

マイクロサンプリング血漿を用いた高速 エイコサノイドプロファイリング法の開発

山田 真希、長野 直子、久保 はるみ、服部 考成

ユーザーベネフィット

- ◆ 10分でヒト血漿中のエイコサノイドを含む脂肪酸代謝物のモニタリングが可能です。
- ◆ Nexera™と超高速トリプル四重極型質量分析計LCMS-8060がハイスルーブット分析を実現します。
- ◆ マイクロサンプリングデバイスMSW²™で精度よく試料の微量採取が可能です。

はじめに

エイコサノイドやオメガ3系脂肪酸代謝物は、病態生理学的な機能の解明および疾患バイオマーカーを探索する上で重要なターゲットです。著者らはASMS2019において、エイコサノイド類196成分をモニターすることが可能なMRM（多重反応モニタリング）メソッドを開発し、疾患モデルマウスの血清中から検出された100成分以上についての定量的プロファイリングについて報告しました¹⁾。

本報では、微量の血漿での迅速なエイコサノイド類の分析系の構築についてご紹介します。対象成分を血漿で検出された成分に絞り込むことで、エイコサノイドおよび関連する脂肪酸代謝物114成分が10分でモニタリング可能となりました。新規開発したメソッドを用いて、マイクロサンプリングデバイスMSW²で微量採取した市販ヒト血漿（5.6 μL）の分析を行い、エイコサノイド類を検出した例をご報告します。

分析条件

標準試料は、Cayman Chemical(Ann Arbor, MI)から購入しました。ヒト血漿とヒト血清は、コージンバイオ株式会社から入手しました。一定量の血漿を採取するためにマイクロサンプリングデバイスMSW²（当社製）を使用しました。固相抽出カートリッジは、STRATA™-X 10mg(Phenomenex Torrance, CA)を用いました。

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-8060（図2）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。

マイクロサンプリングデバイス MSW²

MSW²は、全血から血漿を微量採取するためのユニークなマイクロサンプリングデバイスです。

樹脂製のMicrosampling Wing™（図1）に全血を採取し、直接遠心分離を行うことによってマイクロ流路内で血漿と血球に分離します。遠心分離後は、定容量部を折り取るだけで一定量の血漿を精度よく採取できます。さらにMicrosampling Wingは溶媒耐性が高い樹脂材質のため、チップをチューブに入れたまま除タンパク等の前処理に供することができます。

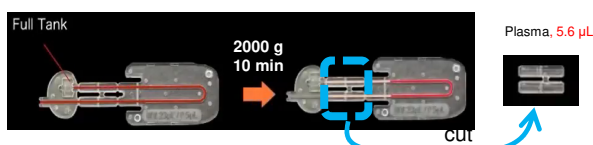


図1 マイクロサンプリングデバイスMSW²™のMicrosampling Wing™

表1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera X3)	
Column	: Shim-pack™ GIST C18-AQ HP *1 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
Column oven	: 40 °C
Solvent A	: 0.1 % Formic acid – water
Solvent B	: Acetonitrile
Flow rate	: 0.4 mL/min
Injection volume	: 5 μL (co-injected with 15 μL of water)
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI, Positive/Negative
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.5 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.	: 270 °C
CID Gas Pressure	: 230 kPa
Dwell time/ Pause time	: 10 msec/ 1 msec

*1 P/N 227-30807-02



図2 LCMS™-8060の外観

前処理

ヒト血漿からの脂肪酸抽出の流れを図3に示しました。マイクロサンプリングデバイスMSW²で採取した血漿5.6 μLに0.1 %ギ酸を含むメタノールを300 μLと18成分の内部標準物質溶液を10 μL添加し、5分間攪拌しました。遠心分離後、上清を0.1 %ギ酸水で希釈して固相抽出カートリッジにロードしました。抽出液を乾固した後、メタノール30 μLで溶解し、LCMS分析試料としました。

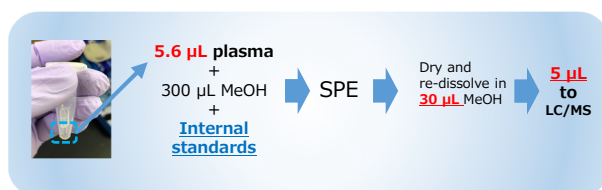


図3 前処理ワークフロー

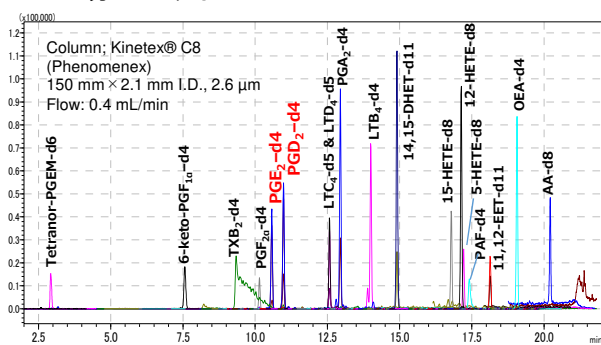
■結果

<高速分析メソッド開発>

ASMS2019では、エイコサノイドおよび脂肪酸代謝物196成分と、18成分の内部標準試薬を含む、326個のMRMトランジションからなるメソッドを報告しました。このメソッドにより疾患モデルマウスの血清中から延べ109成分を検出し、定量的プロファイリングを行いました。内部標準試薬18成分のMRMクロマトグラム（20分メソッド）を図4の上段(I)に示します¹⁾。

分析時間の高速化を図るためにターゲット成分数を、上記の109成分に5成分を加えた114成分に絞りました。18成分の内部標準試薬をあわせて、合計200個のMRMを10分の分析時間内に設定しました。新規開発したメソッドでの内部標準試薬18成分のMRMクロマトグラムを図4の下段(II)に示します。新規に開発した10分メソッドでは、プロスタグランジンE₂-d4(PGE₂-d4)とPGD₂-d4はそれぞれ5.05分、5.24分に溶出し、分離度は、3.0でした。20分メソッドにおける両成分の分離度は3.8であり、分離を損なうことなく分析時間の短縮を行いました。

I. 20分メソッド



II. 新規10分メソッド

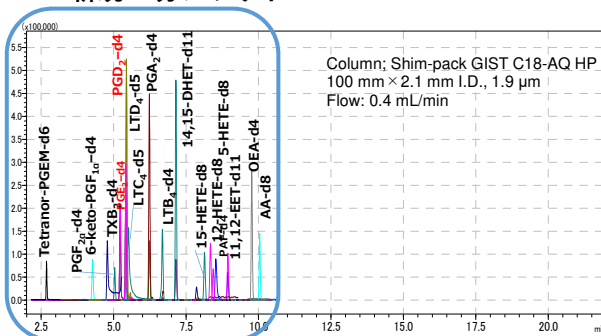


図4 内部標準物質（18成分）のMRMクロマトグラム
I. 20分メソッド (ASMS2019)
II. 新規10分メソッド

<マイクロサンプリングの再現性>

MSW²を用いてヒト血清を3回微量採取し、LC/MS分析を行うことで、MSW²のマイクロサンプリング「5.6 μL」の再現性を確認しました。最も強度が高かったLyso-PAF(血小板活性化因子)のサンプリング(n=3)間における面積値の変動は、3.2%でした。5.6μLマイクロサンプリングの精度は、約3%(CV%)と推定されました。

Nexera, LCMS, MSW², Shim-packおよびMicrosampling Wing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。KinetexおよびSTRATAは、Phenomenex, Inc.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

01-00124-JP 初版発行：2021年3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。

<ヒト血漿プロファイリング>

5.6 μLのヒト血漿から、5-, 8-, 11-, 12-および15-HETEsなど主要なアラキドン酸代謝物を含む50成分が検出されました。表2に再現性良く検出された36成分のピーク高さ比（ターゲット/対応する内部標準物質）と再現性（CV%, n=3）を示します。

表2 ヒト血漿（5.6 μL）中で検出された成分の高さ比

	脂肪酸種	化合物名	保持時間	高さ比平均 (3回分析)	CV% (3回分析)
1	AA	6-trans-LTB4	6.65	0.0378	9.4
2	AA	14,15-DHET	7.229	0.0109	18.2
3	AA	11,12-DHET	7.334	0.0065	19.1
4	AA	15-HETE	8.175	0.4461	7.7
5	AA	11-HETE	8.301	1.1596	1.9
6	AA	8-HETE	8.338	0.4028	14.1
7	AA	12-HETE	8.367	0.3975	14.2
8	AA	15-KETE	8.369	0.0593	12.0
9	AA	9-HETE	8.434	0.1796	13.7
10	AA	5-HETE	8.465	0.7621	3.5
11	AA	12-KETE	8.553	0.0544	9.3
12	AA	AA	10.073	11.6832	11.2
13	ALA	9-HOTrE	7.487	0.0041	4.8
14	DGLA	15-HETrE	8.495	0.2570	14.6
15	DGLA	8-HETrE	8.529	0.1466	14.9
16	DHA	10,17-DiHDHA	6.73	0.0173	13.9
17	DHA	20-HDHA	8.098	0.0423	6.9
18	DHA	16-HDHA	8.265	0.0830	13.1
19	DHA	10-HDHA	8.338	0.0500	10.4
20	DHA	14-HDHA	8.357	0.0510	17.6
21	DHA	7-HDHA	8.431	0.0201	8.1
22	DHA	11-HDHA	8.431	0.1002	19.9
23	DHA	8-HDHA	8.46	0.0850	16.0
24	DHA	DHA	9.993	5.2927	3.8
25	EA	AEA	9.076	0.0256	9.1
26	EA	OEA	9.793	0.2154	2.3
27	EDA	15-HEDE	8.924	0.0239	19.9
28	EPA	EPA	9.584	2.0875	11.0
29	LA	12,13-DiHOME	6.905	0.0844	6.1
30	LA	9,10-DiHOME	6.986	0.1568	5.9
31	LA	9-HODE	8.015	1.8331	6.9
32	LA	13-HODE	8.015	1.2752	7.9
33	LA	9-HpODE	8.206	0.2157	15.1
34	LA	13-KODE	8.209	0.2299	17.8
35	LA	9-KODE	8.299	0.0434	18.7
36	LPC	Lyso-PAF	7.861	575.2240	3.4

略号 AA: Arachidonic acid, DGLA: Dihomo-gamma-linolenic acid, DHA: Docosahexaenoic acid, EA: Ethanolamide, EDA: Eicosadienoic acid, EPA: Eicosapentaenoic acid, LA: Linoleic acid, LPC: Lyso-phosphatidylcholine

■まとめ

エイコサノイドを含む脂肪酸代謝物114成分を10分でモニタリングできるハイスループット分析法を開発しました。本法を用いて、ヒト血漿5.6 μL (MSW²マイクロサンプリング相当量) から、エイコサノイドを含む36成分以上の脂肪酸代謝物、DHA代謝物およびリノレン酸代謝物が定量的に検出可能であることが確認されました。

これらの成果は、再使用 (Re-using) マウスを用いた病態生理学の研究等への展開が期待できます。

参考文献

- ¹⁾ M. Yamada, T. Nakamura, A. Murata and T. Hattori, MP-546, 67th ASMS (2019)

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。改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm
閲覧には、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/

© Shimadzu Corporation, 2021