

全自動LCMS前処理装置 CLAM™-2030
高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMSTM-8060

全自動前処理装置付き LC/MS/MSシステムによる ヒト血漿中一次代謝物の測定

井本 英志、川上 大輔

ユーザーベネフィット

- ◆ 血漿に含まれる一次代謝物を網羅的に測定することができます
- ◆ 煩雑な試料前処理を自動で行います
- ◆ 前処理作業の属人性を排除し、手技による定量結果のバラツキを低減します

■はじめに

多数の代謝物を網羅的に解析する手法であるメタボロミクス解析は、食品の機能解析や発酵生産性の改善、生理・病理機構の解明など、幅広い分野・用途で用いられています。メタボロミクス解析には、液体クロマトグラフ質量分析計などの質量分析計が用いられています。近年、メタボロミクス解析が、疾患マーカーや薬剤の効果・毒性予測マーカーの探索などの臨床研究（Clinical Research）に利用されつつあります。しかし、メタボロミクス解析のための前処理および質量分析計の操作は、一般的な検体検査における操作と比べて煩雑であり、作業者の手技に由来するバラツキや作業ミスリスクが課題です。また、試料数の増加に応じて作業者の負荷が増えるため、多数の試料を測定する際には一連の分析ワークフローの中で前処理過程がボトルネックとなることもあります。

全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムによる一次代謝物の一般的な前処理プロトコルでは、有機溶媒の添加による除タンパク、固体成分の遠心分離による除去と上清分取などのステップを行います。本報では全自動LCMS前処理装置CLAM-2030および高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-8060からなる全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステム（図1）を用いて、メタボロミクス解析を臨床研究に適用する際の前処理の課題を解消できる分析例をご紹介します。



図1 全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステム
(CLAM™-2030+LCMSTM-8060)

■全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステム による一次代謝物一斉分析のワークフロー

CLAM-2030では、採血管などをセットするだけで試料の前処理を全自動で行います。前処理後のサンプルはオートサンプラーへ自動搬送され、LC/MS/MSによる分析が行われます。このLC/MS/MSによる分析を含むワークフローと前処理プロトコルを図2に示します。LC条件、MS条件およびMRM transitionの各パラメータ設定は「LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 Ver.2」（表1）に準じました。測定対象は「LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 Ver.2」の一部を変更し設定しました。

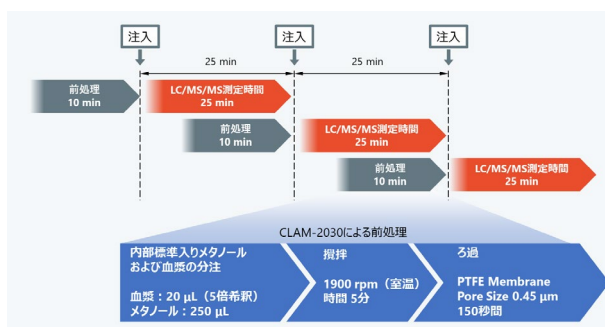


図2 CLAM-2030による血漿の前処理フロー

表1 LCおよびMSの分析条件

Liquid chromatograph	
System	: Nexera™ X2
Column	: Reversed-phase column
Mode	: Gradient elution
Injection volume	: 2 µL
Mobile phase A	: 0.1% formic acid in Water
Mobile phase B	: 0.1% formic acid in Acetonitrile
Flow rate	: 0.25 mL/min
Mass spectrometer	
System	: LCMSTM-8060
Ionization	: ESI (Positive/Negative)
Nebulizing gas	: 3 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min
DL temp	: 250 °C
Heat block temp	: 400 °C
Interface temp	: 300 °C

■全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムによる臨床検体およびQC検体の連続分析

本分析では、1日あたり10本の臨床検体を22日間測定しました（計220検体）。市販ヒト血漿をQC検体とし、QC検体を測定した後、臨床検体10本を測定しました。内部標準物質にはD3-Creatineを用いました。表2に全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムを用いてQC検体より検出した一次代謝物の一覧を示します。「LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 Ver.2」に含まれるアミノ酸、有機酸、ヌクレオシドを中心とした計55成分を検出しました。

QC検体を22回測定した際の各一次代謝物の面積値%RSDを算出しました。また、各一次代謝物とD3-Creatineとの面積比%RSDを算出し、面積値%RSDおよび面積比%RSDそれぞれのデータ区間と頻度を表したヒストグラムを図3に示します。55成分の内33成分（60%）が面積値%RSD 10%以下、51成分（93%）が面積値%RSD 20%以下でした。一方でD3-Creatineで補正した場合、55成分の内37成分（67%）が面積比%RSD 10%以下、52成分（95%）が面積比%RSD 20%以下でした。

表2 QC検体より検出した一次代謝物一覧

化合物名	化合物分類	化合物名	化合物分類
2-Aminobutyric acid	アミノ酸	Valine	アミノ酸
4-Aminobutyric acid	アミノ酸	Carnitine	アミノ酸誘導体
4-Hydroxyproline	アミノ酸	Creatinine	アミノ酸誘導体
Alanine	アミノ酸	Kynurenine	アミノ酸誘導体
Arginine	アミノ酸	S-Adenosylhomocysteine	アミノ酸誘導体
Asparagine	アミノ酸	Adenine	塩基
Aspartic acid	アミノ酸	Choline	コリン
Asymmetric dimethylarginine	アミノ酸	Acetylcarnitine	脂質
Citrulline	アミノ酸	Inosine	ヌクレオシド
Cystathionine	アミノ酸	Uridine	ヌクレオシド
Cysteine	アミノ酸	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	ヌクレオチド
Glutamic acid	アミノ酸	Adenosine monophosphate	ヌクレオチド
Glutamine	アミノ酸	Niacinamide	ビタミン
Glycine	アミノ酸	Allantoin	プリン誘導体
Histidine	アミノ酸	Hypoxanthine	プリン誘導体
Isoleucine	アミノ酸	Carnosine	ペプチド
Leucine	アミノ酸	2-Ketoglutaric acid	有機酸
Lysine	アミノ酸	Argininosuccinic acid	有機酸
Methionine	アミノ酸	Cholic acid	有機酸
Methionine sulfoxide	アミノ酸	Citric acid	有機酸
Ornithine	アミノ酸	Creatine	有機酸
Phenylalanine	アミノ酸	Guanidoacetic acid	有機酸
Proline	アミノ酸	Isocitric acid	有機酸
Serine	アミノ酸	Lactic acid	有機酸
Symmetric dimethylarginine	アミノ酸	Pantothenic acid	有機酸
Threonine	アミノ酸	Succinic acid	有機酸
Tryptophan	アミノ酸	Uric acid	有機酸
Tyrosine	アミノ酸		

* LC/MS/MS メソッドパッケージ一次代謝物 Ver.2登録化合物を一部変更しました

LCMS、NexeraおよびCLAMは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

以上の結果より、全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムは、前処理の負担を軽減するだけでなく、測定毎のバラツキを低減することが可能です。また、内部標準物質を添加することで、より安定した連続分析を達成しました。

1日10検体の臨床検体を22日間（計220検体）測定した際のD3-Creatineの面積値推移を図4に示します。22日間の測定において、装置のチューニングや分析カラムの変更は実施しておりません。この連続測定において、D3-Creatineの面積値%RSDは5.9%を達成しました。これらの結果から、QC検体だけでなく、臨床検体においても安定した連続分析を実現する事が示されました。

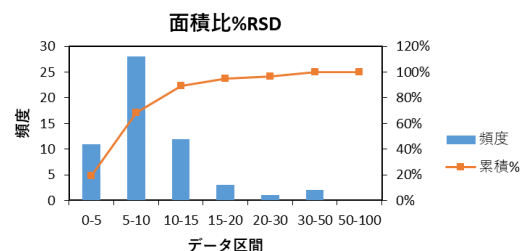
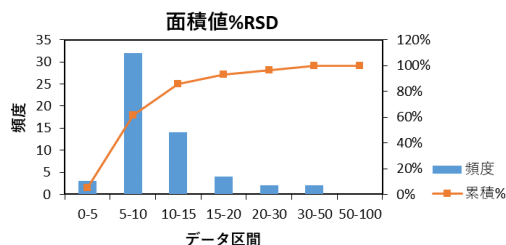


図3 QC検体22測定の面積値%RSDとD3-Creatineとの面積比%RSDのヒストグラム

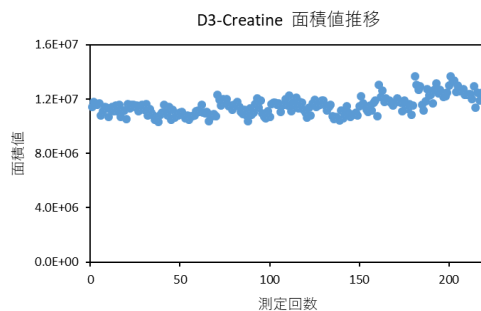


図4 22日間の臨床検体繰り返し測定（計220検体）におけるD3-Creatineの面積値推移

■まとめ

全自動LCMS前処理装置CLAM-2030および高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-8060からなる全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムを用いて一次代謝物の一斉分析を行いました。臨床検体およびQC検体に対して安定した連続測定を実現しました。本システムは、メタボロミクス解析によるマーカー候補の探索や検証に用いるシステムとしての今後の発展が期待されます。

■謝辞

本資料における検討には、兵庫医科大学 疾患オミクス解析学講座 特任講師 西海 信先生より多大なご協力をいただきました。