

## エイコサノイド類196成分に対応した代謝マップによる解析ツールの開発

山田 真希, 長野 直子, 馬越 泰, 山田 洋平

### ユーザーベネフィット

- ◆ 「LC/MS/MSメソッドパッケージ 脂質メディエーター Ver. 3」が対象とする196成分の代謝マップによる解析ツールをご利用いただけます。
- ◆ 脂肪酸代謝物の量的な違いを代謝マップ上に表示することで、関与する代謝酵素を容易に解析できます。

### ■はじめに

エイコサノイドは、主にアラキドン酸カスケードに属する生理活性脂質（脂質メディエーター）を指します。近年のLC/MSの高感度化と高速化により、アラキドン酸代謝物や $\omega$ 3脂肪酸代謝物など100成分以上の脂肪酸代謝物を網羅的に分析する手法が開発され、生理機能の解明やバイオマーカー探索に用いられています。

我々はこれまでに196成分のエイコサノイド類一斉分析法「LC/MS/MSメソッドパッケージ 脂質メディエーター Ver. 3」を開発しました。本稿では、この196成分の代謝マップ表示による解析ツールを新規開発し、ヒト血しょうと血清から検出された代謝物の比較解析を行った例を紹介いたします。196成分の一斉分析法により、血しょうと血清から延べ68成分の代謝物が検出されました。この解析ツールを用いることで、検出された代謝物に関与する酵素を容易に確認することができました。

### ■分析条件

標準試料は、Cayman Chemical(Ann Arbor, MI)から購入しました。ヒト血しょうとヒト血清は、コージンバイオ株式会社から入手しました。ヒト血しょうは、EDTA血しょう(EDTA Plasma)とヘパリン血しょう(Heparin Plasma)の2種類用いました。

測定機器は、LC-40シリーズNexera™ UHPLCシステムと超高速トリプル四重極質量分析計LCMS-8060NX (図1)を使用しました。HPLCおよび質量分析計の分析条件を表 1に示します。

### ■前処理

ヒト血しょうおよび血清30  $\mu$ Lに0.1 %ギ酸を含むメタノールを300  $\mu$ Lと18成分の内部標準物質溶液を10  $\mu$ L添加し、約3分間攪拌しました。遠心分離後、上清を0.1 %ギ酸水で3倍に希釈して固相抽出カートリッジに添加しました。抽出液を乾固した後メタノール30  $\mu$ Lで溶解し、5  $\mu$ LをLC/MS分析に供しました。各サンプルについて3回分析しました。

表 1 分析条件

<b>[HPLC conditions] (Nexera X3)</b>	
Column	: Kinetex™ C8 (150 mm $\times$ 2.1 mm I.D., 2.6 $\mu$ m)
Column oven	: 40 °C
Solvent A	: 0.1 % Formic acid – water
Solvent B	: Acetonitrile
Flow rate	: 0.4 mL/min
Injection volume	: 5 $\mu$ L (co-injected with 15 $\mu$ L of water)
<b>[MS conditions] (LCMS-8060NX)</b>	
Ionization	: ESI, Positive/Negative
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.5 L/min
Drying gas flow	: 3.0 L/min
Heating gas flow	: 15.0 L/min
DL temp.	: 200 °C
Block heater temp.	: 450 °C
Interface temp.	: 300 °C
CID Gas Pressure	: 230 kPa
Dwell time/ Pause time	: 7 msec./ 1 msec.

### ■結果

#### <血しょうと血清のエイコサノイド類分析>

エイコサノイド類196成分の一斉分析法により、30  $\mu$ Lのヒト血しょう2ロットと血清からの抽出液を分析したところ、延べ68成分が検出されました。血しょうからはトロンボキサンB2 (TXB2) を除く67成分が検出され、血清からは44成分が検出されました (図2)。

新規に開発した代謝マップによる解析ツールを用い、68成分の定量的プロファイルをマップ上に示しました (図3)。各成分のピーク面積を内部標準のピーク面積で割った面積比をグラフの縦軸に示しています。

#### 血しょう67成分      血清44成分

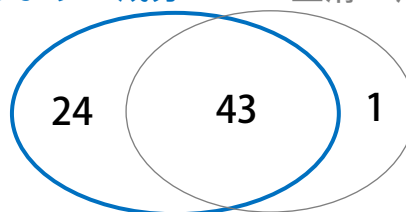


図2 ヒト血しょうと血清から検出された成分数

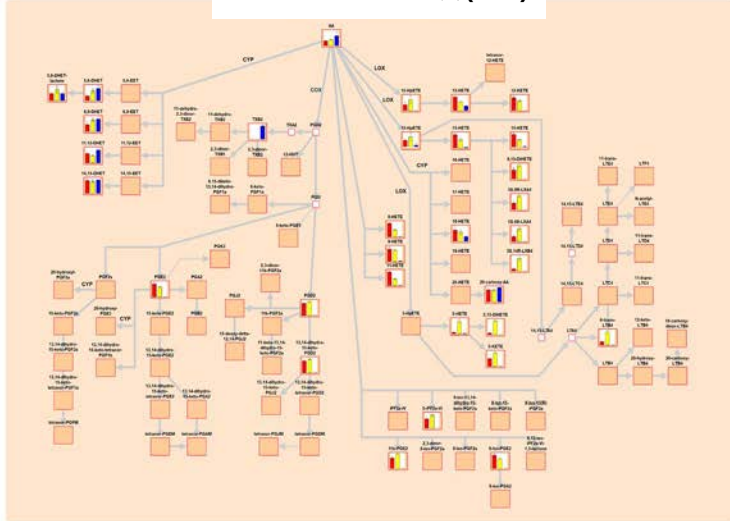


図1 LCMS™-8060NXの外観

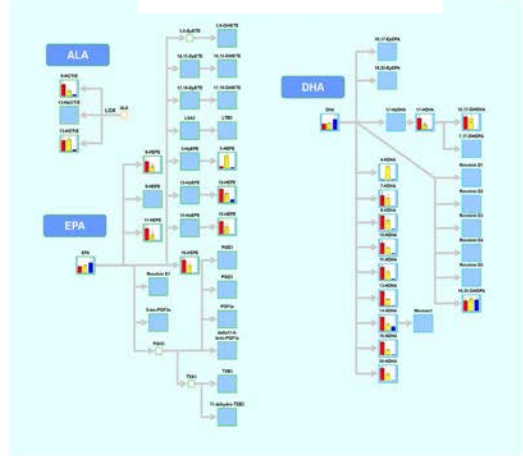
Metabolic Map for Shimadzu LC-MS/MS method package for lipid analysis Ver. 2.0



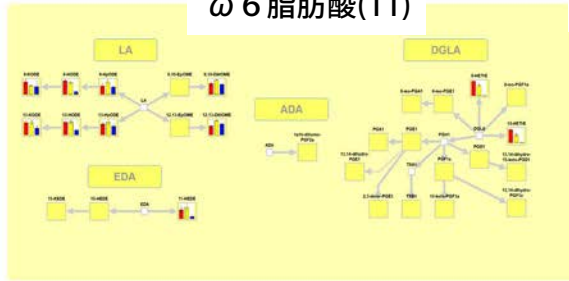
### アラキドン酸(32)



### ω 3 脂肪酸 (22)



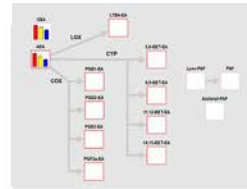
### ω 6 脂肪酸(11)



### ω 9 脂肪酸(1)



### エタノールアミド PAF類(2)



### 内部標準

5,6-DHET	8,9-DHET	11,12-DHET	14,15-DHET	TXB2	TXA2	12-HpETE	15-HpETE	12-HETE	15-HETE	16-HETE	17-HETE	18-HETE	19-HETE	20-HETE	20-carboxy-AA	5-HETE	8-HETE	9-HETE	11-HETE	5-KETE	5,15-DHETE	5-KETE	14,15-LTB4	LTB4	6-tran-LTB4	12-aceto-LTB4	20-hydroxy-LTB4	11-trans-LTE4	LTF4	N-acetyl-LTE4	11-trans-LTD4	11-trans-LTC4	14,15-LTD4	14,15-LTC4
----------	----------	------------	------------	------	------	----------	----------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------------	--------	--------	--------	---------	--------	------------	--------	------------	------	-------------	---------------	-----------------	---------------	------	---------------	---------------	---------------	------------	------------

図3 ヒト血しょうと血清から検出された68成分の代謝マップと定量的プロファイル  
赤：EDTA Plasma, 黄：Heparin Plasma, 青：Serum

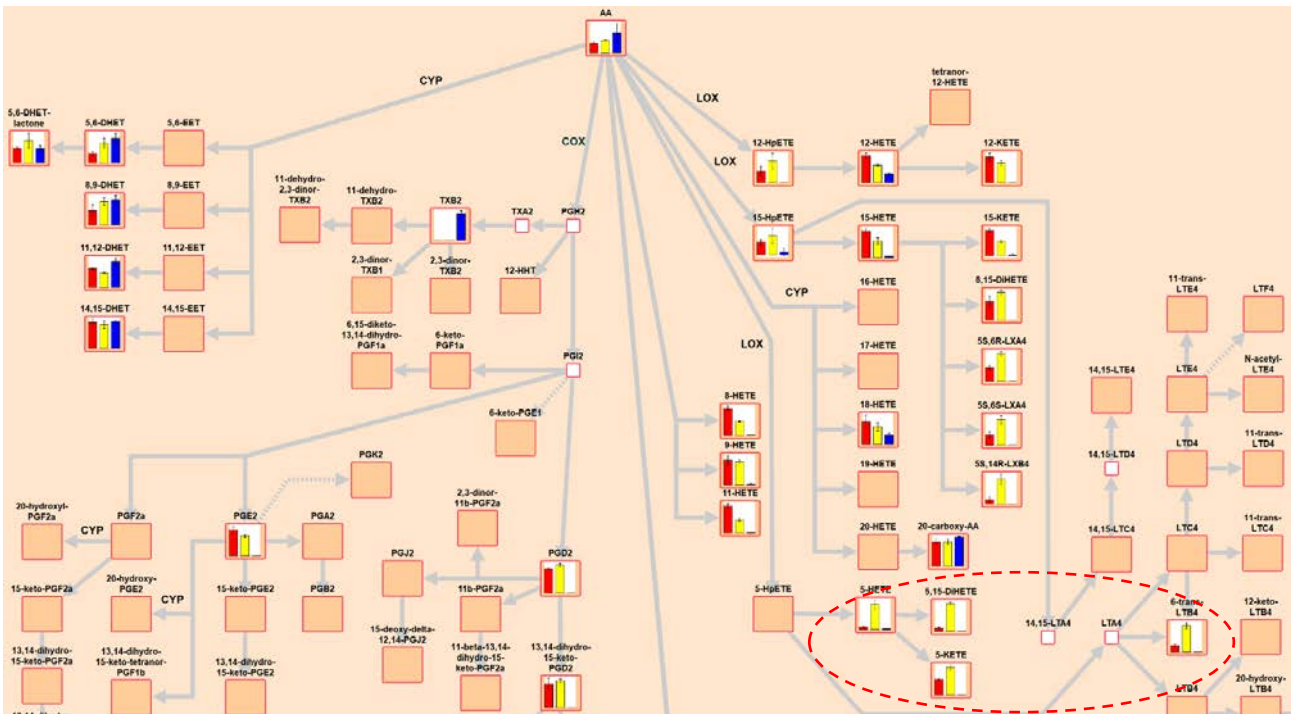


図4 ヒト血しょうと血清から検出されたアラキドン酸代謝物の代謝マップと定量的プロファイル  
赤：EDTA Plasma, 黄：Heparin Plasma, 青：Serum

血清で検出されたTXB2を青破線で囲み、ヘパリン血しょうで顕著に検出された5-LOXによる代謝物を赤破線で示す

略号 CYP: Cytochrome P450, COX: Cyclooxygenase, LOX: Lipoxygenase, AA: Arachidonic acid, ADA: Adrenic acid, ALA: alpha-linolenic acid, DGLA: Dihomo-gamma-linolenic acid, DHA: Docosahexaenoic acid, EA: Ethanolamide, EDA: Eicosadienoic acid, EPA: Eicosapentaenoic acid, LA: Linoleic acid, LPC: Lyso-phosphatidylcholine, MA: Mead acid, PAF: Platelet activation factor, HETE: hydroxyeicosatrienoic acid, EET: epoxyeicosatrienoic acid, TX: thromboxane, PG: Prostaglandin, HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid, HpETE: hydroperoxyeicosatetraenoic acid, LX: lipoxin, LT: leukotriene, KETE: keto-eicosatetraenoic acid.

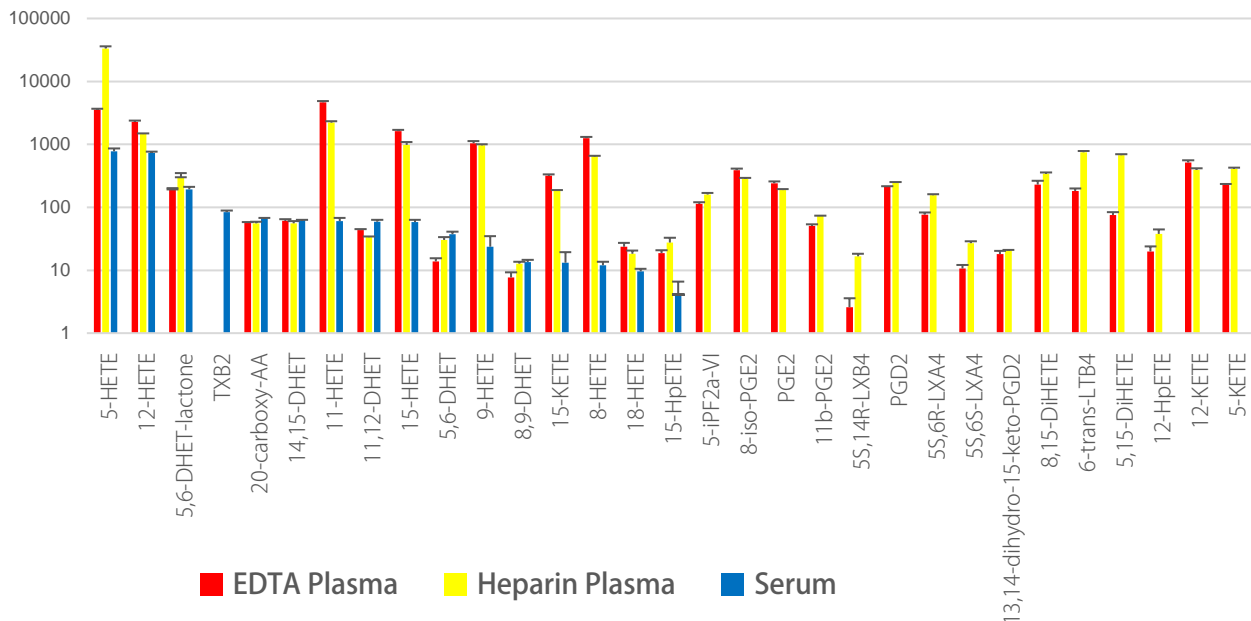


図5 ヒト血しょうと血清から検出されたアラキドン酸代謝物31成分の定量的プロファイリング  
縦軸には内部標準との面積比を1000倍した値を表示しています

### <代謝マップによる解析>

アラキドン酸とその代謝物が32成分、 $\omega$ 3脂肪酸とその代謝物が22成分、アラキドン酸以外の $\omega$ 6脂肪酸代謝物が11成分、その他3成分（ミド酸代謝物1成分とエタノールアミド2成分）が検出されました。図3のように、検出された代謝物の上流の脂肪酸を簡単に確認することができました。この分析法では、アラキドン酸とEPAとDHAの3種の遊離脂肪酸そのものを測定しています。3種の遊離脂肪酸はいずれも血清で比較的多く、脂肪酸代謝物は概ね血しょうで多いことがわかりました。

図4に、アラキドン酸カスケードの拡大図を示します。血液凝固因子であるTXA2の代謝物TXB2（トロンボキサンB2）は、血しょうでは検出されませんでした。EDTAやヘパリンにより血液凝固因子が抑制されていることがよくわかります。一方で、PGE2やPGD2などのCOX代謝物が血しょうで検出されました。CYP代謝物であるDHET類と20-carboxy-AAは、血しょうと血清で大きな差は見られませんでした。LOX代謝物であるHETE類は血しょうで多く検出されました。なかでも5-LOX代謝物である、5-HETE、5,15-DiHETE、6-trans-LTB4は、ヘパリン血しょうで顕著に高い濃度で検出されました。

アラキドン酸代謝物31成分について、内部標準との面積比の1000倍を縦軸にとったグラフを図5示しました。31成分に対応する内部標準の添加量は約20 nmol/Lとしており、血中濃度20 nmol/Lが縦軸1000付近に相当します。ヘパリン血しょうの5-HETEが約660 nmol/Lであり、代謝物では最大値を示しました。約0.2 nmol/Lの濃度であった5,6-DHETや8,9-DHETまで繰り返し再現性良く測定できました。

### ■ まとめ

エイコサノイドを含む脂肪酸代謝物196成分の一斉分析法に対応した代謝マップによるデータ解析ツールを開発しました。この解析ツールを利用して、ヒト血しょうと血清から検出された代謝物について解析することで、各代謝物からの脂肪酸から生じたか、どのような酵素により生じているかを容易に解析することができました。LC/MS/MSメソッドパッケージ 脂質メディエーター Ver. 3のデータ解析に是非ご利用ください。

### ■ 謝辞

脂質メディエーターメソッドパッケージver.3の分析対象196成分に対応した代謝マップは、東京大学大学院医学系研究科リビドミクス社会連携講座の北芳博先生、徳岡涼美先生等と共同発表しました論文<sup>1)</sup>に掲載した代謝マップ<sup>\*</sup>をベースに開発しました。

### ■ 参考文献

- <sup>1)</sup> M. Yamada, J.Chromatogr. B 2015 Jul 15; 995-996; 74-84.

NexeraおよびLCMS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。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

01-00250-JP 初版発行：2021年 11月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。  
本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。  
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。  
最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。  
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021