

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19853

研究課題名（和文）胎児期から乳児期の化学物質曝露の軌跡：エクスポゾーム研究のための乳歯分析法開発

研究課題名（英文）History of chemical exposure from fetal to infancy: development of deciduous tooth analytical method for exposome

研究代表者

岩井 美幸（Iwai-Shimada, Miyuki）

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・主任研究員

研究者番号：80723957

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：乳歯は、幼児期から学童期にかけて脱落が起こり、侵襲性のない生体試料である。乳歯には、新産線と呼ばれる出生時の線があり、この線を境にして胎児期と生後1年程度までの長期的かつ経時的な曝露の情報が集約している。本研究では、乳歯に含まれる低分子化合物を乳歯の形態を維持したまま測定できる手法を開発することを目的とした。乳歯の薄片を作成し、導電性スライドガラスに載せ、マトリックス剤を塗布し、光学顕微鏡内蔵型の質量分析計（iMScope QT）を用いて分析した。乳歯薄片を100-400m/zと400-1100 m/zの範囲でそれぞれ分析した結果、100-400m/zに乳歯由来のマスマスペクトルを多数検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、イメージング質量分析により乳歯中で検出される低分子化合物について、乳歯の形態を保持したまま網羅的に探索できる手法を構築した。乳歯の解剖学的特徴から、乳歯薄片を割れ目なく作成するのは難易度が高く、世界的にも同様の研究を進めているグループは限られている。乳歯の形態を保持したまま分析することで、乳歯の成長に伴って取り込まれた物質を捉えることが可能であり、開発した本手法の応用範囲は広く、乳歯の特徴である時間軸情報を活用した分析法となり、今後疫学研究と融合することで新たな研究展開をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a method for measuring low molecular weight compounds (LMWCs) in deciduous teeth while preserving their morphological integrity. Deciduous teeth, naturally shed during childhood, serve as non-invasive biological samples and contain valuable information about an individual's exposure history. Deciduous teeth were sectioned and mounted on conductive glass slides. Matrix solutions were applied, and the LMWCs were analyzed using an iMScope QT. Numerous mass spectra were detected in the 100-400 m/z range, which were attributed to the deciduous teeth themselves. These mass spectra likely represent endogenous compounds related to the tooth structure and composition. The results demonstrate the potential of using iMScope QT to analyze LMWCs in deciduous teeth without compromising their morphology. This method could provide insights into an individual's exposure history and overall health status.

研究分野：環境保健学

キーワード：乳歯 質量分析 環境保健 曝露 エクスポゾーム

1. 研究開始当初の背景

ヒトが生涯において曝露する化学物質の総量としてエクスポーズームという概念が提唱され (Vermeulen et al., Science, 2021:367, 392-396)、生涯曝露を明らかにする取り組みが世界中で進められている (しかし、その方法論は探索的な状況にある)。特に、胎児期から乳児期の化学物質曝露は、成長や発達への影響が懸念される時期である。近年、我が国では学童期の問題行動、発達障害といった精神神経発達に対する懸念が高まっており、欧米でも同様の状況である。発達障害のひとつである自閉スペクトラム症の増加については、その原因の 40% は不明とされる (Weintraub, Nature, 2011:479, 22-24)。その一方、胎児期や小児期の重金属、有機フッ素化合物、残留性有機汚染物質、農薬などの様々な化学物質曝露が子どもの成長と発達に影響する知見が多数報告される。多種多様な化学物質にさらされている現代において、どの物質が、いつの時期にどのくらい曝露することが健康に影響するのか明らかにするためには、時間軸の情報をもった試料での分析手法の開発が喫緊の課題である。乳歯は胎生中期から出生後約 1 年間に取込まれた物質の情報が蓄積された侵襲性のない生体試料である。米国マウントサイナイ医科大学の Arora 教授は、乳歯を用いて 1 週間の間隔で様々な元素を同時測定する分析技術を開発し (Nat. Commun., 2017:15493) この技術により 1) 乳歯で測定できるものなら、胎児期から乳児期までの曝露を経時的に評価できること、2) いつの時期の曝露や欠如が子どもの健康に影響するか明らかにできることを示し、本分野での技術的・研究的革新があった。Arora 教授らが開発した分析手法は元素分析に限られており、有機化合物に関する同等の分析手法はない。そこで本研究では、光学顕微鏡内蔵型質量分析計を用いて、乳歯中有機化合物を乳歯の形態を保持したまま分析する手法を開発し、疫学調査に応用可能な手法の構築を目指すことが研究開始当初の背景であった。

2. 研究の目的

乳歯は、幼児期から学童期にかけて脱落が起こり、侵襲性のない生体試料である。乳歯には、新産線 (neonatal line) と呼ばれる出生時の線があり、この線を境にして胎児期と生後 1 年程度までの長期的かつ経時的な曝露推移の情報が集約されている。これまでに長期的な元素曝露の変遷を測定できる手法を用いて乳歯の分析を進めているが、乳歯に含まれる元素以外の低分子化合物に関して、その種類や分析法に関する研究は限定的である。そこで本研究では、光学顕微鏡内蔵型質量分析計を用いて、乳歯中有機化合物 (低分子) を乳歯の形態を保持したまま分析する手法を開発することを目的とした (図 1)。

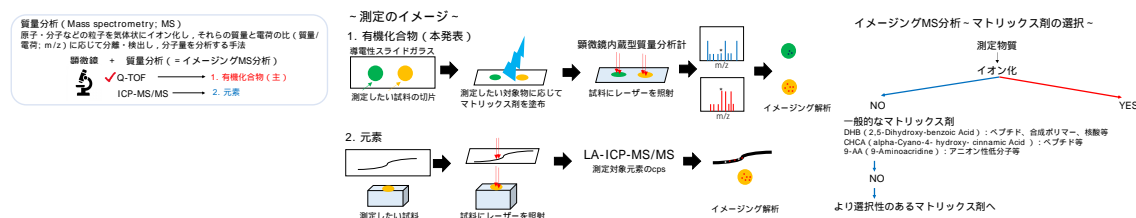


図 1. 研究概要

Iwai-Shimada et al (2022),70, 139-141, J. Mass Spectrom. Sco. Jpn.

3. 研究の方法

ウェブ調査により収集した乳歯を用いて、乳歯を切断、脱灰処理をした。脱灰処理は、2ヶ月程度乳歯を EDTA 溶液に浸け、適宜溶液を交換した。クライオトーム (Laica) で乳歯薄片 (20µm 程度) を作成し、導電性スライドガラスに載せ、iMLayer (島津製作所) を用いてマトリックス剤を均一に噴霧した。マトリックス剤には、CHCA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid)、DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を用いた。光学顕微鏡内蔵型の質量分析計 (iMScope QT, 島津製作所) を用いて分析をした。iMScope の設定は、表 1 の通りとした。

表 1. iMScope の測定条件

iMScope setting	
No. laser shots	50 shots
Repetition rate	1000 Hz
Laser diameter	10 µm
Laser intensity	60
m/z	100~400、400~1000
Polarity	Positive

4. 研究成果

4-1. マトリックス剤の比較

CHCA または DHB を乳歯薄片に塗布し、2 種のマトリックス剤の m/z 100–400 におけるフルスキャンスペクトルを比較した。その結果、CHCA を塗布したサンプルでは乳歯由来と考えられる質量数のピークが多数検出され、DHB と比べてイオン化効率が高いと考えられた。一方で、DHB は低質量領域にマトリックス剤由来のピークが検出され、乳歯由来の物質のイオン化に適していない可能性が示唆された。また、CHCA または DHB のいずれのマトリックス剤を用いても 400-1000 m/z では、乳歯特有のピーク強度は低かった。

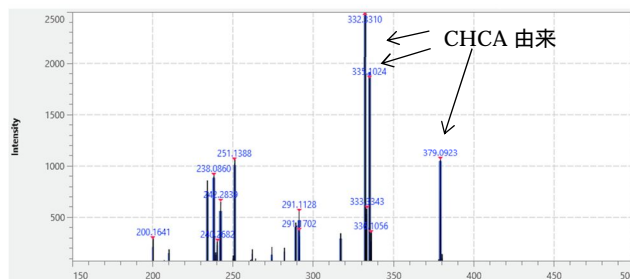


図 2. CHCA 使用時の乳歯薄片のマススペクトル (m/z 100-400)

4-2. CHCA による乳歯特有のピーク

CHCA を使用した場合に見られた乳歯特有のピークについて、分布特性をみたところ、A)象牙質全体に分布している場合、B)象牙質中心部に分布している場合、C)象牙質内のエナメル質近傍に分布しているものの 3 パターンを確認した (図 3)。いずれも乳歯の形態的特徴、構造とマッチしたものであり、乳歯の成長特徴とは異なっていた。

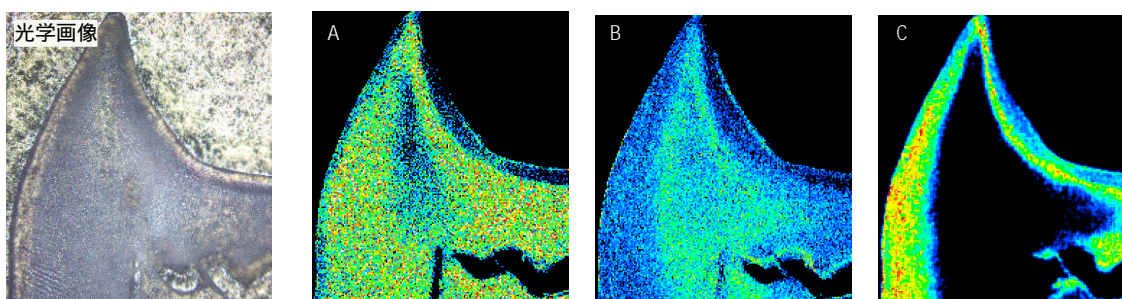


図 3. 乳歯薄片の顕微鏡光学画像と質量イメージング

4-3. 考察と今後の課題

本研究では、イメージング質量分析により乳歯中で検出される低分子化合物について、乳歯の形態を保持したまま網羅的に探索できる手法を構築した。乳歯の解剖学的特徴から、乳歯薄片を割れ目なく作成するのは難易度が高く、世界的にも同様の研究を進めているグループは限られている。

使用するマトリックス剤の種類により、イオン化効率が大きく異なっており、本検討の中では CHCA がより適していた。CHCA は、通常、ペプチドおよびヌクレオチドなどを測定する際のマトリックス剤として用いられており、乳歯中のこれらの物質が検出された可能性が高い。乳歯の形態を保持したまま分析することで、乳歯の成長に伴って取り込まれた物質を捉えることが可能であり、開発した本手法の応用範囲は広く、乳歯の特徴である時間軸情報を活用した分析法となり得る。また複数の乳歯を比較する際に、1)マトリックス剤のみのイオン強度で補正する手法、2)乳歯に標準的に含まれる物質を用いて補正する手法を想定していたが、2)についていくつかの候補物質があったものの、イオン化効率が悪く課題となった。今後、様々なマトリックス剤を用いて検討を進めるとともに、成長過程で経時的に変化する物質を捉えることにより、疫学研究と融合できるような新たな研究展開をもたらすことが期待された。

謝 辞：

本調査にご協力いただいたすべての方に感謝いたします。

本研究は、科研費 挑戦的研究 (萌芽 代表 岩井美幸, 22K19853) の助成を受け実施された。発表内容に関連し、発表者らに開示すべき COI 関係にある企業などありません。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 岩井美幸, 中山祥嗣	4. 巻 70
2. 論文標題 イメージング質量分析からわかるヒトでの化学物質曝露の軌跡	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 139-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5702/massspec.S22-31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iwai-Shimada M., Nakayama S.F.
2. 発表標題 Challenge to elucidate critical windows of susceptibility: Temporal trends in elemental exposure of each individual
3. 学会等名 フォーラム2022：衛生薬学・環境トキシコロジー（日韓合同シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩井美幸、SUWANNARIN Neeranuch、岩井健太、磯部友彦、中山祥嗣
2. 発表標題 乳歯を用いた低分子化合物の検出に関する試み
3. 学会等名 第94回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	磯部 友彦 (Isobe Tomohiko) (50391066)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・主幹研究員 (82101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岩井 健太 (Iwai Kenta)		
研究協力者	スワンナリン ニーラヌッチ (SUWANNARIN Neeranuch)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関