

自動抽出装置を使った血漿，尿，糞便サンプルの胆汁酸 39 種類の迅速プロファイリング

Aurore JAFFUEL, 國澤 研大, 堀江 征司, 渡辺 淳

1 はじめに

胆汁酸 (BA) は小腸における脂肪の吸収に重要な役割を果たしている。さらに、コレステロールから胆汁酸への変換を介して、その代謝に重要な役割を担っている。肝臓でコレステロールの異化により一次胆汁酸が産生され、多くはタウリンまたはグリシンと結合し抱合胆汁酸が合成される。一部の一次胆汁酸は、後に腸内細菌により修飾され、二次胆汁酸が産生される。

これら胆汁酸の濃度は、いくつかの肝疾患の早期診断または機能評価のためのマーカーとして用いられている。急性および慢性肝不全は、世界保健機関 (WHO) による推定では、世界中で 1200 万人以上の人々が罹患しており、年間 200 万人が死亡しているとされている。肝疾患の早期診断のための検査として、血液酵素活性検査 (ALT, AST 等) や総胆汁酸測定 (TBA) が広く行われているが、これらの検査は決定的な解釈を提供できず、肝損傷の鑑別には個々の胆汁酸 (IBA) のモニタリングが重要であると指摘されている。

しかし、化学的に類似した多様な構造を持つ胆汁酸を分離、検出することは大きな課題となっている。多くの胆汁酸は、トリプル四重極質量分析計でフラグメントイオンを生成することが困難であり、いくつかの異性体も存在するため、正確な測定を保証するためには、これらの胆汁酸を完全に分離しなければならず、分離性能を最大限に引き出すような HPLC 条件の最適化が必要となる。

本稿では、生体試料 (ヒト血漿^{けっしょう}、ヒト尿およびマウス糞便^{ふん}) 中の 39 種の胆汁酸を 10 種の内部標準物質を用いて定量分析した。分析には「LC/MS/MS メソッドパッケージ胆汁酸 Ver.2」を用いている。本メソッドパッケージには、HPLC およびトリプル四重極質量分析計での分析のための最適化された条件、ならびに自動化試料調製プロトコルが含まれており、クロマトグラフィーの専門家でなくとも、容易に多種類の胆汁酸を一斉分析できるようになっている。

2 前処理

前処理はメソッドパッケージに含まれるサンプル調製プロトコルに従った (図 1)。この前処理法では Biotage[®] Extrahera[™] を使用し、96 の生体試料を合計 45 分 (1 サンプル当たり 0.5 分) で同時に処理することができる。手動で同じサンプル数を前処理すると約 3 時間必要であるため、この方法では 4 倍の高速化が可能である。また、少ないマンパワーで再現性が高く、低コストであるという利点もある。

マウスの糞便試料の場合には、腸管内で生成される胆汁酸の硫酸エステルおよびグルクロン酸抱合体から、胆汁酸を遊離させるため、最初に加水分解を行う。糞便 5~10 mg に水酸化カリウムを加え、80 °C で 20 分間インキュベートし、リン酸カリウム緩衝液を用いて pH を

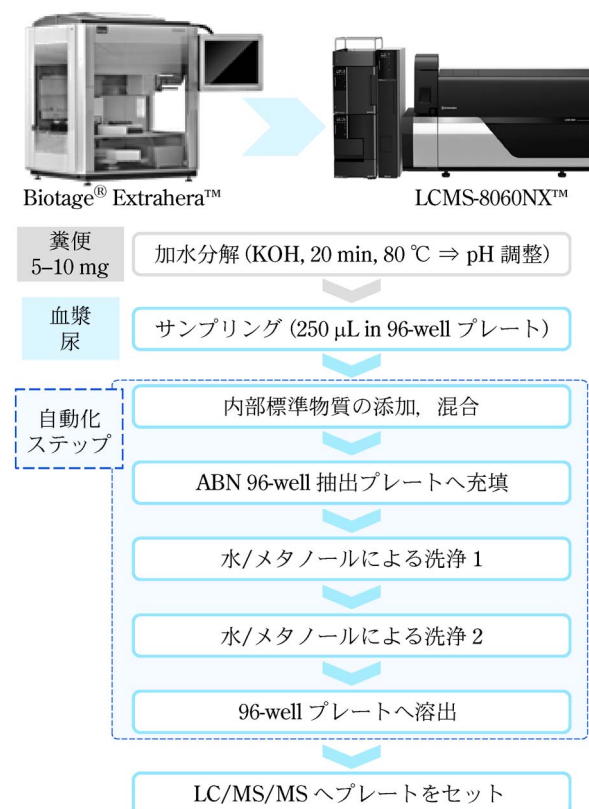


図 1 前処理プロトコル (血漿, 尿, 糞便)

下げて自動抽出用サンプルとした。血漿、尿および加水分解糞便いずれのサンプルについても、250 μ L を抽出に使用した。抽出用プレートには Evolute Express ABN 30 mg 96 ウェルプレート (Biotage[®]) を、抽出溶媒にはギ酸を添加した水とメタノールを使用した。

3 分析条件

前処理した試料を、LC/MS/MS メソッドパッケージ胆汁酸 Ver.2 記載のメソッドファイルを使用し、Nexera[™] X2 UHPLC, LCMS-8060NX のシステムで分析した。分析条件の詳細を表 1 に示す。対象化合物には 39 種の一次、二次および抱合胆汁酸を選択し、すべての胆汁酸クラスをカバーしつつ、高い定量精度を達成するために 10 種の内部標準物質 (安定同位体標識; Alsachim) を選択した。異性体間の分離を良好に維持

表 1 分析条件

UHPLC (Nexera [™] X2 system)	
Column	ACE Excel C18 Amide
Mobile phase	Aqueous: Formic acid in Water Organic: Acetonitrile/Methanol
LC run time (MS time)	10.95 min (10 min)
Flow rate	0.65 mL/min
Column temperature	45 °C
MS TQ (LCMS-8060NX [™])	
Ionization	Ion Focus ESI (Negative)
Mode	MRM
Nebulizing gas flow	3.0 L/min
Drying gas flow	5.0 L/min
Heating gas flow	15.0 L/min
DL temperature	250 °C
Heat Block temperature	500 °C
Interface temperature	400 °C

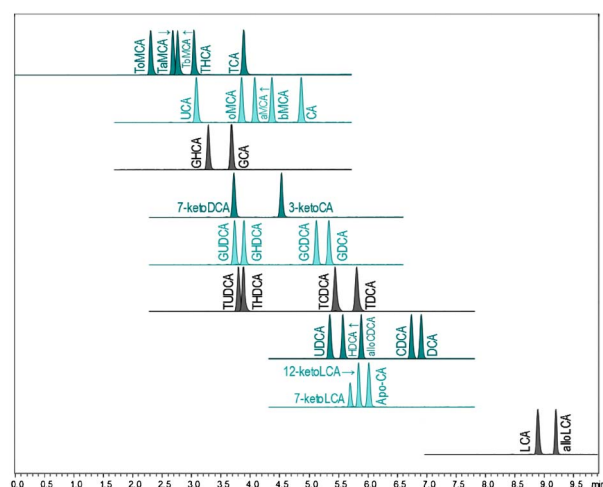


図 2 胆汁酸異性体の MRM クロマトグラムの例
標準溶液 (各 10 ng/mL) の定量イオンのクロマトグラム

しながら高速分析化を行い、質量分析の測定時間は 10 分とした。図 2 に、胆汁酸異性体ごとの多重反応モニタリング (MRM) クロマトグラムの例を示す。

4 結果

4.1 直線性

0.5~50 ng/mL の範囲の六つの検量点を用いて回帰式を求め、本測定メソッドの直線性を確認した。ピーク面積は LabSolutions Insight ソフトウェアを用いて自動計算により決定した。検量線の例を図 3 に示す。すべての検量点において、正確さ (得られた検量線より計算される検量点サンプルの濃度 ÷ 検量点サンプルの実濃度 × 100) は 80~120 % を示した (図 4)。

4.2 生体試料の分析

生体試料に標準物質を添加して分析を行うことで、本分析手法の評価を行った。試料には、血漿 (ヒト)、尿 (ヒト)、糞便 (マウス) を用い、血漿および尿には 10 ng/mL、糞便には 2.3 ng/mg の標準物質を添加した (検出濃度は内因性濃度に添加濃度が加算された値となる)。非添加試料 (ブランク) についても分析した。分析の精度は添加ありの血漿試料の保持時間および面積を用いて確認した。近接するピークとの分離をチェックし

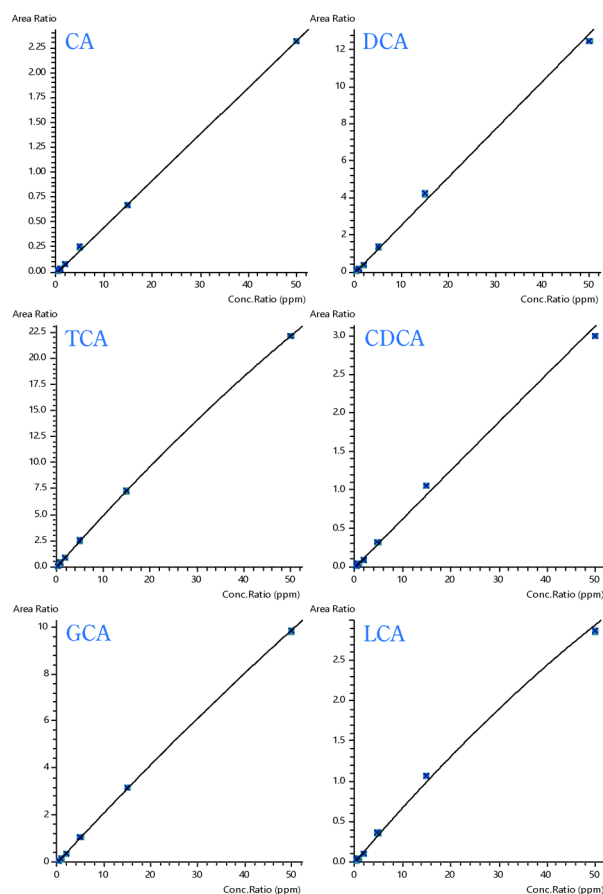


図 3 検量線の例
0.5~50 ng/mL の範囲で六つの検量点を用いた

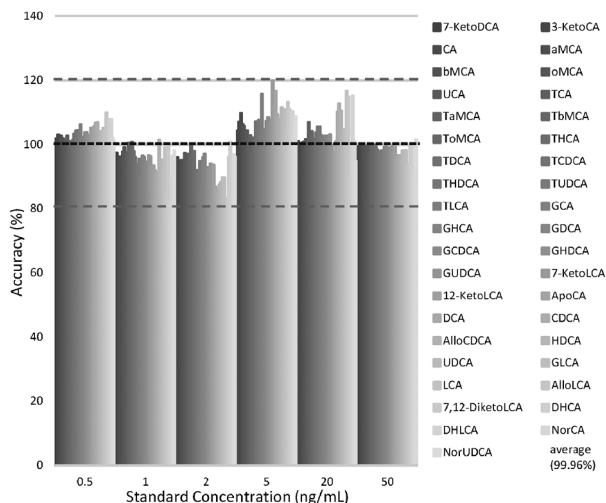


図4 検量点の正確さ

たところ、すべての胆汁酸について1.1以上の分解能を示した（データの記載なし）。最後に、各サンプルの胆汁酸濃度を測定した

4・2・1 再現性

同じ血漿試料（標準物質 10 ng/mL 添加）について、同日内に同一の条件で5回前処理を行い、日内再現性を評価した。さらに、3日間で4回の実験を行い、日間再現性を評価した。各実験において5回の前処理を実施し、その平均値を実験間のRSD計算に用いた。実験の結果、保持時間の日内再現性はRSD<0.5%、日間再現性はRSD<0.3%と良好であった。面積の日内再現性はRSD<12%、日間再現性はRSD<15%となり、いずれも非常に良好な結果を示した（表2）。

4・2・2 定量分析

血漿、尿および糞便中の胆汁酸を定量した。標準添加法（10 ng/mL）を定量分析の参照法として用い、(i) 内部標準法（10 ng/mL 水溶液中での内部標準物質との比を用いた一点検量）と(ii) 直接同位体希釈法（内部標準物質との比率による直接定量）の二つの定量方法を評価した。

10種の内部標準物質（安定同位体標識）を39種の胆汁酸の定量に使用するため、すべての胆汁酸が化学的に同等な同位体標識化合物によって補正されるわけではない。対象化合物と内部標準物質の抽出回収率が異なる場合は補正係数を適用する必要があるため、内部標準物質回収率と標的化合物回収率の比率を補正係数として算出している。補正係数の値はマトリックスに依存し、代表的な補正係数はLC/MS/MSメソッドパッケージ胆汁酸Ver.2の取扱説明書に記載している。これらの係数を以下の計算に用いた。

内部標準法による定量をブランク試料（内因性胆汁酸が検出された場合）と添加試料の両方に適用した。血漿サンプル（添加なし）のクロマトグラムの例を図5に、

表2 日内再現性（n=5）と日間再現性（n=4）の評価
10 ng/mL 添加血漿を用いて、すべての胆汁酸に対し実験ごとにRSDの最小値、最大値、平均値を確認した

	再現性実験1 RSD (n=5)			再現性実験2 RSD (n=5)		
	Min.	Max.	Av.	Min.	Max.	Av.
Ret. Time RSD (n=5, %)	0.02 %	0.30 %	0.06 %	0.05 %	0.43 %	0.16 %
Peak Area RSD (n=5, %)	1.2 %	11.9 %	5.7 %	1.0 %	12.0 %	5.6 %
	再現性実験3 RSD (n=5)			再現性実験4 RSD (n=5)		
	Min.	Max.	Av.	Min.	Max.	Av.
Ret. Time RSD (n=5, %)	0.03 %	0.26 %	0.13 %	0.02 %	0.30 %	0.10 %
Peak Area RSD (n=5, %)	1.6 %	11.7 %	6.5 %	1.5 %	11.7 %	5.8 %
	日間再現性 (n=4)			日内再現性	日間再現性	
	Min.	Max.	Av.			
Ret. Time RSD (n=4, %)	0.03 %	0.28 %	0.09 %	RT RSD <0.5 % Area RSD <12 %	RT RSD <0.3 % Area RSD <15 %	
Peak Area RSD (n=4, %)	1.2 %	14.8 %	5.4 %	※いずれも全胆汁酸に対して		

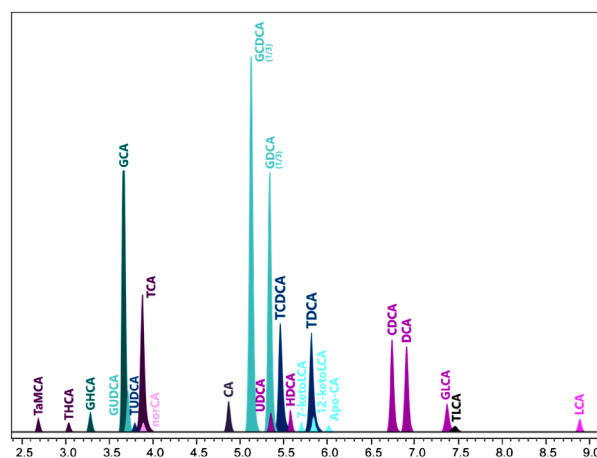


図5 ヒト血漿サンプル（未添加）のクロマトグラム例
定量結果は表3に詳しく記載した

すべてのブランクマトリクス中で計算された各種胆汁酸濃度の比較を図6に示す。さらに、標準添加法を基準とした正確さを表3に詳述する。

すべての胆汁酸化合物について、添加なしおよび添加試料の両方で優れた定量結果が得られた。正確さ（内部標準法による定量結果÷標準添加法による定量結果×100）は、糞便では80~120%（図7）、尿では82~119%（図8）、血漿では82~119%（図9）となり、この定量法が本法に含まれる39種の胆汁酸の定量に適

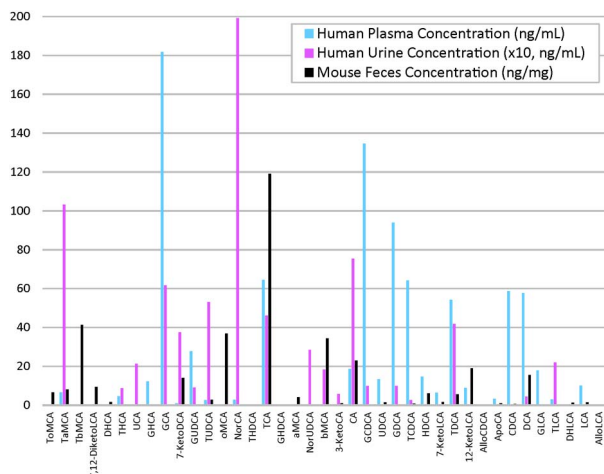


図6 各種胆汁酸の定量結果（血漿，尿，糞便）
未添加サンプルより内部標準法にて算出した

していることが確認できた。

直接同位体希釈法による定量をブランク試料（内因性胆汁酸が検出された場合）と添加試料の両方に適用した。このアプローチの主な利点は、較正が不要なことである。濃度は、試料に添加された内部標準と標的化合物との間の面積比により計算される。内部標準物質が化学的に同一な同位体標識化合物ではない場合、同じ濃度でのMSでの応答に差が生じるため、その補正を行った（補正係数に関する情報は島津製作所より提供可能である）。

すべての胆汁酸について、添加なしと添加試料の両方で優れた定量性が得られた。正確さ（直接同位体法による定量結果÷標準添加法による定量結果×100）は、糞便では90～113%（図10）、尿では84～118%（図11）、血漿では81～120%（図12）となり、この定量法も本法に含まれる39種の胆汁酸の定量に適していることが確認できた。

内部標準法と直接同位体希釈法の二つの定量手法は、標準添加法との相関も非常に良好であり（図13）、どちらも本法に含まれる39種の胆汁酸の定量に適していることが示された。

前述したように、直接同位体希釈には較正を必要としないという主な利点があるが、この手法を用いる場合には、優れた定量の正確さを保証するために、内部標準と標的化合物の応答性が同程度であることが重要となる。しかし、許容範囲はかなり広く、例えばこの実験では、内部標準物質のMS応答性は標的化合物の応答性の1/3から80倍の間に広がっているが、それでも優れた正確さを示した。

結論として、適切に設計された内部標準物質の混合物を用いれば、直接同位体希釈法は生体試料を用いた胆汁酸のLC/MS/MSによる定量におけるゴールドスタンダード法になると考えられる。

表3 各種胆汁酸の定量結果と正確さ
未添加サンプル（血漿，尿，糞便）を内部標準法で定量し、標準添加法の定量結果を元に正確さを算出した

Compound Abbreviation	Plasma Unspiked		Urine Unspiked		Feces Unspiked	
	Conc. (ng/mL)	Accuracy (%)	Conc. (ng/mL)	Accuracy (%)	Conc. (ng/mg)	Accuracy (%)
ToMCA	ND	N/A	ND	N/A	6.5	84 %
TaMCA	6.6	84 %	10.3	84 %	8.1	80 %
TbMCA	ND	N/A	ND	N/A	41.4	N/A*
7,12-DiketoLCA	ND	N/A	ND	N/A	9.4	95 %
DHCA	ND	N/A	ND	N/A	1.7	88 %
THCA	4.6	89 %	0.9	98 %	ND	N/A
UCA	ND	N/A	2.1	101 %	ND	N/A
GHCA	12.2	97 %	ND	N/A	ND	N/A
GCA	181.8	N/A*	6.2	105 %	0.2	99 %
7-KetoDCA	1.0	104 %	3.7	93 %	14.0	81 %
GUDCA	27.8	116 %	0.9	101 %	0.0	100 %
TUDCA	2.6	106 %	5.3	97 %	2.8	100 %
oMCA	ND	N/A	ND	N/A	36.9	N/A*
NorCA	2.7	99 %	19.9	101 %	0.1	98 %
THDCA	ND	N/A	ND	N/A	0.3	101 %
TCA	64.5	82 %	4.6	87 %	119.0	N/A*
GHDCA	ND	N/A	ND	N/A	ND	N/A
aMCA	ND	N/A	ND	N/A	4.0	83 %
NorUDCA	ND	N/A	2.9	97 %	ND	N/A
bMCA	ND	N/A	1.8	82 %	34.4	N/A*
3-KetoCA	0.2	104 %	0.6	105 %	0.9	96 %
CA	18.7	101 %	7.5	110 %	23.0	N/A*
GCDCA	673.5	N/A*	1.0	102 %	ND	N/A
UDCA	13.4	104 %	ND	N/A	1.4	100 %
GDCA	470.2	N/A*	1.0	118 %	0.1	116 %
TCDCA	64.2	99 %	0.3	115 %	0.8	98 %
HDCA	14.7	102 %	ND	N/A	6.1	108 %
7-KetoLCA	6.4	111 %	ND	N/A	1.6	98 %
TDCA	54.2	97 %	4.2	100 %	5.6	95 %
12-KetoLCA	8.9	107 %	ND	N/A	19.0	103 %
AlloCDCA	ND	N/A	ND	N/A	ND	N/A
ApoCA	3.2	106 %	ND	N/A	0.9	95 %
CDCA	58.6	108 %	ND	N/A	0.7	118 %
DCA	57.6	116 %	0.4	117 %	15.5	120 %
GLCA	17.9	119 %	ND	N/A	ND	N/A
TLCA	3.0	114 %	2.2	119 %	0.3	120 %
DHLCA	ND	N/A	ND	N/A	1.2	97 %
LCA	10.0	116 %	ND	N/A	1.4	104 %
AlloLCA	ND	N/A	ND	N/A	ND	N/A

* 内因性の濃度に対して添加濃度が低すぎる（1/10以下）ため、標準添加法による定量結果の信頼性が乏しく、正確さの計算を実施できませんでした。

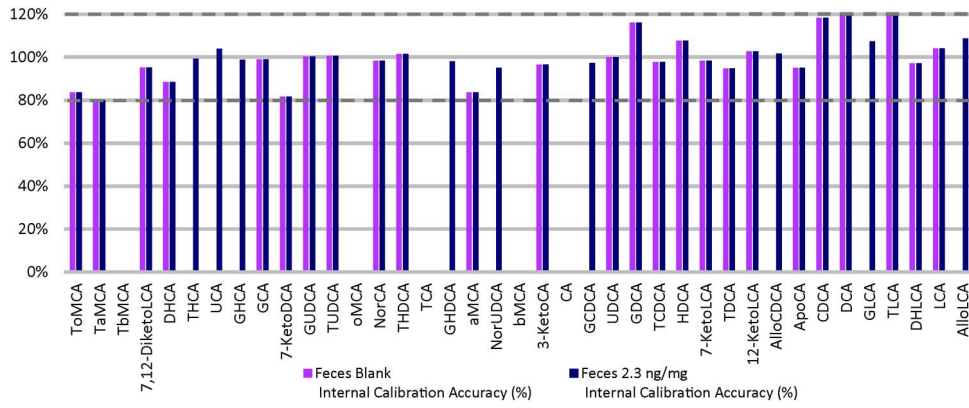


図7 糞便の内部標準法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出した

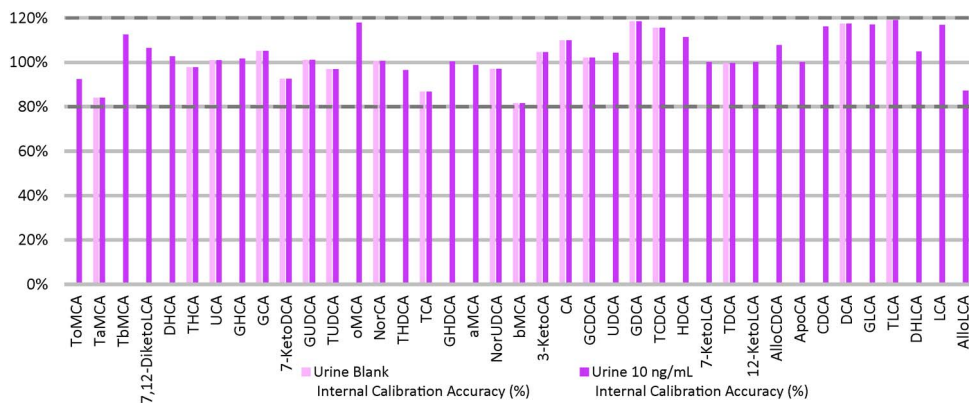


図8 尿の内部標準法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出した

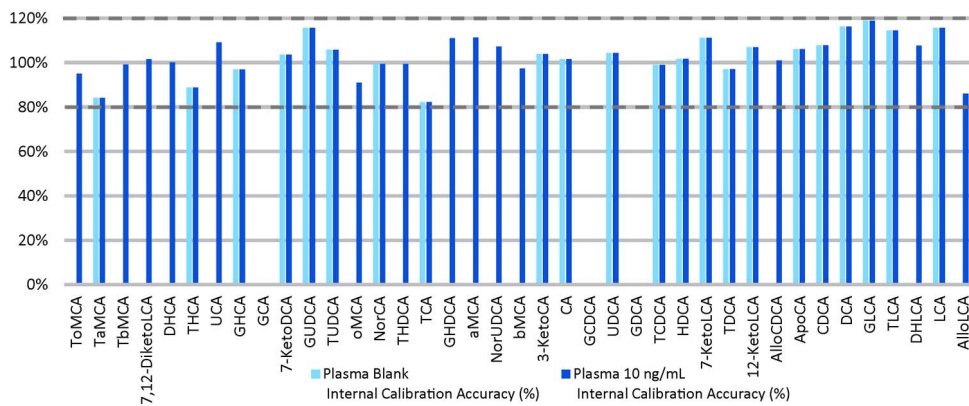


図9 血漿の内部標準法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出した

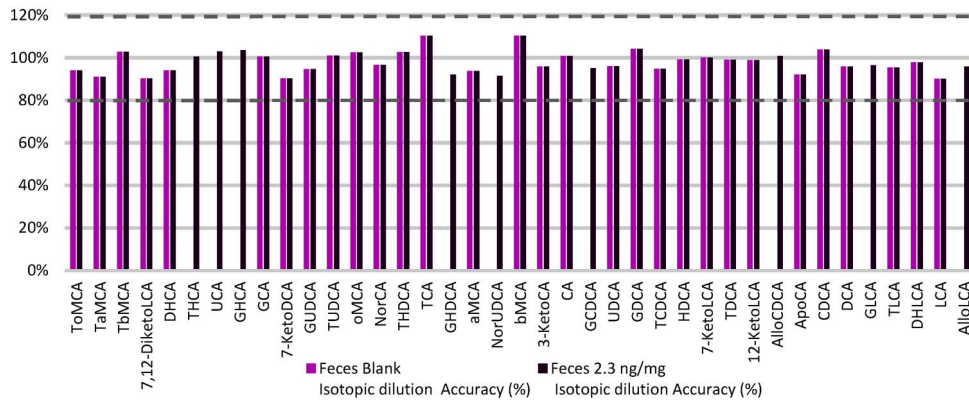


図 10 糞便の直接同位体希釈法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出した

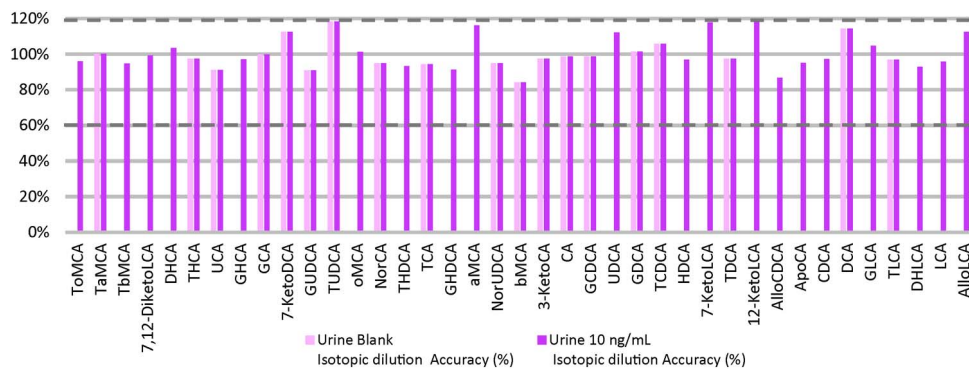


図 11 尿の直接同位体希釈法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出した

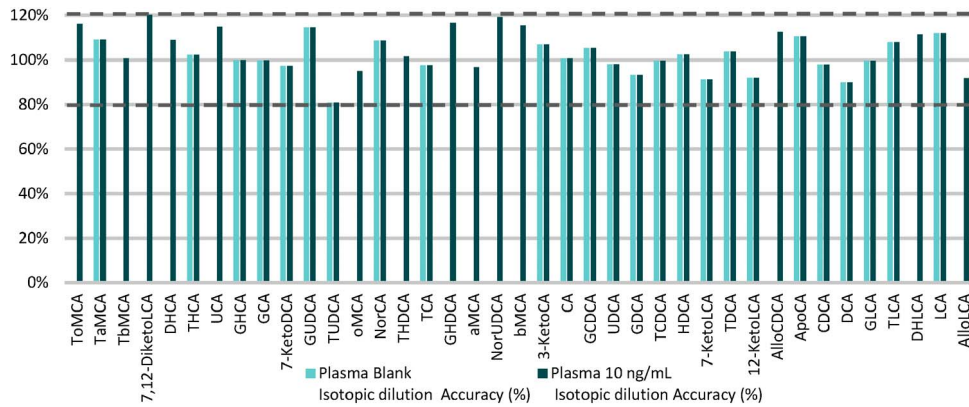


図 12 血漿の直接同位体希釈法による定量結果の正確さ
標準添加法による定量結果を基準に算出した

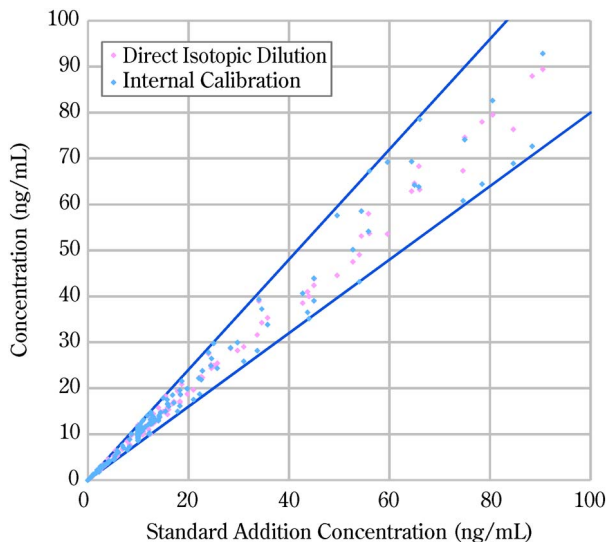


図 13 内部標準法および直接同位体希釈法の標準添加法との相関図

X 軸：標準添加法による算出濃度

Y 軸：内部キャリブレーション法および直接同位体希釈法による算出濃度

5 まとめ

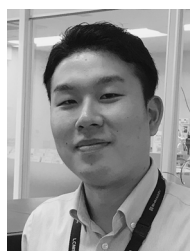
本稿では、LC/MS/MS メソッドパッケージ胆汁酸 Ver.2 が血漿、尿及び糞便のような生体試料中の一次、二次および抱合体を含む 39 種の胆汁酸の分析に適していることが示された。本メソッドパッケージを使用することで、自動抽出装置により、一度に 96 サンプルを処理することができ、10 分という短い分析時間で異性を分離して検出することができた。このように、高速 LC/MS/MS 法と自動試料抽出の組み合わせにより、高いスループットと低コストで頑健な胆汁酸のルーチン分析が可能であるため、是非ご活用いただきたい。



ジャフェル オロール

(Aurore JAFFUEL)

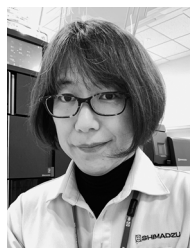
株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1)。PhD in Chemistry, Analytical Sciences - University of Lyon (France, 69)。PhD in Chemistry, University of Lyon (France)。《現在の研究テーマ》マイクロフロー LC/MS/MS によるステロイドの高感度分析。《趣味》山登り、ハイキング、マウンテンバイク
E-mail : jaffuel.aurore.4yf@shimadzu.co.jp



國澤研大 (Akihiro KUNISAWA)

株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1)。京都大学大学院工学研究科修士課程修了。修士 (工学)。《現在の研究テーマ》質量分析計を用いた腸内細菌が産生する代謝物の網羅的分析。《趣味》旅行、音楽鑑賞。

E-mail : aki-kuni@shimadzu.co.jp



堀江征司 (Seiji HORIE)

株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1)。大阪市立大学理学研究科前期博士課程修了。修士 (理学)。《現在の研究テーマ》LC/MS/MS による各種測定法の開発。《趣味》サイクリング、アニメ。

E-mail : horie.seiji.8mz@ext.shimadzu.co.jp



渡邊 淳 (Jun WATANABE)

株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1)。京都大学大学院農学研究科修士課程修了。修士 (農学)。《現在の研究テーマ》LC/MS, LC/MS/MS を用いたアプリケーション開発など。《趣味》テニス、旅行。

E-mail : jun_wtnb@shimadzu.co.jp

株式会社島津製作所 分析計測機器ホームページ :

<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

関連製品ページURL :

https://www.an.shimadzu.co.jp/lcms/m_package/bile_acids.htm