

## ● LC-MS 分析での感度変化を内部標準物質で補正する

高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) は、感度や選択性の高さから、生体試料の分析に不可欠である。LC-MS をはじめ、定量分析では試料の前処理や LC、MS で生じる誤差の補正のために内部標準物質 (IS) が用いられる。IS には分析対象との性質の類似性から、構造類似体や安定同位体 (SI) で標識した化合物が使われている。

MS のイオン化効率と同じ日内でも時間とともに変化し、感度の違いが生じるため、IS には MS の感度補正の役割も求められる。Jiang らは、MS の感度変化の IS での正確な補正法について報告している<sup>1)</sup>。MS の感度変化には、(1) 化合物の構造、(2) 化合物の濃度 (ピーク強度) が大きく影響する。また、機器や時間により感度の変化は異なり、予測することは難しい。実際に構造類似体の感度変化は、多くの場合、分析対象と異なり、感度補正には有効でなかった。また、SI-IS での補正でも濃度によって感度変化が変わるため、分析対象の濃度が離れると正確に感度を補正できないことがわかった。つまり、従来の IS のように濃度の影響をほとんど考慮せず、すべての試料に同じ濃度で加える場合には、定量する濃度範囲が広いと正確な補正ができないことが示された。

そこで、新たな感度の補正法として疑似的内部標準法を検証した。これは、分析対象のピークの直後に分析対象の標準品を疑似的な IS としてピークが出るようにポストカラム法で自動インジェクションし、感度の補正を行う方法である。分析対象のピーク強度を元にインジェクション量を調整することで、IS の濃度が常に分析対象と近くなり、MS の感度補正に安定して有効であることが示された。また、本法は SI ではなく、通常の標準物質を IS として利用できることも大きなメリットである。しかし、疑似的内部標準法では、夾雑物<sup>きょうざつ</sup>によるイオン化効率の変化や前処理での誤差の補正などはできず、すべてを補正できる万能な方法ではないと筆者らも述べている。

IS は広く利用されているが、MS の感度補正を見ても分かるように、正確な補正のためには、どの物質を使うかだけでなく、濃度などを含めてどのように使うかが重要である。現状、すべてを正確に補正できる方法はないため、定量に影響する要因を理解し、IS での補正の

妥当性を十分に検証してから利用することが肝要である。

1) F. Jiang, Q. Liu, Q. Li, S. Zhang, X. Qu, J. Zhu, G. Zhong, M. Huang: *Anal. Chem.*, **92**, 7690 (2020).

〔岐阜薬科大学 高須蒼生〕

## ● 半導体ポリマードットを利用したエクソソーム一粒子解析

近年、がん診断や再生医療の分野でエクソソームとよばれる直径 100 nm 程度の細胞外小胞が、RNA やタンパク質のキャリアとして注目を浴びつつある。エクソソームから標的細胞への内包物輸送には幾つかの膜タンパク質が重要であるが、その微小さゆえに一粒子ごとの発現プロファイルを精密に解析することは困難である。この課題に対して、光スイッチング型半導体ポリマードット (Pdots) を開発し、Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) によるエクソソーム一粒子の膜タンパク質マッピングへと適用する研究が Jiang らによって行われたので紹介する<sup>1)</sup>。

光スイッチ可能な蛍光色素を逐次活性化し、時間分解された位置情報から高解像度な画像を構築する STORM 顕微鏡は、最も広く用いられている超解像顕微技術の一つであるが、光退色や光スイッチング能の問題から適用可能な色素の種類は限定的である<sup>2)</sup>。Jiang らが開発した Pdots は、共役ポリマーに金属ポルフィリン誘導体 (MP) と、6,6-フェニル C61 醜酸メチル (PCBM) をドーブした直径 10 nm 程度のナノ粒子である。488 nm のレーザーにより共役ポリマー相が励起されると、電子は MP と PCBM の準位へと流れ込むことで Pdots は消光する。一方、405 nm のレーザーにより MP が励起されると、共役ポリマー相に電子が流れ込み Pdots の発光が活性化される。つまり、二つのレーザーを交互に照射することで Pdots の明滅周期を自在に調節可能であり、この仕組みを STORM 観察に適用した。

脂質膜結合色素 PKH26 により染色した精液由来エクソソームに、Alexa Fluor 647 で標識した抗 CD9 抗体と、異なる Pdot で標識した抗 CD63 抗体、抗 CD81 抗体を結合させた。最適化されたレーザー強度や明滅周期の下、わずか 5 分で数百のエクソソーム粒子の超解像画像を取得することに成功し、膜タンパク質の発現パターンが異なる様々なサブクラスの存在を確認することができた。定量的な解析の結果、一般にエクソソームの共通マーカーとされる CD9、CD63、CD81 について、少なくとも一つ以上発現しているのは全体の半数にも及ばず、エクソソーム表面の多様な性質を示唆する結果となった。今回 Jiang らが開発した Pdots による超解像観察は、エクソソームに限らず様々な微小粒子へと適用可能であり、多様な生体微小粒子の生物学的役割の解明や医薬応用が期待される。

1) Y. Jiang, L. A. Andronico, S.-R. Jung, H. Chen, B. Fujimoto, L. Vojtech, D. T. Chiu : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **60**, 13470 (2021).

2) G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bate, X. Zhuang : *Nat. Methods*, **8**, 1027 (2011).

[東北大学理学研究科 桑原和貴]

~~~~~

原 稿 募 集

トピックス欄の原稿を募集しています

内容：読者の関心をひくような新しい分析化学・分析技術の研究を短くまとめたもの。

執筆上の注意：1) 1000字以内（図は1枚500字に換算）とする。2) 新分析法の説明には簡単な原理図などを積極的に採り入れる。3) 中心となる文献は原則として2年以内のものとし、出所を明記する。

なお、執筆者自身の文献を主として紹介する

ことは御遠慮ください。又、二重投稿は避けてください。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2  
五反田サンハイツ 304号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会  
[E-mail: bunseki@jsac.or.jp]