

揮発性代謝物マルチマーカープロファイリング技術の開発と応用

Development of multimarker profiling methods for volatile metabolites
and their applications

馬場健史

Takeshi BAMBA

九州大学生体防御医学研究所附属トランスオミクス医学研究センターメタボロミクス分野

〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1

TEL 092-642-6170

E-mail: bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

はじめに

生体内には様々な揮発性成分が存在し、これらが複雑に組み合わせることで多種多様な「におい」が形成される。これまでに、皮膚や血液、尿、呼気などに含まれる揮発性成分が分析されており、生体内情報を反映する重要な要素として揮発性成分は注目されてきた。呼気や尿に含まれる揮発性成分は、それぞれ肺や腎臓で血液を介して移動することから、血液中の揮発性成分分析は組織障害や疾患などの診断や病態モニタリング、または各種病気の早期診断などへの応用が試みられてきた。

血液中にはさまざまな揮発性成分が存在しており、これまでに揮発性成分が遺伝子発現などの生理活性機能に関与するなど血中揮発性成分解析が注目されている。これら揮発性成分は血液中に微量に存在するため、前処理法としてヘッドスペース固相マイクロ抽出 (HS-SPME) 法が用いられてきた。しかし、HS-SPME 法はファイバーを気相に露出して抽出を行う静的な手法であり、抽出固定相と相互作用が強い成分が強調される、または夾雑物により回収率が低下するなどの問題があった。そのため血液中に存在する多種多様な揮発性成分のうち特定の成分しか注目されておらず、血中揮発性成分プロファイリングのために幅広い揮発性成分を分析できる手法が必要であった。そこでダイナミックヘッドスペース (DHS) 法に注目した。DHS 法は気相成分をパージして担体で捕集する動的な手法であるため、微量な揮発性成分を含む網羅的な揮発性成分解析が期待できる。本研究では、血中揮発性成分マルチマーカープロファイリングのための高感度かつ網羅的に解析可能な分析系の構築を目的として、*in vitro* 酸化脂質標準品を調製し、揮発性成分の解析を試みるとともに、血液中に存在する多種多様な揮発性成分の解析の際に必要な揮発性成分ライブラリーの構築を目指した。また、高圧注入法や抽出担体の検討を行い、血液に含まれる揮発性成分の多成分分析に基づく揮発性成分プロファイリングを試みた。

1. *in vitro* 酸化処理脂質から生成される揮発性成分プロファイリング

血液に含まれる揮発性成分の生成源の一つとして酸化脂質が注目されている。酸化脂質と疾患の関連性は注目されているが、血液中にはさまざまな脂質が存在するため揮発性成分も同様に存在すると考えられた。そこで *in vitro* 酸化処理脂質標準品を調製し、酸化脂質から生成されるさまざまな揮発性成分の分析を行い、その結果を基に血液試料に適用した。その結果、酸化脂質から 40 種類以上の揮発性成分を検出し、アルデヒド類のみならずアルコール類やフラン類などさまざまな構造を有する成分が含まれていた。マウス血しように適用した結果、これら揮発性成分を検出することができた。各種酸化処理脂質や血液試料に含まれる揮発性成分の解析が可能となり、得られた結果は揮発性成分同定の際に必要な揮発性成分ライブラリーとして期待できた。

2. ダイナミックヘッドスペース ガスクロマトグラフィー/質量分析を用いた血中揮発性成分プロファイリング技術の開発

DHS 法は気相成分の全量を抽出する事が可能であるが、担体の破過容量や熱脱着後のカラム導入において課題があり、揮発性成分の多成分分析に基づく解析が困難だった。そこで本章では、抽出担体の検討や高圧注入法に着目した。注入法について詳細に検討を行うことで DHS 法における課題に取り組み、HS-SPME 法における検出感度の問題解決を試みた。その結果、高圧注入条件を 360 kPa, 2 分間にし、抽出担体に Tenax GR を用いることで、HS-SPME 法で検出できなかったアルコール類や低分子揮発性成分を含む 50 種類の揮発性成分を検出することができた。DHS 法は HS-SPME 法と異なり、気相は強制的にパージされて、揮発性成分は担体に効率よく捕集されるため検出感度が向上したと考えられた。そして酸化処理マウス血しように適用したところ、化合物によって 3 種類の揮発性成分プロファイルを示す事が明らかとなった。また急性炎症モデル、慢性炎症モデルマウスの血しように適用した結果、急性炎症でアルコール類やアルデヒド類が慢性炎症に比べて有意に増加することが明らかになった。以上より、HS-SPME 法では検出感度が低かった成分を含む多成分の揮発性成分を高感度に検出することが可能となり、血液中の揮発性成分プロファイルを明らかにすることが出来た。

まとめ

本研究で、DHS 法を用いて血中揮発性成分マルチマーカープロファイリングのための高感度かつ網羅的に解析可能な分析系を構築する事が出来た。HS-SPME 法は分配平衡に則る抽出法であるため揮発性成分の網羅的な分析が困難だったが、DHS 法を適用することで

アルコール類を含む揮発性成分を分析することが可能となった. *in vitro* 酸化処理脂質から生成される揮発性成分の解析により構築したライブラリーを用いることで, 血液中に存在する多種多様な揮発性成分情報を明らかにすることが出来た. また, DHS 法に高圧注入法を適用することで, 生体レベルで存在する揮発性成分を高感度に分析する事が可能となり, 揮発性成分の高感度かつ網羅的な解析により炎症タイプごとの揮発性成分プロファイルを明らかにすることが出来た. 本分析系により従来の単一成分分析に比べてより詳細な解析が可能となり, 炎症や各種疾患における揮発性成分プロファイリング解析で新たな知見の獲得など, 今後の揮発性成分マルチマーカープロファイリングの新たな展開が期待される.

参考文献

- 1) Shoji Kakuta, Yasuhiko Bando, Shin Nishiumi, Masaru Yoshida, Eiichiro Fukusaki and Takeshi Bamba. Metabolic profiling of oxidized lipid-derived volatiles in blood by gas chromatography/mass spectrometry with in-tube extraction. *Mass Spectrometry*. **2**, A0018 (2013)
- 2) Shoji Kakuta, Toshiyuki Yamashita, Shin Nishiumi, Masaru Yoshida, Eiichiro Fukusaki and Takeshi Bamba. Multi-component profiling of trace volatiles in blood by gas chromatography/mass spectrometry with dynamic headspace extraction. *Mass Spectrometry*. **4**, A0034 (2015)