

少量のヒト血漿サンプルに含まれる 残留性有機汚染物質の GC-MS/MS 分析

技術概要

著者

Anthony Macherone^{1,2}, Sarah Daniels³, Alex L. Maggitti⁴, Melissa Churley¹, Matthew McMullin⁴, and Martyn T. Smith³

¹ Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA

² Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD

³ University of California, Berkeley, CA

⁴ NMS Labs, Willow Grove, PA

はじめに

分析化学および生物化学分野における技術の進歩により、慢性疾患の発病に総体として関与する可能性のある幅広い化学物質曝露の特性解析が可能になりました。また、質量分析 (MS) の技術革新が進み、1 つのヒト検体から数千種類もの化学物質を測定できるようになりました [1]。こういった体内環境に存在するあらゆる曝露化学物質を包括的に測定し、特性解析することが、エクスポソーム研究の主な目的です。

エクスポソームは、遺伝由来なのか曝露由来なのかなどその起源にかかわらず、体内を循環するすべての生物活性化学物質によって体内環境が構成されているという概念にもとづきます [2]。このような化学物質には、食品に添加されている化学物質、薬物、汚染物質、生体変換生成物 (代謝物)、外来 DNA といった外因性および内因性の化学物質や曝露源が含まれます [3]。これらの化学分析対象物を、慢性疾患のリスク要因の解明を目的とした集団調査で集められた少量のヒトサンプルを用いて検出する場合、質量分析法が有効です。



Agilent Technologies

エクスポソミクス

エクスポソミクスとは、NMR、質量分析計、バイオインフォマティクスなどを手段として、エクスポソームの特性解析および測定を行う研究分野です。エクスポソミクスでは、個々の曝露または遺伝的形質では集団における疾患リスクを説明しきれない、複合的な慢性疾患に焦点を当てています。健康集団と疾患集団間の曝露プロファイルの違いは、綿密な症例対照研究により明らかにできます。また、これらの症例対照研究をより大規模な前向きコホート研究の一環として行えば、測定した分析対象物と、それが発病前の患者におよぼした影響の因果関係を検証することができます。

エクスポソミクスでは、ヒトサンプル中の高濃度および低濃度の化学物質を測定するために、分析においてターゲットメソッドとノンターゲットメソッドがどちらも必要になります。ヒト体内に存在する多くの外因性汚染物質の濃度は、食品、医薬品、または代謝物由来の汚染物質の 1/1,000 程度で (図 1)、ラボで実施されるノンターゲットメソッドの検出下限を下回っている場合がほとんどです [4]。こういった低濃度の化合物は、GC、LC、またはその両方の MS/MS メソッドにより測定できます。金属および複合化有機金属種については、ICP-MS による測定が可能です。また、多くの分析は血液で行われますが、リンパ液、唾液、尿、母乳なども測定対象となります。

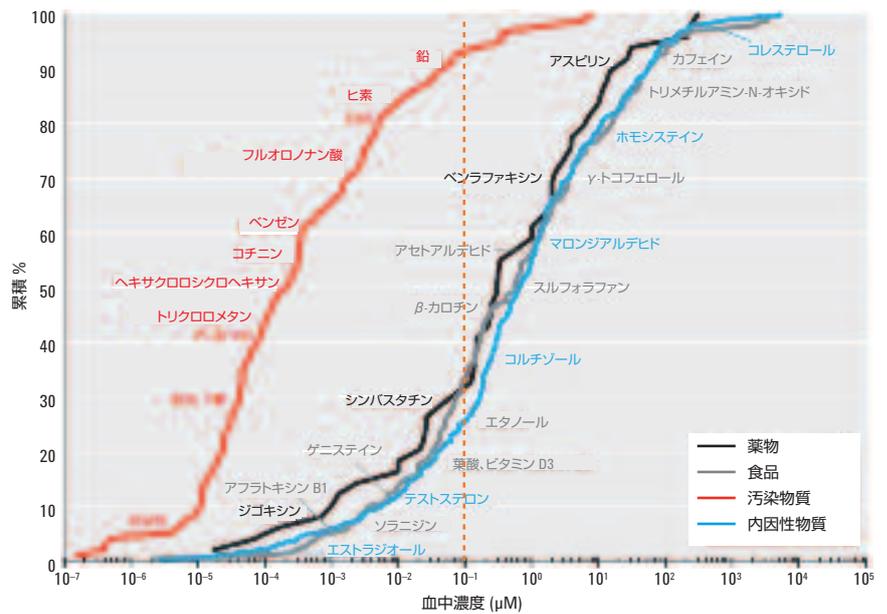


図 1. 一般的な曝露化合物の血中濃度。破線の右側にある化学物質は、一般にノンターゲット (探索主体) LC-TOF メソッドで検出されます。破線の左側にある化学物質の多くは、このメソッドでは検出されないため、ターゲット MS/MS メソッドが必要になります。この図は、「Environmental Health Perspectives」(Rappaport 他著、2014 年) からの抜粋です。

ターゲットエクスポソミクスメソッドの例

ここでは、ターゲットエクスポソミクス調査の例として、少量の血漿サンプルを用いた残留性有機汚染物質 (POP) の測定について説明します。図 1 に示すように、血中の DDE (ジクロロジフェニルジクロロエチレン)、PCB (ポリ塩化ビフェニル)、PBDE (ポリ臭化ジフェニルエーテル)、ダイオキシンなどの POP は、ノンターゲットメソッドの検出下限 (LOD) (0.1 µM) より低濃度です。実際、エクスポソームの約 70 % は、液体クロマトグラフィー飛行時間型またはフーリエ変換型質量分析法によるノンターゲット分析では検出できません。ヒトのエクスポソームの完全な定量および特性解析に必要な LOD を得るためには、GC-MS/MS のような感度と特異性に優れた分析手法が必要です。

コホート研究で得られる生体検体は貴重なため、通常、分析に使用できる生体サンプル量はごくわずかです。ところが、血中の POP を測定する多くの分析手順は、抽出のために大量のサンプルを必要とします。例えば、米国の全国健康栄養調査 (NHANES) で血漿中の POP の測定に用いられる Lab 28 メソッドでは、10 mL ものサンプルが必要になります。そのため、わずか 200 µL のサンプルで分析対象物を確実に検出するためには、厳密な抽出と感度/特異性の高い質量分析メソッドが不可欠です。必要なサンプル量を 100 µL 未満まで少量化する努力もなされています。

メソッド

49 個のヒト血漿サンプルと 3 個のプールされた参照サンプル (それぞれ 200 µL) を次の手順で抽出しました。

1. 約 200 µL の血漿を分取
2. 1 mL の 10 M 尿素を追加
3. 1 mL の 10 % プロパノール水溶液、1 mL の MeOH、および 6 mL の石油エーテルを添加
4. 遠心分離し、有機層を移動
5. 約 1 g の Florisil でろ過
6. MTBE/石油エーテルで溶解
7. 蒸発乾固
8. 注入前に再溶解

分析には、Agilent 7890B GC および Agilent 7010A GC トリプル四重極質量分析計を使用しました。Agilent 7010A は、電子イオン化 (EI) マルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードで動作させました。カラムには、Agilent J&W HP-5ms ウルトライナート (30 m × 250 µm、0.25 µm) を使用しました。トランスファーラインは 300 °C に設定しました。イオン源温度は 350 °C でした。コリジョンガスには窒素を用い、流量を 1.5 mL/min に設定しました。6 つの POPs 化学物質群 67 種類の POPs について、ターゲット MRM で測定しました。各化合物に対して定量 MRM と定性 MRM を設定しました。システムの性能と精度の確認は、3 段階の濃度で実施しました。リテンションタイム精度および面積カウントなどのパラメータの性能評価には、抽出後に ¹³C₁₂-DDT を加えた未知サンプルを使用しました。各サンプルは 2 µL 注入し、これを 3 回繰り返しました。

結果と考察

今回の調査でターゲットとした POPs は、米国環境保護庁 (EPA) の水質汚染物質リストで報告されているものをもとに選択しました。具体的には、16 種類の多環芳香族炭化水素 (PAHs)、12 種類のダイオキシン様ポリ塩化ビフェニル (DL-PCBs)、12 種類の PBDEs、17 種類の有機塩素系農薬 (OCPs)、5 種類のダイオキシン類、および 5 種類のフラン類をヒト血漿サンプルでターゲット GC-MS/MS により測定しました。表 1 に、分析したすべての化合物を示します。

表 1. 化合物リスト

Analyte	Analyte
4,4'-Dibromodiphenyl ether	1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran
2,4,4'-Tribromodiphenyl ether	1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran
2',3,4-Tribromodiphenyl ether	1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran
2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether	Octachlorodibenzofuran
2,2',4,5'-Tetrabromodiphenyl ether	3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl
2,3',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether	3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl
2,4,4',6-Tetrabromodiphenyl ether	2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl
2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether	2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl
2,2',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether	2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl
2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenyl ether	2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl
2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphenyl ether	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl
2,2',4,4',6,6'-Hexabromodiphenyl ether	2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl
Acenaphthene	2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl
Acenaphthylene	2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl
Anthracene	3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl
Benzo(a)anthracene	2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl
Benzo(b)fluoranthene	a-BHC
Benzo(k)fluoranthene	b-BHC
Benzo(g,h,i)perylene	g-BHC
Benzo(a)pyrene	d-BHC
Chrysene	Heptachlor
Dibenz(a,h)anthracene	Aldrin
Fluoranthene	Heptachlor Epoxide (isomer B)
Fluorene	Endosulfane I
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	DDE
Naphthalene	Dieldrin
Phenanthrene	Endrin
Pyrene	DDD (mitotane)
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	Endosulfane II
1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin	Endrin Aldehyde
1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	DDT
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin	Endosulfane sulphate
Octachlorodibenzo-p-dioxin	Methoxychlor
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran	

性能評価における $^{13}\text{C}_{12}$ -DDT 内部標準の面積精度は、平均 RSD が 3 % でした (最小 = 0.38 % RSD、最大 = 6.79 % RSD、 $n = 153$)。リテンションタイム精度は、 ± 0.122 分でした (^{13}C 標識 DDT の平均リテンションタイムは 9.608 分)。使用した分析メソッドでは、抽出量 200 μL のサンプル中に 5.0 pg/mL という低濃度で存在する一部の分析対象物を検出するのに十分な感度が得られました。分析後のデータ解析により、集団サンプル中で 27 種類のターゲット化合物が検出されたことが判明しました。報告されている LOD は、DL-PCBs が 0.005~0.02 ng/mL 、OCPs が 0.05~0.15 ng/mL 、PBDEs が 0.0075~0.075 ng/mL です (Smith 他、2015 年)。また、最近の研究 (未発表) では、DL-PCBs に対して 0.004~0.009 ng/mL 、a-HCH、b-HCH、および g-HCH については 0.005 ng/mL 、*o,p'*-DDT および *p,p'*-DDT と、*p,p'*-DDD (MDL は 0.028 ng/mL) を除くその代謝生成物については 0.001~0.006 ng/mL の最小検出下限 (MDL) が得られています。

結論

以上の結果から、200 μL の血漿サンプルで 4 pg/mL という低い検出下限を実現し、幅広い POPs 濃度範囲に対応できることが実証されました。ここで報告した濃度は、湿潤状態の血漿サンプル量にもとづく結果であり、脂質におけるプロファイルは考慮されていません。ヒト生体サンプル中に超低濃度で存在する POPs をより少量の試料から測定できるようになれば、エクスポソームにおける曝露評価は格段に進展することになります。また、その評価にここで紹介したようなターゲット MS/MS 分析を用いることで、多様な汚染物質の曝露プロファイルの定性的および定量的差異を明らかにすることができます。

参考文献

1. J. Ivanisevic, *et al.* "Toward 'Omic Scale Metabolite Profiling: A Dual Separation–Mass Spectrometry Approach for Coverage of Lipid and Central Carbon Metabolism" *Anal. Chem.* **85(14)**, 6876–6884 (2013).
2. M. T. Smith, R. de la Rosa, S. I. Daniels. "Using exposomics to assess cumulative risks and promote health" *Environ. Mol. Mutagen.* **56(9)**, 715–723 (2015).
3. S. M. Rappaport, M. T. Smith. "Environment and disease risks" *Science* **330**, 460-461 (2010).
4. S. M. Rappaport, *et al.* "The Blood Exposome and Its Role in Discovering Causes of Disease" *Environ. Health Perspect.* **122(8)**, 769-774 (2014).

www.agilent.com/chem/jp

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2016

Printed in Japan,

February 4, 2016

5991-6595JAJP



Agilent Technologies