

質量分析用機能性誘導体化試薬を活用した 生理活性物質分析への応用

高感度化を指向した質量分析法はこれまでも多く開発されてきたが、高感度化だけではない機能的な誘導体化試薬を活用した生理活性物質測定について解説する。また、これまではあまり適用例のない MALDI-MS/MS 用の誘導体化を活用した生体成分分析の例についても紹介する。

小川 祥二郎

1 はじめに

医薬品を含む、生体内微量生理活性物質のレベル変動を的確に把握することは、これらが関与する疾患の診断や治療効果の追跡、生理学的意義の解明の一助となりうる。現在、特異性の高さの観点から、高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化/タンデムマスマスペクトロメトリー (LC/ESI-MS/MS) に代表される、質量分析を基盤とした分析法が、第一選択として用いられる。しかしながら、ESI などのイオン化法は特にイオン性の官能基などを持たない中性の有機分子を測定対象物質としている場合、そのイオン化効率が十分ではない場合には、期待した感度が得られず、本手法をもって測定が困難な場合も少なくない。一方で、このような質量分析法における感度不足を補う目的で、測定法の原理に基づき、測定対象物質に化学的な変換を施し、感度向上を達成する手法が誘導体化法である。質量分析用の誘導体化法はこれまでも様々な誘導体化試薬が開発されてきており、これに伴い、種々の化合物の質量分析法での感度不足が改善された。近年、感度不足の改善に加えて、質量分析法の欠点の克服のために、種々の機能を付加させた多機能な誘導体化試薬がデザイン・合成されて

きており、実際に生体試料分析に適用されてきている。ここでは、最近の誘導体化試薬の特徴と実際の応用例について解説する。

2 誘導体化-質量分析法

2.1 ESI/MS によるイオン化の原理

ESI による化合物のイオン化は、高電圧に印加させたキャピラリー先端から、大気圧下で HPLC などから送られた試料溶液を静電噴霧し、気相中にイオンを取り出すものである。ここでは正イオン化する例をあげるが、キャピラリーを正電圧に印加した時、キャピラリー先端で過剰に正電荷に帯電した液滴が生じ、液滴溶媒の濃縮に伴い微細な液滴を経て、電荷濃縮によりクーロン反発され対向電極に向けて噴霧される (図 1)。イオン化に際しては、移動相中の添加剤の種類によって、アンモニウム付加イオン $[M+NH_4]^+$ やナトリウム付加イオン $[M+Na]^+$ なども形成されるが、最も一般的に見られるイオン化は、プロトン移動であると言える。ここでは正イオン検出を対象として、プロトン付加によるイオン化について取り上げる。測定対象がプロトン付加されやすいかどうかは、測定化合物自身がプロトンを受け取りやすいか否かに依存すると言っても良い。

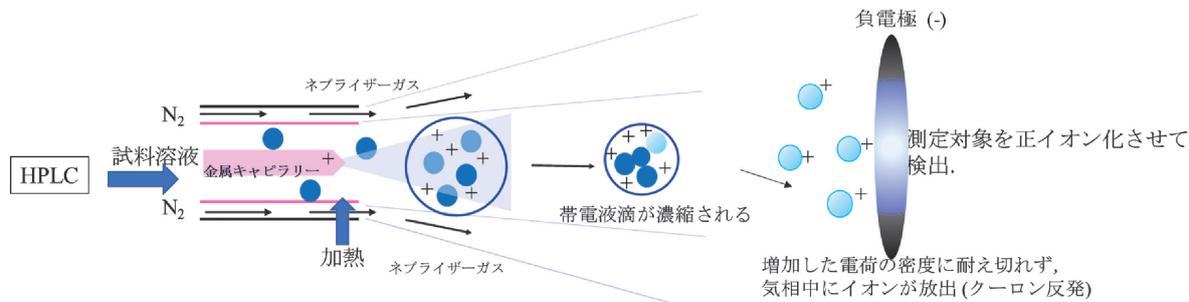


図 1 ESI 法による正イオン検出の模式図

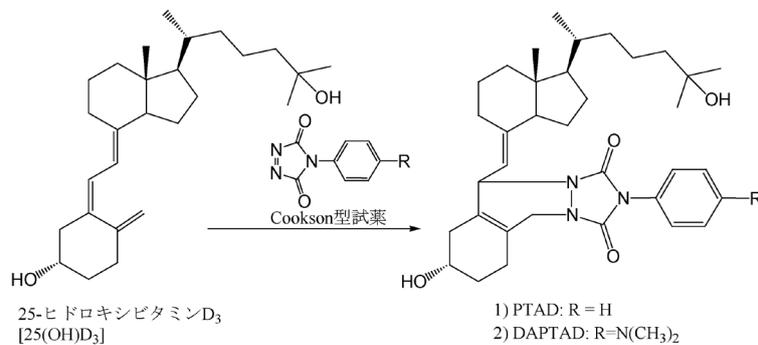


図2 Cookson型試薬による25(OH)D₃の誘導体化

2.2 ESI/MSにおける高感度化誘導体化

(HPLC/)ESI-MSにおける誘導体化試薬については、1) 3級アミンやピリジル基などのプロトン親和性原子団導入によるイオン化効率の向上、あるいは、ピリジニウムやアンモニウム基の導入による正に荷電した誘導体に変換することで、測定対象のESIに対する応答性を大幅に改善することがあげられる。次いで、2) 誘導体化により特異性を向上させる、すなわち、プリカーサーイオンに対して、MS/MS（プロダクトイオン分析）で特異的なフラグメンテーションを誘起し、特徴的なプロダクトイオンを生成させ、選択性を向上させることを目的とする。

このような感度や特異性の向上を目的とした誘導体化試薬は、いまなお新規の試薬の開発がなされ、高感度化試薬の生体試料分析における適用例はいくつも報告されている。例えば、テストステロンはアンドロゲン類の産生低下に伴う鬱や心血管疾患男性更年期障害などの指標とされている。これらはGirard試薬で誘導体化することにより、正イオン検出でS/N=5を与える注入量を検出限界としたとき、それぞれ1 fmolとなり、測定に使用する血液が40 μLと少量でも定量するのに十分な感度が得られることが分かった。

また、生体内ビタミンDの分析では、本法で測定するには実用的な感度が得られないなどの問題があったが、PTADやDAPTADと言ったCookson型試薬を用いた誘導体化により、イオン化効率が十数倍増加したなどの報告がなされている¹⁾²⁾(図2)。

3 機能性誘導体化試薬のLC/ESI-MS/MS測定法への応用

HPLC/ESI-MS/(MS)を用いた生体内微量成分の分析を行う場合、2.2で述べた、高感度化を目的とした誘導体化を施すことで、測定対象のイオン化応答性を化学的に変化させることで、感度面での改善が達成される。しかし、それだけでは十分でなく、高感度化に加えて別の機能も併せもち、HPLC/MS/(MS)装置や分離器材の欠点を補完する機能をカスタマイズさせた種々のタイプ

の機能性誘導体化試薬が開発されてきている。

3.1 Cookson型試薬を活用した尿中グルクロン酸抱合型ビタミンD₃代謝物の抱合位置の特定

ビタミンD₃の欠乏は骨粗鬆症などの骨疾患のみならず、うつ病やある種の癌、心血管疾患に深くかかわっており、また、新生児期のビタミンD₃不足は将来の統合失調症などの危険因子となることも知られている。ビタミンD₃の供給状態の評価は、血中の25-ヒドロキシビタミンD₃ [25(OH)D₃]の濃度によってなされている。血中カルシウム濃度が十分な場合、生体中では25(OH)D₃は24R,25-ジヒドロキシビタミンD₃ [24,25(OH)₂D₃]などの不活性な代謝物に変換され、さらに水酸基が一つグルクロン酸(Glu)抱合化されたGlu抱合体となって尿中に排泄される。これまでは水解し、脱抱合化して測定されていたが、最近、Glu抱合位置の特定にも関心がもたれている。水解せずに尿中ビタミンD₃代謝物を分析した結果では、25(OH)D₃は3位がGlu抱合され、24,25(OH)₂D₃は24位がGlu抱合されていることが報告されている³⁾。一方で、尿中には23S,25-ジヒドロキシビタミンD₃ [23,25(OH)₂D₃]のモノGlu抱合の存在が知られているものの、その抱合位置の特定には至っていなかった。そこで、Cookson型試薬による誘導体化を活用してHPLC/ESI-MS/MSによる特異的なフラグメンテーションを活用してその抱合位置の特定をした。測定にはTakadaらは新規のCookson型試薬として、ピペリジノフェニル基を有するPIPTADを合成して尿中ビタミンD₃代謝物分析に応用した⁴⁾。23,25(OH)₂D₃のモノGlu抱合体の位置異性体の合成標品は存在しないため、すべての異性体の合成標品が存在する24,25(OH)₂D₃のモノGlu抱合[24,25(OH)₂D₃-3Glu, 24,25(OH)₂D₃-24Glu及び24,25(OH)₂D₃-25Glu]をPIPTADと反応させ、MS及びMS/MS挙動を精査した。HPLC/ESI-MS/MSには、Waters社のQuattro PremierXEにLC-e2695を接続して用いた。いずれのGの位置異性体でもm/z 851のプロトン付加分子を基準ピークとして与え、これをプリカーサーイオンとしたMS/MSでは、m/z 381が高強度に得

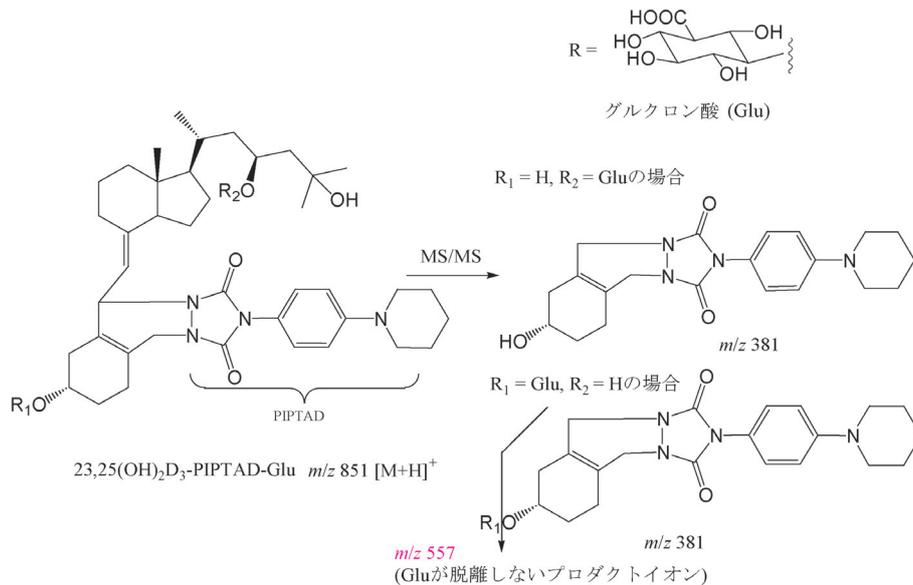


図3 Glu 抱合位置の違いによる PIPTAD 誘導体によるプロダクトイオンの構造

られた。しかしここで、Glu 位置が3位の時には一部の Glu 抱合が MS/MS では開裂せずに残ることから、抱合位置が3位の場合、特異的に m/z 557 も観測された。Cookson 型試薬による誘導体化ではビタミン D₃ 代謝物の C6-7 結合が開裂した特徴的なプロダクトイオンが得られる。加えて、25位は3級水酸基であるため反応性が乏しいことから、生体内で Glu 抱合は進行しないものと考えられる。さらに、ビタミン D₃ 代謝物の側鎖水酸基が24位でも、23位でも誘導体の MS/MS 挙動は大きく変わらないものと推察されるため、図3に示す MS/MS 挙動をとる。これを踏まえて、 m/z 851 から得られる二つのプロダクトイオンをそれぞれ用いた、選択反応モニタリング (SRM) で、尿中 23,25(OH)₂D₃ のモノ Glu 抱合体分析を行った。その結果、尿中 23,25(OH)₂D₃ のモノ Glu 抱合体の PIPTAD 誘導体のピークは、SRM トランジションが m/z 851 → 381 のみで観測され、 m/z 851 → 557 ではピークが現れなかった。以上のことから、Glu の抱合位置がビタミン D₃ 側鎖の23位であると特定できた。通常、Cookson 型試薬による誘導体化を用いない場合には、MS/MS (プロダクトイオン分析) においても、抱合位置の違いによる位置異性体のプロダクトイオンには違いが生じにくいため、抱合位置の特定につながる情報は得難かったが、PIPTAD 誘導体化の導入により、位置異性体の弁別が可能となった。

3.2 重水素標識誘導体化試薬を活用した多検体一括定量法への応用

HPLC/ESI-MS/(MS) による定量では、高い特異性を有する反面で、基本的には前処理を行った生体試料について、1検体ずつクロマトグラフィーによる分離を伴う測定がなされるため、分析の検体処理能力、すなわち、

分析スループットは免疫アッセイなどと比べて劣る。そこで、質量分析法の特性として、質量が異なれば弁別して検出できることと考えられ、一例として、タンデムマスタグ (TMT) 試薬と呼ばれる安定同位体標識試薬を用いた解析法が知られている。これは、安定同位体標識位置の異なるアイソトポマーの試薬を複数用いて、それぞれ別の試料を標識化し、TMT 試薬ごとのプロダクトイオンの値に差が生じることを利用して、各試料中の特定のペプチドの発現量を相対比較するものである⁵⁾。このような安定同位体標識化の考えを応用し、Fujimura らは重水素標識数の異なる誘導体化試薬を活用することで複数検体を一括して、1回の HPLC/ESI-MS/MS 運転で多検体の測定データを得られるものと考えた。血中アンドロゲン分析の分析スループット向上を目的に、測定対象をテストステロン (TS) とデヒドロエピアンドロステロン (DHEAS) とした。これらアンドロゲン類は両方の血中レベルを評価することでアンドロゲン産生低下に伴う鬱病や心血管疾患、男性の加齢に伴う疾患をより詳細に評価できるものとされている。アンドロゲンはカルボニル基を有するため、2種の Girard 試薬のアナログ (Girard T と Girard P) 及びそれらのアイソトポログを用いた (図4)。HPLC/ESI-MS/MS には、Waters 社の Quattro PremierXE に LC-e2695 を接続して用いた。

ここで、誘導体化試薬のアイソトポログ間での誘導体の保持時間は殆ど変わらないことが知られているが、構造が異なる誘導体化試薬のアナログも用いるため、得られる誘導体の HPLC の保持時間が大きく異なることが懸念された。しかし、TS と DHEAS とともに誘導体の HPLC 保持時間は Girard T と Girard P の誘導体化試薬アナログ間でほとんど変わらず、6分の装置運転時間で

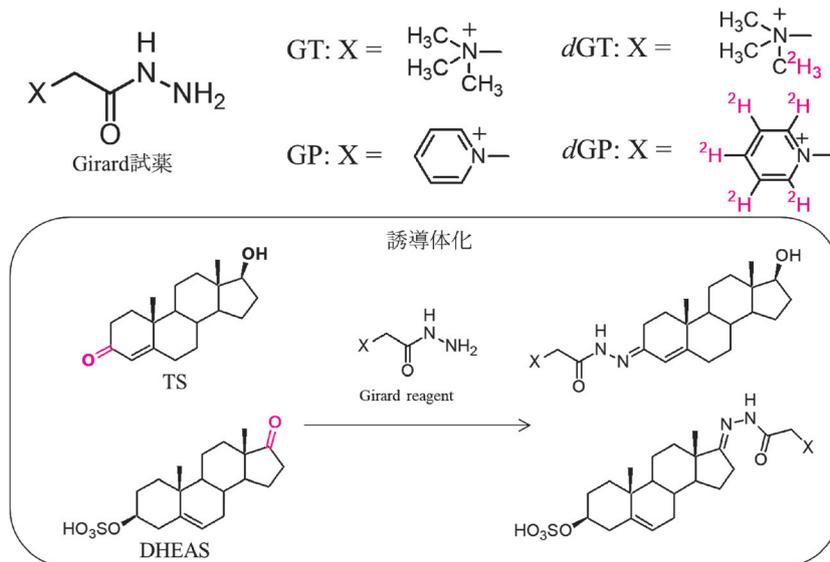


図4 4種 Girard 試薬の構造とアンドロゲンとの誘導體化反応

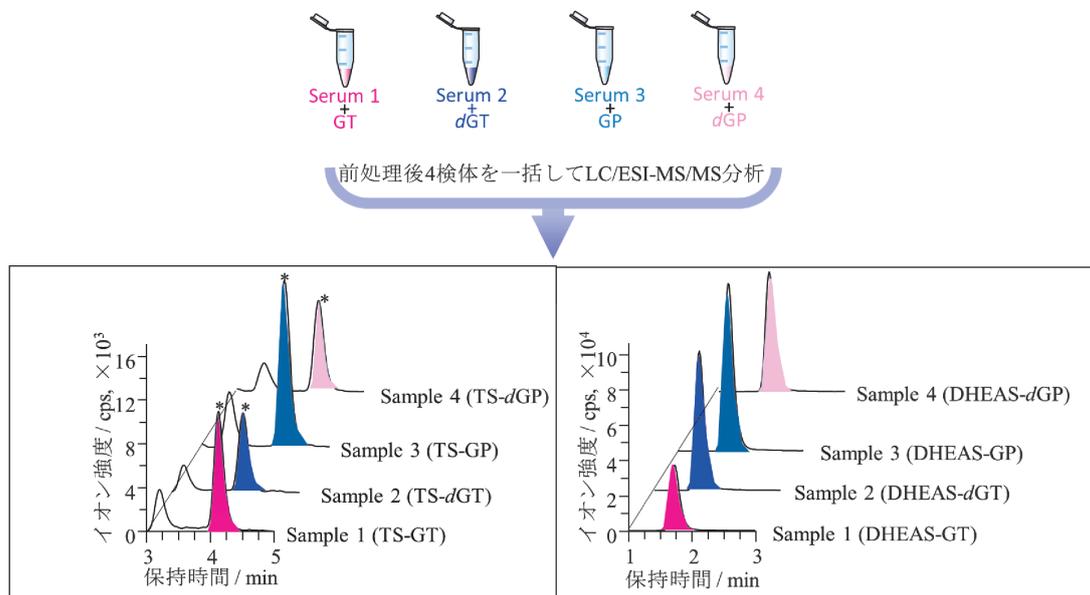


図5 4種 Girard 誘導體化試薬による4検体一括定量法の概略

測定が完了することも示された (図5)。36検体の健常人血清試料に対して、一方は血液試料を固相抽出して誘導體化せず1検体ずつ HPLC/ESI-MS/MS で測定する方法 (従来法とする) とし、もう一方は36検体を固相抽出で前処理し、無作為に四つずつ9組に分けて4種の Girard 試薬で別々に誘導體化した後、試料を一括して測定を行った。固相抽出以降にかかる時間を比較したところ、従来法では1測定あたり7分の HPLC/ESI-MS/MS 運転時間で36検体分の合計250分であったのに対して、開発された4種の Girard 試薬を用いる手法では誘導體化の試料調製に40分を要するものの、1測定あたり6分の装置運転時間で9回測定するため、およそ100分で36検体分の測定データが得られた。すなわち、誘導體化試薬を活用した4検体一括定量法により、期待通り分析スループットが40%に短縮された⁶⁾、

Girard 試薬のアナログはこれまでにいくつか報告がされており、試薬アナログとそのアイトポログ試薬を増やすことで、さらなる分析スループットの短縮も見込める。

4 マトリックス支援レーザー脱離イオン化法における誘導體化の導入への試み

これまでは、ESIをイオン化法とした質量分析法への誘導體化試薬を活用した分析法について述べたてきたが、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI/MS) について述べる。本手法は、ステンレスプレート上に N₂ レーザーを吸収するシナピン酸などの MALDI マトリックスと試料の混晶を作成し、330 nm 程度のレーザーを混晶に照射して試料中の測定対象及び MALDI マトリックスの脱離、イオン化が起こるもので

ある。ペプチド、脂肪酸などの組織内の分布を解析できるソフトなイオン化法として知られる。イオン化効率の低いステロイドなどの低分子化合物では MALDI マトリックスに由来するピークによって妨害を受けるため、そのままでは十分な感度が得られず、測定が困難な状況であり、最近、MALDI/MS/(MS) についても、誘導体化の導入も検討されつつある。

4.1 Girard 誘導体を活用した MALDI-ToF-MS/MS による血清中コルチゾールの定量法開発

コルチゾール (CRT) は、多くの生理学的プロセスにおいて重要な役割を果たしているため、血清中の CRT 濃度の測定は臨床的に非常に重要である。MALDI-MS/MS は、高い特異性、操作性、迅速な分析といった特性を有するため、MALDI-MS/MS を基盤とした血清中の CRT の定量に精度と分析スループットに優れた手法となる可能性がある。そこで、Nakamura らは MALDI-MS/MS を用いて血清中の CRT を定量する方法の開発を試みた。MALDI-MS/MS には、Waters 社の MALDI Synapt™ G1 を用いた。ここで誘導体化なしに 5 ng の CRT を MALDI 測定用のプレートにスポットして測定したところ、CRT に由来するイオンのピークは得られなかった。そこで、MALDI への応答性を高めるため、Girard 試薬であるヒドラジノカルボニルメチル-イソキノリニウムクロリド (GIQ) を用いた誘導体化を採用したところ、CRT250 pg に相当する誘導体の S/N は 350 程度となり、GIQ 誘導体化により 200 倍の感度向上を達し、感度不足が補えた (図 6)。加えて、MALDI/MS においても、測定ごとの装置のイオン化効率の変動を補正し、精密な定量を可能にするために、重水素標識化された COR (d_4 -COR) を用いた安定同位体標識内標準法を採用した。COR-GIQ は MS において m/z 546 の $[M]^+$ に由来するピークを基準ピークとして与え、 d_4 -COR-GIQ は m/z 550 を与えた。そこで四重極コリジョンセル内での衝突活性化 (CID) による MS/MS 測定 (プロダクトイオン分析) を行うために m/z 548 を中心に、イオンセクターの m/z 範囲を 7 にすることで四重極を m/z 546 と m/z 550 が同時に通過し、続く CID により、COR と d_4 -COR はそれぞれ m/z 417 と 421 の

ステロイドに由来するプロダクトイオンが得られた。これらのイオンに基づく MS/MS によって、ノイズが少ない COR の分析が可能となった。この方法により、20 μ L の血清サンプルを用いて血清中 CRT を再現性高く定量測定可能となった (定量範囲: 25~500 ng/mL)。開発された MALDI-MS/MS 法によって測定された血清中 CRT 濃度は、健常人血清で 73.9~91.5 ng/mL、高血圧患者の副腎静脈血で 277~1986 ng/mL であった。この結果は HPLC/ESI-MS/MS 法や電気化学発光免疫測定法によって測定された濃度もよく一致した。以上より、特定のステロイドの定量に、誘導体化-MALDI-MS/MS 法が十分に適用可能であることが示された⁷⁾。

4.2 キラル誘導体化-MALDI/イオンモビリティスペクトロメトリー (IMS)/MS を活用した光学異性体弁別への応用

MALDI/MS は、HPLC の様なクロマトグラフィーによる分離に関する部位を有さないことから、質量による分離が主である。一方で、生体成分の中には光学活性なものも多く存在し、対掌体間で生理活性や体内動態が異なる場合があるものの質量スペクトルに差がない。通常ではキラルカラムや、キラル誘導体化法を用いたクロマトグラフィーによる光学異性体の弁別がなされる。Sugiyama らは、正に荷電したキラルな構造を持つ誘導体化試薬、(S)-1-(4-(ビス(2,4,6-トリメトキシフェニル)メチルイウミル)-3,5-ジメトキシフェニル)ピロリジン-3-アミン [BTMD(S)A] を開発し、IMS による光学異性体弁別を試みた。D-及び L-2-ヒドロキシグルタル酸 (D-,L-2HG) を測定対象とした。D-,L-2HG は腫瘍代謝物とも言われ、DNA メチル化の調節に関与しているとされており、対掌体間でそれぞれ異なる種類のガンや代謝障害に関与している。そのため、2HG についてはその組織分布とともに、D/L の比を測定することは重要である。縮合剤に EDC と HOAt を用いた時、ラセミ体である 2-HG と BTMD(S)A は定量的に反応した。さらに、得られた誘導体は IMS で対掌体のピークの分離度が 1.8 以上で完全分離した (図 7)。また、誘導体化に伴い、キラル反転は認められなかった。誘導体化によるシグナル強度は、ガラスプレート上のスポットで 272

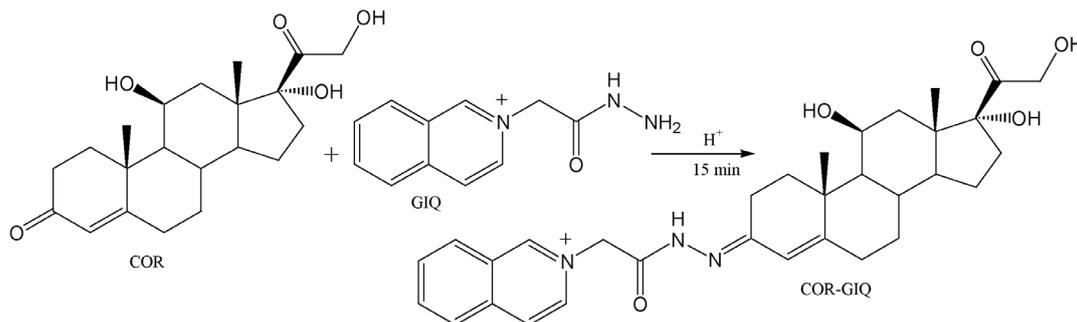


図 6 GIQ による CRT の誘導体化

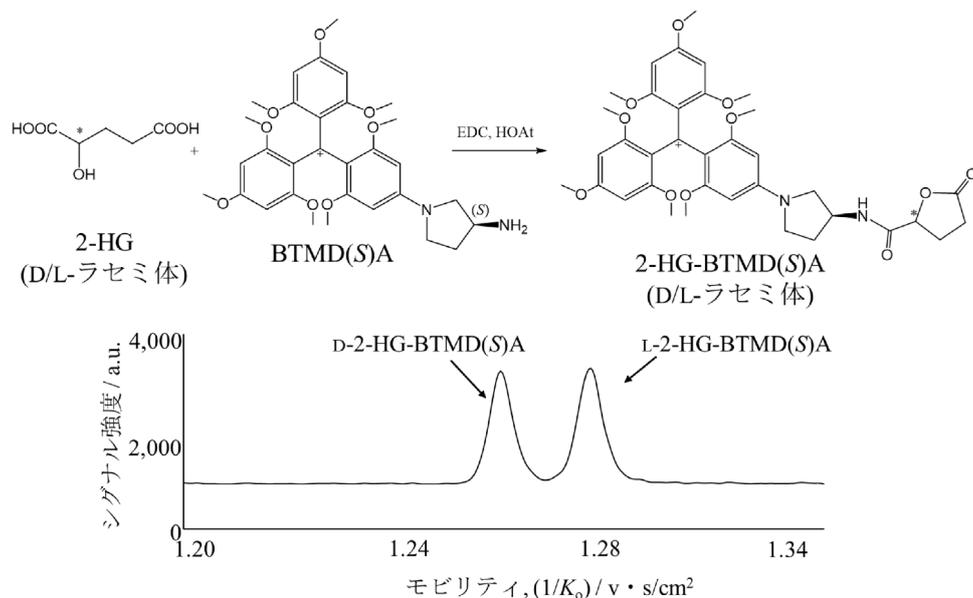


図7 BTMD(S)A誘導体化による誘導体化反応及び誘導体のモビログラム

(a.u.). 組織上で170 (a.u.)と、満足しうる強度が得られた。MALDI/IMS/MSはBruker社のautoflex maXを用いた。BTMD(S)A誘導体化-MALDI/IMS/MSを用いた、マウス精巣における内因性D/L-2HGの検出と可視化を試みたところ、マウス精巣組織では平均してL-2HDがD-2HDよりも2.5倍多く存在していることが分かり、これはGC/MSによる先の報告と一致していた。このように、通常、クロマトグラフィーによる分離が行えないMALDIにおいても、IMSでの分離用に設計されたキラルな誘導体化試薬が、光学活性な小分子のエナンチオ選択的イメージングに有用なツールとなることが示された⁷⁾。

5 おわりに

ESI-MS/MS用の誘導体化試薬は、今現在でも多くの新しい試薬がデザイン・開発されてきている。誘導体化は、測定対象物質の検出感度の改善はもとより、分析装置の欠点を補完する上でも有効な手段であることは間違いない。HPLCはクロマトグラフィーによる化合物の分離という点で非常に有効であるものの、一方で、HPLCの運転時間は要求されてしまう。この、分離に要する時間の長さは、HPLC/ESI-MS/MSを分析の方法論として用いる測定者にとっても解決すべき課題であると思われる。このことを、MS/MSの装置の特性と誘導体化試薬を組み合わせることで解決する、という試みは、上記の課題の一つの解決策として有効であると言える。前処理法としての誘導体化は、試薬の調製や反応に幾ばくかの時間を要することから、その分の分析スループットの低下は免れられないが、それを補ってあまりあるような、機能的で実用的な面が多くあるということが少しでも多くの測定者に伝わることを願っている。また、ESI-MS/MS用

の誘導体化試薬に比べ、まだMALDI-MS/(MS)では誘導体化試薬は不足している現状ではあるが、クロマトグラフィーなしでの異性体弁別など、今後、MALDI用のより実用的な誘導体化試薬の開発がなされ、これからより複雑になっていくバイオメディカル分析の発展にも大きく寄与できるものと確信され、この点においても、今後の発展に非常に興味をもたれる。

文 献

- 1) T. Higashi, S. Ogawa : *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **162**, 57 (2016).
- 2) 東 達也, 小川祥二郎, ぶんせき (*Bunseki*), **2013**, 422.
- 3) Y. Yoshimura, M. Togashi, S. Ogawa, T. Higashi : *Steroids*, **162**, 108695 (2020).
- 4) K. Takada, S. Ogawa, N. Yoshida, T. Higashi : *Anal. Sci.*, **39**, 1053 (2023).
- 5) T. Higashi, S. Ogawa : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **130**, 181 (2016).
- 6) S. Fujimura, T. Ito, S. Ogawa, T. Ishige, S. Nishimoto-Kusunose, T. Higashi : *Anal. Sci.*, **38**, 167 (2022).
- 7) M. Nakamura, M. Moritsuna, K. Yuda, S. Fujimura, Y. Sugiura, S. Shimma, K. Nishimoto, T. Nishikawa, M. Suematsu, S. Ogawa, T. Higashi : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **178**, e112912 (2020).
- 8) E. Sugiyama, Y. Nishiya, K. Yamashita, R. Hirokawa, Y. Iinuma, T. Nirasawa, H. Mizuno, Y. Hamashima, K. Todoroki : *Chem. Comm.*, **59**, 10825 (2023).



小川 祥二郎 (OGAWA Shoujiro)

福山大学薬学部薬学科 (〒729-0292 広島県福山市学園町1番地三蔵). 日本大学大学院総合基礎科学研究科相関理化学専攻博士後期課程. 博士(理学). 《現在の研究テーマ》質量分析計用の多機能誘導体化試薬の合成と生体試料分析への応用. 《趣味》博物館・美術館巡り.
E-mail : sho-ogawa@fukuyama-u.ac.jp