

分析までの経過時間が定量におよぼす影響

○高垣さとし^{A)}、前田康博^{B)}、

^{A)} 名古屋市立大学 共用機器センター

^{B)} 藤田医科大学 オープンファシリティセンター

概要

名古屋市立大学では受託解析事業でトリプル四重極質量分析計(MS/MS)を利用したメタボライト定量解析を行っている。着実に依頼件数が増えるとともに多検体を取り扱うことが増えてきているため、本稿では一次代謝物メソッドパッケージ（水溶性化合物）と胆汁酸メソッドパッケージ（脂溶性化合物）（株式会社島津製作所）を用いて分析をするにあたり、オートサンプラーに投入して分析するまでの時間経過による影響を確認した。本検討実験は人材育成において技術指導を賜った藤田医科大学前田康博准教授と共に行ったものである。

1 方法

水溶性化合物用、脂溶性化合物用をそれぞれ Control 血清から前処理しサンプルを準備した。サンプルをオートサンプラー（4℃）に投入後、それぞれ 0～48 時間の間で 4 時間毎に LCMS8050（SHIMADZU）に導入し分析した。内部標準法で解析し、対象とする化合物は一定量以上の強度があるものに絞り検討した。

1.1 前処理（水溶性化合物）

Control 血清 200 μL に内部標準物質 Methionine sulfone（100 μM ）40 μL とメタノール 800 μL を添加し、攪拌（1 分間）・遠心分離（15,000rpm, 15 分, 4℃）後、その上清 840 μL を採取し窒素ガスで乾固したものを、水 800 μL で再溶解し各 50 μL 、13 本のバイアルに分注した。

1.2 前処理（脂溶性化合物）

Control 血清 100 μL に内部標準物質 D4_GDCA（1 μM ）10 μL 、塩酸（1M）30 μL 、アセトニトリル 1,000 μL を添加し、攪拌（1 分間）、遠心分離（14,000g, 15 分, 室温）後、上清 1,000 μL を採取し窒素ガスで乾固してメタノール 100 μL で再溶解したものを 14 本準備し、すべてを混合した後に、各 100 μL 、13 本のバイアルに分注した。

1.3 分析（水溶性化合物）

一次代謝物メソッドパッケージ Ver.3（SHIMADZU）、カラム Shim-pack GIST PFPP（株式会社島津ジーエルシー）2.1 mm× 150 mm、移動相 A：0.1%ギ酸水・移動相 B：0.1%ギ酸アセトニトリルを利用した。オートサンプラーに 13 本をセットし、1 時間おきに 2 回（2 時間でバイアル 1 本使用）、48 時間分析し続けた。

1.4 分析（脂溶性化合物）

胆汁酸メソッドパッケージ（SHIMADZU）、カラム Ace Excel C18 Amide 2.1 mm× 75 mm、移動相 A：0.01%ギ酸水・移動相 B：アセトニトリル/メタノール 90/10 を利用した。オートサンプラーに 13 本をセットし、1 時間おきに 2 回（2 時間でバイアル 1 本使用）、48 時間分析し続けた。

1.5 検討対象化合物の選定方法

内部標準法で解析し、検討対象化合物は面積比（化合物 Area Under the Curve/内部標準品 Area Under the Curve）が2以上の化合物とした。

2 結果

水溶性化合物（一次代謝化合物）の検討では、面積比が若干下がるものも上がるものもあったが、変動係数（標準偏差／平均値）を確認すると、2.64～8.37の範囲であった（図1）。

一方、脂溶性化合物の検討では、同じく0-48時間で検討した結果、変動係数が2～43まで幅広く、化合物によって大きく変動するものがあった。脂溶性化合物（胆汁酸化合物）については経過時間によって大きく増加・減少しているものがあり、経過時間の影響が大きいことがわかった（図2）。

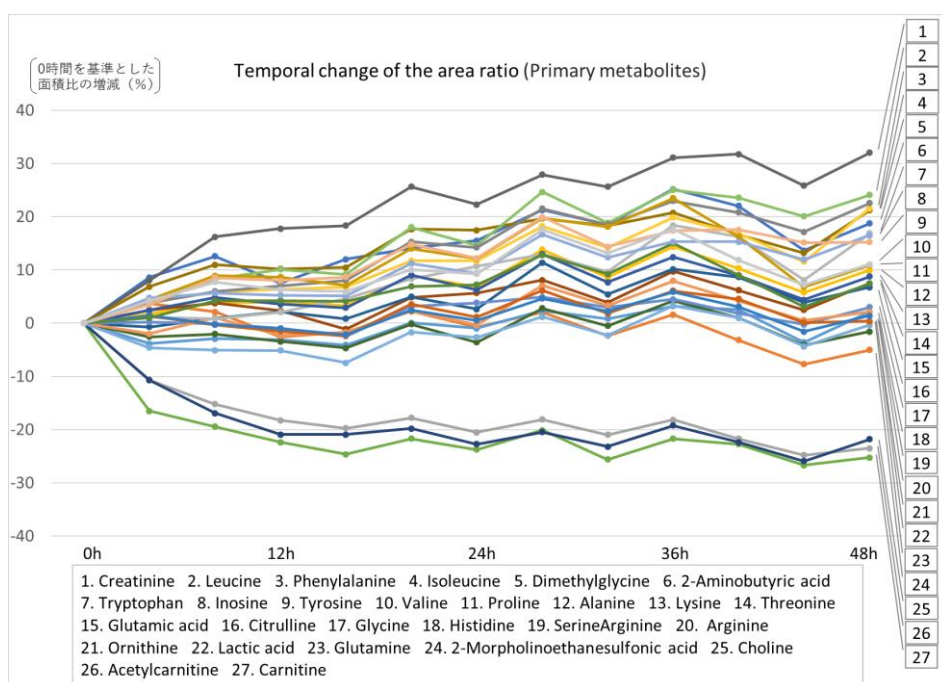


図1. 時間経過による水溶性化合物の強度変化（0時間を基準として面積比の増減（%））

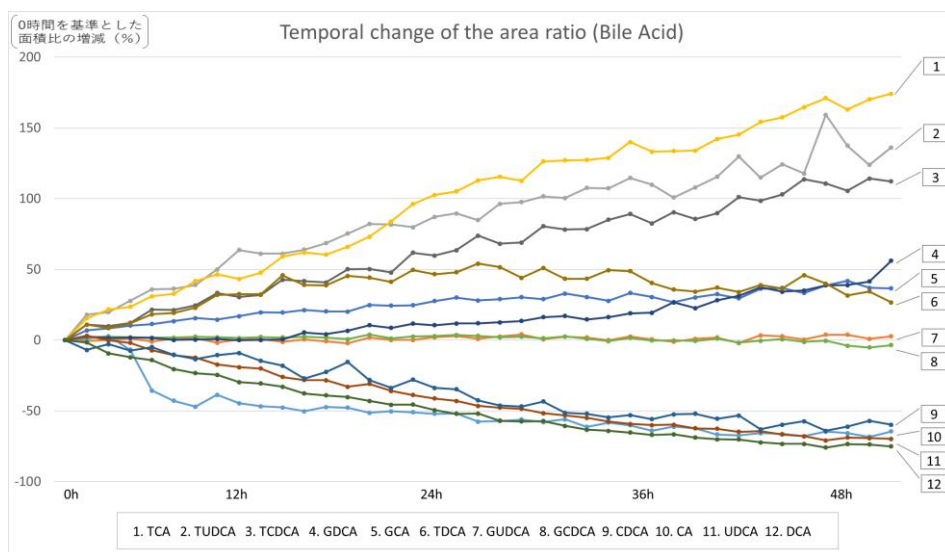


図2. 時間経過による脂溶性化合物の強度変化（0時間を基準として面積比の増減（%））

3 考察

今回分析した水溶性化合物では面積比が若干下がるものも上がるものもあったが、変動係数を確認するとすべて 10 未満に収まっているため、0-48 時間の間では一度にオートサンプラーにセットしても経過時間による影響は少ないとの結論に至った。また脂溶性化合物については大幅な増加傾向の化合物はタウリン抱合、増加もしくは安定している化合物はグルタミン抱合、大幅な減少傾向の化合物は抱合なしであった。内部標準物質がグルタミン抱合の D4_GDCA であったため、グルタミン抱合のものは比較的安定している。上記によりターゲットとする化合物に内部標準品を適切なものに合わせる必要があることがわかる。ただし、48 時間経過したときの増減率を見ると、グルタミン抱合の化合物も水溶性化合物（一次代謝物）よりも増加率もしくは減少率が大きく、あまり長くオートサンプラーに入れない方がよいという結論に至った。

4 今後の展望

名古屋市立大学で行われた質量分析における人材育成では試行的（技術料を取らない）受託解析が大きな成果を生んでいる。令和 6 年度に Thermo Fisher Scientific Orbitrap Exploris 240 が導入されたこと、アドバイザー制度（利用装置について専門知識のある研究者をアドバイザーとして設定）を制定したことも後押しし、依頼件数も表 1.の通り急増している。約 3 年間の試行的受託解析事業も解析結果の信頼性が十分担保できていると判断され、令和 7 年 12 月からは技術料を有料化するようになった。

また自己財源（目的積立金）により質量分析の受託依頼を受ける職員を 2 名雇用しており、また令和 7 年 12 月からの技術料の徴収により共用機器センターの収入を安定させることで、今後も受託解析事業の安定した運営ができる体制が整った。

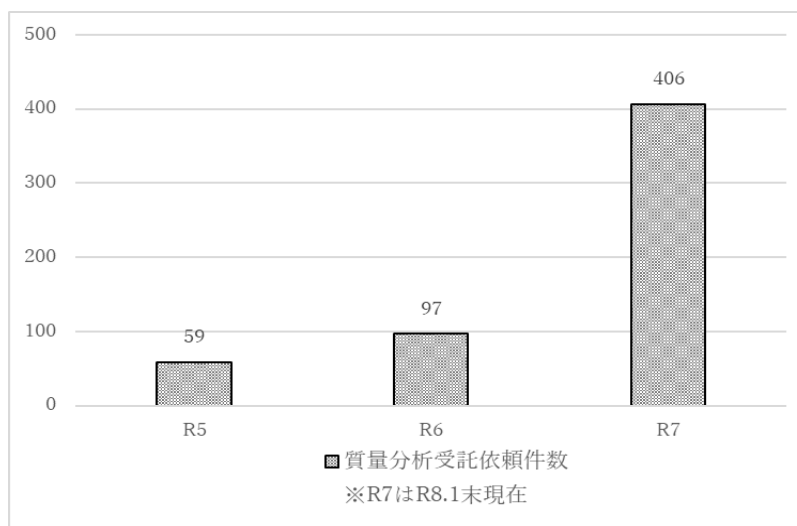


表 1. 質量分析受託依頼件数

5 謝辞

本発表は文部科学省先端研究基盤共用促進事業（コアファシリティ構築支援プログラム）JPMXS0441500025 で共用された機器を利用したものです。

検討実験のために試薬やカラムを快く貸して下さった名古屋市立大学呼吸器・免疫アレルギー内科学伊藤圭馬様、機能組織学植田高史様、受託解析事業を広範囲で支えて下さった細胞生化学橋本寛様、共用機器センターの皆様、この 4 年半を支えて下さった島津製作所とその関連会社の本学担当の皆様に感謝申し上げます。