

LC/MS によるアレルギー性化学物質の検出と スクリーニングへの応用*

森 脇 洋**・清水 充**
田 中 正 宣**・鶴 保 謙四郎**

キーワード ① LC/MS ② GPC カラム ③アレルギー性化合物 ④スクリーニング

要 旨

生活環境、室内環境に存在する可能性のあるアレルギー性化合物5種についてLC/MSを用いた検出法を開発し、LC/MSがこれら物質のスクリーニングに用いることができないか検討を行った。選択した化合物は有機金属化合物や4級アンモニウムを含む化合物を含み、GC/MSによる一斉検出は困難である。一方、LC/MSではGPCカラムにより分離を行うことにより、これら物質のピークが得られた。本法では、5種のアレルギー性化合物の一斉検出が可能であった。

1. はじめに

スギ花粉症やアトピー性皮膚炎といったアレルギー疾患を有する人の増加傾向に伴い、近年、「アレルギー」に対する関心が高まっている。アレルギーとは“免疫反応が結果として生体に危害を与えてしまう状態”と定義できる。このアレルギーの原因となる物質(アレルゲン)は多岐にわたっており、身体への侵入経路により大きく分類されている。呼吸などから侵入する吸入アレルゲン(たとえばスギ花粉など)、食物を通じて侵入する経口アレルゲン(卵など)、皮膚接触を通じて侵入する接触アレルゲン(ニッケルなど)などが挙げられる。とくに室内環境におけるアレルゲンの存在は、アレルギー症状を引き起こす重要な原因となりうることから、環境問題としてアレルギーを考える動きがさかんになってきている¹⁾。

室内環境、あるいは生活環境に起因するアレルギーとして問題になると考えられるのは吸入ア

レルゲンと接触アレルゲンであろう。これらアレルゲンのスクリーニングは、アレルギーの原因が何か早急に突き止めるうえで重要な意味を有する。本報では、とくに接触アレルゲンに着目した。

われわれが日常生活において曝露する可能性がある接触アレルゲンとしてはニッケルをはじめとする金属類、あるいは生活用品に使用されている種々の有機化合物が考えられる。重金属類の分析は、アレルギー性が疑われる試料を水や酸で溶出試験を行ない、溶出液をICP/MSなどにより分析することにより、その存在の有無を明確にすることができる。一方、接触アレルゲンとして考えられる有機化合物の分析については、分析法が確立されていない物質も多く、簡易なスクリーニング法、分析法の開発が急がれるところである。

身の回りに存在する接触アレルゲンとして考えられる有機化合物には、どのような物質があるのだろうか?近年の抗菌ブームの高まりなどからブ

*Detection of Allergenic Chemicals by LC/MS and the Application for the Screening of Allergen

**Hiroshi Moriwaki, Mitsuru Shimizu, Masanobu Tanaka, Kenshiro Tsuruho (大阪市立環境科学研究所), Osaka City Institute of Public Health & Environmental Sciences

表1 アレルギー性を有する抗菌剤の例

抗菌剤	略式	人に対する皮膚感作性	実験動物に対する皮膚感作性	使用例	参考文献
10, 10'-oxybis-10H-phenoxarsine	OBPA	有	報告例無し	人工皮革	2
4, 4'-(tetramethylenedicarbonyldiamino)-bis(1-decylpyridinium bromide)	TMCBDPB	報告例無し	有	塗料	3
N,N'-hexamethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	HMBCDPB	報告例無し	有	塗料	3
1, 2-benzisothiazolin-3-one	BIT	有	有	印刷用インク・壁紙用接着剤	4
N-n-butyl-1, 2-benzisothiazolin-3-one	BBIT	報告例無し	有	プラスチック製品・塗料	5

プラスチック製品、繊維、食品、塗料などの家庭製品には各種の抗菌剤が使用されている。清水らはこれら抗菌剤の多くに、アレルギー性の接触皮膚炎を生じさせる可能性のある皮膚感作性を示す物質があることを報告した²⁻⁵⁾。清水らにより報告された皮膚感作性を有する抗菌剤を表1に示す。これら化合物は、たとえば人工皮革など皮膚と直接、接触する機会の多い家庭用品に含まれていることが報告されており⁶⁾、アレルギー症状を起こす原因となりうる。表1に示した化合物のうちOBPAのような有機金属化合物、TMCBDPB

やHMBCDPBのような4級アンモニウムを含む化合物は不揮発性であることから、GC/MSによる測定が困難である。そこで、本報では、家庭用品に用いられる抗菌剤のうちアレルゲンの可能性が指摘されている5種の物質(OBPA, TMCBDPB, HMBCDPB, BIT, BBIT: 図1にその化学構造式を示した)を取り上げ、LC/MSによる簡易スクリーニング法を検討した。

2. 実験

OBPAは市販製品 Vinylzene BP 5-2 PG(株野村事務所)から再結晶法により単離したものを使用した。TMCBDPBは市販製品ダイマー136(イヌイ株)、HMBCDPBはダイマー38(イヌイ株)をそのまま使用した。BITはセネガ製のProxel PL, BBITはアビシア株製の市販品 Vanquish 100を用いた。アセトニトリルはHPLCグレードを用いた。

LC/MSはアプライドバイオ社製API2000を用いた。液体クロマトグラムはアジレント製HP1200シリーズを使用した。質量分析計の条件を表2に示す。

カラムには東ソー Tosoh VMPAK25(2.0×150 mm)を用いた。移動相はアセトニトリルと水(酢酸アンモニウム 2 mM, 酢酸 2 ml/l)を用い、アセトニトリルの比率が0-10分では10%に固定し、10

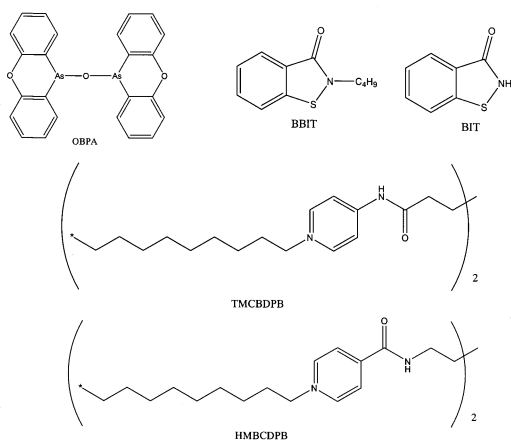


図1 アレルギー性化合物の化学構造式

表2 主なMSの操作パラメーター

Parameter	Setting
イオン化法	エレクトロスプレー法 (ポジティブイオンモード)
イオンスプレー電圧	5.0kV
カーテンガス	40 ^a
ペーパーライザー温度	500℃
デクラスター電圧	30, 50, 50, 20, 20 (それぞれ OBPA, TMCBDPB, HMBCDPB, BIT, BBIT)

a 機器の設定値

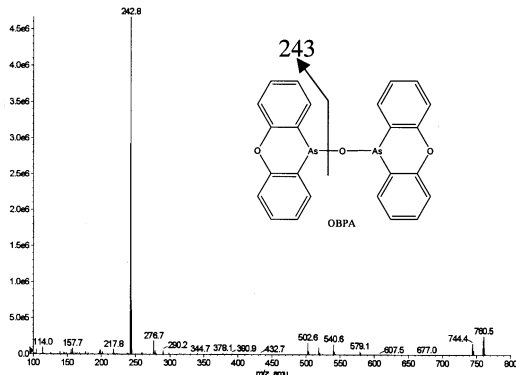
-20分で90%まで上昇させ、20-30分で90%に固定した。

3. アレルギー性化合物のマススペクトル

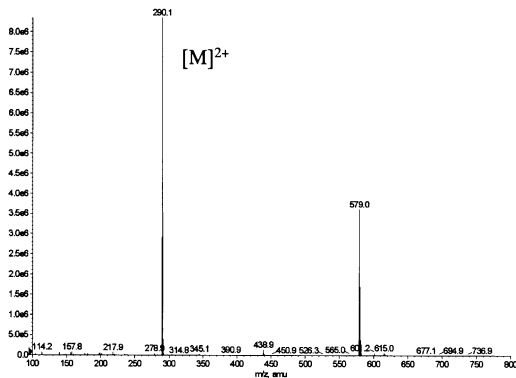
最初に OBPA, TMCBDPB, HMBCDPB, BIT, BBIT のマススペクトルをエレクトロスプレーイオン化法のポジティブイオンモードを用いて測定した。各化合物の100ppmのアセトニトリル溶液を用い、フローインジェクション法によりマススペクトルを得た。OBPAでは砒素と酸素の結合が切れたフラグメントイオン(m/z 243)がベースピークとして観測された。一方、TMCBDPB, HMBCDPB についてはそれぞれの二価イオンが得られた。BIT, BBIT についてはプロトンが付加したイオン $[M+H]^+$ が検出された。各化合物のマススペクトルを図2に示す。

4. アレルギー性化合物の LC 分離

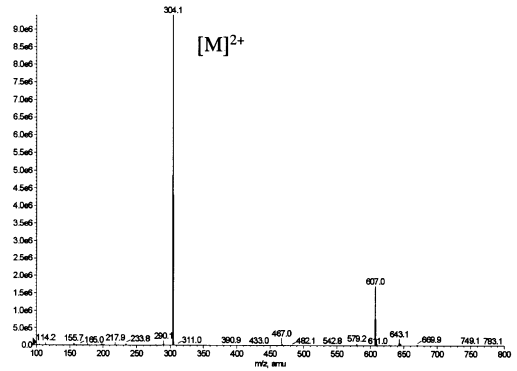
最初に5種の化合物について ODS カラムを用いた分離分析を検討した。しかし、TMCBDPB, HMBCDPB のピークが全く得られなかった。これは ODS のシラノール残基とこれら化合物の4級アミン部位が強く相互作用するためであると考えられる。また、OBPA についてはピークにテーリ



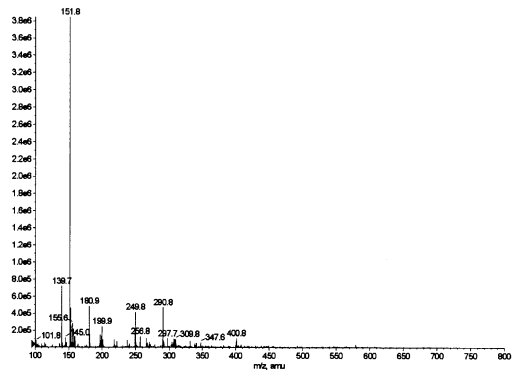
a) OBPA のマススペクトル



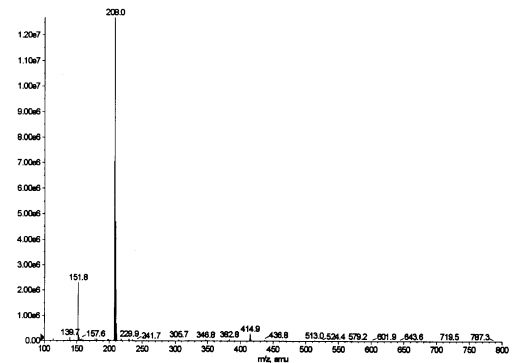
b) TMCBDPB のマススペクトル



c) HMBCDPB のマススペクトル



d) BIT のマススペクトル



e) BBIT のマススペクトル

図2 アレルギー性化合物のマススペクトル

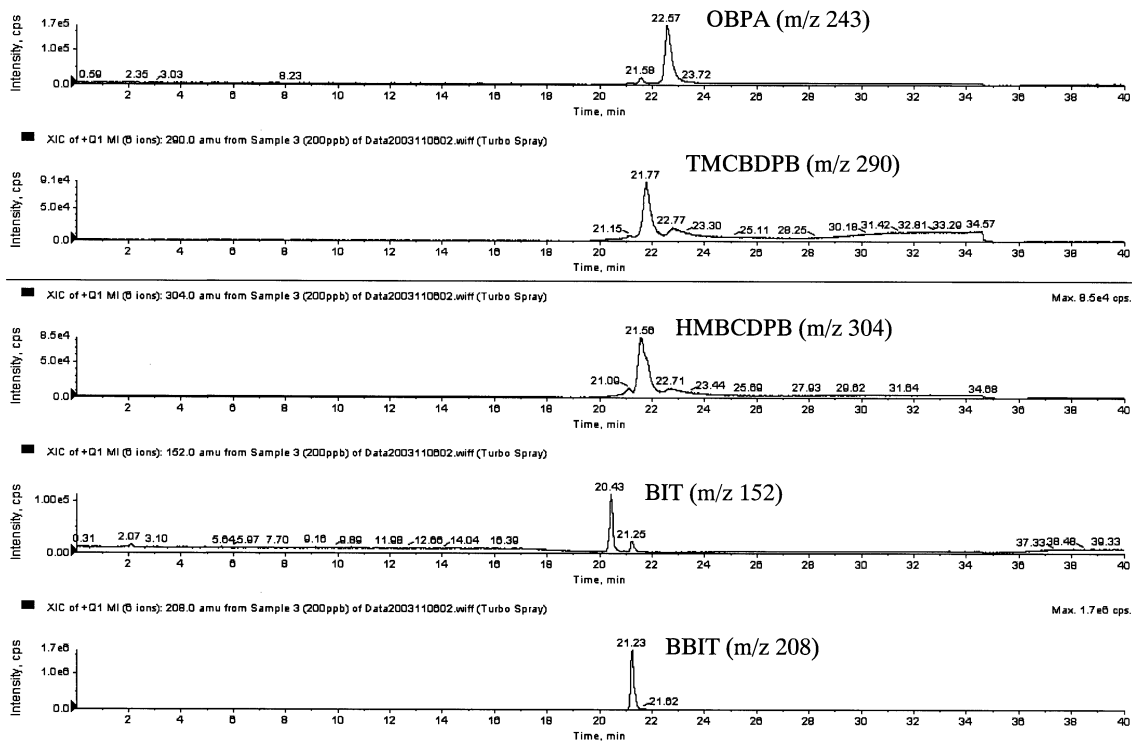


図3 アレルギー性化合物のマスククロマトグラム(200 ng/ml, 標準溶液, SIMモード)

ングの現象が見られた。そこで、ビニルポリマーを基材とした充填剤を用いた極性有機溶媒系GPCカラムであるVMPAK25を用いて、測定を行ったところ、比較的良好な形状のピークがいずれの抗菌剤についても得られた。得られたマスククロマトグラムを図3に示す。

5. アレルギー性化合物のLC/MSによる測定

LC/MSを用い、5種のアレルギー性物質の検量線を作成した。検量線はSIMモードで行った(選択したイオンはOPBA: m/z 243, TMCBDPB: m/z 290, HMBCDPB: m/z 304, BIT: m/z 152, BBIT: m/z 208)。いずれの化合物についても10-1000ng/mlの濃度範囲で $r^2 > 0.999$ の良好な直線性を示した。

この測定条件を用いて、実試料についてアレルギー性化合物のスクリーニングに用いることができなから検討を行った。実際試料としては椅子の背もたれに用いられている細菌の合成人工皮革を用いた。人工皮革はさまざまな抗菌剤が使用され

てきた経緯があり、また、人工皮革との接触によりアレルギー症状が見られた例なども報告されている⁶⁾。それゆえ、人工皮革中のアレルギー性物質のスクリーニング法を確立することは重要である。そこで廃棄されていた椅子から人工皮革を採取し(n=4)、5種のアレルギー性物質のLC/MS分析を行った。抽出方法はOBPA分析における五十嵐らの方法を参照した。すなわち細かく切った人工皮革(1gの試料を約1mm×1mmとなるようにはさみで裁断する。)にメタノール5mlを抽出溶媒として加え、30分間、振とう抽出した。溶液をろ過し、LC/MSに注入して測定を行った。今回、分析を行った人工皮革からアレルギー性物質はいずれも検出されなかった。五十嵐らは、UV検出法により古い時代の人工皮革についてOBPAを検出している⁶⁾。本研究のLC/MS法ではその検出濃度に充分対応できるが、最近の試料ではOBPAが使用されていない可能性が高い。

6. おわりに

5種のアレルギー性物質の一斉スクリーニングにLC/MSを用いる手法を示した。

なお、五十嵐らはHPLCを用いたOBPAの分析法を報告している。彼らの方法における問題点はUV検出法の選択性の低さからOBPAのピークがマトリックスピークと区別するのが困難である点であった。本報で述べたLC/MSによる分析法はMSを検出器として用いた結果、UV検出と比較し、選択性が高く、マトリックスの影響を受けにくい。実際、OBPAに対応するm/z 243におけるSIMモードのマスクロマトグラムにおいては、実試料の測定においても、ほとんどマトリックス由来のピークは見られなかった。

本手法は定量に用いるためには、抽出方法などについてさらなる検討が必要なものの、簡易スクリーニング法としては、人工皮革以外のさまざまな試料についても応用が可能であると考えられ

る。抗菌剤にはアレルギー性を示すものが少なくないが、近年、さかんに販売されている「抗菌グッズ」にどのような抗菌剤が使用されているかは、ほとんど不明である。これら抗菌グッズによるアレルギー症例が起こった際、本法は原因物質を特定するために、有用な手法となるであろう。

—参考文献—

- 1) 伊藤幸治：環境問題としてのアレルギー，NHKブックス（日本放送出版協会），東京，1995
- 2) 清水 充，山野哲夫，野田 勉：大阪市立環境科学研究所報告 調査研究年報 第64集，54-57，2002
- 3) 清水 充，山野哲夫，野田 勉：大阪市立環境科学研究所報告 調査研究年報 第64集，1-5，2002
- 4) 野田 勉，山野哲夫，清水 充：大阪市立環境科学研究所報告 調査研究年報 第60集，24-34，1998
- 5) 野田 勉，山野哲夫，清水 充：生活衛生，45，137-142，2001
- 6) 五十嵐良明，鹿庭正昭，中村晃忠：薬学雑誌，120（9），795-799，2000