



日本化学工業協会
新LRI 第2期 研究報告会

シンポジウム:「内分泌かく乱物質の現状と課題」

メタボリックプロファイリングによる化学物質
の内分泌かく乱作用 *in vitro* 評価系の開発

2014年8月29日
ベルサール神田

馬場 健史

大阪大学大学院 工学研究科
生命先端工学専攻

bamba@bio.eng.osaka-u.ac.jp



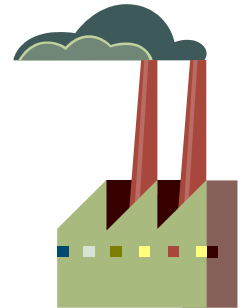
化学物質毒安全性評価のスクリーニング の必要性

- 化学物質は5000万種類以上
- 化学物質の安全性(毒性)評価を行うことは物質を正しく使用する上で重要

評価対象化学物質

これまで

医薬品、農薬が毒性の評価対象
→評価する化学物質が限られていた



近年

工業用品など、一般化学物質も評価の対象になってきた

- ・世界の動向
EUが2007年よりREACH規則制定, 既存の化学物質も評価対象に
- ・日本の動向
2011年化審法の改正, 基本的にすべての化学物質を対象



内分泌かく乱作用とその評価方法

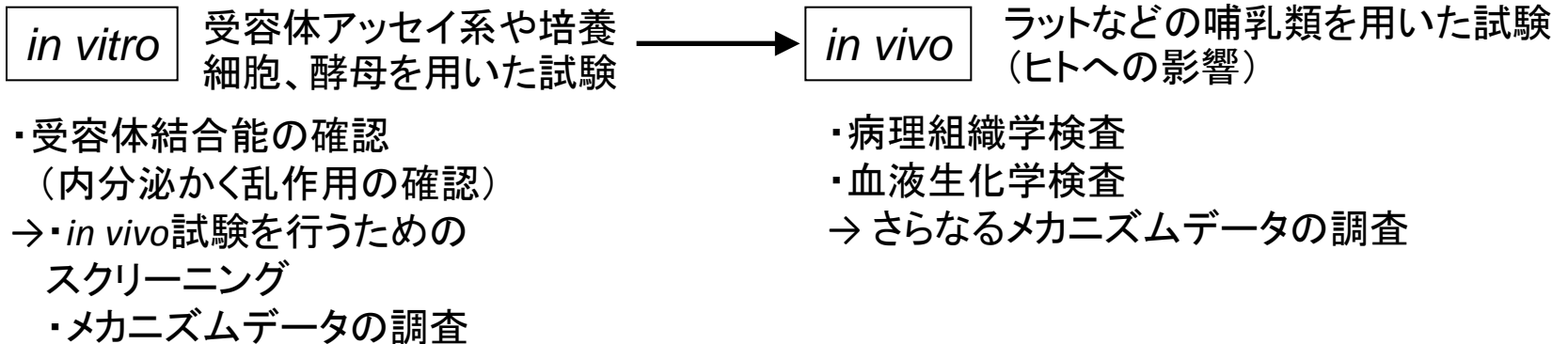
■ 内分泌かく乱物質

内分泌かく乱作用をもつ化学物質のことであり、「内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質」とされている（環境省）

■ 内分泌へのかく乱作用

- ホルモン受容体に結合することで情報伝達を促進、または阻害する
- ホルモン合成を促進、または阻害する
- ホルモン受容体数を増加、または減少させる
- 本来のホルモン量の調節（フィードバック）を阻害する

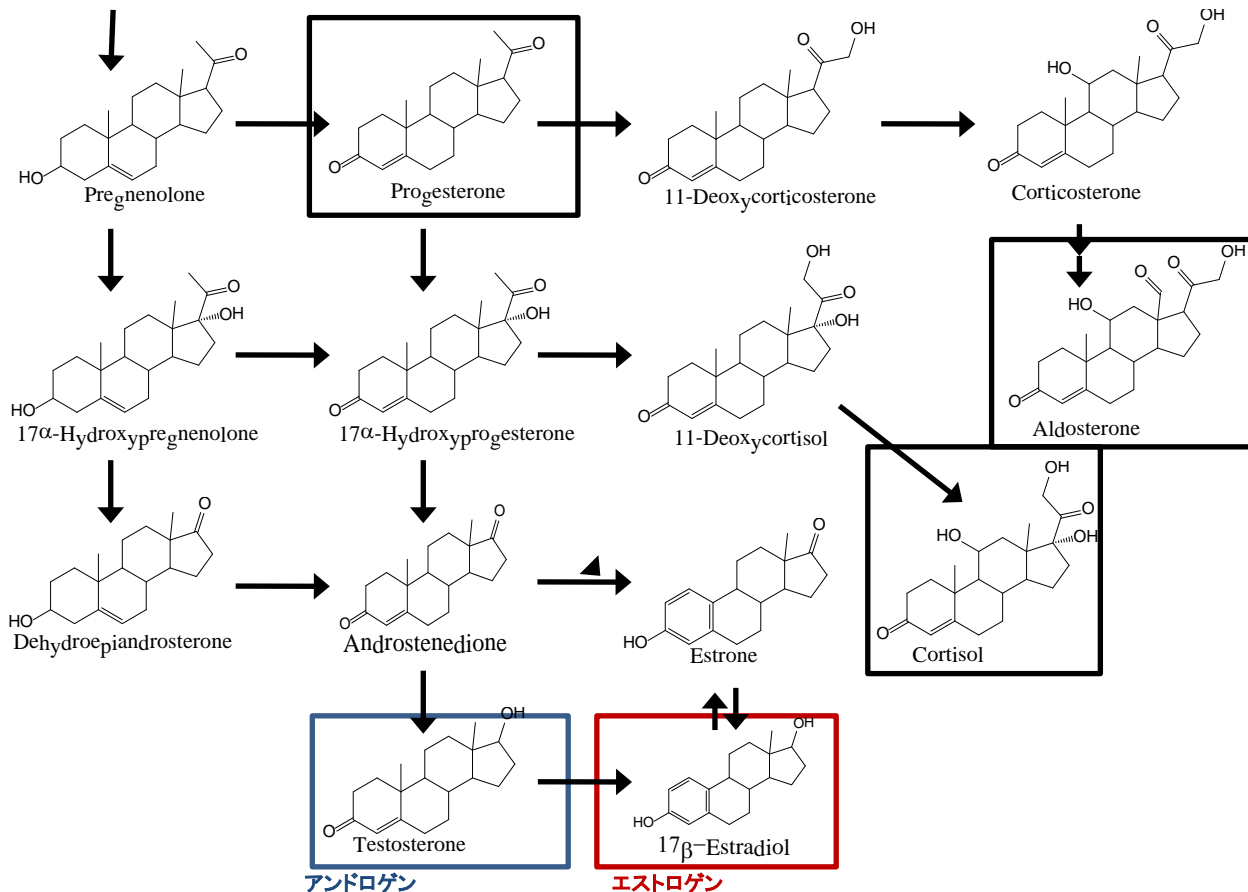
■ 内分泌かく乱作用の評価方法





ステロイドプロファイリングのメリット

Cholesterol



複数の作用点を一度に確認可能

➡ ステロイド類の包括的なプロファイリングにより、従来の評価方法では難しかった作用点の推定が可能なり、非線形形反応や低用量影響なども捕らえることができる



研究の目的

ステロイド代謝物を高精度で定量可能な分析系を構築し、
曝露と相関して変動する複数の内因性代謝物の量比
バランスに基づく(マルチマーカープロファイリング)
内分泌かく乱作用の評価系を構築する



化学物質曝露によるステロイド代謝物の変動を
指標とした 内分泌かく乱作用の *in vitro*
ハイスループット評価系を開発

コレステロールからアンドロゲンやエストロゲンに至るステロイド
合成経路代謝物を一斉プロファイリングすることで、化学物質
曝露により影響を受けたステロイド合成経路(作用点)が推定
でき、簡便で高スループットなEDのメカニズム解析が可能



ステロイド類一斉分析系の構築



培養細胞に化学物質を暴露しステロイド代謝
プロファイルの変動を調べる

- ステロイド生合成系への影響が既知の化学物質を用いて, 本評価系の有用性を検証
- 各種化学物質のクラスタリング, モデル構築



研究のストラテジ

ステロイド類一斉分析系の構築

1. 標品を用いて各種分析条件を構築
培養細胞中にある濃度まで検出できる感度
2. 標品を培養細胞に添加(スパイク)して評価
マトリックス効果の影響を検証
3. 実サンプルでの評価
 - ・内部標準物質 : Methyltestosterone
 - ・感度 : Estradiol, testosterone → 10~100pg/ml
その他のステロイド → 1ng/ml

分析対象ステロイド

Cholesterol
Pregnenolone
Progesterone
11-Deoxycorticosterone
Corticosterone
17 α -Hydroxypregnenolone
17 α -Hydroxyprogesterone
11-Deoxycortisol
Aldosterone
Dehydroepiandrosterone
Androstenedione
Estrone
Cortisol
Testosterone
17 β -Estradiol
Dihydrotestosterone
Androstenediol

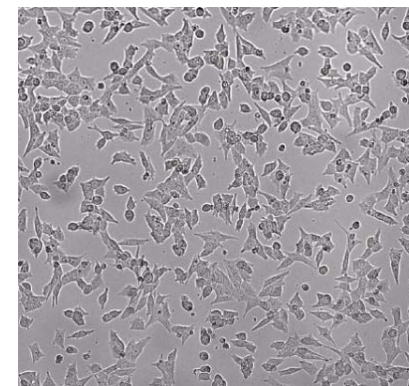


研究のストラテジ

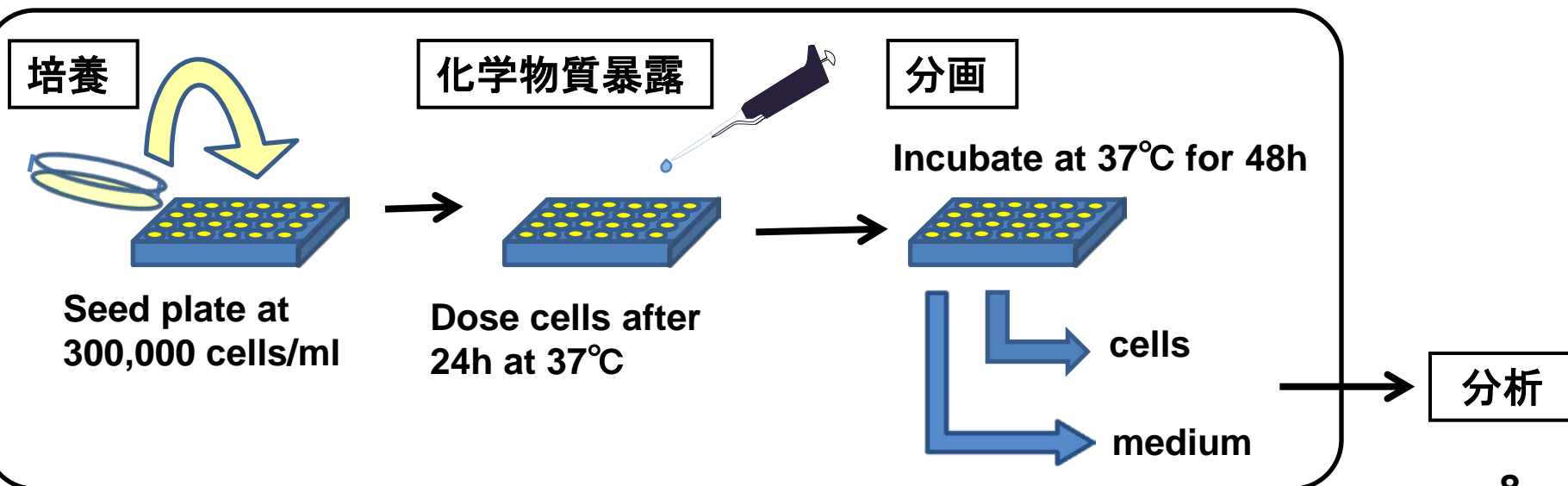
化学物質暴露培養細胞のステロイドプロファイリング

■使用細胞: H295R細胞 (ヒト副腎皮質由来)

- 副腎皮質がん細胞
- ステロイド合成経路中の酵素を所有
- OECDの内分泌かく乱物質スクリーニング試験として利用



■実験の流れ

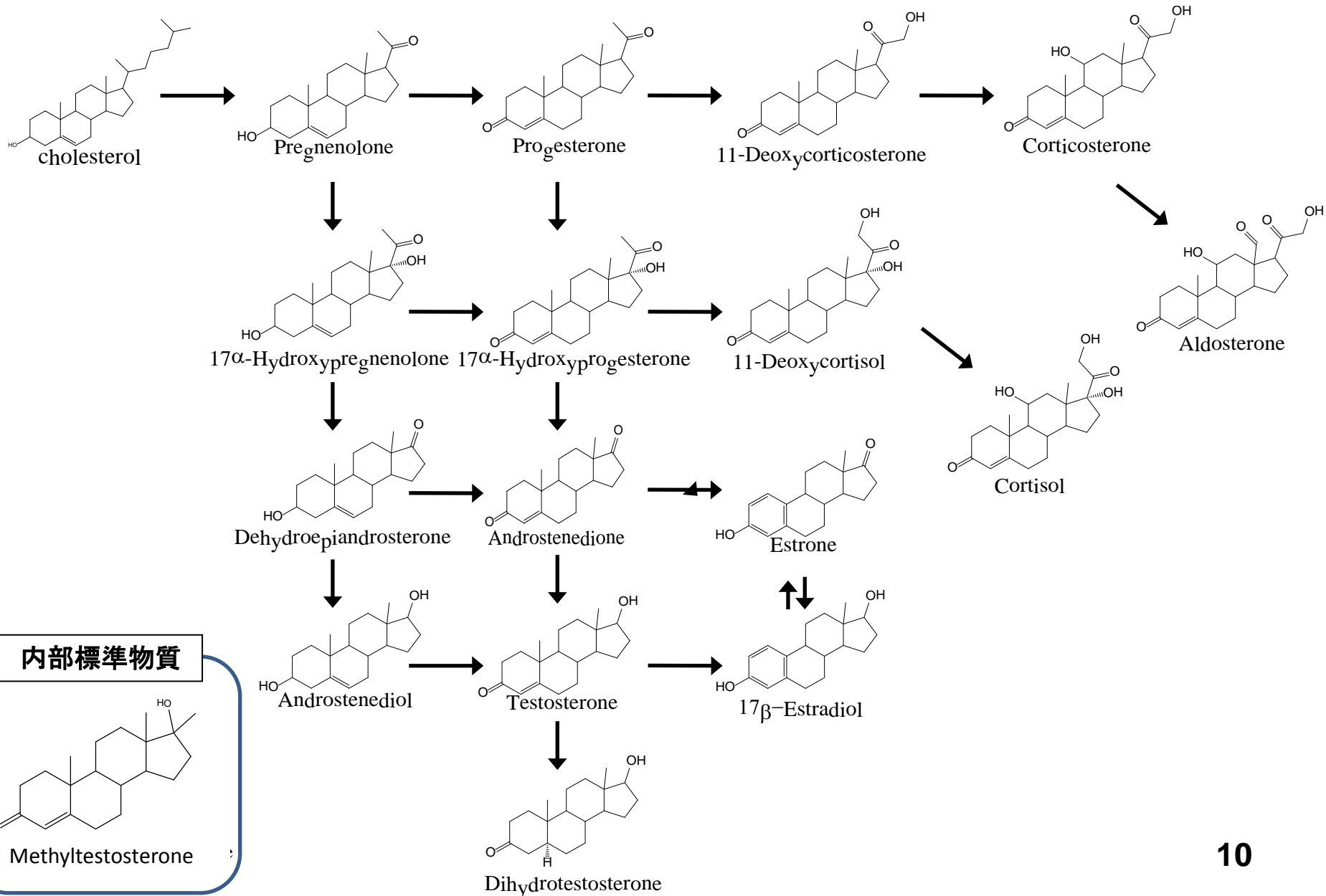




GC/MSを用いたステロイドー斉分析系 の構築



分析対象ステロイド





GC/MS/MS分析条件

誘導體化

Perトリメチルシリル化

固相抽出後、濃縮乾固させたサンプルに *N*-methyl-*N*-trifluorotrimethylsilyl acetamide / Trimethylsilyl iodide / dithioerythritol 混合液 (1000 μ L : 10 μ L : 4 mg) を20 μ L および *n*-Hexane を20 μ L 加え、65°C で35 min 反応させた

GC/MS 条件

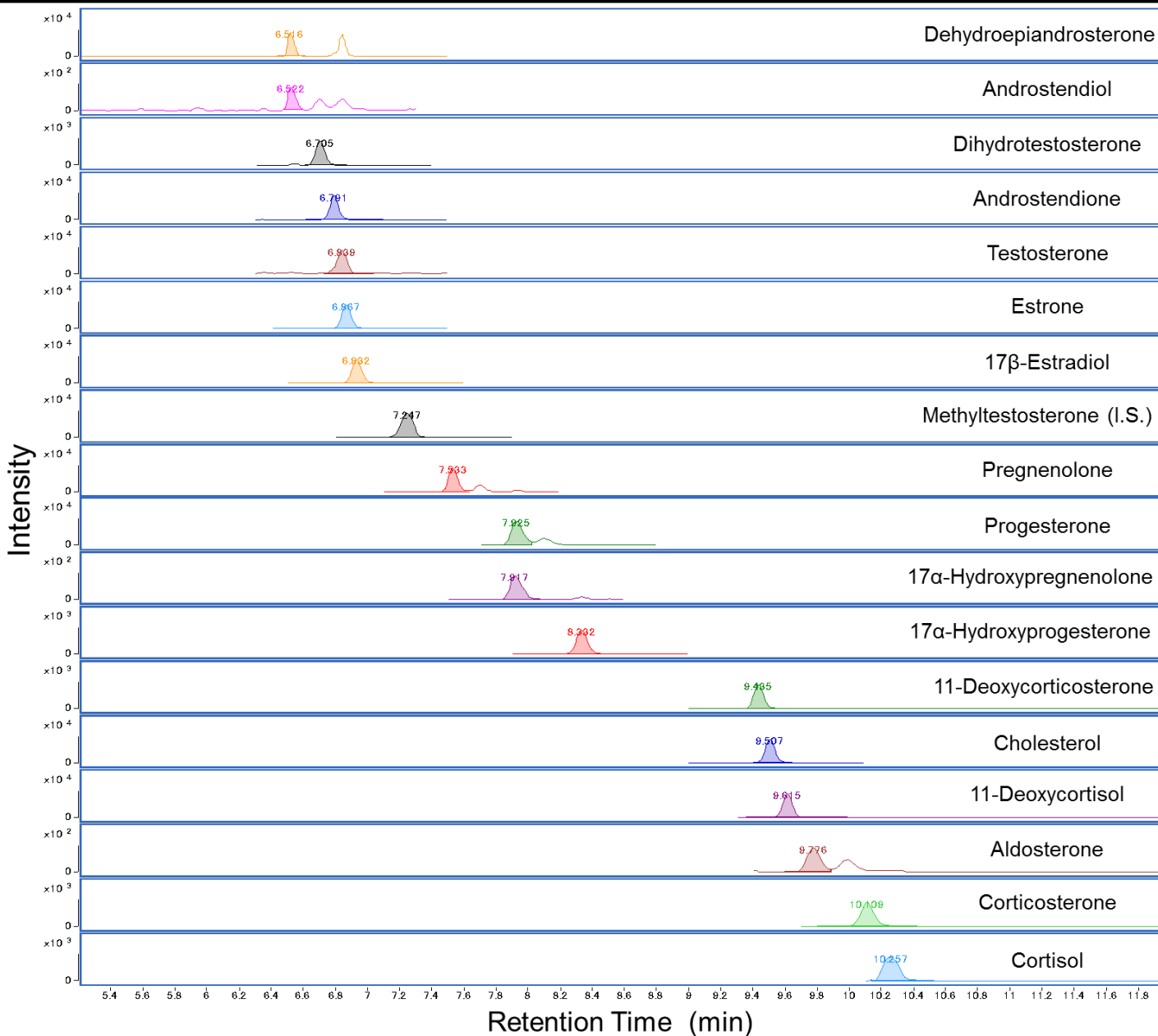
装置	Agilent 7890GC / 7000 QqQ
キャピラリカラム	CP-Sil 8CB-MS (Agilent, 30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m)
注入法	パルスドスプリットレス (25 psi, 1 min)
注入量	1 μ L
注入口温度	280°C
オープン	150°C (1min) \rightarrow 25°C/min \rightarrow 270°C \rightarrow 1°C/min \rightarrow 285°C \rightarrow 25°C/min \rightarrow 325°C (6 min)
キャリアガス	He, 1.0 mL/min, コンスタントフローモード

トランスファーライン温度	280°C
イオン源温度	230°C
四重極温度 (Q1, Q3)	150°C
Q2コリジョンガス	N ₂ , 1.50 mL/min
Q2クエンチングガス	He, 2.25 mL/min
イオン化法	EI
測定モード	MRM



ステロイド混合標準液 GC/MS/MS クロマトグラム

~ PerTMS化体, MRM ~





ステロイド混合標準液 GC/MS結果

～ PerTMS化体, MRM ～

Compounds	Retention Time (min)	MRM transition	Peak area RSD(% , n=5)	Linear range (ng/ml)	Concentration of calibration curve (ng/ml)	Coefficient of determination R ²	LOD (ng/ml)
Dehydroepiandrosterone	6.52	432 > 417	6.4	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.991	0.1
Androstendiol	6.52	434 > 329	5.1	0.1 - 33	0, 0.1, 11, 33	0.990	0.1
Dihydrotestosterone	6.71	405 > 167	21.9	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.996	0.1
Androstendione	6.79	430 > 169	11.8	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.992	0.1
Testosterone	6.84	432 > 73	3.2	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.998	0.1
Estrone	6.87	399 > 155	15.9	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.994	0.1
17β-Estradiol	6.93	416 > 285	3.7	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.997	0.1
Methyltestosterone (I.S.)	7.25	446 > 301	0.1	—	—	—	—
Pregnenolone	7.53	445 > 157	5.7	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.990	0.1
Progesterone	7.93	458 > 157	5.7	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.991	0.1
17α-Hydroxypregnenolone	7.92	548 > 143	18.3	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.996	0.1
17α-Hydroxyprogesterone	8.33	316 > 208	5.2	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.996	0.1
11-Deoxycorticosterone	9.44	301 > 169	16.6	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.998	0.1
Cholesterol	9.51	368 > 255	23.6	0.5 - 25	0, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.980	0.5
11-Deoxycortisol	9.62	544 > 73	5.4	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.998	0.1
Aldosterone	9.78	530 > 73	3.3	0.5 - 25	0, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.993	0.5
Corticosterone	10.11	404 > 208	8.9	0.1 - 25	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25	0.998	0.1
Cortisol	10.26	632 > 437	11.1	0.1 - 33	0, 0.1, 11, 33	0.990	0.1

Peak areaの繰り返し測定における標準液濃度

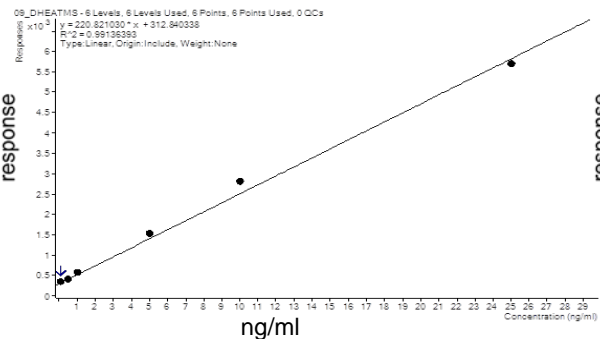
AndrostenediolおよびCortisol 11ng/mL, Methyltestosterone 27ng/mL, その他のステロイド類 0.1ng/mL



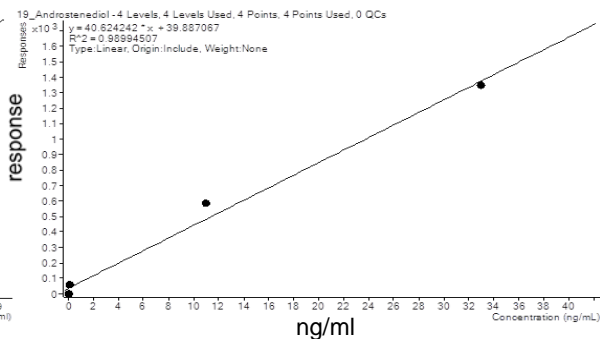
ステロイド混合標準液 GC/MS 検量線

～ PerTMS化体, MRM ～

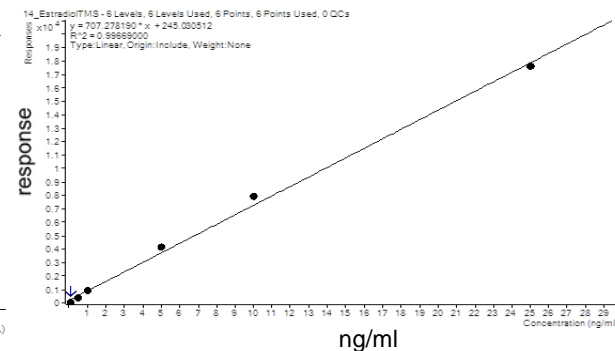
Dehydroepiandrosterone



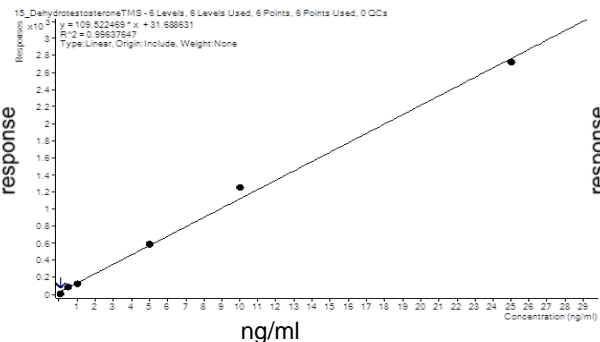
Androstenediol



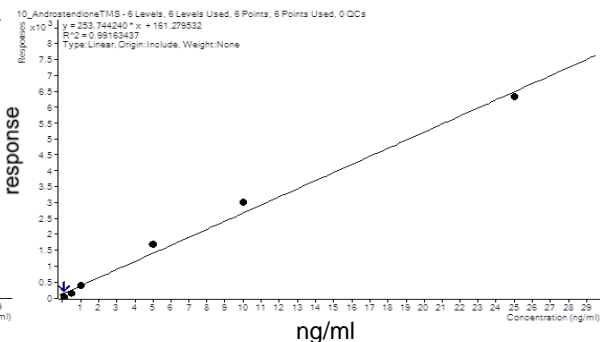
17β-Estradiol



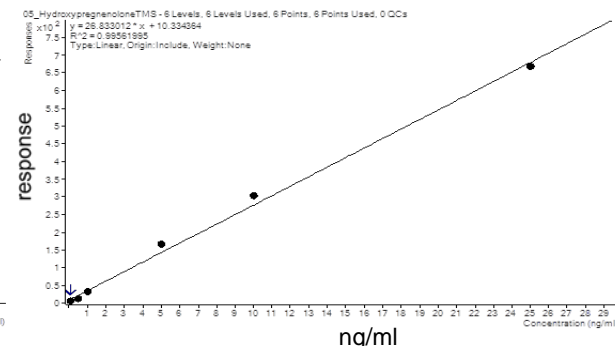
Dihydrotestosterone



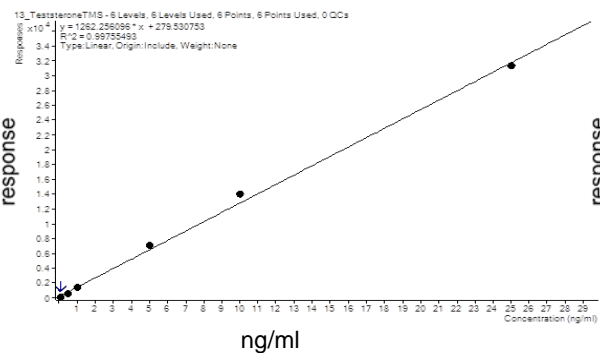
Androstendione



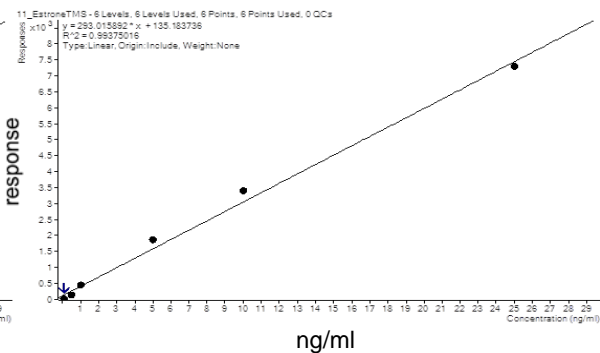
17α-Hydroxypregnenolone



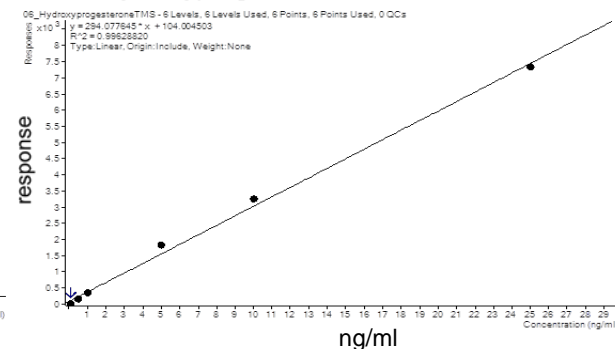
Testosterone



Estrone



17α-Hydroxyprogesterone

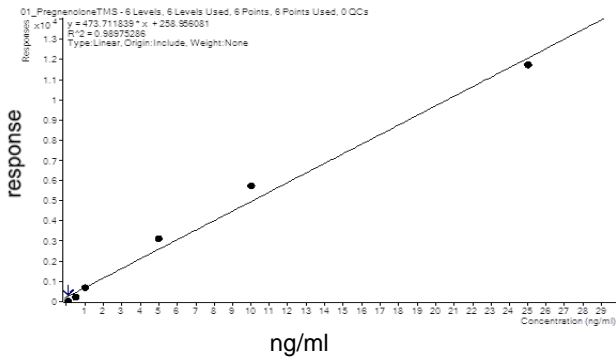




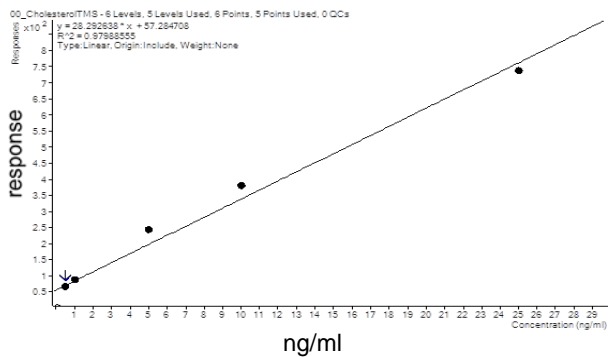
ステロイド混合標準液 GC/MS 検量線

～ PerTMS化体, MRM ～

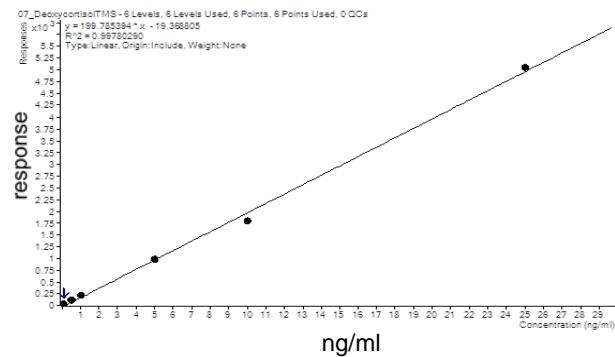
Pregnenolone



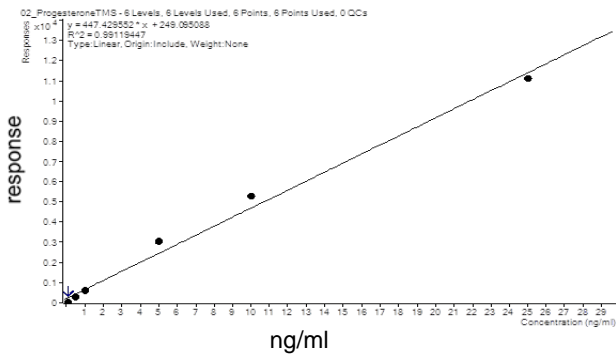
Cholesterol



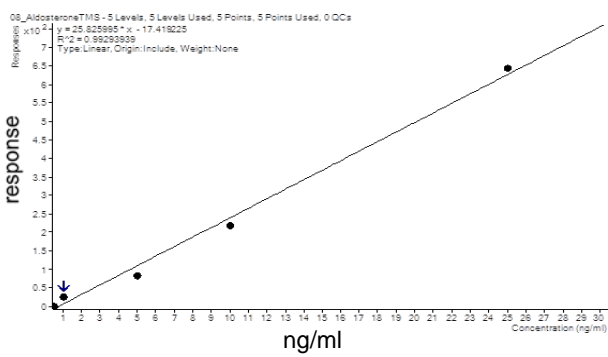
11-Deoxycortisol



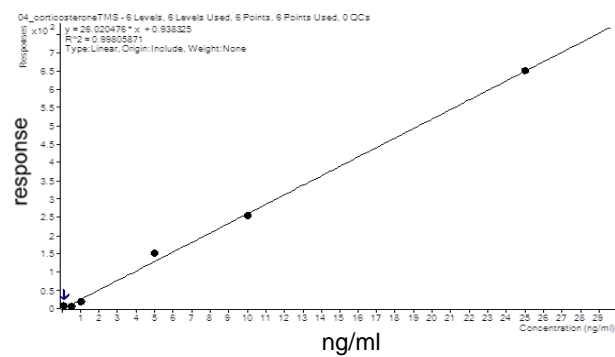
Progesterone



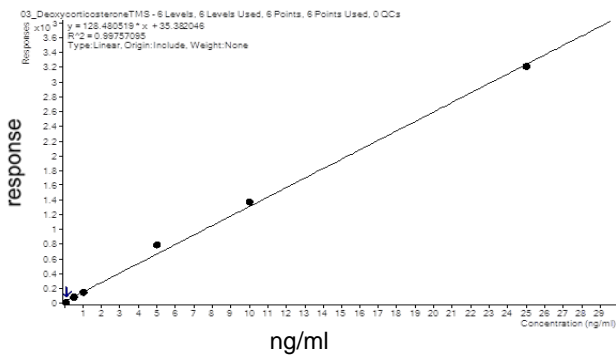
Aldosterone



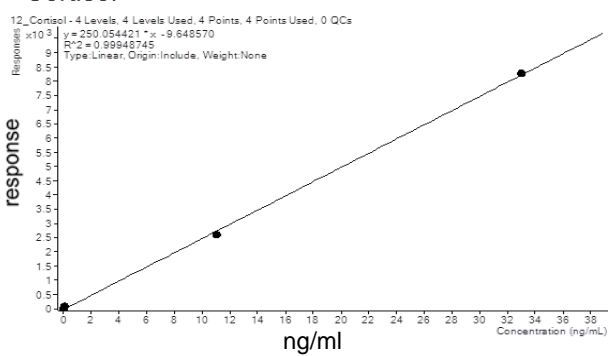
Corticosterone



11-Deoxycorticosterone



Cortisol

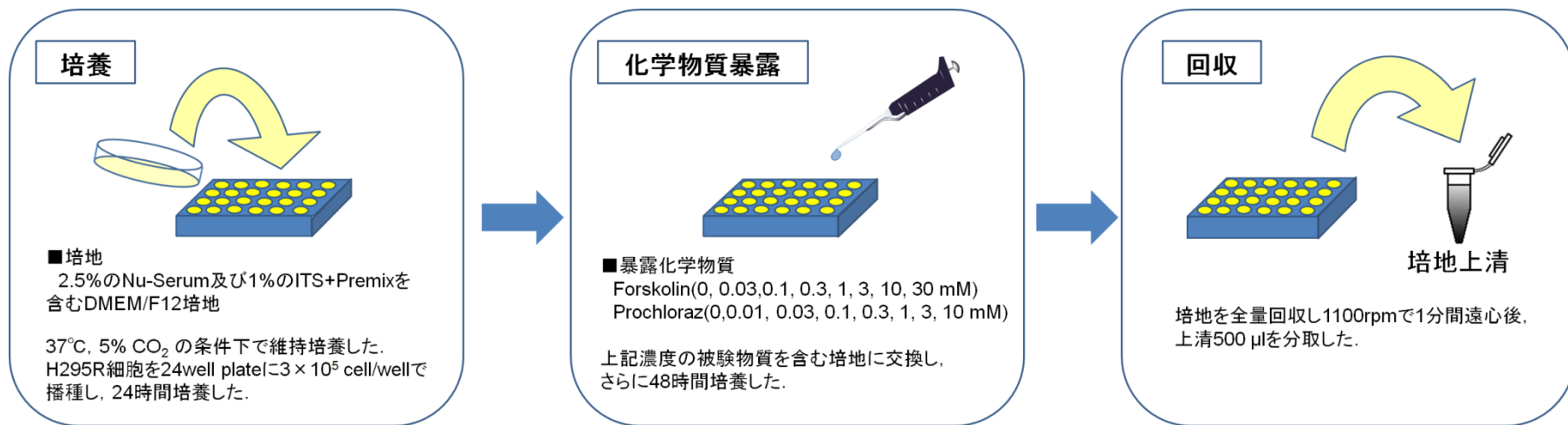




内分泌かく乱物質暴露培養細胞におけるステロイド類代謝プロファイル解析



H295R細胞における化学物質暴露



プレートで培養したH295R(ATCC No. CRL-2128)を24well plateに播種し24時間培養後各種濃度のForskolin, Prochlorazで48時間暴露させた後, 培地上清を回収した. なお, 細胞毒性試験において細胞生存率80%以上であり, 細胞毒性がないことを確認した.



培地上清の固相抽出および誘導体化

固相カートリッジ : Smart SPE HLBi5-20 (AiSTI Science)

コンディショニング

- ①超純水 1 ml
- ②メタノール 1 ml
- ③超純水 1 ml

サンプル負荷: 培地上清サンプル 500 μ l

洗浄: 超純水 1 ml

溶出: メタノール 1 ml (1滴/sec)

遠心濃縮 (1500 rpm, 2 h)

← MSTFA activated I 30 μ l
(*N*-methyl-*N*-trifluorotrimethylsilyl acetamide / Ammonium iodide / Ethanethiol 混合液)

← ピリジン 7.5 μ l

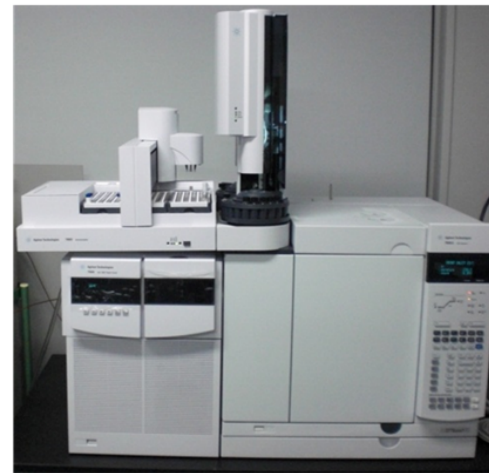
TMS誘導体化 (80°C, 500 rpm, 30 min)

GC / MS測定



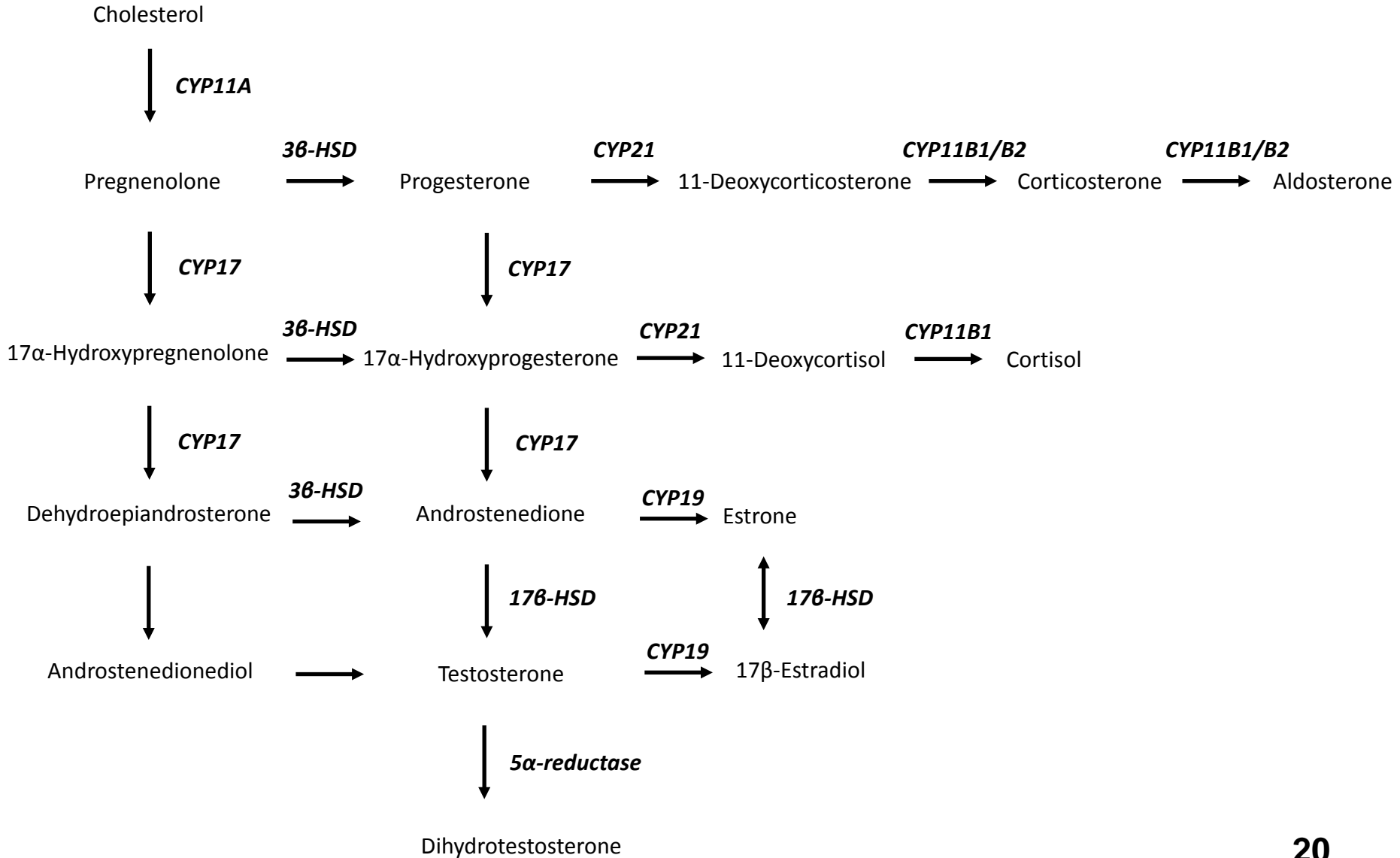
GC/MS/MS分析条件

装置	7890A GC - 7000B QqQ (Agilent Technologies)
キャピラリカラム	InertCap 5MS/Sil (GL Sciences, 30m × 0.25mm × 0.25μm)
注入法	パルスドスプリットレス (30 psi, 1 min)
注入量	1μL
注入口温度	280°C
オープン	150°C (1min) → 25°C/min → 270°C → 1°C/min → 276°C → 25°C/min → 325°C (3 min)
キャリアガス	He, 1.0 mL/min, コンスタントフローモード
トランスファーライン温度	280°C
イオン源温度	230°C
四重極温度 (Q1, Q3)	150°C
Q2コリジョンガス	N ₂ , 1.50 mL/min
Q2クエンチングガス	He, 2.25 mL/min
イオン化法	EI
測定モード	MRM

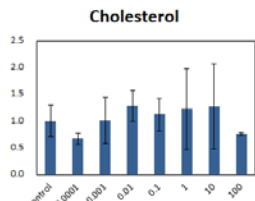




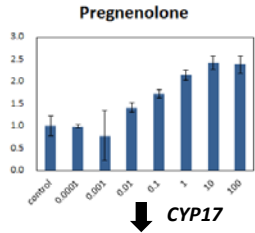
ステロイド生合成経路



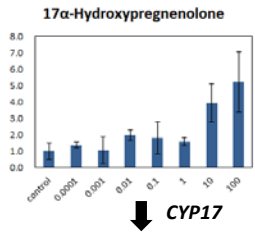
Forskolin 暴露時のステロイドの変動



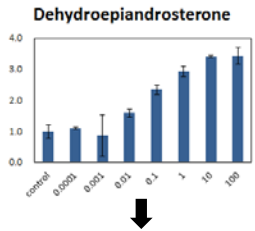
↓ CYP11A



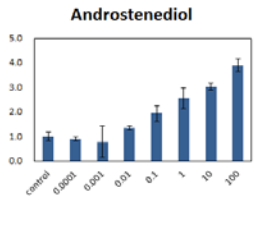
↓ CYP17



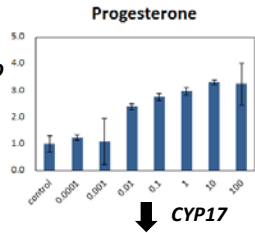
↓ CYP17



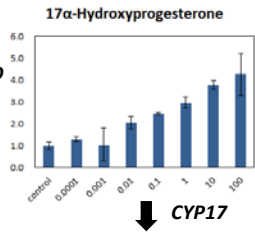
↓



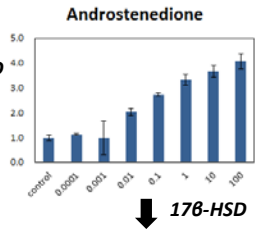
↓



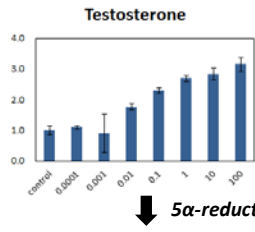
↓ CYP17



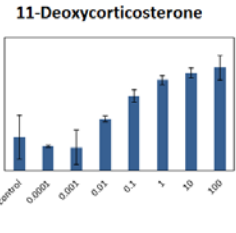
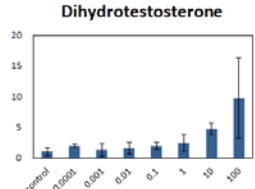
↓ CYP17



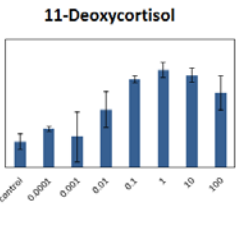
↓ 17β-HSD



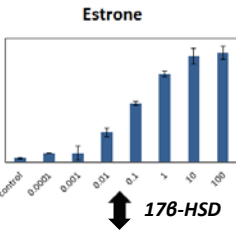
↓ 5α-reductase



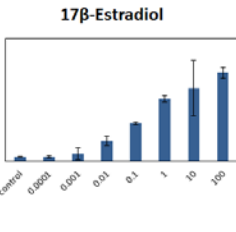
CYP21



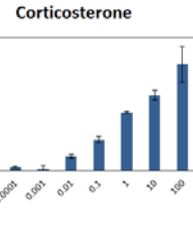
CYP21



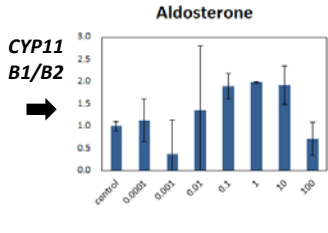
CYP19



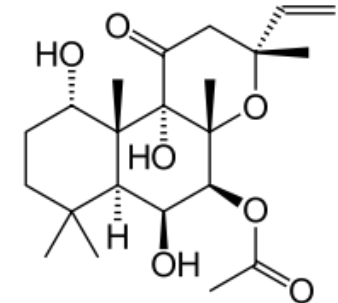
CYP19



CYP11 B1/B2



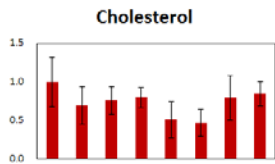
CYP11 B1/B2



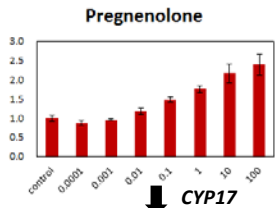
横軸: 暴露濃度 (μM)

縦軸: SC=1を基準とした濃度のFold Change 21

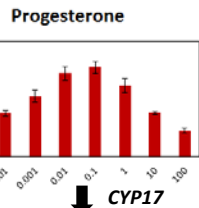
Prochloraz 暴露時のステロイドの変動



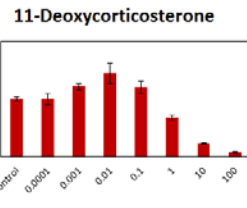
↓ CYP11A



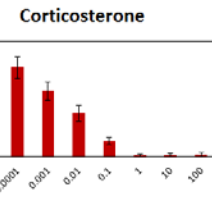
3β-HSD



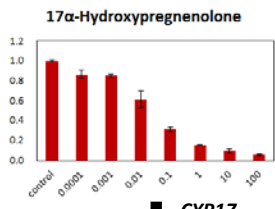
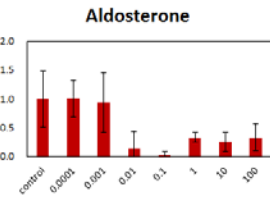
CYP21



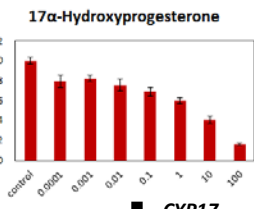
CYP11 B1/B2



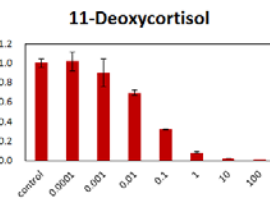
CYP11 B1/B2



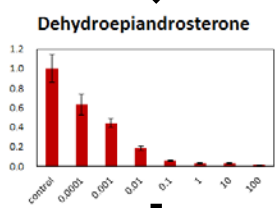
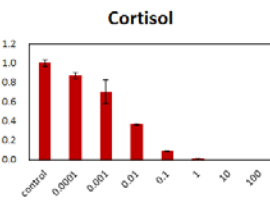
3β-HSD



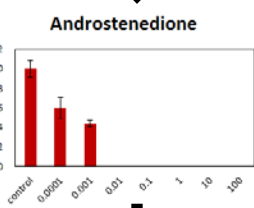
CYP21



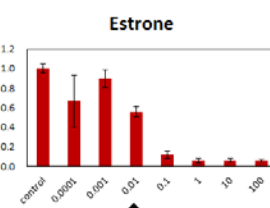
CYP11B1



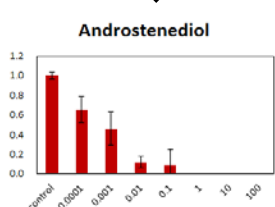
3β-HSD



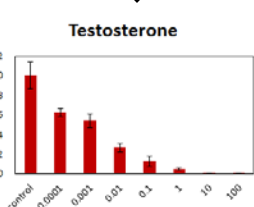
CYP19



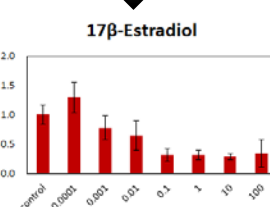
17β-HSD



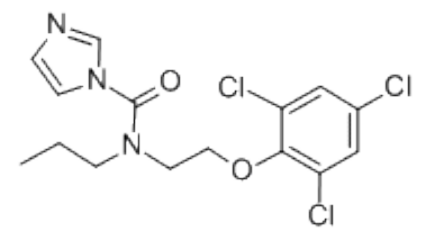
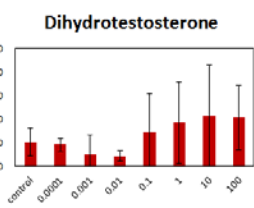
3β-HSD



CYP19



5α-reductase



横軸: 暴露濃度 (μM)
縦軸: SC=1を基準とした濃度のFold Change 22



多検体の解析に対応した ステロイドプロファイリングシステムの構築



オンラインLC-誘導体化-GC/MSシステムの開発



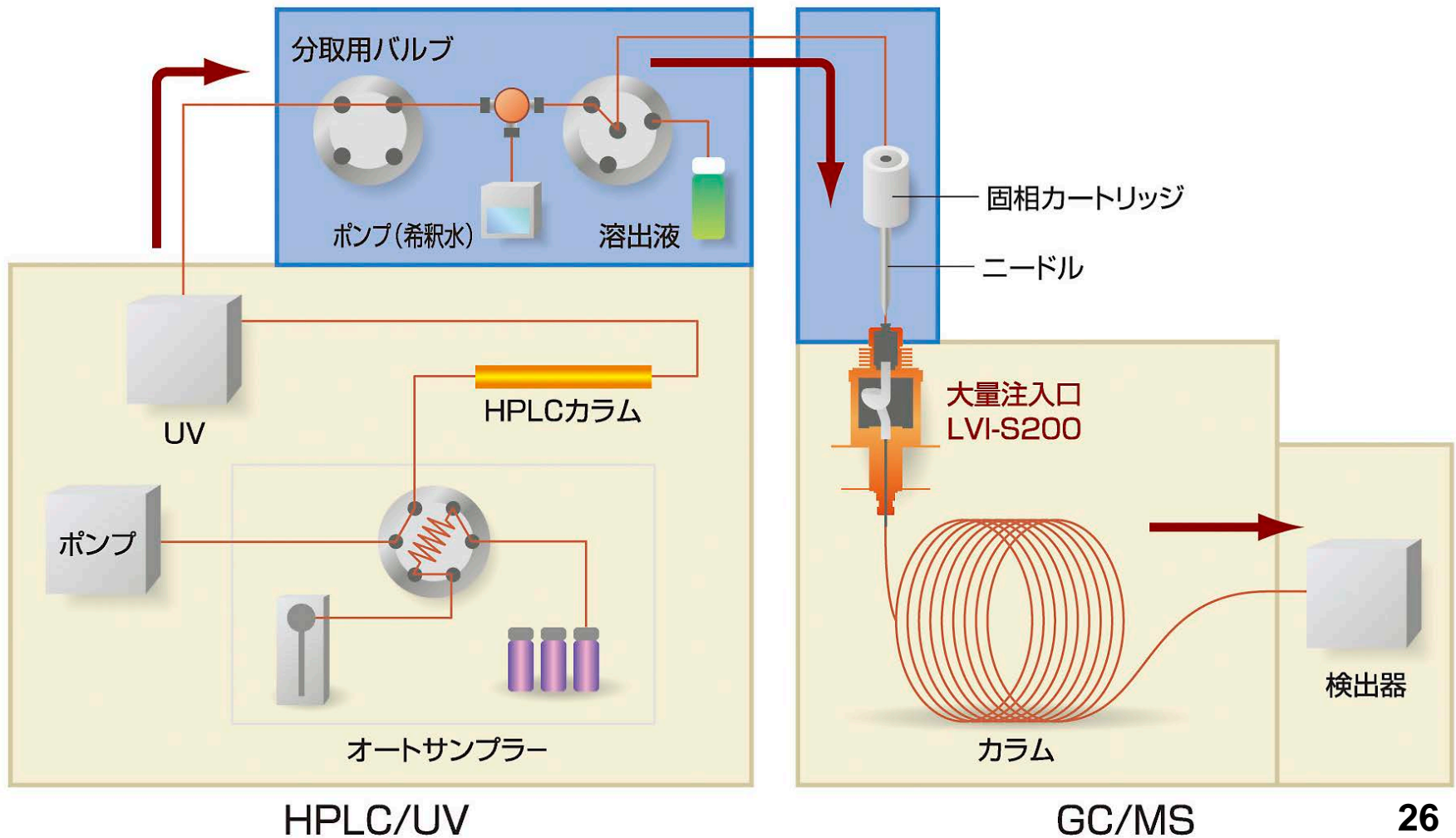
オンラインLC-GC/MSシステム





オンラインLC-GC/MSシステムフロー図

LC-GCインターフェイスLGI-200, GC注入口装置LVI-S200をUFLC-PDA, TQ8030 GC/MSに接続した

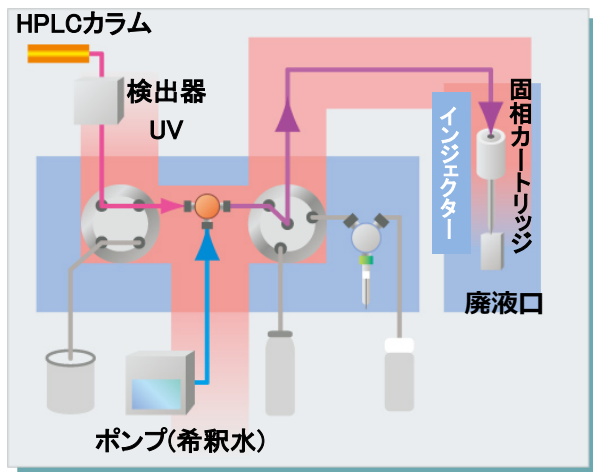




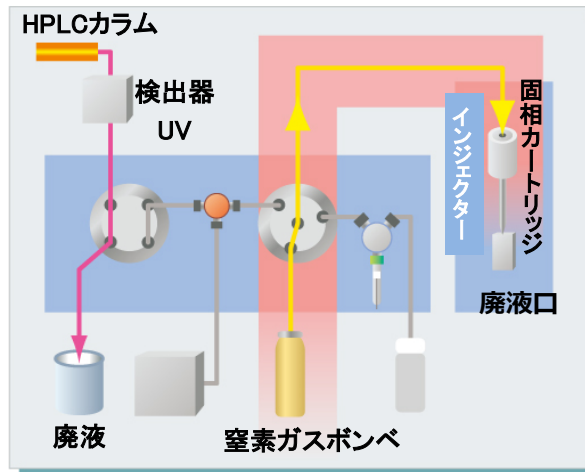
オンラインLC-GC注入プロセス

LCカラムで分離された目的成分を含む画分をGCインジェクターに取り付けた固相カートリッジに保持させる。

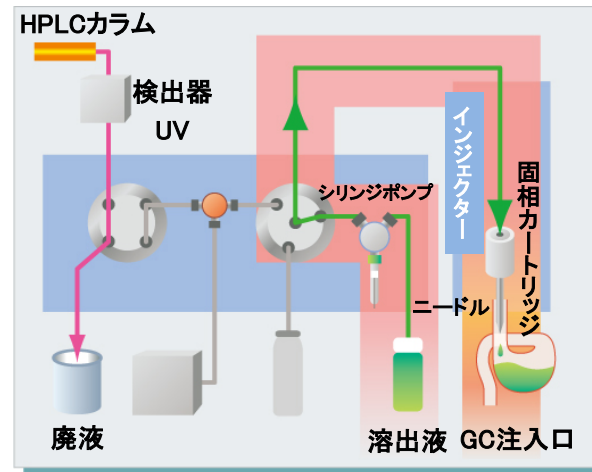
固相を窒素ガスにより乾燥させた後、目的成分を誘導体化試薬を含有する溶液でGC注入口へ溶出し、注入口のインサートライナー内で誘導体化させGC分析カラムへ導入する。全行程はLGI-S200のコントロールソフトで制御され、自動で行われる。



① LC分取 & 固相に保持



② 固相の乾燥

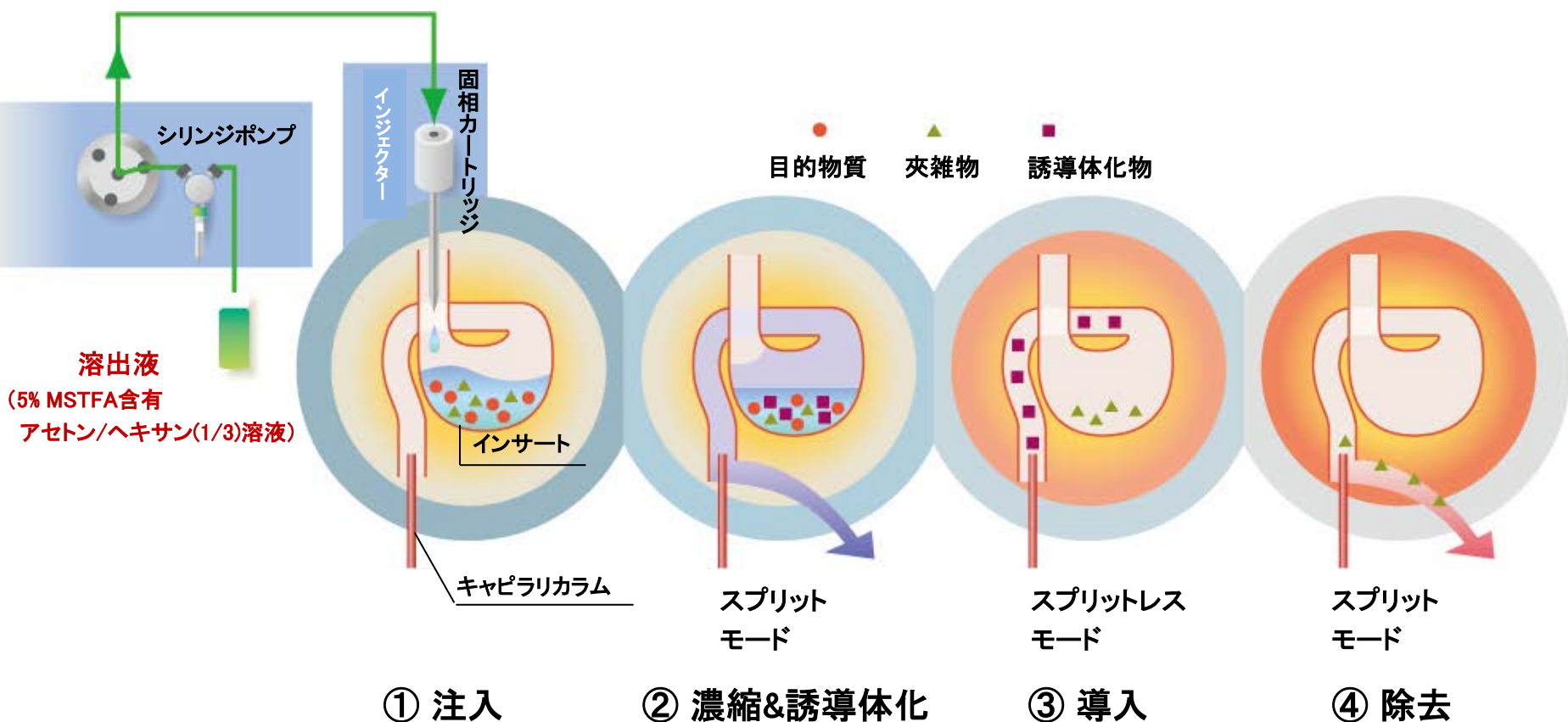


③ 固相から溶出 & GCに注入



GC注入口における濃縮および誘導体化

GC注入口インサートライナー中での濃縮および誘導体化, 導入は急速な昇降温度プログラムが可能なGC注入口装置LVI-S200部で制御される.





オンラインLC-GC誘導体化注入法による 17 β -エストラジオールおよびテストステロンの分析条件

HPLC (Prominence ; Shimadzu)

Injection: 50 μ L

Column: 3.0 mm i.d. \times 100 mm Inertsil ODS-3

Solvents: A: water B: Acetonitrile

flow rate: 0.5 mL/min

Gradient(B%) : 0min(40%)–9min(40%)–12min(90%)–14min(90%)

Detector: UV 210 nm

Interface LC-GC (LGI-S110; AiSTI)

SPE: 2 mm i.d. \times 10 mm C18

Diluting: water 0.5 mL/min

Purge: N₂ gas, 3 min

Elution: 5% MSTFA acetone/*n*-hexane(1/3), 50 μ L

Interface Injector (LVI-S200; AiSTI)

Insert: Spiral Insert

Solvent Vent: 0.60min, Purge flow 150 mL/min

Splitless: 4 min

Inj. Temp.: 70°C(0.6min)–120°C/min–290°C(15min)

GC/MS (TQ8030 GC/MS; Shimadzu)

Column: 0.25 mm i.d. \times 30 m, df 0.25 μ m InertCap Sil

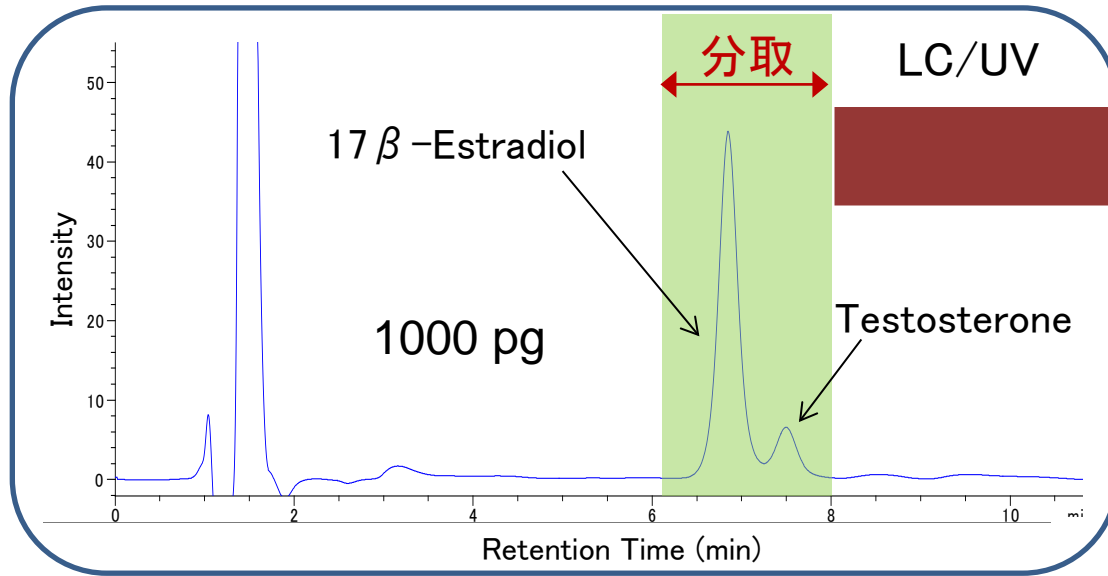
Oven: 60°C(4min)–20°C/min–300°C(3min)

Carr. gas: He, 1 mL/min

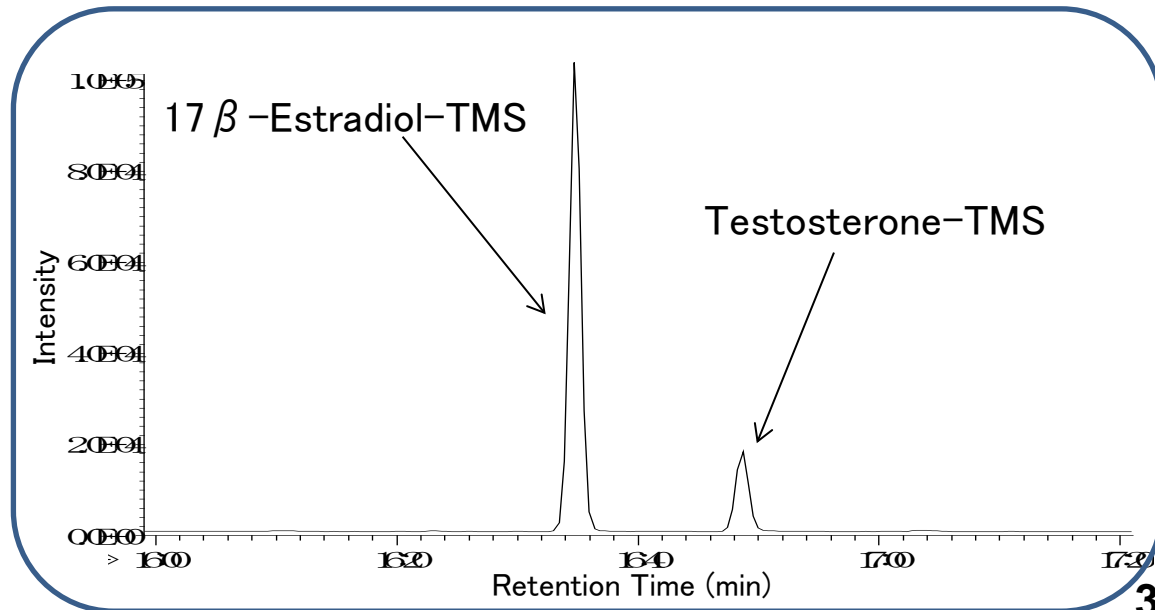
MS: MRM



オンラインLC-GC誘導体化注入法による 17 β -エストラジオールおよびテストステロンの測定



GC/MS



	RSD(%)	REC(%)
17 β -Estradiol-TMS	1.26	80.6
Testosterone-TMS	0.58	82.0



オンラインLC-誘導体化-GC/MSシステムの 実サンプルへの応用



培地上清の固相抽出および誘導体化の流れ

固相抽出-TMS化-GC/MS法

LC-GC/MS法

固相カートリッジ : Smart SPE HLBi5-20 (AiSTI Science)

培地上清サンプルをアセトニトリルで希釈
内部標準を添加

コンディショニング

- ①超純水 1 mL
- ← ②メタノール 1 mL
- ③超純水 1 mL

サンプル負荷 : 培地上清サンプル 500 μ L

洗浄 : 超純水 1 mL

溶出 : メタノール 1 mL (1滴/sec)

遠心濃縮 (1500 rpm, 2 h)

← MSTFA activated I 30 μ L
(*N*-methyl-*N*-trifluorotrimethylsilyl acetamide / Ammonium iodide / Ethanethritol 混合液)

← ピリジン7.5 μ L

TMS誘導体化 (80°C, 500 rpm, 30 min)

GC/MS/MS測定

4時間/検体

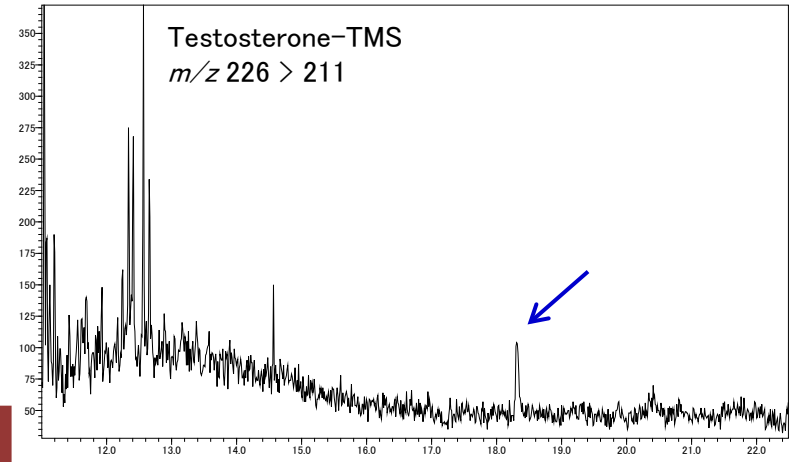
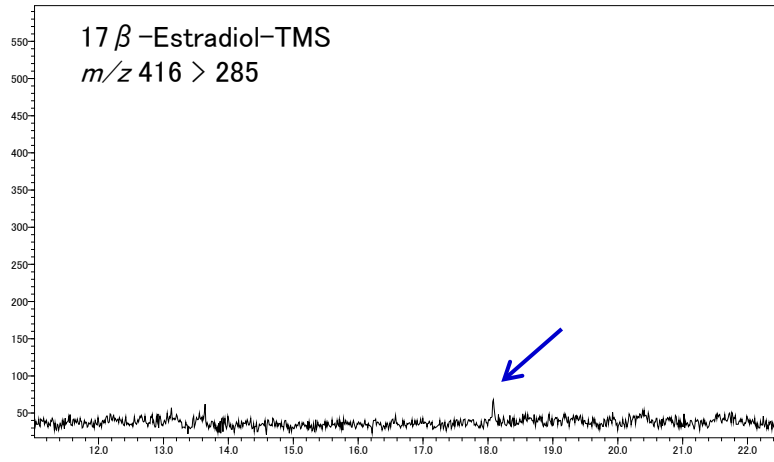
LC-GC/MS/MS測定

1時間/検体

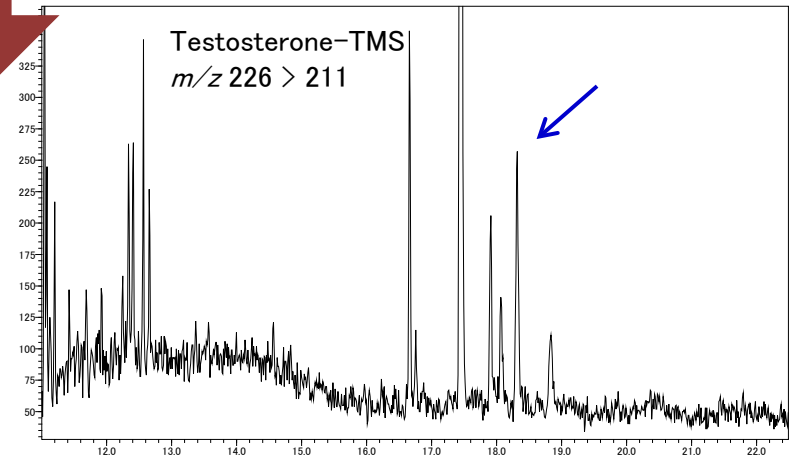
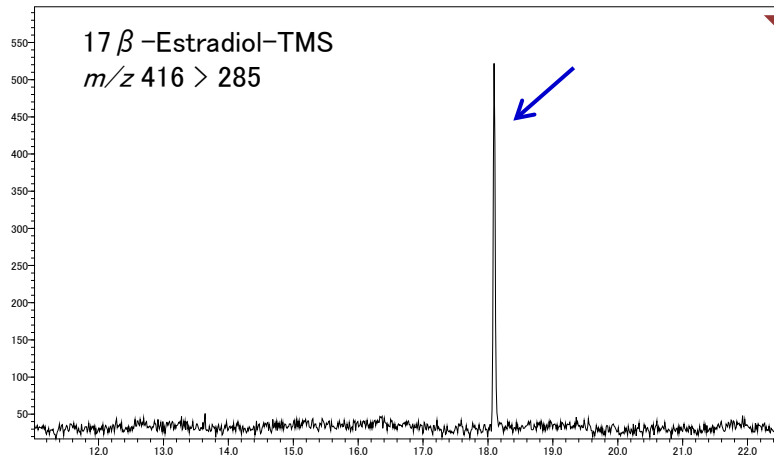


オンラインLC-GC誘導体化注入法による 培地上清の測定

DMSOのみ暴露した培地上清



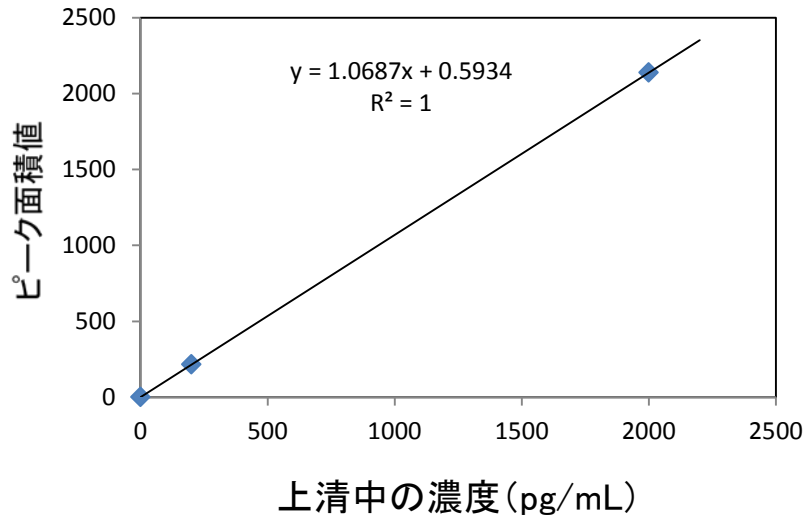
Forskolin を10 μ M暴露した培地上清



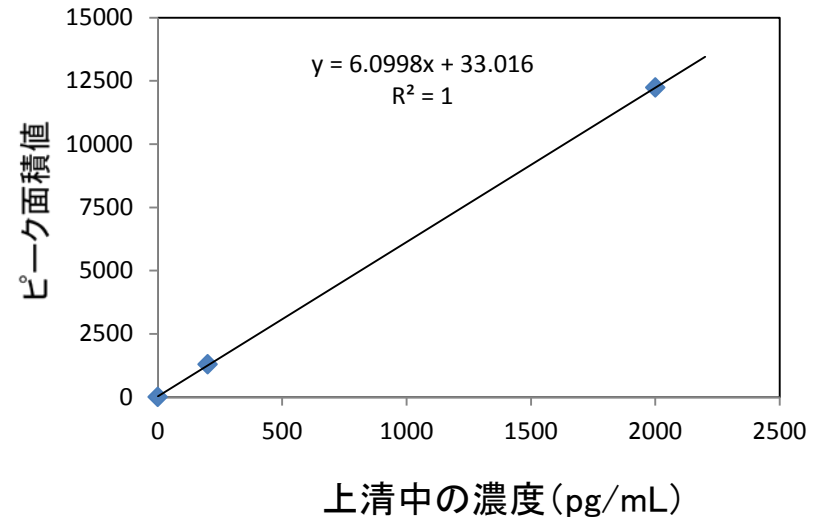


オンラインLC-GC誘導体化注入法を用いた検量線

17β-Estradiol



Testosterone

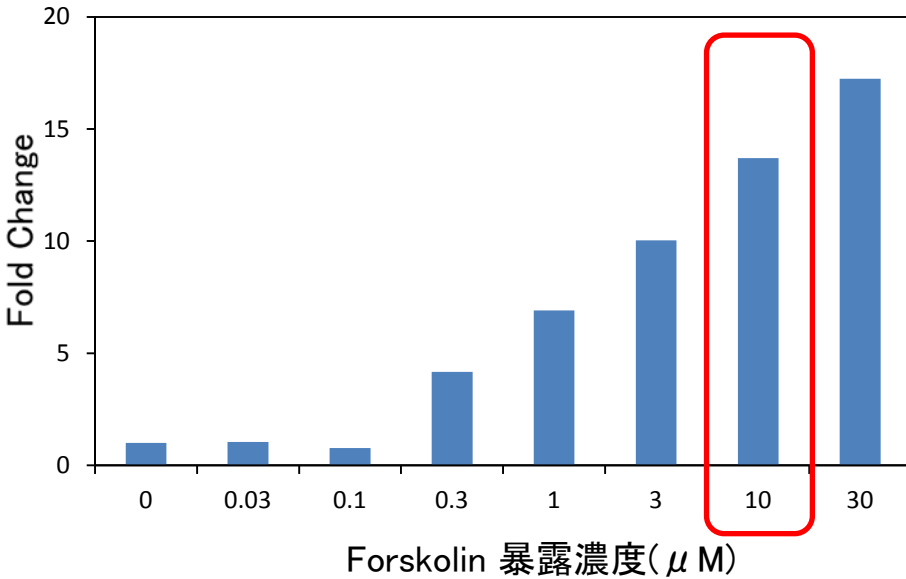


濃度を調製した混合標準液を測定し、検量線を作成した。
直線性は良好であり、これらの検量線をサンプル濃度の定量に用いた。



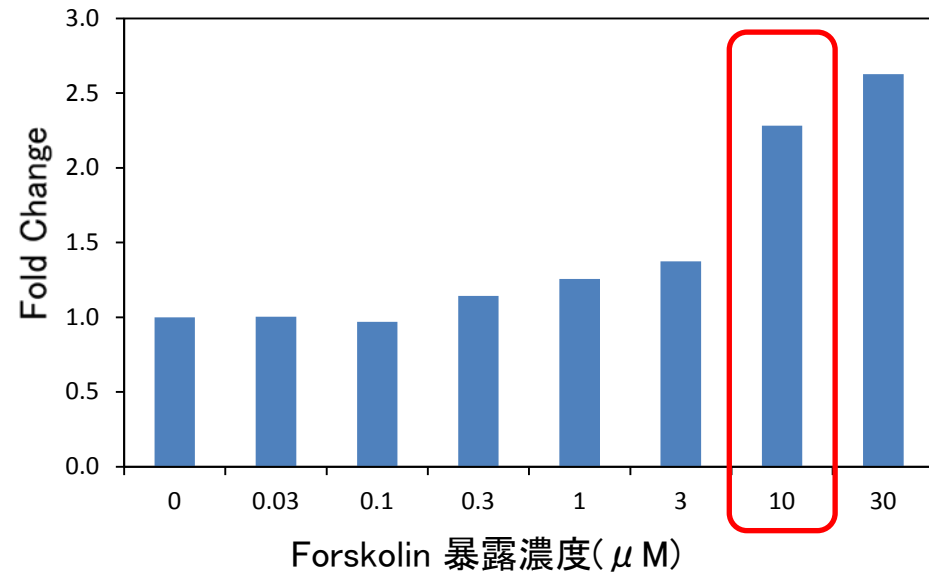
化学物質暴露によるステロイド量の変化 (Forskolin)

17 β -Estradiol



固相抽出法 FC=17.8
本法 FC=13.7

Testosterone



固相抽出法 FC=2.8
本法 FC=2.3

OECD TG 456の実験基準を満たした

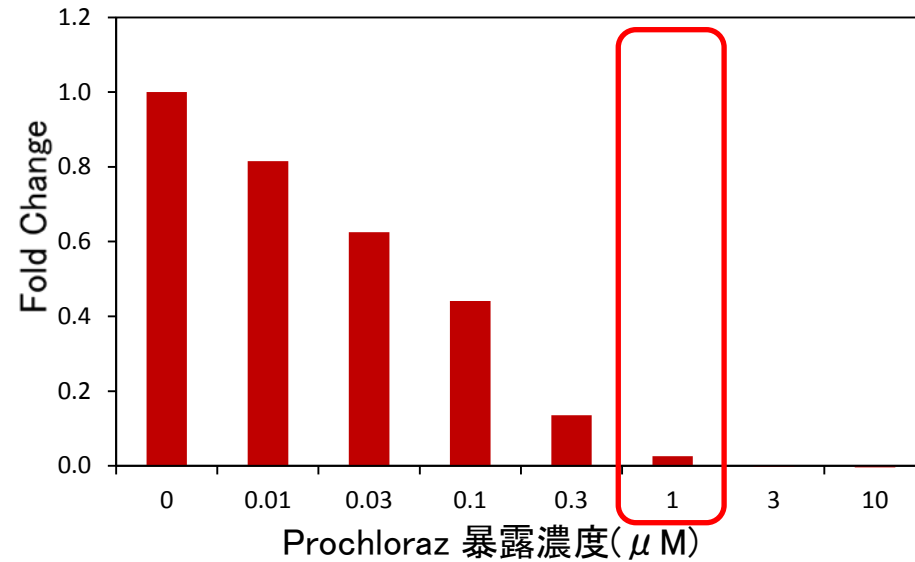
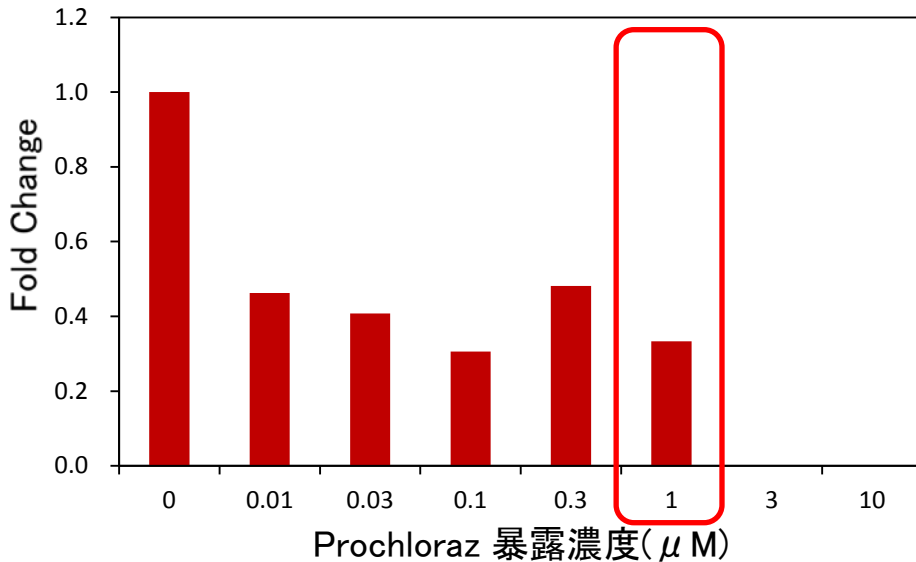
「10 μ M Forskolin暴露時の17 β -EstradiolはSCの7.5倍以上, TestosteroneはSCの1.5倍以上」



化学物質暴露によるステロイド量の変化 (Prochloraz)

17 β -Estradiol

Testosterone



固相抽出法 FC=0.31
本法 FC=0.33

固相抽出法 FC=0.05
本法 FC=0.03

OECD TG 456の実験基準を満たした
「1 μ M Prochloraz暴露時の17 β -Estradiol, TestosteroneともにSCの0.5倍以下」