

平成 29 年 8 月 22 日

「超微細針（鍼灸針）」を用いた新規分析法を用いて マウス脳内の「直接・迅速メタボローム解析法」の構築に成功

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長：門松 健治）法医・生命倫理学の財津 桂（ざいつ けい）准教授、医療技術学専攻病態解析学の林 由美（はやし ゆみ）助教（いずれも名古屋大学高等研究院（院長：篠原 久典）教員を兼務）および株式会社島津製作所らの研究グループは、超微細針（鍼灸針）を用いた新規イオン化法である「探針エレクトロスプレーイオン化法（PESI）」と「タンデム質量分析（MS/MS）」を組み合わせた新規質量分析法「PESI/MS/MS」を用いて、マウス脳内の内因性代謝物（メタボライト）の直接分析に成功し、かつ、大脳内におけるメタボライトの局所解析を行うことに成功しました。

アミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類などの内因性代謝物（メタボライト）を網羅的に解析する手法である「メタボローム解析」は、近年、生命科学分野において広く活用されています。財津准教授、林助教、株式会社島津製作所らの研究チームは、2016 年に PESI/MS/MS による肝臓中メタボライトの直接分析法を開発しました。この分析法は、従来のメタボローム解析において必須であった抽出操作などの前処理操作を行うことなく、肝臓内のメタボライトを直接分析することが可能な手法です。

そこで、本研究では、この手法を脳試料の解析に拡張し、脳内メタボライトの直接分析法の構築を試みました。一般的に、脳は脂質類が豊富に存在し、それらの脂質類が分析時の妨害成分となることから、前処理操作が不可欠でした。しかし、PESI/MS/MS を脳試料に適用した結果、前処理操作を一切行うことなく、脳内メタボライトを直接かつ迅速に分析することに成功しました。さらに、本手法では先端直径が約 700 nm の超微細針（鍼灸針）を試料採取およびイオン化の機構に用いていることから、大脳皮質と海馬におけるメタボライトの局所分布の違いを捉えることにも成功しました。本手法の確立は、疾患等の病態解析に必須のツールとなりつつあるメタボローム解析の技術発展に大きく寄与するとともに、脳内の局所解析や脳内成分のマッピング（イメージング）技術への拡張が強く期待されます。また、今後は、脳疾患や認知症などの病態解析に本手法を応用することも望まれています。

なお、本研究成果は、名古屋大学研究強化促進事業 若手新分野創成研究ユニット（in vivo リアルタイム・オミクス研究室）の活動に基づくものであり、平成 29 年 6 月 30 日付で科学雑誌「Analytica Chimica Acta」オンライン版に掲載されました。

「超微細針（鍼灸針）」を用いた新規分析法を用いて マウス脳内の「直接・迅速メタボローム解析法」の構築に成功

ポイント

- 先端直径 700 nm の「超微細針（鍼灸針）」を用いた新規の分析法である
「PESI/MS/MS」を、マウス脳内の内因性代謝物（メタボライト）の分析に、世界で初めて応用
- マウスの脳試料を穿刺するだけで、簡便かつ迅速に脳内のメタボライトを直接、同定
- 先端直径 700 nm の超微細針を用いるため、大脳における皮質と海馬のプロファイルの差異を簡便に捉えることが可能であり、局所解析への応用も可能

1. 背景

近年、アミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類などの内因性代謝物（メタボライト）を網羅的に解析する手法である「メタボローム解析」は、生命科学分野において広く活用されています。その中でも、特に、大きな社会問題となっている脳疾患や認知症などの病態解析において、メタボローム解析を用いた研究例が多数報告されています。一般にメタボローム解析を行う際には、メタボライトなどの抽出操作といった前処理操作を行い、その後、質量分析計などの機器分析法を用いてメタボライトのプロファイリングを行います。中でも脳を分析試料とした場合、脳内には脂質類が豊富に存在し、それらの脂質類は、分析時の妨害成分となることから、前処理操作が不可欠でした。しかしながら、前処理操作には多大な時間を要し、結果にバイアスをもたらす可能性があるなどの問題点も多く残されています。また、脳試料の解析では、メタボライトの脳内局所分布も重要な意味を持つことから、メタボライトの局所解析を簡便かつダイレクトに行う手法の開発が求められていました。

2. 研究成果

本研究では、超微細針（鍼灸針）を用いた新規イオン化法である「探針エレクトロスプレーイオン化法（PESI）」と「タンデム質量分析（MS/MS）」を組み合わせた新規質量分析法「PESI/MS/MS」（図 1）を用いて、前処理操作を行うことなく、脳内のメタボライトの直接分析を試みました。その結果、前処理操作を一切行うことなく、脳内メタボライトを直接かつ迅速（1 分析当たり 0.2 分）に分析することに成功しました。大脳内でエネルギー代謝を低下させる薬剤（AM-2201）を投与したマウスと、コントロールマウスの大脳皮質内のメタボライトを PESI/MS/MS で分析し、得られた結果について多変量解析（PLS-DA）を行った結果が図 2 です。多変量解析の結果、図 2 左に示すように投与群とコントロール群は良好に分離したことから、メタボロームのプロファイルが両群で異なることが視覚的にわかります。また、図 2 右に示すローディングプロットでは、2 群間での差が大きく異なる成分をピックアップすることが出来ますが、解析結果から、グルタミン酸、コハク酸などの成分が 2 群間で大きく異なることがわかりました。これらのメタボライトは、既報において変動することが明らかとなっている成分であり、PESI/MS/MS が前処理操作を一切行うことなく、既存のメタボローム解析法と同等の結果を得ることが可能であることを

示しています。

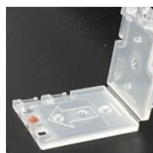
さらに、本手法では先端直径が 700 nm の超微細針（鍼灸針）（図 1 参照）を試料採取およびイオン化の機構に用いていることから、非常に微細な局所の分布解析に応用できる可能性があります。そこで、大脳皮質と海馬におけるメタボライトの分析を PESI/MS/MS で行いました。その結果、図 3 に示すように、本手法を用いることで前処理操作を行わずに、大脳皮質と海馬のメタボライトの局所分布差を直接捉えることにも成功しました。

以上の結果、新規質量分析法である PESI/MS/MS を用いれば、脂質含有率の高い脳試料であっても、煩雑な前処理操作を行うことなく、極めて簡便かつ迅速に、脳内メタボライトの直接検出が可能であることが示されました。さらに、本手法で用いている超微細針（鍼灸針）の特性を最大限に利用することで、脳内メタボライトの局所解析が可能であることも示されました。

3. 今後の展開

前述の通り、近年、脳疾患や認知症の研究にメタボローム解析が応用されるケースが増加しています。本手法は脳を対象としたメタボローム解析の技術発展に大きく寄与すると同時に、脳内メタボライトの局所解析、ひいては、脳内成分のマッピング（イメージング）技術への拡張が強く期待されています。また、脳疾患や認知症などの病態解析に本手法を応用することも望まれます。さらに、今後、超微細針の低侵襲性（臓器などへの障害が少ないこと）を利用し、“生きたマウス”の脳内メタボライトの「リアルタイム分析」へ拡張することを目標としています。

超微細針（鍼灸針）
（直径 700 nm）



サンプルプレート

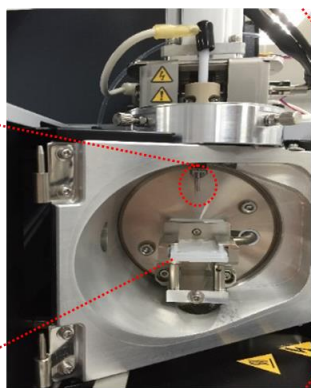


図 1 PESI/MS/MS システムの概略図

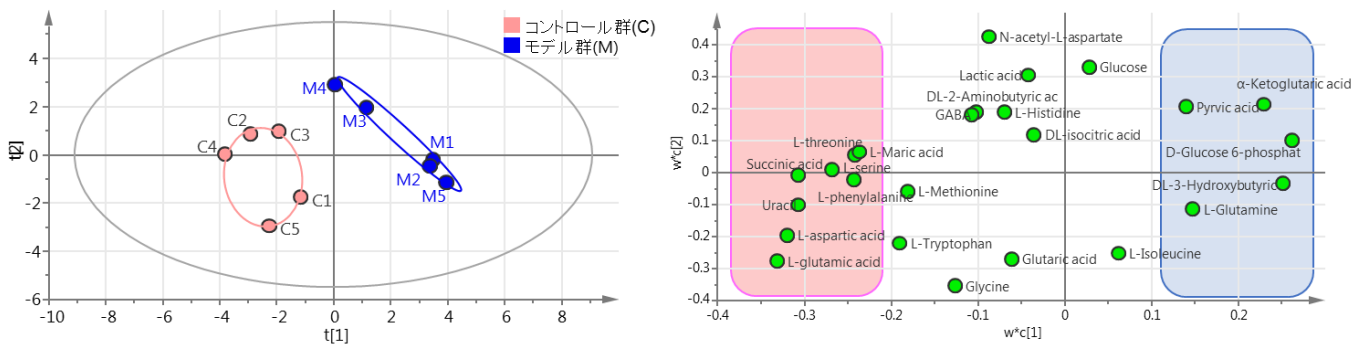


図 2 大脳皮質におけるコントロールマウスとモデルマウスの分析結果

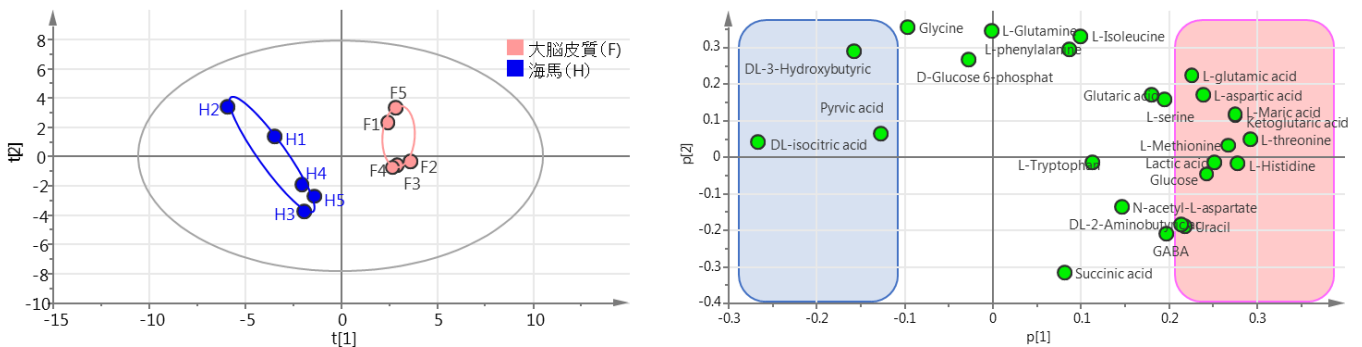


図 3 大脳皮質と海馬の局所分析の結果

4. 用語説明

メタボライト：アミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類等の内因性代謝物を指す。各メタボライトは、機能的なネットワークを形成して相互作用することから、メタボライトを網羅的に解析する手法（メタボローム解析）の進展が著しく、バイオマーカーの探索や生体の機能解明に関わる研究等に応用されている。

メタボローム解析：メタボライトを網羅的に解析する手法を指す。生体試料からメタボライトの抽出や濃縮等の前処理を行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析やガスクロマトグラフィータンデム質量分析、液体クロマトグラフィータンデム質量分析等を用いて解析を行うのが一般的である。

PESI：探針エレクトロスプレーイオン化法（Probe Electrospray Ionization）は、2007年に山梨大学の平岡賢三 教授が開発した新規イオン化法であり、鍼灸針（先端直径 700 nm）を用いて試料の採取とイオン化を行うことが可能である。超微細針（鍼灸針）を使用することから、高い空間分解能を達成することが出来るため、本研究成果が示したように局所解析への応用が可能である。

タンデム質量分析 (MS/MS) : 対象成分をイオン化し、電場等と利用して対象成分を質量依存的に分離する分析法のうち、質量分離部に四重極型と呼ばれる質量分離装置を 3 つ直列に接続したものを指す。MS/MS により二段階の質量分離が可能となるため、イオン化した対象成分の特異的な検出が可能である。

PESI/MS/MS : 新規イオン化法である PESI と化合物の同定能力の高いタンデム質量分析 (MS/MS) を組み合わせることで、前処理操作が不要かつ対象成分をそのままの状態 (インタクト) で分析することが可能である。2016 年に当研究グループが PESI/MS/MS を用いたメタボライトの直接分析法を世界で初めて報告し、さらに生きたマウスの肝臓中メタボライトのリアルタイム・モニタリングにも成功している。

多変量解析 : 複数の変数からなる多変量データを統計的に解析する手法のことで、主成分分析等が知られている。本研究で用いた PLS-判別分析 (PLS-DA) は、得られたメタボローム・データによってプロファイルが記述される各マウスについて、群情報を与えたうえで最も群分離を達成出来るような二次元空間に各マウスを落とし込むことで、プロファイルの群間差を視覚的に描写することが可能な手法である。

5. 発表雑誌

Intact metabolite profiling of mouse brain by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its potential use for local distribution analysis of the brain

Yumi Hayashi, Kei Zaitso, Tasuku Murata, Tomomi Ohara, Stéphane Moreau, Maiko Kusano, Hiroshi Tanihata, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii, Tetsuya Ishikawa
Analytica Chimica Acta (2017 年 6 月 30 日付けの電子版に掲載)

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.047>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Analytica_C_20170822en.pdf