

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24612004

研究課題名(和文)ホスゲン・塩素ガス等の塩素系化学兵器曝露のバイオマーカー探索に関する研究

研究課題名(英文)Search on the biomarker for the identification of Cl₂ and phosgene exposure

研究代表者

柘 浩一郎 (Tsuge, Koichiro)

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官

研究者番号：90356204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：塩素ガスやホスゲン等の塩素系ガスは化学工業分野で広く使用され、化学兵器としてテロに用いられる可能性もあが、これらの曝露証明法は確立されていない。本研究では、生体内高分子との結合物の検出により、曝露を証明することを目的とした。

モデルタンパク質に塩素曝露の間接的方法として次亜塩素酸ナトリウムを添加し、処理/未処理資料のプロテアーゼ消化後の全断片をLC-MS/MS分析し、処理によって有意にピーク面積が減少した断片を抽出した。これらの断片に塩素が付加した質量をターゲットとしてLC-MS/MS分析を実施し、塩素結合断片の探索を実施したが、塩素付加と考えられるピークの同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The chloric gas and phosgene are used widely in the chemical industry field. There are also more possibilities that these are used by terrorism as a chemical weapon. However, determination method of exposure by these toxic gases is not established.

Model protein was exposed to a sodium hypochlorite and digested by the proteases.

The digested peptide mixture was injected to LC-MS/MS. To compare the peak area of exposed and non-exposed samples, a few peptides that peak area decreases significantly were found. LC-MS/MS analysis was carried out using the mass number which presumed chlorine to have combined. However, we did not determine the chlorine combined peptides.

研究分野：法医学 環境系薬学

キーワード：塩素 法中毒 法医学 曝露証明 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

サリンをはじめとする化学兵器を用いたテロの懸念はサリン事件から15年以上経過した現在でも継続している。

サリン事件後、テロに用いられる可能性のある有毒ガスはサリンといったイメージが定着しつつあるが、実際には特殊な毒ガスだけではない。

塩素ガスやホスゲン等の塩素系有毒ガスは工業用途として多量に使用されているため、工場災害による曝露の可能性も高い。民生用途で幅広く使用されていることから入手が容易であり、予測される被害の程度はサリン等に比べて小さいものの、テロ等に使用される可能性も高い。

しかしながらこれらの曝露を証明する方法は確立されておらず、この確立が急務である。

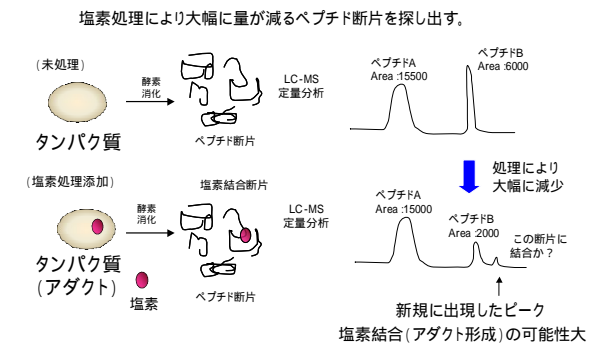
2. 研究の目的

本研究では、これらの塩素系有毒ガス曝露を証明するバイオマーカーの探索をおこない、構造決定をおこなった後、特異的抗体を作成しスクリーニング法を開発するとともに、質量分析法を用いた確定的証明法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

我々は先行研究として、化学兵器の1つであるマスタードガスが生体内タンパク質と結合した部位を決定し、曝露証明をしようとする研究をおこなっている。結合部位の決定は質量分析法を用い、タンパク質のトリプシン消化物についてLC-MSで全断片同定した上で、マスタードガス添加量を変化させた試料を用いて定量分析をおこない、添加量に応じ

てピーク面積が減少する断片を結合部位の候補とし、さらにLC-MS/MSを用いて結合部位を同定するという手法である。先行研究の結果、本手法によりマスタードガスがウシ血清アルブミンのCys-34残基に結合することが明らかとなっている。



この確立された先行研究の手法をもとに、ホスゲンおよび塩素ガスについても同様の手法でヒト血清アルブミンを用いた結合部位の同定とその構造解析をおこなう。さらに、決定された毒性ガス付加アミノ酸とその周辺ペプチドの配列をもとに、特異的抗体の作成をおこない、ELISA法によるスクリーニング検出系を確立する。また、対象タンパク質の種類をひろげ、採取が容易な唾液中や鼻粘膜、鼻汁等に含まれるタンパク質への付加の有無を確認するとともに、バイオマーカーとなり得るかについても詳細に検討をおこなう。

さらに、質量分析法を用いて、マーカーとなる修飾アミノ酸(またはそれらを含むペプチド断片)の高感度分析法(分析の最適化)を確立した上で定量および検出下限等の算出をおこない、これら塩素系有毒ガス曝露の確定的証明法とする。

4. 研究成果

モデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(BSA)及びヒトケラチンを用いて塩素

ガスの曝露条件の検討を実施した。

さらに、ThermoFisher Science LTQ-Orbitrap を用い、BSA 及びケラチンのプロテアーゼ (トリプシン・キモトリプシン及び V8 プロテアーゼ) 消化断片の一斉分析条件を確立し、各断片の MRM による定量を可能にした。

当初、塩素ガス発生装置 (パーミエーター) を用いた曝露法を検討したが、パーミエーターによって発生できる塩素ガスの濃度が極めて低く、曝露後のタンパク質プロテアーゼ分解物の全断片の定量を行っても有意なピーク面積の増加や減少は認められなかった。

そこで、塩素曝露法として塩素ガスではなく間接的な曝露法である次亜塩素酸塩を用いる方法を検討した。次亜塩素酸ナトリウム添加後、SDS-PAGE によって残存タンパク質を定量したところ、添加濃度に依存して元のタンパク質のバンドが減少することがわかった。この結果から、添加する次亜塩素酸ナトリウムの濃度を終濃度 0.01% と設定した。

BSA 5mg/mL、次亜塩素酸ナトリウム 0.01% を 50 mM リン酸緩衝液に添加し、37 °C で 1 時間インキュベート後、限外濾過フィルターで低分子画分を除去した。続いてトリプシン・キモトリプシン処理を行い、LTQ-Orbitrap を用いた全消化断片の定量を行った。

塩素未曝露のタンパク質についても同様の分析を実施し、塩素処理によってピーク面積が大幅に減少するペプチド断片を得た。

トリプシン消化では NECFLSHK (55.4% 減少)、IETMR (51.0% 減少) 等のペプチド断片が、キモトリプシン消化では VEVTKL (65.2% 減少)、EIARRHPY (48.6% 減少) 等の断片が塩素結合の可能性のある断片としてリストアップされた。

#	(M+H) ⁺	Prek Area Ratio	Sequence
T1	977.5	-55.40% ± 28.9%	(R)NECFLSHK(D)
T2	649.3	-51.00% ± 19.2%	(K)IETMR(E)
T3	1,399.7	-49.60% ± 9.9%	(K)TVMENFVAFVDK(C)
T4	1,014.6	-45.70% ± 24.1%	(K)QTALVELLK(H)
T5	609.3	-43.20% ± 18.8%	(K)AFDEK(L)
T6	927.5	-41.60% ± 22.5%	(K)YLYEIAR(R)

#	(M+H) ⁺	Prek Area Ratio	Sequence
CT1	688.4	-65.20% ± 15.8%	(F)VEVTKL(V)
CT2	1,041.6	-48.60% ± 28.4%	(Y)EIARRHPY(F)
CT3	561.3	-42.90% ± 12.4%	(Y)VPKAF(D)
CT4	888.5	-40.50% ± 26.8%	(L)ASSARQL(R)

これらの断片に塩素が付加した質量をターゲットとして LC-MS/MS 分析を実施し、塩素結合断片の探索を実施したが、塩素付加と考えられるピークの同定には至らなかった。

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)

Y. Seto, K. Tsuge, et al. *Anal. Chem.* **86**, 6316-26 (2014)

[学会発表] (計 0 件)

[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

柘 浩一郎 (Tsuge Koichiro)

科学警察研究所・主任研究官

研究者番号：90356204

(2)研究分担者

大森 毅 (Ohmori Takeshi)

科学警察研究所・室長

研究者番号：70356195

(3)連携研究者

()

研究者番号：