

## 論文の内容の要旨

氏名：下 田 康 代

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：メタロミクス研究への応用展開を目的とした有害金属測定法の開発

### 【目的】

「メタロミクス」は、生命活動における生体構成元素、特に微量元素元素の機能と役割を包括的に解明することを目的とした新領域分野である。生体内の微量元素元素は、遺伝子発現、シグナル伝達および代謝反応に関わるタンパク質・酵素など多様な生体試料に含まれており、これらの元素の含有量や化学形態を明らかにすることは他のオミクス分野と共に生命現象の解明に貢献するものと考えられる。この分野の発展のためには、微量な試料からの金属元素の同定や多元素一斉解析、あるいは多様な化学形態で存在する元素を解析するための分析技術が求められる。

近年、食の欧米化が進んでいるとはいえ、日本は諸外国と比較すると依然として米や海産物を中心とした食文化を維持している。これらの食品のうち、米中に含まれるカドミウムは腎機能障害の誘発物質であり、また、海藻、特にヒジキに含まれる無機ヒ素のみならず海産物中に含まれる有機ヒ素化合物摂取後の主要な代謝物であるメチル化ヒ素化合物についてもヒトに対する発癌性が疑われていることから、それらの安全性に対する関心が高まっている。カドミウムおよびヒ素化合物の測定には、従来、原子吸光光度法が用いられてきたが、近年、より高感度分析が可能である誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)による分析が中心となりつつある。加えて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を組み合わせた化学形態別分析により高感度な分析が可能となった。しかしながら、これらの測定法については、様々な方法が提案されているもののいまだ検討の段階であり、問題点も多い。

これらのことから、本研究は、メタロミクスへの応用発展を目的にヒ素化合物およびカドミウムの新たな分析法の確立を目指した。具体的には、第1章では試料中の無機・有機ヒ素化合物の一斉分析および新規有機ヒ素化合物の同定を可能にする ICP-MS と有機質量分析法である HPLC-tandem MS を併用した分析法の確立、さらに第2章では尿中カドミウム分析法の高感度化と試料処理の高速化を両立した ICP-MS 法の確立を目指した。

### 第1章 HPLC-ICP-MS 法と HPLC-tandem MS 法を併用したヒ素化合物の形態別分析法の開発

ヒ素化合物はその化学形態により発癌のリスク評価が異なり、国際癌研究機関より発行された IARC Monograph vol. 100c (2012) の発癌性の分類において、無機ヒ素は“ヒトに対する発癌性が認められる(Group 1)”，無機ヒ素の代謝物であるモノメチルアルソン酸およびジメチルアルシン酸は“ヒトに対する発癌性が疑われる(Group 2B)”，海産物に含まれるアルセノベタインは“ヒトに対する発癌性が分類できない(Group 3)”に分類されている。このため、正確なヒ素化合物の発癌リスク評価のためには尿中の総ヒ素量分析のみならず形態別分析が必須である。これまでのヒ素形態別分析はヒトに対し発癌性が認められている無機ヒ素とその尿中代謝物の分析が中心であったが、近年では食品中に含まれるヒ素化合物の安全性に対して関心が集まっており、食品中のヒ素とその尿中代謝物の分析が中心になりつつある。これらのヒ素化合物には無機ヒ素、メチル化ヒ素のほか、標準物質の合成が困難なアルセノシュガー類や未知の化合物が存在し、HPLC-ICP-MS 法のみでは同定が困難である。一方、HPLC-tandem MS 法は標準物質が準備できない有機ヒ素化合物についても推定および同定が可能であるが、無機ヒ素を検出することができない。そこで今回、HPLC-ICP-MS 法と HPLC-tandem MS 法の併用によりヒ素化合物の一斉分析および新規有機ヒ素化合物の同定法の確立を目指した。

### 【実験方法】

ヒジキからのヒ素化合物の抽出：乾燥ヒジキ製品を粉碎した後、その 0.5 g に超純水 20 mL を加えて超音波細胞破砕器を用いてヒ素化合物を抽出した。その試料溶液を 3000 rpm, 15 分間遠心分離した後、上清を超純水で希釈して分析に用いた。

ヒ素化合物の一斉分析法:HPLCに検出器としてICP-MS(HP7500cx, Agilent)あるいはQuattro micro API tandem mass spectrometer(Waters)を接続したシステムを構築した。HPLC-ICP-MS法におけるHPLCは以下の条件で行った。カラム;陰イオン交換カラムPRP-X100(250×4.6 mm i.d. Hamilton),移動相;20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(pH 8.0),流速;1.0 mL/min,カラムオープン温度;40 °C。HPLC-tandem MS法はHPLCのカラム径や流速等の条件を一部変更し,エレクトロスプレーイオン化法陽イオンモードで実施した。

#### 【結果および考察】

今回,無機ヒ素化合物および有機ヒ素化合物を含むヒジキを分析試料として,HPLC-ICP-MS法とHPLC-tandem MS法を併用した方法により,無機ヒ素および有機ヒ素を同時にすべて同定可能な測定法を検討した。その結果,本法は6種類のアルセノシュガーおよび無機ヒ素,ジメチルアルシン酸およびアルセノベタインを同時に検出・同定することが可能であり,本形態別分析法は高感度一斉ヒ素形態分析として有用であることが示唆された。また,本法を用いて房総産ヒジキの原藻とその製品中のヒ素化合物含有量を比較した結果,総アルセノシュガー含量は原藻と比較して製品で低い傾向があった。一方,ジメチルアルシン酸の含量は製品では高く,これは製品のヒジキの製造工程での加熱加工による影響と思われた。

## 第2章 オクタポールコリジョンセル(OCC)-ICP-MS法を用いた尿試料の迅速・高感度カドミウム測定法の確立

カドミウムによる腎機能障害の指標の一つである尿中カドミウムをICP-MS法により分析する場合,尿中に多量に存在するモリブデンに由来するスペクトル干渉が問題となる。原理的にはカドミウムと干渉イオンとの質量差により両者を分離することは可能であるが,高い分解能を持つ二重収束型マスフィルタを有するICP-MS(SF-ICP-MS)法の高分解モード(分離能  $m/\Delta m > 8000$ )においても分離は困難であり,かつコスト高であるために実用性は低い。このため,SF-ICP-MSの低分解モード( $m/\Delta m = 300$ )で測定した後に妨害イオンの影響を算術的に補正し濃度を算出する方法,および比較的共存物の影響を受けにくい同位体希釈法が汎用されている,また,干渉イオン除去システムの一つであるダイナミックリアクションセル(DRC)を搭載したICP-MS法も利用されるが,この方法は機能性キレート樹脂を用いた固相抽出(SPE)による前処理が必須である。いずれの方法も高い分析費用あるいは煩雑な処理を必要とするため,DRCとは異なる干渉イオン除去法であるオクタポールコリジョンセル(OCC)法を利用し,高感度と多検体数に対応する試料処理の迅速化を両立したICP-MS法の確立を目指した。

#### 【実験方法】

測定試料として,SRM2670a標準尿(アメリカ国立標準技術研究所)および東京在住の健康な20人の女性ボランティア(26-43歳,平均31.7 ± 4.0歳)より得た尿を用いた。これらの尿は0.5% NH<sub>3</sub>,0.5 g/L Triton X-100,0.5 g/L EDTA混合溶液により希釈して分析に用いた。カドミウムの分析にはOCCを備えたAgilent 7500cx ICP-MSを用い,干渉イオン除去を目的にコリジョンガスとしてヘリウムを用いた。また,機能性キレート樹脂カラム(NOBIAS Chelate PA-1,日立ハイテク)を用いた尿試料のSPE前処理がOCC-ICP-MSに及ぼす影響を検討した。

#### 【結果および考察】

OCC法は同重体イオンの影響を除去できないが多原子イオンによる干渉の除去に優れるので,カドミウム同位体の中で唯一同重体を持たない<sup>111</sup>Cdに着目し本法への適応を検討した。その結果,カドミウム標準液の検出限界(LOD)は0.0002 μg/Lであった。この方法で標準尿中のカドミウムをSPE前処理なしで測定した結果,カドミウムLODおよび装置定量限界はそれぞれ0.0097および0.003 μg/Lであり,SF-ICP-MS法に匹敵する高感度が得られた。さらに,健康人の尿20サンプルについてSPE前処理あり,なしで比較したところ両者には差が無く,SPE処理を行わずとも良好な結果が得られ,OCC-ICP-MS法は尿中のカドミウムを高感度かつ迅速に分析できる方法であることが明らかになった。

#### 【総括】

国内外で食品中の金属に関する摂取勧告や評価の見直しが実施されており,2006年,コーデックス委員会は,精米のカドミウム基準値として0.4 mg/kgを採択しており,2010年わが国もこれに同調し

ている。また、2004年、英国食品規格庁が無機ヒ素を多く含有するヒジキの摂食を控えるよう英国国民に勧告しており、今後も国内外を問わず食品中に含まれる金属の安全性に対して関心がさらに高まることが予想される。著者は、第1章でHPLC-ICP-MSとHPLC-tandem MSを組み合わせた手法によりヒジキを例にヒ素の形態別分析法を確立した。次いで、第2章で尿中のカドミウム濃度分析法の高感度化と試料処理の高速化を両立したICP-MS法を確立した。これらの分析法は、食品の安全性評価に加えて微量元素の生命現象への関わりを解明するメタロミクス分野においても広く利用されることが期待できる。