

【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 (H27～H29)

中島 大介 (国立研究開発法人国立環境研究所)

1. 研究開発目的

本申請研究の分担者らは、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、内分泌かく乱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よりも比較的容易に作製可能な「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する。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ける内分泌かく乱化学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。

2. 研究の進捗状況

サブテーマ(1)ではエストロゲン受容体結合活性 (アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性) を示す全ての物質について LC-QTOFMS による精密質量測定を実施し、イオン化可能な全ての物質について精密質量数及びコリジョンエネルギーを 5 段階に変化させた際のプロダクトイオン強度の変化を明示し、マイクロソフトエクセル及びアクセスを用いてデータベース化した。続いて当初の計画を越え、LC-QTOFMS ではその化学構造上、検出困難な物質について LC-MS/MS 及び GC-MS/MS での分析条件を調べ、全活性物質 177 物質のうち 166 物質に対して一斉分析法の構築に必要な分析条件を整備できた。そのほか、個別分析法の適用によって一部 (1 物質) の例外を除き、全ての分析パラメータを整備した。更に、588 物質の受容体結合活性について、エストロゲンの他に 4 種の受容体結合活性及び発光細菌毒性値を整理してデータベース化できた。

サブテーマ(2)では既存の吸着剤よりも疎水的な非特異吸着を大幅に低減することを親水性ポリマーの利用により達成した。また、親水性ポリマーマトリックス内で疎水的なモノマーが hER 結合活性物質の吸着性を向上させ、そこに酸性モノマーを加えることで、hER 結合活性物質の選択的吸着に成功した。さらに、pH を変動させることにより、相対的に吸着選択性を向上させることができた。この検討結果に基づき、次年度における活性特異的濃縮基材の作製に進むことが可能となった。以上のように当初の計画段階での個々のステップをクリアできたと判断できる。

サブテーマ (1) 及び (2) で得られた組み合わせることで、将来的に 環境中の既知全活性物質の濃度実態調査の実現、 活性特異的濃縮基材による環境試料中活性物質の選択的濃縮 (夾雑物質の効率的除去) 活性特異的濃縮基材による環境試料中の未知活性物質の検出と同定、 環境中活性物質の活性寄与算出、等の成果が見込まれる。

3. 環境政策への貢献

本研究課題の成果は、以下のような環境政策への貢献が見込まれる。

- i. 588 物質の受容体結合活性強度を一覧表に整理した。他に男性ホルモン受容体、催奇形性に関係するレチノイン酸受容体、生体機能維持に関する構成的アンドロスタン受容体、ダイオキシンや多環芳香族類と結合するアリルヒドロカーボン受容体との結合活性強度の一覧表も作成した。この成果は、EXTND における候補物質の選定等に資する。
- ii. エストロゲン受容体結合活性物質の高精度な一斉分析法作成支援のため、これに必要な分析パラメータを調べ、データベース化した。これにより、従来、代表的物質に限られていた環境中の濃度測定が、網羅的に一斉分析することが可能になる。従来の LC-MS/MS 等よりも定性精度の高い LC-QTOFMS による分析法作成の支援となり、今後の環境実態調査に活用が見込まれる。
- iii. エストロゲン受容体結合活性物質 177 物質に関する網羅的分析法を、LC-QTOFMS による高精度一斉分析 (138 物質)、LC-MS/MS による一斉分析 (6 物質)、GC-MS/MS による一斉分析 (22 物質)、その他のターゲット分析 (10 物質) のセットで網羅分析することを提案した。
- iv. 本課題で開発しつつある受容体結合活性物質の特異的吸着基材を利用することで、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。環境試料から受容体結合活性物質だけを抽出することが可能になる。活性未知の物質を新たに検出できるようになる。LC-QTOFMS 等と併用することで、EXTEND における候補物質選定スキームを補完できる可能性がある。
- v. 上記 i. と iii. の成果を組み合わせることにより、河川水などに含まれる活性物質の濃度と活性への寄与が算出可能となり、EXTEND における評価対象物質選定に資する。

#### 4. 委員の指摘及び提言概要

研究は順調に進捗していると考え。また、大変重要で独創的な成果が得られていると思う。作成した基材は、スクリーニング法として有用と考えられ、多様な試料への適用が期待される。今後、活性強度の差による分別まで可能になれば大変面白い。

学術的貢献が大きい。知財としての価値、標準化などを検討すると良いのではないかと。

#### 5. 評点

総合評点：A