

CE-MS のメタボローム測定への使用事例

平山 明由

1 はじめに

CE（キャピラリー電気泳動）は、内径数十 μm の細管（キャピラリー）の中で電気泳動を行い、各化合物を分離する分析手法の一つである。分析を始めるにあたり、キャピラリーの中に泳動液を充填し、その両端を泳動液が入ったバイアルに浸漬する。サンプル注入時は、その一端をサンプルバイアルに浸漬し、落差法、あるいは加圧法によってサンプルをキャピラリー内に注入する。その後、数十 kV の高電圧を印加し、各化合物の分離を行う。

他の分析手法と比べた際の CE のメリットとしては、1) 一度に消費されるサンプル量が少なく（数～数十 nL）、2) 有機溶媒をほとんど必要としないため、コスト面や安全性の面で有利であり、さらに 3) 比較的短時間で高分離が得られる点が挙げられる。特に、1) のサンプル消費量が少なく済む点に関しては、後述するメタボローム解析においては非常に有利である。

CE における検出法としては、UV/Vis 吸光度検出、レーザー励起蛍光検出、電気伝導度検出などが使用されているが、本稿では検出器として MS（質量分析）を使用した例について紹介する。

2 CE-MS によるメタボローム測定法

大部分の生物の生命活動は、代謝と呼ばれる種々の酵素反応の連鎖によって営まれており、代謝によって産生される代謝中間体や代謝産物の総体はメタボロームと呼ばれている。

メタボロミクス（メタボローム解析）は、このような生体内に含まれる代謝物を網羅的に解析することによって生命現象を包括的に理解しようとするオミックス解析の一分野である。代謝物は生命システムにおける最終産物であるため、その変動は生物の環境応答や適応変化を最も鋭敏に反映していると考えられている。

また、疾病等によって代謝の変化がある場合、血液や尿といった体液に含まれる代謝物の組成や濃度にも変

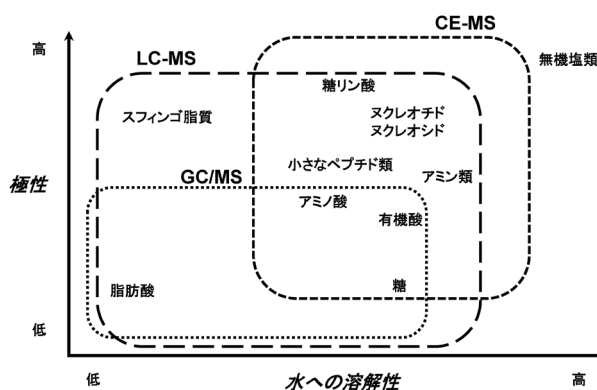


図1 代謝物の物理化学的性質と各分析法の適用範囲

化が生じると考えられるため、各種疾患のバイオマーカーの探索も精力的に進められている。

しかしながら、現在までにすべての代謝物を一度に分析可能なメタボローム測定法は存在しない。その理由は、対象とする代謝物の物理的・化学的性質が多岐に渡るためである。したがって、比較的性質の近い化合物群に対し、GC/MS、LC-MS、CE-MS などのメタボローム測定法を使い分けている（図1）

一方、代謝経路に目を向けてみると、生命活動に必須であるエネルギー代謝、細胞増殖に必要な核酸を合成する核酸代謝や各種のアミノ酸代謝などを担う代謝中間体の多くが、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、リン酸基などを有する低分子のイオン性の物質である。

したがって、メタボロミクスにおいて CE-MS は、サンプル中のイオン性代謝物の網羅分析に使用されている。筆者の所属する研究グループでは、CE-MS をこれまでがんの特異的代謝機構の解明¹⁾²⁾や、バイオマーカー探索³⁾⁴⁾など、医学、薬学を中心とした研究に適用してきた。本稿では、CE-MS の網羅分析への適用事例として、メタボロミクスを中心に紹介する。

2・1 陽イオン性代謝物測定法⁵⁾⁶⁾

陽イオン性の代謝物質の測定は、内径 50 μm 、全長 100 cm のフューズドシリカキャピラリーを用いて行う。検出は MS で行うため、キャピラリーの途中に検出窓は

設けない。泳動液として 1 mol/L のギ酸溶液を用い、キャピラリーの出口側 (MS 側) が陰極となるように 30 kV の電圧を印加する (図 2A)。

キャピラリー内に導入されたサンプル中の各代謝物は、その電荷と水和イオン半径の比に基づいた速度 (電気泳動移動度) によって泳動し、キャピラリー出口に接続したネブライザーという部品でエレクトロスプレーイオン化によって最終的にイオンとなり、MS に導入される。図 3 に CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計) を用いて得られたがん組織の陽イオン性代謝物測定結果の例を示す。

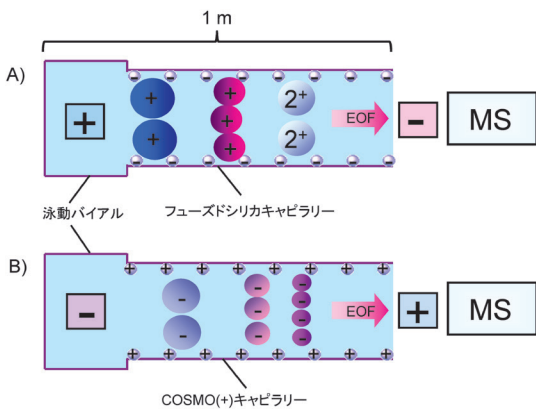


図 2 CE-MS によるメタボローム測定法
A) 陽イオン分析, B) 陰イオン分析

2.2 陰イオン性代謝物測定法⁷⁾⁸⁾

陰イオン性代謝物質の測定は、塩基性化合物を内壁表面に化学修飾したキャピラリーを用いて行っている [COSMO (+) キャピラリーという名前でナカライテック(株)より市販されている]。泳動液には pH8.5 に調整した 50 mmol/L の酢酸アンモニウム溶液を用い、陽イオン測定とは極性を反転させて分析を行う。

COSMO (+) キャピラリーを用いることによって、

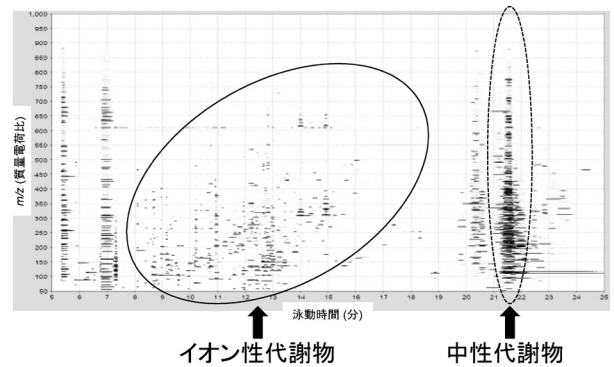


図 3 CE-TOFMS による陽イオン性代謝物測定例 (大腸がん組織)

それぞれの陽イオン性代謝物は、その水和イオン半径と電荷の比に基づいてキャピラリー内を泳動し、質量分析計でその質量電荷比に応じて検出される。中性代謝物も EOF によって質量分析計まで運ばれるが、泳動を伴わないため同じ時間に検出される。

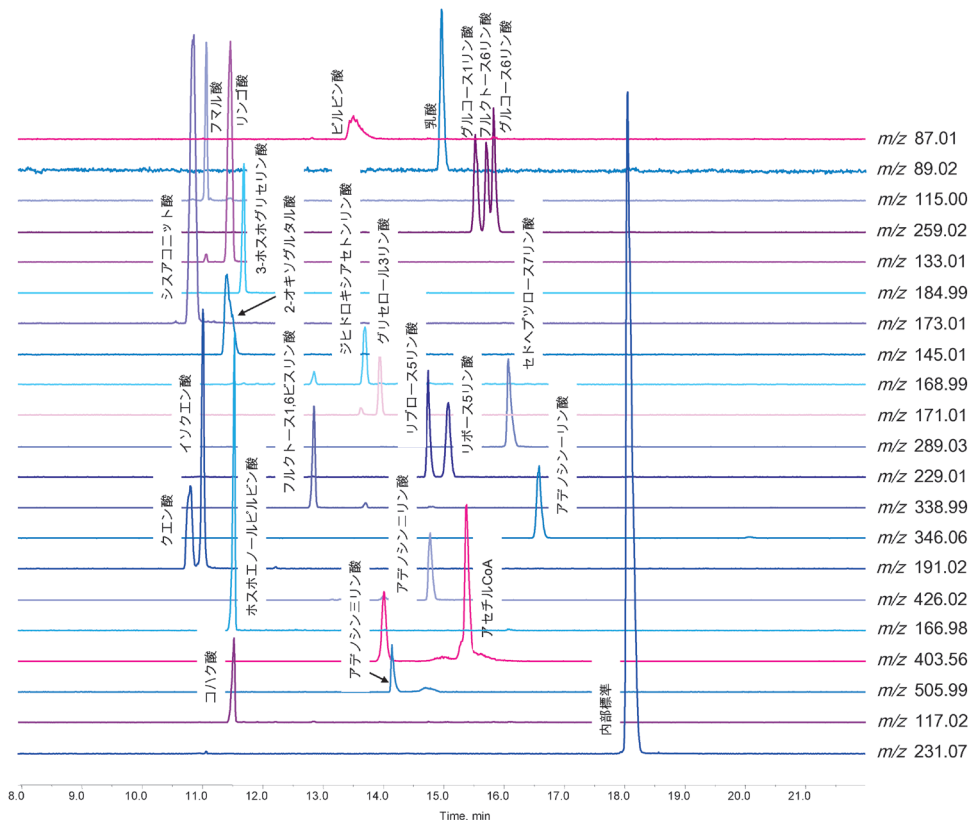


図 4 CE-TOFMS による陰イオン性代謝物標準溶液の測定 (各代謝物濃度; 50 μmol/L)

内壁表面を常に正に帯電させることが可能となり、結果として電気浸透流 (EOF) が逆転する。これによって、陰イオン性代謝物と EOF が共に陽極方向へ向かうため、拡散の影響を受けづらく、シャープなピーク形状を得ることが可能となる (図 2B)。

図 4 に、解糖系、ペントースリン酸回路、TCA (トリカルボン酸) 回路の代謝中間体と、ヌクレオチド類を一斉分析した例を示す。本法を使用すれば、構造異性体であるクエン酸とイソクエン酸、リブローズ 5 リン酸とリボース 5 リン酸、グルコース 1 リン酸、フルクトース 6 リン酸およびグルコース 6 リン酸も分離することが可能である。

2.3 試料の前処理

メタボローム解析において、試料を前処理する際に最も注意する点は、試料採取後の代謝による影響である。試料中の代謝物量を正確に定量するためには、試料前処理のスタート時に代謝を瞬時に停止させる工夫が不可欠である。また、CE-MS の場合は、サンプル中に含まれるタンパク質の影響を受けやすい (キャピラリーの内壁に吸着しやすい) ため、この点も注意を要する。

ここでは、血液試料の場合を例にとって説明する (図 5)。血液試料 (50 μ L の血清または血漿) は、まず内部標準の入った 10 倍量のメタノール溶液に混合する。大部分の代謝酵素は、100 % メタノール条件下では不活化されるので、この時点で代謝の停止が完了する。次いで、クロロホルム、超純水を追加して分液操作を行うことにより、疎水性のタンパク質や脂肪酸、リン脂質等を除去する (本手法は Bligh-Dyer 法と呼ばれ、最も汎用されるメタボローム前処理法である)。さらに、分液後の水層を分画分子量 5000 の限外ろ過フィルターに通すことによって、水溶性のタンパク質までも完全に除去する。滲液は遠心濃縮機で溶媒を完全に除去した後、50 μ L の超純水に再溶解して CE-MS 分析に供する。

2.4 データ解析

メタボロミクスにおいて、網羅解析の場合、その分析系で検出されたすべてのピークを扱うことになり、1 測定あたり数千以上になる場合がある。これらを手動で解析することは不可能であるため、市販の解析ソフト等を用いて自動的に解析を行うことが普通である。

しかしながら、CE-MS で得られたデータを解析する際には注意を要するケースがある。それは、測定ごとの各物質の泳動時間のずれが生じることである。LC-MS 用の解析ソフトは、基本的に測定ごとの検出時間にずれが生じることを想定しておらず、補正機能を持っていないものがほとんどである。そのため、筆者らの研究グループでは CE-MS 解析に特化したソフトウェアの開発も行ってきた⁹⁾。このソフトウェアは、ピークの積分、泳動時間のずれの補正、ピークの同定や定量までを一貫通貫に実施可能であり、データ解析にかかる時間を飛躍的に短縮することに貢献している。

また、最近では検出時間補正機能を持ったソフトウェアも市販されつつあり、大量のデータ解析も精度良く短時間で行うことが出来るようになってきている。

3 糖尿病性腎症のバイオマーカー探索への応用

3.1 背景

糖尿病性腎症は、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害と並んで糖尿病の三大合併症の一つであり、慢性腎臓病の中で最も対策を講じなければならない腎疾患である。しかしながら、病態と病期を正確に鑑別診断し、できるだけ早期に治療介入すれば、腎症の進行を有意に遅らせられることが分かっている。このようなことから、本疾患の診断技術の開発は、疾患対策の観点からも極めて重要である。

糖尿病性腎症の重症化予防および治療においては、病態の鑑別と病期の推定が極めて需要である。従来技術では、糖尿病の既往に加え、尿所見の変化 (タンパク尿・

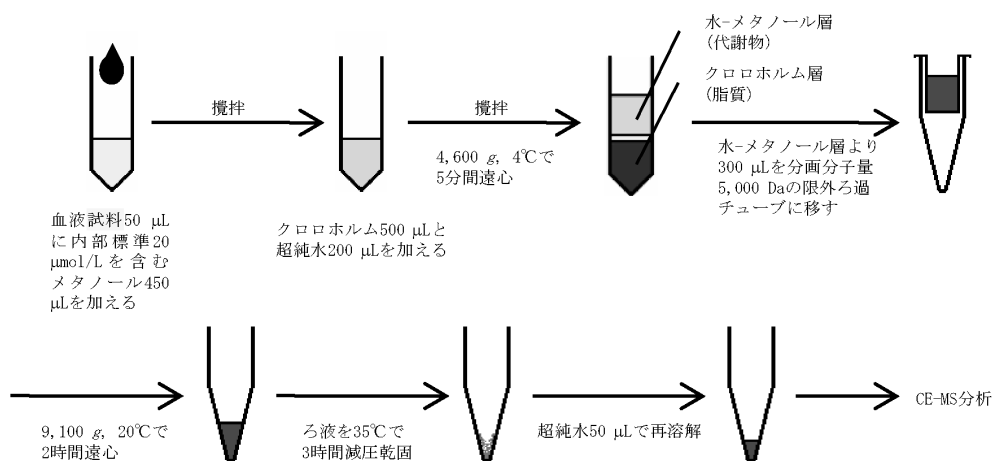


図 5 血液試料 (血清・血漿) からの代謝物抽出法

微量アルブミン尿の出現)やeGFR(糸球体濾過量:腎機能を表す指標で血清クレアチニン濃度と年齢・性別を基に算出される)の低下,眼底検査所見(眼底血管病変の観察)に基づいて糖尿病性腎症の鑑別および病期推定を行っていた。しかし,これらの従来技術では,糖尿病性腎症を他の腎疾患と簡便・確実に区別できない問題や病期を正確に推定できないといった問題があった。一方,いまだ従来技術に代わる新規バイオマーカーの実用化には至っておらず,現在でも尿中タンパク質やアルブミン,血清クレアチニン濃度に基づいた診断がデファクトスタンダードとなっている。

従来技術が内包する「病態形成が十分に進行した状態にならないと糖尿病性腎症を検出できない問題」や「病期を正確に見積もることができない問題」が生じる理由は,従来技術の方法論に問題があるためである。すなわち,従来技術では腎組織の構造的異常が生じた結果として現れる現象を検出して腎機能障害を診断しているため,病態形成が進行して十分に腎臓組織の構造的異常が生じないと糖尿病性腎症の発症を検出することができなかった。さらに,従来技術は腎機能障害を全般的に検出するもので,糖尿病性腎症のみを鑑別することは不可能であった。

そこで筆者らは,CE-TOFMSを用いて糖尿病性腎症病期を診断する血清バイオマーカーの探索を行った¹⁰⁾。

3・2 サンプル情報

共同研究先である中部ろうさい病院(愛知県)に通院,あるいは入院している患者の内,同意の得られた糖尿病性腎症の病期ステージの異なる78名の空腹時血清(無発症患者20名,マイクロアルブミン尿期32名,およびマクロアルブミン尿期26名)を採取した。

サンプル前処理法,ならびに測定条件は,2章に記した通りである。

3・3 糖尿病性腎症バイオマーカーの探索

CE-TOFMSを用いたメタボローム解析の結果,陽イオン測定と陰イオン測定の2回の測定によって,1サンプルあたり平均4400のピークを検出した。そこから,フラグメントイオン,アダクトイオンといった一つの代謝物から派生する関連ピークを除去し,ノイズピークなども精査した結果,最終的に289種類の代謝物由来のピークを得た。

これらのピークを用いて統計解析を行った結果,糖尿病性腎症の病期の異なるグループ(無症状,マイクロアルブミン尿期,マクロアルブミン尿期)間で有意な差が見られた化合物を19種得ることができた(表1)。これらの内8物質に対しては,標準試薬とキャピラリー内の分子の移動時間,さらに質量分析装置から得られるマススペクトルの比較によって同定することができ,それ

表1 糖尿病性腎症病期間で有意差のあった代謝物(文献10より引用,改変)

ID	分析モード	m/z	無症状		マイクロアルブミン尿期		マクロアルブミン尿期		p値*1	組成式	代謝物
			平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差			
11	陽イオン	114.067	0.501 ± 0.153	0.612 ± 0.209	1.052 ± 0.506	<0.0001	C ₄ H ₇ N ₃ O	クレアチニン			
17	陽イオン	129.067	0.046 ± 0.035	0.065 ± 0.049	0.125 ± 0.079	<0.0001	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂				
29	陽イオン	134.046	0.126 ± 0.025	0.141 ± 0.041	0.170 ± 0.036	<0.0001	C ₄ H ₇ NO ₄	アスパラギン酸			
39	陽イオン	146.118	0.028 ± 0.007	0.032 ± 0.008	0.039 ± 0.010	<0.0001	C ₇ H ₁₆ NO ₂	ガンマ-ブチロベタイン			
51	陽イオン	156.139	0.006 ± 0.005	0.005 ± 0.004	0.001 ± 0.003	0.001	C ₉ H ₁₇ NO				
52	陽イオン	158.154	0.063 ± 0.020	0.055 ± 0.022	0.040 ± 0.012	0.001	C ₉ H ₁₉ NO				
69	陽イオン	176.104	0.194 ± 0.053	0.199 ± 0.060	0.275 ± 0.081	0.001	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	シトルリン			
78	陽イオン	203.150	0.006 ± 0.002	0.007 ± 0.002	0.010 ± 0.005	0.000	C ₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	シンメトリックジメチルアルギニン			
82	陽イオン	209.093	0.010 ± 0.004	0.011 ± 0.005	0.016 ± 0.005	0.000	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	キヌレニン			
96	陽イオン	243.184	0.026 ± 0.013	0.019 ± 0.012	0.015 ± 0.007	0.030					
97	陽イオン	244.106	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.002	0.000					
114	陽イオン	276.128	0.008 ± 0.006	0.006 ± 0.004	0.003 ± 0.003	0.010					
127	陽イオン	302.197	0.106 ± 0.050	0.079 ± 0.047	0.062 ± 0.028	0.037					
134	陽イオン	316.213	0.010 ± 0.009	0.006 ± 0.007	0.003 ± 0.002	0.016					
152	陰イオン	96.960	0.216 ± 0.063	0.243 ± 0.063	0.341 ± 0.103	<0.0001	H ₂ SO ₄				
158	陰イオン	103.014	0.003 ± 0.002	0.004 ± 0.002	0.005 ± 0.002	0.000	C ₂ H ₄ N ₂ O ₃				
202	陰イオン	149.049	0.030 ± 0.006	0.034 ± 0.009	0.051 ± 0.019	<0.0001	C ₆ H ₆ N ₄ O				
232	陰イオン	187.098	0.020 ± 0.013	0.017 ± 0.011	0.009 ± 0.004	<0.0001	C ₉ H ₁₆ O ₄	アゼライン酸			
246	陰イオン	209.031	0.029 ± 0.012	0.024 ± 0.009	0.016 ± 0.013	<0.0001	C ₆ H ₁₀ O ₈	ガラクトール酸			

*1: p値の算出には, Kruskal-Wallis 検定を用いた

らはクレアチニン, アスパラギン酸, ガンマ-ブチロベタイン, シトルリン, シンメトリックジメチルアルギニン, キヌレニン, アゼライン酸, ガラクタル酸であった。

これらの同定された代謝物に関し, 各代謝物の相対量と eGFR との相関関係を解析したものが図 6 である。すべての代謝物は eGFR と有意な相関関係 ($p < 0.05$) が見られ, 腎機能の低下を推定する良いバイオマーカー候補になると考えられた。さらに, アゼライン酸とガラク

タル酸に関しては, 腎機能の低下とともに存在量が減少するといった他の代謝物とは逆の傾向が見られており, これらは特に特異性の高いバイオマーカーとして有望であると考えられた。

次に, 今回得られたマーカー候補 19 物質について, 各代謝物を単独で用いた際の糖尿病性腎症無発症患者とアルブミン尿期患者 (ミクロアルブミン, マクロアルブミン尿期の両方を含む) の診断能について表したものが表 2 である。

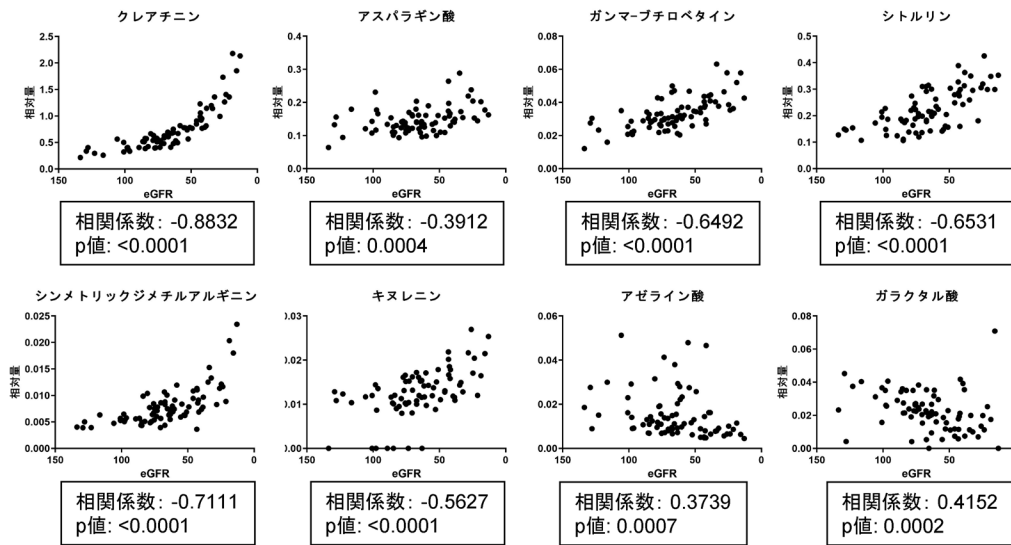


図 6 有意差の見られた代謝物の相対量と eGFR の相関

表 2 各代謝物の糖尿病性腎症の発症有無の診断能 (文献 10 より引用, 改変)

代謝物	ROC 解析における 曲線下面積	95% 信頼区間		p 値
		下限	上限	
クレアチニン	0.753	0.642	0.863	8.06×10^{-4}
ID 17	0.732	0.613	0.851	2.09×10^{-3}
アスパラギン酸	0.707	0.587	0.827	6.05×10^{-3}
ガンマ-ブチロベタイン	0.738	0.615	0.861	1.60×10^{-3}
ID 51	0.644	0.502	0.786	0.056
ID 52	0.708	0.585	0.830	5.84×10^{-3}
シトルリン	0.643	0.516	0.770	0.058
シンメトリックジメチルアルギニン	0.731	0.610	0.852	2.18×10^{-3}
キヌレニン	0.728	0.612	0.845	2.44×10^{-3}
ID 96	0.683	0.548	0.818	0.015
ID 97	0.666	0.540	0.791	0.028
ID 114	0.684	0.540	0.827	0.015
ID 127	0.671	0.532	0.809	0.024
ID 134	0.655	0.510	0.800	0.040
ID 152	0.730	0.605	0.856	2.26×10^{-3}
ID 158	0.711	0.581	0.841	5.16×10^{-3}
ID 202	0.765	0.649	0.880	4.47×10^{-4}
アゼライン酸	0.731	0.615	0.847	2.18×10^{-3}
ガラクトール酸	0.759	0.617	0.901	5.89×10^{-4}

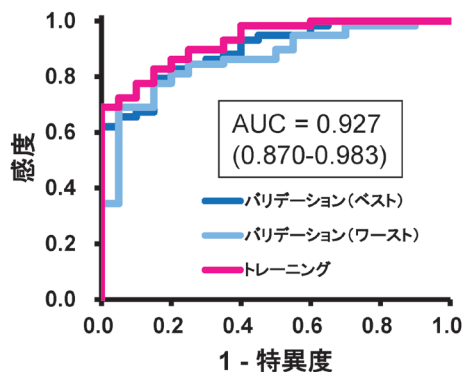


図7 糖尿病性腎症を判別するためのROC曲線
文献10より引用、改変

臨床統計において、バイオマーカーの性能を評価する指標の一つとして、ROC（受信者動作特性）解析がある。この解析において、AUC（曲線下面積）値が1に近ければ近いほど良いマーカーであり、一般的に0.8以上あれば優秀なマーカーであるとされる。今回、単独の代謝物を用いてROC解析を実施した際のAUC値は0.765（ID 202）から0.643（シトルリン）の間であり、単独の代謝物であってもある程度は糖尿病性腎症の有無を判別することが可能であった。

一方、メタボローム解析の利点の一つは、一度の測定で100以上の成分の同時定量が可能な点が挙げられる。そこでこの利点を生かし、さらに診断能を上げるため、多変量解析手法の一つである多重ロジスティック回帰分析を行い、複数の代謝物を組み合わせたモデルの作成を実施した。今回得られた19種のバイオマーカー候補すべてを用いて多重ロジスティック回帰分析を行った結果、5種類の代謝物（ガンマ-ブチロベタイン、シンメトリックジメチルアルギニン、アゼライン酸、ID114、ID127）の組み合わせによってAUC値が0.927となり、より高精度に糖尿病性腎症の診断ができることが示された（図7）。さらに、このモデルの妥当性はクロスバリデーションによっても確認し、その際のAUC値は0.870～0.983であった。これにより、得られたモデルの高い汎化性能が証明された。

4 おわりに

CE-MSは親水性代謝物の網羅分析法として、メタボロミクスの中で一定のシェアを占めている。特に、検体量の少ないサンプルにおいては、一度の分析で消費するサンプル量が少なく済むCE-MSは非常に相性が良い。一方で、CE-MSには細かいノウハウや経験が必要な部分があることも事実であり、このことが広く普及しにくい原因となっていることも確かである。

また、これはCE-MSに限ったことではないが、メタボローム解析では得られたピークの内、3割程度しか同定が出来ない。今回の糖尿病性腎症のバイオマーカー探

索においても、19種のマーカー候補の内、同定まで至ったのは8種にとどまっている。したがって、メタボローム解析で何か有望なバイオマーカー候補を発見しても、同定できない可能性の方が高くなってしまっている。

これを解決する方法の一つは、標準試薬の拡充である。現状は、試薬メーカーに依存しているため、売れない試薬は製造されない。国家プロジェクトを立ち上げて、合成化学や天然物化学の専門家の力を借りつつ標準化合物の拡充に関する取り組みが必要であると考えられる。

もう一つの方法は、未知化合物のタンデムマス情報から構造を予測するソフトウェアの開発である。この点に関しては、現状かなり予測精度の高いソフトウェアなども出てきており、今後の進展が期待される。

ユニークな分離特性を持つCE-MSの網羅分析がさらに普及し、今後様々な疾患の新規バイオマーカーの発見や食品の機能性成分の特定などに貢献することを期待したい。

文 献

- 1) A. Hirayama, K. Kami, M. Sugimoto, M. Sugawara, N. Toki, H. Onozuka, T. Kinoshita, N. Saito, A. Ochiai, M. Tomita, H. Esumi, T. Soga : *Cancer Res.*, **69**, 4918 (2009).
- 2) J. Whitburn, SR. Rao, EV. Morris, S. Tabata, A. Hirayama, T. Soga, JR. Edwards, Z. Kaya, C. Palmer, FC. Hamdy, CM. Edwards : *Sci. Adv.*, **8**, eabf9096 (2022).
- 3) T. Soga, M. Sugimoto, M. Honma, M. Mori, K. Igarashi, K. Kashikura, S. Ikeda, A. Hirayama, T. Yamamoto, H. Yoshida, M. Otsuka, S. Tsuji, Y. Yatomi, T. Sakuragawa, H. Watanabe, K. Nihei, T. Saito, S. Kawata, H. Suzuki, M. Tomita, M. Suematsu : *J. Hepatol.*, **55**, 896 (2011).
- 4) R. Saito, A. Hirayama, A. Akiba, Y. Kamei, Y. Kato, S. Ikeda, B. Kwan, M. Pu, L. Natarajan, H. Shinjo, S. Akiyama, M. Tomita, T. Soga, S. Maruyama : *Metabolites*, **11**, 671 (2021).
- 5) T. Soga, DN. Heiger : *Anal. Chem.*, **72**, 1236 (2000).
- 6) T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, T. Nishioka : *J. Proteome Res.*, **2**, 488 (2003).
- 7) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, T. Nishioka : *Anal. Chem.*, **74**, 2233 (2002).
- 8) T. Soga, K. Igarashi, C. Ito, K. Mizobuchi, H. Zimmermann, M. Tomita : *Anal. Chem.*, **81**, 6165 (2009).
- 9) M. Sugimoto, A. Hirayama, T. Ishikawa, M. Robert, R. Baran, K. Uehara, K. Kawai, T. Soga, M. Tomita : *Metabolomics*, **6**, 27 (2010).
- 10) A. Hirayama, E. Nakashima, M. Sugimoto, S. Akiyama, W. Sato, S. Maruyama, S. Matsuo, M. Tomita, Y. Yuzawa, T. Soga : *Anal. Bioanal. Chem.*, **404**, 3101 (2012).



平山 明由 (HIRAYAMA Akiyoshi)

慶應義塾大学政策・メディア研究科
〒997-0052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上
246-2。北海道大学大学院地球環境科学
研究科物質科学専攻修士課程修了。博士
（環境科学）。《現在の研究テーマ》高感度
メタボローム解析手法の開発とその応用。
《主な著書》メタボロミクス実践ガイド
（羊土社）。《趣味》庭いじり、家庭菜園。
E-mail : hirayama@tck.keio.ac.jp