

Gas Chromatograph Mass Spectrometer

GC/MS

Technical Report No. 5

▶ GC/MSを用いた血中代謝物プロファイリングによる膵臓がんの新規診断法

神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学
消化器内科学
質量分析総合センター

吉田 優

Abstract: //////////////////////////////////////

膵臓がん患者と健常者の血清からそれぞれ抽出した代謝物をGC/MSで測定し、代謝成分データベースを用いて代謝物の同定を行いました。その結果、60個の代謝物が検出されました。得られた結果をSIMCA-P+ (Umetrics社)を用いて多変量解析に供した結果、膵臓がん患者と健常者のグループを分けることができました。

Keywords: GC/MS, metabolomics, organic acids, amino acids, pancreatic cancer, multivariate analysis

////////////////////////////////////

▶ はじめに:

がんによる死亡は増加の一途を辿っており、昨今では日本人死因の約3分の1を占めるようになりました。中でも、膵臓がんは早期発見が困難で、その治療成績も不良であることから、早期診断が可能な疾患マーカーの開発が望まれています。近年、代謝物を網羅的に解析する方法であるメタボローム解析(メタボロミクス)が、医療分野に導入されつつあります。特に、疾患診断や薬効評価、薬剤毒性を示すマーカー探索が行われています。

メタボローム解析は、さまざまなクロマトグラフに質量分析計を接続した機器を用いて行われています。血液などの臨床検体は多種多量の代謝物を含むため、解析に用いるクロマトグラフの選択には、分解能や定量性、再現性に優れ、代謝物の同定可能なデータベースの存在が必須となります。これらの理由から、臨床検体を用いたメタボローム解析の実施に、GC/MS(ガスクロマトグラフ質量分析計)を選択いたしました。GC/MSを用いたメタボローム解析の有効性を検証するために、GCMS-QP2010 PlusとUmetrics社の多変量解析ソフトウェアSIMCA-P+を用いて、膵臓がん患者ならびに、健常人の血中代謝物プロファイリングを行い比較検討を行いました。

▶ 実験:

試薬

2-イソピルリンゴ酸をミリQ水に溶解し、1.0 mg/mLの濃度で調製し内部標準としました。オキシム化に使用するメト

キシアミン溶液はメトキシアミン塩酸塩(和光純薬工業株式会社(大阪))をピリジンに溶解させ20 mg/mLの濃度で調製しました。トリメチルシリル(TMS)誘導体化に使用するMSTFA(N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide)はGLサイエンス株式会社(東京)から購入しました。

前処理

神戸大学医学部附属病院、ならびに、関連病院で、倫理委員会承認後、同意が得られた患者、ならびに、健常人から得られた血清を用いました。血清は既に報告されている前処理手順に従って処理を行いました。まず、血清のスタート容量は50 μ Lで、サンプル間の補正のための標準物質として、あらかじめ水に溶解した2-イソピルリンゴ酸を5 μ L加えました。これは人工合成化合物で、ヒト血清では検出されないものです。これに、タンパク質を取り除くために、250 μ Lのメタノール/水/クロロホルム溶液(2.5:1:1)を加え、ボルテックスで混濁しました。37°Cで30分間、1,200 rpmで振盪させました。4°Cで5分間、16,000 \times gで遠心し、上清225 μ Lを新しいチューブに移し、これに200 μ Lの蒸留水を加えました。ボルテックスでよく混濁後、4°Cで5分間、16,000 \times gで遠心し、再び250 μ Lの上清を新しいチューブへ移しました。室温で20分間スピードバック(真空下での遠心濃縮)処理を行った後、残った液を-80°Cのディープフリーザー内に10分間入れてサンプルを凍結後、凍結乾燥機で一晩かけて脱水しました。これを、ピリジンで溶かした40 μ Lの20 mg/mLのメトキシアミン

(methoxyamine hydrochloride) に溶解しボルテックスでよく混ぜた後、30℃で90分間、1,200 rpm で振盪しオキシム化しました。その後、誘導体化のため 20 μL の MSTFA で、37℃で30分間、1,200 rpm で振盪しトリメチルシリル化しました。

GC/MSの測定条件

GC/MSにはGCMS-QP2010 Plusを、GC用のキャピラリーカラムには、DB-5 (30 m \times 内径0.25 mm \times 膜厚1.00 μm) (J&W Scientific) を用いました。GCの昇温条件は100℃から320℃までを4℃/分の速度で上昇させました。注入口温度は、280℃とし、キャリアガスにはヘリウムを用い、39.0 cm/秒の速度で流しました。サンプルはスプリットレスモードで、1 μL インジェクションしました。電子イオン化のエネルギーは、70 eVとし、ソース温度は200℃で、スキャンする m/z の範囲は35–600としました。

データの解析

上記の条件で得られた膵臓がん患者、ならびに、健康人から得られた血清由来水溶性代謝物のTICを示します (Fig.1)。主要なピークについて、データ解析ソフトであるGCMSsolutionとGC/MS代謝成分データベース (島津製作所) を用いて検索を行いました。このデータベースには、ヒトの尿中の代謝物から構築されたもので、アミノ酸、脂肪酸、有機酸などを含む178化合物に関して、ある設定条件での保持指標とEIスペクトルのデータが含まれています。EIスペクトルピークの類似度 (シミュラリティスコア) が、80以上の60種類の代謝物を同定し、これらについて9名の健康人群と20名の膵臓がん患者 (ステージIII-IV) 群のメタボロームデータを取得しました (Table 1)。代謝物の同定のために、保持指標より推測された保持時間と少なくとも2つの特異的なピーク (確認イオン、定量イオン) の m/z の存在を確認しました。

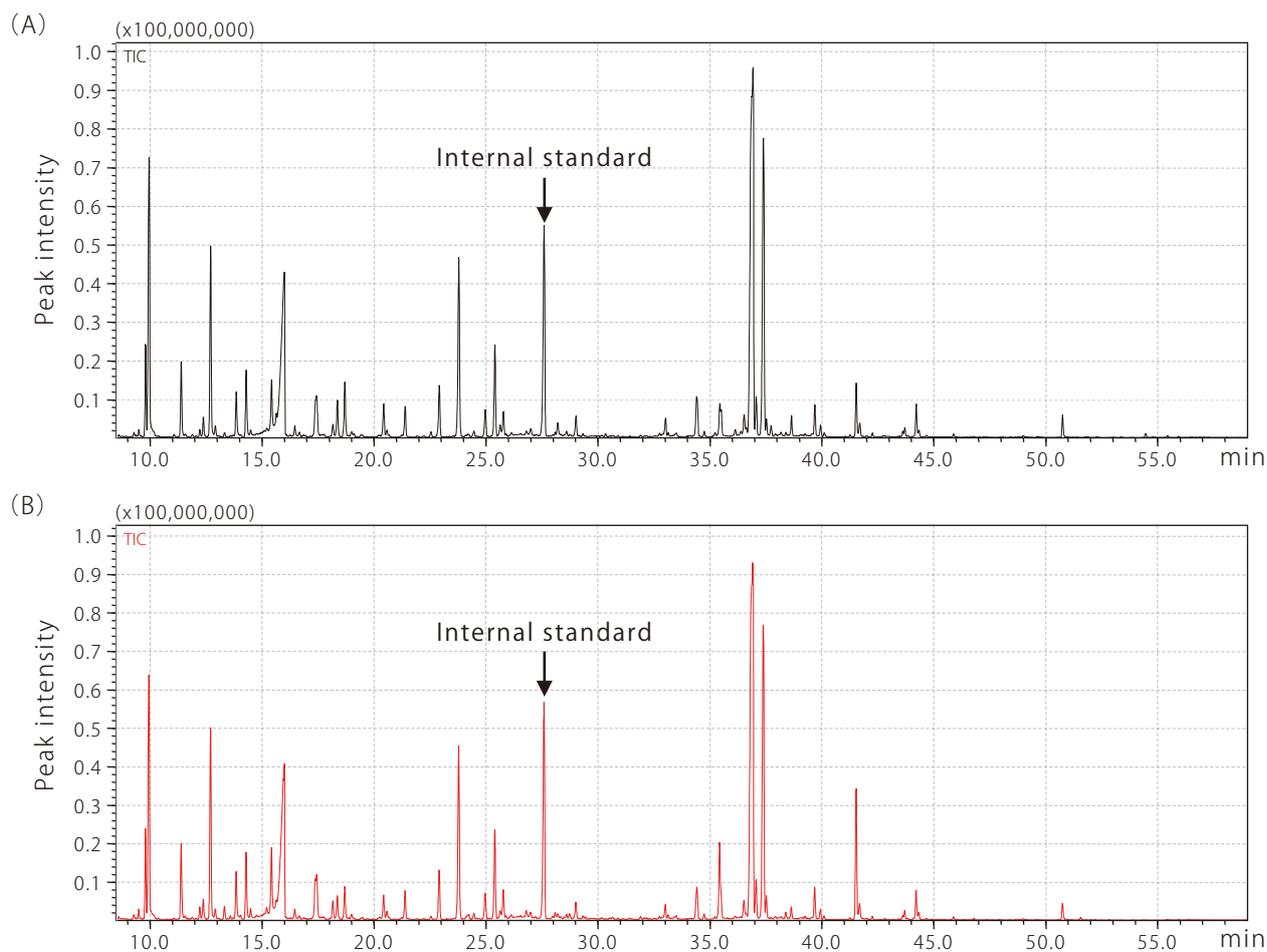


Fig.1: 膵臓がん患者と健康人の血清由来の水溶性代謝物のTIC

縦軸がピーク強度で、横軸が保持時間を表す。内部標準 (図中の↓) を用いてサンプル間の補正を行う。

(A) 膵臓がん患者

(B) 健康人

Table 1 膵臓がん患者と健常人の血清から検出された水溶性代謝物のリスト

	Fold induction	P value	Similarity	Retention time (min)	Quantified ion (<i>m/z</i>)	Confirmed ion (<i>m/z</i>)
01. Lactic acid	1.48	0.00011 ^a	87	8.849	219	191
02. Glycolic acid	0.89	0.45	94	9.246	205	177
03. L-Alanine	1.02	0.83	97	10.262	190	147
04. L-Glycine	0.76	0.033 ^a	95	10.768	204	176
05. Glyoxylic acid	1.16	0.53	86	11.004	233	218
06. Oxalic acid	1.01	0.87	86	11.037	190	219
07. 2-Hydroxybutyric acid	0.83	0.20	90	11.037	219	205
08. 3-Hydroxypropionic acid	1.28	0.32	81	11.576	219	177
09. Pyruvic acid	0.97	0.70	87	11.812	247	232
10. 4-Cresol	1.08	0.88	90	12.115	180	165
11. 3-Hydroxybutyric acid	2.49	0.21	96	12.149	233	191
12. 3-Hydroxyisobutyric acid	1.00	0.99	84	12.216	177	233
13. 2-Hydroxyisovaleric acid	1.36	0.24	95	12.418	247	219
14. Malonic acid	1.05	0.68	91	13.667	233	133
15. L-Valine	0.88	0.27	97	14.215	218	144
16. Urea	0.80	0.0028 ^a	96	14.798	189	171
17. Octanoic acid	0.73	0.00055 ^a	91	15.654	201	117
18. L-Leucine	0.94	0.60	92	16.168	232	218
19. Glycerol	0.73	0.069	90	16.203	218	205
20. Phosphoric acid	0.97	0.76	96	16.237	314	299
21. L-Isoleucine	1.05	0.71	95	16.956	232	218
22. L-Proline	1.26	0.23	98	17.157	216	147
23. Glyceric acid	0.53	0.00063 ^a	87	18.261	292	189
24. Fumaric acid	1.34	0.071	85	18.462	245	217
25. Citraconic acid	1.40	0.45	93	18.796	259	184
26. L-Serine	0.99	0.92	96	19.198	306	278
27. L-Threonine	0.89	0.19	96	20.168	291	218
28. Decanoic acid	0.76	0.016 ^a	81	22.129	229	117
29. Aspartic acid	1.30	0.075	96	24.393	334	306
30. L-Methionine	0.97	0.78	85	24.424	293	250
31. 5-Oxoproline	1.00	0.99	95	24.546	258	230
32. Thiodiglycolic acid	6.27	<0.0001 ^a	82	24.637	294	251
33. 4-Hydroxyproline	1.29	0.12	82	24.668	332	304
34. 7-Hydroxyoctanoic acid	1.38	0.00025 ^a	81	25.065	289	273
35. 2-Hydroxyglutaric acid	1.00	0.55	81	26.043	349	247
36. 3-Hydroxyphenylacetic acid	1.23	0.15	81	27.056	296	281
37. L-Glutamic acid	2.21	0.055	86	27.375	363	348
38. L-Phenylalanine	0.95	0.61	96	27.782	218	192
39. 4-Hydroxyphenylacetic acid	1.89	0.21	82	27.927	296	281
40. Lauric acid	0.76	0.047 ^a	93	28.101	257	145
41. Tartaric acid	1.47	0.36	81	28.130	292	219
42. Asparagine	1.35	0.013 ^a	84	28.942	348	333
43. cis-Glutaconic acid	1.11	0.60	80	30.953	346	331
44. Aconitic acid	1.54	0.030 ^a	84	30.953	375	285
45. L-Glutamine	1.00	0.97	92	31.807	362	347
46. Isocitric acid	0.95	0.52	92	33.244	465	375
47. Citric acid	0.97	0.71	97	33.244	363	347
48. Glucuronic lactone	0.94	0.44	86	33.297	287	259
49. Homogentisic acid	1.26	0.031 ^a	81	33.533	384	341
50. Myristic acid	0.77	0.0073 ^a	95	33.533	285	129
51. Glucuronic lactone	1.14	0.45	86	33.638	230	147
52. L-Tyrosine	0.99	0.92	85	36.297	382	354
53. Palmitoleic acid	1.31	0.36	97	38.017	311	145
54. Palmitic acid	0.79	0.032 ^a	97	38.447	313	145
55. N-Acetyltyrosine	1.57	0.026 ^a	80	40.171	260	218
56. Uric acid	0.61	0.0029 ^a	95	40.354	456	441
57. Margaric acid	0.80	0.018 ^a	92	40.788	327	342
58. Indolelactic acid	1.22	0.54	93	42.198	421	292
59. Stearic acid	0.74	0.0034 ^a	95	42.986	341	145
60. L-Tryptophan	0.98	0.82	95	43.139	405	377
2-Isopropylmalic acid (Internal standard)				27.620	275	147

膵臓がん患者(20人)と健常人(9人)のピーク強度の比較をfold inductionとして示す。P値は、Student's t testにて計算された。

▶ 多変量解析

多変量解析にはUmetrics社のSIMCA-P+ソフトウェア (Ver. 12.0.0) を用いました。最初に、血清サンプルより同定された60個の代謝物メタボロームデータを用いて、多変量解析のひとつである主成分分析を行いました (Fig.2)。その結果、取得したデータの中に、膵臓がん患者と健常人群を区別に寄与する代謝物が含まれ

ることが示唆されました。60個の代謝物に関して、がん患者群と健常人群と2群に分けて統計解析したところ、18個で統計的に有意差が認められました。その中には、乳酸、チオジグリコール酸、アスパラギン、アコニット酸、グリシン、グリセリン酸などが含まれていました。

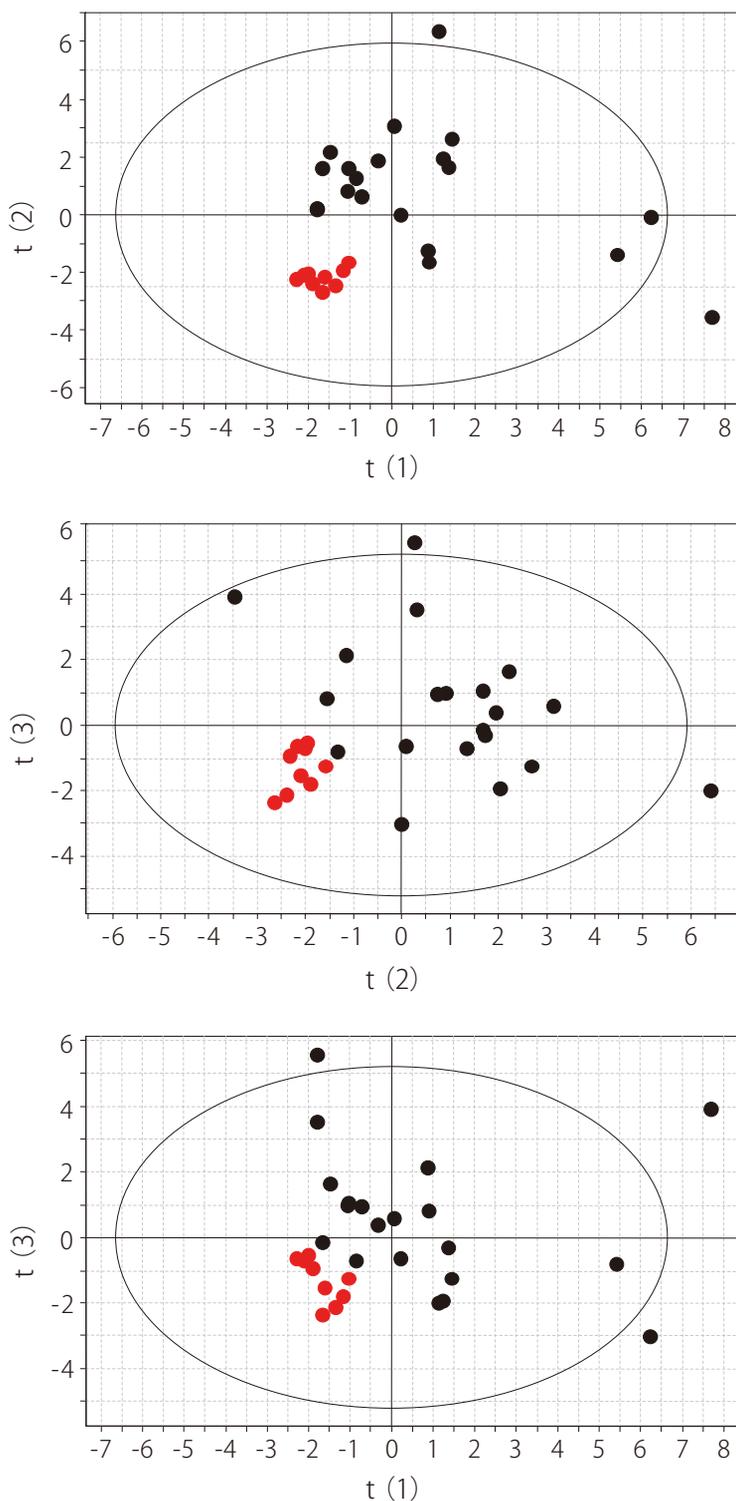


Fig.2: 膵臓がん患者と健常人のメタボロームデータの主成分分析のスコアプロット
健常人群 (●) とがん患者群 (●) が、明確にグループ分け可能であった。

▶ 終わりに

本検討により、GC/MSを用いた血中代謝物プロファイリングによる膵臓がんの新規診断法の可能性が示唆されました。本手法は、疾患特異的なメタボロームプロファイルが得られさえすれば、膵臓がん以外の疾患への応用も可能である可能性があります。本稿で紹介した質量分析計によるメタボローム解析により、様々な疾患特有のメタボロームプロファイルが明らかになり、一滴の血液から多くの疾患の早期診断ができる時代が来ることが期待されます。

参考文献

- [1] Nishiimi S, Shinohara M, Ikeda A, Yoshie T, Hatano N, Kakuyama S, Mizuno S, Sanuki T, Kutsumi H, Fukusaki K, Azuma T, Takenawa T, and Yoshida M. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*. 2010 Nov;6(4):518-528

掲載データは薬事承認された装置で採取されたものではありません。

▶ 謝辞

本研究は、多数の共同研究者の協力の下、当教室の西海信研究員が中心となり行われたものです。また、大阪大学大学院生命先端工学専攻、福崎英一郎先生に親切丁寧なご指導と多大なご協力をいただきました。この場をお借りしまして深く感謝申し上げます。

島津GC/MSと生体分子の定量

アミノ酸、有機酸や脂肪酸などの生体分子は、極性基を有し揮発性があまりないため、直接ガスクロマトグラフィ/マススペクトロメトリ(GC/MS)で測定することが困難です。そのため、これらの極性基を誘導体化することにより揮発性をもった化合物に変換して測定する必要があります。これらの作業は手間がかかり敬遠されがちでした。

しかし、GC/MSは、液体クロマトグラフィなどの他のクロマトグラフィと比べ分離能などの優れた点が見直され、生体成分の

測定に適用されるようになってきました。特に、GC/MSはキャピラリーカラムを用いて容易に高分離を実現でき、また、きょう雑物と目的成分のピークが重なっても電子イオン化法(EI法)により生成されるフラグメントイオンから適切なものを選ぶと、きょう雑物の影響を受けることなく目的成分を定量することができます。さらに、LC/MS/MSで問題となるイオンサプレッションが起これにくいことから、きょう雑物を多く含む試料の定量に適しています。

弊社のGCMS-QP2010シリーズは生体分析に最適な機能と性能を有します。

1. GCMS-QP2010シリーズは生体分子が低濃度まで測定できる感度を有しています。
2. 生体試料はきょう雑物を多く含みます。そのような試料をGC/MSで測定すると、イオン源の汚染が問題となります。

GCMS-QP2010シリーズは汚れにくく、しかもイオン源が汚染されても容易に洗浄できます。

3. 生体試料を一斉に分析するには、その設定が煩雑です。GCMS-QP2010シリーズ用GC/MS用代謝成分データベースには、最適な分析条件と定量のためのパラメータを含んだメソッドファイルが含まれています。

ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010 Ultra

GCMS-QP2010 Ultraの特長

1. 高感度
2. 保守メンテナンスが容易
3. 保持指標を用いた化合物同定が可能



GC/MS代謝成分データベース(アミノ酸・脂肪酸・有機酸)

「GC/MS代謝成分データベース」は、ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-QP2010シリーズ ワークステーション GCMSsolution向けライブラリです。保持指標付きマススペクトルライブラリを用いることによって、候補化合物を大幅に減らし、検索結果の信頼性を向上します。

本データベースには、分析条件、マススペクトル、保持指標などを登録した4種類のメソッドファイルと、CAS番号などを含む化合物情報、マススペクトル、保持指標を含む4種類のライブラリ、ハンドブック(ライブラリ情報の印刷物)から構成されています。

メソッド/ライブラリにはアミノ酸、脂肪酸、有機酸の代謝関連成分について、電子イオン化法スペクトル:261スペクトル、化学イオン化法スペクトル:50スペクトルが登録されています。

・このデータ集は弊社が得た情報および内容のままにご提供するものであり、その正確性および特定の目的における有用性について保証するものではありません。弊社は、このデータ集の使用により直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しても責任を負えないものであり、その使用により生じた結果および現象についてはお客様の責任とします。このデータ集の著作権は、株式会社島津製作所が所有しています。当社の許可なく内容の一部または全部を転載・複製することはできません。このデータ集の内容は将来予告なしに変更することがあります。このデータ集の内容は作成にあたり万全を期しておりますが、万一、誤りや記載もれなどが発見されても、ただちに修正できないことがあります。

 島津製作所

分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>



本社地区事業所認証取得



JQA-0376