

## 「鍼灸針」を用いた分析法を応用し、生きたマウスの内因性代謝物（メタボライト）のリアルタイム・モニタリング手法の開発に成功

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長：高橋 雅英）および名古屋大学高等研究院（院長：篠原久典）の財津 桂（ざいつ けい）准教授、林 由美（はやし ゆみ）助教らの研究チーム（若手新分野創成研究ユニット in vivo リアルタイム・オミクス研究室）は、株式会社 島津製作所らと共同で、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）」と「タンデム質量分析計（MS/MS）」を組み合わせた「PESI/MS/MS」による内因性代謝物（メタボライト）の直接分析法を開発しました。

近年、メタボライトの網羅的解析法であるメタボローム解析（メタボロミクス）の応用分野が拡大しています。現在、主としてメタボローム解析では質量分析計が用いられていますが、質量分析を行う前にメタボライトの抽出等の前処理操作を行う必要があります。しかし、生体内でのメタボライトの変化をより正確に捕捉するためには、前処理操作が不要な分析手法の開発が望まれます。

本研究では PESI と呼ばれる「鍼灸針」を利用した新規イオン化法とタンデム質量分析計を組み合わせることで、肝臓から直接メタボライトを分析する手法を開発しました。さらに、本手法を「生きたマウス」の肝臓に応用し、エネルギー産生に関与する特定のメタボライトの変化をリアルタイムでモニタリングすることにも成功しました。本手法は今後、新たなメタボライト分析手法の発展を飛躍的に推し進め、かつ、動物における代謝異常疾患の原因探索や、植物のリアルタイム・モニタリングへの応用など、広範囲な研究分野に展開することが期待されます。

本研究成果は、名古屋大学研究強化促進事業 若手新分野創成研究ユニット in vivo リアルタイム・オミクス研究室の活動に基づくものであり、平成 28 年 3 月 9 日付（米国東部時間）米国科学雑誌「Analytical Chemistry」オンライン版に掲載されました。

### 【ポイント】

- 新規イオン化法である Probe Electrospray Ionization (PESI)とタンデム質量分析計 (MS/MS)を組み合わせた PESI/MS/MS 法による前処理が不要な内因性代謝物(メタボライト)の直接分析法を開発した。
- 四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>)を用いて作製した肝障害モデルマウスと対照マウスの肝臓について、PESI/MS/MSを用いたメタボライトの直接分析を行ったところ、両者のメタボライト・プロファイルを明確に識別することができた。
- 本手法を「生きたマウス」の肝臓に応用したところ、メタボライトのリアルタイム・モニタリングに成功した。

## 【研究背景】

近年、アミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類等のいわゆる内因性代謝物(メタボライト)<sup>1</sup>を網羅的に解析する技術「メタボローム解析(メタボロミクス)」が、バイオマーカーの探索や生体の機能解明に関わる研究等に幅広く応用されるようになってきています。現在、メタボロームの分析には主として質量分析計<sup>2</sup>が用いられますが、質量分析計では生体成分をイオン化して測定を行います。一般に、生体サンプルからメタボライトを分析するためには、生体サンプルからメタボライトを抽出する操作や、濃縮操作あるいは誘導体化と呼ばれる操作(これを前処理操作と呼びます)を行う必要があります。しかし、このような前処理操作の間にメタボライトの分解が生じる場合やメタボライトの濃度に変動(バイアス)が生じることもあり、生体内のメタボライトの濃度やその変化を正確に補足するためには、前処理操作に伴うバイアスを出来るだけ排除することが好ましいと考えられます。さらに今後、疾患等によるメタボライトの生体内の変動をより正確に捉えるためには、メタボライトのリアルタイム・モニタリング手法の開発も不可欠になると想定されます。しかし、メタボライトのリアルタイム・モニタリングを質量分析計で行うためには、前処理操作を経ずにメタボライトを採取する必要があり、かつ、メタボライトの採取と同時にイオン化を行う技術を用いなければ達成できません。

近年開発された「探針エレクトロスプレーイオン化法(Probe Electrospray Ionization, PESI)<sup>3</sup>は、先端直径が 700 ナノメートルという極細の「鍼灸針」を用いて、生体に損傷をほぼ与えることなく(これを非侵襲的といいます)極微量の生体成分を直接採取することが可能であり、かつ、生体成分を採取した針に直接高電圧をかけることで、その場で生体成分をイオン化することが可能な技術です。

従って、PESI を用いれば、上記のような前処理操作が不要なメタボライトの分析手法が開発できると考えられます。さらに、PESI は非侵襲的に生体成分の採取が可能であることから、生きた動物から直接、生体成分を採取することも可能であると考えられ、生きた動物の生体成分のリアルタイム・モニタリングも可能になると考えられます。

## 【内容】

本研究では、PESI をタンデム質量分析計(MS/MS)<sup>2</sup>と呼ばれる二段階の質量分離が可能な装置と組み合わせることで、図 1 に示すような前処理が不要な分析システムを構築しました。本手法を解剖によって採取したマウスの肝臓に適用したところ、26 成分のメタボライトを直接検出することに成功しました。そこで、本手法の有用性を評価するため、四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)の投与によって作製した肝障害モデルマウスと対照マウスの肝臓を解剖で採取し、PESI/MS/MS によってメタボライトの直接分析を行いました。

図 2 は、モデルマウスと対照マウス、各 5 匹のメタボライトの測定結果を主成分分析<sup>4</sup>と呼ばれる手法で解析した結果です。図 2 に示すように、肝障害モデルマウスと対照マウスは主成分分析において明確にグループが分離していることが分かります。すなわち、本結果は肝障害によって生じた肝臓内のメタボライトの変化を PESI/MS/MS が直接捉えることに成功したことを示しています。



図 1 PESI/MS/MS システムの概略図

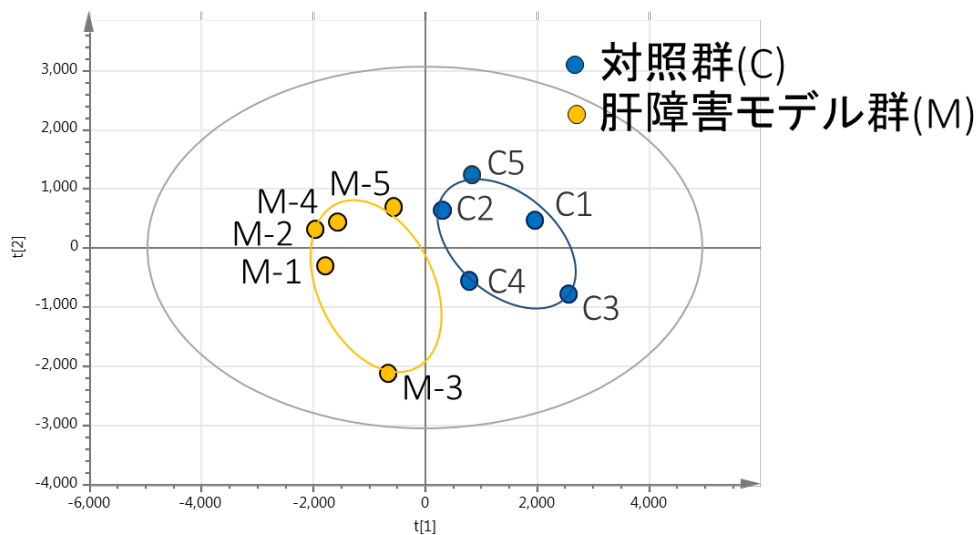


図 2 主成分分析の結果

さらに、本手法を生きたマウスの肝臓に応用し、メタボライトのリアルタイム・モニタリングを行いました(図 3)。ここでは、エネルギーの産生に不可欠な「TCA 回路」<sup>5</sup>を構成する成分(フマル酸および  $\alpha$ -ケトグルタル酸)をリアルタイムでモニターし、TCA 回路をピルビン酸の投与によって意図的に亢進させることで、フマル酸および  $\alpha$ -ケトグルタル酸の上昇を捕捉出来るか検証しました。その結果、図 3 に示すように、ピルビン酸の投与後、上記 2 成分の劇的な上昇を捕捉することに成功しました。

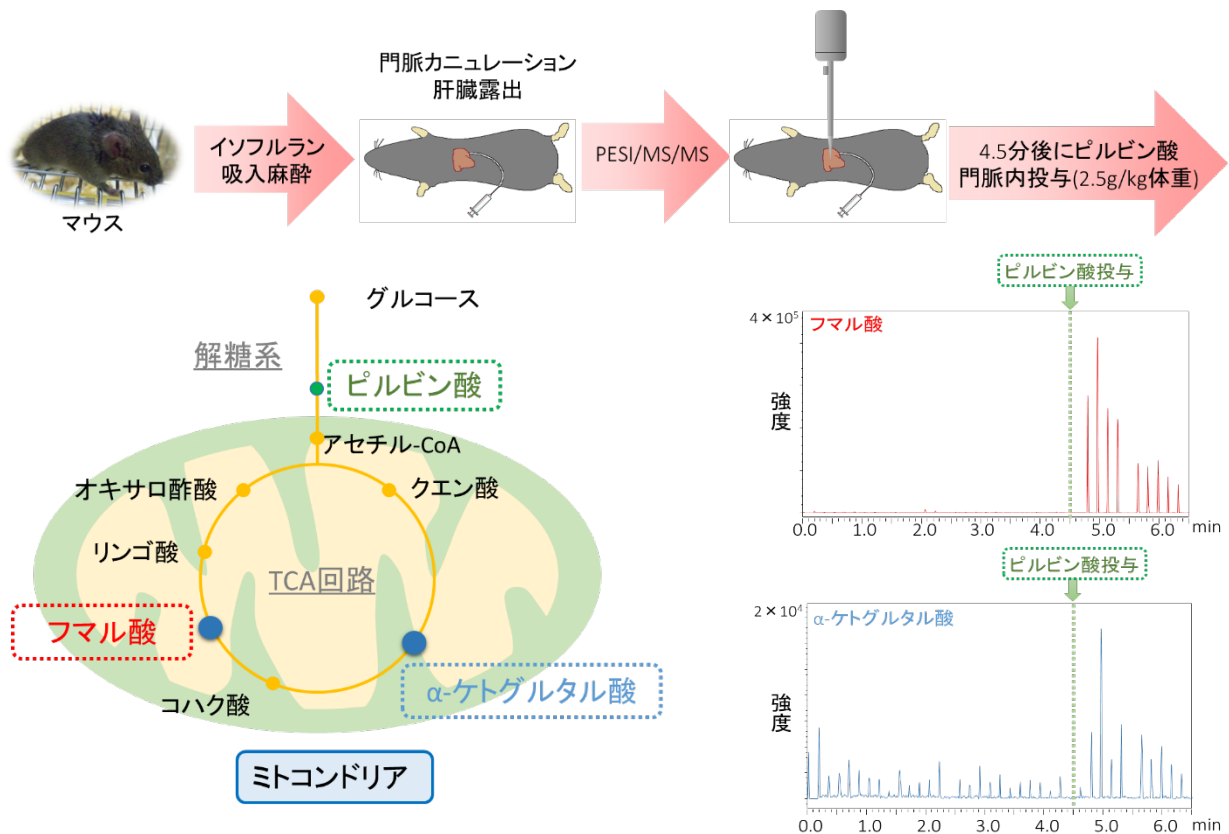


図 3 リアルタイム・モニタリング(上)と TCA 回路(左下)の概略図  
およびフマル酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸のモニタリング図(右下)

### 【成果の意義】

前処理操作が不要な新たなメタボライトの分析手法を開発したことで、生体内のメタボライトの変化をより正確に捉えることが可能になることが期待されます。さらに、本手法を生きた動物だけでなく、植物にも適用することで、動・植物のメタボライトのリアルタイム・モニタリング手法としての応用展開が期待されます。

### 【用語説明】

1. 内因性代謝物(メタボライト): 主としてアミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類などの内因性低分子群を指す。エネルギー産生経路を構成する成分などで知られるように、各分子がそれぞれ機能的なネットワークを形成していることから、近年、メタボライトの網羅的な解析技術であるメタボロミクスの進展が著しく、疾患や毒性のバイオマーカーとして利用することも試みられている。
2. 質量分析計: 対象成分をイオン化し、電場等を利用して対象成分を質量依存的に分離する分析法を指す。質量分離部には四重極型やイオントラップ型などのいくつかの種類があるが、四重極型と呼ばれる質量分離装置を 3 つ直列に接続したものが「タンデム質量分析計(MS/MS)」であり、イオン化した対象成分の特異的な検出が可能である。

3. 探針エレクトロスプレーイオン化法(PESI):山梨大学の平岡賢三 教授が 2007 年に開発した新規イオン化法であり、先端の直径が 700 ナノメートルの金属製の「鍼灸針」を用いて、成分の採取とイオン化を同時に行うことが可能である。「鍼灸針」を用いているため、ほぼ生体に損傷を与えず(これを非侵襲的という)に生体成分の採取が可能であり、かつ、非常に高いイオン化効率を有しているため、生体成分の高感度分析法としても応用できる。
4. 主成分分析:多数の変数(説明変数)でプロファイルが記述される対象を、視覚的に解釈するために二次元(場合によっては三次元)空間に低次元化する手法を指す。本例では 26 成分のメタボライトでプロファイルが記述される各マウスを、二次元空間に落とし込むことで、各群(ここでは肝障害モデルマウス群と対照マウス群)のプロファイルに差異があることを視覚的に描写出来る。
5. TCA 回路:クエン酸回路とも呼ばれ、エネルギーの産生に重要な役割を果たしている生化学反応経路である。ミトコンドリアのマトリクス(基質)に存在するため、ミトコンドリアの外膜を通過できるピルビン酸を投与すれば、TCA 回路が亢進し、TCA 回路を構成する成分の濃度が上昇するものと考えられる。

#### 【論文名】

Intact endogenous metabolite analysis of mice liver by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its preliminary application to in vivo real-time analysis

Kei Zaitzu, Yumi Hayashi, Tasuku Murata, Tomomi Ohara, Kenta Nakagiri, Maiko Kusano, Hiroki Nakajima, Tamie Nakajima, Tetsuya Ishikawa, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii

Analytical Chemistry  
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04046