

【研究報告】

生態系と複合汚染とを統合解析する手法の研究開発

An integration method for evaluating complex pollution inter eco-system

佐々木秀輝\*、\*\*\*\*、大嶽昌子\*、米久保淳\*\*、早川和一\*\*\*

Hideki SASAKI\*、\*\*\*\*, Masako OHTAKE\*, Jun YONEKUBO\*\*, Kazuichi HAYAKAWA\*\*\*

【要約】環境汚染調査における複合汚染の評価と、原因物質と生態系の反応との因果関係を評価するための手法を開発する事を目的とした。網羅的に環境中の化学物質と生体中の化学物質をLC/MSを用いて半定量し、得られたデータを主成分分析する事により縮約・可視化し、評価を行う事で、生態系を評価する手法により、外因性ならびに内因性のマーカーが探索でき、生態系同士を比較する事が可能となるかについて検討した。LC/TofMSによる測定と、主成分分析による解析で網羅的な分析と解析が可能となる可能性が示唆された。PubMedを用いて残留性汚染物質(POPs)に関する文献検索を行い、環境汚染物質に対する内因性マーカーを探索した。代謝酵素、細胞死関連タンパク質、細胞周期コントロールタンパク質、細胞間情報伝達関連タンパク質及びサイトカイン受容体等がマーカー・標的分子候補として有望であった。

キーワード:生態系、複合汚染、バイオマーカー、メタボミクス、網羅的分析、主成分分析

1. 目的と背景

化学物質による環境汚染の調査や研究において、環境汚染の程度を評価したり、汚染と疾病との因果関係を判断したりするにあたって、汚染の原因となりうる特定の物質だけを解析するのではなく、可能な限り多数の化合物・因子を同時に解析する事は、現実の環境を総合的に評価するために重要な事である。また、汚染の度合いを評価すると同時に、汚染によって生じる生体内の内因性物質の変化を可能な限り多数の物質について測定し、汚染(外因性)物質と内因性物質の変化とを関連付ける作業もまた、汚染と疾病との因果関係を判断するうえで重要な事である。

というのも、環境試料はほとんどの場合、複雑なマトリックスで構成されているため、単一の物質のみが存在している事例はまれで、多数の化学物質が複雑に組み合わせられて複合汚染している場合がほとんどであると考えられる。また、当然の事ながら、生体は多数の物質で複雑に構成されており、この化学物質は外的刺激に対して多様な応答をする。

しかし、1970年代からすでに指摘されてきた複合汚染の問題が、2000年代に至ってもなお解決できていない事からも明らかなように、外因性並びに内因性物質

を多数同時に評価解析する手法はいまだ確立されていない。このため仮にもし、汚染の原因となりうる候補物質を含む環境中の多数の化学物質と、多数の内因性物質とを一斉に網羅的に分析し、得られたデータを統合し、理解しやすい情報に変換・解析する技術が開発出来れば、現実にある複合汚染と生態系からの反応とを結びつけられ、汚染の原因と汚染の結果との因果関係を直接的に説明できるのではないかと考えられた。

このような網羅的解析を実現化する上で問題となるのは、どのようにして膨大な数の分析値を得るかという点と、得られた分析値をどのようにして解析するかという点である。

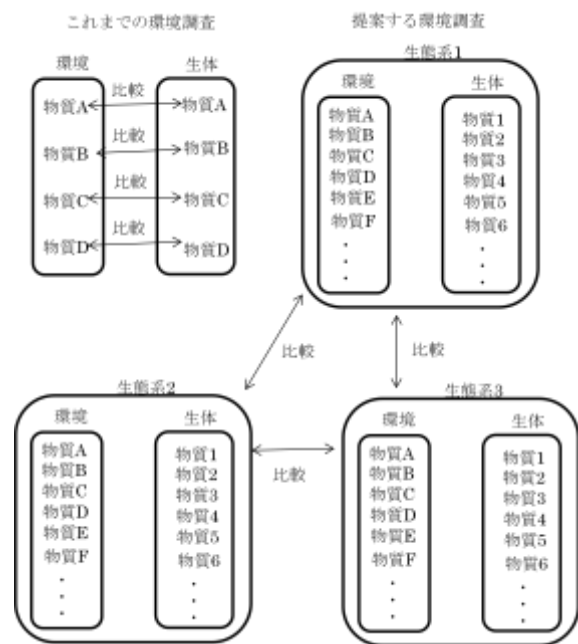


図1 研究の概念図

著者所属:\*(財)日本環境衛生センター環境科学部、\*\*(株)日本ウォーターズ応用研究部、\*\*\*金沢大学大学院自然科学研究科、\*\*\*\*現所属:環境省環境保健部化学物質審査室、\*Japan Environmental Sanitation Center, \*\*Nihon Waters K.K., \*\*Kanazawa University Graduated Scholl of Natural Science &Technology, \*\*\*\*Present address: Chemicals Evaluation Office, Ministry of the Environment, Japan

網羅的な分析を実現する最も有力な技術の一つは、クロマトグラフィーと質量分析とを融合させた技術、即ち GC/MS や LC/MS である。これらは SIM (Selected Ion Monitoring) や MRM (Multiple Reaction Monitoring) モードでの分析により特定の物質を高感度に定量する手法として、環境化学分野ですでに広く普及しているが、本稿で提案するのは Scan モードでの測定である。特に LC/Tof-MS を用いた分析では、一回の分析で数万物質を ppt (ng/L) から ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) のオーダーの検出感度で分析する事が可能である<sup>(1,2)</sup>。

一方、分析データを網羅的に解析する技術として最も有力な解析手法の一つとして挙げられるのは、メタボノ (ロ) ミクス技術等でも使われているピークピッキング技術と主成分分析 (PCA : Primary Component Analysis) の融合である<sup>(1,3,4)</sup>。

ピークピッキング技術とは、3次元のトータルイオンクロマトグラム (TIC ;  $m/z$ 、保持時間および強度との3つの因子から構成されている) データから、測定した全  $m/z$  領域に渡って、特定の  $m/z$  で網羅的にクロマトグラムを抽出し、検出されている全てのピークの応答を出力する技術である。また、PCA は多変量統計解析の技術一つで、多次元のデータを縮約して、2次元や3次元画面上に投影する事が可能である<sup>(1,3)</sup>。

これらの技術を融合させれば、複雑な因子を持つ生態系同士を比較し、複合汚染の評価やマーカーを探索する事が出来るのではないかと考え、研究全体の構想を以下の様に計画した。

① 環境 (水、大気、土壌) 試料を網羅的に半定量する (内部標準に対する応答の比を各成分の応答とする)。

② ①の試料と同じ地点の生体試料を網羅的に半定量する。

③ ①、②から得られたデータを1地点毎に1つのデータセットとして融合させる。

④ 複数のデータセットを PCA により解析し、測定地点毎、もしくは測定化合物ごとに、2次元あるいは3次元空間上に投影する。

⑤ 投影された空間上で、測定データを比較する事により、汚染の状況と生態系全体での挙動とを把握する、あるいはマーカーとなる物質の探索等を行う。

本研究報告においては、多数のデータを採取するのに先立ち、(1) 多数の化合物を同時に解析し、生態系同士を比較する手法を最適化・検証し、(2) 測定方法を最適化する目的で、内因性化合物として何を測定すべきか、あらかじめ文献検索により目測をつけておく事、及び (3) 簡易的な模擬試料を実測後、(1) により最適化された解析法を適用し研究手法の妥当性を検

証する事を目的とした。

## 2. 研究の方法

### 2.1 環境中の多数の化合物を同時に解析する手法の検討

PCA による解析手法を最適化する目的で、公的な機関により測定・公開・解析されており、かつ環境中の多数の成分が同時に多地点で測定されているデータセットを用いて、解析方法の検討を行った。

このような条件を満たすデータセットとして環境省「平成 18 年度化学物質と環境 モニタリング調査分析機関報告データ」<sup>(13)</sup> に公表されている PCB の測定値がある。この検討用データには、PCB の同族体 24 物質について全国 48 地点での測定値が含まれ、計  $24 \times 48 = 1152$  個の測定値が存在する。

この検討用データセットを Microsoft 社製 Excel (WA, USA) のシートに入力した。シートの縦のカラム (列) には測定地点名、横のカラム (行) には化合物名を入力し、各カラムには測定された各化合物の濃度を入力した。入力が終わったワークシートを Umetrics 社製 SIMCA ソフトウェア (Umeå, Sweden) にインポートし、PCA を行った。

各測定地点をプロットしたスコアプロットと各測定成分をプロットしたローディングプロットを 2次元画面上で作成し、両者を比較する事により、各測定地点に特異的に多いあるいは特異的に少ない成分を抽出した。

これらの成分を、3次元画面に作成したスコアプロット上で、測定地点間と特異的成分との関連性を比較した。

### 2.2 内因性化合物として何を測定すべきかの検討 (文献検索)

研究の最終目標は、網羅的分析・解析を行う事であるが、どのような測定を行うべきかの検討に資する目的で文献調査を行った。汚染物質の対象を残留性有機汚染物質 (POPs) に絞り、POPs 暴露に対するバイオマーカー、および POPs が直接的に作用する標的分子を探索した。

アメリカ国立医学図書館 (NCBI: National Center for Biotechnology Information, USA) の医学文献データベース PubMed<sup>(10)</sup> を用いて、文献検索を行い、化合物の対象を残留性有機汚染物質 (POPs) による汚染のマーカーとなりうる内因性化合物を探索した。

検索の対象とした POPs は以下の 17 化合物群である。1) DDT、2) PCB、3) PFOA、4) PFOS、5) アルドリ

ン、6) エンドリン、7) エンドスルファン、8) クロルデコン、9) クロルデン、10) デイルドリン、11) トキサフェン、12) ヘプタクロル、13) マイレックス、14) ヘキサクロロシクロヘキサン、15) ポリクロロベンゼン、16) ポリブロモビフェニル、17) ポリブロモジフェニルエーテル。

これらの化合物について、原則として[物質名] and [human] and [exposure]で検索される文献すべてについて、そのタイトルを出力した。ただし、一つの化合物当たり 500 を超える物質群については、最新の 10 年間のみの文献を用いた。調査した時点 (2009 年 2 月) で出力された総計 2796 報をタイトルから内容を判断し、サマリーを 1724 報出力し、ここから有用と判断された文献の本文 335 報以上について精査し、マーカー探索を行った。

### 2.3 研究の妥当性の検証 (模擬試料での分析)

本研究の最終目標は可能な限り多量のデータを取得・解析する事であるが、本報告では手法の開発・検討が主目的であるため、検証の手間を省く目的で、環境試料の抽出液と生体試料とを混合した状態に近く、容易に入手できる試料の代表として、ビールおよびビール風味アルコール飲料を用いた。

LC/ToF-MS 測定、ピークピッキングおよび PCA により試料を分析・解析し、試料間の微妙な差が判定できるかどうかを検証した。

試料は、市場より購入し、開封後三角フラスコに入れ、泡があふれない程度にゆるやかに振とうし、一晚冷暗所にて保存したものを分析用試料とした。

ピークピッキングには Waters 社製 MassLynx ソフトウェアの MarkerLynx オプションソフトウェア (MA, USA) を用いた。LC/ToF-MS 測定には LC として Waters 社製 Acquity UPLC システムを用い、ToF-MS には Waters 社製 LCT-Premier XE を用いた。カラムには Waters 社製 Acquity BEH, 100 × 2.1 mm ID., 粒子径 1.7 μm を用いた。移動相は A: 0.1% ギ酸水溶液、B: 0.1% ギ酸を含むメタノールとし、流速 0.4 ml/min で B% を 10 から 100% まで、0 min から 4 min の間でグラジエント分析を行った。注入量は 5 μL とした。

ToF-MS の条件は、スキャン範囲  $m/z$  200 から 1000、分解能 10000、スキャン時間 0.1 sec/spectra、Lockmass: Leucin-enkephalin  $m/z$  556.2772、質量精度 3ppm である。イオン化は ESI モード、イオン化電圧 3600 V、脱溶媒ガス温度 200°C、脱溶媒ガス: 窒素 (200°C) で測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 環境中の多数の化合物を同時に解析する手法の検討

図 2 に環境省「平成 18 年度モニタリング調査分析機関報告データ」を PCA により解析し、3 次元投影した結果を示す。図中に示された点の一つ一つが各測定地点を示している。

図 3 のグラフ上で左側に行くほど PCB 汚染の強度が弱く、右側に行くほど汚染の強度が強くなっている。また、奥行き方向のデータはより化合物中の塩素の数が少なく、手前側の方は塩素数が多くなっている。

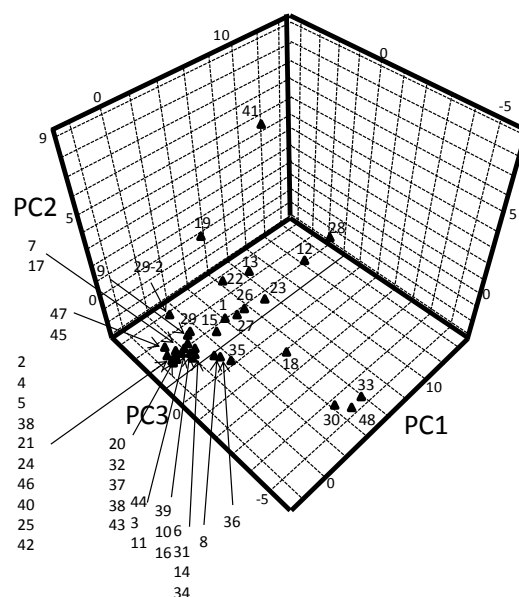


図 2 環境省「平成 18 年度モニタリング調査分析機関報告データ」の PCB の測定値を PCA 解析し、3 次元投影した。

(測定地点) : 1. 北海道十勝川すずらん大橋 (帯広市) 2. 石狩川河口石狩河口橋 (石狩市) 3. 青森県十三湖 4. 岩手県豊沢川 (花巻市) 5. 宮城県仙台湾 (松島湾) 6. 秋田県八郎湖 7. 山形県最上川河口 (酒田市) 8. 福島県小名浜港 9. 茨城県利根川河口かかもめ大橋 (神栖市) 10. 栃木県田川 (宇都宮市) 11. 千葉市花見川河口 (千葉市) 12. 東京都荒川河口 (江東区) 13. 隅田川河口 (港区) 14. 横浜市横浜港 15. 川崎市川崎港京浜運河 16. 新潟県信濃川下流 (新潟市) 17. 富山県神通川河口萩浦橋 (富山市) 18. 石川県犀川河口 (金沢市) 19. 福井県笹の川三島橋 (敦賀市) 20. 長野県諏訪湖湖心 21. 静岡県天竜川 (磐田市) 22. 愛知県名古屋港 23. 三重県四日市港 24. 滋賀県琵琶湖唐崎沖中央 25. 京都府宮津港 26. 京都市桂川宮前橋 (京都市) 27. 大阪府大和川河口 (堺市) 28. 大阪市大阪港 29. 兵庫県姫路沖 [50L] 29-2. 姫路沖 [250L] 30. 神戸港中央 31. 和歌山県紀の川河口紀の川大橋 (和歌山市) 32. 岡山県水島沖 33. 広島県呉港 34. 広島湾 35. 山口県徳山湾 36. 宇部沖 37. 萩沖 38. 徳島県吉野川河口 (徳島市) 39. 香川県高松港 40. 高知県四万十川河口 (四万十市) 41. 北九州市福岡湾 42. 佐賀県伊万里湾 43. 長崎県大村湾 44. 熊本県緑川 (宇土市) 45. 宮崎県大淀川河口 (宮崎市) 46. 鹿児島県天降川 (隼人町) 47. 五反田川五反田橋 (いちき串木野市) 48. 沖縄県那覇港

東京や大阪などの都市圏を含む多くの地点では左から右に伸びる (PC1 軸の平行) 線上に存在しており、汚染の度合いが高いほど矢印方向に移動している (図 3)。これらの地点では PCB 同位体の存在パターンは同じであると考えられ、濃度の違いこそあれ、汚染源は生活から出てきたものが中心になっているものと予想される。この様な傾向は従来から行われてきた方法によっても指摘されてきており、本報告で提案している手法には妥当性があるものと考えられた。

一方、左から右上に向かって伸びるライン上に存在する一群があるが、ここには洞海湾 (北九州)、笹の川三島橋 (敦賀市)、姫路沖 (250 L) の測定値がある。姫路沖のデータは通常 50 L の試料を処理するところを 250 L 使っているためであると考えられるが、他の 2 点は特殊な汚染 (油症関連か、不法投棄のようなもの) があつた可能性が考えられた。さらに、左から右下に向かって伸びるライン上に存在する一群がある。ここには神戸港、呉港、那覇港の測定値が含まれ、特殊な船舶由来からの汚染の可能性も考えられた。

この検討用データの解析結果から、PCA と 3 次元投影を組み合わせる事で、多数の測定データを同時に解析し、データをより総合的に判断する事が出来る可能性があるものと考えられた。例えば、同一地点について経時的に調査し、多数の測定データをもとに、その測定地点がどのように推移してきたか、あるいは推移するか等の予測が可能になるかもしれない。また、人為的な汚染がほとんどないと考えられるようなスーパーサイトやきわめて汚染が進行している地点との比較によって、評価地点がどの程度汚染されているかを、総合的に判断する等の応用が可能かもしれない。

### 3.2 内因性化合物として何を測定するべきかの検討 (文献検索)

すでに代表的なマーカーとして考えられている代謝酵素<sup>(6)</sup>である CYP1A、CYP2B 以外に、細胞死関連タンパク質<sup>(7)</sup>である caspase-3、-9、bcl-2、Bax、Fas、細胞周期コントロールタンパク質である p53<sup>(8)</sup>、細胞間情報伝達関連タンパク質である Cx43、EGF(R)<sup>(9)</sup> (上皮細胞増殖因子 (受容体))、TNF- $\alpha$ (R)等のサイトカイン受容体等がマーカー・標的分子候補として有望であった。

これらの CYP を含めたマーカーとして有望なタンパク質群は膜タンパク質が多い傾向があつた。しかし、膜タンパク質は脂溶性が高いため、水系での可溶化技術が確立しておらず、様々な手法が検討の段階にある<sup>(5)</sup>。現在、タンパク質研究で多用される電気泳動を中心とする分離・分析法は水系で操作されるため、脂溶性の高いタンパク質を高感度で分析する手法には向い

ていない。一方、LCMS(MS)では脂溶性の高い物質を扱う事も出来るため、これらの膜タンパク質を分析するのに優位な状況となっている<sup>(5)</sup>。

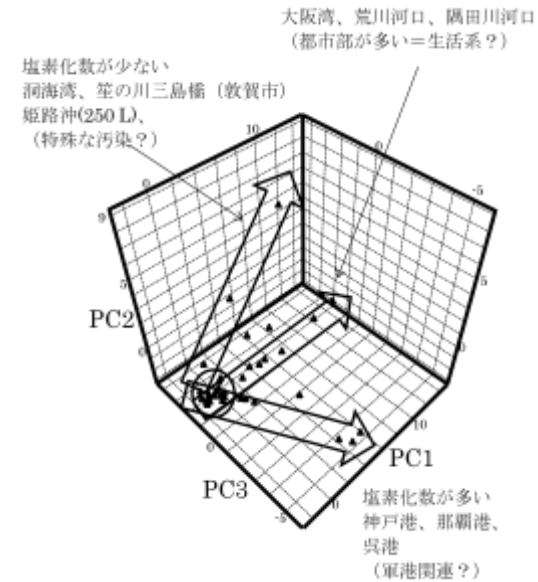


図3 環境省「平成18年度モニタリング調査分析機関報告データ」のPCBの測定値を各測定点毎にグループ化した (太い矢印)

CYP以外のマーカー候補のタンパク質については、CYPと比較してはるかに存在量が少なくと予想される事から、より高感度が達成できる実験計画が必要であろうと予測された。即ち、マーカーとなるタンパク質を、分画する前の状態でトリプシンにより加水分解し、得られたペプチドをLCMS/MS (タンデム四重極型) のMRMモードで高感度定量する手法の優位性が考えられた<sup>(11,12)</sup>。

一方、分子量が1000以下程度の低分子内因性代謝物に関しては、汚染物質との関係を研究した例自体が非常に少なく、有望なマーカーに関する情報は得られなかった。

従って、低分子の内因性代謝物に関しては、研究の新規性が高く、新たなマーカー探索の重要な研究領域となりえることがうかがわれた。

### 3.3 研究手法の妥当性の検証

ビールを環境試料と生体試料を混合した模擬試料とし、測定・解析を行った。試料としてビールを24種類、ビール風味飲料23種類 (発泡酒17種類、雑酒5種類、リキュール類1種類)、総計47種類の試料についてLC/Tof-MSで測定した。得られたScanデータを

MarkerLynx ソフトウェアで解析し、ESI ポジティブモードで検出された 13856 種の成分、ESI ネガティブモードで 16746 種類の成分について、全ての応答値を求めた。得られた応答値を、PCA 解析した試料ごとの結果を 1 つの点として、2 次元画面上に投影した (図 4)。

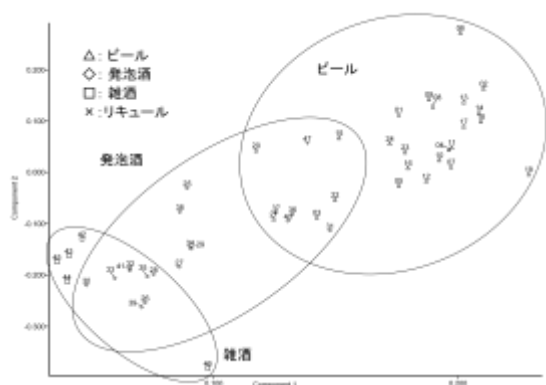


図 4. 市販のビールおよびビール風味飲料を UPLC/Tof-MS (ESI ポジティブ) 分析後、PCA を行い、2 次元画面に投影した

図 4 において、ビール、発泡酒、雑酒の 3 つの群が形成されており、製法の違いや原料等の微妙な差が、本研究で提示する手法で検出されている。ビール中に含まれる化学物質は極めて多様であり、有機酸や糖類以外にもペプチドなども含まれている。かつ各成分間での濃度差も極めて大きい<sup>(14,15)</sup>。このような複雑な組成をもつビール類の比較において、本手法が有効であることから、本研究で提案しているような環境試料(水、大気、土壌、生体)の総合的な解析においても、同様に有効である可能性が高いものと判断された。

#### 4. まとめ

今回の研究により、多数の測定値を 3 次元画面中に可視化し、総合的に判断するための手法が開発された。環境を総合的に判断する事に、本研究で開発された手法が適用できるかどうかの検証をする目的で、ビールおよびビール風味飲料を模擬試料として評価したところ、その有用性が確認できた。汚染による生体側の反応を示すマーカータンパク質の候補を探索し、いくつかの候補が見つかった。

#### 引用文献

1) 米久保淳, 井上知佳, 佐々木秀輝 (2006): 最新の飛行時間型質量分析計 LCT Premier™ の特徴と食品メタボロームへの応用, *Chromatography*, 27(2),

pp85-89

2) Hideki Sasaki, Jun Yonekubo and Kazuichi Hayakawa (2006): A new on-line sample preparation system for the liquid chromatography/time-of flight mass spectrometry simultaneous analysis of pesticides in river water, *ANALYTICAL SCIENCES*, 22, pp835-40

3) Hideki Sasaki, Hiroshi Akiyama, Yoshifumi Yoshida, Kazunari Kondo, Yoshiaki Amakura, Yoshimasa Kasahara and Tamio Maitani (2006): Sugihiratake mushroom (angel's wing mushroom)-induced cryptogenic encephalopathy may involve vitamin D analogues, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29 (12), 2514-18

4) Robert S. Plumb, Chris L. Stumpf, Jennifer H. Granger, Jose Castro-Perez, John N. Haselden and Gordon J. Dear (2003): Use of liquid chromatography/ time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, pp2632-2638

5) Takeshi MASUDA and Yasushi ISHIHAMA (2009): Sample Preparation Methods for Large-Scale Analysis of Membrane Proteins Using Shotgun Proteomics, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 57(3), pp145-151

6) 大村恒雄, 石村巽, 藤井義明 編集(2003): シトクロム P450, 講談社

7) Shi Y, Song Y, Wang Y, Liang X, Hu Y, Guan X, Cheng J, Yang K. (2009): *p,p'*-DDE induces apoptosis of rat Sertoli cells via a FasL-dependent pathway, *J.Biomed. Biotechnol.* 2009, pp181282

8) De Coster S, Koppen G, Bracke M, Schroyen C, Den Hond E, Nelen V, Van de Mierop E, Bruckers L, Bilau M, Baeyens W, Schoeters G, van Larebeke N. (2008): Pollutant effects on genotoxic parameters and tumor-associated protein levels in adults: a cross sectional study., *Environ Health.*, pp7-26

9) Rivedal E, Opsahl H. (2001): Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells., *Carcinogenesis.*, 22(9), pp1543-50

10) NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA),

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>

- 11) J.Sherman, M.McKay, K.Ashman, and M.Molly, Unique Srm (uSRM) Mass Spectrometry to Unequivocally Identify and Quantify All the Proteins in a Proteome, HUPPO 6<sup>th</sup> Annual World Congress Book of Abstracts, HA-0180, pp46
- 12) Sherman J, McKay MJ, Ashman K, Molloy MP. (2009): How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy., *Proteomics.*, 9(5), pp1120-3
- 13) 環境省環境保健部環境安全課 (2009), 平成 20 年度版「化学物質と環境」添付資料 分析機関報告データ添付,  
<<http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2008/index.html>>
- 14) 橋本直樹, ビールのはなし Part2 (1998), 技報堂出版, pp58-69
- 15) Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K.J., Verachtert, H. and Derdelinxkx, G. (2003), Evaluation of chemical and sensory properties during again of top-fermented beer, *J. Agric. Food chem.*, 51, pp6782-6790

### Summary

An integration method for evaluating comprehensively multiple environmental factors was developed. This method consists of a 5-step approach including step 1: semi-quantify environmental exogenous substances cyclopaedically, step 2: semi-quantify endogenous

substances of biota at the same environment cyclopaedically, step 3: integrating the exogenous data and the endogenous data into one dataset, step 4: statistically analyzing multiple data sets with primary component analysis (PCA) and step 5: comparing data sets in the down-dimension space and exploring markers. These approaches (step 4 and 5) are successively applied to evaluate analytical data of 24 PCB congeners at 48 points of the Japan coastal area. These approaches (step 1, 3, 4, 5) were evaluated by applying to beers as mock samples that contain comprehensively large numbers of exogenous compounds. Using UPLC/ToF-MS and PCA, beer samples were successively divided into three groups according to malts content. In order to previously get information of which molecules should be monitored in approach step 2, we did literature (PubMed) research for exploring bio-markers representing exposure of persistent organic pollutants. From the results of the literature research, the following (membrane) proteins were found as potential markers, 1) metabolizing enzymes: CYP1A, CYP2B, 2) apoptosis-related: caspase-3, caspase-9, bcl-2, Bax, Fas, EGF(R), FasL, TNF- $\alpha$ (R), 3) gap junction intercellular communication-related: cx43. These results suggest that the proposed method can be used for evaluating multiple factors.