解説

読物企画

Accelerator Mass Spectrometry (AMS) の生化学分野への応用

宮下 正弘*

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

(平成 13 年 11 月 20 日受理)

Applications of Accelerator Mass Spectrometry (AMS) to
Biochemical Studies

Masahiro MIYASHITA

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

Key words: accelerator mass spectrometry, dermal exposure, radioimmunoassay, protein sequencing.

はじめに

femto (f, フェムト), atto (a, アト), zepto (z, ゼプト) という言葉はあまり聞き慣れないという人が多いかもしれない。これらは物質質量を表す mol のような単位につけて使われる接頭語で、それぞれ 10^{-15} , 10^{-18} , 10^{-21} を意味する。聞き慣れないのも当然で、通常、特に生化学の研究においてこのような小さい値を用いることは稀である。微量物質を検出するための様々な方法がこれまで開発されてきたが、その中で、比較的このような超微量に出くわすのは質量分析 (MS) による研究であろう。MS は物質の分子量という基本的な物性データを与える有用な分析法として古くから広く用いられてきた。当初、MS はそのイオン化法の性質上、低分子有機化合物の構造決定に広く用いられた。近年ではエレクトロスプレーイオン化法に代表されるソフトなイオン化法が確立され、タンパク質のような生体高分子の分析まで可能になったことから、生化学領域においても必須の分析装置となってきた。MS の技術の発展が、現在盛んに行われているプロテオーム解析を推し進める原動力となっていることは言うまでもない。MS の感度は他の分析手法と比較しても高いものであり、fmol から amol レベルという超微量まで検出が可能になってきている。

Accelerator Mass Spectrometry (AMS) は一般的にはあまり知られていない特殊な装置であるが、その名の通り加速器 (Accelerator) を持つ質量分析計である¹⁾。質量分析計という名が付いてはいるが、一般的な質量分析とは異なり、「分子量」を測定することはできない。AMS では分子を構成する、ある特定の「元素」の同位体の量のみを精密に測定する。代表的な測定元素である ^{14}C の場合、従来の質量分析法では、 ^{14}C とほとんど質量が同じである ^{13}CH や $^{12}\text{CH}_2$ などを区別することができないため、 ^{14}C だけを特異的に測定することは不可能であった。それに対し、AMS では加速器をはじめとした、妨害イオンを除去する様々な工夫により、ノイズとなるバックグラウンドをほとんど排除できる。その結果として、元素の同位体、特にその自然存在比が極めて低い放射性同位体を高感度で測定することが可能となった。AMS によって測定可能な主な同位体元素を表 1 に挙げた。この中では、 ^{14}C が測定の対象になることが最も多い。考古学研究における年代測定や、地球環境解析における ^{14}C 濃度測定など、主に微量試料から高精度に同位体比を測定する必要がある目的に用いられ、これまでは得ることのできなかった多くの情報がもたらされている。

近年、米国ローレンス・リバーモア国立研究所 (LLNL) のグループを中心として、AMS の最大の利点である高感度を生かすべく、生化学分野への応用が試みられている²⁾。生化学分野において、化合物の挙動を知るためにしばし

* 〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町
E-mail: miyamas@kais.kyoto-u.ac.jp

ば ^{14}C 標識化が行われる。この ^{14}C による標識化には次のような利点が考えられる。一つは、ほとんどの化学物質は炭素を含んでおり ^{14}C で標識化しても、構造に変化を与えないこと。二つ目は、 ^{14}C が地球上において比較的少なく、ノイズとなるバックグラウンドが低いことである。また、 ^{14}C は半減期が長いので、長期に渡って保存可能であることも、その利点であろう。長い半減期を持つ ^{14}C の比放射活性は低く、通常用いられる液体シンチレーションカウンター(LSC)による測定にとっては不利であるが、AMSは原子そのものの量を“直接的”に測定するので、 ^{14}C の長い半減期は測定に影響しない。つまり、AMSでは崩壊数ではなく、質量数を14に固定して選択イオンモニタリング測定す

ると考えていただければよい。図1に示したように、感度の点ではAMSはLSCに比べはるかに高く、 ^{14}C 標識化合物の高感度検出が可能である。このことは、これまでLSCで行っていた多くの生化学研究に対して、AMSを応用することが可能であることを意味している。また、AMSは法律적으로는放射性物質とは言えないレベルで検出を行うため、測定後に放射性廃棄物が出ないという実際上の利点もある。本解説においては、AMSの生化学分野への応用例として、LLNLのJ. S. Vogelらとカリフォルニア大学デービス校のB. D. Hammockらのグループによって行われた研究について紹介する。

1. Accelerator Mass Spectrometry (AMS) の原理

LLNLにおけるAMSの装置の概略を図2に示した。ここでは ^{14}C の測定を例に挙げて、その測定原理を説明する。測定試料は多く場合そのままの状態では測定することはできず、試料を燃焼によって CO_2 の形にした後、還元してグラファイトにする必要がある。イオン源にセットされた試料はセシウムイオンビームの照射により陰イオンとして放出される。生じた陰イオンは通常の磁場型質量分析計と同様の手法により質量数14のみが選択される。このとき、内部標準となる ^{13}C を測定するために質量数13もごく短時間だけ選択される。この段階では ^{14}C に加えて、ほとんど質量数の変わらない ^{13}CH や $^{12}\text{CH}_2$ なども含まれている。これらの妨害イオンを含む陰イオンは続いて加速器に導入される。AMSには様々な種類の加速器が用いられているが、図2に示したようなタンデム Van de Graaff 型加速器が最も多く用いられている。この加速器は中央部分で高電圧(2~10 MV)で正に荷電しており、陰イオンは中央に向かって引きつけられ加速される。中央部分には炭素薄膜が存在し、陰イオンはこれに衝突することによって電子がはぎ取られ、陽イオン($\text{C}^{1+} \sim \text{C}^{6+}$)へと変換される。この際、 ^{13}CH や $^{12}\text{CH}_2$

同位体	半減期 (年)	感度 (parts per 10^{15})	イオン源での 試料の形
^3H	12.3	0.1	TiH_2
^{10}Be	1.6×10^6	5	BeO
^{14}C	5730	2	グラファイト
^{26}Al	720,000	3	Al_2O_3
^{36}Cl	300,000	5	AgCl
^{41}Ca	105,000	2	CaF_2 , CaH_2
^{129}I	16×10^6	10	AgI

図1 AMSとLSCの ^{14}C 測定感度の比較

図2 LLNLにおけるAMSの概略

などの分子イオンは結合が切断されて原子イオンとなることで妨害イオンではなくなる。 ^{14}C (主に $^{14}\text{C}^{4+}$) は、さらにマグネチックおよび静電フィルターを通した後、最終的にガスイオン化検出器によって測定される。AMS では ^{14}C の絶対量は測定できないので、同じ試料に含まれる ^{13}C を内部標準として用いている。 ^{13}C の量は加速器を出た後ファラデーカップによって測定され、 $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$ として測定値が得られる。サンプルに含まれる全炭素の量が分かっているならば ^{13}C の量は決まるので、 ^{14}C の量を決定することができる。測定感度は極めて高く、1 サンプルあたり 1 amol~10 fmol (およそ 0.0001 dpm~1 dpm) の ^{14}C を定量することが可能である (図 1)。 ^{14}C は現在の地球上の生物圏では 1 mg の炭素中に約 100 amol 含まれている。そのため、amol レベルで測定を行う場合は特にコンタミネーションの防止に細心の注意を払う必要がある。ちなみに、多くの試薬類は石油を原料として作られており、 ^{14}C をほとんど含まない“Dead Carbon” からなっているので、測定にはほとんど影響しない。

2. ヒトによる農薬の吸収・代謝・排出の研究

農家のような農薬散布を頻繁に行う人にとって、生体異物である農薬の皮膚あるいは呼吸を通した吸収による健康への影響は重大な関心事である。しかしながら、農薬がどれくらい皮膚を通して吸収され、どのように代謝されるのかについては、ヒトに対して実験を行うことが難しいため、分からないことが多い。一般的に生体異物の吸収・代謝・排出の研究には放射性同位体で標識化した化合物が用いられ、その検出には LSC が用いられる。LSC で検出するには比較的高濃度で化合物を投与する必要があるが、実際にヒトを用いたこのような実験は、人体に対する化合物自身の毒性や放射能による悪影響などの問題があり容易に行うことができない。また、放射性廃棄物などの実際上の問題もある。動物を用いて同様の実験を行うことは可能であるが、必ずしもそこから得られた情報がヒトに対して適用できるわけではなく、ヒトを用いて健康に影響しない濃度でこういった実験が行えることが望ましい。AMS は LSC に比べはるかに高感度であり、用いる放射能の量を極端に減らすことが可能である。つまり人体に悪影響を及ぼさない量でヒトを用いて実験を行うことができる。

アトラジン (図 3) は世界で最も使用された除草剤の一つであり、その毒性は低いとされているが、ヒトに対する影響はいまだ不明な点が多い。ヒトにおけるアトラジンの皮膚からの吸収・代謝を詳細に調べるために、 ^{14}C 標識アトラジンを用いた実験が行われた³⁾。この研究では、まず LSC と AMS の感度の比較が行われた。比較的多い量の標識化合物 (一人当たり 6.45 μCi あるいは 24.7 μCi) が投与されているが、これは LSC で測定できる最低限の放射性同位体の量である。AMS のみを測定に用いる場合、500 nCi にま

図 3 アトラジンおよび TCDD の構造

で減らすことが可能であり、経口あるいは静注投与ではさらに 100 nCi にまで減らすことができる。この程度の放射性同位体による被曝量は、数時間の飛行機旅行で浴びる宇宙線による被曝量とあまり変わらない。

健康なボランティアのヒトに対し所定の量の標識化合物を皮膚上から 24 時間にわたって投与し続け、一定時間毎の尿中に排出される ^{14}C の量が LSC または AMS によって測定された。その結果、7 日間にわたる LSC と AMS による定量は非常に良く一致したが、吸収および排出の量は、動物実験などからの予測よりは低いものであった。また、測定感度を比較すると、AMS は LSC に比べ、濃度にして 12 倍、物質量にして 1 万倍もの低い検出限界を有していた。さらに、尿中における代謝物の同定が、HPLC 分析上における標品との比較により行われた。この研究で用いられた標識化合物の量は、尿中の全放射能を LSC によって測定できる限界に設定されたので、HPLC による分離後の個々のフラクションの ^{14}C 量はもはや LSC では定量することはできなかった。一方、AMS では HPLC による分離後も各フラクションの ^{14}C の定量が可能であった。また、HPLC 分析の際、標品は ^{14}C をほとんど含んでいないので、試料と同時にインジェクションすることが可能であり、UV 検出と AMS による検出を比較することで各ピークを容易に同定することができた。このように、AMS を用いることにより、人体に対して悪影響を与えない濃度で、ヒトを用いて生体異物の吸収・代謝・排出についての研究を行うことが可能であることが示された。同様の手法はもちろん、栄養素や医薬品の体内動態研究にも応用可能であり、いくつかの例が既に報告されている⁴⁾。イギリスにある CBAMS (The Center for Biomedical Accelerator Mass Spectrometry) Ltd. では受託測定を始めており、今後 AMS を用いた薬物動態研究の例は増えていくであろう。

3. AMS を用いたラジオイムノアッセイ

抗原抗体反応を利用したイムノアッセイは様々な分野に

において用いられている重要な分析手法である。最近では、狂牛病の病原体の検出に使われていることで、一般の人にも広く知られるようになってきた。開発初期におけるイムノアッセイでは放射性同位体によって標識された抗原あるいは抗体を用いるラジオイムノアッセイが盛んに行われた。 ^{32}P や ^{125}I のような放射性同位体を用いることで、高感度の検出が行えるが、半減期が短いため標識体が長期保存できないという問題があった。一方、放射性同位体によって抗原を標識する場合、 ^{14}C や ^3H などは抗原の構造を変えずに導入が可能であるため、より直接的に抗原と抗体との相互作用が測定できる。しかし、これらの同位体は比較的半減期が長いので、LSCによる測定では検出感度があまり良くないという問題がある。また放射性同位体を用いた実験を行える場所は限定されており、放射性廃棄物などの問題もあって、現在ではラジオイムノアッセイに代わって酵素標識による方法(ELISA法など)が用いられることがほとんどである。しかしながらAMSは ^{14}C を高感度に検出することができるため、これまでの ^{14}C 標識化合物を用いたラジオイムノアッセイの欠点である、感度の問題を克服することができる。この考えに基づいて、農薬のアトラジン、ダイオキシン類のTCDD(図3)に対するAMSを用いたラジオイムノアッセイが検討された⁵⁾。

まず、 ^{14}C -アトラジン(17.7 mCi/mmol)に対する検量線がAMS測定により求められた。その結果、AMSによる定量は3桁以上に渡って直線性を有しており、定量限界はわずか12 amolであった。AMSによるラジオイムノアッセイの方法の概略を図4に示したが、一つの反応にはアトラジン、TCDDはそれぞれわずか0.24 pC(80.53 dpm)が用いられるのみである。もちろん、この量はLSCでは検出不可能であり、放射性廃棄物としての基準以下である。AMSを用いてアトラジン、TCDDのラジオイムノアッセイが行われた結果、検出感度がELISA法と比較して10倍程度向上した。この検出感度は、抗体の K_d 値から推測される理論値に近く、AMSを用いるラジオイムノアッセイが非常に優れていることを示している。酵素標識法によってもある程度高感度なイムノアッセイを構築することは可能であるが、様々な抗原と抗体との組み合わせを試す必要がある。

一方、AMSを用いるラジオイムノアッセイでは、標識抗原は ^{14}C を含む以外は測定対象となる化合物と同じ構造であるため、このような最適化が必要ではなく、その感度は抗体の性質によってのみ決まる。このように、AMSを用いるイムノアッセイは、これまでにない感度が得られるだけでなく、シンプルに実験系を構築できることや、放射性廃棄物を出さないといった点においても優れた方法であることが示された。AMSを用いる方法では、 ^{14}C 標識化合物を合成しなければならないという問題がある。しかしながら、対象となる農薬などは一般的にその開発段階で、代謝実験などの目的で標識体が合成されることが多く、標識化の方法については詳細に検討されている場合が多い。

4. 超高感度タンパク質シーケンシング

様々な生物のゲノム解析が行われ、データが蓄積しつつある現在、その次の段階として遺伝子の翻訳によってできるタンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)に関心が持たれている。プロテオーム解析においてはタンパクは二次元電気泳動などの技術によって分離された後、個々のスポットはエドマン分解法やMSを駆使してそのアミノ酸配列が決定される。こういった研究では、ハイスループットが何よりも重要であるため、比較的高感度(fmolオーダー)かつ迅速に配列が得られる、MSを用いたアミノ酸配列決定法が主に用いられる。しかしながら、この方法は等しい質量数を有するイソロイシンとロイシンや、ほぼ等しいグルタミンとリジンを区別することができないという欠点があり、新規なタンパク質の解析に用いることは困難である。一方、エドマン分解法は最も確立されたアミノ酸配列決定法であり、広く用いられてきたものの、MS法に比べ感度が低く、通常分析ではpmolオーダーの試料を要する。感度については、エドマンによる発明以降様々な工夫が行われ、その向上が図られてきた。中でも、エドマン分解反応(図5)によって得られるPTH-アミノ酸の検出を、UV検出器を装備したHPLC法で行えるようになって格段に感度が上昇した。現在のシステムは基本的には20年ほど前のこの段階とほとんど同じである。その後の改良はゆっくり進み、現在では数百fmolの試料の解析が可能となってきたが、感度の面ではMS法に大きく水をあけられた感がある。

エドマン分解法の改良の歴史の中で、PTH-アミノ酸の検出感度を上げるために放射性同位体(^{14}C , ^3H , ^{35}S)による標識エドマン試薬(phenyl isothiocyanate, PITC)が用いられたことがあった。この方法は、当時としては高感度であったが、その後のHPLCの導入により感度の面だけでなく、簡便さにおいても劣るため用いられなくなった。しかしながら、AMSを検出器として用いることにより、放射性同位体標識したPTH-アミノ酸を極めて高感度に検出できるとの考えのもと、すべてのアミノ酸を ^{14}C 標識したタン

図4 AMSを用いたラジオイムノアッセイの方法の概略

パク質を用いてその検討が行われた⁶⁾(図 6-A)。¹⁴C 標識化タンパク質は大腸菌を用いた発現系において合成された。まず、1.8 fmol のタンパク質を用いて、配列決定が試みられた。この量は従来のエドマン分解法では分析不可能な量であることは言うまでもないが、MS 法においても困難である。エドマン分解を 10 サイクル行い、それぞれ得られた PTH-アミノ酸を HPLC によって分離し、AMS 測定を行っ

図5 エドマン分解反応

た。その結果、 $[^{14}\text{C}]\text{PTH-アミノ酸由来の HPLC ピークにのみ }^{14}\text{C}$ が観測され、10 残基の N 末端配列を同定することができた (図 7)。UV 検出の場合、溶媒を含め、様々なものに由来する UV 吸収性物質が解析の邪魔をすることが多いが、AMS による ^{14}C 測定の場合、極めてバックグラウンドのノイズが低く、容易にピークを同定することができた。また、タンパク質の微量分析の場合、試料が器壁に吸着するなどしてほとんど失われてしまう場合がある。ここでは、それを防ぐため大過剰の非標識タンパク質が試料の希釈の段階から添加されている。AMS による測定ではこの ^{14}C 非標識のタンパク質は測定に影響しない。このような工夫により、反復収率も 88% とまずまずの結果であった。実際、試料を希釈する際に非標識タンパク質を入れなかつ

図6 AMSを検出器に用いたエドマン分解によるアミノ酸配列決定法

A) ^{14}C 標識化タンパク質を用いる方法. B) ^{14}C 標識化 PITCH を用いる方法.

図 7 1.76 fmol の¹⁴C 標識化タンパク質を用いたエドマン分解反応後の PTH-アミノ酸の AMS による同定

A) 標準 PTH-アミノ酸混合物の UV 検出による HPLC 分析. B) AMS による HPLC フラクシオンの ^{14}C 量の測定結果. 矢印は同定されたアミノ酸のピークを示し、数値は ^{14}C の量から計算された収量を表す.

た場合、大幅なシグナルの減少が見られた。さらに、amol レベルでの解析が行われた結果、100 amol においても有意に HPLC ピークが観測され、AMS を用いたエドマン分解法が amol レベルにおいてもアミノ酸配列を決定できることが示された。ここで述べた配列決定法は、タンパク質を ^{14}C で標識する必要があるため、限られた状況でしか用いることができない。さらに適用範囲を広げ、一般的な方法となるにはタンパク質ではなくエドマン試薬 (PITC) を ^{14}C 標識する必要がある。図 6-B に示したように、 ^{14}C 標識化 PITC を用いることでも同様に ^{14}C PTH-アミノ酸が得られ、AMS で検出することが可能となるであろう。

微量のタンパク質の量を正確に定量することもまた難しい。AMS による ^{14}C の検出は高感度であるだけでなく、定量的でもある点を生かし、微量タンパク質の定量に用いる試みも行われている⁷⁾。タンパク質の研究では、より高感度な微量分析技術が求められており、AMS は今後このような分野でも多く用いられるであろう。

お わ り に

AMS の最大の特徴である定量性と高感度を生かした研究例について述べてきたが、これらの例がもっと一般的になるには越えなければならないハードルはいくつかある。まず、AMS が巨大な装置であることが挙げられる。図 1 にも示したように、LLNL の AMS は加速器だけで 15 メートルもの長さを有しており、装置全体を含めると、体育館ほどの広さが必要となってくる。また、ほとんどの AMS は特注であり、その製造コストは莫大である。実際、LLNL のもので約 700 万ドル (\$1=¥120 として 8 億 4 千万円) もの巨額の費用を必要とした。しかしながら、これらの問題は技術の進歩と需要の増加により克服されるものであろう。現在、LLNL では生医化学分野専用の小型 AMS が稼働しつつある。ほとんどの生医化学分野での測定は、 ^{14}C を用いるので、これに限定することでこれまでの装置の 12 分の 1 にまで小型化が可能となり、製造コストも従来の装置よりも大幅に削減されている。今後、装置の設置面積が現在の NMR ぐらいになり、価格が 1 億円を下回るようになれば、AMS を導入する研究機関は増えていくであろう。

AMS が一般的な測定装置となるには、もう一つ越えなければならない障壁がある。 ^{14}C の測定の際、試料はそのままの状態では用いることができず、あらかじめグラファイトにしておく必要がある。この作業は経験を要するだけでなく、時間もかかるものであり、測定の効率化のボトルネックとなっている。ここで例に挙げた研究においても、HPLC による分離の後、各フラクションを個々にグラファイト化し、測定を行っている。もし、このような試料調製を自動化できたり、HPLC や GC による分離後、直接試料を AMS に導入することができれば、より一層の測定の効率化が図

れるであろう。現在、この問題に対処すべく新たな装置の設計・改良が進められている⁸⁾。

最近の様々な検出手法の改良や発明により、amol オーダーという超微量での測定がかなり身近なものとなってきた。1 mol は 6.02×10^{23} 個の原子・分子を指すが、1 amol では 6.02×10^5 個に相当する。今後さらに測定感度の向上が進むと、mol ではなく分子の数で言い表すほうが分かりやすい時代が訪れるであろう。

引 用 文 献

- (a) L. K. Fifield: *Rep. Prog. Phys.* **62**, 1223-1274 (1999)
(b) J. S. Vogel, K. W. Turteltaub, R. Finkel & D. E. Nelson: *Anal. Chem.* **67**, A353-A359 (1995)
- (a) J. S. Felton, K. W. Turteltaub, J. S. Vogel, R. Balhorn, B. L. Gledhill, J. R. Southon, M. W. Caffee, R. C. Finkel, D. E. Nelson, I. D. Proctor & J. C. Davis: *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B* **52**, 517-523 (1990)
(b) K. W. Turteltaub, J. S. Felton, B. L. Gledhill, J. S. Vogel, J. R. Southon, M. W. Caffee, R. C. Finkel, D. E. Nelson, I. D. Proctor & J. C. Davis: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 5288-5292 (1990)
- (a) S. D. Gilman, S. J. Gee, B. D. Hammock, J. S. Vogel, K. Haack, B. A. Buchholz, S. Freeman, R. C. Wester, X. Y. Hui & H. I. Maibach: *Anal. Chem.* **70**, 3463-3469 (1998)
(b) B. A. Buchholz, E. Fultz, K. W. Haack, J. S. Vogel, S. D. Gilman, S. J. Gee, B. D. Hammock, X. Hui, R. C. Wester & H. I. Maibach: *Anal. Chem.* **71**, 3519-3525 (1999)
- (a) S. R. Dueker, Y. Lin, B. A. Buchholz, P. D. Schneider, M. W. Lame, H. J. Segall, J. S. Vogel & A. J. Clifford: *J. Lipid Res.* **41**, 1790-1800 (2000)
(b) B. A. Buchholz, A. Arjomand, S. R. Dueker, P. D. Schneider, A. J. Clifford & J. S. Vogel: *Anal. Biochem.* **269**, 348-352 (1999)
(c) A. J. Clifford, A. Arjomand, S. R. Dueker, P. D. Schneider, B. A. Buchholz & J. S. Vogel: *Adv. Exp. Med. Biol.* **445**, 239-251 (1998)
- G. Shan, W. Huang, S. J. Gee, B. A. Buchholz, J. S. Vogel & B. D. Hammock: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2445-2449 (2000)
- M. Miyashita, J. M. Presley, B. A. Buchholz, K. S. Lam, Y. M. Lee, J. S. Vogel & B. D. Hammock: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4403-4408 (2001)
- J. S. Vogel, P. G. Grant, B. A. Buchholz, K. Dingley & K. W. Turteltaub: *Electrophoresis* **22**, 2037-2045 (2001)
- (a) B. J. Hughey, R. E. Klinkowstein, R. E. Shefer, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum & J. S. Winshnok: *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B* **123**, 153-158 (1997)
(b) D. J. W. Mous, K. H. Puesser, W. Fokker, R. van den Broek & R. B. Koopmans: *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B* **123**, 159-162 (1997)