

# 超臨界流体クロマトグラフィー質量分析を基盤とした 定量リピドーム分析法の開発

和泉 自泰\*・馬場 健史

## はじめに

脂質は、生体膜の構成成分、エネルギー貯蔵物質、脂質メディエーター、タンパク質修飾、細胞内や細胞間のシグナル分子などとして働く重要な分子である。このような脂質分子を包括的かつ定量的に解析する学問分野はリピドミクスと呼ばれている。近年の質量分析および周辺技術の発展によってリピドーム解析技術も進歩し、生体関連試料から多種多様の脂質分子を観測できるようになってきた。今後、脂質分子の新たな生理機能を発見し、脂質代謝制御機構の全貌を明らかにしていくためには、リピドームデータの活用が重要となる。本稿では、リピドミクスの世界的動向を紹介するとともに、近年、筆者らが開発した超臨界流体技術を用いた定量リピドーム分析法について概説する。

## 脂質の分類

脂質は単純脂質、複合脂質、誘導脂質に大別される(図1)<sup>1)</sup>。単純脂質は、主骨格(グリセロール、スフィンゴシン、ステロール)と脂肪酸がエステル結合あるいはアミド結合した脂質を指し、中性脂質(monoacylglycerol, MG; diacylglycerol, DG; triacylglycerol, TG)やコレステロールエステル(cholesterol ester, ChE)、セラミド(ceramide, Cer)などがあげられる。複合脂質は、リン酸や糖を含む脂質を指し、大きく分けてリン脂質と糖脂質からなる。誘導脂質は、単純脂質や複合脂質から各種リパーゼなどの酵素反応によって分解、誘導された脂質を指し、遊離脂肪酸やステロイドなどがあげられる。生物種によっても異なるが、それぞれの脂質骨格には20種以上の脂肪酸が結合することから、理論的には10,000種類以上にもおよぶ脂質の存在が推定されている<sup>2)</sup>。さらに、各脂質の代謝の反応場はさまざまであり[脂肪酸合成(細胞質, 小胞体), グリセロリン脂質合成(細胞質, ミトコンドリア, 小胞体, 核など), β-酸化(ミトコンドリア, ペルオキシソーム)], オルガネラ間の脂質輸送もまた精密に制御されている。

このように膨大な種類が存在する脂質を網羅的かつ正確に測定するためには、脂質の化学構造をよく理解することが重要である。たとえば、細胞膜の脂質二重層の構成要素だけではなく、生体内外での情報伝達に深く関わっているリン脂質や糖脂質はグリセロール骨格のsn-1 (stereospecifically numbered, sn) およびsn-2の位置に疎水性の脂肪酸が結合し、sn-3の位置にリン酸や糖などの極性ヘッドグループが結合する(図1)。さらに、リン脂質のsn-1およびsn-2の位置に結合する脂肪酸の種類あるいは結合様式の組合せによって同重体や異性体が多数存在するため、リピドーム情報を正確に取得するためには、細心の注意を払う必要がある。

## 従来のリピドーム分析法

ガスクロマトグラフ(gas chromatograph, GC)に水素炎イオン化型検出器(flame ionization detector, FID)あるいは質量分析器(mass spectrometer, MS)を接続した

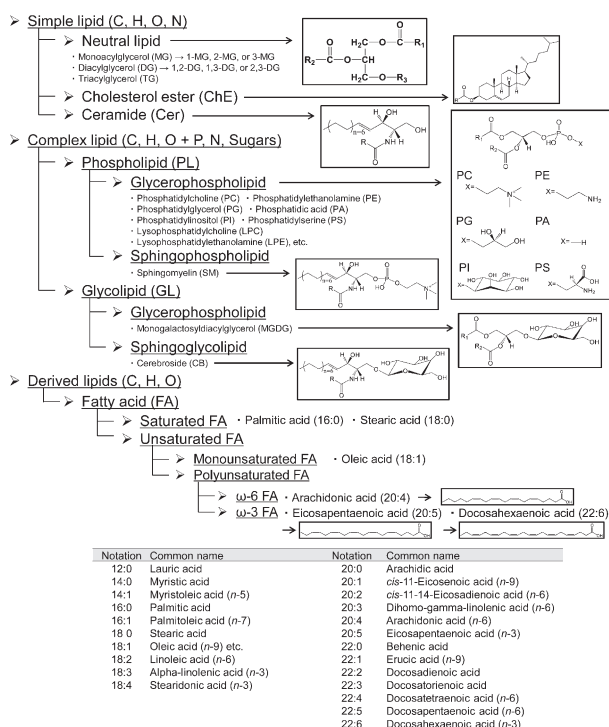


図1. 化学構造による主要な脂質および脂肪酸の分類

\* 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(准教授) E-mail: izumi@bioreg.kyushu-u.ac.jp

GC/FIDあるいはGC/MSはもっとも汎用的な脂質の分析法である。これらの脂質分析法は、酸あるいは塩基を触媒として脂質とメタノールを反応させるメチルエステル化反応によって生成した脂肪酸メチルエステルを分離検出するのが一般的である<sup>3)</sup>。本手法は、総脂質中の脂肪酸組成の情報を定量的に取得できるため、生物工学をはじめ、さまざまな研究分野で活用されている。

一方、近年では、個々の脂質分子の情報を取得するために、液体クロマトグラフィーおよびエレクトロスプレーイオン化タンデム型質量分析 (electrospray ionization tandem mass spectrometry, ESI-MS/MS) による各種リピドーム解析法が提案されている (表1)<sup>4)</sup>。ESI-MS/MSによる脂質の解析は、各脂質クラスの化学構造の規則性に従い、プリカーサーイオン (MS) およびプロダクトイオン (MS/MS) 情報を活用して実施する。MS/MSを取得するためには、衝突誘起解離などが搭載された三連四重極型質量分析計 (triple-quadrupole mass spectrometer, QqQMS)、四重極飛行時間型質量分析計 (quadrupole-time of flight mass spectrometer, Q-TOFMS)、あるいは四重極オービトラップ型質量分析計 (quadrupole orbitrap mass spectrometer, Q-OrbitrapMS) などのタンデム型質量分析計が使用される。ESI-MS/MSにおける脂質のイオン化 (正・負のイオン化モードとそれらの付加イオンの種類) およびフラグメンテーションは、脂質クラスの種類によって大きく異なる。したがって、タンデム型の質量分析を用いて各脂質クラスのイオン化およびMS/MSによる部分構造情報を整理して理解することがリピドーム解析を始めるうえで重要となる。

ショットガンリピドーム解析とも呼ばれるダイレクトインフュージョンタンデム質量分析 (direct infusion tandem mass spectrometry, DI/MS/MS) はクロマトグラフィーによる分離を行わず、測定試料を直接ESI-MS/MSに導入する手法であり、短時間で脂質分子を一斉定量するために利用されている<sup>5,6)</sup>。DI/MS/MS法は、脂質クラスごとに生体内で検出されない脂質標準品あるいは安定同位体標識した脂質標準品 (Avanti Polar Lipids, Inc. から販売

されているアシル側鎖にd<sub>7</sub>-18:1などを含むSPLASH<sup>®</sup> LIPIDOMIX<sup>®</sup> Mass Spec Standardなど) を抽出試料に添加することで、ESIによるイオン化の際のマトリクス効果 (イオン化サプレッションなど) を標準化することが原理上可能であり、定量的なりピドーム分析法として広く利用されている。しかし、DI/MS/MS法は抽出液に含まれる多数の脂質成分あるいは未知の生体マトリクス成分が一斉にESIイオン源に導入されるため、低濃度の脂質分子はイオン化サプレッションの影響によって検出が困難となる。さらに、タンデム型質量分析計の質量分離の機能を最大限活用したとしても、異性体を含む多種多様な脂質分子の情報を一斉に取得することは容易ではない。また、ESIでの高電圧および高温の影響によって、一部の脂質分子は部分的に開裂 (インソースフラグメント) することが知られており、同定精度および定量性の低下につながる場合がある (表1)。

液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) は、DI/MS/MS法の問題点 (感度、異性体の識別、網羅性) を改善した方法である。LC/MS/MSの利点は、①ESI-MSは濃度依存型の検出器であり、LC分離によりカラム内で測定対象物の希釈を抑制できるため検出感度が向上する<sup>7)</sup>、②LC分離により異性体の分離ができるだけでなく、生体試料のマトリクス効果を軽減し、脂質分子のイオン化効率が向上する、③結果的に検出可能な脂質分子数が増加することである。逆相液体クロマトグラフィー (reverse phase liquid chromatography, RP-LC) は、移動相に水、アセトニトリル、メタノール、イソプロパノールのような極性～中極性溶媒を使用し、固定相にシリカゲルなどの粒子表面にオクタデシルシリル (ODS) 基などを化学結合した逆相担体を用いる組合せのクロマトグラフィーである。脂質分子種は、ODS基の非極性側鎖と脂質の疎水性脂肪酸側鎖との間の疎水性相互作用に基づき分離し、保持時間再現性も高いことから、リピドーム解析においてもっとも広く使用されているLC分離モードである<sup>4,8,9)</sup>。しかし、生体試料から検出されたすべてのピークに対する内部標準物質を準備することは現実的に難しいことから、RP-LC/MS/MSは個々の脂質分子のマトリクス効果の補正と定量値算出の観点で課題が残されている (表1)。

一方、順相液体クロマトグラフィー (normal phase liquid chromatography, NP-LC) は主に極性ヘッドグループによって各脂質クラスを分離することができる<sup>10,11)</sup>。そのため、NP-LC/MS/MSでは、脂質クラスごとに内部標準物質を添加することで脂質クラス間のマトリクス効果を標

表1. リピドーム分析法の特徴

分析法の性能	従来法				新規分析法
	DI/MS/MS	RP-LC/MS/MS	NP-LC/MS/MS	HILIC/MS/MS	NP-SFC/MS/MS
スループット	◎	○	○	△	○
感度	△	◎	○	◎	◎
異性体の識別	△	◎	○	○	◎
網羅性	△	◎	○	○	◎
定量性	◎	○	◎	◎	◎

準化できることから、DI/MS/MSと同様に定量的な解析が可能となる。しかし、ヘキサンやクロロホルムなど、NP-LCの移動相はプロトン供与性を持たない溶媒が多く、ESIにおけるイオン化効率が低いため、検出感度の点が課題となっている(表1)。NP-LC/MS/MSと類似した分析法として親水性相互作用クロマトグラフィータンデム質量分析(hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry, HILIC/MS/MS)があげられる<sup>12-14)</sup>。リピドーム解析におけるHILICの分離挙動はNP-LCと類似しているが、HILICはメタノールや水などプロトン供与性を持つ溶媒を移動相として使用するため、HILIC/MS/MSの感度はNP-LC/MS/MSと比較して高い<sup>12)</sup>。しかし、HILICはChEやDG、TGなどといった疎水性の高い脂質の保持や分離が不十分である<sup>13)</sup>。そのため、HILICは主にグリセロリン脂質やスフィンゴ脂質などといった比較的極性の高い脂質に適用範囲が限定される<sup>12-14)</sup>。さらに、保持時間やピーク面積値の再現性を高い状態で保ちながらリピドーム解析を実施するためには、固定相表面の水和相の形成に多くの平衡時間を必要とする<sup>12-14)</sup>。以上のことから、スループット、感度、異性体の識別、網羅性、定量性のすべての要件を満たす理想的なリピドーム解析法は未だ確立できていないといえる(表1)。

### リピドミクスデータの施設間比較

近年、人工知能技術の発展に伴い、各種オミクスの大規模データの活用が注目されている。しかし、大規模なメタボロームデータを用いた統合解析を可能にするためには、異なる時期、異なる実験室、異なる分析法で取得したメタボロームデータの定量値を比較可能とする基盤技術の確立が必要となる。その端緒として、筆者らは2014年ごろにアメリカ国立標準技術研究所(national institute of standards and technology, NIST)が中心となって企画した「世界の31研究機関におけるリピドミクスデータの施設間比較研究」に参加した<sup>15)</sup>。当該研究プロジェクトの目的は、同一の血漿試料を各施設に配布し血漿中の脂質分子の定性および定量情報を収集、評価することであった。全研究機関のデータから、1,500種以上の膨大な脂質分子の定性情報の取得に成功した一方で、5つの研究機関以上で検出された339種の脂質分子を対象に行った定量評価においては、3分の1の脂質分子の定量値が施設間で大きく異なった。この主な要因は、各分析法の定量精度の違い、適切な内部標準物質が整備できていないことがあげられた。筆者らは当該研究プロジェクトの経験を通して、リピドーム解析における定量性の重

要性を再認識するとともに、超臨界流体技術を用いた新規の定量リピドーム分析法の開発に着手した。

### 超臨界流体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析による定量リピドーム分析法の開発

超臨界流体は、温度と圧力が気液の臨界点を越えた非凝縮性高密度流体と定義される物質の状態の一つである。超臨界流体は一般的に、①気体と液体の中間の密度、②気体と液体の中間の拡散係数、③気体と液体の中間の粘度、といった熱物理学的特徴を有している。すなわち、液体のように物質を溶解することができ、一方で、気体のように流動性や浸透性が抜群で表面張力もない、液体と気体の両方の性質を持ち合わせた理想の溶媒といえる。また、超臨界二酸化炭素(supercritical carbon dioxide, SCCO<sub>2</sub>)は、①臨界温度(31.1°C)、臨界圧力(7.38 MPa)が比較的低い、②多くの有機化合物を溶解する、③化学的に不活性、④無毒で安価といった性質からもっともよく使用されている。

移動相にSCCO<sub>2</sub>を用いた超臨界流体クロマトグラフィー(supercritical fluid chromatography, SFC)は、1962年にKlesperらによって初めて報告された<sup>16)</sup>。そして、1982年、Gereらによって、LC装置をもとに充填カラムSFC装置が開発され<sup>17)</sup>、SFCのクロマト理論およびLCとの相違点がまとめられた<sup>18)</sup>。これまでの研究によってSFCは、LCよりも高いカラム効率を特に高速領域で顕著に得られること、また、GCやLCにはない種々の特徴を有する分離技術であることが示された<sup>17,18)</sup>。一方で、従来のSFC装置は、液化炭酸ガスを送液するためのポンプの性能、あるいはSCFを精密に制御するための背圧制御装置の性能が悪く、再現性の高いSFC分析を実施することができなかった。しかし、近年の技術革新により、安定した送液と圧力制御が可能な次世代のSFC装置(Waters社のACQUITY UPC<sup>2</sup>や島津製作所社のNexera UCなど)が開発され、再現性、堅牢性の高い生体試料の分析が可能となっている<sup>19)</sup>。

SFCの移動相として使用するSCCO<sub>2</sub>は*n*-ヘキサン程度と極性が低いため脂質の溶解力が高く、また、メタノールなどの極性有機溶媒をモディファイアとして使用することで移動相の極性を大きく変化させながら疎水性成分の分離分析が達成できる。筆者らは長年にわたる種々の検討の結果、SFCおよびSCCO<sub>2</sub>の特性を最大限に発揮した脂質クラスの高分離分析法の開発に成功した。本手法は、エチレン架橋型ハイブリッドシリカ粒子にジエチルアミン(diethylamine, DEA)を修飾したDEAカラムによる順相モードでのSFC分離(normal phase SFC,

NP-SFC)である<sup>20)</sup>。NP-SFCとQqQMSを接続したNP-SFC/MS/MSは、従来の脂質クラス分離・検出法であるNP-LC/MS/MSやHILIC/MS/MSと比べて、①脂質クラス間の分離性能に優れ、②質量分析では識別できないリゾリン脂質(LPC, LPE)や中性脂質(MG, DG)の位置異性体のクロマト分離を達成し、③中性脂質から極性脂質までの幅広い脂質クラスの分離および平衡化を短時間(トータルの分析時間20分)で実施でき、④ESI/MS/MSでのイオン化効率および検出感度が高い、という特徴を有した(表1)。さらに、NP-SFC/MS/MS分析法の定量性を評価するためにウサギ血漿試料を用いた添加回収試験を実施したところ、すべての脂質クラスで64.9%から103.5%の回収率を得ることができた。

以上の結果より、筆者らはNP-SFC/QqQMS分析法と安定同位体希釈法を組み合わせることで、脂質分子を高感度かつ網羅的、定量的に測定でき、データ解析のスループットや偽陽性・偽陰性を低減させた新規の定量リピドーム解析法の開発に成功した<sup>20)</sup>。本手法を用いて取得した定量リピドームデータは、EPAの投与による血中脂質バランスの改善効果<sup>20)</sup>、スタチンあるいは新規脂質低下剤の作用機序<sup>21,22)</sup>、動脈硬化診断のためのバイオマーカー候補の選定<sup>23)</sup>、生活習慣病に対するクルクミンの作用機序と脂質代謝への影響<sup>24)</sup>、エクソソームを介した血管内皮細胞のセラミド排出機構<sup>25)</sup>、乳がん細胞の転移性に関与するエクソソーム中の脂質分子の同定<sup>26)</sup>など、脂質機能や脂質代謝制御に関する新たな知見の取得につながった。

### おわりに

本稿では、各種クロマトグラフィーおよび質量分析の特徴を整理しながら既存のリピドーム分析法を解説した。さらに、近年、筆者らが開発したNP-SFC/QqQMSによる新規リピドーム分析法について概説した。筆者らが考案したワイドターゲット定量リピドーム分析法の特徴は、SFCの順相モードによる脂質クラスのクロマト分離能が高く、QqQMSによって微量な脂質成分を含む

包括的かつ高感度の測定が実施できる点、さらに、SFCの脂質クラス分離と安定同位体希釈法(各脂質クラスに対して1種の安定同位体内部標準物質を試料抽出時に添加)によるワイドターゲットの定量分析(各脂質クラスの総和および個々の脂質分子の定量)ができる点である。したがって、本手法は、基礎研究のみならず、異なる時期、異なる施設で取得したりピドームデータの統合を必要とする大規模コホート研究などに応用できる可能性がある。さらに、SFC/MS/MSによるリピドーム測定技術を発展させ、生物工学分野の微生物育種研究への応用にも貢献したい。

### 文 献

- 1) Fahy, E. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **46**, 839 (2005).
- 2) Kind, T. *et al.*: *Nat. Methods*, **10**, 755 (2013).
- 3) Roberts, L. D. *et al.*: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **871**, 174 (2008).
- 4) Cajka, T. *et al.*: *Trends Anal. Chem.*, **61**, 192 (2014).
- 5) Han, X. *et al.*: *Mass. Spectrom. Rev.*, **24**, 367 (2005).
- 6) Heiskanen, L. A. *et al.*: *Anal. Chem.*, **85**, 8757 (2013).
- 7) Hopfgartner, G. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **647**, 51 (1993).
- 8) Yamada, T. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1292**, 211 (2013).
- 9) Tsugawa, H. *et al.*: *Nat. Methods*, **12**, 523 (2015).
- 10) Uran, S. *et al.*: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **758**, 265 (2001).
- 11) Pang, L. Q. *et al.*: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **869**, 118 (2008).
- 12) Zhao, Y. Y. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1218**, 5470 (2011).
- 13) Zhu, C. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1220**, 26 (2012).
- 14) Sonomura, K. *et al.*: *J. Sep. Sci.*, **38**, 2033 (2015).
- 15) Bowden, J. A. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **58**, 2275 (2017).
- 16) Klesper, E. *et al.*: *J. Org. Chem.*, **27**, 700 (1962).
- 17) Gere, D. R. *et al.*: *Anal. Chem.*, **54**, 736 (1982).
- 18) Gere, D. R.: *Science*, **222**, 253 (1983).
- 19) Nováková, L. A. *et al.*: *Anal. Chim. Acta*, **824**, 18 (2014).
- 20) Takeda, H. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **59**, 1283 (2018).
- 21) Tamura, S. *et al.*: *Eur. J. Pharmacol.*, **822**, 147 (2018).
- 22) Takeda, H. *et al.*: *J. Proteome Res.*, **19**, 1100 (2020).
- 23) Shiomi, M. *et al.*: *Atherosclerosis*, **284**, 18 (2019).
- 24) Kobori, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 1 (2018).
- 25) Obata, Y. *et al.*: *JCI Insight*, **3**, 1 (2018).
- 26) Nishida-Aoki, N. *et al.*: *Metabolites*, **10**, 67 (2020).