

# Application News

## No. C150

LC/MS

### 全自動前処理 LC/MS/MS システムによる 一次代謝物の一斉分析

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、近年、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 (LC/MS/MS) 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等の臨床研究 (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 LC/MS 分析の操作は、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つきや作業ミスリスクが課題となってきます。また、試料数の増加に応じて作業者の負荷が増えるため、多数の試料について測定する際には一連の分析ワークフローのなかで前処理過程がボトルネックとなることもあります。

本報では、全自動 LCMS 前処理装置 SCLAM-2000 および高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8040 からなる全自動前処理 LC/MS/MS システムを用いて、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。

K. Shima



図1 全自動前処理 LC/MS/MS システム

#### ■全自動前処理 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

全自動前処理 LC/MS/MS システムによる一次代謝物の一斉分析例をご紹介します。

LC/MS 分析における血漿/血清試料中の代謝物抽出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が必要となります。今回、この前処理手順を簡易化することにより、SCLAM-2000 に適合させる試みを行いました。

SCLAM-2000 では、採血管などをセットするだけでこれらの前処理を全自動で行います。前処理が行われたサンプルはオートサンプラへ自動搬送され、LC/MS/MS による分析が行われます。このワークフローと、今回採用した前処理プロトコルを図2に示します。

HPLC 条件と MRM transition の各パラメータ設定は、「一次代謝物メソッドパッケージ ver.2」に準じ (表1)、血漿を試料とする一次代謝物一斉分析を LCMS-8040 を用いて行いました。



図2 LC/MS/MS システムによる代謝物一斉分析のワークフロー

表 2 に、全自動前処理 LC/MS/MS システムにより検出された一次代謝物の一覧を示します。一次代謝物メソッドパッケージ ver.2 に含まれる成分のうち、アミノ酸、有機酸、ヌクレオシドを中心とした成分が検出されています。

表 3 に、今回採用した前処理プロトコルを的手法と SCLAM-2000 それぞれで行った際の検出代謝物総数と、そのうち、内部標準物質の MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid) のピークとの面積比の RSD% が 20% 未満だった代謝物の数を示します (n=5)。なお、手法前処理では、SCLAM-2000 の前処理の濾過部分を、限外濾過フィルター (MW3,000) による遠心

表 1 一次代謝物の分析条件

| HPLC 条件           |                           |
|-------------------|---------------------------|
| 分析カラム             | : 逆相カラム                   |
| 移動相 A             | : 0.1 % ギ酸/水              |
| 移動相 B             | : 0.1 % ギ酸/アセトニトリル        |
| 流速                | : 0.25 mL/min             |
| モード               | : グラジエント溶出                |
| カラム温度             | : 40 °C                   |
| 注入量               | : 1 µL                    |
| MS 条件 (LCMS-8040) |                           |
| イオン化法             | : ESI (Positive/Negative) |
| ネブライズガス流量         | : 2.0 L/min.              |
| ドラインガス流量          | : 15.0 L/min.             |
| DL 温度             | : 250 °C                  |
| ヒートブロック温度         | : 400 °C                  |

表 2 SCLAM-2000 前処理にて検出された一次代謝物

| 化合物名                 | 化合物分類 | 化合物名            | 化合物分類   |
|----------------------|-------|-----------------|---------|
| ADMA                 | アミノ酸  | Trp             | アミノ酸    |
| Ala                  | アミノ酸  | Tyr             | アミノ酸    |
| Arg                  | アミノ酸  | Val             | アミノ酸    |
| Asn                  | アミノ酸  | Carnitine       | アミノ酸誘導体 |
| Asp                  | アミノ酸  | Kynurenine      | アミノ酸誘導体 |
| Citrulline           | アミノ酸  | Adenine         | 塩基      |
| Cys                  | アミノ酸  | Choline         | コリン     |
| Cystathionine        | アミノ酸  | Acetylcarnitine | 脂質      |
| Cystine              | アミノ酸  | Adenosine       | ヌクレオシド  |
| Dimethylglycine      | アミノ酸  | Guanosine       | ヌクレオシド  |
| Gln                  | アミノ酸  | Inosine         | ヌクレオシド  |
| Glu                  | アミノ酸  | Thymidine       | ヌクレオシド  |
| Gly                  | アミノ酸  | Uracil          | ヌクレオシド  |
| His                  | アミノ酸  | Uridine         | ヌクレオシド  |
| Hydroxyproline       | アミノ酸  | AMP             | ヌクレオチド  |
| Ile                  | アミノ酸  | cis-Aconitate   | 有機酸     |
| Leu                  | アミノ酸  | Citrate         | 有機酸     |
| Lys                  | アミノ酸  | Creatine        | 有機酸     |
| Met                  | アミノ酸  | Isocitrate      | 有機酸     |
| Methionine-sulfoxide | アミノ酸  | Lactate         | 有機酸     |
| Ornithine            | アミノ酸  | Malate          | 有機酸     |
| Phe                  | アミノ酸  | Pantothenate    | 有機酸     |
| Pro                  | アミノ酸  | Pyruvate        | 有機酸     |
| SDMA                 | アミノ酸  | Uric acid       | 有機酸     |
| Ser                  | アミノ酸  | Creatinine      | ラクタム    |
| Thr/Homoserine       | アミノ酸  |                 |         |

注) 本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

濾過 (15,000×g、4 °C、60 分間) としました。検出された代謝物の総数は、SCLAM-2000 と手法でほとんど変わりはありませんでした。その一方で、RSD% が 20% 未満の代謝物数は、SCLAM-2000 の方が多いという結果になりました。手法では、作業者の手技によるばらつきが大きかったため、このような差が生じたと考えられます。

この結果により、全自動前処理 LC/MS/MS システムによる一次代謝物の分析可能性と、同じプロトコルで比較した場合に手法と比較して SCLAM-2000 による前処理でも遜色ない結果が得られることが示唆されました。

表 3 SCLAM-2000 と手法の前処理比較結果

| 前処理法       | 手法 | SCLAM-2000 (自動) |
|------------|----|-----------------|
| RSD% < 20% | 38 | 45              |
| 検出代謝物数     | 50 | 51              |

(n=5)

## ■ まとめ

全自動 LCMS 前処理装置 SCLAM-2000 および高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8040 からなる全自動前処理 LC/MS/MS システムが、今回、一次代謝物の一斉分析にも適用可能であることが示唆されました。この全自動前処理 LC/MS/MS 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神戸大学大学院医学研究科 内科系講座病因病態解析学分野 准教授 吉田 優先生、内科学講座消化器内科学分野 特命准教授 西海 信先生より多大なご協力をいただきました。

本資料は、AMED-CREST 革新的先端研究開発支援事業「包括的メタボロミクス・ターゲットプロテオミクスによるがん診断・薬効診断マーカー探索と革新的統合臨床診断ネットワーク構築」によって得られた成果を元に作成しています。