

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790126

研究課題名（和文） 酸化ストレスを惹起するキノン系化合物の人体曝露評価法の開発

研究課題名（英文） Development of a biomarker for assessing exposure to quinone compounds associated with producing reactive oxygen species

研究代表者

鳥羽 陽 (TORIBA AKIRA)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：50313680

研究成果の概要（和文）：循環器疾患やアレルギー性疾患の悪化に寄与する可能性があり、ディーゼル排ガス等に含まれる、酸化ストレスを惹起する環境汚染物質である 9,10-phenanthrenequinone (PQ) の人体曝露量を評価するための生体指標（バイオマーカー）を開発することを目的としてヒト尿中に排泄される PQ 代謝物を測定するための分析法を開発し、ヒト尿中から PQ 代謝物をはじめて同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：9,10-Phenanthrenequinone (PQ) has been suspected to be a causative factor in cardiovascular and allergic diseases which have been reported to be oxidative stress-related disorders. To develop a biological marker (biomarker) for assessing human exposure to PQ, an analytical method has been developed to determine urinary metabolites of PQ in human urine. For the first time, PQ metabolites in human urine were identified using the developed method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：環境分析化学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：バイオマーカー、酸化ストレス、有害化学物質、大気汚染、曝露評価

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において関心の高い動脈硬化による心疾患や脳疾患はわが国の死因の 30% に上り、がんにも匹敵する。動脈硬化などの循環器疾患の進展には様々な要因によって産生される活性酸素種（酸化ストレス）が関係する。ディーゼル排ガス等の人為燃焼発生源に由来する浮遊粒子状物質には酸化ストレスを誘発する物質が含まれ、特にキノン系化合物の各種疾患との関連性が指摘されている。しかしながら、生体を受ける酸化

ストレス量（障害）に対する環境から曝露されるキノン系化合物の寄与度は不明であり、酸化ストレスを惹起する環境汚染物質（キノン系化合物）の曝露と酸化ストレスによる生体影響との関係を明らかにすることが急務となっている。

大気粉じんやディーゼル排ガス粉じん中には、多環芳香族炭化水素 (PAH) のキノン体、すなわち 9,10-フェナントラキノン、1,2-及び 1,4-ナフトキノン、9,10-アントラキノン等が存在することが報告されている。これら

のキノン系化合物は、活性酸素種であるスーパーオキシド産生に係わるレドックスサイクルにおいて触媒的に働くため、微量でも酸化ストレスの原因となる。都市部において捕集された大気粉じん中キノン体濃度の報告があるものの、ヒトに対する曝露量や生体への影響予測はまったく行われていない。

細胞を用いた *in vitro* 実験で 9, 10-フェナントラキノン (PQ) を細胞に曝露させた後に PQ のモノグルクロン酸抱合体 (PQHG) が細胞外に排泄されていることが報告されており、ヒト尿中に排泄されるキノン系化合物、中でも大気環境中に高濃度で存在する PQ の代謝物をバイオマーカーとしてキノン系化合物の人体曝露量を評価することを推定した。

## 2. 研究の目的

- (1) 酸化ストレスを惹起する PAH キノン体 (PQ) のヒト尿中代謝物の同定
- (2) PQ 代謝物を超高感度に検出するための誘導体化を利用した高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) 及びガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) を用いた新しい分析法の開発
- (3) 被検体に対する特異性や回収率が高く、ルーチン分析に適した尿試料の前処理法の確立
- (4) 酸化ストレスの指標である尿中 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) の分析法開発
- (5) 外因性酸化ストレスを誘導する PAH キノン体 (PQ) 尿中排泄量と全体 (外因性+内因性) の酸化ストレスの指標 (8-OH-dG) や吸気中 PAH キノン濃度等との相関性の評価

## 3. 研究の方法

### (1) 尿試料の前処理操作

①脱抱合により生成する PQ を対象とする尿前処理法

ヒト尿試料 50 mL を pH 5 に調整した後、 $\beta$ -glucuronidase / arylsulfatase により 37°C、4 時間脱抱合処理を行った。脱抱合処理をした尿試料に内標準物質として脱抱合により生じるキノンの重水素化体を添加し、逆相系固相抽出カートリッジおよびジクロロメタンを溶出液としたシリカゲルカラムによる順相系 HPLC で分取精製を行った。分取した PQ 画分を 50  $\mu$ L まで減圧濃縮したものを GC-MS 法と LC-MS/MS 法の 2 つの測定方法に適用した。

②8-OHdG 測定のための尿前処理法

ヒト尿試料 100  $\mu$ L に内部標準物質として 8-OHdG の同位体標識物質を加え、固相抽出カートリッジ (Oasis HLB) に導入して 50%メタノール/水で溶出して試料として LC-MS/MS に適用した。

### (2) GC-MS による PQ 測定

上述の前処理後の試料をトリメチルシリル (TMS) 導体化し、Agilent 5975B GC-MS システムを用いて SIM 法で測定した。カラムは DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm i. d., 0.25  $\mu$ m, J&W) を使用し、50°C-300°C (25°C/min) の昇温プログラムで分析した。モニタリングイオンとして PQ の場合は m/z 354、266 を、重水素化体 (PQ- $d_9$ ) は m/z 362、274 を選択した。

### (3) LC-MS/MS による PQ 代謝物測定

分離カラムとして Inertsil ODS-P (250 mm  $\times$  4.6 mm i. d., 5  $\mu$ m, GL sciences) を用い、カラムオープン温度は 30°C とした。移動相として 5 mM 酢酸アンモニウム (A 液) とメタノール (B 液) を用いて、B 液 60%-80% (30 min) のグラジエントプログラム、流速 0.5 mL/min で分析した。MS 部として API-4000 Q Trap (Applied Biosystems) を用い、APCI ポジティブモードによる選択反応モニタリングモード (SRM) で測定した。モニタリングイオンとして、PQ は m/z 209 $\rightarrow$ 181, 153 を、PQ- $d_9$  は m/z 217 $\rightarrow$ 189, 161 を選択した。

### (4) 8-OHdG の測定

分離カラムとして COSMOSIL HILIC (150  $\times$  2.0 mm, 5  $\mu$ m, ナカライテスク) を使用した。カラム温度を 40°C に設定し、移動相はアセトニトリル、10 mM 酢酸アンモニウムからなる混液を流速 0.4 mL/min で送液し、試料は 20  $\mu$ L を注入した。MS のイオン化法は ESI ポジティブモードを採用し、測定は SRM で行った。

## 4. 研究成果

### (1) PQ 分析法の確立

#### ①GC-MS による PQ 測定

PQ の代謝物である PQHG はグルクロン酸部位を酵素等で加水分解するとカテコール体 (PQH<sub>2</sub>) を生じ、さらに自動酸化によりキノン体に戻ることから、尿試料を加水分解することで PQ を対象として分析が可能となる (図 1)。そこで、まず PQ を高感度に測定できる分析法の開発を行った。

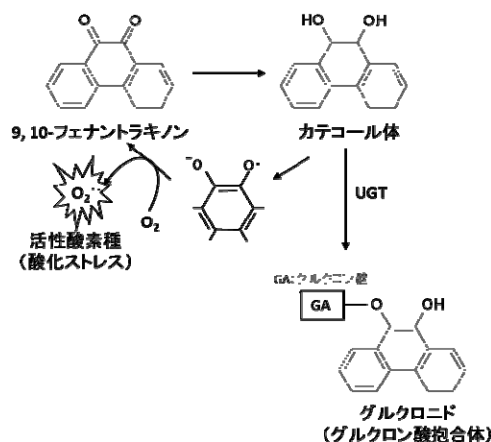


図1 9,10-フェナントラキノンの代謝経路

PQを直接GC-MSで測定した際の検出限界は1000 pg/injection (S/N = 3) と、感度が低く、尿試料への適用は困難であった。高感度化を目的としてアセチル誘導体として GC-MSで測定する方法が報告されているものの感度が十分ではなかった。そこで、新規誘導体化法として TMS 誘導体化を試みた結果、誘導体の同定に成功した。スキャンモードで PQ の TMS 化誘導体から、PQ に TMS 基が2つ付加した分子イオン  $[M]^+ m/z 354$  とフラグメントイオンとして  $[M-TMS-CH_3]^+ m/z 266$ 、 $[M-TMS-(CH_3)_3]^+ m/z 236$ 、脱離した TMS 基のイオン  $m/z 73$  を観察した。さらに、TMS 誘導体化することで高感度に PQ を検出できることが判明した(検出限界 0.1 pg/injection)。

### ②LC-MS/MSによる PQ 測定

PQ を誘導体化せずに直接検出できる方法として LC-MS/MS 法を検討した結果、大気圧化学イオン化法 (APCI) において PQ にプロトンが付加した  $[M+H]^+ m/z 209$  をプレカーサーイオンとした EPI スキャンにおいて、プロダクトイオンとして  $[M-CO]^+ m/z 181$ 、 $[M-(CO)_2]^+ m/z 153$  を検出した。プレカーサーイオン  $[M+H]^+$  に対して  $[M-CO]^+ m/z 181$ 、 $[M-(CO)_2]^+ m/z 153$  の2種のプロダクトイオンを定性と定量を目的として選択し、実試料の測定は SRM モードで行った。SRM モードでの測定により、高感度な検出が可能であった(検出限界 1.2 pg/injection)。

### (2) ヒト尿中 PQ 代謝物の同定

脱抱合したヒト尿試料を GC-MS 法と LC-MS/MS 法の両法に適用したところ、いずれの方法でも PQ に該当するピークを検出することに成功した(図2及び図3)。また、同一尿試料について、脱抱合処理を行わずに測定したところ、PQ に該当するピーク強度は著しく低下した(尿中に存在する PQ 自体は PQHG も含めた全量に対して 8-23%)。脱抱合処理した尿試料において PQ のピークが検出されたことから、抱合体が加水分解されて  $PQH_2$  を生成し、さらに自動酸化により PQ が生成したと結論づけた。また、酵素の種類を変えて抱合体の割合を調べたところ、グルクロン酸抱合体が 70%、硫酸抱合体が 30%であった。従って、PQ は  $PQH_2$  のグルクロン酸抱合体(主代謝物)及び硫酸抱合体としてヒト尿中に排泄され、脱抱合処理後に PQ を生成したと推定した。この結果は、ヒト尿中への PQ 代謝物の排泄を世界ではじめて明らかにしたものである。

### (3) ヒト尿中 PQ 代謝物の定量

金沢市在住の 20-50 代の男女 13 名(非喫煙者 10 名、喫煙者 3 名)の尿中 PQ 代謝物の定量を行った。非喫煙者では 2.7-14.2 ng/L urine であった。一方、喫煙者では 36.8-46.8

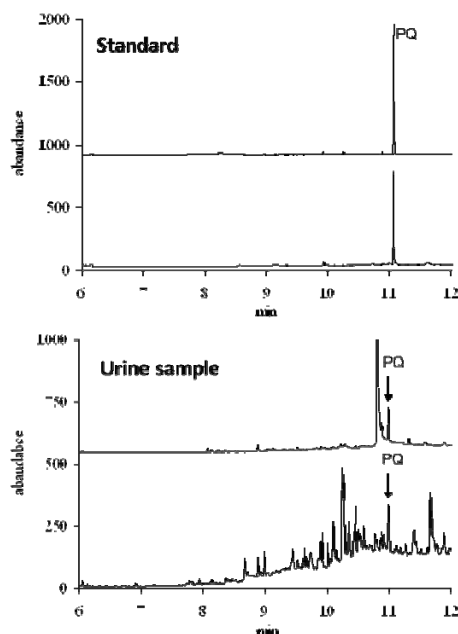


図2 GC-MSによるヒト尿試料中のPQ代謝物の検出

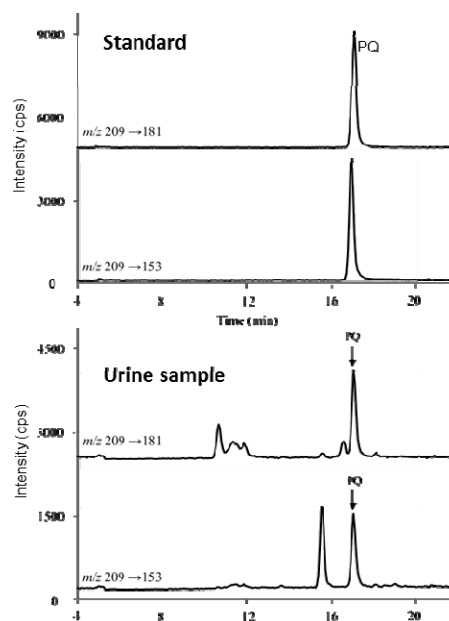


図3 LC-MS/MSによるヒト尿試料中のPQ代謝物の検出

ng/L urine であり、喫煙者では非喫煙者より尿中 PQ 代謝物濃度が高い傾向がみられた(図4)。喫煙が尿中 PQ 代謝物濃度の上昇の要因であると推定されたが、タバコ煙中の PQ 濃度についての報告はなく、今後タバコ煙や他の燃焼発生源中の PQ 濃度を測定していく必要がある。

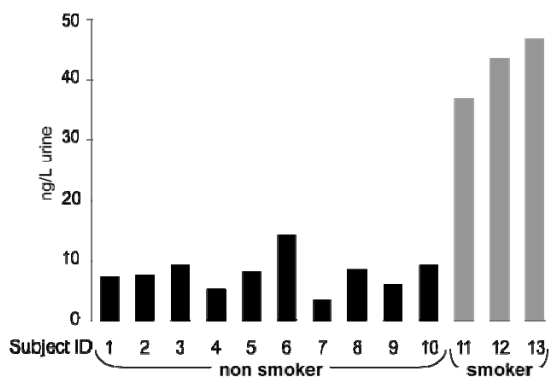


図4 ヒト尿試料中のPQ代謝物濃度

#### (4) 8-OHdG の測定法開発

HILIC-MS/MSによるヒト尿中8-OHdGの分離定量法を検討したところ、移動相アセトニトリル濃度を90%にすることで夾雑物の影響を受けることなく約7分で分離できた。検出下限値 (S/N=3) は1 fmol/injection、定量下限値 (S/N=10) は3.5 fmol/injectionであり、従来法に比べて高感度化を達成した。検量線は、相関係数0.999以上の良好な直線性が得られた。日差および日内変動はRSD<5%であった。以上の結果より、HILIC-MS/MSによる尿中8-OHdGの高感度・高選択的な分析法を開発することに成功した。本法を用いることで従来法に比べてより迅速に8-OHdGを測定できることができ、尿中キノン代謝物との比較も容易になると考えられる。

#### 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8件)

- ① T. Kameda, A. Toriba, (③, 他3名); Atmospheric formation of hydroxyl nitropyrenes from a photochemical reaction of particle-associated 1-nitropyrene. *Environ Sci. Technol.*, in press. (査読有)
- ② J. P. Miller-Schulze, A. Toriba, C. D. Simpson, (③, 他6名); Exposures to Particulate Air Pollution and Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons among Taxi Drivers in Shenyang, China., *Environ. Sci. Technol.*, **44**(1), 216-221 (2010). (査読有)
- ③ X.-Y. Yang, A. Toriba, (⑦, 他6名); Indirect- and direct-acting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res.*,

**695** (1-2), 29-34 (2010). (査読有)

- ④ T. Kameda, A. Toriba, (③, 他3名); Determination of particle-associated hydroxynitropyrenes with correction for chemical degradation on a quartz fibre filter during high volume air sampling, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **90** (13), 976-987 (2010). (査読有)
- ⑤ A. Ohno, A. Toriba, (②, 他5名); Determination of 1-nitropyrene in low volume ambient air samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection., *J. Chromatogr. A*, **1216**, 4625-4628 (2009). (査読有)
- ⑥ Y. Motoyama, A. Toriba, (⑧, 他6名); Oxidative stress more strongly induced by ortho- than para- quinoid polycyclic aromatic hydrocarbons in A549 cells. *J. Health Sci.*, **55**(5), 845-850 (2009). (査読有)
- ⑦ X.-Y. Yang, N. A. Toriba, (⑦, 他6名); Long-range transport of fluoride in East Asia monitored at Noto Peninsula, Japan. *Sci. Total Environ.*, **407**, 4681-4686 (2009). (査読有)
- ⑧ T. Kameda, A. Toriba, (②, 他3名); Determination of airborne particle-associated benz[a]anthracene-7, 12-quinone using high-performance liquid chromatography with in-line reduction and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, **1216** (39), 6758-6761 (2009). (査読有)

[学会発表] (計10件)

- ① 旭 美樹 (鳥羽 陽)、活性酸素を生成する9,10-phenanthrenequinoneの尿中代謝物の同定と定量、日本薬学会第131年会、2011年3月30日、東日本大震災のため誌上開催
- ② 鳥羽 陽、ディーゼル排ガス曝露指標を指向したヒト尿中1-ニトロピレン代謝物の測定、日本薬学会第131年会、2011年3月30日、東日本大震災のため誌上開催
- ③ 細住智恵美 (鳥羽 陽)、親水和相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による尿中8-hydroxy-2'-deoxyguanosineの分析、フォーラム2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010年9月9日、東京薬科大学(東京都)
- ④ 鳥羽 陽、メトキシフェノール類をバイオマーカーとした木材燃焼煙の曝露評価、フォーラム2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010年9月9日、東京薬科大学(東京都)

- ⑤片山裕規 (鳥羽 陽)、日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノン濃度の測定：汚染レベルの比較ならびに発生源の検討、第 51 回大気環境学会年会、2010 年 9 月 9 日、大阪大学 (大阪府)
- ⑥鳥羽 陽、活性酸素種を生成する 9,10-phenanthrenequinone のヒト尿中代謝物の検出、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28-30 日、桃太郎アリーナ (岡山県)
- ⑦亀田貴之 (鳥羽 陽)、大気粒子状物質に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の測定、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28-30 日、桃太郎アリーナ (岡山県)
- ⑧鳥羽 陽、ディーゼル排ガス曝露指標を指向したヒト尿中 1-ニトロピレン代謝物の測定、フォーラム 2009：衛生薬学・環境トキシコロジー、2009 年 11 月 5-6 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県)
- ⑨川合美緒 (鳥羽 陽)、活性酸素種を生成する 9,10-phenanthrenequinone のヒト尿中代謝物の分析法の開発、日本分析化学会第 58 年会、2009 年 9 月 24-26 日、北海道大学 (北海道)
- ⑩川合美緒、(鳥羽 陽)、活性酸素種を生成する 9,10-Phenanthrenequinone のヒト尿中代謝物の検出、第 69 回北陸質量分析談話会、2009 年 5 月 23 日、金沢大学 (石川県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥羽 陽 (TORIBA AKIRA)  
金沢大学・薬学系・准教授  
研究者番号：50313680

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

早川 和一 (HAYAKAWA KAZUICHI)  
金沢大学・薬学系・教授  
研究者番号：40115267

亀田 貴之 (KAMEDA TAKAYUKI)  
金沢大学・薬学系・助教  
研究者番号：50398426

唐 寧 (Tang Ning)  
金沢大学・薬学系・助教  
研究者番号：90372490

### (4) 研究協力者

Christopher D. Simpson  
米国・ワシントン大学・准教授