

Application News

No. B88

探針エレクトロスプレーイオン化質量分析計

DPIMS™-8060 によるマウス肝臓内の メタボローム直接分析法の構築

内因性代謝物（メタボローム）解析において、前処理やサンプリング時におけるバイアスを完全に除外することは難しく、生体内のメタボロームの変動を正確に捕捉するためには、メタボロームの直接分析法の構築が不可欠です。新規イオン化法である探針エレクトロスプレーイオン化法：PESI（Probe Electro Spray Ionization）は超極細で低侵襲な探針が試料をサンプリングし、かつ針先に高電圧を付与することにより、サンプリングした対象成分をイオン化させる直接イオン化法であり、クロマトグラフを介さずに試料の分析が可能です。

PESI をタンデム質量分析計と組み合わせた探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析計 DPIMS-8060 (図1) を用いることで、生体試料中のメタボロームの直接分析が可能です。

本アプリケーションニュースでは、PESI とタンデム質量分析計による生体組織中メタボロームの直接分析法（インタクト・メタボローム分析法）を構築した例、さらに本法を「CCl₄ 誘導性急性肝障害モデルマウス」のメタボローム解析に応用した例をご紹介します。

T. Murata



図1 DPIMS™-8060

■ 試料調製および分析条件

50%エタノール溶液で希釈したアミノ酸、有機酸、糖類などのメタボライト標準試料（26成分）を専用の液体試料用サンプルプレート（島津製作所製）に10 μL 滴下した後、各化合物のMRM トランジションの選択および Collision energy (CE) など、質量分析計の条件を最適化しました。26成分の最適化したMRM トランジション情報を表1に示しました。

次に健常マウスと肝障害モデルマウス（四塩化炭素を投与し肝障害を誘起）それぞれのマウスの肝臓を解剖により採取し、約3 mm 四方に切り出した後、専用の固体試料用サンプルプレートに挟み込み、装置にセットしました。DPIMS-8060による固体試料の分析は、試料をサンプルプレートに挟み込むだけで分析が開始できるため、煩雑な固体試料の前処理作業を短縮できます。

表1 メタボライト 26成分 MRM トランジション

Name	Polarity	Transition (<i>m/z</i>)	Collision Energy (V)
3-hydroxybutyrate	(-)	103.1>59.0	35
Citric acid/isocitric acid	(-)	191.0>111.1	20
D-glucose	(-)	179.1>59.2	20
Glucose-6-phosphate	(-)	259.1>96.9	20
Glutaric acid	(-)	131.0>87.3	20
Glycine	(-)	74.2>74.2	20
L-asparagine	(-)	131.0>113.3	20
L-aspartic acid	(-)	131.9>88.1	20
L-glutamic acid	(-)	146.0>102.1	20
L-lactic acid	(-)	89.0>43.2	20
L-malic acid	(-)	133.0>114.9	20
L-serine	(-)	103.9>74.2	20
Pyruvic acid	(-)	87.1>43.1	20
Succinic acid	(-)	117.1>73.0	20
Taurine	(-)	124.0>80.0	20
2-aminobutyric acid	(+)	104.1>58.1	20
L-glutamine	(+)	147.1>84.2	20
L-histidine	(+)	156.1>110.3	20
L-leucine/L-isoleucine	(+)	132.1>86.2	20
L-methionine	(+)	150.3>104.1	20
L-ornithine	(+)	132.9>70.0	20
L-phenylalanine	(+)	166.2>120.2	20
L-proline	(+)	116.2>70.0	20
L-threonine	(+)	120.1>74.0	20
L-tryptophan	(+)	205.2>146.1	20
L-tyrosine	(+)	182.1>136.1	20

■ 健常マウスおよび肝障害マウスの インタクトメタボローム解析

四塩化炭素 (CCl₄) は急性肝臓障害を誘引することが知られています。そこで、CCl₄ 誘引急性肝障害モデルマウス群 (以下、モデル群) および対照群について、構築した DPiMS/MS によるインタクトメタボローム解析を行いました。得られた結果について主成分分析 (PCA) を行ったところ、図 2 (a) に示すように、PCA スコアプロットにおいて 2 つの群は第 1 主成分軸に沿って良好に分離していました。さらに、図 2 (b) に示す PCA ローディングプロットにおいて、タウリンが群分離に大きく寄与していることが示唆されたことから、図 2 (c) に示すとおり、タウリンについて Box-whisker plot を作成し、有意差検定を行ったところ、モデル群と対照群の間には有意な差が観察されました (p<0.001, Welch's t-test)。

さらに、急性肝障害の指標として用いられるアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) といった逸脱酵素は、モデル群で有意な上昇が観察されており、これら逸脱酵素と CCl₄ 誘引

急性肝障害モデルにおけるタウリンの間には、有意な負の相関が認められました (ピアソン係数 $r = -0.975$ (ALT) および -0.785 (AST))。CCl₄ を投与したマウスの肝臓内では、代謝酵素である CYP2E1 の働きによって CCl₄ からトリクロロメチルラジカルが産生され、このトリクロロメチルラジカルが急性肝障害を誘引するとされている一方、タウリンは肝臓内でラジカルスカベンジャーとして機能するとされていることから、モデル群の肝臓内では CCl₄ より産生したトリクロロメチルラジカルによって、肝臓中タウリン濃度が減少したものと考えられます。

■ 結論

DPiMS-8060 を使用することで、煩雑な前処理を行うことなく、マウス肝臓内のメタボローム解析を行うことができました。

特に、CCl₄ 誘引肝障害モデルマウスへ本手法を適用した結果、肝障害の惹起によって生じたメタボライトの変化を直接観察することが出来たことから、本手法の実用性が確認されました。

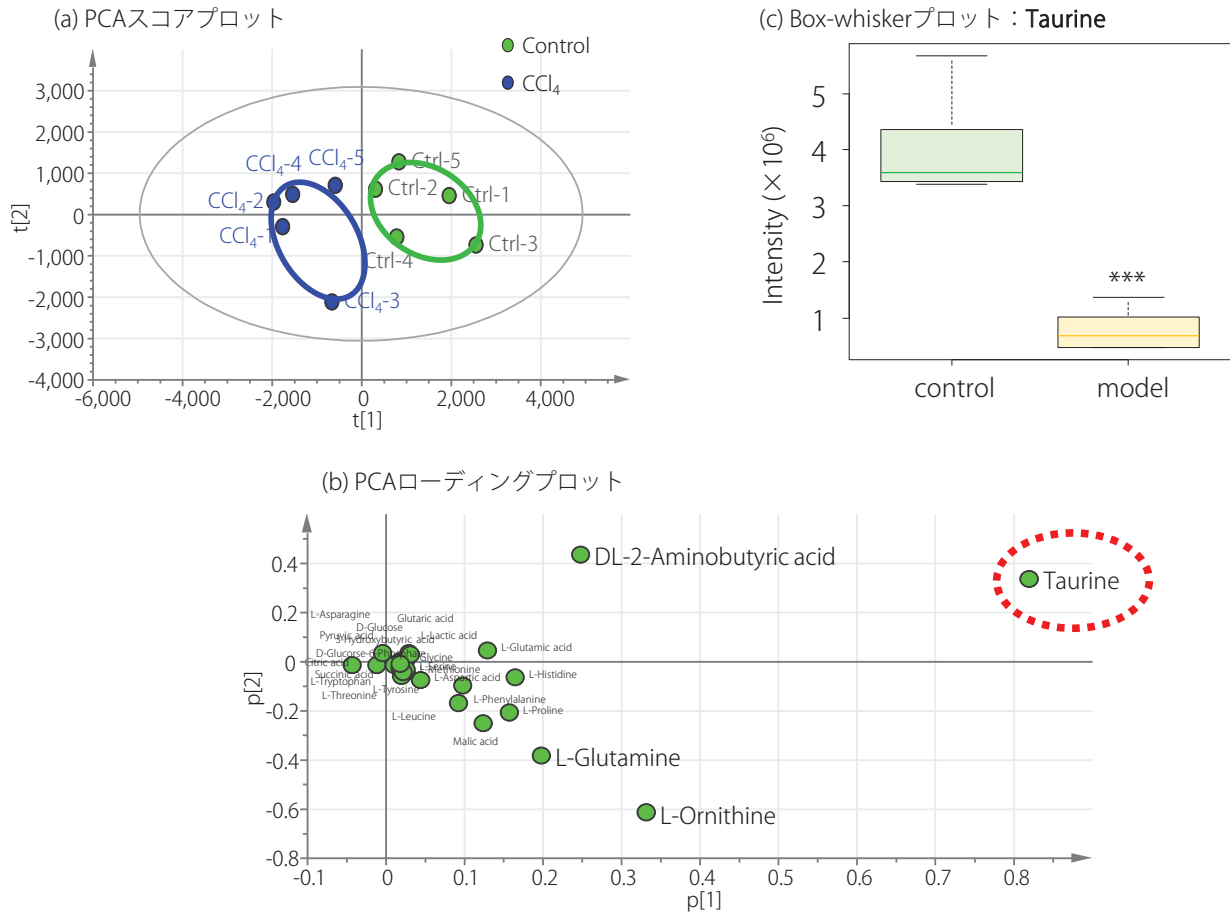


図 2 健常マウスおよび肝障害モデルマウスのインタクトメタボローム解析結果

謝辞

本データは名古屋大学大学院医学系研究科の財津桂准教授、林由美講師との共同研究により取得されたものです。データをご提供いただいたことに深い謝意を表します。

参考文献

Zaitzu, K.; Hayashi, Y.; Murata, T., et al. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3556-3561.

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。

DPiMS は、株式会社 島津製作所の商標です。

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：2019年1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。