substance identification using LC/QTOFMS, the hER activity was completely recovered compared with the conventional method, whereas the number of captured compounds was 25%. These results showed that the MIP prepared in this study is effective for highly accurate screening of hER binding active substances.

Furthermore, a fully automated pretreatment system was constructed by linking MIP which selectively enriches hER binding active substance developed in sub-theme 2 to LC/QTOFMS equipped with the accurate mass database developed in sub-theme 1. It was thus possible to

selectively concentrate the hER binding active substance from environmental water samples and to subject it to LC/QToFMS analysis. These results will enable the development of a quick, simple and inexpensive method of evaluating the endocrine-disrupting effect of existing and new chemical substances.