

Application News

シングル四重極質量分析計を用いた糞便中の親水性代謝物の一斉分析

服部 考成、柴山 泰子

ユーザーベネフィット

- ◆ シングル四重極LC-MSで、糞便に含まれる親水性代謝物を簡便に一斉分析できます。
- ◆ マルチオミクス解析パッケージを用いることで、容易に多変量解析まで行うことができ、サンプルに特徴的に含まれる成分を簡単に見つけることができます。

■はじめに

ヒトの腸内には、約1000種類、およそ100兆個もの腸内細菌が生息すると言われています。近年、これら腸内細菌が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになりつつあり、腸内細菌叢に関する研究が注目されています。医学分野では、腸内細菌叢と大腸がん等疾患との関係、薬効や免疫系へ及ぼす影響等、また食品分野では機能性食品に含まれる乳酸菌の保健効果の検証等が行われています。腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸をはじめとした代謝物は、宿主へ何らかの影響を与えると考えられ、そのため、腸内細菌研究において代謝物を分析することは重要です。

本アプリケーションニュースでは、シングル四重極LC-MSを用い、糞便中の親水性代謝物を一斉分析した事例をご紹介します。糞便中の短鎖脂肪酸・有機酸を高感度で分析する必要がある場合は、Application News No. 01-00601-JPの手法が有用ですので、合わせてご活用下さい。

■サンプル

試料であるサル糞便の詳細を表1に、採取地点の概略図を図1に示します。A地点、B地点、C地点から、計5頭分を採取しました。採取現場で凍結し、分析まで-80℃で冷凍保管しました。詳細は、土田らの参考文献をご参照下さい。

表1 試料の詳細

サンプル名	採取場所	サル	凍結処理までの経過
S1	A地点	不明	半日~1日経過
S2	B地点	4歳 オス	排泄直後
S3	B地点	2歳 オス	排泄直後
S4	C地点	大人 メス	排泄直後
S5	C地点	大人 メス	排泄直後

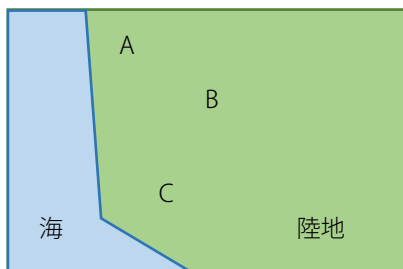


図1 採取地点の概略図

■前処理

図2に前処理手順を示します。糞便 100 mg にりん酸緩衝生理食塩水 (PBS) 700 μL を添加後、攪拌し、その上清を遠心分離、限外濾過しました。その後、濾液を超純水で10倍希釈しました。希釈の際、内部標準物質として、Morpholinoethanesulfonic acid (MES) を10 μmol/Lになるように添加しました。

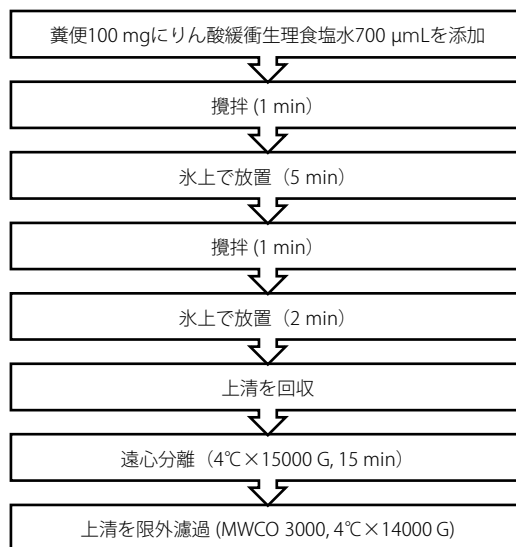


図2 糞便の前処理方法

■装置、分析条件

分析には、図3に示すNexera™シリーズとLCMS-2050を組み合わせたシステムを使用しました。LCMS-2050は、コンパクトでありながら、使いやすさや性能面にも秀でたシングル四重極質量分析計です。ESI法とAPCI法、両方の長を有するイオン化である加熱型DUIS™を搭載し、質量範囲は m/z 2-2000まで対応しています。そのため、幅広い物性を持つ代謝物の一斉分析に有用な装置です。



図3 Nexera™, LCMS™-2050システム

表2にHPLCおよびMSの分析条件を示します。LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 ver.3の分析条件を参考に、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143成分の一斉分析系を構築しました。

表2 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera XR)	
Column	: Shim-pack™ GIST PFPP*1 (2.1 mmI.D. x 150 mmL, 3.0 μm)
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 (17-19 min, 0.5 mL/min)
Injection volume	: 3 μL
[MS conditions] (LCMS-2050)	
Ionization	: ESI/APCI (DUIS), Positive and Negative mode
Mode	: SIM (143 events)
Nebulizing gas flow	: 2.5 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 7.0 L/min
Desolvation temp.	: 500°C
DL temp.	: 250°C

*1 P/N: 227-30858-07

■分析結果

サル糞便中の親水性代謝物を一斉分析した結果、アミノ酸、有機酸、核酸系代謝物を中心に66成分が検出されました。各サンプルから検出された代謝物数を表3に示します。

表3 検出成分数

S1	S2	S3	S4	S5
44	52	52	55	48

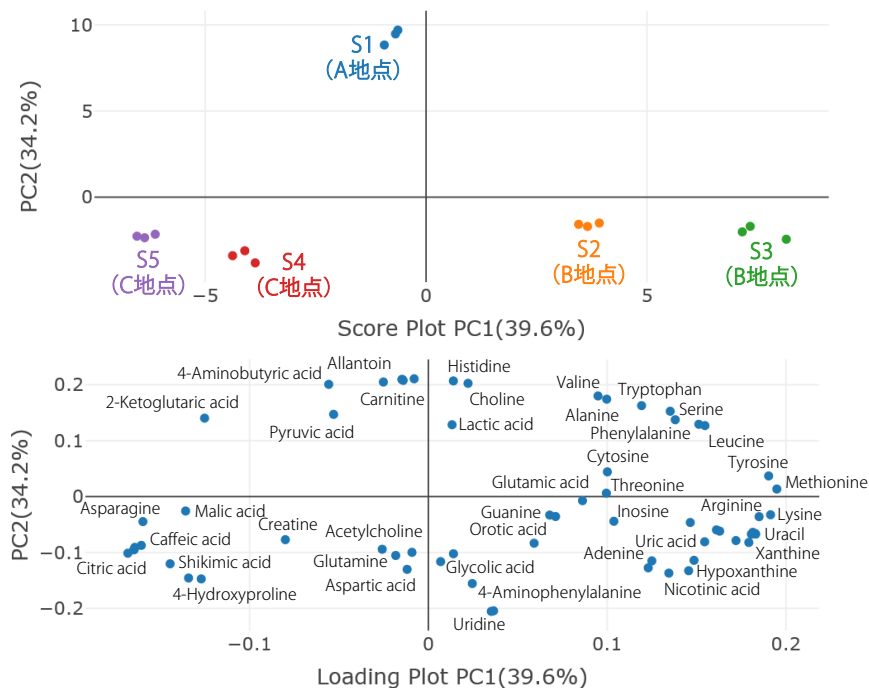


図4 主成分分析の結果

<参考文献>

- 1) S. Tsuchida, T. Hattori, A. Sawada, K. Ogata, J. Watanabe, K. Ushida: Fecal metabolite analysis of Japanese macaques in Yakushima by LC-MS/MS and LC-QTOF-MS, J Vet Med Sci, 83 (6) 1012-1015 (2021).

<関連アプリケーション>

1. 有機酸高速分析カラム Shim-pack™Fast-OAIによる腸内細菌叢研究の生産性向上 [Application News No. L555](#)
2. シングル四重極質量分析計を用いた糞便中の短鎖脂肪酸・有機酸の分析 [Application News No. 01-00601-JP](#)

LCMS、Nexera、DUIS、Shim-packは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

内部標準物質に対する各成分のピーク面積比を用いて、マルチオミクス解析パッケージで主成分分析を行いました。主成分分析の結果を図4に示します。スコアプロット（図4上）から、糞便の採取場所（サルの群れ）の違いで分類されることがわかりました。ローディングプロット（図4下）から、S1には、4-アミノ酪酸（GABA）、カルニチン、コリン等が、S2、S3には、キサンチン、ヒポキサンチン等のプリン体関連成分が、S4、S5にはクエン酸、コーヒー酸等の有機酸が特徴的に含まれることがわかりました。糞便採取前の摂食の違いにより、腸内細菌が生産する代謝物の差異を表していると考えられます。

■まとめ

シングル四重極LC-MSを用いた糞便中の親水性代謝物の一斉分析事例をご紹介しました。通常、このような代謝物のワイドターゲット分析では、トリプル四重極LC-MSが使われることが多いですが、本報告で示した通り、シングル四重極LC-MSでもできることがわかりました。トリプル四重極LC-MSと比べ、シングル四重極LC-MSは安価で扱いやすいため、質量分析の経験がない方をはじめ、より多くの方に使っていただきやすい装置です。シングル四重極LC-MSによる親水性代謝物の一斉分析が広まることで、腸内細菌研究のますますの発展が期待されます。

本アプリケーションニュース作成にあたり、サル糞便のご提供並びにご指導を中部大学 応用生物学部の牛田一成教授にご協力頂きました。心より感謝申し上げます。