

平成30年6月22日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02853

研究課題名(和文) 未知汚染物質の網羅的探求：今日のLC/MSと多変量解析の利用でどこまで探れるのか

研究課題名(英文) Exploring and identifying unknowns by using high resolution mass spectrometry and multivariable analysis

研究代表者

高梨 啓和 (TAKANASHI, Hirokazu)

鹿児島大学・理工学域工学系・准教授

研究者番号：40274740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：液体クロマトグラフ-高分解能質量分析計(LC-HRMS)を用いた網羅的分析で得られた結果から、測定したサンプルの特性を定める物質のピークを多変量解析により抽出可能か検討した。サンプルの特性として、変異原性に着目した。まず、既知変異原を添加した模擬試料を調製し、OPLS-RA、相関分析および重回帰分析を組み合わせて検討したところ、検出された数多くの物質の中から、サンプルの変異原性強度を特徴付けるピークを選択することに成功した。次に、土壤燻蒸剤D-Dの水溶液に次亜塩素酸ナトリウム水溶液を添加した試料中の未知変異原を探索したところ、主要な変異原として1,3-ジクロロアセトンを発見・同定した。

研究成果の概要(英文)：A method for picking up a major MS peak from a great number of detected peaks was developed because liquid chromatograph-high resolution mass spectrometers (LC-HRMS) provide many peaks which were consisted of those of impurities and proper substances. First, a model sample was prepared by spiking known mutagens. The substances in the sample were analyzed by using a LC-HRMS. The obtained results were analyzed with the orthogonal partial least squares regression analysis, the correlation analysis and the multiple linear regression analysis to explore the spiked mutagens from the detected many substances. By coupling LC-HRMS analyses and the multivariable analyses, a proper substance which characterizes a sample property (mutagenicity) was successfully uncovered. Second, the developed method was applied to a nematocide DD aqueous solution treated with sodium hypochloride, resulting in identifying 1,3-dichloroacetone, a major mutagen in the solution.

研究分野：環境化学

キーワード：高分解能質量分析 多変量解析 構造推定 農薬 塩素処理 変化体

1. 研究開始当初の背景

近年の液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)の技術的な進歩はめざましく、測定対象物質の物性の広範囲化、高感度化、構造推定技術の高度化などが次々に達成された。環境科学・環境工学の観点からすると、これらの技術革新により、今までは質量分析(MS)で検出できなかった環境汚染物質を検出できるようになったことの意味が大きい。これは、「MSは多成分を網羅的に一斉分析可能」という特徴を進展させることが可能となり、「予期できなかった汚染物質の混入」を検知したり、「汚染物質の前駆体を探索」したりする、いわゆる定性分析(未知物質の構造推定)の可能性が急速かつ飛躍的に高まったためである。

しかし、このような定性分析を実施していると、数多くの無関係なピークが検出されてしまい、解析対象ピークがどれだか分からないという、1つの大きな壁に突き当たる。主だった大きさのピークの数が少ない場合など、解析すべきピーク数を絞り込むことができる場合はよいが、現実にはそのような場合だけではない。また、サンプル中の目的物質の濃度は高いが、その物質のイオン化効率が低いためにLC/MSでのピークが小さくなってしまう場合もある。このような場合には、現状では、解析対象ピークを適切に絞り込むこと(ピークピッキング)が不可能であり、解析したピークが目的物質でない場合が多い。結果的に、トライアンドエラーによる解析を繰り返すことになり、研究効率が低い場合があり、さらには、解析対象ピークを特定できない場合もある。

2. 研究の目的

高分解能LC/MSで測定した結果に多変量解析を適用することによって、トライアンドエラーによる解析を繰り返すことなく、毒性強度などのサンプルの性状を決定づける未知汚染物質(原因物質)のピークを網羅的に探求し、客観的に決定できるか(ピークピッキングできるか)を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 模擬サンプルを用いた原理確認

既知変異原と既知非変異原の濃度を変えて混合したサンプルを調製し、調製したサンプルの変異原性強度と高分解能LC/MS測定結果を得た。既知変異原として4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)、furylfuramide (AF2)、既知非変異原として butamifos、asulam、carbofuran、methyldimuron、monuronを用いた。AF2の濃度を変化させ、それ以外の物質は同一濃度として4サンプルを調製した。変異原性強度は、*Salmonella typhimurium* TA100株を用いたAmes assay (preincubation method)により求めた。高分解能LC-MSは、Acquity H-class-Synapt G2 Si HDMS (Waters, USA)を用いた。イオン化は、electrospray ionization (ESI)により行った。サンプル調製の繰り返し数および分析の繰り返し数は、それぞれ2回とした。

高分解能LC/MSで測定した結果は、

Nonlinear Dynamics, Tyne and Wear, UK)によるピークアライメント、PLS_Toolbox 7.9.3 (Eigenvector Research, USA)によるOrthogonal Partial Least Squares Regression Analysis (OPLS 回帰分析)およびSPSS Statistics 23 (IBM, USA)による相関分析および重回帰分析を組み合わせることにより、検出された数多くのイオンの中から、サンプルの変異原性強度を特徴付けるMSピークを選択した。

(2) 土壤燻蒸剤 DD 塩素処理サンプル中の変異原の探索

DDのモデル物質として、純度>96%の(E)-dichloropropene (東京化成工業、東京)を購入し、0.5 Mリン酸緩衝液を用いて500 ppmの溶液を調製した。0.5~4.0 mol-Cl₂/mol-DDの塩素添加率で塩素処理し、変異原性強度が異なる5サンプルを調製した。サンプルの変異原性強度は、Ames試験で評価した。また、塩素処理副生成物をDNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine)を用いて誘導体化した後、高分解能LC/MSで網羅的に検出した。検出結果は、模擬サンプルを用いた原理確認実験と同様の方法で解析した。

解析により得られたピークの物質は、高分解能・高質量精度LC/MS (UltiMate HPG-3400SD-LTQ Orbitrap XP, Thermo Fisher Scientific, USA)を用いて構造推定された。その際、分子式の推定確度を高めるために、ESIでのイオン化に加えて、Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)によるイオン化を行い、同物質の検出を確認した。推定結果は、クロマトグラフィーおよび衝突誘起解離実験により確認された。確認に用いた(E)-1,3-dichloropropeneは、東京化成工業より購入した。

4. 研究成果

(1) 模擬サンプルを用いた原理確認

調製した4サンプルの変異原性は、すべて陽性であった。また、AF-2の濃度が増加するとともに変異原性強度が増加し、両者に明確な関係が認められた。そこで、サンプルに含まれる物質をLC-MSで測定したところ、4サンプルの合計で2,084個のイオンが検出された。検出されたイオン数が多く、最終目的である重回帰分析が実行不可能なので、ブランクサンプルの測定データを差引き、さらに、 1×10^5 cps以下の弱いピーク強度のイオンを除去した。LCカラムの保持時間(RT)の実験誤差により、同一イオンが誤って異なるイオンと判断されている例を数多く発見した。そこで、4サンプルのクロマトグラムで同一イオンのRTが最も一致するようにアライメントを実施した。その結果、図1に示すように、イオン数を680個に削減することができた。

従属変数を実測したサンプルの変異原性強度、独立変数を抽出されたイオン(680個)のピークボリュームとしてOPLS回帰分析を実施し、サンプルの変異原性強度に対する各イオンの寄与の程度をVariable Importance in Projection (VIP)で評価した。その結果、図2に示すように、

寄与の程度はイオンにより大きく異なった。そこ

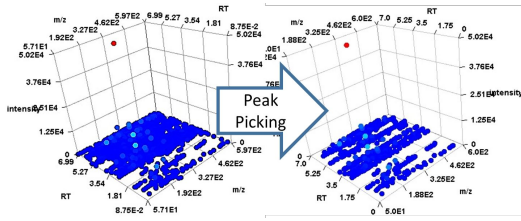


図1 解析対象イオンの抽出結果

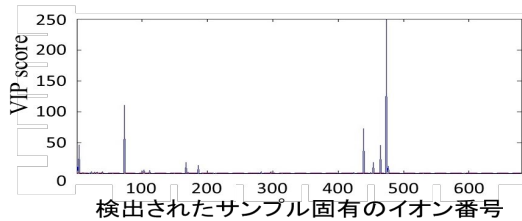


図2 変異原性強度に対する各イオンの寄与の程度

で、VIP が大きい上位 3 個のイオンと変異原性強度の相関分析を行ったところ、正の相関を持つ 2 個のイオンが抽出された。重回帰分析を行った結果、変異原性強度 (net. rev/mL) = $0.69 \times (\text{AF2 のピークボリューム}) + 550$ となり、構築したモデルから算出した変異原性強度と一致したことから、原理を確認した。

(2) 土壌燻蒸剤 DD 塩素処理サンプル中の変異原の探索

DD 塩素処理サンプルを高分解能 LC/MS を用いて測定したところ、有機塩素化合物のイオンがほとんど検出されなかった。そこで、カルボニル化合物の生成を想定し、DNPH を用いて誘導体化した。得られた分析結果を統合解析ソフトで解析したところ、1,389 個の component が検出された。検出された component の中で、塩素処理サンプルの peak volume がブランクサンプルの peak volume の 2 倍以上になり、なおかつ、neutral mass が判明した component を探索したところ 10 個であった。

その 10 個の component についての VIP 値と Pearson の相関係数との関係を図 3 に示す。相関係数が高くても VIP 値が低い component があることがわかる。そこで、VIP 値が 1 以上の component の peak volume とサンプルの変異原性強度との重回帰分析を実施したところ、 m/z 304.9845 (MassLynx mass) の peak volume による単回帰式を得ることができた。この回帰式の決定係数は 0.918、有意確率は 0.0102 であり、正確なモデルであった。この component のピークボリュームと塩素処理サンプルの変異原性強度の相関関係を確認したところ、図 4 に示すように、決定係数 0.975 の良好な相関関係が確認された。このため、この component が DD 塩素処理サンプルの主要な変異原と予測された。

そこで、発見された component のマスペクトルの同位体パターン解析を実施したところ、図 5 に示すパターンとなり、この component は

$[\text{M-H}]^- = \text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4\text{N}_4\text{Cl}_2$ と予測された。分子式を確

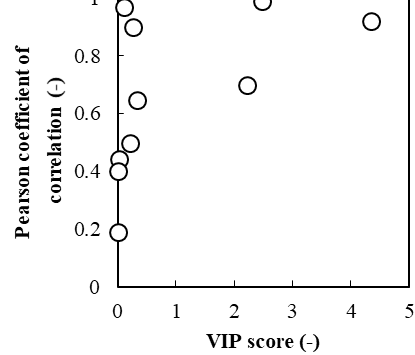


図3 OPLS により抽出されたコンポーネントの相関係数

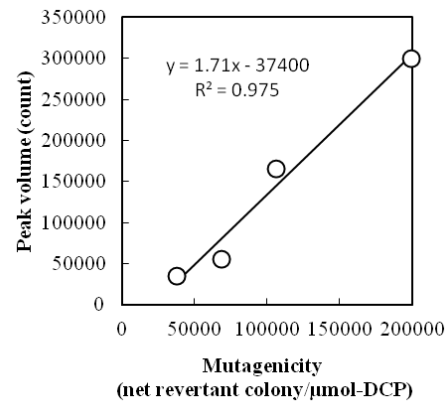


図4 発見されたコンポーネントのピークボリュームと塩素処理サンプルの変異原性強度の相関関係

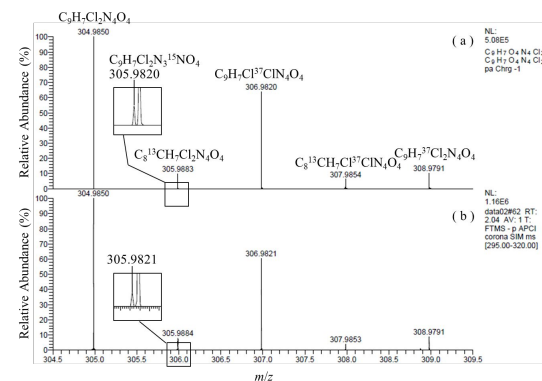


図5 発見されたコンポーネントのマスペクトル

定するために、正イオン化モードでの測定や種類の異なる付加体イオンの測定を試みたが検出されなかった。このため、ESI での測定に加えて APCI での測定を実施し、同じ m/z 、同じ同位体パターンのイオンを検出した。このことから、同物質の中性分子式を $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_4\text{Cl}_2$ と予測した。

構造を推定したところ、DCA の DNPH 誘導体化合物と推定された。DCA の試薬を購入して DNPH で誘導体化し、 $^1\text{H-NMR}$ で生成・精製確認した。これを用いて cochromatography および MS^2 解析を実施したところ、DCA であることが確認された。DCA の変異原性を測定したところ、160,000 net revertant colonies/ μmol であり、この

値は Ames 試験の陽性対照物質として用いられる 4NQO の 10 分の 1 程度と高い値であった。そこで、DD 塩素処理サンプルの変異原性強に対する DCA の寄与率を検討したところ 98%であり、主要な変異原性物質であった。

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1件)

1. 高梨啓和、上田岳彦、精密質量分析計を用いた未知物質の分子式推定、水環境学会誌、査読無、39(10)、360-364、2016 .

[学会発表](計6件)

1. 高梨啓和、浜 知宏、中島常憲、大木 章、上田岳彦、松下 拓、亀屋隆志、高分解能LC/MSと多変量解析を用いたtrans-1,3-ジクロロプロペン塩素処理物中の変異原性物質の探索、第26回環境化学討論会、2017年.
2. 高梨啓和、阿比留和也、浜 知広、中島常憲、大木 章、上田岳彦、近藤貴志、松下 拓、亀屋隆志、高分解能LC-MSおよび多変量解析を用いた土壤燻蒸剤DD塩素処理物中の未知変異原性物質の同定、日本質量分析学会第64回質量分析総合討論会、2016年.
3. 浜 知広、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、松下 拓、亀屋隆志、多変量解析を用いた trans-1,3-ジクロロプロペン塩素処理物中の変異原性物質の探索、第 50 回日本水環境学会年会、2016 年.
4. 浜 知広、高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、松下 拓、亀屋隆志、重回帰分析などを用いた trans-1,3-ジクロロプロペン塩素処理物中の変異原性物質の探索、日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会、2016 年.
5. 高梨啓和、浜 知広、中島常憲、大木 章、上田岳彦、亀屋隆志、近藤貴志、松下 拓、多変量解析と高分解能質量分析による変異原の探索、環境科学会 2015 年会、

2015 年.

6. 高梨啓和、中島常憲、大木 章、上田岳彦、近藤貴志、亀屋隆志、松下 拓、高分解能LC-MSを用いた土壤燻蒸剤D-D塩素処理物中の未知変異原の探索、日本質量分析学会第63回質量分析総合討論会、2015年.

[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：
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
高梨 啓和 (TAKANASHI, Hirokazu)
鹿児島大学・理工学域工学系・准教授
研究者番号：40274740

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者
上田 岳彦 (UEDA, Takehiko)
鹿児島大学・理工学域工学系・准教授
研究者番号：80293893

(4)研究協力者 なし