

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 6 日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790651

研究課題名(和文) 塩素曝露証明のためのバイオマーカー開発と実用化に関する研究

研究課題名(英文) Research on development and application of biomarkers for verification of human exposures to chlorine gas

研究代表者

大沢 勇久(Ohsawa, Isaac)

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官

研究者番号：30370886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：3,5-ジクロロチロシンを合成し、3-クロロチロシン及び3,5-ジクロロチロシンのLC-MSを用いた分析法を開発した。一般的な逆相系その他、順相と陽イオン交換のミックスモードとなっているアミノ酸分析専用のカラムを用いた。健康人の尿中のチロシンの塩素化体を調べたところ、検出されなかった。また、市販の健康人のプール血漿について、血漿タンパク中のチロシンの塩素化体について、メタンスルホン酸を用いた酸加水分解により遊離化して分析する方法で調べたところ、検出されなかった。一方、塩素ガスへ曝露させた健康人のプール血漿からは、チロシンの塩素化体が検出されるとともに、その量に塩素ガス濃度依存性がみられた。

研究成果の概要(英文)：3,5-dichlorotyrosine was synthesized, and we developed an analytical method to detect 3-chlorotyrosine and 3,5-dichlorotyrosine using LC-MS. The method uses a general reversed-phase column or a mix-mode column of normal-phase and cation exchange. When we apply the method to normal human urine, chlorinated tyrosines were under detection limit. Although we also apply the method to pooled normal human plasma after hydrolyzing plasma protein with methansulfonic acid, chlorinated tyrosines were also under detection limit. On the other hand, chlorinated tyrosines were detected in the normal human plasma after exposure to chlorine gas. It was also observed that the amount of generated chlorinated tyrosines depends on concentration of chlorine gas exposed to the human plasma.

研究分野：法中毒学

キーワード：塩素ガス曝露 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

塩素ガスは産業上重要な化学物質であるばかりでなく、浄水場や食品製造業などにおいて消毒に使われており、塩素ガスボンベの誤操作、酸性物質との誤混合などによる事故が後を絶たない。また、家庭内において次亜塩素酸塩を含む漂白剤と酸を含む洗浄剤とを混合して、発生させた塩素ガスによる中毒事故・自殺事案も散見される。さらに、塩素ガスは化学兵器として位置づけられており、社会不安の惹起を狙った犯罪、特にテロ等の犯罪に使用されることも考えられる。塩素ガスは、皮膚・粘膜への強い刺激作用および肺胞毛細血管の障害作用があり、1 ppm で眼や喉の痛みが現れ、最小中毒濃度は 15 ppm であり、1,000 ppm では即死に至る。通常、事故現場等に残留する塩素ガスについては、採証活動として、シリカゲル等の細粒に試薬を吸着させて乾燥させた検知剤を封入してある検知管等を用いて検出するとともに濃度を推定するが、現場が十分換気された後では検出そのものが困難となる。また、被害者の塩素ガスへの曝露は主に呼吸を通じて起こることから、曝露時間等の問題もあり、必ずしも現場での濃度の高さと被害者の実際の曝露量の多さとは一致しない。したがって、被害者の中毒症状の重篤さと実際の曝露量との相関を調べるためにも、曝露した被害者の体内にどれだけ塩素ガスが取り込まれたかについての指標とその分析方法の確立が要求される。

塩素ガスは皮膚や呼吸器の粘膜上の水分に溶解して次亜塩素酸を生じる。次亜塩素酸は容易に細胞内へ浸透し、生体物質を破壊して炎症を引き起こすため、毒性発現はこの次亜塩素酸によるところが大きい。次亜塩素酸はチロシン等のアミノ酸を塩素化してタンパク質等の構造変化を起こし、不飽和脂肪酸、コレステロール、リン脂質等の脂質をクロロヒドリン化して細胞膜等を破壊しうるということが知られている。塩素ガスへの曝露によって生体内では多量の次亜塩素酸が生じ得ると考えられることから、次亜塩素酸でみられるこれらの反応が塩素ガスへの曝露によっても起こり得ると考えられ、これらの生成物は塩素ガスへの曝露に特異的な指標(バイオマーカー)となりうる。実際、ラットの鼻粘膜を用いて、タンパク質中のチロシンの塩素化体である 3-クロロチロシンおよび 3,5-ジクロロチロシンが検出されることが報告がされている。しかし、手法が煩雑であくまでも定性的であり、定量による曝露量等の推定はなされていない。

研究代表者は、これまでに塩素を含む化学兵器であるびらん剤(マスタードガス)の関連化合物(分解物等)について、生体試料からの抽出法と分析法についての研究を行ってきた。また、培養細胞を用いてびらん剤と生物毒素(リシン)の毒性評価等の研究を行ない、曝露量・投与量と細胞障害発現との相

関等について明らかにした。しかし、これらによる中毒事件・事故よりもはるかに頻度の高い塩素のガス中毒事件・事故については、特異的な分解物等の関連化合物がないために、分析による曝露の証明は不可能であった。そこで本研究では上記の報告を参考として踏まえ、タンパク質、ペプチド、遊離アミノ酸や脂質等の生体物質に焦点を当てて、これらの塩素化体やクロロヒドリン化体の塩素ガス曝露のバイオマーカーとしての可能性を、生体内における動態等も含めて網羅的に探ることを目的として研究を行なう。したがって、本研究には学術的・実践的な意義があると思われる。

2. 研究の目的

塩素ガスの人体曝露について、証明法がない。そのため、死因究明や被害者の曝露量推定等の観点から塩素ガスの曝露証明法の確立が要求されている。本研究は塩素ガス曝露の特異的な生体内指標(バイオマーカー)候補について分析手法を確立し、実用性を検証したものである。

本研究の具体的な目的としては、(1)塩素ガス(塩素ガスから生じる次亜塩素酸を含む)と生体内分子との反応生成物をバイオマーカー候補とする。具体的にはタンパク質、ペプチドや遊離アミノ酸の塩素化体、不飽和結合を持つ脂質等のクロロヒドリン化体等に着目してそれらの分析手法を確立し、曝露量とそれらの生成量、中毒症状などの毒性発現との相関、などを明らかにする。(2)バイオマーカーとしての利用のためには、代謝による分解等に起因する生体内での動態についての情報も得る必要がある。したがって、それらの代謝による減少速度等について解析を行なう、というものである。

3. 研究の方法

塩素ガスへの曝露は、呼吸器粘膜上の水分と反応して生成した次亜塩素酸が肺胞を通じ毛細血管に入り血液中に浸透する場合と、肺胞から直接塩素ガスとして毛細血管の血液中に吸収される場合が考えられる。どちらの場合でも血液が曝露すると考えられることから、バイオマーカー候補として血液中のタンパク質・ペプチド・脂質等の生体物質の次亜塩素酸または塩素ガスへの曝露による修飾化合物と、それらが代謝による分解等を受けて排出された場合に尿中の存在すると考えられる、修飾された遊離アミノ酸等を想定し、上記二通りの曝露様式に基づいた研究を行なう。

(1)最初に、基礎的なデータの取得のため生体物質の標品を用いた実験を行なう。まず遊離アミノ酸の次亜塩素酸塩・塩素ガスによる塩素化反応について、生成物の高性能分析機器を用いた分析方法を確立する。研究代表者の所属する科学警察研究所では高分解能質量分析計を有しており、質量

分解能が数万から十数万という極めて高い精度での分析が常時可能である。そして、タンパク質およびペプチドについて開発した方法を応用した化学的な解析を行ない、内在するアミノ酸への塩素付加の容易性とタンパク質等の構造等との相関の有無について解明を行なう。さらに、次亜塩素酸塩と塩素ガスでの塩素化反応効率等の違いの有無について明らかにする。また、不飽和脂肪酸、コレステロールやホスファチジルコリン等の脂質のクロロヒドリン化反応(二重結合の隣接する炭素原子に塩素と水酸基がそれぞれ結合する)についても生成物の分析方法を確立し、その反応効率等についての解明を行なう。

次に、中毒事件・事故時に比較的手続きしやすい生体試料である尿と血液についての分析方法を確立する。まず、尿試料中に排出された遊離アミノ酸の塩素化体を想定し、これを添加した尿試料からの効率の良い回収方法を確立する。血液試料については、次亜塩素酸塩・塩素ガスと接触・反応させ、血液中のタンパク質とペプチドの塩素化体、血漿中および血球膜中の脂質等のクロロヒドリン化体について解析を行ない、タンパク質等および脂質の標品の場合と比較した反応効率等の違い、曝露量と変化体の生成量についての相関の有無について明らかにする。

(2) チロシンの塩素化体は、肝臓に存在する未同定の酵素により脱塩素化等の代謝を受けるとの報告がある。曝露量の推定のためには代謝等による影響を考慮する必要がある。そこで、チロシンの塩素化体を含む上記のバイオマーカー候補の代謝等の動態について解明する。

4. 研究成果

本研究では、実際に次亜塩素酸によって生成するチロシンの塩素化体(3-クロロチロシン及び3,5-ジクロロチロシン)をバイオマーカー候補として設定し、標準品を一部合成するとともに、標準品を用いてLC-MS等による分析方法を確立し、塩素ガス曝露によって生体試料中でチロシンの塩素化体が生じるかどうかを調べた。

まず、チロシンの塩素化体のうち3,5-ジクロロチロシンを合成し、3-クロロチロシン及び3,5-ジクロロチロシンのLC-MSを用いた分析方法を開発した。アセトニトリル及びギ酸を移動相に用い、一般的な逆相系のカラム(ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-SP)で分析を行ったほか、アセトニトリル、ギ酸およびギ酸アンモニウムを移動相に用い、順相と陽イオン交換のミックスモードとなっているアミノ酸分析専用のカラム(Imtakt社製 Intrada Amino Acid)で分析を行った。なお、逆相系カラムを用いた場合では、チロシン残基中のカルボキシル基をアルキル化(*n*-プロピル化)することにより、より保持されるよ

うになり、ピーク形状がシャープとなった。検出限界は、チロシンおよび2種類のチロシンの塩素化体ともに、カラム負荷量で1 ng未満であった。

上記のLC-MSによる分析法を用い、健常人の尿中のチロシンの塩素化体を調べたところ、チロシンは検出されたもののその塩素化体は検出されなかった。したがって、塩素ガスへ曝露した被害者の尿中からチロシンの塩素化体が検出されれば、塩素ガスへの曝露の証明となると考えられた。

次に、タンパク質を構成しているチロシンの塩素化体の分析を可能とするために、ウシ血清アルブミンをモデルタンパク質として用い、酸の存在下で加熱を行って、加水分解による遊離化方法を検討した。通常使われる6Mの塩酸を用いたところ、バックグラウンドでチロシンの塩素化体が生じるため不適であった。一方、6Mのメタンスルホン酸を用いたところ、115℃で24時間分解してもそのような問題は起こらず、チロシンの塩素化体の分解等もみられなかったことから、メタンスルホン酸が本研究の目的に適していると考えられた。なお、酸処理後は、水で希釈した後、逆相と陽イオン交換とのミックスモードの固相抽出カラム(ウォーターズ社製 OASIS MCX)で遊離したアミノ酸を精製し、上記のLC-MSを用いた分析法で分析した。

市販の健常人のプール血漿について、血漿タンパク質を構成しているチロシンの塩素化体について、上記の酸加水分解により遊離化させて分析する方法で調べたところ、チロシンの塩素化体は検出されなかった。一方、塩素ガスへ曝露させた健常人のプール血漿からは、チロシンの塩素化体が検出されるとともに、その量に塩素ガス濃度依存性がみられた。したがって、チロシンの塩素化体が塩素ガスへの曝露のバイオマーカーとなり得ることが強く支持された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

日本法中毒学会第32年会, 2013

大沢勇久, 大森 毅, 金森美江子, 柘浩一郎, 長島央行, 瀬戸康雄

「塩素化チロシンの分析」

第51回 国際法中毒学会年会(TIAFT), 2013

I. Ohsawa, T. Ohmori, M. Kanamori-Kataoka,

K. Tsuge, H. Nagashima, Y. Seto,

H. Fukushima

“Development of method of analyzing chlorinated tyrosines in biological samples for verification of chlorine gas exposure”

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沢 勇久 (Ohsawa Isaac)

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究
官

研究者番号：30370886

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：