

## 胎盤・臍帯を生体試料とした重金属・微量元素の同時多元素分析法の開発

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
分担研究者	和泉俊一郎	東海大学 医学部専門診療学系産婦人科
研究協力者	藤田 裕子	国立成育医療センター研究所
	田上 昭人	国立成育医療センター研究所
	内田 能安	東海大学 医学部専門診療学系産婦人科
	呉屋 憲一	東海大学 医学部専門診療学系産婦人科
	池田 仁恵	東海大学 医学部専門診療学系産婦人科
	近藤 文雄	愛知県衛生研究所
	林 留美子	愛知県衛生研究所
	猪飼 誉友	愛知県衛生研究所

### 研究要旨

児の重金属汚染の実態を評価するために、まず周産期における胎児期に着目し、臍帯および胎盤組織を生体試料として用いる分析システムを構築する事を目的として研究を行った。誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を分析測定方法として導入し、本年度は臍帯・胎盤の溶解方法の検討に主力を注いだ。検討により、マイクロウェーブによる溶解法が最も組織を完全に溶解することが判明した。

### A. 研究目的

重金属による環境汚染は、かつて深刻な公害病を引き起こしたため、人体への毒性や曝露源などが国内外でよく研究されており、耐用摂取量も制定されている。しかしながら、重金属は成人のみならず、胎児性水俣病に代表されるように、妊娠中に胎盤を通過し胎児にも被害をもたらすことが報告されており、感受性が成人とは異なる胎児や小児への被害を防ぐため、これまでの基準値を見直さなければならない、との声も上がっている。米国では水銀による小児の神経発達遅延の被害が生産性の低下などにもつながり、年間 87 億ドルの経済的損失を招いていると推定されている。このようなことから、早急に周産期の重金属曝露の実態を明らかにし、妊婦や小児に対して曝露源と考えられる飲料水や食品などの基準値を見直す必要がある。

しかしながらこれまで重金属測定のための生体試料として用いられている毛髪などのサンプルを新生児から採取することは困難であることから、本研究では重金属の周産期曝露量を高精度かつ簡便に測定する方法を構築することを目的として、通常は出産後、医療廃棄物として廃棄される「臍帯および胎盤」を利用して周産期の重金属汚染を評価するシステムを構築することを本年度の目的とした。重金属の高感度分析を行うため、広いダイナミックレンジを持ち多元素同時分析が可能な誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を導入し、その分析方法の開発を試みた。

### B. 研究方法

#### B-1 試料の採取

試料は東海大学医学部で、十分なインフォームドコンセント（IC）のもとに文書による同意を得

て採取された臍帯・胎盤を用いた。試料は分娩後、マイナス 20℃で凍結保存し、分析の前処理直前に解凍して使用した。尚、本研究の骨子並びに IC の実際的方法等については、既に医学部内の倫理委員会において許可を得ている。

#### B-2 装置

ICP-MSは横河アナリティカル社製HP-4500を使用した。プラズマ条件および測定条件は Table. 1 に示した。マイクロウェーブによる試料前処理には、ACTAC 社製スピードウェーブ MWS-2 を使用した。

#### B-3 試薬および標準液の調整

標準溶液には、SPEX 社製混合標準液 XSTC-469（5%硝酸ベース）を用いた。内標準液は同社製混合内標液 XSTC-538 を用いた。試料の希釈等には、ミリポア社製 MilliQ SP（電気伝導度 18.3Ω）で精製したものを使用した。試料前処理に使用するアルカリ溶液として和光純薬工業社製の精密分析用 25%テトラメチルアンモニウム-ヒドロキシド溶液を、酸溶液として関東化学工業社製の超高純度硝酸を用いた。また、同硝酸溶液は使用器具の洗浄にも用いた。

#### B-4 測定対象元素および内標元素

測定対象元素およびそれぞれの元素の内標元素は Table. 2 に示した。

#### B-5 試料の前処理

それぞれの試料は解凍後、約 2cm の組織片に細切したものを 1 サンプルとした。各サンプルの重量を測定し、80℃の恒温インキュベータ内で重量の変化がなくなるまで乾燥させた。試料の溶解にはマイクロウェーブ分解法、硝酸分解法、アルカリ分解法をそれぞれ行った。それぞれの前処理法の詳細は Figure. 1 に示した。

#### B-6 添加回収試験

それぞれの測定元素における添加回収試験を

超純水を用いて行った。超純水に標準溶液を1/1000に希釈して加えた。回収率は  $\text{回収率} = \frac{\text{添加試料の測定濃度}}{\text{添加濃度}} \times 100$  の式で計算した。

## C, D. 研究結果 及び 考察

### C-1 試料の前処理法における検討

臍帯組織の乾燥による重量変化を Figure. 2 に示した。約2cmの組織片に細切した臍帯は80°Cで5時間の乾燥でほぼ恒量に達したことから、以降の分析はこの乾燥方法を用いて行った。

乾燥した臍帯試料を ICP-MS に導入し測定するためには、試料を酸・アルカリなどで溶液化しなければならない。そこで、①酸によるホットプレート分解法、②アルカリによるホットプレート分解法、③マイクロウェーブ分解法、の3種の方法を用いて適切な前処理法の検討を行った。

マイクロウェーブ分解法では、最も短時間で試料を完全に溶解することが出来た。酸およびアルカリによるホットプレート分解法では概ね全ての組織を溶解することが出来たが、組織片の残りが若干観察された。これらの結果からマイクロウェーブ分解法は臍帯・胎盤組織の溶解に最も適していると考えられるが、処理過程での温度上昇中に沸騰による揮発性元素の損失の恐れもあるため、さらに条件検討を行う必要がある。また、酸およびアルカリによるホットプレート分解法は、マイクロウェーブ分解法で用いた特殊な設備を必要としないため、簡便な分解法として期待される。しかしながら、これらの方法を用いた場合、組織片の残りが試料導入部のペリスタリックポンプに詰まりを生じさせるおそれがあるため、フィルター処理が必要であると考えられた。今後、これらの方法で溶液化した試料はマトリクスの影響、測定試料の pH 等を考慮して測定条件を決定しなければならない。

### C-2 検量線濃度の検討

検量線は、混合標準液を希釈し、1000、500、100 倍に希釈した。各元素の標準液中濃度を Table. 3 に示した。この広い濃度範囲で、全ての測定元素で良好な直線性が得られた (Figure. 3)。今回は検量線濃度を決定するため、5%硝酸水溶液ベースで検討を行ったが、今後、生体試料の分析にこれらが反映されるかの検証が必要である。

### C-3 添加回収試験

各測定元素の添加回収試験結果を Figure. 4 に示した。各元素で約120から140%の回収率が得られた。今後これらの元素を生体試料においても同時測定することが可能かどうかの検証が必要である。

## E. 結論

周産期の重金属曝露量を測定する生体試料と

して、通常、医療廃棄物として廃棄される「臍帯・胎盤」を利用するシステムを構築するために、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) による分析方法を検討した。本年度は主に試料を ICP-MS に導入するため溶液化する前処理方法の比較、検討を行った。比較した3つの方法のうちマイクロウェーブを用いた分解方法が、最も短時間で試料が完全溶解したが、簡便なプロトコールを構築するため、マイクロウェーブのような特殊な機器を使用しない他の方法についても、今後は更に検討の余地が残ると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

該当なし

## H. 知的所有権の取得状況

該当なし

■Table 1. ICP-MS プラズマ条件および測定条件

ICP-MS : 横川アナリティカル社製 HP4500
RF パワー : 1400W
プラズマガス (Ar) 流量 : 15L/min
キャリアガス (Ar) 流量 : 1.25L/min
サンプリング位置 : 8mm
ネブライザ : バビントンネブライザ
試料導入: オートサンプラ使用
測定ポイント数 : 3
繰り返し回数 : 3 回
積分時間 : 0.1
測定方法 : 絶対検量線法 (内部標準補正)

■Table 2. 測定元素および内標準元素

測定元素	Mass number	内標準元素	Mass number
Al	27	Co	59
Cr	52	Co	59
Ni	60	Co	59
As	75	Y	89
Cd	111	Te	125
Sb	121	Te	125
Pb	208	Tl	205
U	238	Tl	205

■Figure 1. 試料の前処理フロー図

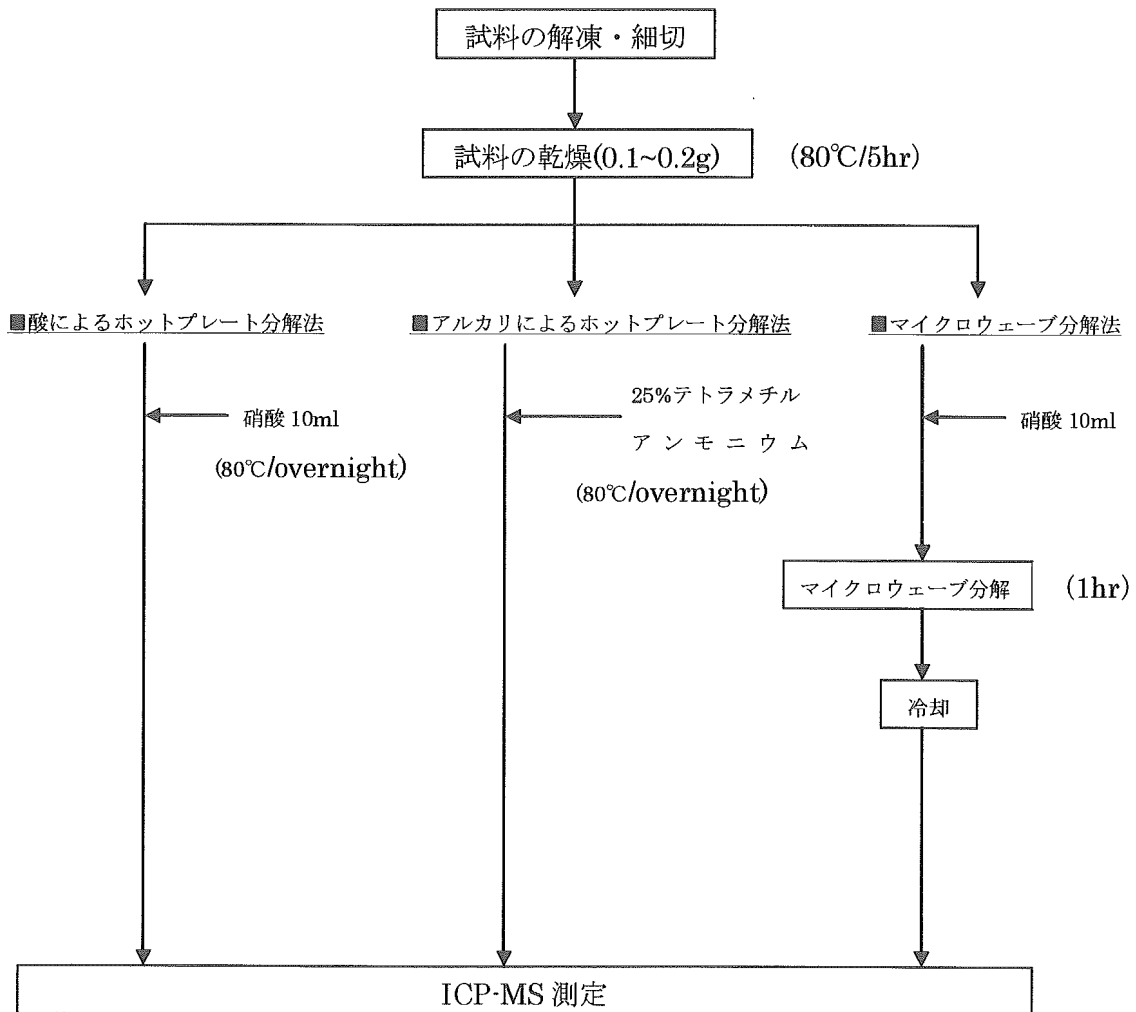


Figure 2. 臍帯組織の乾燥による重量変化

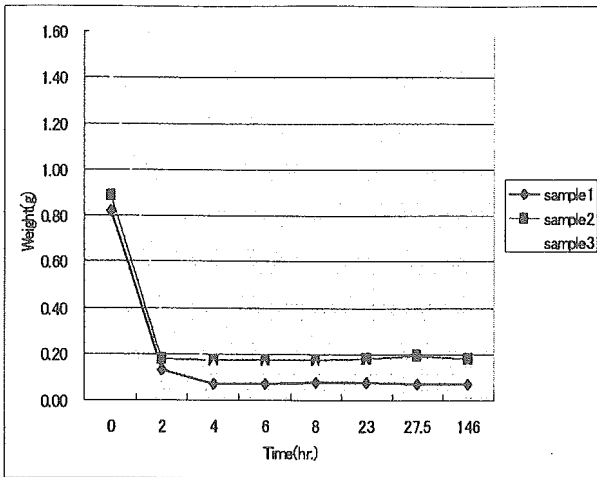


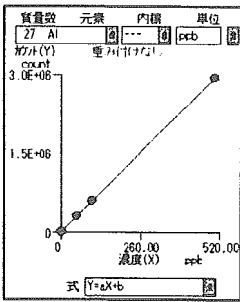
Table 3. 標準液中の各元素濃度

	1:1000	1:500	1:100
Al	50	100	500
Cr/Ni/As/Cd	10	20	100
Sb/U	1	2	10

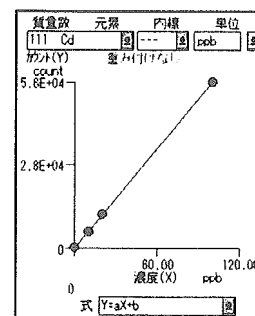
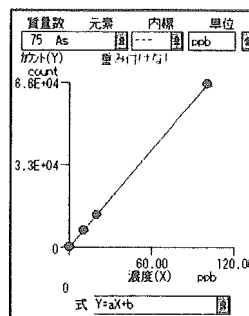
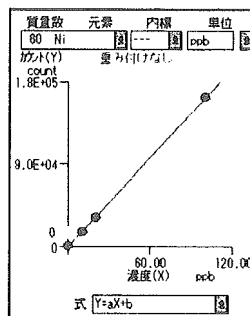
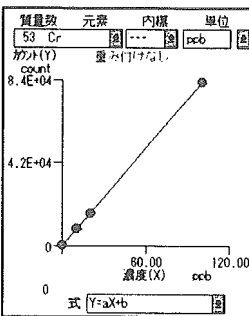
(単位 : ppb)

Figure 4. 混合標準液を用いた際の各元素検量線

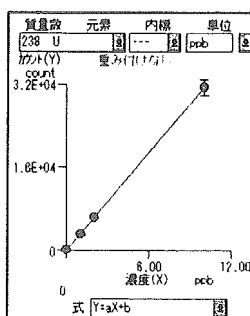
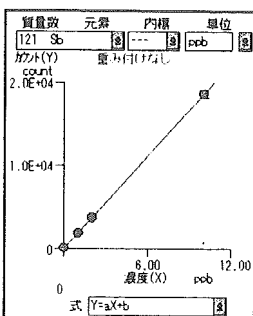
検量線濃度範囲 : 50~500ppb



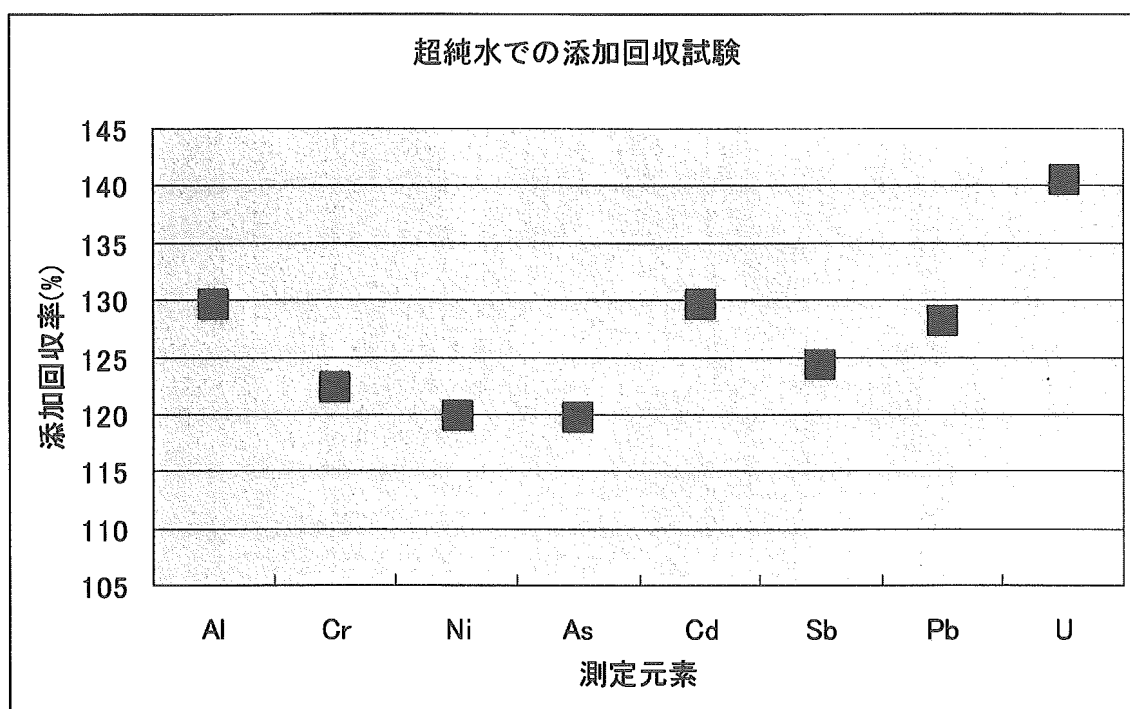
検量線濃度範囲 : 10~100ppb



検量線濃度範囲 : 1~10ppb



■Figure5. 超純水での添加回収率試験



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書  
化学物質の胎盤機能と胎児発生におけるエピジェネティックな影響の解明

主任研究者 牧野 恒久 東海大学 医学部  
分担研究者 塩田 邦郎 東京大学・大学院農学生命科学研究科・細胞生化学  
研究協力者 田中 智 東京大学・大学院農学生命科学研究科・細胞生化学

### 研究要旨

化学物質が DNA メチル化やクロマチン構造といったエピジェネティック機構の変化を引き起こす可能性を検証する目的で、まず、凍結保護剤や溶媒として多用されるジメチルスルホキシド (DMSO) の、細胞ゲノムへの影響を、マウス ES 細胞をモデルに用いて解析した。その結果、DMSO により、DNA メチル化を担う酵素の 1 つである Dnmt3a の発現が促進されることを発見した。これに伴い、反復配列のメチル化が亢進していた。また興味深いことに、DMSO 処理によって逆にメチル化が低下するゲノム領域の存在も見出された。DMSO はヒストン修飾にも影響しながら、領域特異的なエピジェネティック変化を引き起こしていることが伺われる。この結果は、DNA メチル化を変えうる身近な化合物が、他にも数多く存在する可能性をも示唆する。

### A. 研究目的

ヒト受精卵は 200 種もの異なる細胞へと分化する。この過程は「細胞は同じ DNA 塩基配列を持つが異なる性質を持つようになり、その性質は細胞分裂後も維持される」エピジェネティックなプロセスである。DNA メチル化は遺伝子サイレンシング・クロマチン構造の変換を伴う遺伝子発現の制御機構であるとともに、細胞分裂後も維持される、エピジェネティクスの分子機構である。各々の細胞はゲノム上の異なる座位がメチル化・脱メチル化され、細胞特異的な DNA メチル化プロファイルを持つようになる。近年、ヒ素などの環境汚染物質が DNA メチル化レベルでの異常を引き起こすことが懸念されている。もしこれらの物質が母体を通じて初期胚の DNA メチル化プロファイルに異常を生じさせ、個体発生にエピジェネティックな異常を生じさせている可能性がある場合、その異常は生後も引き継がれ、生涯を通じて遺伝子発現が異常になる可能性を秘めている。

本研究では、ジメチルスルホキシド (DMSO) などの化学物質が DNA メチル化やクロマチン構造といったエピジェネティック機構の変化を引き起こす可能性の検証をおこなった。本研究の成果によって、化学物質の安全基準濃度範囲の規定といった評価基準に新たな基礎的知見を与えることが可能となると考えられる。また、初期胚の発生には複数のマスター遺伝子が重要な役割を有することが明らかになっており、化学物質がこれらのマスター遺伝子にどのようなエピジェネティック変化を誘発するかを解析することで、化学物質が奇形などの異常を誘発する場合の機序や治療法解明へ貢献することが期待される。

### B. 研究方法

#### B-1 DMSO 存在下でのマウス ES 細胞の分化

マウス ES 細胞を、DMSO 存在下 (0.02%、0.1%、0.5%、1.0%) で 4 日間浮遊培養することで分化を誘導し、胚様体 (embryoid body; EB) を形成

させた。

#### B-2 DMSO がエピジェネティック制御因子の発現におよぼす影響の解析

DMSO 存在下、および、非存在下で形成した EB から RNA を抽出し、DNA メチル化を担う DNA メチル基転移酵素 3 種 (Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b) および、ヒストン修飾を担う酵素 5 種 (メチル化: G9a、Suv39h1、Suv39h2、mDot1; アセチル化: Sir2a) の mRNA の発現を、定量的リアルタイム PCR により解析した。

#### B-3 DMSO がマウス ES 細胞のゲノム DNA メチル化状態におよぼす影響の解析

DMSO が ES 細胞ゲノムにおよぼすエピジェネティックな影響 (DNA メチル化状態の変化) を、繰り返し配列のサザンハイブリダイゼーション解析、および、Restriction landmark Genomic Scanning (RLGS) 法と呼ばれる手法を用いて解析した。RLGS 法は、メチル化感受性制限酵素 (活性が認識配列のメチル化で阻害される) である NotI、および、その他の制限酵素でゲノム DNA を断片化し、NotI 切断端を放射性標識したのち 2 次元電気泳動で展開する手法である。NotI 認識部位がメチル化されていない場合、該当する DNA 断片が X 線フィルム上にスポットとして検出され、1 枚のフィルム上で約 1,500 ヶ所の領域の解析が可能である。

#### B-4 倫理面への配慮

本研究に用いられた ES 細胞はマウス由来のものであり、倫理上の問題は全くない。

### C. 結果

#### C-1 DMSO がエピジェネティック制御因子の発現におよぼす影響の解析

解析した 8 種のエピジェネティック因子 (Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b、G9a、Suv39h1、Suv39h2、mDot1、Sir2a) のうち、Dnmt3a の発現が DMSO の濃度依

存的に上昇することがわかった。

#### C-2 DMSO がマウス ES 細胞のゲノム DNA メチル化状態におよぼす影響の解析

DMSO 存在下で形成した EB のゲノム DNA を用いたサザンハイブリダイゼーション解析では、DMSO による繰り返し配列のメチル化の亢進が認められた。また、RLGS でも 4 個のスポットの消失（すなわち、DMSO によるメチル化誘導）が認められた。さらに、RLGS 解析では、逆に 11 個のスポットが DMSO 処理によって新たに検出された。これらの領域では、DMSO により DNA の脱メチル化が誘導されたことを意味する。

#### D. 考察

Dnmt3a は、メチル化されていない 2 本鎖 DNA に新たにメチル基を付加する、いわゆる de novo メチル化活性を有することが示されている。Dnmt3a mRNA の DMSO による発現促進は、DMSO に、ゲノム DNA のメチル化を亢進する作用があることを示唆する。これは、ゲノムに多コピー存在する反復配列をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション解析において、これらの配列のメチル化が亢進していることが判明した事からも支持される。しかしその一方で、RLGS 解析では、DMSO 処理によってメチル化の低下を示す領域が、メチル化が亢進した領域の数よりも多く検出された。DNA メチル基転移酵素の増加が、そのまま全ゲノムの高メチル化をもたらすのではなく、おそらくヒストン修飾とも関連しながら、領域特異的なエピジェネティック変化を引き起こしているものと考えられる。

#### E. 結論

本年度の研究により、DMSO が細胞のゲノムに、エピジェネティック変化を誘発することが明らかとなった。DMSO が de novo メチル化活性の高い Dnmt3a の発現を促進したにより、ゲノムの大部分を占める繰り返し配列や一部の遺伝子領域のメチル化が亢進されたと考えられる。さらに、脱メチル化も見られた点は、大変興味深い。この研究成果で重要なことは、DNA メチル化を変えうる身近な化合物が、他にも数多く存在する可能性を示唆していることである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 岩谷美沙、大鐘潤、塩田邦郎  
発生・分化とエピジェネティクス  
ゲノム医学 5:25-30, 2005
- 2) Misa Iwatani, Kohta Ikegami, Yuliya

Kremenska, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro Yagi and Kunio Shiota.

Demethyl sulfoxide (DMSO) affects genome-wide DNA methylation profiles and level of Dnmt3a transcript in mouse embryoid body.

Stem Cells (in revision)

##### 2. 学会発表

- 1) 岩谷美沙、池上浩太、服部中、田中智、八木慎太郎、塩田邦郎  
ジメチルサルフォキシド (DMSO) は Dnmt3a mRNA 発現を上昇させ、DNA メチル化プロファイルを変化させる (ポスター発表)  
第 28 回 日本分子生物学会  
(2005 年 12 月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
仲田尚生, 中田彩子, 岡田文雄, 伊藤里恵, 井之上浩一, 斉藤貢一 中澤裕之	オンライン固相抽出 - LC/MS/MSを用いたヒト 血漿中有機フッ素系化合 物の一斉分析法の開発	分析化学	54	877-884	2005
岩谷美沙, 大鐘潤, 塩田邦郎	発生・分化とエピジェネ ティクス	ゲノム医学	5	25-30	2005
Misa Iwatani, Kohta Ikegami, Yuliya Kremenska, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro Yagi, Kunio Shiota	Demethyl sulfoxide (DMSO) affects genome- wide DNA methylation profiles and level of Dnmt3a transcript in mouse embryoid body	Stem Cells	in revision		



報 文

## オンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー /タンデム質量分析計を用いるヒト血しょう中有機 フッ素系化合物の一斉分析法の開発

仲田 尚生<sup>1</sup>, 中田 彩子<sup>1</sup>, 岡田 文雄<sup>1</sup>, 伊藤 里恵<sup>1</sup>,  
井之上浩一<sup>1</sup>, 斉藤 貢一<sup>1</sup>, 中澤 裕之<sup>®1</sup>

### Development of Online Solid-Phase Extraction-HPLC/MS/MS Method for the Determination of Perfluorochemicals in Human Plasma

Hisao NAKATA<sup>1</sup>, Ayako NAKATA<sup>1</sup>, Fumio OKADA<sup>1</sup>, Rie ITO<sup>1</sup>,  
Koichi INOUE<sup>1</sup>, Koichi SAITO<sup>1</sup> and Hiroyuki NAKAZAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 15 April 2005, Accepted 26 July 2005)

A method for determining perfluorochemicals (PFCs) such as perfluorooctanesulfonic acid (PFOS), perfluorooctane sulfonamide (PFOSA), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorononanoic acid (PFNA) and perfluorodecanoic acid (PFDA), in human plasma samples was developed by online solid-phase extraction-HPLC/MS/MS, only after deproteinization with acetonitrile. The limits of detection of PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA and PFDA in human plasma at a signal to noise (ratio of 3) were 0.08~0.14 ng/ml, and the limits of quantitation of PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA and PFDA in human plasma were 0.50 ng/ml. The average recoveries of PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA and PFDA ranged from 93.3 to 105% (RSD, 3.0~8.9%;  $n = 6$ ). This method is more rapid and accurate, compared with the column-switching HPLC/MS method presented in previous reports<sup>18)19)</sup>. The developed method can be applied to the determination of PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA and PFDA in human plasma samples for monitoring human exposure.

**Keywords** : perfluorooctanesulfonic acid; perfluorochemicals; MS/MS; human plasma; column-switching.

#### 1 緒 言

近年, 新たな環境汚染物質として, パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) を代表としたパーフルオロ化合物 (PFCs) が注目されている。PFOSは, 水にも油にも溶けやすい性質から界面活性剤として利用され, 近年までに撥水剤, 消火剤, 潤滑油及び消泡剤等として用いられている。また, パーフルオロオクタン酸 (PFOA) においては, テフロン加工製品にも応用されていることから, PFCsは, 我々の生活環境中で広範囲に存在している。Fig. 1にこれ

ら PFCs の構造を示す。直鎖状に並んだ炭素原子すべてにフッ素原子が結合しており, 末端にスルホン酸基又はカルボン酸基を有する構造をしている。炭素原子とフッ素原子の結合は非常に強いので, PFOSは, 極めて安定な化学物質であると考えられている。この安定性により PFCsは, 河川水, 海洋性哺乳類, 魚類及び鳥類等, 生態系で分解することなく, 長期にわたり残留することが報告されている<sup>1)~5)</sup>。また, 毒性としては, 実験動物に対する催奇形性, 甲状腺ホルモンへの影響<sup>6)7)</sup>, ペルオキシソーム増殖作用<sup>8)~10)</sup>が報告されていることから次世代への影響や発がん作用, コレステロール代謝<sup>代謝</sup>攪乱作用等が懸念されている。また, PFOAは実験動物において血しょうタンパク質と結

<sup>1</sup> 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

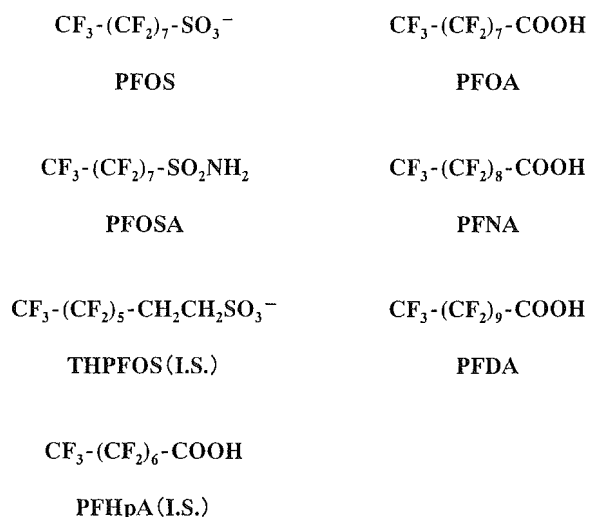


Fig. 1 Structures of PFCs and internal standards

PFOS: perfluorooctanesulfonic acid; PFOSA: perfluorooctanesulfonamide; PFOA: perfluorooctanoic acid; PFNA: perfluorononanoic acid; PFDA: perfluorodecanoic acid; PFHpA: perfluoroheptanoic acid; THPOS: 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctanesulfonic acid

合して血液中に蓄積しているという報告がある<sup>11)12)</sup>。それ故 PFCs による生態系及びヒトへのリスク評価を行うためにサーベイランスが必要となっている。近年、国内において PFCs は、環境モニタリングが実施されている<sup>13)</sup>が、ヒトへの暴露調査は、いまだほとんど行われていない。

現在、報告されている生体試料中 PFCs の測定は、主に高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 (HPLC/MS) 及び高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (HPLC/MS/MS) が用いられている<sup>14)~19)</sup>。しかしヒトへの暴露実態を正確に把握するためには、より精度の高い HPLC/MS/MS を用いる方が望ましいとされている。また、試料前処理法には、液-液抽出法<sup>5)14)15)</sup>、固相抽出法<sup>16)17)</sup>、カラムスイッチング法<sup>18)19)</sup>が報告されている。液-液抽出法及び固相抽出法は、煩雑な操作を必要とし、多検体処理能に乏しい。また、先に報告したカラムスイッチング-HPLC/MS 法<sup>18)19)</sup>では、簡便な操作ではあるが、分析時間が 30 分と長く、回収率及び分析精度がやや乏しい。そこで本研究では、簡便かつ多検体処理能を有する前処理法であるオンライン固相抽出法を採用し、高精度・高選択的な機能を有する HPLC/MS/MS を用いることにより、迅速かつ高感度・高精度な血しょう試料中 PFCs の一斉分析法を開発した。

## 2 実験

### 2.1 試薬

パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS, >98%), パーフルオロオクタン酸 (PFOA, >90%), パーフルオロ

ノナン酸 (PFNA, >98%) は Fulka 製を用いた。パーフルオロオクタンスルホンアミド (PFOSA, 97%) は ABCR GmbH & Co.KG 製, パーフルオロデカン酸 (PFDA, 97%) は Lancaster 製を用いた。内標準物質として用いたパーフルオロヘプタン酸 (PFHpA, 99%) は Aldrich 製, 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-パーフルオロオクタンスルホン酸 (THPFOS, >90%) は SynQuest 製を用いた。精度管理用凍結乾燥プール血清コンセーラは、日水製薬製を用いた。超純水は日本ミリポア製 Milli-Q の超純水装置で調製したものをを用いた。アセトニトリル, メタノールは、和光純薬製 HPLC 用及び残留農薬試験用を使用した。ナイロンメンブランフィルター (0.2 μm, 13 mm) は、日本ボール製を用いた。

### 2.2 標準溶液の調製

各標準品をアセトニトリルに溶解させ、1.0 mg/ml の溶液を調製し、0.50~100 ng/ml の範囲で標準溶液を水/アセトニトリル = 50/50 (v/v) で適宜希釈して測定用試料を調製した。

### 2.3 装置及び分析条件

HPLC/MS/MS は、Waters 製 Quattro micro システムを用いた。インジェクションボリュームを 50 μl とし、ガードカラムに関東化学製の Mightysil RP-18 GP プレカラム (2.0 mm × 5 mm, 5 μm) を用い、分析カラムに GL サイエンス製 Inertsil ODS-3 (2.1 mm × 50 mm, 5 μm) を使用した。また、カラムオーブンは 40°C に設定した。

オンライン固相抽出法の条件は、送液ポンプに島津製 LC-10ADvp pump を用い、固相カートリッジとしては、Waters 製 Oasis HLB extraction column (20 mm × 2.1 mm, 25 μm) を使用した。構築したオンライン固相抽出システムを Fig. 2 に、操作プログラムを Table 1 に示す。オートサンプラーにより試料溶液を注入後、5 分間 50 mM 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH = 4.7)/メタノール (90/10, v/v) を Pump 1 より送液することで、固相抽出カートリッジ上で測定対象物質の濃縮とクリーンアップを行った。次に六方バルブを切り替え、Pump 2 から 1 mM 酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混液をバックフラッシュ法によりグラジエント溶出することで、測定対象物質を固相抽出カートリッジから溶出させ、分離部及び検出部に導入した。

MS/MS のイオン化法は、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のネガティブイオンモードを採用し、検量線及び実試料の測定は、Multiplex Reaction Monitoring (MRM) モードで行った。MS/MS 条件としては、デソルベーション温度及びソース温度をそれぞれ 350°C, 100°C とし、コーンガス流量及びデソルベーションガス流量を 50 l/hr,

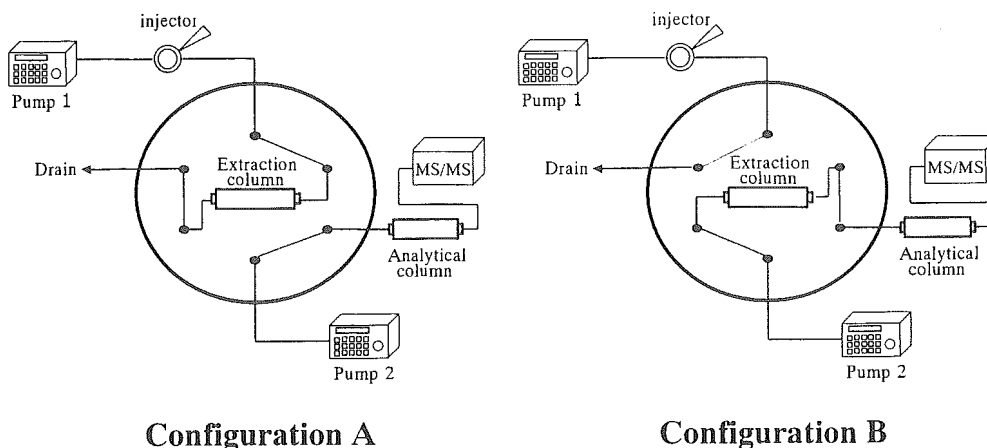


Fig. 2 Schematic diagram of the column-switching HPLC/MS/MS system  
 Configuration A: sample loading and washing; Configuration B: sample eluting

Table 1 Time program of column-switching HPLC/MS/MS coupled with on-line extraction condition

Time/min	Column position <sup>a)</sup>	Mobile phase	
		Pump 1 <sup>b)</sup> (A-B, v/v)	Pump 2 <sup>c)</sup> (A-B-C, v/v)
0.0	Configuration A	90 : 10	54 : 1 : 45
5.0	Configuration B	90 : 10	54 : 1 : 45
10.0	Configuration A		
12.0		90 : 10	14 : 1 : 85
14.9		90 : 10	14 : 1 : 85
15.0		90 : 10	54 : 1 : 45

a) Configuration A and B are shown in Fig. 2; b) Pump 1 solvent: (A) 50 mM Ammonium acetate buffer (pH-4.7), (B) Methanol; c) Pump 2 solvent: (A) Water, (B) 100 mM Ammonium acetate, (C) Acetonitrile

350 l/hrとした。また、キャピラリー電圧を -600 V に設定した。コーン電圧及びコリジョンエネルギーを PFOS: -60 V, 65 eV, PFOSA: -45 V, 35 eV, PFOA: -30 V, 18 eV, PFNA: -30 V, 20 eV, PFDA: -30 V, 22 eV, PFHpA: -28 V, 18 eV, THPFOS: -35 V, 37 eV に設定した時、モニタリングイオンはそれぞれ, PFOS:  $m/z$  499 → 80, PFOSA:  $m/z$  498 → 78, PFOA:  $m/z$  369 → 169, PFNA:  $m/z$  419 → 169, PFDA:  $m/z$  469 → 169, PFHpA:  $m/z$  319 → 169, THPFOS:  $m/z$  427 → 81 となった。

測定対象物質の分離は、逆相分配モードの ODS (octadecyl silica) カラムを用い、1 mM 酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル (v/v) 混液を移動相として、流量 0.2 ml/min で送液し、測定時間 5~12 分にかけて、アセトニトリル含量を 45~85% にグラジエント溶出して行った。

#### 2.4 ヒト血しょう試料

本研究遂行に当たり、血しょう試料の採取は提供対象者に対する人権擁護上の配慮、研究に対する利益・不利益等の説明を行い、インフォームドコンセントを得た。また、血しょう試料は、-80℃ で保存し、分析直前に室温で自然解凍した。ボランティアは、男女各 3 名ずつの健常人であった。

#### 2.5 測定試料の調製法

0.1 ml のヒト血しょうに対して、内標準物質を含むアセトニトリル溶液を 0.2 ml 加えた。よくかくはん後、3000 rpm で 10 分間、遠心分離を行った。遠心分離後、上澄みをナイロンメンブランフィルター (0.2 μm) に通し、測定試料とした。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 オンライン固相抽出条件の検討

オンライン固相抽出法における溶離液の検討を行った。まず、水/メタノール (v/v) 混液について検討したところ、実試料と標準溶液の間において、保持時間にずれが生じた。この原因としては、固相抽出カートリッジ上での保持挙動が pH に依存するため、実試料中 PFCs の保持・溶出挙動が標準溶液と異なるためと考えられた。そこで、移動相に 50 mM 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH = 4.7) / メタノール (v/v) 混液を用いたところ、保持時間を一定に保つことが可能となった。また、Fig. 3 に 50 mM 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH = 4.7) / メタノール (v/v) の混合比率の検討を示す。メタノール含量が少ないほど、測定対象化合物のピーク面積は大きくなる傾向にあるが、メタノールを 10% 含む時点でほぼプラトーとなったので、最適混合比率を 50 mM 酢酸・酢酸アンモニウム

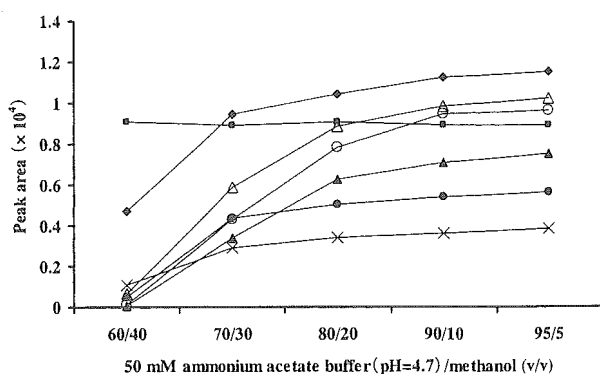


Fig. 3 Effect of the mobile phase composition on the peak area of PFCs

◆: PFOS; ■: PFOSA; ▲: PFOA; ●: PFNA; ×: PFDA; ○: PFHpA; △: THPFOS

緩衝液 (pH = 4.7)/メタノール = 90/10 (v/v) とした。

### 3.2 MS/MS 測定条件の検討

PFCs5 種類の標準品を用いて、MS/MS のイオン化について検討した。測定対象物質のマススペクトルを Fig. 4 に示す。イオン化法に ESI 法を採用し、ネガティブイオンモードで測定したところ、PFOS においては  $[M-K]^-$  イオンの  $m/z$  499, PFOSA, PFOA, PFNA, PFDA, PFHpA 及び THPFOS に関しては、 $[M-H]^-$  イオンである  $m/z$  498, 413, 463, 513, 363, 427 の分子量関連イオンピークがそれぞれ確認された。この結果より、PFOS, PFOSA 及び THPFOS に関しては、 $m/z$  499, 498, 427 をプレカーサーイオンとした。しかし、PFOA, PFNA, PFDA 及び PFHpA に関しては、 $[M-H]^-$  イオンに比べ、 $[M-COOH]^-$  イオンの強度が強かったため、プレカーサーイオンをそれぞれ、 $[M-COOH]^-$  イオンである  $m/z$  369, 419, 468, 319 に設定した。またプレカーサーイオンが開裂することで生じるプロダクトイオンは、それぞれ PFOS:  $m/z$  499 → 80, PFOSA:  $m/z$  498 → 78, PFOA:  $m/z$  369 → 169, PFNA:  $m/z$  419 → 169, PFDA:  $m/z$  469 → 169, PFHpA:  $m/z$  319 → 169, THPFOS:  $m/z$  427 → 81 とした。

設定したモニタリングイオンを用い、キャピラリー電圧のイオン強度に及ぼす影響について検討した。その結果を Fig. 5 に示す。キャピラリー電圧は -600 V の時、測定対象化合物すべてにおいて最大のピーク面積が得られた。また、一般的に MS や MS/MS を用いて測定をする際、揮発性の酸や塩基を少量加えることによりイオン化効率が上昇することが知られている。そこで今回、PFCs のイオン化効率を上昇させるため、酢酸アンモニウムの添加濃度を検討した (Fig. 6)。その結果、酢酸アンモニウムを 1 mM 添加した時に測定対象化合物のイオン強度が最大値を示した。

### 3.3 オンライン固相抽出-HPLC/MS/MS 測定条件の検討

得られた条件を用い、PFCs5 種類の標準品の測定を行った。Fig. 7 (a) に示したクロマトグラムのようにすべての化合物を 15 分以内に良好に分離した。同様に血しょう試料に測定対象物質を 10 ng/ml となるように添加したクロマトグラムにおいても、他の夾雑物質の影響を受けることなく良好に相互分離することが可能であった (Fig. 7 (b))。また、血しょう試料における検出限界 ( $S/N=3$ ) を求めたところ、それぞれ PFOS: 0.08 ng/ml, PFOSA: 0.11 ng/ml, PFOA: 0.11 ng/ml, PFNA: 0.10 ng/ml, PFDA: 0.14 ng/ml であった。定量限界は、すべての化合物を明瞭に測定することができる 0.50 ng/ml ( $S/N>10$ ) とした。

### 3.4 内標準物質の検討

近年、MS や MS/MS を用いた測定は、重水素置換体や  $^{13}C$  標識体等の安定同位体を用い、内標準法により測定が行われている。しかし、PFCs においては、重水素置換体や  $^{13}C$  標識体等の安定同位体の入手が困難なことから、内標準物質として PFOS 類似化合物が多く用いられている<sup>15)17)</sup>。そこで、今回は、従来多くの研究報告で用いられている PFHpA 及び THPFOS に着目した。標準溶液 0.1 ml に内標準物質含有アセトニトリル 0.2 ml を加え、よくかくはんした溶液を測定試料とし、検量線を作成したところ、0.50 ~ 100 ng/ml の範囲で良好な直線性 ( $r=0.999$  以上) を得ることができた。しかし、精度管理用プール血清コンセンラに測定対象物質が 10 ng/ml となるように添加して、回収率を求めた結果、PFHpA を内標準物質として用いた場合の回収率は、91.0% 以上と良好な結果を得ることができたが、THPFOS を用いた時、回収率 43.7 ~ 53.7% と良好な結果を得ることができなかった。THPFOS を用いた時に回収率が低減した原因としては、血清試料中の共存物質のマトリックス効果により、測定対象物質に比べ THPFOS のイオン強度が増加してしまったためと考えられる。これらの結果より、内標準物質として PFHpA を用いることにした。

### 3.5 添加回収試験

内標準物質に PFHpA を用い、ヒト血しょうにおける添加回収試験を行った。添加回収試験は、まず各測定対象化合物を異なる濃度レベルで添加した血しょう試料 0.1 ml に PFHpA 含有アセトニトリル 0.2 ml を加え、よくかくはんし、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。次いで、上澄みをナイロンメンブランフィルター (0.2  $\mu$ m) に通し、その濾液を測定して、回収率を算出した。その結果、平均回収率 93.3% 以上 {相対標準偏差 (RSD)  $\leq$  8.9%} と良

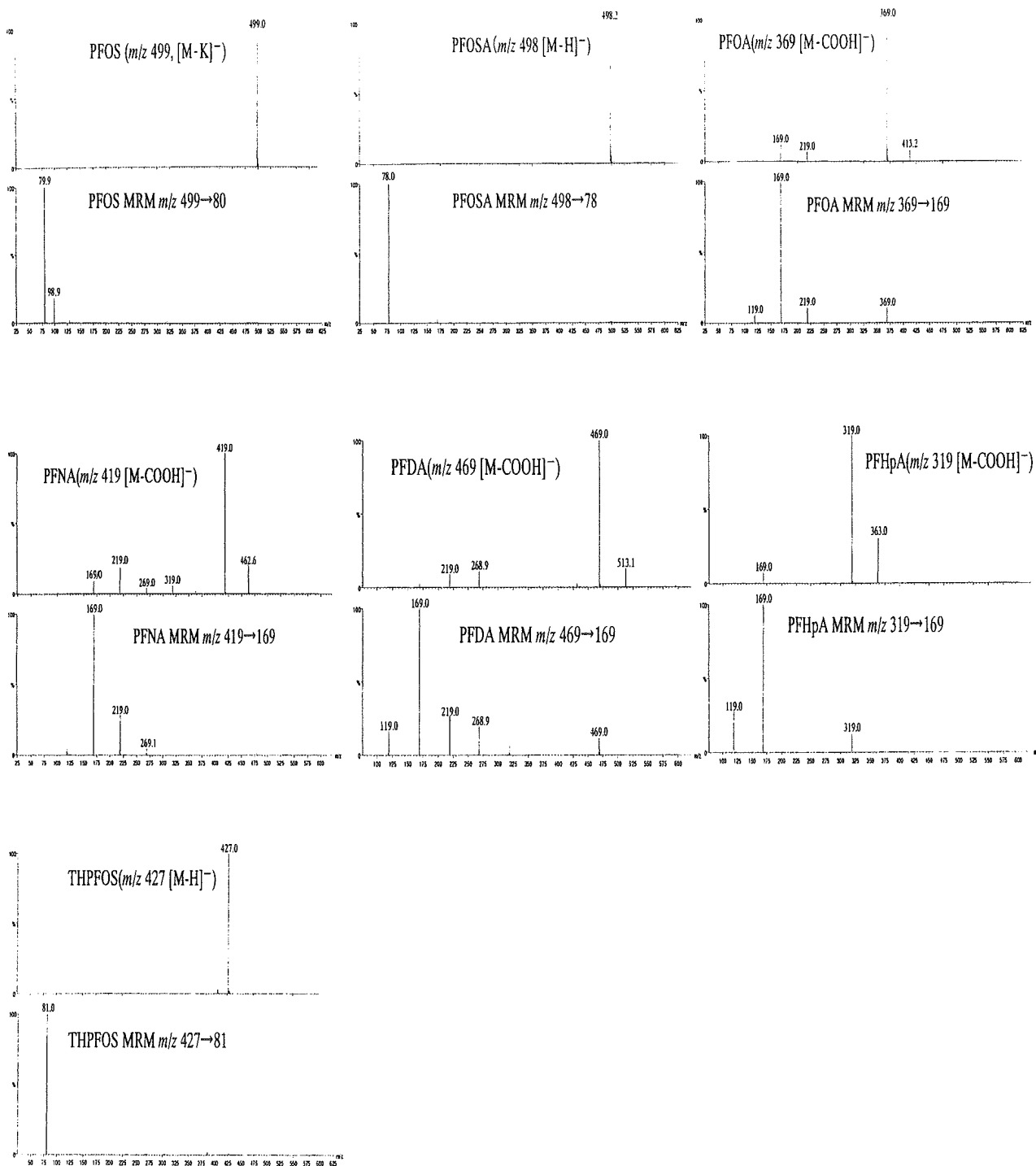


Fig. 4 Mass spectra of PFCs and internal standards  
precursor ion spectrum : above; product ion spectrum : below

好な結果を得ることができた (Table 2).

本法を健康人 6 人に適用し, 血しょう中の PFCs を測定した (Table 3). その結果, すべての検体から PFOS 及び PFOA を検出することができた. PFOS 濃度は 2.1~21.3 ng/ml の範囲で, PFOA 濃度は 0.7~4.6 ng/ml の範囲で存在した. また, PFNA についても 3 検体から 0.6~1.0 ng/ml の範囲で検出することができた. これらの濃度は,

既に報告されているヒト血しょう中の PFCs の濃度<sup>15)</sup>と比較し, ほぼ同レベルであったことから, 本法は, ヒト血液試料中 PFCs の定量に応用可能であることが認められた.

#### 4 結 言

本分析法では, 前処理法にオンライン固相抽出法を用いることで, 除タンパクのみという簡便な操作で PFCs の測

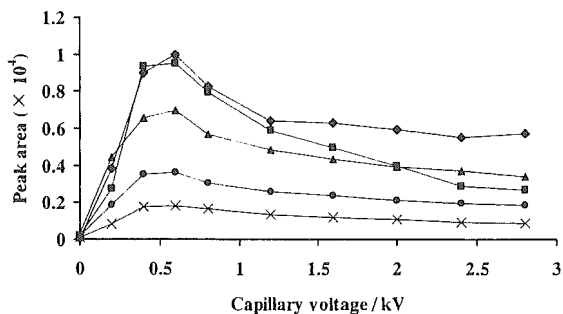


Fig. 5 Effect of capillary voltage on the peak area of PFCs

◆: PFOS; ■: PFOSA; ▲: PFOA; ●: PFNA; ×: PFDA

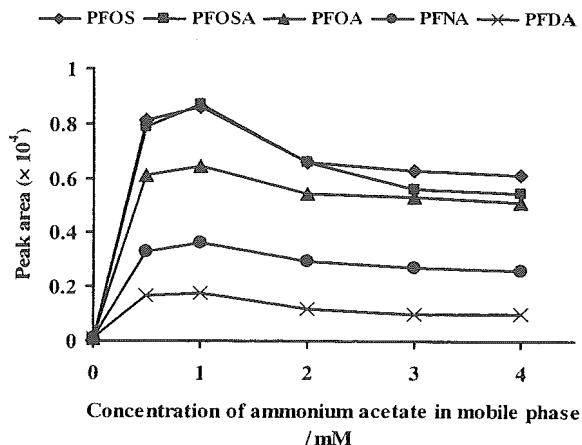


Fig. 6 Effect of concentration of ammonium acetate in mobile phase on the peak area of PFCs

◆: PFOS; ■: PFOSA; ▲: PFOA; ●: PFNA; ×: PFDA

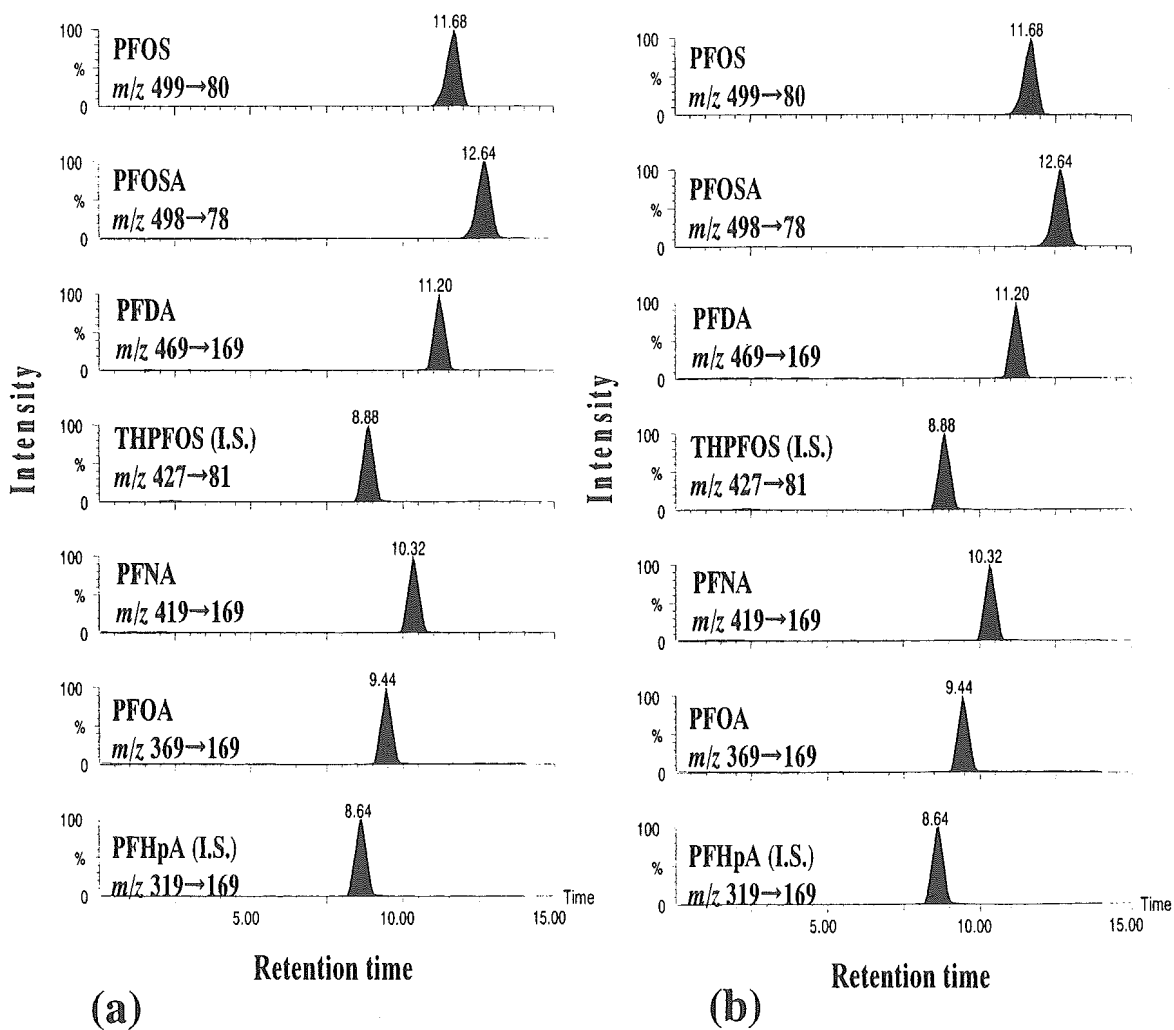


Fig. 7 MRM chromatograms of (a) a mixture of standards (PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA, PFDA) and internal standards; (b) pooled human plasma with addition of 10 ng/ml PFCs

Table 2 Recovery levels of PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA and PFDA in human plasma samples

Compound	Spiked amount/ ng ml <sup>-1</sup> , human plasma sample	Average recovery, %	RSD, %
PFOS	5	99.3	3.0
	50	97.5	6.3
PFOSA	1	98.3	4.2
	10	105	4.2
PFOA	1	100	8.9
	10	97.3	4.8
PFNA	1	96.7	8.4
	10	94.7	3.1
PFDA	1	93.3	8.7
	10	103	4.7

n = 6

Table 3 Concentration of PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA and PFDA in plasma samples from healthy volunteers

Volunteer	PFOS	PFOSA	PFOA	PFNA	PFDA
A (male)	5.6 ± 0.15	N.D.	1.7 ± 0.13	N.D.	N.D.
B (male)	17.7 ± 0.35	N.D.	2.8 ± 0.11	1.0 ± 0.05	N.D.
C (male)	21.3 ± 1.35	N.D.	4.6 ± 0.06	0.8 ± 0.05	N.D.
D (female)	2.1 ± 0.09	N.D.	0.7 ± 0.02	N.D.	N.D.
E (female)	10.4 ± 0.31	N.D.	2.4 ± 0.14	N.D.	N.D.
F (female)	15.1 ± 0.91	N.D.	1.9 ± 0.07	0.6 ± 0.02	N.D.

mean ± SD ng ml<sup>-1</sup>, N.D. < 0.5 ng ml<sup>-1</sup>, n = 3

定が可能となった。先に報告したカラムスイッチング-HPLC/MS法<sup>18)19)</sup>と本法を比較すると、測定装置にMS/MSを用いることでバックグラウンドの影響を軽減することができ、回収率が93.3%以上と向上した。また、分析カラムに50 mmのODSカラムを用いたことで、測定時間を15分に短縮することができた。再現性に関しては、前報では、オンライン固相抽出の溶離液に水/メタノール混液を用いていたが、今回、50 mM酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH = 4.7)/メタノール混液を用いたことで、保持時間のRSD (%)値が1.1%以下と良好な結果が得られた。以上のことから、本法は前報<sup>18)19)</sup>に比べて迅速かつ高い分析精度でPFCsの測定が可能となった。更に本法をヒト血しょう試料に応用したところ、PFOS、PFOA及びPFNAを検出することができた。今後、本法が多くヒト血液試料の分析に用いられることにより、大規模な疫学研究等が実施され、PFOS及びPFOS関連化合物のリスク評価に資するものと期待される。

## 文 献

- 1) J. P. Giesy, K. Kannan: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1339 (2001).
- 2) K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Oehme, S. Focardi, J. P. Giesy: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 3210 (2002).
- 3) K. Kannan, J. Newsted, R. S. Halbrook, J. P. Giesy: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 2556 (2002).
- 4) K. J. Hansen, H. O. Johnson, J. S. Eldridge, J. L. Butenhoff, L. A. Disk: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1681 (2002).
- 5) S. Taniyasu, K. Kannan, Y. Horii, N. Hanari, N. Yamashita: *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 2634 (2003).
- 6) J. R. Thibodeaux, R. G. Hanson, J. M. Rogers, B. E. Grey, B. D. Barbee, J. H. Richards, J. L. Butenhoff, L. A. Stevenson, C. Lau: *Toxicol. Sci.*, **74**, 369 (2003).
- 7) C. Lau, J. R. Thibodeaux, R. G. Hanson, J. M. Rogers, B. E. Grey, M. E. Stanton, J. L. Butenhoff, L. A. Stevenson: *Toxicol. Sci.*, **74**, 382 (2003).
- 8) T. Ikeda, K. Aiba, K. Fukuda, M. Tanaka: *J. Biochem.*, **98**, 475 (1985).
- 9) A. K. Sohlenius, K. Andersson, J. DePierre: *J. Biochem.*, **285**, 779 (1992).
- 10) Y. Kawashima, N. Uy-Yu, H. Kozuka: *J. Biochem.*, **261**, 595 (1989).
- 11) X. Han, T. A. Show, R. A. Kemper, G. W. Jepson: *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 775 (2003).
- 12) X. Han, P. M. Hinderliter, T. A. Show, G. W. Jepson: *Drug. Chem. Toxicol.*, **27**, 341 (2004).
- 13) S. Taniyasu, K. Kannan, Y. Horii, N. Hanari, N. Yamashita: *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 2634 (2003).
- 14) G. W. Olsen, K. J. Hansen, L. A. Stevenson, J. M. Burris, J. H. Mandel: *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 888 (2003).
- 15) K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Fillmann, K. S. Kumar, B. G. Loganathan, M. A. Mohd, J. Olivero, J. H. Yang, K. M. Aldous: *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 4489 (2004).
- 16) Z. Kuklenyik, J. A. Reich, J. S. Tully, A. M. Calafat: *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 3698 (2004).

- 17) A. Karrman, B. B. Van, U. Jarnberg, L. Hardell, G. Lindstrom: *Anal. Chem.*, **77**, 864 (2005).
- 18) K. Inoue, F. Okada, R. Ito, M. Kawaguchi, N. Okanouchi, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. B*, **810**, 49 (2004).
- 19) K. Inoue, F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, S. Nakajima, A. Uno, Y. Saijo, F. Sata, Y. Yoshimura, R. Kishi, H. Nakazawa: *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1204 (2004).

---

### 要 旨

近年、新たな環境汚染物質として注目されているパーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 及び PFOS 関連化合物を対象としたヒト血しょう試料中の一斉分析法について検討した。本研究では、試料前処理法にカラムスイッチング方式を用いたオンライン固相抽出法を採用することで、除タンパクした血しょう試料中のパーフルオロ化合物 (PFCs) を簡便な操作で測定することが可能となった。本法をヒト血しょう試料中 PFCs の分析へ応用した結果、検出限界は、0.08~0.14 ng/ml ( $S/N=3$ ) であり、ヒト血しょう試料中における定量限界は、すべての測定対象化合物において 0.50 ng/ml とした。また、内標準物質にパーフルオロヘプタン酸 (PFHpA) を用いることにより、回収率 93.3% 以上 [相対標準偏差 (RSD)  $\leq 8.9\%$ ] と良好な回収率を得ることができた。このことから、本法は、ヒト血しょう試料中の PFCs の定量に応用できることが明らかとなった。



# 発生・分化とエピジェネティクス

*Epigenetics in differentiation and development*

Key Words オケノム用語解説85ページ～

- ⇒DNAメチル化
- ⇒組織特異的メチル化可変領域(T-DMR)
- ⇒クローン動物
- ⇒エピ変異原

岩谷美沙<sup>1)</sup>, 大鐘 潤<sup>1)</sup>, 塩田邦郎<sup>2)</sup>

- 1: 東京大学大学院農学生命科学研究科  
獣医学・応用動物科学専攻細胞生化学研究室
- 2: 同 獣医学・応用動物科学専攻細胞生化学研究室教授

## はじめに

哺乳類の個体は機能、形態の異なる約 200 種類の細胞から構成されている。細胞は DNA 塩基配列情報の変化なしに、必要な遺伝子群の発現をオン、不必要な遺伝子群の発現をオフにすることで、細胞種ごとに固有の遺伝子発現パターンを形成している。エピジェネティック機構のひとつである DNA のメチル化は遺伝子サイレンシングに重要な役割を果たしており、遺伝子発現のオン・オフを決定する。つまり塩基配列情報のうえに DNA メチル化情報を書きこむ、または消去することで発生時期・細胞種に応じた遺伝子発現を可能にしていると考えられる。

クローン胚の大部分は発生過程で致死となり、誕生にまで至った個体においても異常がみられる。また、薬物などの化学物質によって細胞の形態や機能が変化してしまう現象がしばしばみられる。個体発生、細胞分化の分子基盤としてエピジェネティック機構があることを考慮すると、これらの現象はエピジェネティッ

ク変化に起因する可能性がある。本稿では、個体発生、細胞分化の観点からの DNA メチル化情報の重要性を述べる。

## 組織特異的メチル化可変領域(T-DMR)

哺乳類において、DNA メチル化は主に 5'-CG-3'配列のシトシン残基 5 位で起こり<sup>1,2)</sup>、そのメチル化パターンは細胞分裂後も維持される。DNA はメチル化されると、クロマチン構造の変化をとめない遺伝子発現を不活化することが近年明らかとなってきた<sup>3)</sup>。

ゲノム上には CpG 配列が密に存在する領域、CpG アイランドがあり、それらの多くは遺伝子の転写調節領域に存在することが知られている<sup>4,5)</sup>。これまで CpG アイランドは正常組織、細胞ではメチル化されない領域であると考えられていた。しかしわれわれは、以前、正常組織の CpG アイランドにおいて組織特異

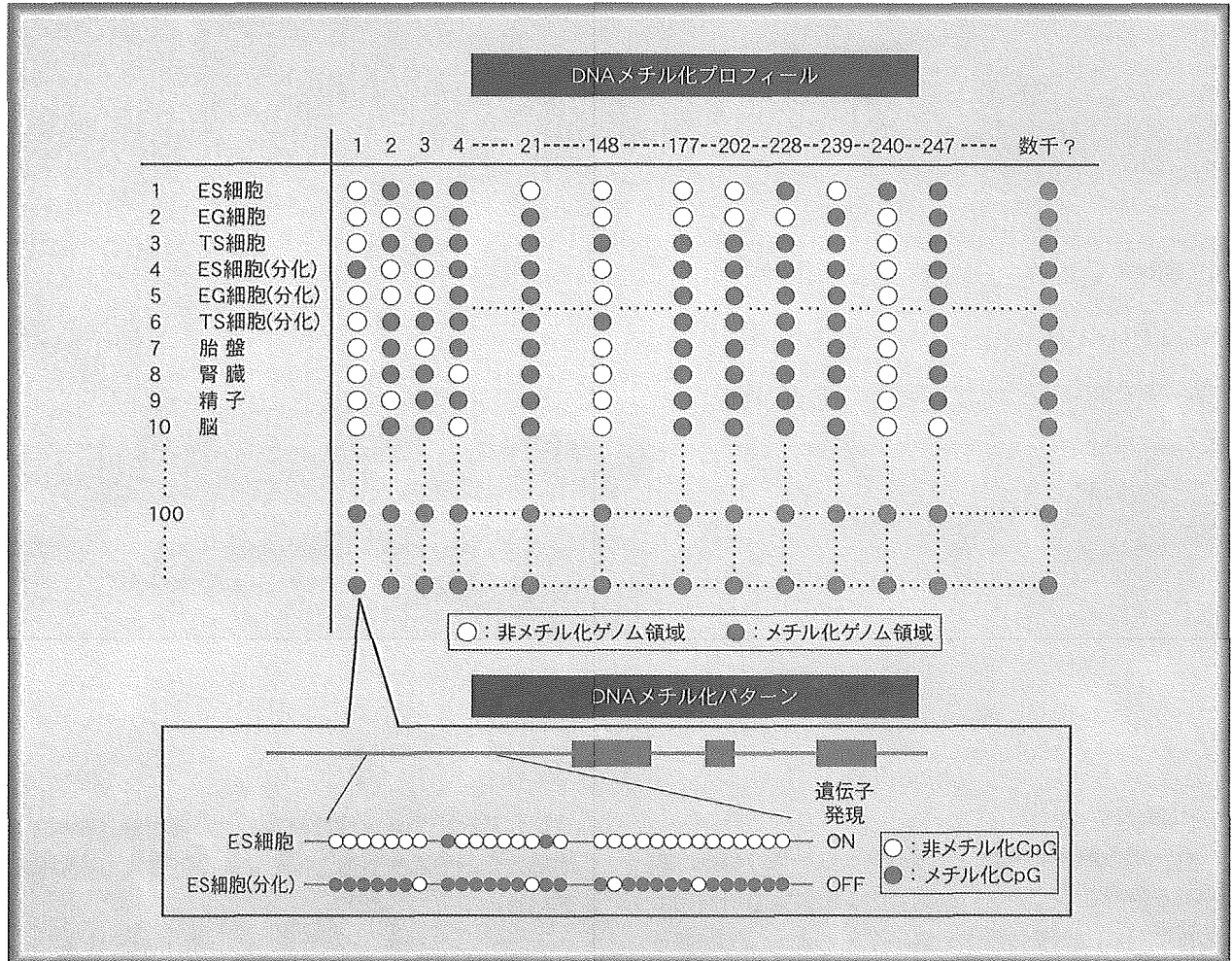


図1 組織、細胞特異的DNAメチル化プロフィール

遺伝子領域のCpG配列では、細胞の種類に応じた「DNAメチル化パターン」が形成されている。ゲノム上に散在している各遺伝子のDNAメチル化パターンの組み合わせ、すなわち「DNAメチル化プロフィール」はそれぞれの細胞種に特有である。このDNAメチル化プロフィールはその細胞でのON/OFF状態の遺伝子セットの情報でもある。組織を構成する細胞のDNAメチル化プロフィールの集まりは組織のDNAメチル化プロフィールとして、また、個体の全細胞のそれは個体のDNAメチル化プロフィールとしてDNAメチル化データベースを形作る。

○：非メチル化領域、●：メチル化領域。

的にメチル化される領域を発見し<sup>6)</sup>、組織特異的メチル化可変領域(Tissue-dependent and differentially methylated region ; T-DMR)と名付けた。さらに、胚性幹細胞(ES細胞)、栄養膜幹細胞(TS細胞)などを含む合計10種類の細胞、組織を用いて、ゲノム上の約1500のCpGアイランドについてDNAメチル化状態を解析し、用いた組織、細胞によってメチル化パターンの異なる247カ所のT-DMRを発見した<sup>7)</sup>(図1)。

つまり、各組織、細胞種は特有のDNAメチル化プロフィールをもっているのである。哺乳類の体は約200種類の細胞からなることを考慮すると、ゲノム中のT-DMRは数千存在すると推測できる。このような細胞のDNAメチル化プロフィール、すなわち、ゲノムメインスイッチのON/OFF模様が、発生・分化・内分泌系・代謝系・免疫系・神経系など、さまざまな生体制御系に関する遺伝子発現制御の基礎になっているのである。

## 分化とエピジェネティクス

各組織、細胞種の DNA メチル化プロフィールを比較することにより、細胞分化にともないさまざまな遺伝子座の DNA メチル化状態が変化することが明らかとなっている。2つの異なる組織または細胞間でメチル化状態に差のある T-DMR の数は VED(Value of epigenetic distance)として定義することができる(図2)。すなわち、VED は2種類の異なるゲノム DNA におけるエピジェネティック情報の違いの度合いを反映している。たとえば、ES 細胞の分化では 108 カ所(メチル化 73 カ所、脱メチル化 35 カ所)の T-DMR で変化がみられるのに対し、TS 細胞の分化では VED が

30(メチル化 15, 脱メチル化 15)である。このことは、ES 細胞が胚体を構成するすべての細胞へ分化する能力があるのに対して、TS 細胞は胎盤を構成する数種類の栄養膜細胞系のみへの分化能しか保持していないことを反映していると考えられる。また、胚性生殖幹細胞である EG 細胞は、ES 細胞との比較では VED が 49(メチル化 17, 脱メチル化 32)、精子との比較では 81(メチル化 26, 脱メチル化 55)であり、VED の点では同じ幹細胞である ES 細胞に近く、むしろ精子とはエピジェネティック情報の違いは大きいことがわかる。このような T-DMR を中心としたエピジェネティック情報の比較は、ある幹細胞の分化能や細胞同士の近縁性を評価するうえでの指標とすることができる。

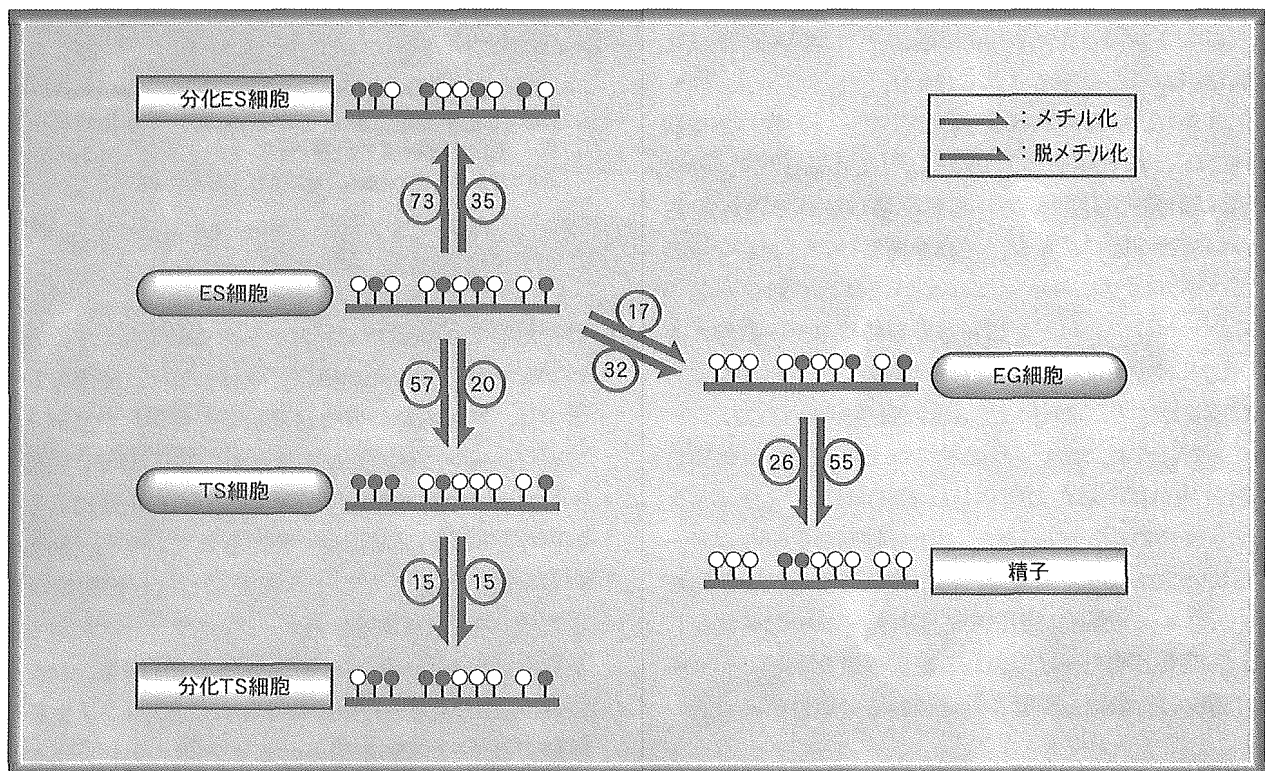


図2 各幹細胞間および幹細胞と分化細胞間のエピジェネティック距離

マウス組織、細胞種の DNA メチル化プロフィールの比較により明らかになった 247 カ所の T-DMR のうち、各幹細胞間、幹細胞と分化細胞間でメチル化状態が変化する領域数を示した。2つの細胞種間のエピジェネティック情報の違いは VED として表すことができる。DNA メチル化からみると、EG 細胞は精子よりもむしろ ES 細胞に近く、また TS 細胞は ES 細胞と異なることが明らかである。

○: 非メチル化 T-DMR, ●: メチル化 T-DMR.

(文献7より改変引用)



発生とエピジェネティクス：  
クローン動物における異常

胎盤過形成はクローン動物で共通してみられる異常である<sup>8,9)</sup>。われわれはこれまでクローン新生児の組織の DNA メチル化プロファイルを解析し、自然交配動物と比較して若干(約 0.3%)の DNA メチル化異常があることを検出した<sup>10,11)</sup>。そのうちのひとつである Sall3 遺伝子は、発生初期の胎盤細胞においてのみ CpG アイランドの T-DMR が顕著にメチル化される。クローン胚の分娩期胎盤において、Sall3 遺伝子の T-DMR は異常な高メチル化状態を示し、さらにクローン個体ごとの胎盤重量と Sall3 遺伝子 T-DMR での DNA メチル化量のあいだには正の相関があることが明らかとなった<sup>12)</sup>。マウスゲノムには約 15,500 の CpG アイランドをもつ遺伝子が存在しており、クローン動物ではその 0.3% にあたる約 40 の遺伝子に DNA メチル化異常があるとも考えられる(図 3)。

さらに、われわれは成体雌のクローン動物のある個体では X 染色体不活化が偏ることも発見した<sup>13)</sup>。通常、哺乳類の雌では胚発生の初期段階において両 X 染色体が活性状態であるが、その後細胞分化にともなってランダムにどちらか一方の X 染色体の不活化が起こる。しかし、クローン動物においてはドナー細胞の不活化 X 染色体の不完全な消去のみならず、ランダムに起こるはずの X 染色体不活化の偏りがみられた。

このように、クローン動物では DNA メチル化異常や X 染色体不活化の偏りといったエピジェネティックレベルでの異常がみられ、ドナー細胞の完全なコピーとはいえないのである。一見正常に発生したようにみえるクローン動物に潜在する DNA メチル化異常が、ある程度の期間を経て現れる肥満や短命などのクローン動物の特徴にも影響を与えている可能性が高い。

化学物質とエピジェネティクス：  
DMSO によるエピジェネティック変化

ゲノムの塩基配列を変化させる物質を変異原と呼ぶ

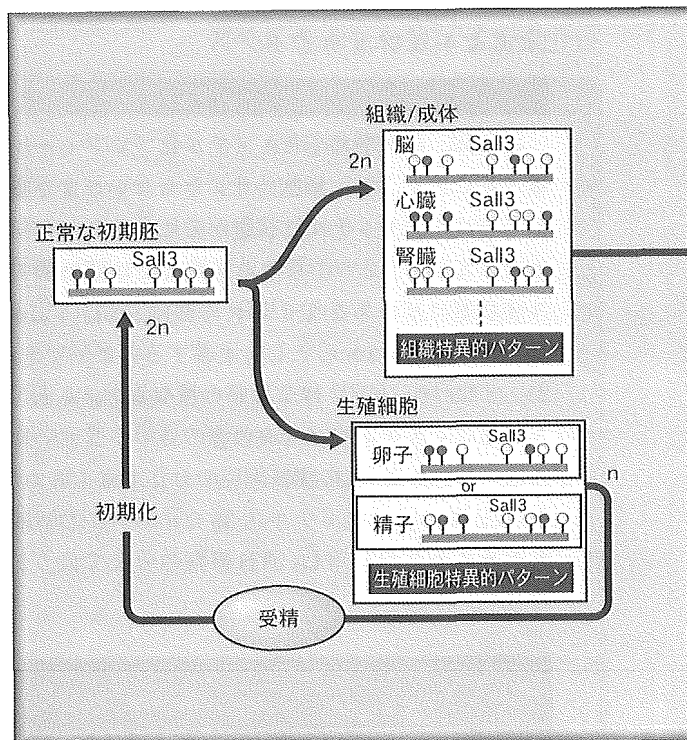


図 3 正常発生における T-DMR メチル化パターンの変化とクローン胚での異常

○：非メチル化 T-DMR，●：メチル化 T-DMR。

のに対して、エピジェネティック変化を起こす物質はエピ変異原(Epimutagen)と呼ばれる<sup>14)</sup>。従来の毒理学では、ゲノム機能変化は遺伝子の変異しか考えられていなかった。ジメチルスルホキシド(DMSO)は再生医療のための幹細胞、不妊治療のための生殖細胞や受精卵など細胞の凍結保存で使用されているが、細胞の形態や機能を変えてしまう現象がしばしば観察される<sup>15-17)</sup>。そこで DMSO のエピジェネティック制御系に及ぼす影響を調べてみると、マウス ES 細胞、および ES 細胞を分化させた胚様体において DNA メチル基転移酵素のひとつである Dnmt3a の発現の上昇が認められた。さらに、ゲノム全域の DNA メチル化状態を解析すると、DMSO は DNA メチル化プロファイルのほとんど(約 99%)には影響を与えないが、ある特定の遺伝子座においてはメチル化、脱メチル化をとまない DNA