

【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	中島大介（国立環境研究所）
研究実施期間	平成27年度～29年度
累積予算額	10,2083千円（間接経費込）

# 研究目的

EXTEND2010などの化学物質安全管理施策を支援する  
工学的（迅速，安価）スクリーニング手法開発

1) 内分泌かく乱化学物質を定量・同定するための  
化学分析システムを構築する

サブテーマ（1）：活性物質精密質量ライブラリ

2) 内分泌かく乱化学物質の活性（生殖毒性）を  
工学的基材でスクリーニングする

サブテーマ（2）：活性特異的濃縮基材開発

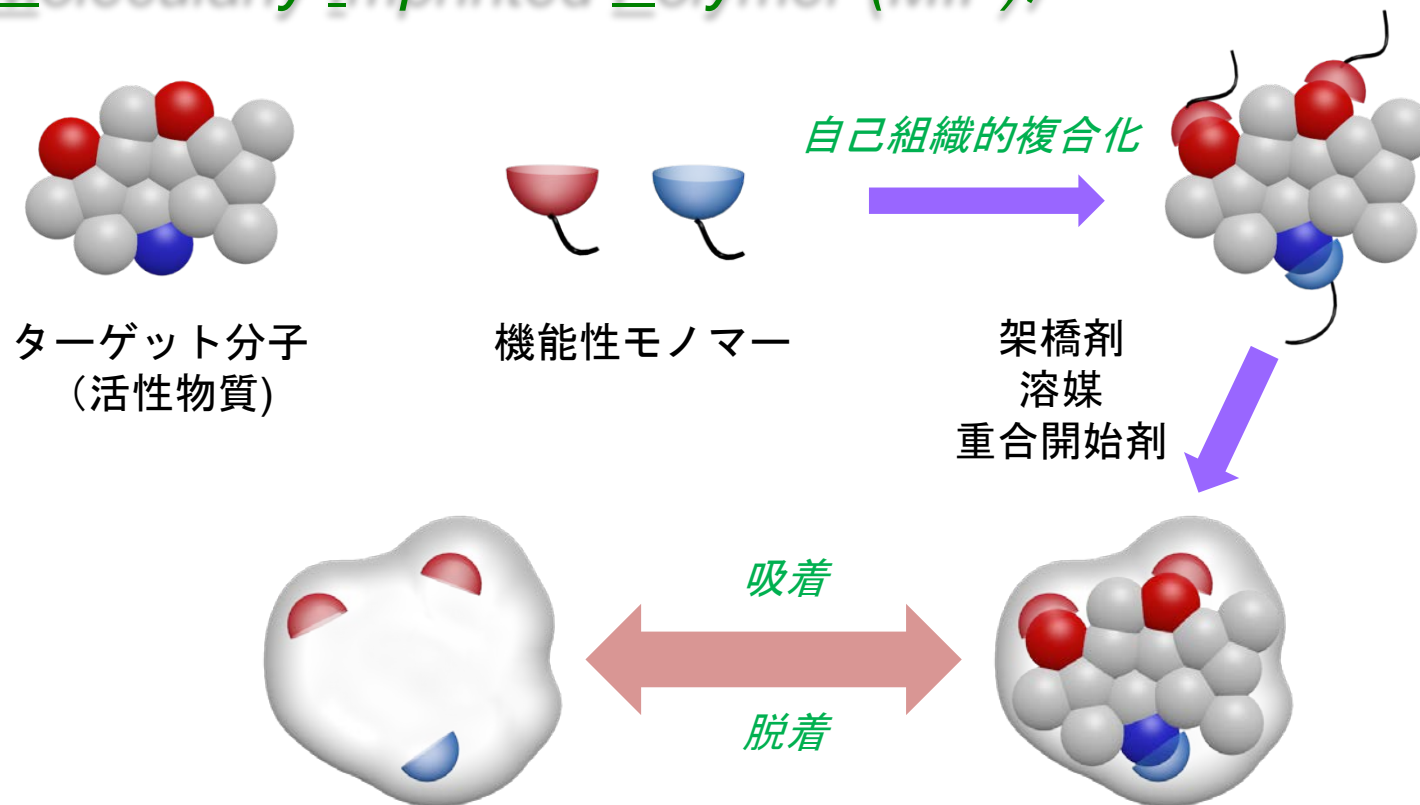


ハザード評価、環境中濃度測定の両面から  
In vivo試験対象物質の絞込みに貢献

# 分子インプリント法

## 分子インプリントポリマー

〈Molecularly Imprinted Polymer (MIP)〉



本来MIPが目指す“単一分子のみ”の選択的認識場を敢えて緩く作製することにより、生体内の受容体における化学物質認識を模擬できる可能性に着目

# 研究実施体制と計画

サブテーマ (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

＜国立環境研究所＞

代表者：◎中島大介

多段階精密質量ライブラリ  
オンライン化

分担者：中山祥嗣

同定定量システム開発

①

ER結合活性物質の精密質量データベース構築

(データベース)

⑤

差分ピーク抽出法及び解析ソフト開発

(ソフト)

④

オンライン迅速同定定量システム構築

(MIP-LC-QTOF装置)

高通水性基材の  
オンライン化

同定定量ソフトの  
装置実装

環境試料での  
検証試験

サブテーマ (2)

＜京都大学＞

分担者：○久保拓也

活性特異的濃縮基材開発

②

活性特異的濃縮基材の開発

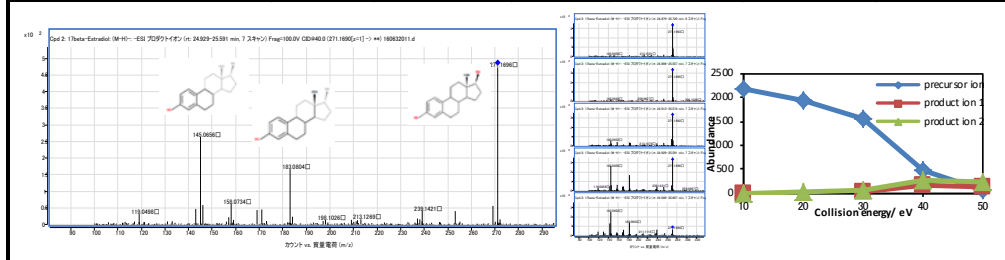
(ER\_MIP)

③

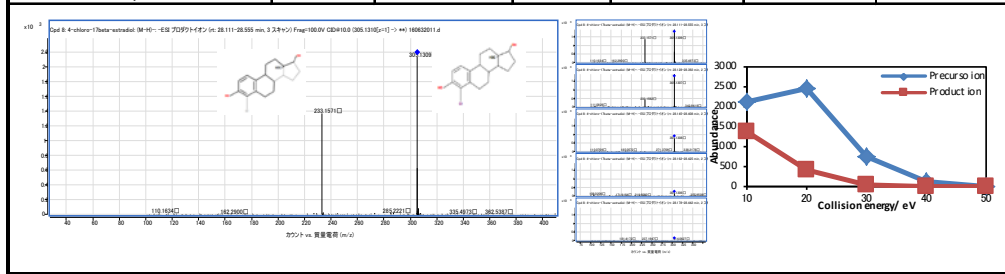
活性特異的濃縮基材の  
高通水性化

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

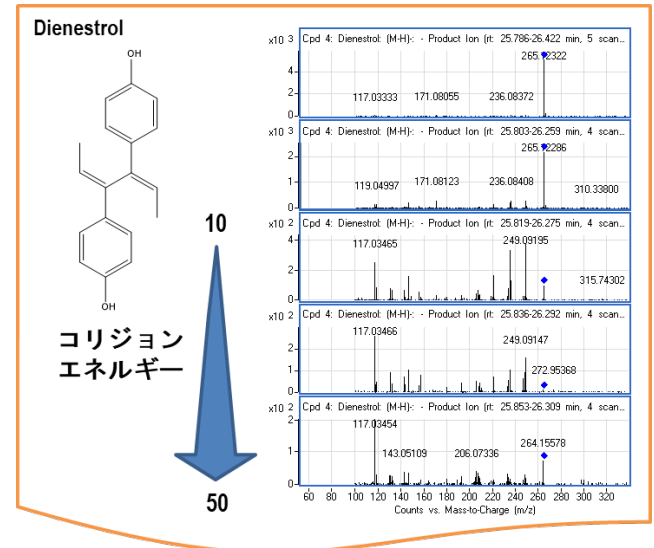
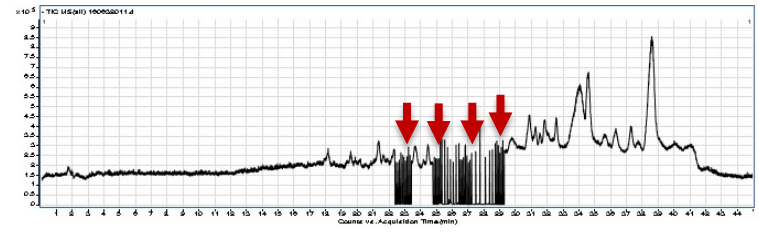
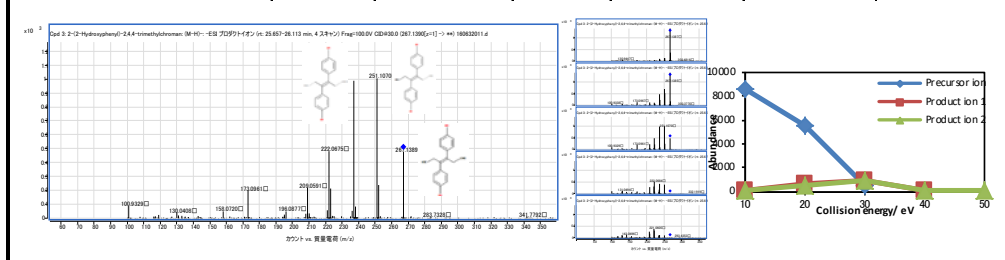
物質名	CAS No.	示性式	RT/ min	Base peak m/z	Product ion1 m/z	Product ion2 m/z
17β-Estradiol	50-28-2	C18H24O2	25.26	271.169	183.080	145.066



物質名	示性式	RT/ min	Base peak m/z	Product ion1 m/z	Product ion2 m/z
4-chloro-17β-estradiol	合成品 C18H23O2Cl	26.54	305.1309	233.157	-



物質名	CAS No.	示性式	RT/ min	Base peak m/z	Product ion1 m/z	Product ion2 m/z
Diethylstilbestrol(DES)	56-53-1	C18H20O2	25.52	267.1389	251.107	237.0915

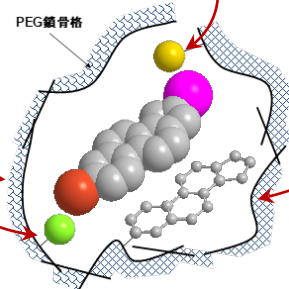
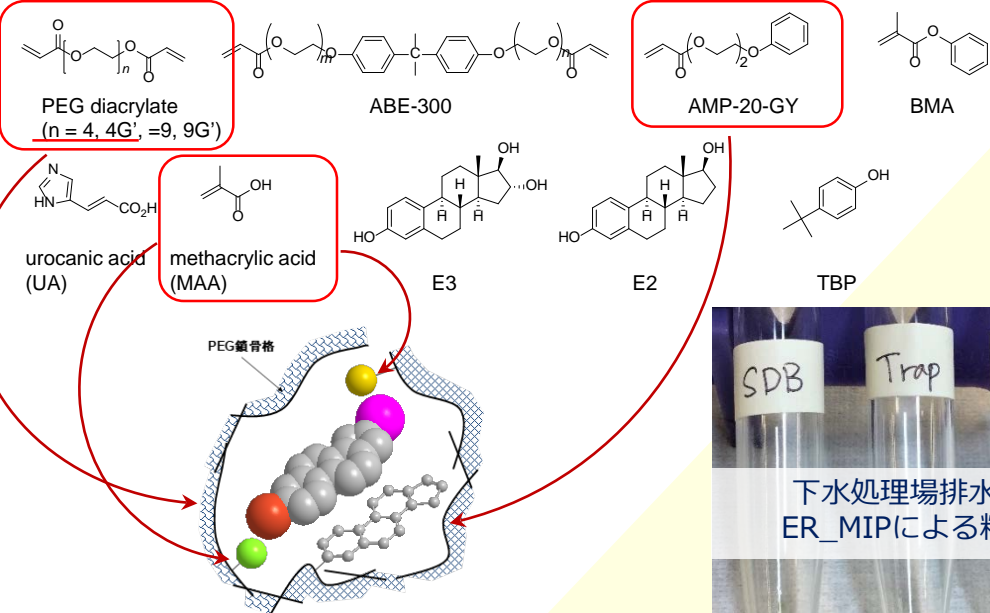


陽性141物質について、保持時間、多段階精密質量、相対感度係数をデータベース化。  
一斉ターゲット分析を可能とした。

# 活性特異的濃縮基材 (ER\_MIP) の開発

主な成果  
②

- ✓ ER活性を100%回収
- ✓ 高い精製効果



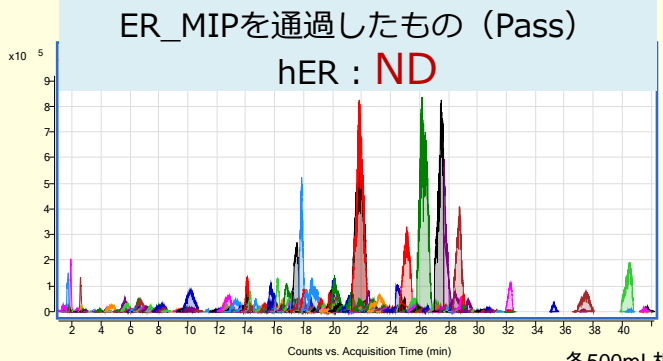
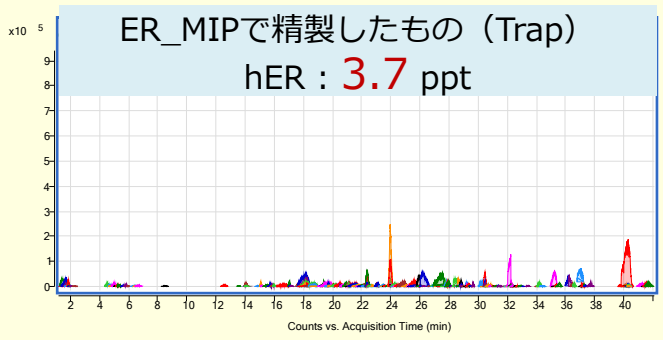
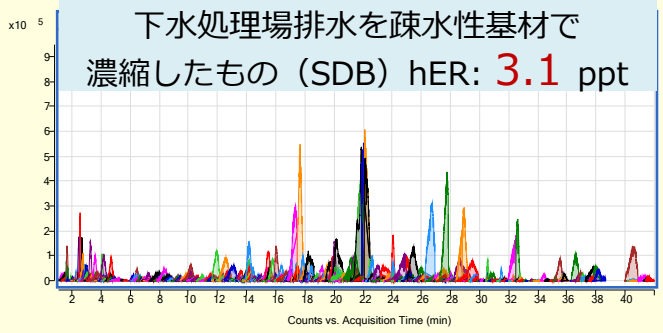
精製によりイオン抑制効果が低減  
↓  
検出感度向上



カートリッジタイプ ER\_MIP

検出された陽性物質と活性寄与率

Name	SDB (ppt)	Trap (ppt)	hER ECx10 (nM)	ER活性 (ppt, E2換算)
Equol	ND	600	250	0.2928
6,8-Dichlorogenistein	ND	10	9100	0.0001
17β-Estradiol	0.3	0.6	0.12	0.6000
Estrone	1.4	3.2	0.72	0.5333
total				1.43



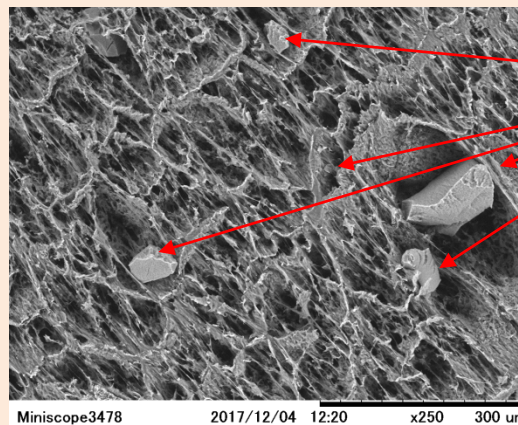
各500mL相当

精製効果の高い活性特異的濃縮基材の開発に成功。誤検出の低減、感度向上を実現。ER\_MIPへの吸着特性から新規物質のER結合活性の推定が可能になる可能性。

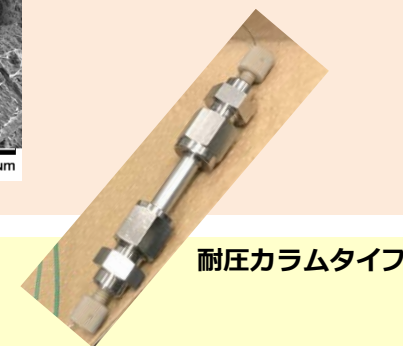


# 活性特異的濃縮基材の高通水性化

## MIP配合型スポンジモノリス

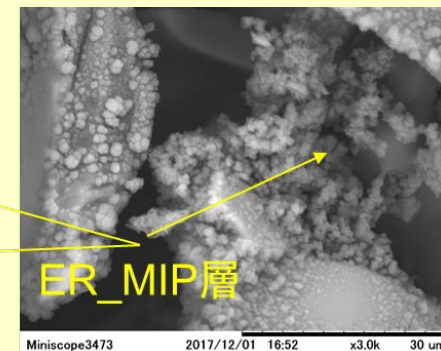
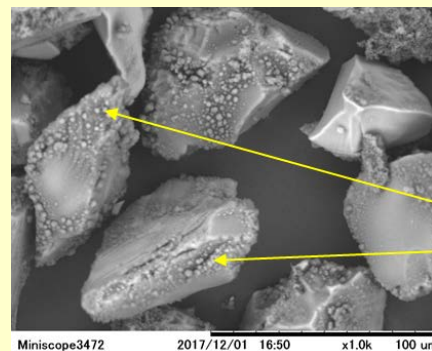
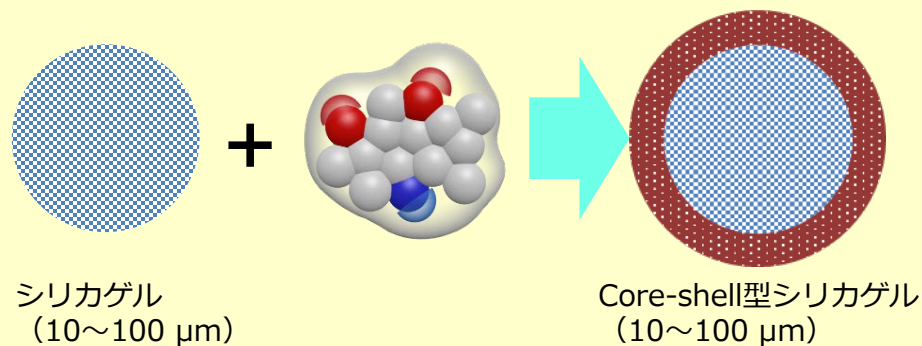


ER\_MIP粒子



耐圧カラムタイプ

## Core-shell型 MIP-シリカゲル

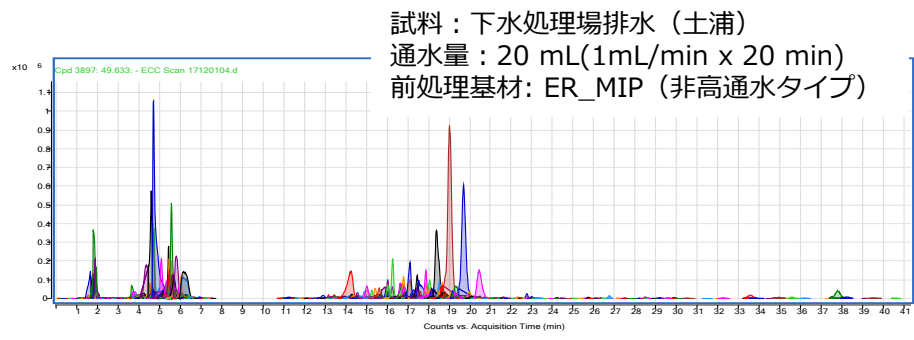
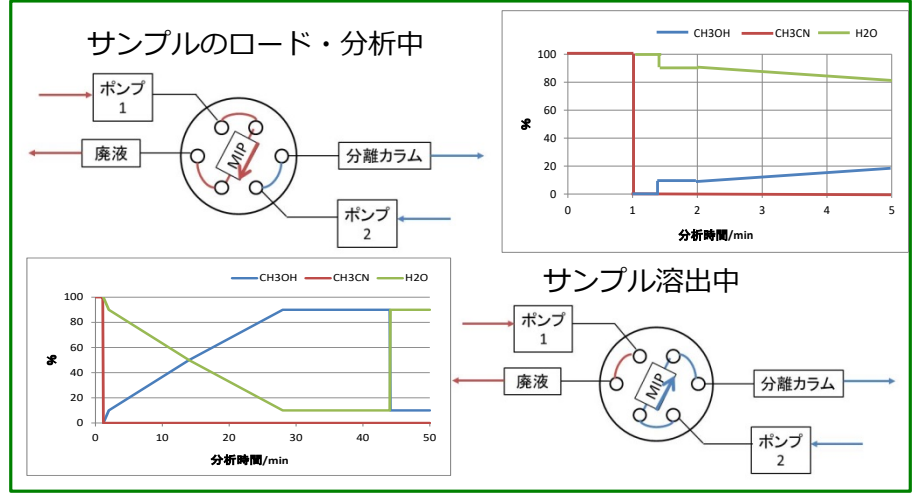
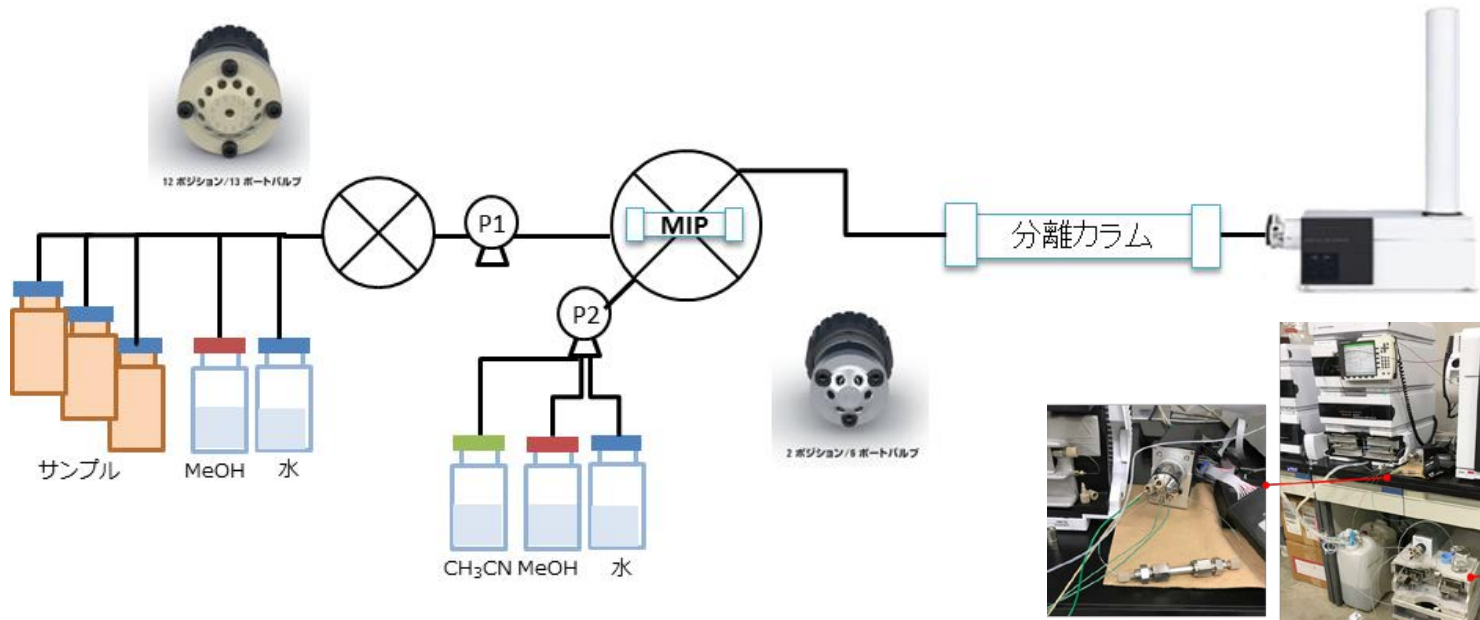


ER\_MIP層

スポンジタイプ、コアシェルタイプのER\_MIPを開発、高速でより高い濃縮率を実現

# 活性特異的前処理基材を接続したオンライン自動分析系の構築

主な成果  
④



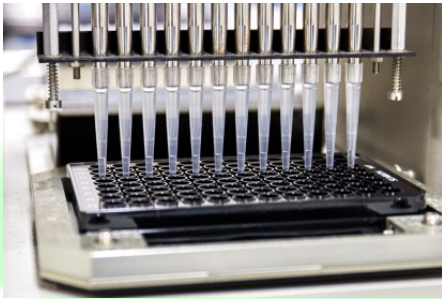
環境水試料をオンライン自動分析系で測定した際のクロマトグラム例

最大10検体の環境水試料を直接MIPに導入して自動分析する装置を作製。  
 定量精度、回収率等の詳細な検討は追って実施する必要がある。  
 QTOFの部分にMS/MS (QQQ)を接続することで高感度一斉分析計も可能。



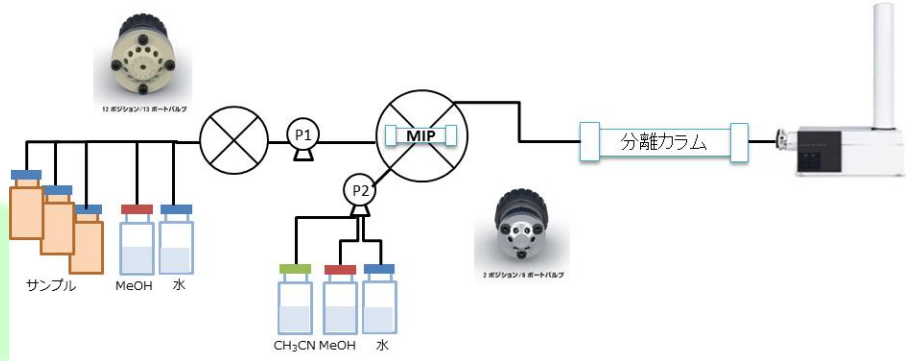
# 本課題の成果を統合して実現するようになったこと

主な成果  
課題全体



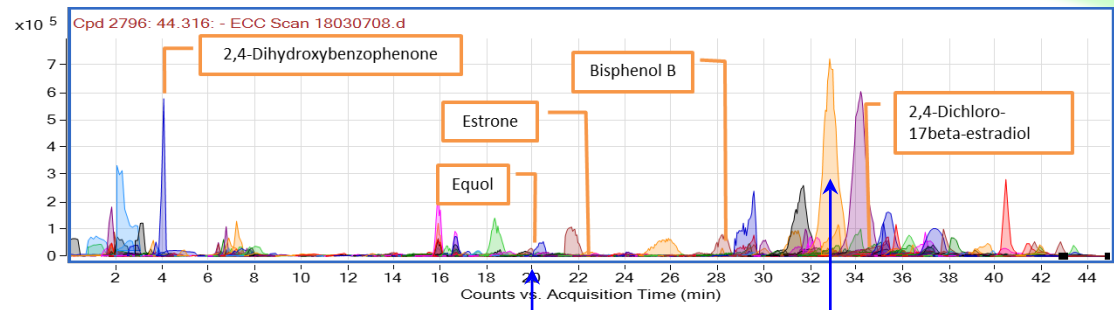
酵母アッセイにより活性確認  
(利根町下水処理場 : 35 ppt)

## 1. 下水処理場排水のhER結合活性確認



## 2. MIP-LC/QTOFシステムによる一斉分析

**!**  
MIPに強く吸着して溶出してこない物質は測定できない



ターゲット分析だけなら、MIP-LC/MS/MS系にすることで感度の向上が期待できる

データベースにヒットしなかったピークはQTOFにより構造推定も可能

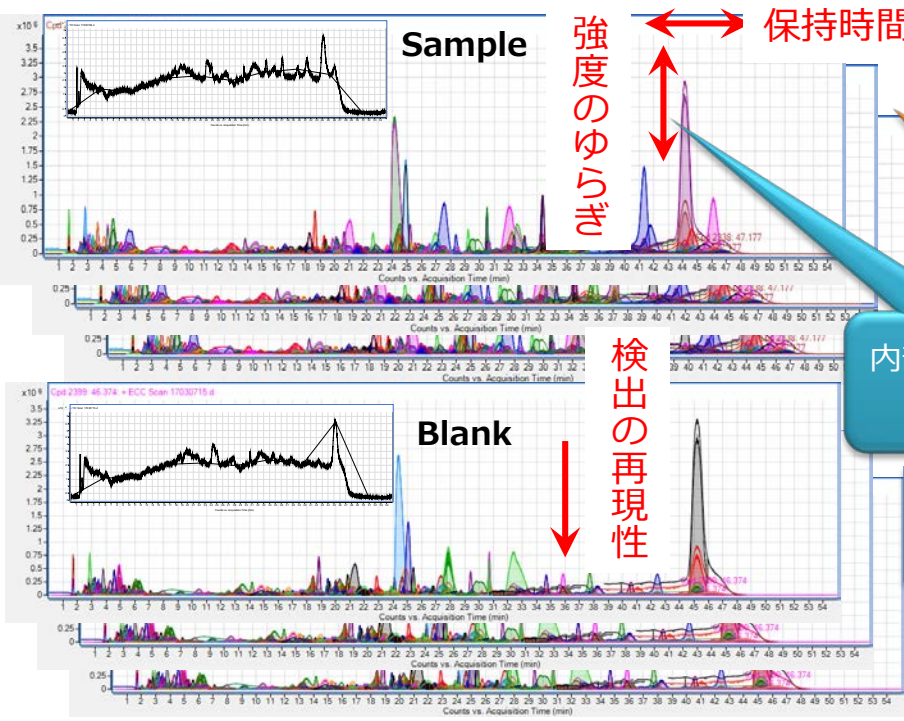
## 3. 活性物質の同定定量と寄与算出

	濃度 (ppt)	hER 活性 (ECx10, nM)	活性寄与 (ppt as E2)
2,4-Dihydroxybenzophenone	66.59	570	0.014
Equol	1.79	250	0.001
Estrone	1.30	0.72	0.216
Bisphenol B	0.12	2300	0.00001
2,4-Dichloro-17beta-estradiol	1.59	15	0.013
total			0.24

環境水中のhER物質の一斉定量結果と活性から、各物質の寄与の算出が可能になった

# 差分クロマトグラム描画ソフトウェアの開発

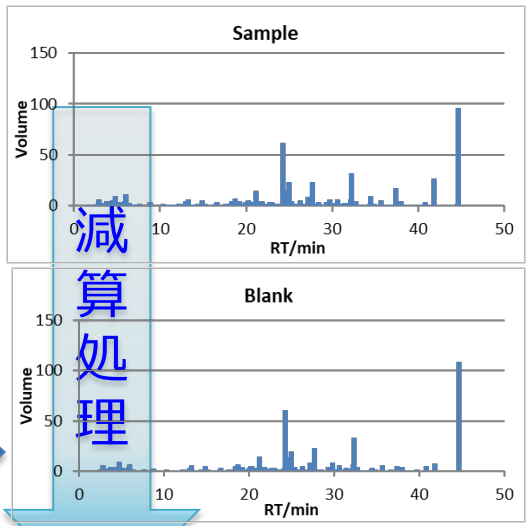
主な成果  
⑤



近傍ピークの精密質量を比較してID化

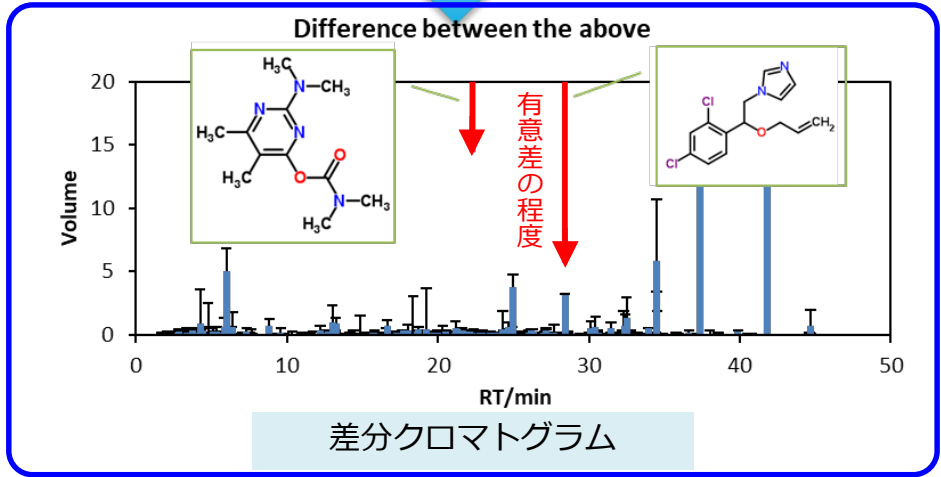
内部標準を用いて相対化

標準化



LC/TOFによるクロマトグラム

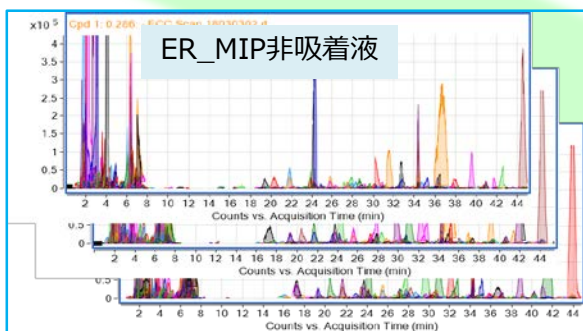
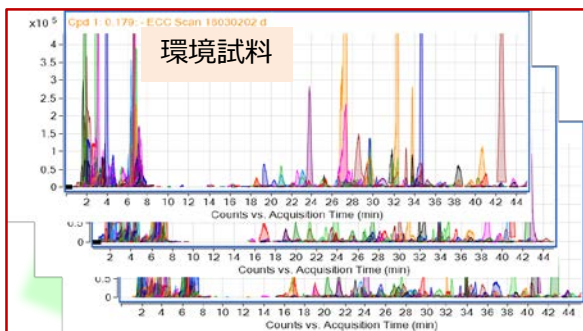
Microsoft Excel®のアドオンとして開発



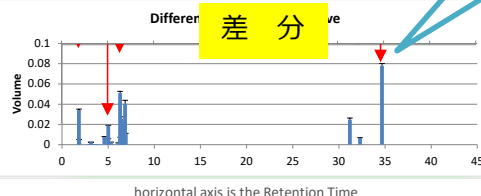
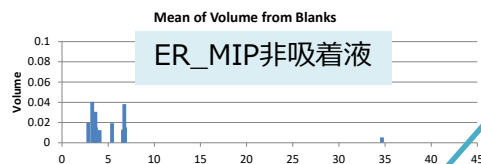
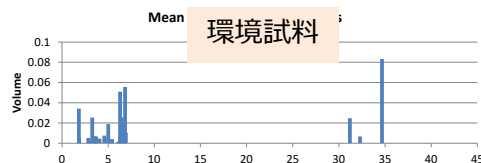
従来不可能だったクロマトグラムの差分の描画を実現  
事故対応などにも応用が期待される

# 本課題の成果を統合して実現するようになったこと

主な成果  
課題全体



## 差分クロマトグラム描画ソフトウェア



$m/z(M-1)$  : 250.1449  
 $C_{11}H_{24}O_6$  : 251.1524  
 Cal.  $m/z$  : 250.1422  
 Diff (ppm) : -11.2

## 5. 活性物質の候補ピークを抽出

様々な環境水から挙げられた構造未知の活性候補ピーク

採取地点	hER活性 (ppt as E2)	Mass	Rt (min)	推定示性式	差 (ppm)
茨城1	8.2	446.2056	13.47	C22 H35 Cl O7	2.54
		250.1571	26.09	C15 H22 O3	-0.42
熊本1	18	637.3443	29.88	C30 H53 O14	-0.74
		328.2608	32.42	C19 H36 O4	1.1
熊本2	2.0	411.0490	17.86	C17 H26 Br Cl2 O2	0.79
		250.1566	26.27	C15 H22 O3	-0.42
愛知1	16	670.0496	23.48	C28 H28 Br Cl O12	0.4
		566.1526	22.31	C21 H36 Cl2 O13	0.52
愛知2	0.31	295.0721	15.84	C15 H16 Cl O4	5.8
		251.1518	31.01	C11 H23 O6	-10.1
愛知3	6.6	324.1614	29.07	C16 H30 Cl2 O2	3.97
		367.9067	20.08	C8 H11 Br Cl2 O7	-1.3
愛知4	0.38	234.1615	29.08	C15 H22 O2	-0.09
		251.9832	18.65	C11 H5 Cl O5	-1.78

## 4. ER\_MIP通水前と、通水後の非吸着画分の差分から消失ピークを検索

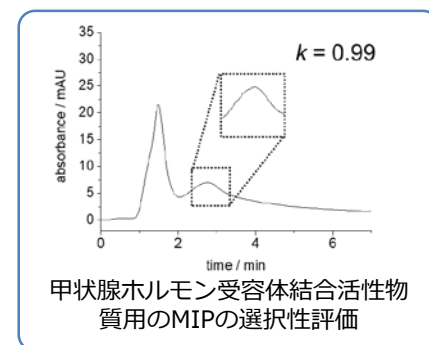
MIP通過により  
消失したピークの  
推定も可能に

環境水中の構造未知の活性物質  
候補の抽出が可能になった

実際の環境水中においてER活性寄与が大きい物質を明らかにできることに  
ハザード評価、環境中濃度測定の両面からin vivo試験対象物質の絞込みに貢献

# 学術的貢献 文献など

- エストロゲン受容体結合活性物質の選択的捕集基材の開発
  - 全く新規の発想による画期的な基材
  - MIP研究の新たな潮流を創設
  - 他の受容体結合活性へも展開
- エストロゲン受容体結合活性物質の高精度一斉分析法の開発
  - 活性全物質の定量→各物質の寄与率算出
  - Effect-Directed Analysisの先進的成果へ
  - 複合影響研究へ貢献
- 未知活性物質の探索・同定への起爆剤



## ➤ 紙上発表 (査読あり)

1. T. KUBO et al., *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 81, 102–109 (2016)
2. T. KUBO et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 130, 68-80 (2016)
3. M. Yagishita et al., *MHSR Jour.*, 29, 91-96 (2017) 他

## ➤ 学会発表

1. Nakajima D. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017, "Detection and measurement of receptor binding substances in environmental water by integrated of biological and chemical approach. : Assessing low-doses and cumulative effects of exposure to chemical mixtures"
2. T. Kubo, T. Nakano, T. Tanigawa, D. Nakajima, T. Naito, K. Otsuka: SETAC North America 38th Annual Meeting, USA; 2017, "Effective screening of the estrogen-receptor active compounds in environmental water using bio-mimic adsorbents prepared by molecular imprinting"
3. 中島大介環境ホルモン学会第20回研究発表会 (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」
4. 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」
5. 中野朋彦, 谷川哲也, 内藤豊裕, 中島大介, 久保拓也, 大塚浩二: 第25回環境化学討論会 (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」
6. T. Tanigawa, T. Nakano, D. Nakajima, T. Naito, T. Kubo, K. Otsuka: HPLC2016, San Francisco, USA, 2016 "Selective Separation of Estrogen-receptor Active Compounds by a Bio-mimic Adsorbent using an Enlarged Molecularly Imprinted Polymer"

第25回環境化学討論会  
RSC英国王立化学会賞  
受賞





# 国民との科学・技術対話

## 1. 市民公開シンポジウムの開催

- 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
- 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

## 2. 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
- 2016年7月23日 (参加者約5,200名) にて成果紹介
- 2017年7月22日 (参加者約5,486名) にて成果紹介

## 3. 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

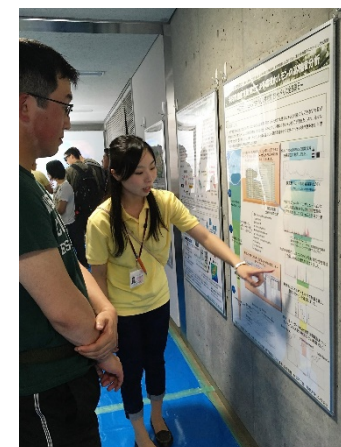
## 4. 生態影響に関する化学物質審査規制／試験法セミナー

「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



市民公開シンポジウム



夏の大公開での研究紹介

# 環境政策への貢献

- 受容体結合活性物質の特異的吸着基材の活用による貢献
  - 新規化学物質等の受容体結合活性が簡便迅速にスクリーニング可能になる。
  - 効果的前処理基材としてエストラジオール等の環境実態調査等へ活用可能性。
  - 活性未知の物質を新たに検出できるようになる。EXTENDにおいて下流側からの候補物質選定スキームの補完に貢献する。
- 環境中での受容体結合活性物質の実態把握へ貢献
  - 精密質量によるエストロゲン受容体結合活性物質の高精度分析条件を提供
  - その他汎用分析法を含めた環境中の女性ホルモン様物質の網羅的実態調査を可能とする情報を一般に公開・提供可能
- エストロゲン等受容体結合活性物質の一覧と公開によるEXTENDへ貢献

(投稿準備中を含む)