

## トリプル四重極質量分析計LCMS™-8060NXを用いた唾液中親水性代謝物のメタボローム解析



ヒト口腔には、およそ 700 種、90 億もの細菌が生息し、腸内細菌と同様に、短鎖脂肪酸を生産します。口腔細菌が生産する短鎖脂肪酸は、歯周組織への為害作用を及ぼしたり、口腔環境維持に寄与していることが明らかになりつつあります。例えば、歯周病の主要原因菌である口腔嫌気性グラム陰性菌は、大量の短鎖脂肪酸（特に酪酸）を生産します。

近年、生体中の代謝物を網羅的に分析するメタボローム解析という技術に注目が集まっています。メタボローム解析とは、細胞の活動によって生じるアミノ酸や有機酸などの低分子の代謝物を網羅的に分析し複数の試料群における差異を明らかにする学術分野であり、他のオミクス解析と比較して対象成分が少ないことから網羅的分析を行いやすいとされています。

本報告では、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）による唾液中のメタボローム解析を行った事例をご紹介します。唾液には口腔細菌が生産した代謝物とともに口腔細菌も存在することが知られています。そのため、分析までの唾液の保管状態によっては、口腔細菌のはたらきで唾液中に含まれる代謝物の量が変化すると考えられます。そこで、メタボローム解析を用いて保管温度が唾液中に含まれる代謝物へ与える影響を調べました。

T. Hattori, Y. Yamada

### ■ サンプル

唾液は健常の成人男性 1 名から採取しました。採取後、12000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清をマイクロチューブ 4 本に分注しました。それぞれを -80、4、25、40 °C で 3 日間保存したものをサンプルとしました。

### ■ 前処理

短鎖脂肪酸・有機酸分析のための前処理では、ODS カラムへの保持と MS 検出における感度向上を目的にサンプルを 3-ニトロフェニルヒドラジン（3-NPH）により誘導体化させました。唾液に 3-NPH（誘導体化試薬）、ピリジン（触媒）、カルボジイミド（縮合剤）、2-Ethylbutyric acid（内部標準物質）を添加し、室温で 30 分間反応させました。反応後、ギ酸を含むメタノール溶液で 5 倍希釈しました。

親水性代謝物の一斉分析のための前処理では、唾液を超純水で 5 倍希釈しました。希釈の際、内部標準物質として 1 μmol/L になるよう 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES) を添加しました。

## ■ 分析条件

短鎖脂肪酸・有機酸分析は、LC/MS/MS メソッドパッケージ 短鎖脂肪酸を用い、LCMS-8060NX を使用して行いました。本分析法では、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸 6 成分と中心代謝経路に関連した有機酸 16 成分を分析可能です。表 1 に HPLC および MS の分析条件を示しました。

表 1 分析条件 (短鎖脂肪酸・有機酸分析)

[HPLC conditions] (Nexera™ X3)	
Column	: Reversed-phase column
Mobile phases	: A) 0.1 % Formic acid in water B) Acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.35 mL/min
Injection volume	: 3 µL
[MS conditions] (LCMS-8060NX)	
Ionization	: ESI (Positive and negative mode)
Probe position	: +3 mm
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

親水性代謝物の一斉分析は、LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 ver.2 に含まれるイオンペアフリー LC/MS/MS 法を用い、LCMS-8060NX を使用して行いました。本分析法では、ライフサイエンス分野のメタボローム解析において重要となるアミノ酸、有機酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド等の親水性代謝物 97 成分の一斉分析が可能です。表 2 に HPLC および MS の分析条件を示しました。

表 2 分析条件 (親水性代謝物一斉分析)

[HPLC conditions] (Nexera X3)	
Column	: Reversed-phase column
Mobile phases	: A) 0.1 % Formic acid in water B) 0.1 % Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 3 µL
[MS conditions] (LCMS-8060NX)	
Ionization	: ESI (Positive and negative mode)
Probe position	: +3 mm
Mode	: MRM
IonFocus voltage	: ±2 kV
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C



## ■ IonFocus™ユニットによる感度向上

生体や食品のようなマトリックスが多いサンプルを分析する場合、イオン源を MS 導入部から離すことでマトリックスの影響を抑えることができますが、MS へ導入されるイオンが減るため感度低下が起こります。LCMS-8060NX の IonFocus ユニット (図 1) は、イオン輸送用のフォーカス電極によりイオンのみを効率的に質量分析計に取り込み、不要な中性粒子を除去します。そのため、イオン源を MS 導入部から離れた場合でも感度低下することなく、高感度分析と高い装置頑健性を両立できます。唾液から検出された親水性代謝物に対して、IonFocus ユニットの効果を確認したところ、イオン源を MS 導入部から離れた状態でも感度低下することなく、平均約 1.4 倍の感度向上が確認できました。図 2 に感度向上例を示しました。

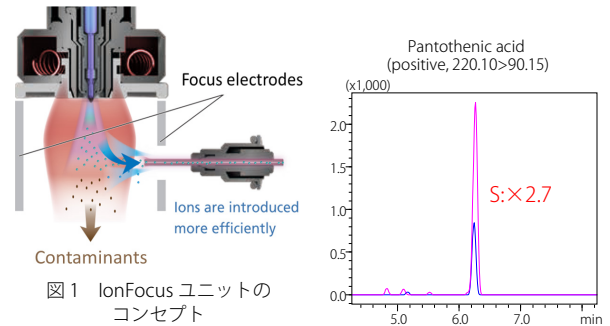


図 1 IonFocus ユニットのコンセプト

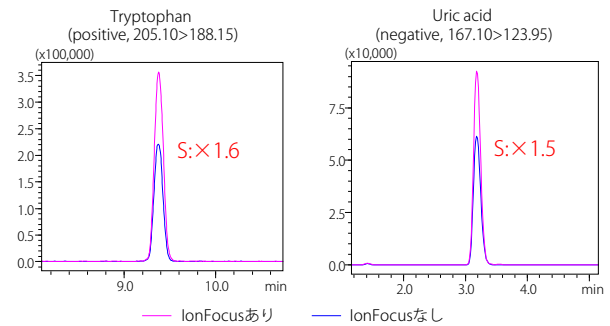


図 2 IonFocus ユニットによる感度向上

## ■ Peakintelligence™による波形処理

検出されたピークの波形処理は、LabSolutions Insight™ のオプションソフトウェアである Peakintelligence により行いました。Peakintelligence では、熟練作業者が行った波形処理を AI に学習させており、熟練者と同レベルの解析を実現できます。図 3 のような別成分由来のピークが近くにある場合でも、Peakintelligence では正しく検出・波形処理が可能です。これにより、誤検出・未検出ピーク数を低減し、波形処理結果の確認と修正にかかる時間を短縮できます。

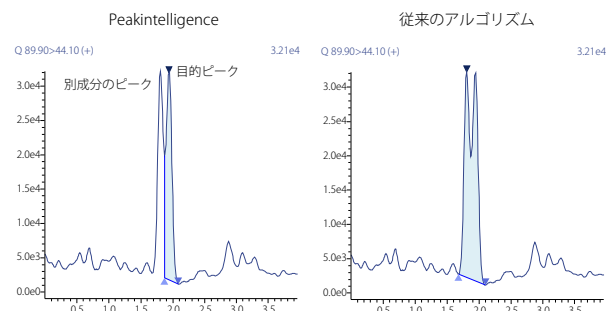


図 3 Peakintelligence による波形処理

## ■メタボローム解析

短鎖脂肪酸・有機酸分析の結果、短鎖脂肪酸 6 成分、有機酸 14 成分が検出されました。親水性代謝物一斉分析の結果、アミノ酸、有機酸、核酸系代謝物を中心に 50 成分検出されました。内部標準物質に対する各成分のピーク面積比を用いて、主成分分析を SIMCA®16 ソフトウェアによって行いました。図 4、5 に短鎖脂肪酸・有機酸分析、親水性代謝物一斉分析におけるスコアプロットおよびローディングプロットをそれぞれ示しました。第 1 主成分軸で、保管温度による

影響を確認できました。40 °C で保管した唾液には、コハク酸やグルタミン酸等が特徴的に含まれていました。25 °C で保管した唾液には、ピルビン酸、ヒスチジン、チロシン等が特徴的に含まれていました。4 °C、-80 °C で保管した唾液中の短鎖脂肪酸、有機酸、アミノ酸、核酸系代謝物は傾向が似ており、ほとんどの成分で大きな量的変化は見られませんでした。

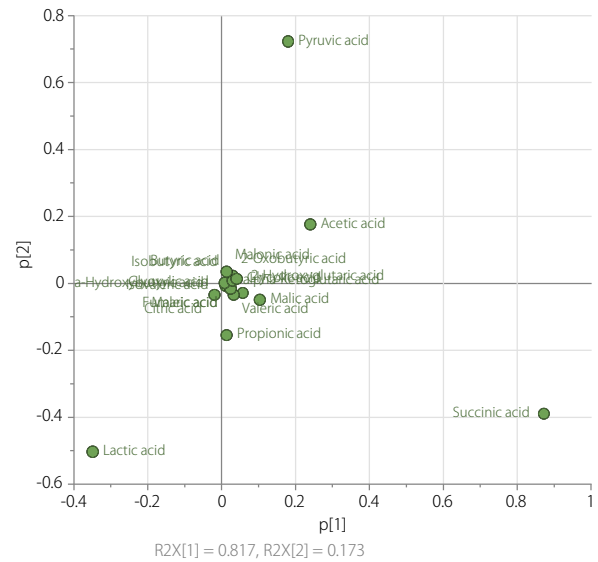
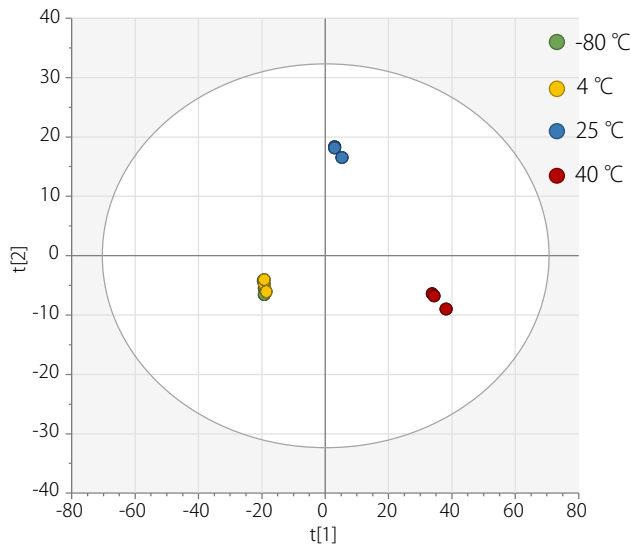


図 4 短鎖脂肪酸・有機酸分析における主成分分析結果

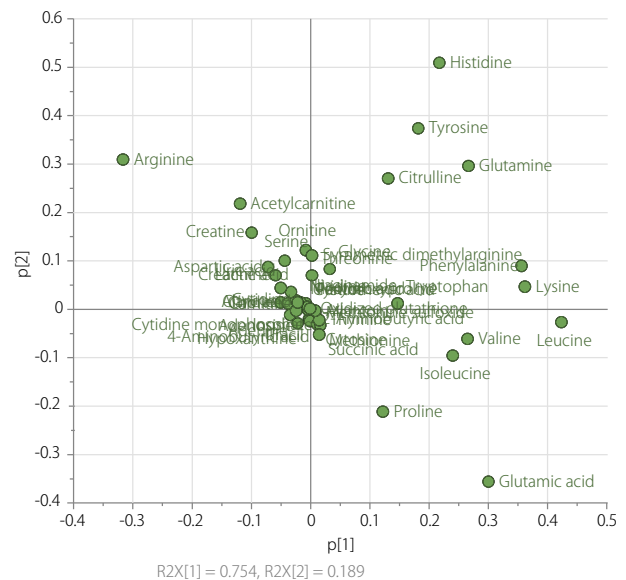
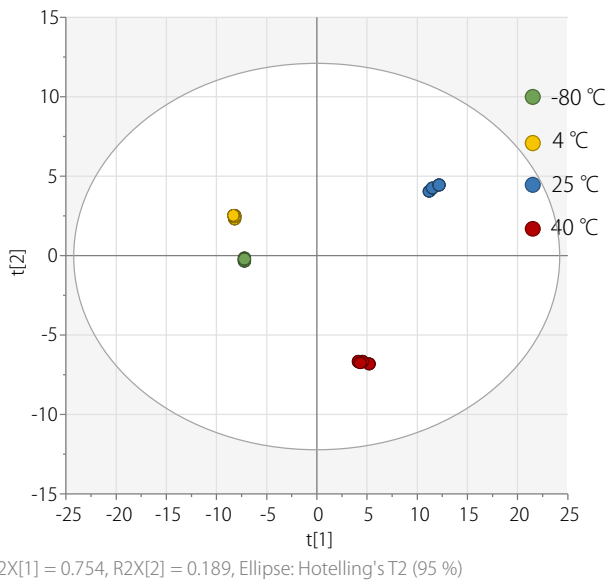


図 5 親水性代謝物一斉分析における主成分分析結果

図6に、保管温度の違いによって大きな量的変化が見られた代謝物のピーク面積比の変動を示しました。アルギニン、グルタミン酸、ヒスチジンなどのアミノ酸や乳酸、ピルビン酸、コハク酸などの有機酸は、保管温度によって大きく増減することがわかりました。このような増減の一因として、唾液中に存在する口腔細菌が保管時にこれら成分を消費・生産したことが考えられます。

## ■まとめ

以上のように、LC/MS/MSによる唾液のメタボローム解析によって、口腔細菌が生産する親水性代謝物を網羅的に分析することが可能です。本分析・解析手法は、口腔細菌叢研究におけるメタボローム解析において、非常に有効と考えられます。

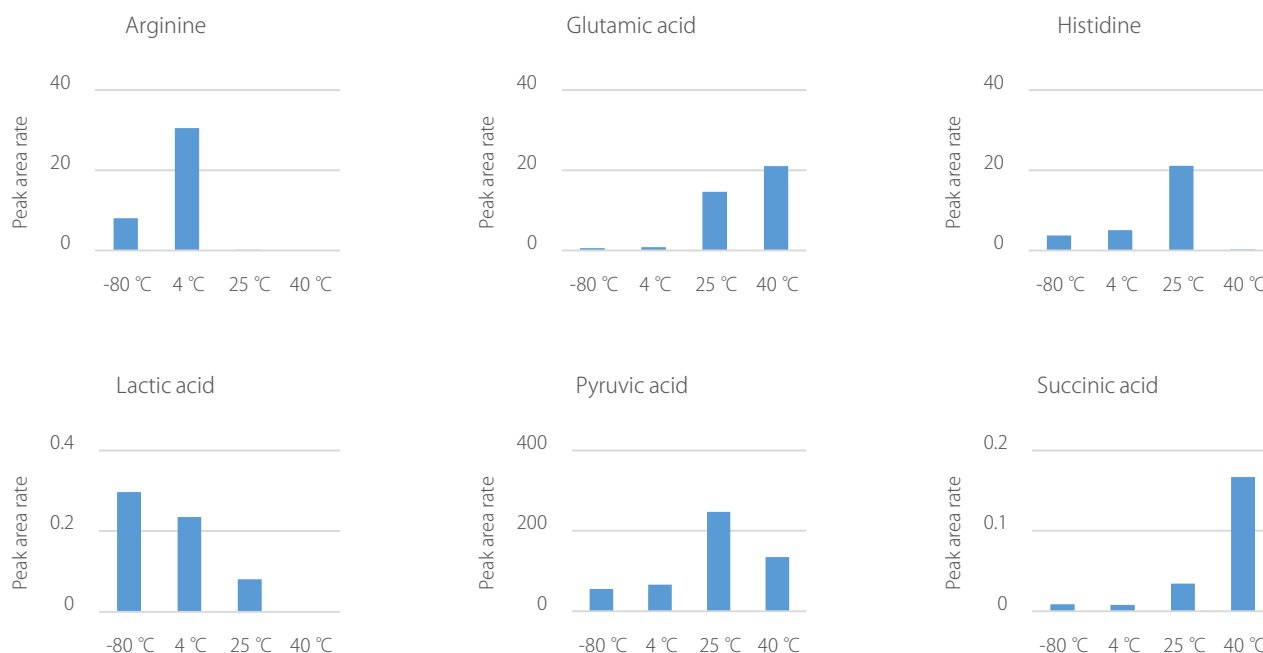


図6 唾液中短鎖脂肪酸・有機酸のプロファイル

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。

LCMS, Nexera, IonFocus, Peakintelligence、および LabSolutions Insight 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。SIMCA は、Sartorius Stedim Data Analytics AB の登録商標です。

**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

初版発行：2020年10月

島津コールセンター ☎0120-131691  
(075) 813-1691

※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。  
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。