

超臨界流体クロマトグラフィーを用いた代謝物プロファイリング技術の開発と応用

竹田 浩章・和泉 自泰・馬場 健史*

はじめに

代謝物はゲノム情報が転写、翻訳過程を経て実行された表現型の一部であり、さまざまな生体反応を司る重要な物質である。メタボロミクスは代謝物総体(メタボローム)に基づくオーム科学であり、ゲノム情報に近接した高解像度表現型解析手段として注目されている。現在では、微生物や植物、動物など、さまざまな試料を対象としたメタボロミクス研究が精力的に実施されている¹⁾。一方、生体内には莫大な種類の代謝物が存在し、疎水性の化合物から親水性の化合物まで幅広い極性を有するため、これらの代謝物を精確に同定し、個々の定量を行うためには、化合物を一つひとつ分離し、高感度で検出する高度な分離分析技術が必要不可欠である。近年、質量分析計(mass spectrometer; MS)の技術革新とともに、液体クロマトグラフやガスクロマトグラフにMSを接続した代謝物プロファイリング技術が劇的な進歩を遂げている。我々のグループにおいては、特に新たな分離技術として移動相に超臨界流体を用いる超臨界流体クロマトグラフィー(supercritical fluid chromatography; SFC)を用いた分析系の開発に積極的に取り組んできた。本稿では、我々がこれまで超臨界流体クロマトグラフィー質量分析(SFC/MS)を用いて開発してきた代謝物プロファイリング技術を紹介するとともに、今後の展望についても概説する。

超臨界流体クロマトグラフィー質量分析

超臨界流体 超臨界流体(supercritical fluid; SCF)とは、臨界温度および臨界圧力を超えた領域の物質を指し(図1)、気体様の拡散性と液体様の溶解性を持ち、

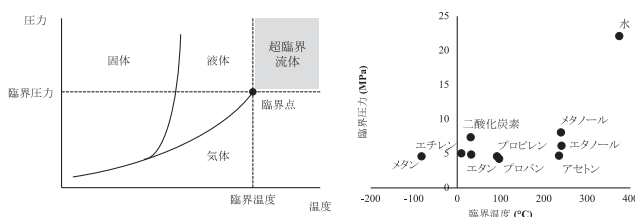


図1. 物質の状態図と各物質における超臨界流体条件

密度を連続して大幅に変化させることができる。SCFはさまざまな物質において臨界点が異なり、なかでも二酸化炭素が広く利用されている。超臨界二酸化炭素(supercritical carbon dioxide; SC-CO₂)は臨界温度が31.1°C、臨界圧力が7.38 MPaと比較的低く(図1)、取り扱いが簡便であるほか、不燃性で無毒かつ安価といった性質から安全面や金銭面においても利用価値が高い。また、SC-CO₂は*n*-ヘキサン程度の低い極性を持つといわれていることから、特に脂溶性化合物の溶解に適している。また、SFCは高分離能を維持したまま高流速分析を行うことが可能であり、イニシャライゼーションも短時間で終わるため、ハイスループットでの分析を実現することが可能である²⁾。極性の低いSC-CO₂は脂溶性化合物の分析に有用であり、メタノールなどのモディファイアを移動相に添加し、極性化合物への溶解力を高めることで、幅広い極性を有する化合物の分離にも適用することができる。ほかにも、SC-CO₂は常温常圧下で気化するため、分析に要する有機溶媒の使用量を激減することができる。以上の性質より、SFCは液体クロマトグラフィー(liquid chromatography; LC)やガスクロマトグラフィー(gas chromatography; GC)とは異なる分離モードを提供することが可能な技術として期待されている。

脂質プロファイリング技術の開発 脂質は生体膜の構成成分、エネルギー源、シグナル分子など多種多様な役割を担う生体分子であり³⁾、生命現象を紐解くためにはこれらの分析技術の開発が必要不可欠である。しかし、脂質には異なる脂肪酸側鎖を有する構造異性体が膨大に存在するため、これらを一齐に分析するためには高度な技術を要する。我々は、超臨界流体クロマトグラフに四重極型(quadrupole; Q)のMSを接続し、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、中性脂質などの脂質一齐分析系の構築に着手した。まずダイレクトインフュージョン質量分析(direct infusion mass spectrometry; DIMS)によりコーン電圧やキャピラリー電圧などのイオン化の条件を詳細に検討し、エレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization; ESI)により高感度で脂質を検出することに成功した⁴⁾。さらに、カラムスクリーニン

*著者紹介 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(教授) E-mail: bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

グの結果、順相カラムの一つであるシアノカラムを用いることで脂質クラス分離をわずか12分で達成した。また、逆相カラムの一つであるODS (octadecylsilylated) カラムを用いた場合には構成脂肪酸側鎖の違いに基づき20分以内に分離することができた⁴⁾。しかし、一部の極性脂質についてはリン酸基などの極性官能基による非特異的吸着が生じ、ピークのテーリングによる感度や定量性の低下が観測された。そこで、吸着の主な原因と考えられる極性脂質の水酸基に対してトリメチルシリル (trimethylsilyl; TMS) による誘導体化処理を施し、極性基を不活化させることで分離能の改善を試みた。その結果、ホスファチジン酸 (phosphatidic acid; PA) やスフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate; So1P) などの極性脂質のピーク形状が劇的に改善され、検出感度の向上につながった⁵⁾。これらの技術開発を基に、SFCが脂質プロファイリングを実施するうえで有用な技術であることが実証された。

さらに我々は個々の脂質分子種の精確な同定を目指し、精密質量情報の取得やMS²測定が可能な四重極-オービトラップ型 (Q-Orbitrap) のMSを接続することで新たな脂質一斉分析系の構築に着手した。ODS担体に極性基を内包させたODS-EPカラム (GLサイエンス) を用いることで、既述のODSカラムで得られた構成脂肪酸側鎖の違いに基づく分離だけでなく、脂質クラスごとの分離までもわずか20分で達成することに成功した⁶⁾。また、Q-Orbitrap-MSの特徴である精密質量情報やMS²情報の取得によりアイソバリックな分子種の質量分離部での分離や構成脂肪酸側鎖を含めた同定が可能となった。さらに、分析中においてポジティブイオンモードとネガティブイオンモードの連続的なスイッチングを行うことで、1度の分析でマウス血漿から500種類以上にも及ぶ脂質分子種の精確な同定をすることができた⁶⁾。

現在、SFC/Q-Orbitrap-MSを用いた脂質一斉プロファイリングシステムによる新たなアプリケーション開発に取り組んでいる。脂質は周囲をアポタンパク質で覆ったリポタンパク質を構成することで体内を循環し、脂質をさまざまな組織に輸送する⁷⁾。リポタンパク質は密度や組成により異なる種類に分類することができ、超低密度リポタンパク質 (very low density lipoprotein; VLDL)、低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein; LDL)、高密度リポタンパク質 (high density lipoprotein; HDL) と称される。一方、脂質代謝異常によりこれらの代謝バランスが変化すると重篤な循環器疾患を引き起こすこ

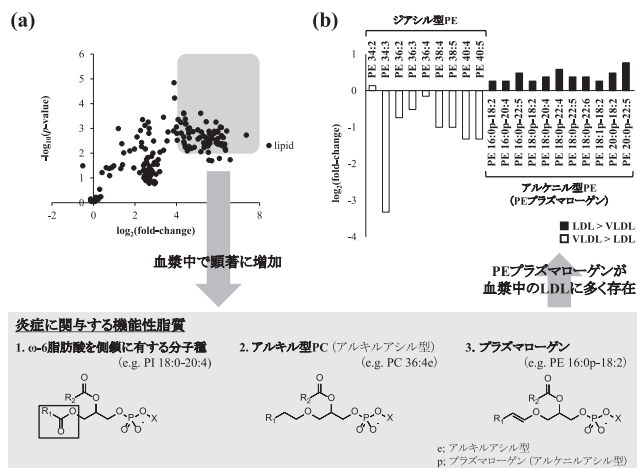


図2. WHHLMI ウサギにおける血漿およびリポタンパク質画分の脂質プロファイリング。(a) Volcano plotによる日本白色種 (Japanese white; JW) ウサギ ($n = 3$) および WHHLMI ウサギ ($n = 5$) の血漿脂質プロファイルの比較。(b) WHHLMI ウサギにおける VLDL 画分と LDL 画分のホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine; PE) 分子種の比較 (文献9より許可を得て転載)。

とが知られている。我々は、心筋梗塞を自然発症するモデル動物である WHHLMI (myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギ⁸⁾ の血漿試料を用いて脂質プロファイリングを実施したところ、炎症に関与する機能性脂質が増加することが分かった⁹⁾。さらに血漿からリポタンパク質を分離し、個々の画分において既述の脂質プロファイリングを適用することで、WHHLMI ウサギにおいてプラズマローゲンなどのエーテル型脂質が LDL 画分に多く含まれることが分かり、リポタンパク質における脂質組成の質的变化を高解像度に取得することに成功した (図2)⁹⁾。

SFCの適用範囲の拡大 我々はSFC/MSによる代謝物プロファイリングの適用範囲の拡大を目指し、さらなる技術開発に取り組んでいる。移動相のSC-CO₂にモディファイアとしてメタノールと水の混合溶媒 (MeOH/H₂O = 95/5, v/v) を添加し、2%から100%までグラジエントをかけることで、わずか4分間で17種類の脂溶性ビタミンおよび水溶性ビタミン ($\log P_{ow} = -2.11 \sim 10.12$) を一斉に分析することに成功した¹⁰⁾。通常移動相がSC-CO₂のみの場合、超臨界流体状態を保つことができるが、モディファイアとしてメタノールを添加した場合、臨界点が変わるため亜臨界流体状態に変化する (図1)。このように移動相の物理状態を超臨界流体から亜臨界流体を経て最終的に液体にまで連続的に変化させ、移動相の極性の幅をn-ヘキサンからメタノールまで連続して変化させることが可能なこの分離手法をユニファ

イドクロマトグラフィー (unified chromatography; UC) として新たに提唱した¹⁰⁾。まだ研究報告例は少ないが、今後UCが水溶性化合物から脂溶性化合物まで幅広い成分の一斉分析を可能とするSFCの新しいステージとして活躍すると期待される。

オンライン超臨界流体抽出 一超臨界流体クロマトグラフィー質量分析

超臨界流体抽出 超臨界流体抽出 (supercritical fluid extraction; SFE) とは、目的成分が含まれる対象物にSCFを抽出媒体として加え、溶解度の差を利用して抽出操作を行う手法である。SCFを抽出媒体として用いることには、さまざまな利点が存在する^{11,12)}。

- I. SCFの高拡散性という性質により、目的成分が含まれる対象物への浸透性が高く、短時間で高い抽出効率を達成できる。
- II. 温度と圧力を制御することで、SCFの溶解力を連続的に変化することができるため、複数の目的成分が存在した場合も最適な条件で抽出操作を行うことができる。
- III. 密封暗黒無酸素下で、臨界温度が31.1°C、臨界圧力が7.38 MPaとマイルドな条件で抽出することができるため、酸化や熱分解、加水分解を受けやすい不安定な化合物や、酸化開裂物を生じやすい揮発性成分などの目的成分への適用が可能である。
- IV. SC-CO₂は常温・常圧で気体に戻るため、抽出後に得られたフラクションから抽出媒体が自然に揮発する。したがって、精製や濃縮に必要な煩雑な操作が不要であり、時間とコストを低減することができる。

以上の性質により、SFEは抽出操作において有用な手法である。既述の通りSC-CO₂は*n*-ヘキサン程度の低い極性を持つことから、トリアシルグリセロールや脂溶性ビタミンなどといった脂溶性化合物の抽出に適しており、食品産業を中心として幅広く利用されている^{13,14)}。さらに、モディファイアを添加し連続的に移動相の極性や溶出力を変化させることで、リン脂質などの極性基を持つ脂溶性化合物を一斉に抽出する研究報告もされている¹⁵⁾。近年、SFEとSFCを接続することで抽出から分析までを自動化したオンライン化 (オンラインSFE-SFC/MS) が実施されており、SCFの利点を最大限に生かした代謝物プロファイリング技術の開発が行われている。

オンラインSFE-SFC/MS オンラインSFE-SFC/MSは、暗黒無酸素条件下で抽出された化合物を閉鎖系内で分析カラムに運ぶ事ができるため、有機溶媒抽出で

は不安定で構造が変化してしまう化合物の分析に適しており、前処理操作の簡略化、人為的誤差の低減が利点としてあげられる。抗酸化能を有する還元型コエンザイムQ₁₀は医薬品や健康食品の素材として幅広く利用されているが、容易に酸化を受けることから、品質管理の観点からも還元型の量を精確に測定する技術が求められている。そこで、我々はオンラインSFE-SFC/MSによるコエンザイムQ₁₀の新たな測定手法の開発を試みた。モディファイアとして0.1% (w/v) ギ酸アンモニウムを添加したメタノールを使用し、初めの10分間はモディファイアを添加せず抽出を行い、その後、抽出画分をカラム先端で濃縮し、グラジエント溶出させることによって、光合成細菌に含まれる還元型および酸化型コエンザイムQ₁₀の抽出、分離分析をわずか20分で達成することに成功した¹⁶⁾。さらに、SFEでは有機溶媒抽出に比べて還元型の割合が有意に高い値を示し、従来法と比較して短時間でより精確な測定を実施することができた¹⁶⁾。当該研究の結果から、オンラインSFE-SFC/MSは暗黒無酸素条件下での抽出が可能であるため、酸化されやすい成分を安定的に分析でき、かつスループットを向上させるための有用な技術であることが示された。

また、オンラインSFE-SFC/MSは新生児マススクリーニングや遺伝性疾患の診断、バイオマーカーのスクリーニングの実施などに用いられるdried blood spots (DBS) やdried plasma spots (DPS) から脂質の抽出や分析を行うことが可能である。DBSやDPSは採血量や輸送費用、保存コストの低減が可能であり、取扱いの簡便性からもさまざまな試験に利用されているが、その安定性や微量な試料による感度不足などといった問題を抱えている。そこで、我々はオンラインSFE-SFC/MSを適用し、DPSからの安定的なリン脂質プロファイリング手法の開発を試みた。分析条件の最適化を行った結果、モディファイアとして0.1% (w/v) のギ酸アンモニウムを添加したメタノールを10%使用することで、わずか5分間でリン脂質を抽出することに成功し、その後モディファイアを30%にし、シリカゲルにホスホリルコリン基を化学修飾したPC HILICカラム (資生堂) で分離分析をすることで、15分間で134種類のリン脂質を同定することができた¹⁷⁾。さらに、そのうちの101種類の脂質分子種については従来の有機溶媒抽出と比較して高い抽出効率を示されることが分かった¹⁷⁾。当該研究の結果から、オンラインSFE-SFC/MSは血液中の成分を安定的に抽出でき、バイオハザードの問題も回避可能であることから、臨床診断および薬物検査のハイスループット脂質プロファイリング、さらにはバイオマーカーのスクリーニ

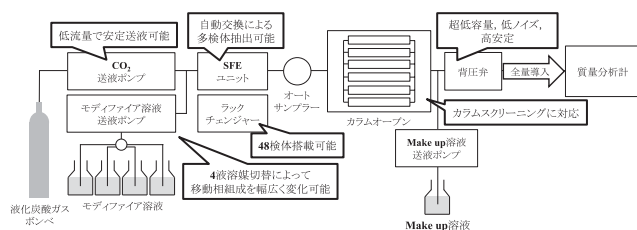


図3. 開発した新規オンラインSFE-SFC装置 (Nexera UC)

ングにおいても適用可能な抽出，分離技術であることが示された。さらに，我々はSC-CO₂に対して14%のメタノールを添加した亜臨界流体を用いることで，DPSから中性脂質やリン脂質だけではなく，アミノ酸や核酸といったより極性の高い親水性代謝物も同時に抽出できることを見いだした¹⁸⁾。これらの技術開発により，SFEは酸化されやすい不安定な成分のほか，一部の親水性代謝物の抽出にも適用可能であり，オンラインSFE-SFC/MSを用いることでさまざまな化合物の抽出，分離分析を連続的に全自動で実施できることを示した。

近年，我々は株式会社島津製作所と連携し，SFEとSFCを接続し，抽出と分析を単一行程で行うことを可能にした新規オンラインSFE-SFC装置(Nexera UC) (図3)を開発し，2015年に上市した。Nexera UCでは低流量で安定した送液が可能なCO₂送液ポンプの開発に成功し，代謝物の保持時間の再現性が飛躍的に向上した。さらに，低容量かつ高性能の背圧制御装置の開発によって，MSへの全量導入が実現可能となり，分析システムの高感度化につながった。他にも，最大48検体の連続抽出および分析が可能なラックチェンジャーが搭載され，多検体の処理を簡便に実施することができるようになった。また，4種類のモディファイアの切り替えにより移動相組成を幅広く変化させることができ，カラムオープンには最大12本のカラムを接続することが可能となり，カラムスクリーニングを含め分析条件の最適化が容易となった。これらの技術的な進歩により，我々は実用的なSFE-SFC装置の開発に世界に先駆けて成功したといえる。

おわりに

各種クロマトグラフィー質量分析システムを用いた代謝物プロファイリング技術はここ数年で急速な発展を遂げ，幅広い試料を対象として広く利用されるまでに至った。我々は，脂質の一斉分析が可能な手法としてSFCに可能性を見だし，脂質分子種を中心に技術開発や応用研究に取り組んできた。現在，水溶性化合物から脂溶性化合物まで幅広い成分の一斉分析が可能な手法としてUCを提案し，SFCの適用範囲の拡大とともにメタボロミクスにおけるクロマトグラフィーの新しい可能性を示すことに成功した。さらに，我々は不安定な代謝物を生体内の情報を精確に反映した状態で測定する手法として，オンラインSFE-SFC/MSによる暗黒無酸素条件下での抽出および分析を実現する方法を提供した。これらの技術開発により，SFCは代謝物プロファイリングの現状を打開しうる新たな分離分析技術として発展を遂げてきた。今後SFC/MSによる代謝物プロファイリング技術の開発がますます発展し，臨床診断やバイオマーカー探索など，多岐にわたる分野において画期的な技術として世に広く普及することを期待する。

文 献

- 1) Putri, S. T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 579 (2013).
- 2) Smith, R. M.: *J. Chromatogr. A.*, **856**, 83 (1999).
- 3) Albi, E. and Viola Magni, M. P: *Biol. Cell.*, **96**, 657 (2004).
- 4) Bamba, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 460 (2008).
- 5) Lee, J. W. *et al.*: *J. Sep. Sci.*, **34**, 3553 (2011).
- 6) Yamada, T. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **1301**, 237 (2013).
- 7) Jackson, R. L. *et al.*: *Physiol. Rev.*, **56**, 259 (1976).
- 8) Shiomi, M. and Ito, T.: *Atherosclerosis*, **207**, 1 (2009).
- 9) Takeda, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 476 (2015).
- 10) Taguchi, K. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **1362**, 270 (2014).
- 11) Lang, Q. *et al.*: *Talanta*, **53**, 771 (2001).
- 12) Lee, J. W. *et al.*: *Bioanalysis*, **4**, 2413 (2012).
- 13) Ge, Y. *et al.*: *J. Agric. Food. Chem.*, **50**, 685 (2002).
- 14) de Azevedo, A. B. A. *et al.*: *J. Supercrit. Fluid.*, **44**, 186 (2008).
- 15) Hubbard, J. D. *et al.*: *Cereal Chem.*, **81**, 693 (2004).
- 16) Matsubara, A. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **1250**, 76 (2012).
- 17) Uchikata, T. *et al.*: *J. Chromatogr. A.*, **1250**, 69 (2012).
- 18) Matsubara, A. *et al.*: *J. Chromatogr. B.*, **969**, 199 (2014).