

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550048

研究課題名(和文)多様な動物種に適用できる内因性ホルモンの高精度分析法の開発

研究課題名(英文)Development of a reliable analytical method for endogenous hormones applicable to various animal species

研究代表者

国末 達也(Kunisue, Tatsuya)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号：90380287

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)：既存の免疫測定法で生じ得る抗体への非特異的反応による測定誤差の影響を受けない内因性ホルモン、とくに脳神経系の発達に重要な役割を果たす遊離型甲状腺ホルモン(THs)の高精度機器分析法の開発を試みた。血清/血漿を限外ろ過デバイスにより1100 × gで30分間、37 °Cで遠心分離後、得られたる液をSPEカートリッジに通して精製することで、対象としたTHsに対して良好な回収率と精度を得た。検出下限値は、1.7 - 6.0 pg/mLであり高感度分析を達成した。確立した分析法をヒト、ウシ、ネコの血清/血漿に適用した結果、良好な精度が得られたことから多様な動物種に適用可能と結論付けられた。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to develop a sensitive and reliable analytical method for endogenous hormones, especially free thyroid hormones (THs) that play important role in the brain development, in serum/plasma of various animal species using ultrafiltration (UF) in combination with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), which can resolve the interferences encountered due to the nonspecific reactivity of anti-hormone antibodies used in immunoassay (IA) methods. UF at 1100 × g and 37 °C for 30 minutes with a 30 kDa ultrafiltration device (Centrifree YM-30) yielded excellent precision. Acceptable accuracy (recovery: 100-110%) and intra- and inter-day precision (CV: <10% and <12%, respectively) were obtained, when triplicate analyses in three different days were conducted using bovine serum. The developed analytical method was successfully applied to the determination of free THs in plasma samples of humans and cats.

研究分野：環境分析化学

キーワード：甲状腺ホルモン 機器分析 遊離型 タンパク結合型 ステロイドホルモン

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン(THs)やステロイドホルモンなどの内因性ホルモンは内分泌器官で生成・分泌され、血流を介して標的組織に運ばれる。細胞内に取り込まれた後、これらのホルモンは核内受容体と結合し、成長、発達、そして代謝といった生物学的過程に關与する遺伝子の発現を調節している。通常、内因性ホルモンによる上記の機序は、生体内のフィードバック機構により恒常性が保たれているが、疾病や生理学的要因により攪乱されることが指摘されている。攪乱要因の1つとして、難分解性有機汚染物質(Persistent Organic Pollutants: POPs)などの化学物質の曝露が挙げられるが、ヒト以外の多様な動物種からも検出が認められており、とくに高次動物の中には高濃度蓄積種の存在が報告されている。このように、ヒトと異なる生理学的要因の影響を受けていると考えられる動物種においても、内因性ホルモンによる作用機序の恒常性を評価することは重要であり、そのためには高精度のホルモン測定法が必要となる。これまで血中の内因性ホルモン濃度の測定には免疫法が用いられており、主にヒトで恒常性の評価がなされてきた。免疫測定法は高感度の検出を可能とする一方で、用いた抗体への非特異性的反応から検体によって異常値が生じることが、国内外の調査で数多く報告されている。とくにヒト以外の動物種の血中には、ヒトで観察されない様々な抗原に対する抗体が存在すると考えられ、免疫法で測定された内因性ホルモン濃度を用いた評価は、誤った解釈を導く可能性が高いと予想される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、血中に存在する抗体などのタンパク組成に影響を受けない、あらゆる動物種に適用可能な内因性ホルモンの高精度機器分析手法を開発することである。血中輸送タンパクに結合したトータルのホルモン量だけでなく、生理活性を有する遊離型ホルモンの測定法開発にも取り組む。

### 3. 研究の方法

THsが脳神経系の発達に重要な役割を果たすことはよく知られており、その恒常性について生理学的要因との関連性を調査した研究事例が、ヒトだけでなく野生動物でも多数存在する。これらの研究で測定された血中のTHs濃度はすべて免疫法による値であり、とくに免疫法の精度管理が十分おこなわれていないヒト以外の動物で得られた関連性の再検証は重要課題の1つである。そのため本研究では、THsを最も優先度の高い内因性ホルモンとして位置付け、分析法の開発をおこなった。対象としたTHsは、甲状腺で生成されプロホルモンとして作用するL-thyroxine(T4)、thyroid hormone receptorに対し強い活性化能を有する3,3',5-triiodo-L-thyronine(T3)、

そしてT4もしくはT3の脱ヨード化体である3,3',5'-triiodo-L-thyronine(rT3)、3,5-diiodo-L-thyronine(3,5-T2)、3,3'-diiodo-L-thyronine(3,3'-T2)である。試料は商業的に入手可能なヒトおよび動物(ウシとネコ)の血清もしくは血漿を用いた。

総THsの前処理は、アセトンによるタンパク分解後、遠心分離した上澄みを固相抽出(SPE)処理することで達成したが、遊離型の場合、輸送タンパク結合体との分離が不可欠となる。THsの血中輸送タンパクであるthyroxine-binding globulin(TBG)、transthyretin(TTR)、そしてalbuminは54-66 kDaの範囲内にあるため、30 kDa以下の分離フィルターを有するUltrafiltration(UF)とEquilibrium dialysis(ED)デバイスを数種類検討した。また、遠心温度、遠心時間、血清/血漿のpHを検討し、前処理の最適化をおこなった。THsの定性・定量は、超高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(UHPLC-MS/MS)のmultiple reaction monitoring(MRM)モードで実施した。イオン化法はESI-positiveを選定し、分析カラムにはAscentis Express F5 analytical column(2.7 μm, 100 mm × 2.1 mm; Supelco, USA)を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 総甲状腺ホルモン濃度

輸送タンパク結合型と遊離型を合わせたトータルのTHsについては、すでにヒト血清を用いた分析法が報告されている。既法がヒト以外の動物種に適用可能か評価するため、ウシ血清を用いて精度確認をおこなった。試料への添加回収試験を実施した結果、96.4-109%(CV% 1.2-8.6)と良好な値が得られた。

#### (2) 遊離型甲状腺ホルモン濃度

##### 2-1. UFデバイスと遠心力

30 kDa以下の分離フィルターを有する3種のultrafiltrationデバイス、(1)先行研究でヒト血清中遊離型THs分析に使用されたCentrifree YM-30(Merck Millipore, Japan)、(2)Centrifree YM-30と同様の膜素材(再生セルロース)を有するAmicon Ultra-0.5(Merck Millipore, Japan)、(3)安価で血清中遊離型医薬品の分析で実績のあるNanosep Omega(Pall Corporation, Japan)を用いて、血中輸送タンパク結合型と遊離型THsの分離効率を検討した。ウシの血清400 μLを限外ろ過デバイスに負荷し、7段階の遠心力1,000、1,500、2,000、3,000、4,000、5,000、10,000 × gで限外ろ過した結果、遊離型T4濃度はCentrifree YM-30を用いた場合、1,000-3,000 × gの間で安定な値を示した(図1)。一方、Amicon Ultra-0.5では、Centrifree YM-30に比べ遊離型T4濃度は数倍高値を示し、その値は大きく変動した(図1)。Nanosep Omegaでは、4,000 × g以上の遠心力で遊離型T4が検出されたが、測定値に大きなバラツキが認められた(図1)。これらの結果から、最

も測定値が安定した Centrifree YM-30 を最適限外ろ過デバイスとして選定し、遠心力は 1,000–3,000 × g の間で先行研究のヒト血清で適用された 1,100 × g を採用した。

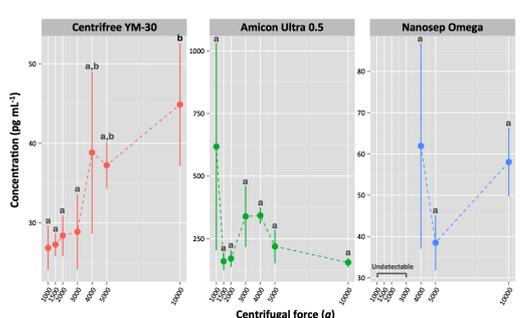


図 1. UF デバイスと遠心力による遊離型 T4 濃度の変動

## 2-2. 遠心温度

遠心時の温度による影響を評価するため、Centrifree YM-30 UF デバイスの最適遠心力 1,100 × g 条件下で、遠心温度を 25°C、28°C、31°C、34°C、37°C に設定し遊離型 THs 濃度の変動を調査した。その結果、遠心温度の低下に伴い遊離型 T4 および T3 濃度は減少を示した(図 2)。哺乳類の一般的な体温を考慮し、37°C を最適遠心温度として選定した。

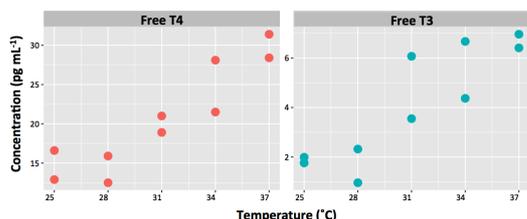


図 2. 遠心温度による遊離型 T4 と T3 濃度の変動

## 2-3. 遠心時間

次に、Centrifree YM-30 UF デバイスを用いた 1,100 × g、37°C の条件下で、遠心時間 10 分、20 分、30 分における遊離型 THs 濃度の変動を調査した。その結果、遊離型 T4 と T3 濃度はいずれも遠心時間 30 分で最も安定したことから(図 3)、最適遠心時間を 30 分とした。

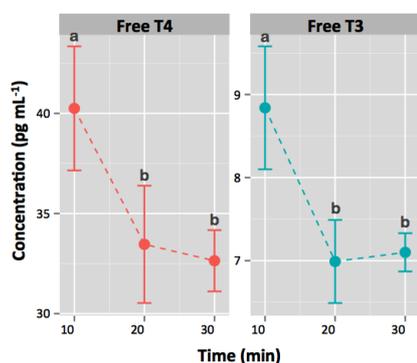


図 3. 遠心時間による遊離型 T4 と T3 濃度の変動

## 2-4. 血清/血漿 pH

哺乳動物の血清/血漿 pH は通常 7.35–7.45 に保たれている。しかし、体外に取り出されると二酸化炭素が減少し、pH > 8 のアルカリ性を示す。これまで多くの医薬品で血漿タンパク質との結合親和性は pH 依存的事であることが報告されている。そこで、血清/血漿 pH が遊離型 THs 濃度に与える影響を評価するため、緩衝液の添加(もしくは無添加)により、pH 8.2(無添加または生理食塩水添加)、pH 7.3(2 M リン酸緩衝液添加)、pH 8.4(2 M TRIS 緩衝液添加)に血漿試料を調製し、確立した最適条件(Centrifree YM-30、遠心力: 1,100 × g、遠心温度: 37°C、遠心時間: 30 分)で限外ろ過を実施した。その結果、これらの pH 条件下では、遊離型 T4 および T3 濃度に有意差は認められなかった(図 4)。分析に供する血清/血漿試料の pH は、上記試験の範囲内と推定されることから、リン酸緩衝液添加による pH の調製は必要ないものと判断した。

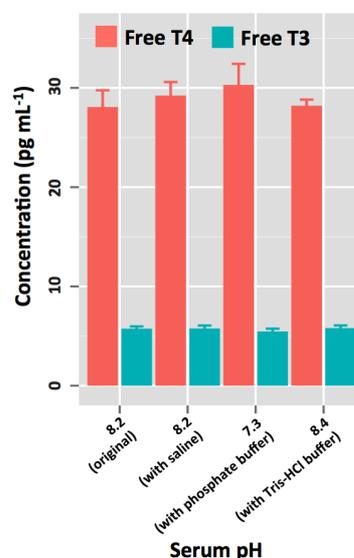


図 4. 異なる血清/血漿 pH における遊離型 T4 と T3 濃度の比較

## 2-5. 平衡透析

ED デバイスに Rapid Equilibrium Dialysis Device (RED Device, Thermo Fisher Scientific Inc.)を用い、透析開始後 0、2、4、8、12、16、24、30 時間におけるウシ血清およびヒト血漿中遊離型甲状腺ホルモン濃度を測定した。その結果、遊離型 THs 濃度は、透析開始から 16 時間後まで上昇し、それ以降は定常を示した(図 5)。透析開始から 24 時間後における遊離型 T4 と T3 濃度の測定誤差は±10%以内であり、その測定値(T4: 49 ± 1.9 pg mL<sup>-1</sup>, T3: 3.3 ± 0.12 pg mL<sup>-1</sup>)は、最適化した UF 法で測定した濃度(T4: 42 ± 3.4 pg mL<sup>-1</sup>, T3: 3.6 ± 0.33 pg mL<sup>-1</sup>)と近似していた。同様の結果は、ヒト血漿でも確認された。ED 法は平衡に到達するまでに 16~24 時間を要した一方、UF 法は短時間(0.5 時間)で遊離型 THs を分離することが可能であった。また、

LC-MS/MS 分析に不適な緩衝液を使用しないことから、最適化したUF法は遊離型 THs の前処理法としてきわめて有効である。

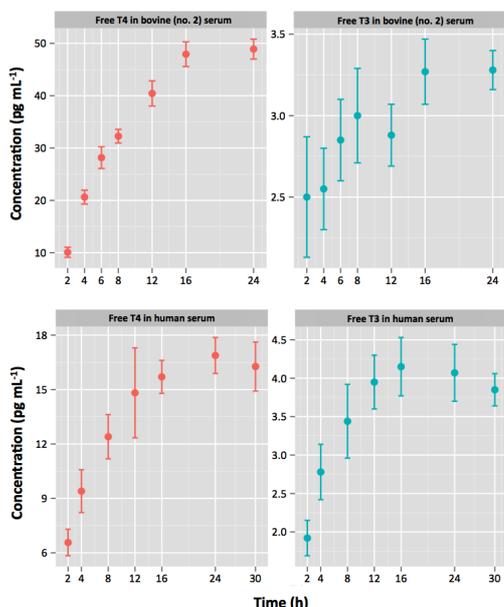


図 5. 透析時間による遊離型 T4 と T3 濃度の変化

## 2-6. 確立した遊離型 THs の分析法

本研究で確立した遊離型 THs 分析法のフローチャートを図 6 (a)に、ウシ血清から検出された遊離型 T4、T3、rT3 の代表的な MRM クロマトグラムを図 6 (b)に示した。血清 400  $\mu\text{L}$  を Centrifree YM-30 に負荷し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分静置した後、遠心分離( $1,100 \times g$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 30 分)により限外ろ過した。得られたろ液を 180  $\mu\text{L}$  分取し、Milli-Q water (1 mL)および各種サロゲート:  $\text{T4-}^{13}\text{C}_6$ 、 $\text{T3-}^{13}\text{C}_6$ 、 $\text{rT3-}^{13}\text{C}_6$  (10 pg; 100  $\mu\text{L}$ )を添加して攪拌後、予め methanol (1 mL)と Milli-Q water (1 mL)を通液しコンディショニングした Oasis HLB cartridge (1 cc/10 mg) に負荷した。カートリッジを 0.01%酢酸含有 Milli-Q water/methanol 溶液(9:1, v/v)で洗浄後、methanol (1 mL)を用いて THs を溶出した。溶出液は窒素気流により乾固後、methanol (1 mL)を添加して THs を溶解させ、LC (Shimadzu UFLC-XR)-MS/MS (AB Sciex QTRAP 5500)に 10  $\mu\text{L}$  注入した。本分析法のサロゲート補正回収率は、100–110%、日内変動は $<10\%$ 、日間変動は $<12\%$ と良好な値が得られた。また、検出下限値は、1.7–6.0  $\text{pg mL}^{-1}$  の範囲を示し、高精度・高感度分析法の確立に成功した。

## 2-7. ネコとヒトの血漿試料への適用

確立した分析法をネコとヒトの血漿に適用した結果、いずれの試料においても良好な精度が得られた(図 7)。以上の結果から、本研究で開発した遊離型甲状腺ホルモンの高精度機器分析法は多様な動物種に適用可能と結論付けられる。

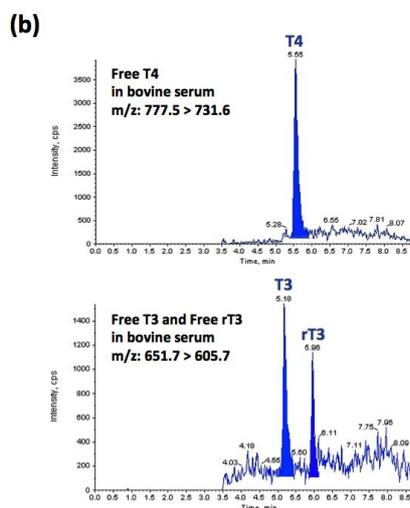
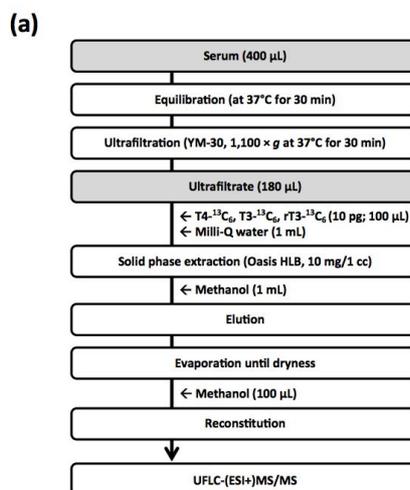


図 6. (a) 遊離型 THs 分析法のフローチャートと(b) ウシ血清から検出された遊離型 T4、T3、rT3 の MRM クロマトグラム

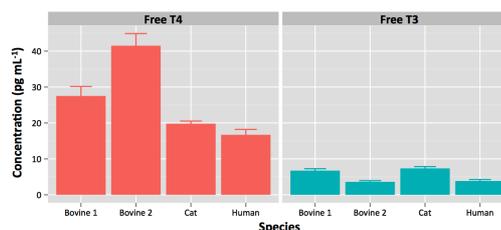


図 7. ウシ、ネコ、ヒト血清/血漿中の遊離型 T4 と T3 濃度

## (3) ステロイドホルモンへの適用の可能性

本研究で最適化した遊離型 THs の UF 前処理法を用いて、他の内因性ホルモン(エストロゲン類、アンドロゲン類、糖質コルチコイド類)の血清中遊離型濃度の測定を試みた。LC-MS/MS の分析条件を最適化し、UF 処理液を分析した結果、糖質コルチコイドの一種であるコルチゾールのピークが確認され(図 8) 遊離型の存在が示唆された。今後、pH や遠心力などについて詳細な精度確認、そして ED 法との比較試験を実施する必要があるが、UF 法は THs だけでなく他の内因性

ホルモンに対しても適用可能と考えられた。

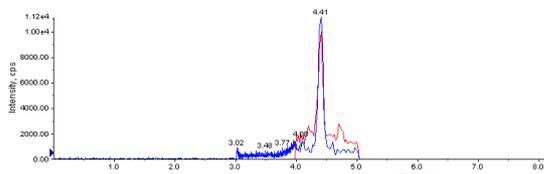


図8. ウシのUF処理液から検出されたコルチゾールのMRMピーク(m/z: 363 > 121 および 363 > 327)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Mizukawa H, Nomiya K, Kunisue T, Watanabe MX, Subramanian A, Iwata H, Ishizuka M, Tanabe S. (2015): Organohalogen and their hydroxylated metabolites in the blood of pigs from an open waste dumping site in south India: association with hepatic cytochrome P450. *Environmental Research*, 138, 255-263. DOI: 10.1016/j.envres.2015.02.012 (査読有)

Eguchi A, Kunisue T, Wu Q, Trang PTK, Viet PH, Kannan K, Tanabe S. (2014): Occurrence of perchlorate and thiocyanate in human serum from e-waste recycling and reference sites in Vietnam: association with thyroid hormone and iodide levels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 29-41. DOI: 10.1007/s00244-014-0021-y (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

Nomiya K, Yamamoto Y, Mizukawa H, Eguchi A, Nakayama SM, Ikenaka Y, Ishizuka M, Kunisue T, Tanabe S. (2016): Accumulation features of organohalogen compounds and their hydroxylated metabolites in pet cats and dogs: effects on thyroid hormones homeostasis. SETAC North America 37th Annual Meeting/7th SETAC World Congress, Orlando, FL, USA, November, Abstracts, 421

Tanoue R, Kume I, Yamamoto Y, Nomiya K, Tanabe S, Kunisue T. (2016): A sensitive and reliable analytical method for free thyroid hormones in animal serum using ultrafiltration in combination with UHPLC-MS/MS. SETAC North America 37th Annual Meeting/7th SETAC World Congress, Orlando, FL, USA, November, Abstracts, 351-352

Nomiya K, Yamamoto Y, Mizukawa H, Takaguchi K, Takiguchi M, Eguchi A, Nakayama S, Ikenaka Y, Ishizuka M, Kunisue T, Tanabe S. (2016): Contamination status of organohalogen compounds and their hydroxylated metabolites in pet cats and dogs: effects on thyroid hormones homeostasis. 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2016),

Firenze, Italy, August-September, Program Book, 51

野見山 桂・山本恭央・水川葉月・江口哲史・滝口満喜・中山翔太・池中原徳・石塚真由美・国末 達也・田辺信介 (2016): 有機ハロゲン化合物によるアニオンアニマルの汚染実態と甲状腺ホルモンへの影響評価, 第25回環境化学討論会, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市), 6月8日, 講演要旨集, 45-46

Yamamoto Y, Nomiya K, Mizukawa H, Takiguchi M, Ishizuka M, Kunisue T, Tanabe S. (2015): Contamination status of organohalogen compounds and their hydroxylated metabolites in pet cats: Effects on thyroid hormones homeostasis. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) North America 36th Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, USA, November, Abstract Book, 284

山本恭央・野見山 桂・水川葉月・滝口満喜・石塚真由美・国末達也・田辺 信介 (2015): ペット動物における有機ハロゲン化合物および水酸化代謝物の曝露実態と甲状腺ホルモン恒常性へ及ぼす影響環, 環境ホルモン学会第18回研究発表会, 自治医科大学(栃木県・下野市), 12月11日, 要旨集, 124

久米伊万里・田上瑠美・田辺信介・国末達也 (2015): 遊離型甲状腺ホルモンの高精度機器分析法の開発, 第24回環境化学討論会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 6月24日, 講演要旨集, 64-65  
山本恭央・野見山 桂・水川葉月・滝口満喜・石塚真由美・国末達也・田辺信介 (2015): ペットネコにおける有機ハロゲン化合物および水酸化代謝物の汚染実態と甲状腺ホルモン恒常性への影響, 第24回環境化学討論会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 6月24日, 講演要旨集, 58-59

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

国末 達也 (KUNISUE TATSUYA)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授  
研究者番号: 90380287

(2) 連携研究者

田辺 信介 (TANABE SHINSUKE)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授  
研究者番号: 60116952