



Title	メタボロミクス研究に資するシリカモノリス担体を用いた新規サンプリングおよび気相-固相誘導体化法の開発
Author(s)	河村, 和広
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101620
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

メタボロミクス研究に資するシリカモノリス担体を用いた新規サンプリングおよび
気相-固相誘導体化法の開発

河 村 和 広

2024年12月

大阪大学大学院工学研究科

目次

用語集	4
第 1 章 緒論	5
1.1 メタボロミクスとは	5
1.2 メタボロミクスで使用される測定技術	6
1.3 GC-MS による代謝物プロファイリングにおける代謝物の抽出と誘導体化	8
1.4 シリカモノリス担体を用いた気相-固相誘導体化法の開発	10
1.5 本博士論文の構成	12
第 2 章 シリカモノリス担体を用いた気相-固相誘導体化法の開発とイオン性高極性代謝物への適応	14
2.1 緒言	14
2.2 実験材料と実験方法	15
2.2.1 試薬	15
2.2.2 サンプル前処理	15
2.2.3 気相-固相誘導体化 (Gas-solid phase derivatization; GSPD)	16
2.2.4 加熱脱着 (TD)-GC/MS 分析	16
2.2.5 溶液中での誘導体化と GC/MS 分析	17
2.3 結果と考察	18
2.3.1 GSPD のワークフロー構築	18
2.3.2 GSPD の多価有機酸分析への適応	20
2.3.3 GSPD の糖リン酸分析への適応	32
2.3.4 実試料の分析と従来法との比較	41
2.3.5 小括	44
第 3 章 シリカモノリス担体を用いたサンプル保管における代謝物安定性向上の検討	45

3.1 緒言	45
3.2 実験材料と実験方法	46
3.2.1 試薬	46
3.2.2 サンプル準備	46
3.2.3 気相-固相誘導体化 (GSPD) による誘導体化	47
3.2.4 加熱脱着 (TD) -GC/MS 分析	47
3.2.5 データ処理と統計解析	48
3.3 結果と考察	49
3.4 小括	55
第 4 章 総括と展望	57
4.1 本研究の総括	57
4.2 今後の展望	58
引用文献	60
学術論文	72
学会発表	73
出願特許	74
書籍等	75
謝辞	76
付録	78

用語集

NMR: Nuclear magnetic resonance, 核磁気共鳴

GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry, ガスクロマトグラフィー質量分析計

LC-MS: Liquid chromatography-mass spectrometer, 液体クロマトグラフィー質量分析計

CE-MS: Capillary electrophoresis-mass spectrometer, キャピラリー電気泳動質量分析計

TMS: Trimethylsilyl, トリメチルシリル

TMSD: Trimethylsilyldiazomethane, トリメチルシリルジアゾメタン

MSTFA: N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide

SPAD: Solid Phase Analytical Derivatization, 固相誘導体化

SPE: Solid Phase Extraction, 固相抽出

SPME: Solid Phase Micro Extraction, 固相マイクロ抽出

GSPD: Gas-Solid Phase Derivatization, 気相-固相誘導体化

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高速液体クロマトグラフィー

TD: Thermal Desorption, 加熱脱着

EI: Electron Ionization, 電子イオン化

CI: Chemical Ionization, 化学イオン化

NCI: Negative Chemical Ionization, 負化学イオン化

SIM: Selected Ion Monitoring, 選択イオンモニタリング

rt: Retention time, 保持時間

RI: Retention Index, 保持指標

TICC: Total Ion Current Chromatogram, 全イオン電流クロマトグラム

第1章 緒論

1.1 メタボロミクスとは

代謝物 (Metabolite; メタボライト) は, 生体内での代謝によって生成された化合物を指す. メタボローム (Metabolome) は生体内に含まれる代謝物の総体 (Metabolites + Ome) を意味し, メタボロミクス (Metabolomics) は代謝物を網羅的に解析する学術分野である. 生物の遺伝情報は, セントラルドグマの概念に従い, DNA→mRNA→タンパク質に順に伝達され, 代謝物はそのカスケードの最終生成物である. メタボロミクスは, ゲノム情報の実行の結果である代謝物を扱うオミクスであることから, 他のオミクスであるゲノミクス, トランスクリプトーム, プロテオームと比べて, 表現型に近い情報を得ることができる. この特徴を活かして, メタボロミクスは疾患のメカニズム解明やバイオマーカー探索, 食品の品質評価・改善などに活用される(1-3).

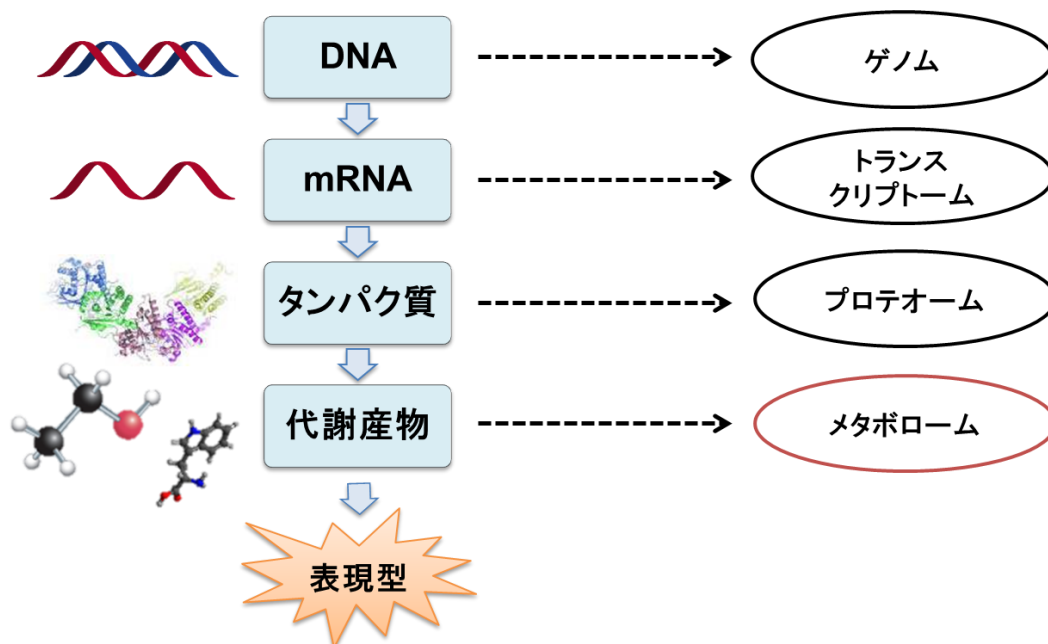


図 1-1 メタボロミクスの概念

1.2 メタボロミクスで使用される測定技術

代謝物は、糖、有機酸、アミノ酸、核酸、脂質、二次代謝物など多様な物理化学的性質を持つ化合物を含んでおり、これらすべてを一斉分析することは難しい(4-6)。メタボロミクスでは、核磁気共鳴装置(NMR)、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)などの分析装置が主に用いられる。NMR は、古くからメタボロミクスに用いられてきた分析装置である(7-9)。ダイナミックレンジが広く、非接触分析であるためキャリーオーバー問題が殆どないという利点を有する一方で、他の分析装置と比べて感度が低く mM レベルでの代謝物の測定が困難であり、また多くのサンプル量が必要であることが欠点である(10-12)。NMR 以外では、網羅性と検出感度からクロマトグラフと質量分析計を組み合わせた分析装置がよく用いられる(10,12,13)。GC-MS は、クロマトグラフィーでのピークキャパシティが大きく、リテンションタイムが安定しているため、多変量解析のためにデータ行列を作成するメタボロミクスにおいて利点である(14-18)。また、イオン化に電子イオン化(Electron Ionization; EI)法を使用できるため、イオン化のサプレッションの心配が少なく、代謝物の同定にマススペクトルライブラリを使用することができる(4,18-20)。このような利点から、GC-MS は代謝物プロファイリングの分析手法としてゴールドスタンダードとして確立されている(21,22)。一方で、GC-MS では、揮発性があり熱的に安定な化合物が分析対象になる。そのため、不揮発性の低分子親水性代謝物においては、誘導体化の工程が必要である(5,18,19,23)。LC-MS は、誘導体化せずに不揮発性の代謝物を分析することができる(5,13)。汎用的に使用される逆相モードによる分離では、主に疎水性代謝物が対象となるが、イオンペア法、誘導体化、親水性相互作用(Hydrophilic interaction liquid chromatography; HILIC)モードなどにより極性代謝物の測定技術の研究開発が行われてきた(4,24-27)。イオン化は、代表的なソフトイオン化であるエレクトロスプレーイオン化(ESI; Electrospray Ionization)法や大気圧イオン化(APCI; Atmospheric Pressure Chemical Ionization)法などが採用

され、化合物の分子イオンを得ることが可能である(4,13). 一方で、マトリックスと共溶出した際にイオン化のサプレッションあるいは、エンハンスメントを受けやすい点に注意する必要がある(28,29). CE-MS は、水溶性かつイオン性の代謝物を高分離で一斉分析することができる(30–32). みかけの容積とチャージによって分離するため、異性体の分離が一般的に困難である(30,33). また、サンプルの導入量は数 nL 程度と他の分析装置と比較して増やすことは難しい点が課題である(30–32).

表 1 メタボロミクスで用いられる主な分析装置

	Pros	Cons
NMR	<ul style="list-style-type: none"> • サンプルの前処理が簡便 • 非破壊分析である • 定量性が高い • 再現性が高い 	<ul style="list-style-type: none"> • 感度が低い • 多くのサンプル量が必要
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • 保持時間が一定である • イオン化のサプレッションがない • 代謝物の同定に豊富なライブラリやデータベースが利用できる 	<ul style="list-style-type: none"> • 不揮発性代謝物は誘導体化が必要 • 代謝物の熱分解に注意が必要
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • 測定できる化合物のカバレッジが広い • 通常は誘導体化が不要 	<ul style="list-style-type: none"> • 代謝物の物性により、メソッドを分ける必要がある • イオンサプレッションを受けやすい
CE-MS	<ul style="list-style-type: none"> • イオン性代謝物に対して、高 	<ul style="list-style-type: none"> • 注入量に制限がある

	い分離性能を誇る	・異性体分離が困難
--	----------	-----------

1.3 GC-MS による代謝物プロファイリングにおける代謝物の抽出と誘導体化

GC-MS を用いた不揮発性代謝物のプロファイリングでは、サンプルから代謝物を抽出する工程と代謝物を誘導体化する工程が必要である。代謝物の抽出は主に溶媒抽出が用いられ、Bligh&Dyer 法ではクロロホルム層に脂溶性成分が、水層に親水性代謝物が抽出される(34,35)。他の分析装置の場合も同様だが、サンプル中の酵素による代謝物の変動を抑えるため、代謝物の抽出はサンプル採取後できるだけ早く行われるか、適切な条件で保管されることが望ましい(36,37)。しかし、その保管や輸送の環境は設備により制限されることが多い(38)。誘導体化は、GC-MS 分析における不揮発性代謝物の揮発性を高めるために行われる(39,40)。メタボロミクスでの誘導体化は、メトキシム化とトリメチルシリル (TMS) 化の組み合わせが化合物クラスを包括的にカバーしているため、メタボロミクスにおいて最も一般的に使用される(図 1-2)(41)。しかし、TMS 試薬は加水分解しやすいため、凍結乾燥機でサンプルを十分に脱水する必要がある、時間と手間を要する(23,42)。

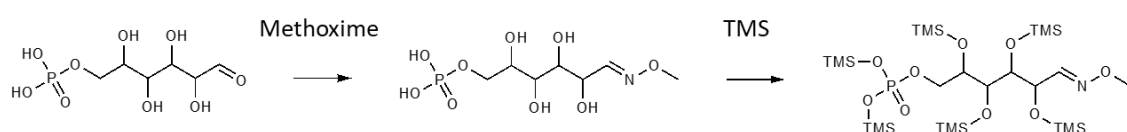


図 1-2 メトキシム化と TMS 化

GC-MS を用いたメタボロミクスにおけるサンプル前処理と誘導体を改善する研究がいくつか行われてきた。固相誘導体化(Solid-Phase Analytical Derivatization; SPAD)は、固相抽出(Solid-Phase Extraction; SPE)と誘導体化を組み合わせた手法である(図 1-3)。代謝物を固相に保持させた状態で、固相カートリッジに誘導体化試薬を流し、固相中で誘導体化を行う。その後、誘導体化物を固相から溶出させ、測定に供する。

SPAD を陰イオンおよび陽イオンのイオン性代謝物に適応するため、陰イオンおよび陽イオン交換樹脂とメキシム化および TMS 化による誘導体化を組み合わせた有機酸およびアミノ酸の分析法が開発され、ヒト血漿、便、みりんなどに適応された(42–44). しかし、SPAD は分析対象物、マトリックス、固相担体、溶媒間の複雑な相互作用を考慮してメソッド開発を行う必要がある。固相マイクロ抽出(Solid Phase Micro Extraction; SPME)を用いたオンファイバー誘導体化も、メタボロミクスへの応用が期待されるアプローチである(図 1-4)(45–47). 不揮発性化合物の抽出は、SPME ファイバーをサンプル溶液に直接浸漬して行い、その後、誘導体化試薬を入れたバイアルのヘッドスペース部にファイバーを挿入し、ファイバー上で化合物を誘導体化する。しかし、抽出時にファイバーが試料溶液に浸漬するため、多量の試料(数 100 μL ~1 mL 以上)が必要となり、生体試料のような微量試料への適応に課題がある。また、ファイバーへの分析対象物の捕集は、サンプル溶液とファイバーの吸着剤との平衡に基づくため、抽出効率に限界があり、さらに抽出に時間がかかる。また、抽出の選択性により、様々な化学的性質を持つ代謝物のプロファイリングに適応することが困難である。

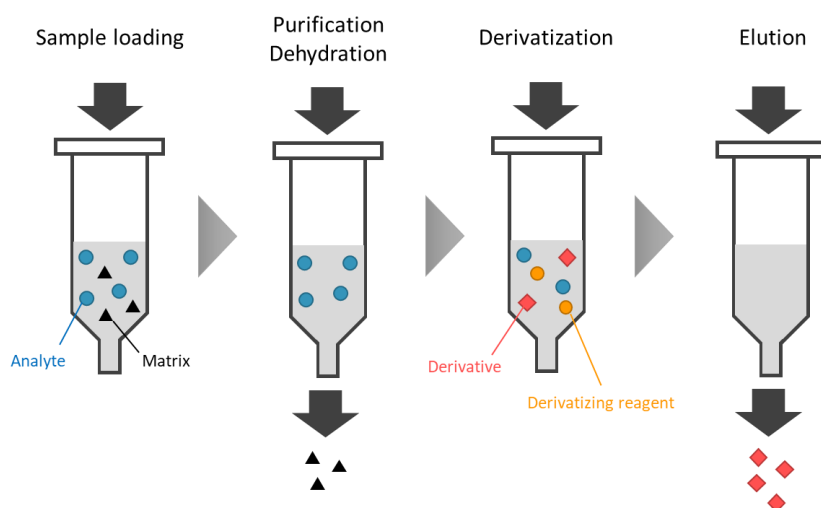


図 1-3 Solid Phase Analytical Derivatization の概略図

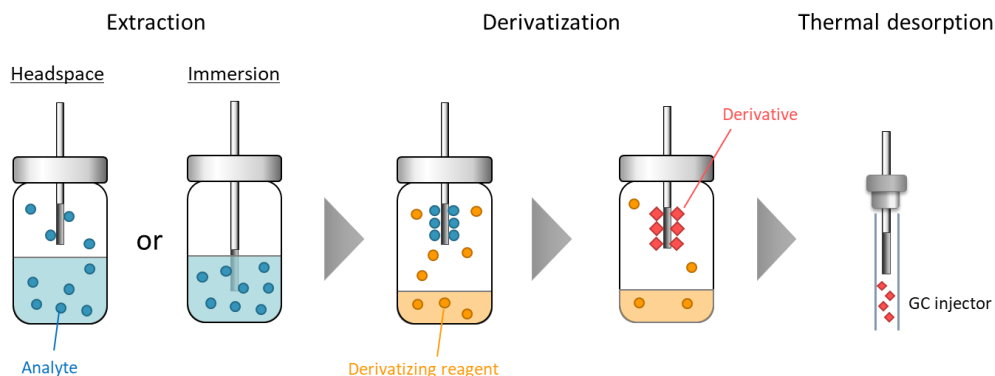


図 1-4 SPME オンファイバー誘導体化の概略図

1.4 シリカモノリス担体を用いた気相-固相誘導体化法の開発

これまで述べてきたように GC-MS ベースのメタボロミクスはよく確立された手法である。しかし、メタボロミクスが広い分野で適応されるようになるにつれ、現場で簡便かつ迅速にサンプリングできる手法が求められるようになってきている。また、前処理および誘導体化の作業工程は依然としてメタボロミクス研究の律速となっている。先に述べた手法は、現場でサンプリングできるものではなく、また誘導体化も対象化合物の選択性があることがメタボロームプロファイリングにおいて課題になる。そこで、本研究では、これら課題を解決する新たなサンプリングおよび誘導体化法の開発を目的とした。ここでは、GC-MS によるメタボロミクスのサンプリングと誘導体化を行うための担体として、シリカモノリスに着目した。シリカモノリスは、二酸化ケイ素から合成された多孔質の無機化合物であり、マイクロメートルサイズの三次元網目状細孔であるマクロ孔とナノメートルサイズの細孔であるメソ孔からなり、広い表面積を有している(図 1-5)。シリカモノリスは、相分離を伴うゾル-ゲル法とスピノーダル分解の組み合わせにより調製され、マクロ孔とメソ孔の量および大きさはそれぞれ独立にコントロールすることが可能である(48)。シリカモノリスはその特徴を活かして、分析化学においては HPLC 用カラム、抽出精製カラム、揮発性化合物の捕集材、フィルターなどに用いられる(49–54)。

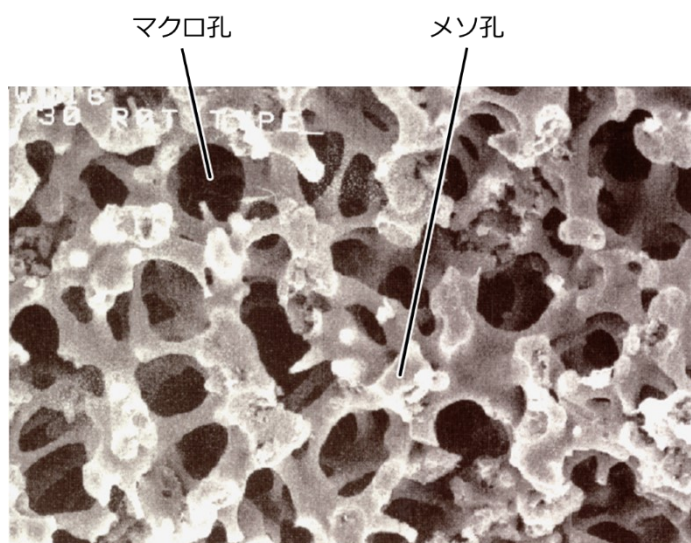
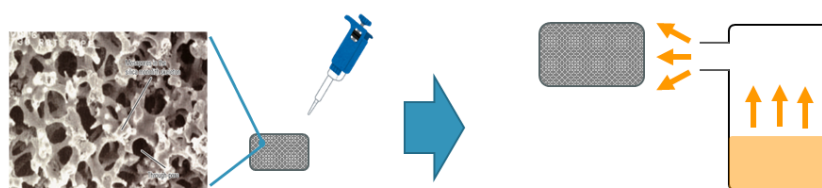


図 1-5 シリカモノリスの構造

本研究のアイデアは、多孔質シリカモノリス担体上に代謝物を保持させ、気相の誘導体化試薬を用いて誘導体化することである(図 1-6). シリカモノリスは高い気孔率を持つことから、不活性ガスでパージすることでサンプルを簡便に乾燥することができ、また気相の誘導体化試薬をシリカモノリス担体中に拡散させて誘導体化することができる. 誘導体化反応は溶媒の影響を受けず、過剰な誘導体化試薬やクロマトグラフィーに影響を与える副生成物は、不活性ガスでパージすることで除去できる. また、サンプルを担体に直接アプライするため、10 μL 以下の微量サンプルにも対応できる. さらに、サンプルは乾燥後、担体ごと輸送および保管することができる. この新しく開発した誘導体化法を気相-固相誘導体化法 (Gas-Solid Phase Derivatization; GSPD) と名付けた.



Sample loading on silica monolith

Derivatization by vaped reagent

図 1-6 気相-固相誘導体化法 (GSPD) のコンセプト

担体に化合物を保持し、気相の反応試薬で化学反応を行う手法は有機合成や他の分析法で研究および開発されてきた。例えば、タンパク質をエドマン分解により N 末端側からアミノ酸を 1 残基ずつ切断して、タンパク質の一次構造を決めるプロテインシーケンサーにおいて、従来の液相式に変わって気相式が開発された(55)。気相式では、ガラスフィルタやポリフッ化ビニリデン (PolyVinylidene DiFluoride; PDVF) 膜にタンパク質を固定化した後、気相でフェニルイソチオシアネートを反応させ得られた N-フェニルチオカルバモイル誘導体化をトリフルオロ酢酸を気相状態で供給してエドマン分解を行い切断された N 末端アミノ酸由来のフェニルチオヒダントイン誘導体を、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) でアミノ酸の検出を行う。気相式では、過剰試薬や副生成物を除去することができるとともに有機溶媒によるタンパク質やアミノ酸の流出が抑えられるため、液相式と比べて微量のタンパク質にも適応することができるようになり、プロテインシーケンサーの普及に貢献した(56)。

1.5 本博士論文の構成

本研究の流れは、まず第 2 章において、GSPD の実現性検討として、解糖系やトリカルボン酸 (Tricarboxylic acid; TCA) サイクルなどの代謝経路の中間体である多価有機酸と糖リン酸をターゲットとしてこれらを測定するワークフローの開発と実試料への適

応を試みた．次に第 3 章において，シリカモノリスに代謝物を保持させた状態で乾燥させることで，代謝物の安定性を高められると期待し，高い温度で保管した際の安定性の評価を行うことを目的とした．第 4 章では，本研究で得られた知見を総括し，今後の展望を考察した．

第2章 シリカモノリス担体を用いた気相-固相誘導体化法の開発とイオン性高極性代謝物への適応

2.1 緒言

第1章で述べた通り、本博士研究では、GC-MSを基盤としたメタボロミクスのための新たなサンプリングおよび誘導体化法として、シリカモノリス担体と気相の誘導体化試薬を用いた気相-固相誘導体化法(GSPD)の開発を行うことを目的とした。

本章では、GSPDの実現性検討として、特にメタボロミクスで重要になる中心代謝経路であるトリカルボン酸(TCA)サイクルおよび解糖系の中間代謝物である多価有機酸および糖リン酸について、測定ワークフローを構築し、誘導体化試薬、反応条件、分析条件を検討した。解糖系やTCAサイクルは中心炭素代謝経路であり、これらの代謝物はメタボロミクスにおいて重要な測定対象である。構築したGSPDワークフローを用いて、生体試料であるヒト血漿と植物試料であるトマト果肉を分析し、実試料への適応性を確認した。

多価有機酸や糖リン酸は、困難な分析ターゲット群である。LC-MSにおいて、逆相(RP)カラムではこれらのイオン性極性代謝物は保持されにくい。この課題を克服するため、イオンペア試薬を移動相に添加して保持とピーク形状の改善がなされた(26,57)。しかし、イオンペア試薬はMSのイオンサプレッションを引き起こし、システム内に残留するため、他の分析法との共存が困難である(58,59)。また、カルボキシル基やリン酸基は、LCラインの金属部に吸着しやすいため性質があるため、ピーク形状の悪化や感度不良、キャリーオーバーなどの原因となる。カラムへの保持やMS感度の向上やラインへの吸着低減を目的として、代謝物を誘導体化してLC-MS測定する報告もなされている(58-62)。GC-MSでは、メタボロミクスで頻用されるTMS化は、カルボキシル基やリン酸基への反応効率はヒドロキシ基と比較して低いことが知られている。他の誘導体化法の選択肢として、多価有機酸では、メチルギ酸メチル(Methyl chloroformate; MCF)を用いたメチル化の手法が開発された(23,63-65)。しかし、MCFは催涙性がある

り、加熱によりホスゲンや塩化水素を生じるため、取り扱いに注意が必要である。糖リン酸では、*o*-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)オキシム (*o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) oxime; PFBO) 化と TMS 化を組み合わせ、負化学イオン化法 (Negative Chemical Ionization; NCI)-GC-MS により高選択的かつ高感度に測定した分析法が報告されている(66)。

2.2 実験材料と実験方法

2.2.1 試薬

2-オキソグルタル酸、アジピン酸、クエン酸、フマル酸、グルタル酸、リンゴ酸、ピルビン酸、コハク酸は東京化成工業株式会社(東京, 日本)から購入した。cis-アコニット酸、イソクエン酸はナカライテスク株式会社(京都, 日本)から購入した。無水酢酸、塩酸、メタノール、ピリジン(脱水)、トリメチルシリルジアゾメタン (Trimethylsilyldiazomethane; TMSD) (ヘキサン中 10%(w/w))は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪, 日本)から購入した。フルクトース-6 リン酸(F6P)、グルコース-6 リン酸(G6P)、マンノース-6 リン酸(M6P)、リボース-5 リン酸(R5P)、リブロース-5 リン酸(Ru5P)、メトキシアミン塩酸塩はメルク(ダルムシュタット, ドイツ)から購入した。N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide; MSTFA)、MonoTrap RSC18 TD はジーエルサイエンス株式会社(東京, 日本)から購入した。ヒトプール血漿はコスモ・バイオ株式会社(東京, 日本)から購入し、使用するまで-80°Cで保存した。

2.2.2 サンプル前処理

ヒトプール血漿は凍結融解し、そのまま GSPD による測定に用いた。トマト果肉は凍結乾燥後、溶媒で抽出した後、GSPD による測定に用いた。具体的には、10 mg の凍結乾燥したトマト果肉に 1 mL の混合溶媒(メタノール/水/クロロホルム = 5/2/2, v/v/v)

を加え、加熱振とう器で 37°C, 1,200 rpm で 30 分間インキュベートした。続いて、16,000 × g, 4°C で 3 分間遠心し、上清を回収し、GSPD に使用した。

2.2.3 気相-固相誘導体化 (Gas-solid phase derivatization; GSPD)

メタノール中 100 mM 塩酸溶液 10 µL とサンプル溶液 10 µL を MonoTrap にアプライした。窒素ガスで MonoTrap をパージすることにより、余分な溶媒を除去した。メチル化では、TMSD 200 µL とメタノール 200 µL を 2 mL クリンプバイアルに加えた。MonoTrap をワイヤーでバイアルに引っ掛けてバイアルのヘッドスペースに吊るし、クリンプキャップで密封した。バイアルを 40°C で加熱してメチル化を行った。アセチル化では、2 mL クリンプバイアルの内部をアルゴンガスで置換し、無水酢酸 200 µL とピリジン 200 µL を加えた。バイアルを 80°C で加熱してアセチル化を行った。誘導体化後は、マルチモード GC 注入口を用い、60°C で 5 分間、200 mL/min でパージした。

2.2.4 加熱脱着 (TD)-GC/MS 分析

GC-MS 分析は、マルチモード GC 注入口 OPTIC-4 (GL Science B.V., エイントホーフェン, オランダ), 自動ライナー交換モジュール LINEX-2 (GL Science B.V.), 多機能オートサンプラ AOC-6000 (株式会社島津製作所, 京都, 日本) を搭載したガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8050 NX (株式会社島津製作所) を用いて、TD-GC/MS 法で測定を行った。多価有機酸では、MonoTrap は OPTIC-4 の注入口温度を 50°C から 240°C まで 5°C/sec で昇温して加熱脱着した。GC 分析は、InertCap 225 カラム (30 m x 0.25 mm i.d., df= 0.25 µm) (ジーエルサイエンス株式会社) を用い、キャリアガスはヘリウム、スプリット比は 10:1, カラム流量は 1.0 mL/min とした。GC 温度プログラムは、50°C で 5 分間維持した後、10°C/min で 240°C まで昇温し、10 分間恒温した。糖リン酸では、50°C から 300°C まで 5°C/sec で昇温して加熱脱着した。GC 分析は、SH-I-1MS カラム (30 m x 0.25 mm i.d., df= 0.25 µm) (株式会社島津製作所) を用いた。GC 温度

プログラムは、80℃で2分間維持し、15℃/minで200℃まで昇温し、5℃/分で300℃まで昇温し、15℃/minで330℃まで昇温し、10分間恒温した。イオン化モードは、電子イオン化(EI)と化学イオン化(Chemical Ionization; CI)を用いた。EIはスキャン(多価有機酸: m/z 35-600, 糖リン酸: m/z 40-1,000)または、スキャン/選択イオンモニタリング(Selected Ion Monitoring; SIM)モードでデータ採取を行った。CIはイソブタンを試薬ガスとして用い、スキャンモード(m/z 80-1,000)でデータ採取を行った。

2.2.5 溶液中での誘導体化とGC/MS分析

溶液中での誘導体化は、以前の研究で報告されているメキシム化とTMS化で行った(67,68)。ヒト血漿中代謝物の抽出は、次の手順で行った。50 μL の血漿を250 μL の混合溶媒(メタノール/水/クロロホルム = 5/2/2, v/v/v)と混合した。この混合溶液を37℃, 1,200 rpmで30分間インキュベートした後、4℃, 16,000 \times gで3分間遠心分離した。上清200 μL を新しいチューブに集め、200 μL の超純水を加え、16,000 \times g, 3分間、4℃で遠心分離した。上清250 μL を新しいチューブに回収し、遠心エバポレータで25分間処理した後、凍結乾燥機で一晩乾燥させた。トマト果肉中代謝物の抽出は、次の手順で行った。10 mgの凍結乾燥トマトを1 mLの混合溶媒(メタノール/水/クロロホルム = 5/2/2, v/v/v)と混合した。この混合液を37℃, 1,200 rpmで30分間インキュベートした後、4℃, 16,000 \times gで3分間遠心分離した。上清600 μL を新しいチューブに回収し、300 μL の超純水を加えた後、16,000 \times g, 3分間、4℃で遠心分離した。上清200 μL を新しいチューブに回収し、遠心エバポレータで25分間処理した後、凍結乾燥機で一晩乾燥させた。誘導体化及び測定は、次の手順で行った。乾燥させたサンプルに、ピリジン中メキシアミン塩酸塩(20 mg/mL)100 μL を加え、攪拌後30℃で90分間インキュベートした。MSTFA50 μL を加え、攪拌後37℃で60分間インキュベートした。誘導体化溶液1 μL をDB-5カラム(30 m \times 0.25 mm i.d, df = 1 μm) (アジレント・テクノロジー, サンタクララ, 米国)にスプリットモード(1:10)で注入した。GC温度

プログラムは、100℃で 4 分間維持し、10℃/min で 320℃まで昇温し、11 分間維持した。イオン化モードは EI で、スキャン(m/z 45-600)/SIM モードでデータ採取を行った。

2.3 結果と考察

2.3.1 GSPD のワークフロー構築

開発した GSPD のワークフローを図 2-1 に示す。代謝物を保持し、気相の誘導体化試薬を効率よく拡散させる担体として、多孔質シリカモノリスが検討された。本研究では、揮発性有機化合物の捕集に用いられる MonoTrap をシリカモノリス担体として採用した(図 2-2)(49-51)。MonoTrap のシリカモノリスは、平均 3~10 μm のマクロ孔と平均 10 nm のメソ孔から構成されている。例えば、グルコースの大きさが 0.5 nm であることから、低分子代謝物やその誘導体化物はメソ孔に対して十分な大きさである。代謝物はシリカモノリス表面との分子間相互作用によってメソ孔表面に保持されと考えられる。MonoTrap は撥水性であるため、水サンプルは、先にメタノールを添加してからアプライした。MonoTrap には、表面修飾の異なる複数の種類があるが、予備実験でどのタイプでも大きな感度の違いはなかったため、誘導体化反応により影響を与えにくいと考えられる C18 結合タイプを本研究では選択した(付録 1)。

シリカモノリス担体からの誘導体化物の脱着は、加熱脱着または溶媒抽出によって行うことができると考えられた。加熱脱着は、不揮発性の試料マトリックスがシリカモノリス担体に残り、GC カラムに導入されない利点があることから採用された。サンプルを精製することなく、誘導体化と分析のために試料を直接シリカモノリス担体に適用することができた。

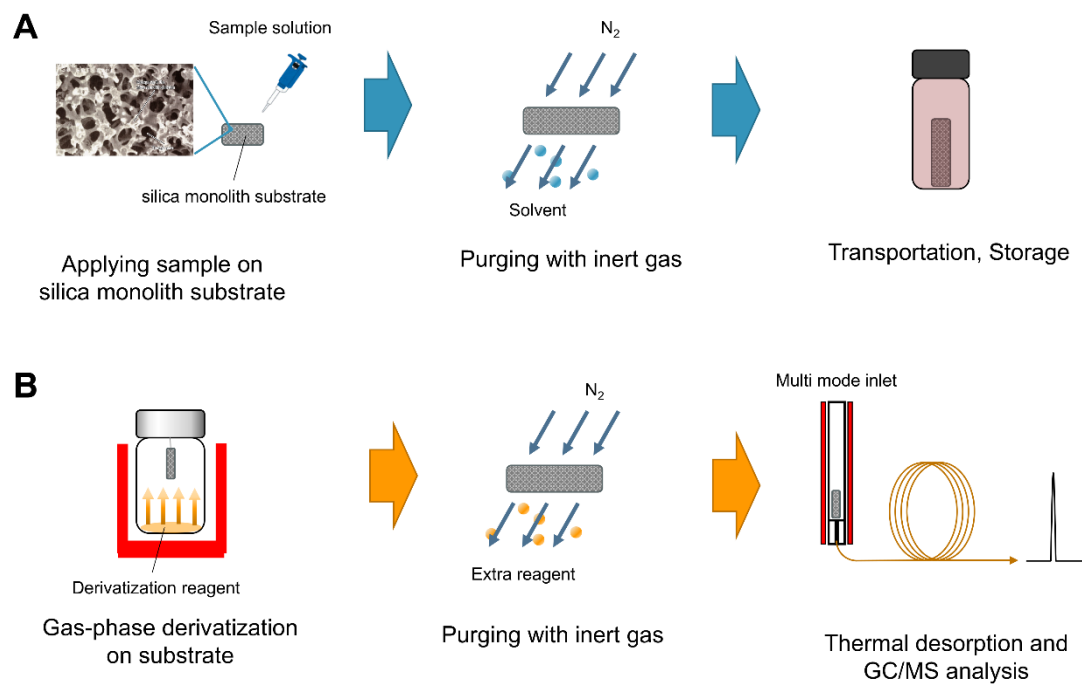


図 2-1 気相-固相誘導体化 (GSPD) のワークフロー

(A) シリカモノリス担体を用いたサンプリング (B) シリカモノリス担体上での誘導体化と加熱脱離 (TD)-GC/MS 分析



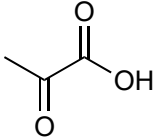
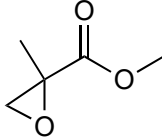
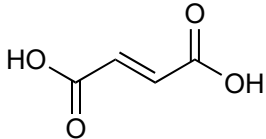
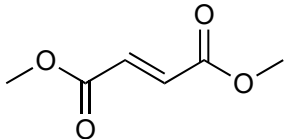
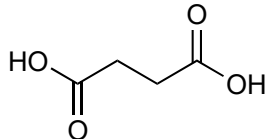
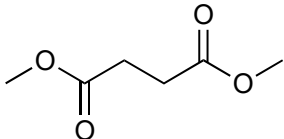
図 2-2 シリカモノリス担体 MonoTrap (RSC18 TD)

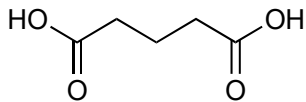
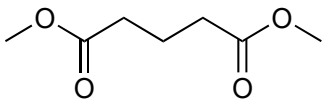
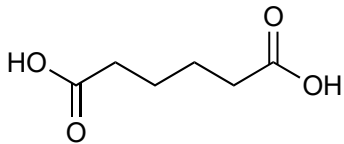
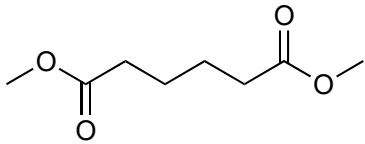
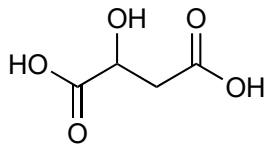
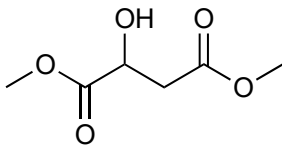
2.3.2 GSPD の多価有機酸分析への適応

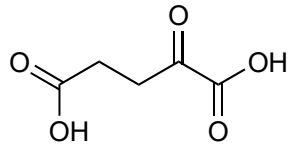
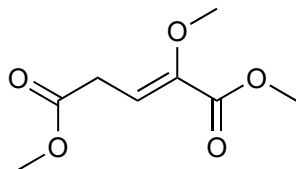
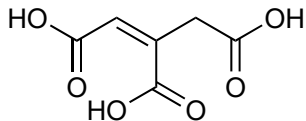
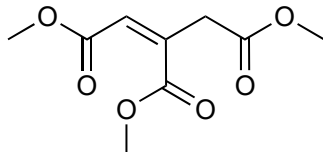
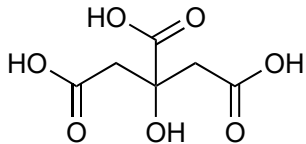
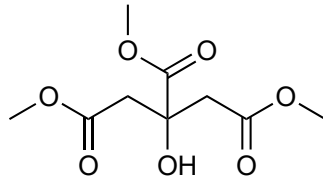
多価有機酸の分析において、カルボキシル基の極性が高いことが分析上の問題になる。メチル化はトリメチルシリル (TMS) 化よりも安定で湿気に強い(23,63–65)。さらに、メチル化は化合物由来のイオンが豊富なため、マススペクトルの解釈が容易である。一方で、TMS 化のマススペクトルでは、TMS 由来の m/z 73 がメインのイオンとして検出されることが多い(69)。トリメチルシリルジアゾメタン (TMSD) は、爆発性のあるジアゾメタンに変わって使用され、面倒な前処理を必要とせず、変異原性や爆発性のリスクが少なく、システムにダメージを与える副反応物を生じないため、カルボキシル基やリン酸基のメチルエステル化に用いられる市販のメチル化試薬である(58,70–74)。しかし、TMSD は疎水性であり、ヘキサン中で保存されているため、TMSD 溶液への溶解度が低いため、極性代謝物である多価有機酸への適応した報告はない。一方で、GSPD は溶媒を介さない誘導体化であるため、TMSD を用いた多価有機酸の誘導体化が可能である。また、長時間の脱水や濃縮の工程がないため、低沸点化合物の損失を防ぐことができる。

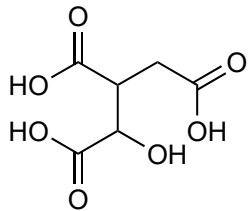
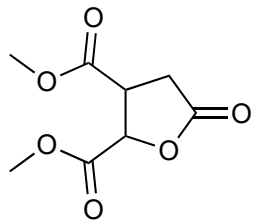
多価有機酸の誘導体化物の同定は、NIST 2023 マススペクトルライブラリを用いて行った。同定された誘導体化物の構造式、保持時間 (retention time; rt) および保持指標 (Retention Index; RI) を表 2-1 に、マススペクトルを図 2-2 に示す。本研究でターゲットとした化合物の中ではカルボキシル基のメチルエステル化以外の反応を起こした化合物もあった。2-オキソグルタル酸やピルビン酸などの 2-オキソ酸は、ケト体とエノール体で存在するが、これらの化合物は単一のピークとして検出された。誘導体化の際、エノールのカルボキシル基に加えてヒドロキシル基のメチル化が起こっていた。また、イソクエン酸については、カルボキシル基のメチルエステル化に加え、分子内縮合が確認された。

表 2-1 多価有機酸の誘導体化物と GC/MS 分析条件およびピーク面積再現性 (1 mM, $n=3$)

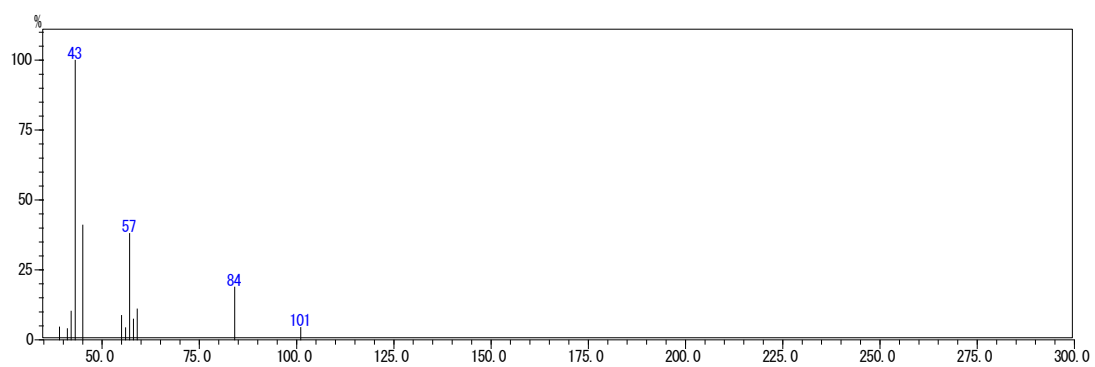
Compound	Derivative	rt (min)	RI	Target m/z	%RSD
Pyruvic acid 		10.18	1201	84	13.1
Fumaric acid 		12.85	1381	113	2.7
Succinic acid 		13.64	1441	115	2.4

Compound	Derivative	rt (min)	RI	Target <i>m/z</i>	%RSD
Glutaric acid 		15.17	1563	100	4.4
Adipic acid 		16.58	1692	114	4.5
Malic acid 		16.71	1702	103	9.2

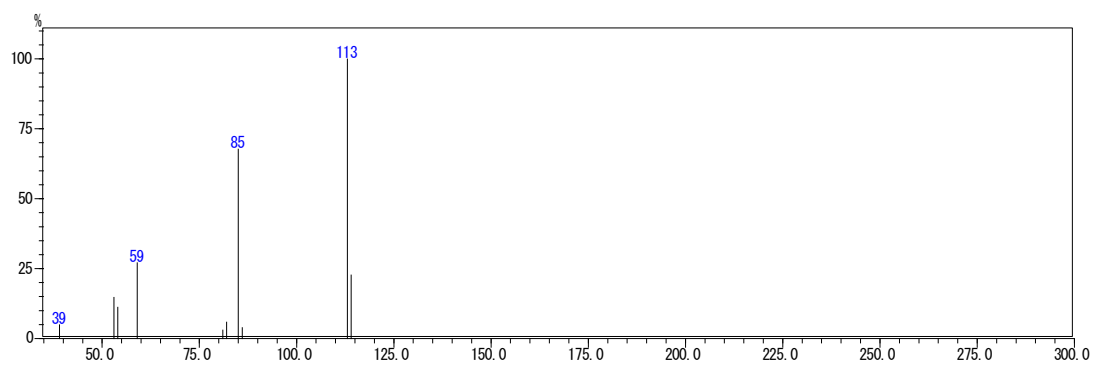
Compound	Derivative	rt (min)	RI	Target <i>m/z</i>	%RSD
2-Oxoglutaric acid 		19.11	1941	115	5.5
cis-Aconitic acid 		19.91	2030	153	5.9
Citric acid 		21.23	2175	175	9.0

Compound	Derivative	rt (min)	RI	Target <i>m/z</i>	%RSD
Isocitric acid 		24.20	2496	115	8.0

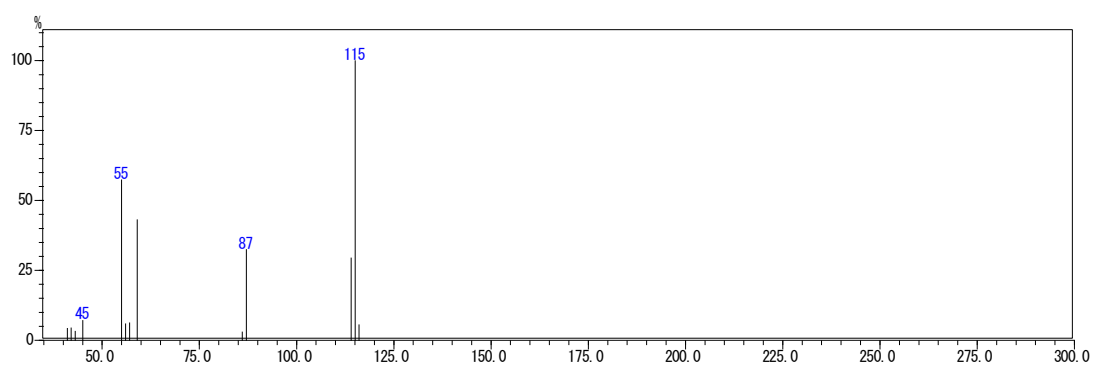
(A) Pyruvic acid



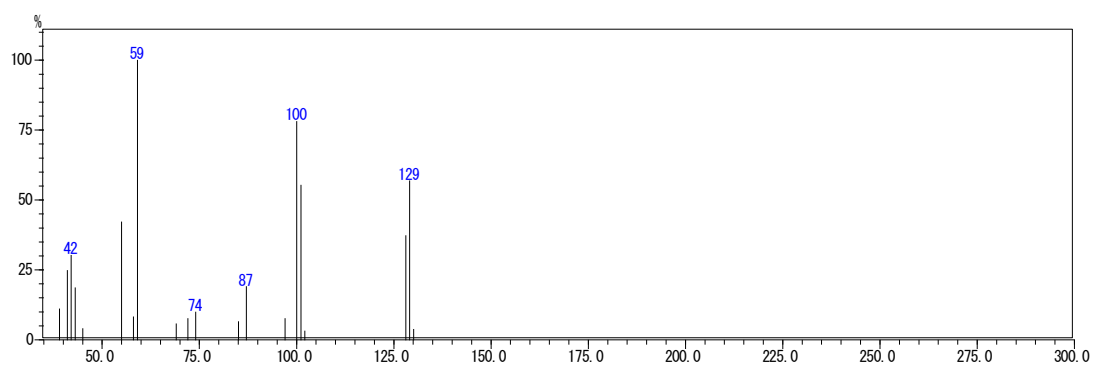
(B) Fumaric acid



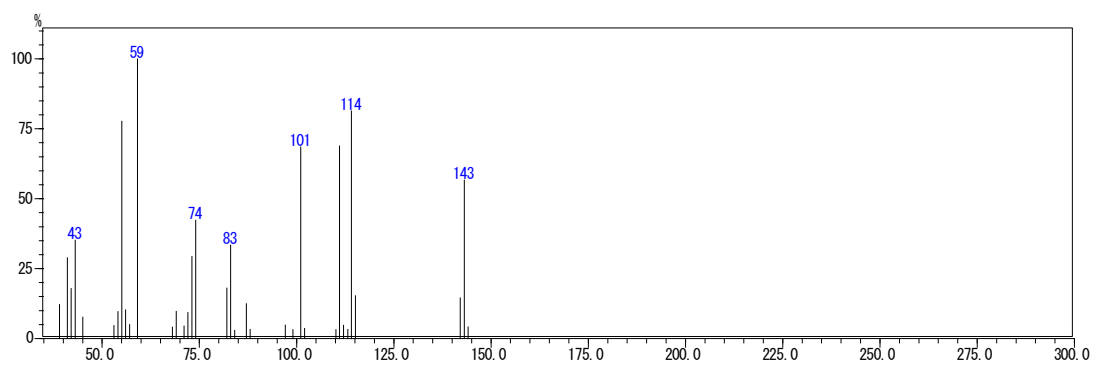
(C) Succinic acid



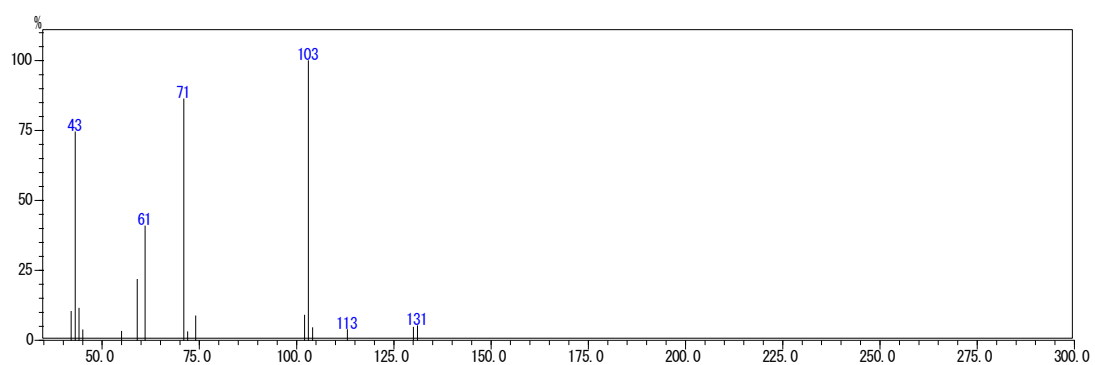
(E) Glutaric acid



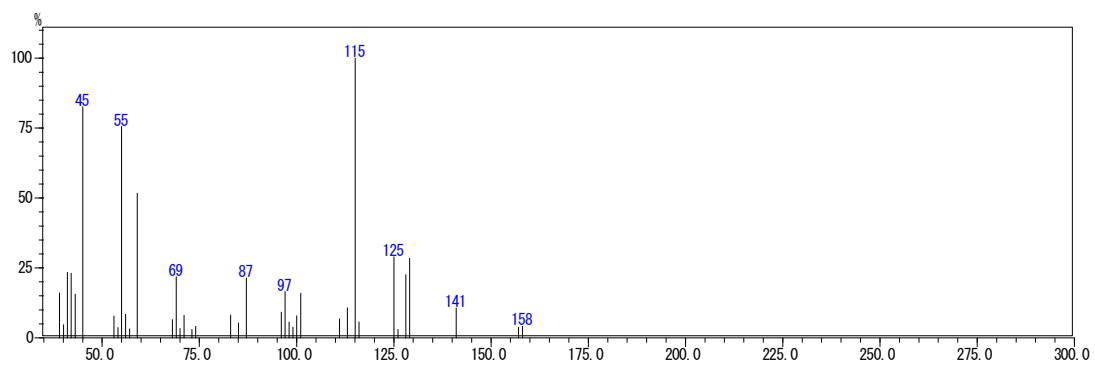
(F) Adipic acid



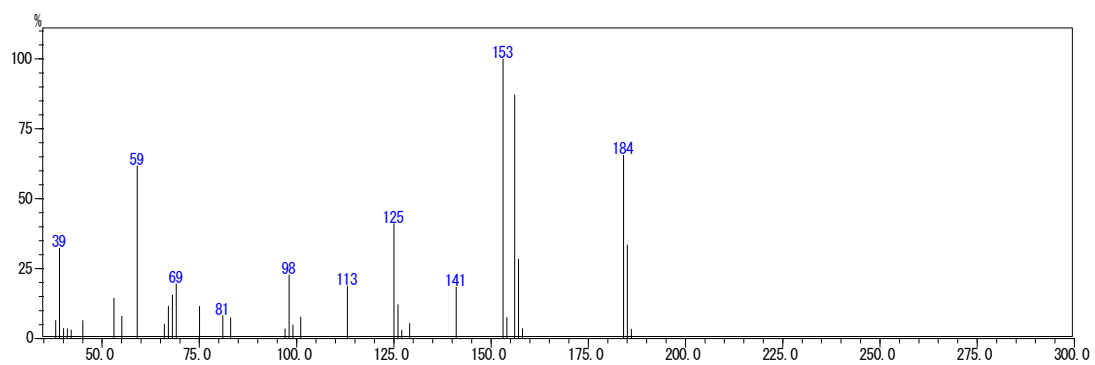
(G) Malic acid



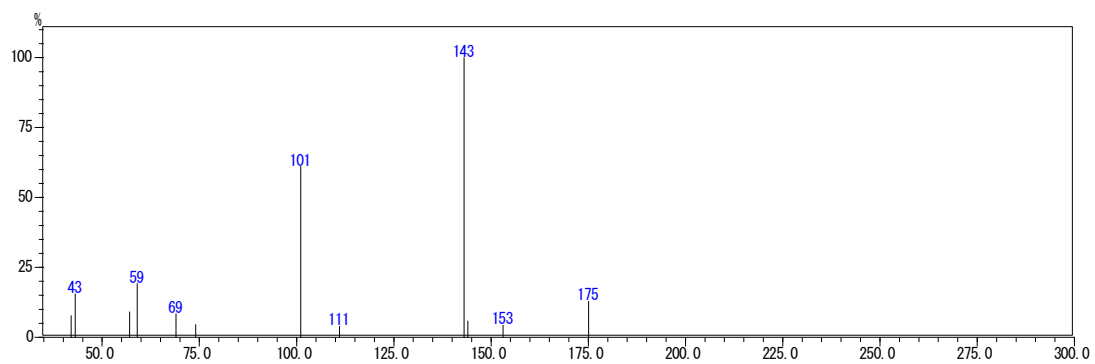
(I) 2-Oxoglutaric acid



(J) cis-Aconitic acid



(K) Citric acid



(M) Isocitric acid

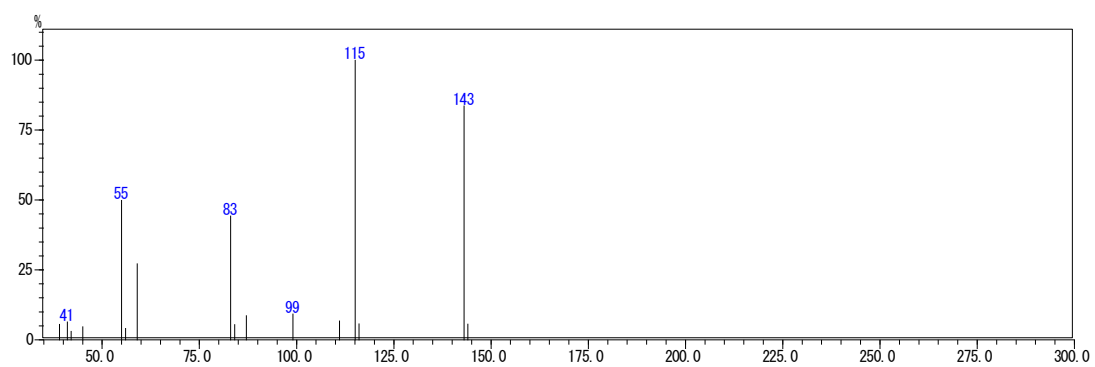


図 2-3 誘導体化された多価有機酸の EI マススペクトル

誘導体化条件を検討するために、異なる誘導体化時間を評価した(図 2-3)。多くの成分で 5～30 分間でピーク面積値はほぼ変動しなかったが、ピルビン酸や cis-アコニット酸のように、10 分を超えるとピーク面積が減少する化合物もあった。そこで、最適な誘導体化時間を 10 分と決定した。GC 分離では、はじめにメタボロミクスで一般的に用いられる微極性カラムを検討した。その結果、ピーク分離は良好であったが、化合物によってはピークのテーリングがみられた。そこで、エステル分析に用いられる極性カラム(InertCap 225 カラム)を使用したところ、良好なピーク形状と分離が得られた(図 2-4)。同カラムは、50 %シアノプロピルメチル-50 %フェニルメチルポリシロキサンを固定層とした中～高極性カラムである。クエン酸とイソクエン酸はヒドロキシ基の位置が異なるのみのため、クロマト分離が難しいが、この方法では分離することができた。

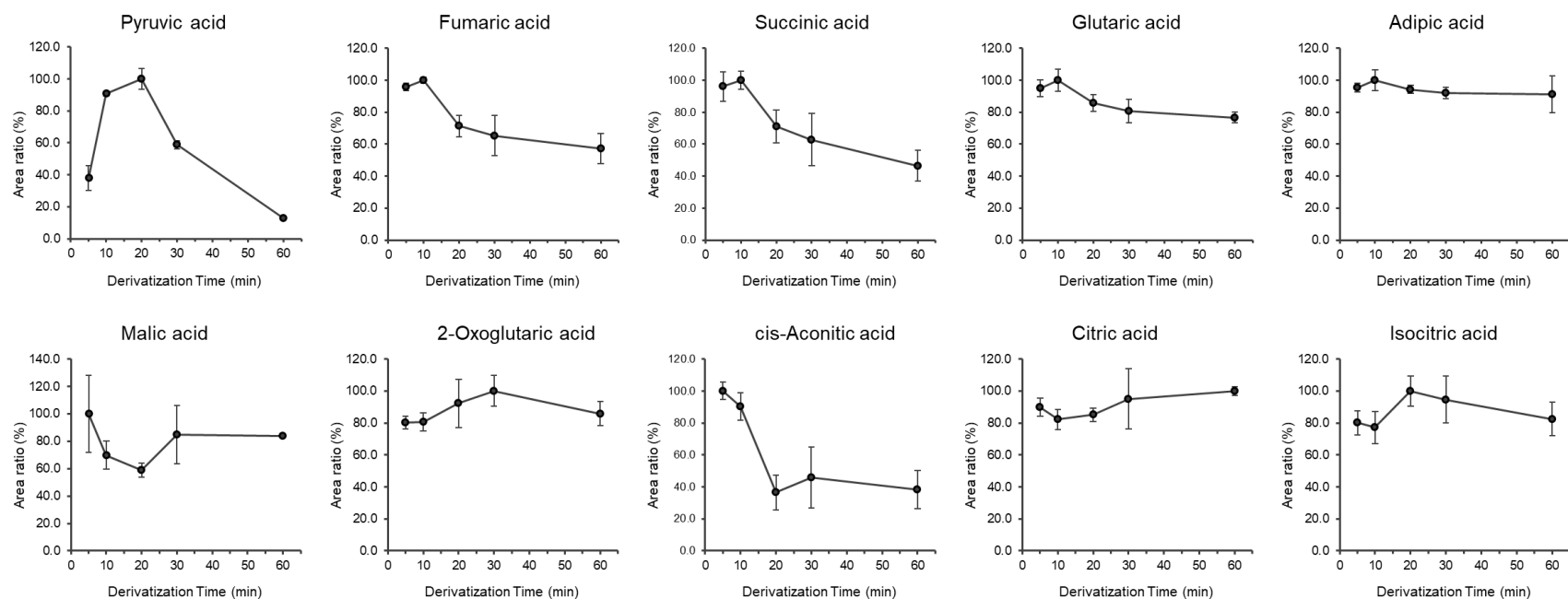


図 2-4 多価有機酸のメチル化時間の最適化

各メチル化時間における面積比を表す。エラーバーは3反復($n=3$)の標準偏差を示す。

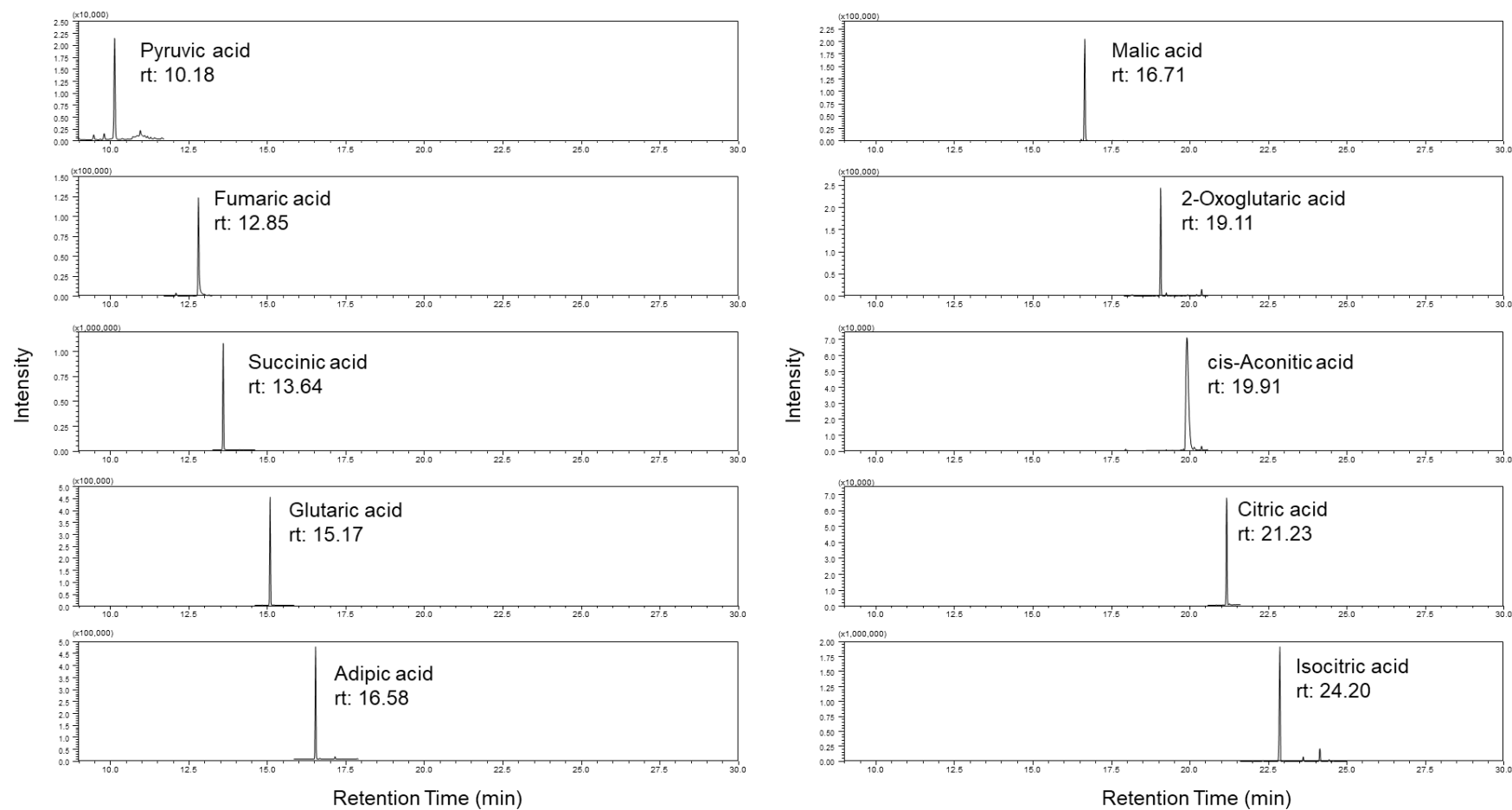


図 2-5 多価有機酸(0.2 mM)のマスキングクロマトグラムと保持時間(rt)

2.3.3 GSPD の糖リン酸分析への適応

糖リン酸については、メチル化に続くアセチル化の 2 段階誘導体化を採用した(図 2-5). 糖リン酸のリン酸基は化学的に不安定かつ極性が高いため、誘導体化する戦略がこれまで研究されており、ヘキソース糖リン酸のリン酸基を TMSD でメチル化すると、高い収率で誘導体化物が得られることが報告されている(58). アセチル化は、化学的および熱的安定性から、糖の誘導体化にしばしば用いられる(75). アセチル化は主に無水酢酸およびピリジンにより行われる. 予備実験としてアセチル化の他に、トリフルオロアセチル化の検討も行った. トリフルオロアセチル化も糖に用いられる誘導体化法である(75). トリフルオロアセチル化は、誘導体化により大きく質量が増加するが、他の誘導体化法と比べ誘導体化物の沸点が低くなる傾向にある. また、電子親和性を持つようになるため、イオン化法で NCI 法を採用することにより、高選択的かつ高感度に検出することができる. しかし、TMSD によるメチル化に続くトリフルオロ無水酢酸 (Trifluoroacetic Anhydride; TFAA) によるトリフルオロアセチル化を行ったところ、脱離したと考えられるメチル化リン酸が検出された(付録 2).

TMSD を用いたメチル化にはメタノールが、無水酢酸を用いたアセチル化にはピリジンが触媒および溶媒として用いられる. しかし、異なる溶媒を用いた 2 段階の誘導体化は、溶媒の置換が必要となるため、時間と手間がかかるとともに、この工程での代謝物の損失が懸念される. GSPD では溶媒を考慮する必要がない誘導体化であるため、異なる溶媒による誘導体化の組み合わせが容易になる.

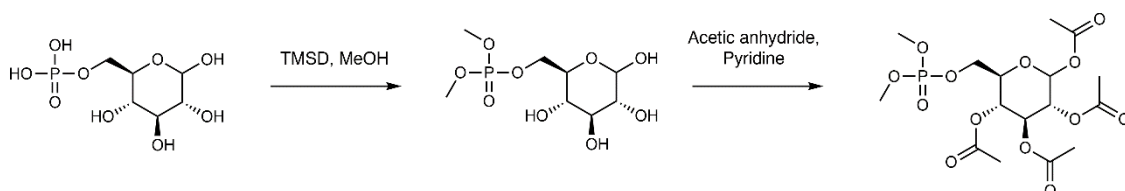
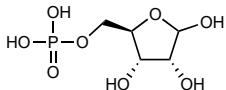
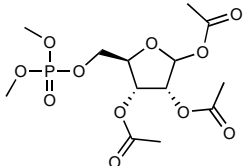
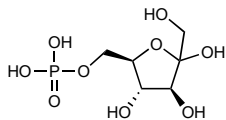
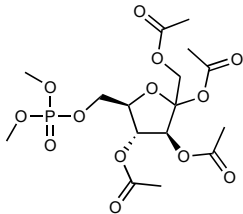
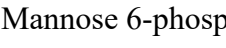
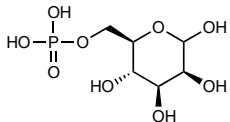
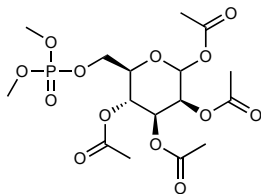
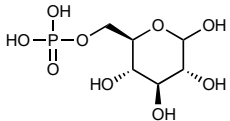
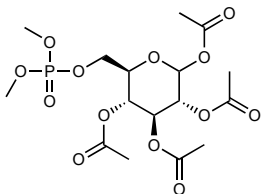


図 2-6 糖リン酸(グルコース 6-リン酸)の誘導体化スキーム

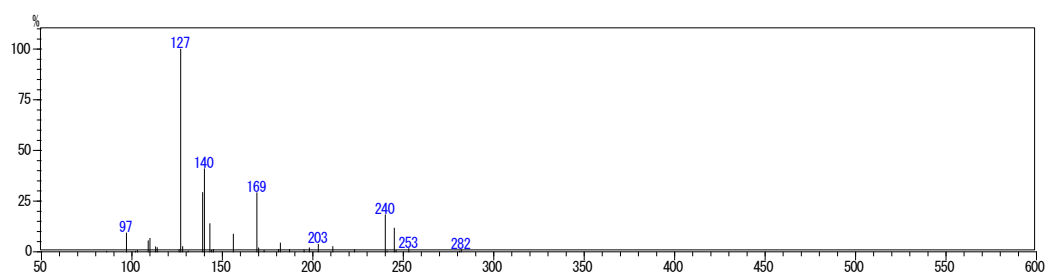
同定された誘導体化物の構造式, 保持時間 (rt) および保持指標 (RI) を表 2-2 に示す. メチル化およびアセチル化された糖リン酸は, 市販のマスマススペクトルライブラリには収載されていなかったため, EI および CI マスマススペクトルから確認した (図 2-6, 図 2-7). EI のマスマススペクトルでは, メチル化リン酸に由来する特徴的なイオンである m/z 127 と 109 が確認された(51). CI マスマススペクトルからは, 誘導体化された化合物の分子イオンと, アセチル基に由来する酢酸が脱離したイオンが検出された. 酸触媒は, TMSD によるメチル化の際の反応を促進する. 本研究では, 酸触媒として塩酸 (HCl) をサンプルとともにシリカモノリス担体にアプライすることで、感度が向上した. 糖リン酸の中では, Ru5P が最も低い感度を示した. 先行研究で, LC-MS 分析における TMSD によるメチル化 Ru5P の感度が極端に低いことが報告されており, Ru5P のメチル化効率が低いことが示唆された(58). TMSD によるメチル化と無水酢酸によるアセチル化の誘導体化時間を変えて検討した (図 2-8). TMSD による糖リン酸のメチル化は, 5 分を超えると感度が低下したため, 反応時間を 5 分に設定した. 無水酢酸によるアセチル化は反応時間を 10 分に設定した. また, 注入口での加熱脱着温度を高くすると脱着効率が向上する一方で, 熱分解の懸念があるが, 加熱脱着温度の評価から 300℃に設定した (付録 3).

表 2-2 糖リン酸の誘導体化物と GC/MS 分析条件およびピーク面積再現性 (1 mM, $n=3$)

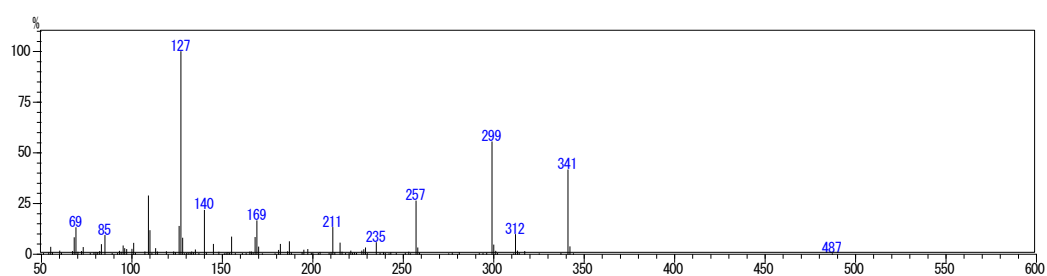
Compound	Derivative	rt (min)	RI	m/z	%RSD
Ribose-5 phosphate 		15.01	2087	240	8.7
Fructose-6 phosphate 		17.32, 17.40	2260, 2265	341	13.3
Mannose 6-phosphate 		17.58, 17.82	2278, 2295	312	13.8

					
<p>Glucose 6-phosphate</p> 		17.70, 17.90	2287, 2301	312	11.5

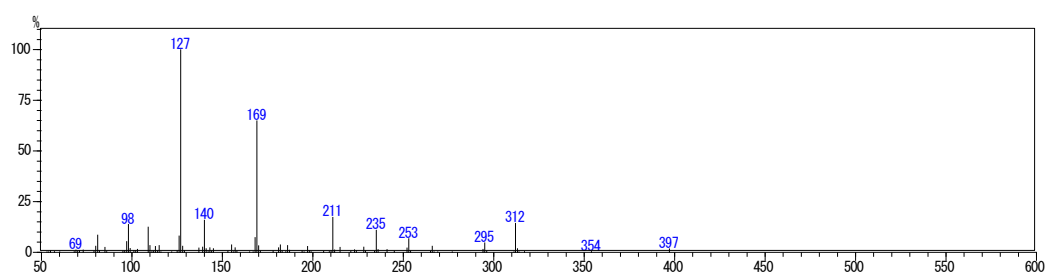
(A) Ribose 5-phosphate



(B) Fructose 6-phosphate



(C) Glucose 6-phosphate



(D) Mannose 6-phosphate

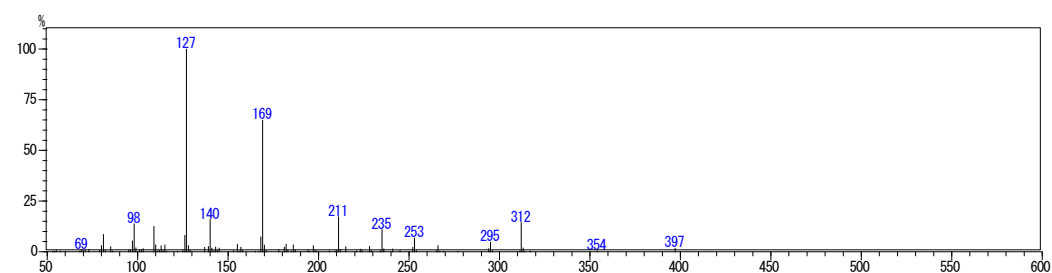
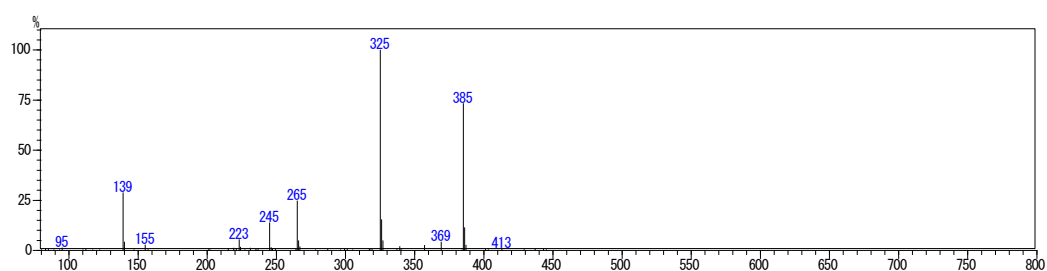
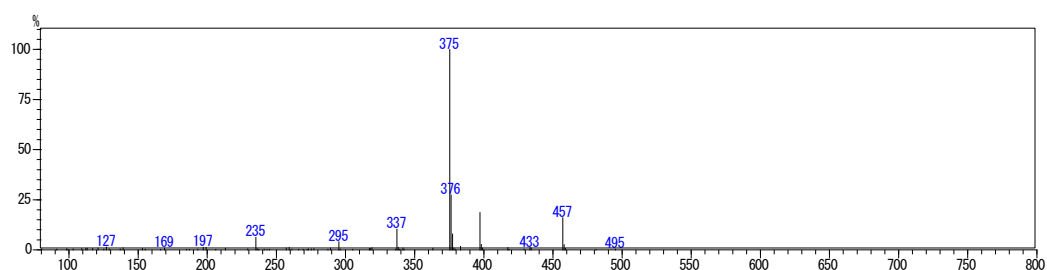


図 2-7 誘導体化された糖リン酸の EI マススペクトル

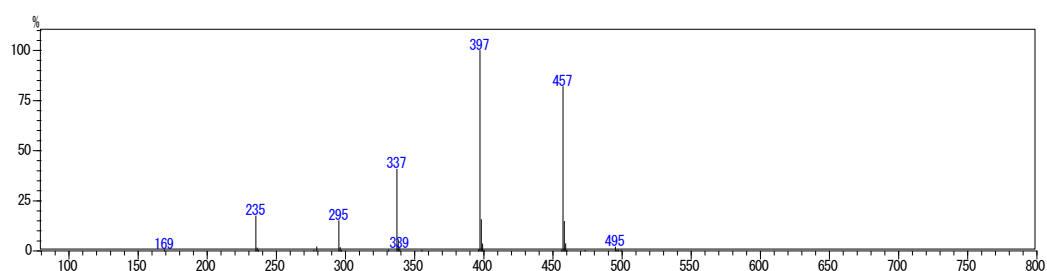
(A) Ribose 5-phosphate



(B) Fructose 6-phosphate



(C) Glucose 6-phosphate



(D) Mannose 6-phosphate

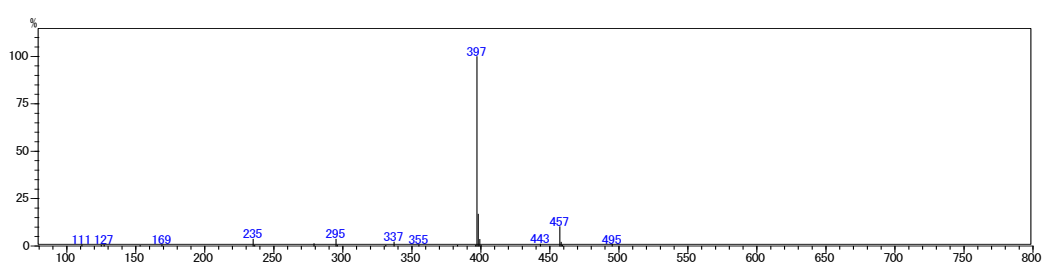
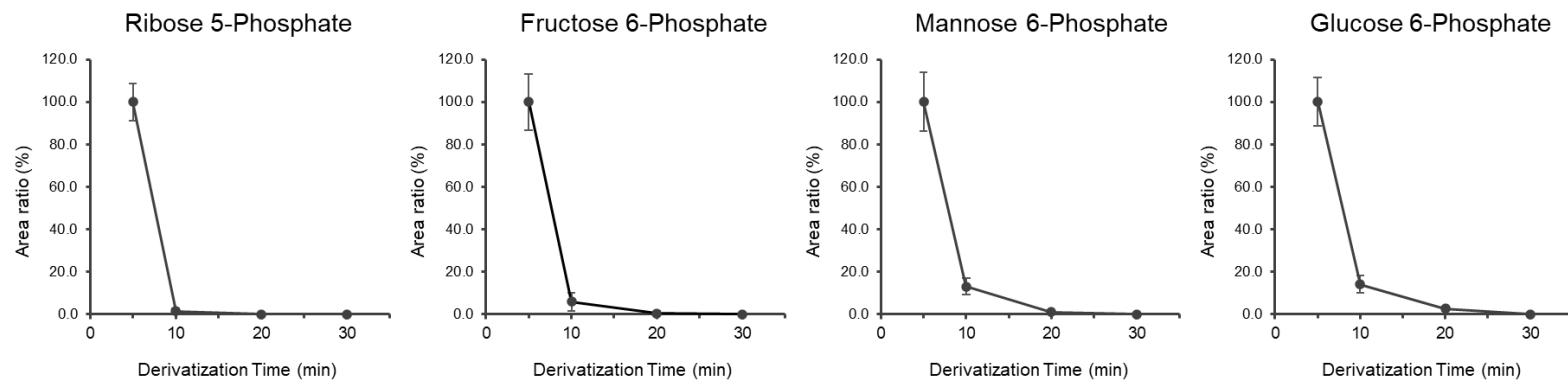


図 2-8 誘導体化された糖リン酸の CI マススペクトル

(a)



(b)

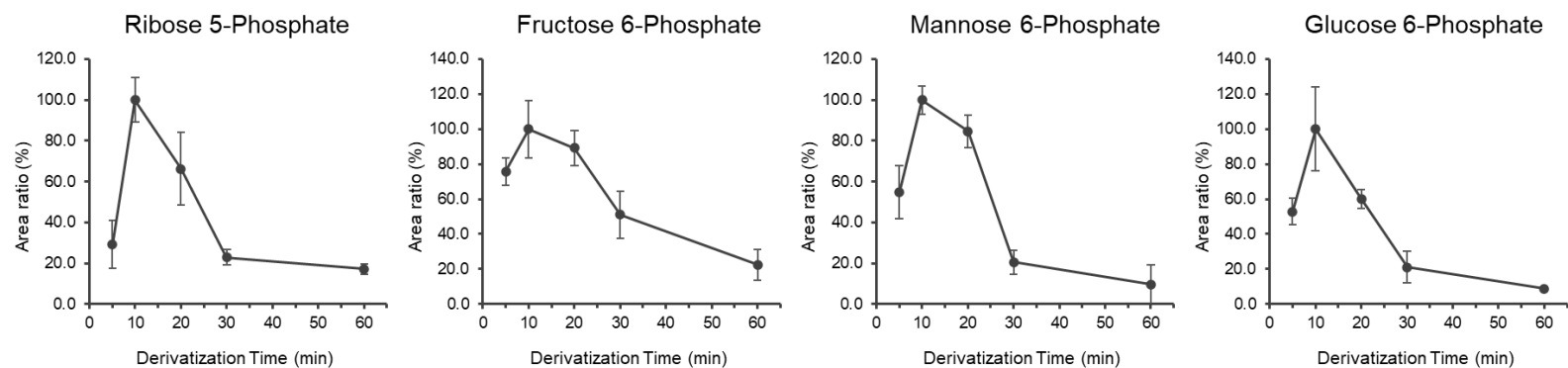


図 2-9 糖リン酸の誘導体化時間の最適化

各メチル化時間(アセチル化は 30 分間に固定)における面積比(A)とアセチル化時間(メチル化は 5 分間に固定)における面積比(B)を表す。エラーバーは 3 反復($n=3$)の標準偏差を示す。

G6P については、ピラノース(α/β)のメインピークとフラノース(α/β)のマイナーピークが検出された。G6P のマイナーピークは F6P のピークと共溶出した。しかし、両者は特徴的なフラグメントイオンで分離できた(図 2-9)。GC 分離を用いた還元糖の分析では、誘導体化にオキシム化を行い、2 つの異性体(*E* と *Z*)のみを形成してピークの数減らす戦略を取ることが多い(76)。オキシム化は G6P のピーク数を減らすことが期待されるが、回収率の低下と誘導体化ステップの増加に伴う労力のため、本研究では採用しなかった。

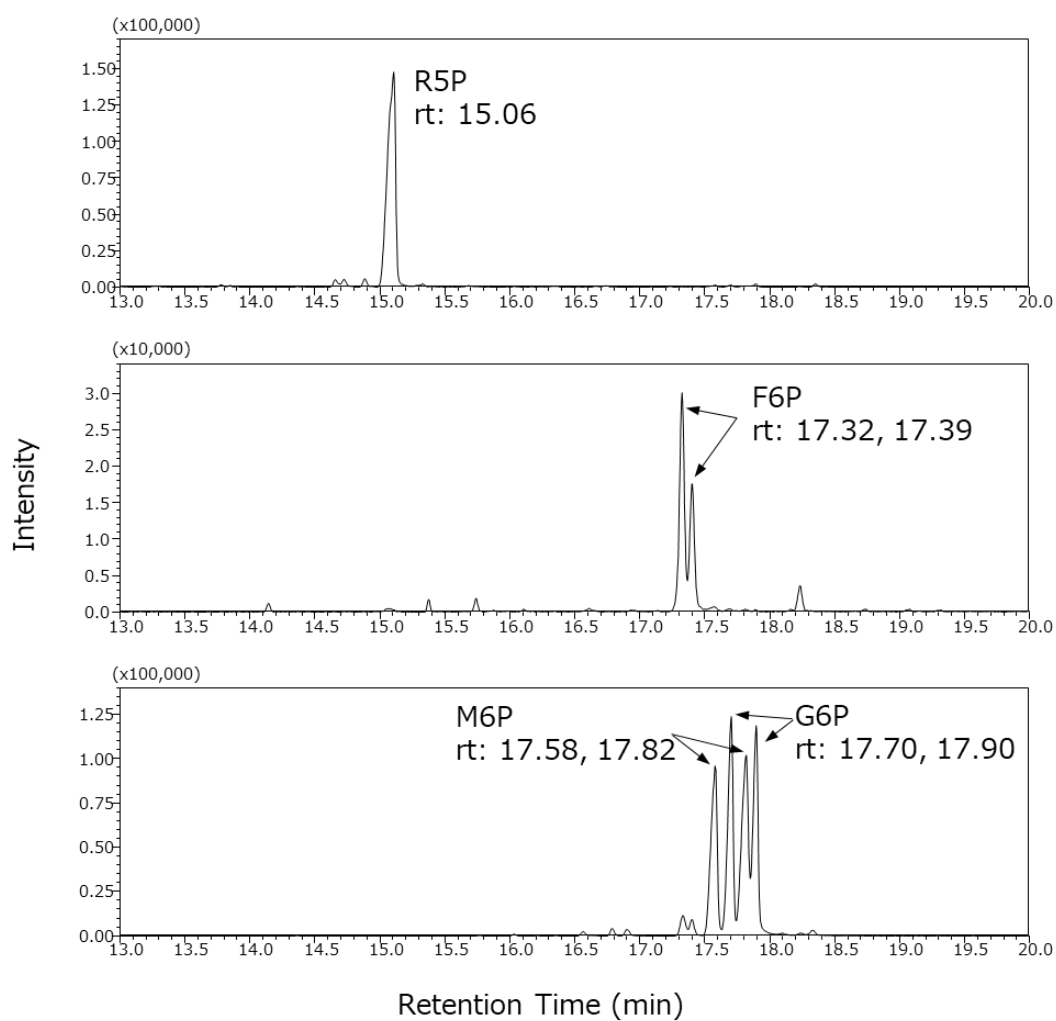


図 2-10 誘導体化された糖リン酸(1 mM)のマスキロマトグラムと保持時間 (rt)

2.3.4 実試料の分析と従来法との比較

開発した分析手法の実用性を確認するため、ヒト血漿およびトマト果肉に適用し、従来の GC-MS 法と比較した。GSPD 法では、ヒト血漿は前処理することなく直接シリカモノリス担体にアプライし、GSPD による誘導体化を行った。トマト果肉は、混合溶媒 (MeOH/H₂O/CHCl₃) で抽出し、水層をシリカモノリス担体にアプライした。GSPD では、タンパク質などの不揮発性化合物は気化しないためシリカモノリス担体に保持されたままになるため、サンプル前処理で除タンパクすることなく測定することができる。実際、ヒト血漿の連続分析においてカラムや MS 汚染に起因する顕著な感度低下やクロマトグラムの乱れは見られなかった(付録 4)。従来法では、Bligh and Dyer 法により抽出を行った後、溶液中でメキシム化に続く TMS 化を行い、反応液を GC-MS に注入し分析した。各手法で検出された代謝物を表 2-3 に示す。ヒト血漿では、従来法では Pyruvic acid, cis-Aconitic acid, Citric acid/Isocitric acid が検出されたが、GSPD によるメチル化では、これら代謝物に加え Fumaric acid, Succinic acid, Malic acid, 2-Oxoglutaric acid が検出された。また、トマト果肉では、従来法と GSPD で同数の多価有機酸と糖リン酸が検出された。

表 2-3 GSPD と従来法による血漿およびトマト果肉中の代謝物検出量の比較

Compound	Human Plasma		Tomato Pulp	
	GSPD	Conventional	GSPD	Conventional
Pyruvic acid	+	+	+	+
Fumaric acid	+	nd	+	+
Succinic acid	+	nd	+	+
Glutaric acid	nd	nd	nd	nd
Adipic acid	+	+	nd	nd
Malic acid	+	nd	+	+
2-Oxoglutaric acid	+	nd	+	+
cis-Aconitic acid	+	+	+	+
Citric acid	+	+ (co-elution)	+	+ (co-elution)
Isocitric acid	+		+	
Ribose 5-phosphate	nd	nd	nd	nd
Fructose 6-phosphate	nd	nd	+	+

Mannose 6-phosphate	nd	nd	+	+
Glucose 6-phosphate	nd	nd	+	+

+: Detected, nd: Not detected.

2.3.5 小括

本章では, GC-MS を用いたメタボローム解析のために, シリカモノリス担体を用いた新規サンプリングおよび誘導体化法として気相-固相誘導体化(GSPD)を開発した. 概念実証として, 多価有機酸の TMSD によるメチル化と, 糖リン酸の TMSD によるメチル化および無水酢酸によるアセチル化の 2 段階誘導体化法を開発した. 開発した方法をヒト血漿およびトマト果肉を実試料として適用したところ, 従来法と比較して検出能が向上した. GSPD は, 溶媒の制限により溶液では困難な誘導体化にも適用できることが示された. さらに, サンプルを精製することなく誘導体化と GC-MS による測定が可能である.

第3章 シリカモノリス担体を用いたサンプル保管における代謝物安定性向上の検討

3.1 緒言

第2章では、シリカモノリス担体を用いたサンプリングと気相-固相誘導体化のワークフローを構築し、多価有機酸および糖リン酸の測定メソッドを検討した。本章では、本手法の利点である、サンプルを簡便に乾燥することができ、さらにシリカモノリス担体ごとサンプルを輸送および保管できることに焦点を当て、本サンプリングを用いた保管時の代謝物の安定性について評価した。

メタボロミクス研究において、通常、サンプルの採取と測定は異なる場所で行われるため、サンプルを輸送・保管する必要がある。サンプルの輸送や保管の条件はその設備により制限されることが多い(77)。しかし、特に生体試料や食品試料などは、輸送や保管の条件によってはサンプル中の酵素などの影響で、代謝物量の変動することが問題になる。例えば、臨床メタボロミクスで使用される血液サンプル(血漿や血清)は-80℃での保管が望ましいとされるが、実際の臨床現場や輸送環境では制限されることも多い(5,77)。そのため、保管温度や期間での代謝物量の変動の調査が様々な分析装置を用いてなされてきた(38,78-82)。さらに、凍結保管の場合は、繰り返しの凍結融解による代謝物の変動も報告されている(38,81-84)。また、フードメタボロミクスとして研究対象となる食品サンプルにおいても、代謝物の変動を抑えるための保管と輸送の条件を確立する必要がある(85)。

本章では、これまで安定性評価の研究報告が多いヒト血漿を対象サンプルとして、シリカモノリス担体を用いたサンプリングによる保管時の代謝物の安定化について検討を行った。第2章で採用したシリカモノリス担体による代謝物のサンプリングでは、代謝物を担体に保持させたまま不活性ガスによる短時間でのサンプルの乾燥が可能であるため、酵素の活性を抑え、より高い温度においても代謝物の変動が抑制されることが期待できる。これまで、メタボロミクスにおいて、サンプルの保管条件における代謝

物の変動の調査は行われてきたが、代謝物の安定性を高める戦略の報告はなされていない。新たな戦略として、冷蔵や室温でサンプルを保管および輸送することができるようになれば、メタボロミクス研究のロジスティクスの課題を解決することが期待できる。

3.2 実験材料と実験方法

3.2.1 試薬

GC/MS メタボロミクス用代謝物質混合試料および MonoTrap RSC18 TD はジーエルサイエンス株式会社から購入した。無水酢酸、塩酸(HCl)、メタノール(MeOH)、脱水ピリジン、トリメチルシリルジアゾメタン(TMSD) (ヘキサン中 10% (w/w))は、富士フイルム和光ケミカルズ株式会社から購入した。プールヒト血漿は、コスモ・バイオ株式会社から購入した。

3.2.2 サンプル準備

通常保管では、-80℃で保存していたヒトプール血漿を凍結融解し、1.5 mL マイクロチューブに分注し、表 3-1 の温度と期間で保管した。

シリカモノリス担体保管では、メタノール 20 µL を MonoTrap にアプライした後、ヒトプール血漿 10 µL をアプライした。MonoTrap を OPTIC-4 用インサートライナーに入れてキャップをし、AOC-6000 のトレイにセットした。OPTIC-4 を用い、60℃で 200 mL/min の流速でヘリウムガスを 5 分間流す(合計 1 L)ことでサンプルを乾燥させた。乾燥させた MonoTrap は、1.5 mL マイクロチューブに入れ、表 3-1 の温度と期間で保管した。保管後のサンプルは、測定まで-80℃で保管した。

表 3-1 サンプル保管条件

Storage period	Storage temperature
----------------	---------------------

	RT (22°C)	4°C	-80°C
1day	✓		
3day	✓		
1week	✓	✓	
3week		✓	✓ (Control)

3.2.3 気相-固相誘導体化 (GSPD) による誘導体化

メチル化では, TMSD 200 μ L とメタノール 200 μ L を 2 mL クリンプバイアルに加えた. MonoTrap をワイヤーでバイアルに引っ掛けてバイアルのヘッドスペースに吊るし, クリンプキャップで密封した. バイアルを 40°C で 5 分間インキュベートしメチル化を行った. アセチル化では, 2 mL クリンプバイアルの内部をアルゴンガスで置換し, 無水酢酸 200 μ L とピリジン 200 μ L を加えた. バイアルを 80°C で 30 分間インキュベートしアセチル化を行った. 誘導体化後は, マルチモード GC 注入口を用い, 60°C で 5 分間, 200 mL/min でパージした.

3.2.4 加熱脱着 (TD)-GC/MS 分析

GC-MS 分析は, マルチモード GC 注入口 OPTIC-4 (GL Science B.V.), 自動ライナー交換モジュール LINEX-2 (GL Science B.V.), 多機能オートサンプラ AOC-6000 (株式会社島津製作所) を搭載したガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8050 NX (株式会社島津製作所) を用いて, TD-GC/MS 法で測定を行った. OPTIC-4 の注入口温度を 50°C から 280°C まで 5°C/sec の昇温でプログラムして加熱脱着を行った. GC 分析は, DB-5 カラム (30 m x 0.25 mm i.d., df= 0.25 μ m) (アジレント・テクノロジー) を用い, キャリアガスはヘリウム, スプリット比は 10:1, カラム流量は 1.0 mL/min とした. GC 温度プログラムは, 60°C で 4 分間維持した後, 10°C/min で 320°C まで昇温し, 10 分間恒温した. イオン化モードは EI で, スキャン (m/z 35-800) モードでデータ採取を行った.

3.2.5 データ処理と統計解析

代謝物の同定とピーク面積値の算出には, LabSolutions Insight (株式会社島津製作所) が用いられた. 先行研究より, 血漿中の代謝物は -80°C で 2.5 年間安定であるため, -80°C で保管した血漿をコントロールとしてみなした(82). 統計解析には, マルチオミクス解析パッケージ(株式会社島津製作所)を用いた. 実験グループ間で有意に異なる代謝物は, Welch's t-test (両側検定)により解析された. コントロールとの比較で p 値が <0.01 の場合, 差異が有意であるとみなされた.

3.3 結果と考察

本章の実験ワークフローの概略を図 3-1 に示す。サンプリング後、MonoTrap の乾燥において、十分かつ再現性よく水分を除去するために、OPTIC-4 注入口を用いて 60℃で温度をかけながらガスを流すことで乾燥させた。ガスはキャリアガスのヘリウムを使用し、合計 1 L となるようにガスを流した。

通常保管での、コントロール、冷蔵・3 週間保管および室温・1 週間保管の全イオン電流クロマトグラム (Total Ion Current Chromatogram; TICC) を図 3-2 に示す。また、シリカモノリス保管での、コントロール、冷蔵・1 週間保管および室温・1 週間保管の TICC を図 3-3 に示す。通常保管では、特に保持時間が 25.5 分付近のピークで顕著な違いが見られ、冷蔵や室温保管ではピークが消失していた。このピークは NIST 2023 ライブラリでシミラリティ検索を行ったところ D-Glucopyranose pentaacetate (グルコースの誘導体化物) であった。一方で、シリカモノリス担体では、該当ピークの消失は見られなかった。

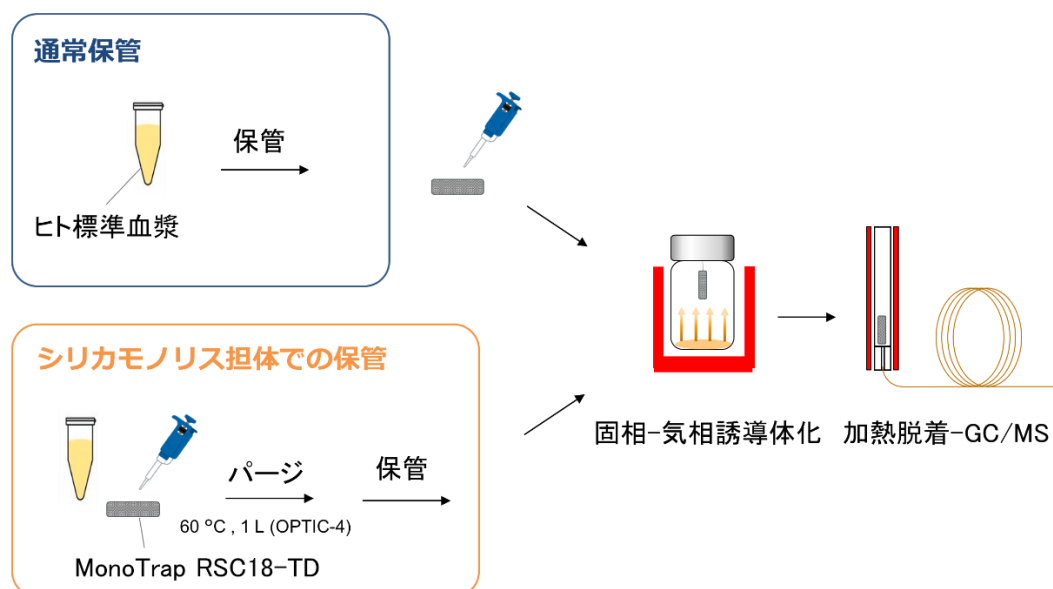


図 3-1 本章の実験ワークフロー概略

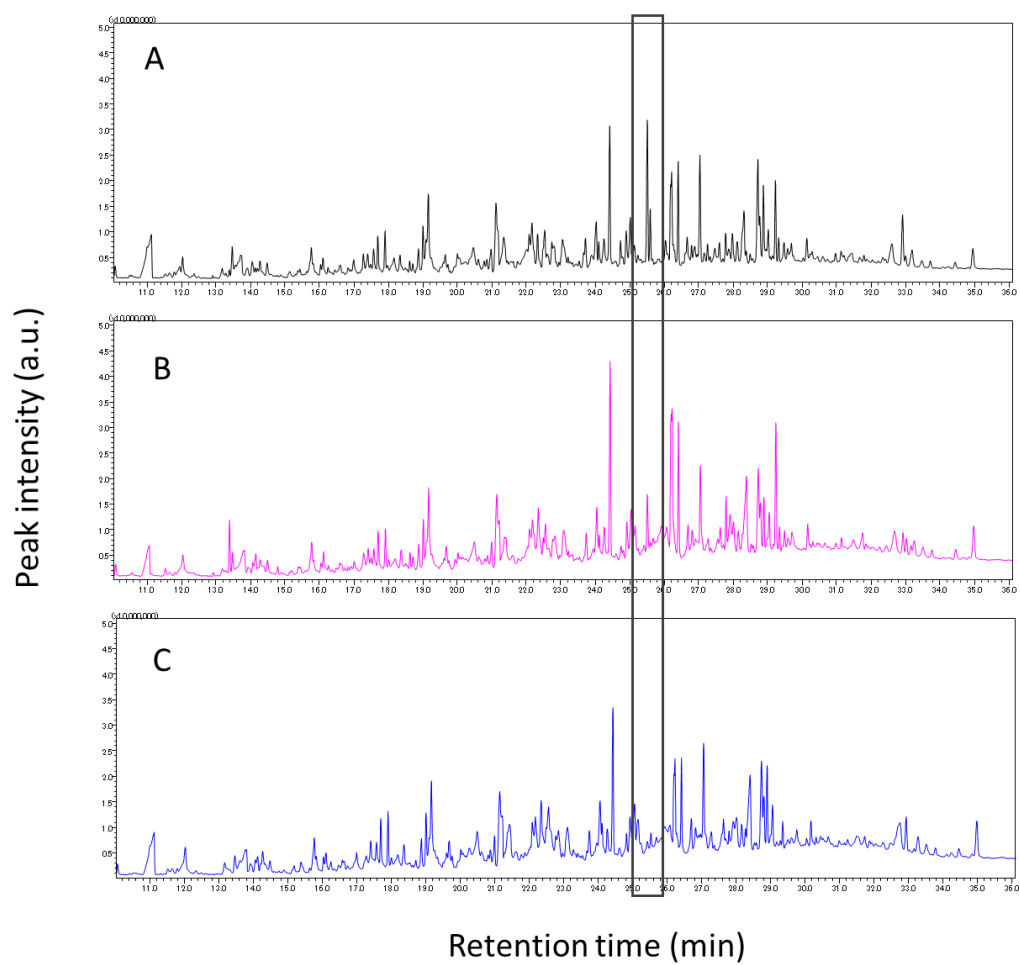


図 3-2 通常保管の TICC

(A) コントロール, (B) 冷蔵・3 週間保存 (C) 室温・1 週間保存. 黒枠はグルコースのピークを示す.

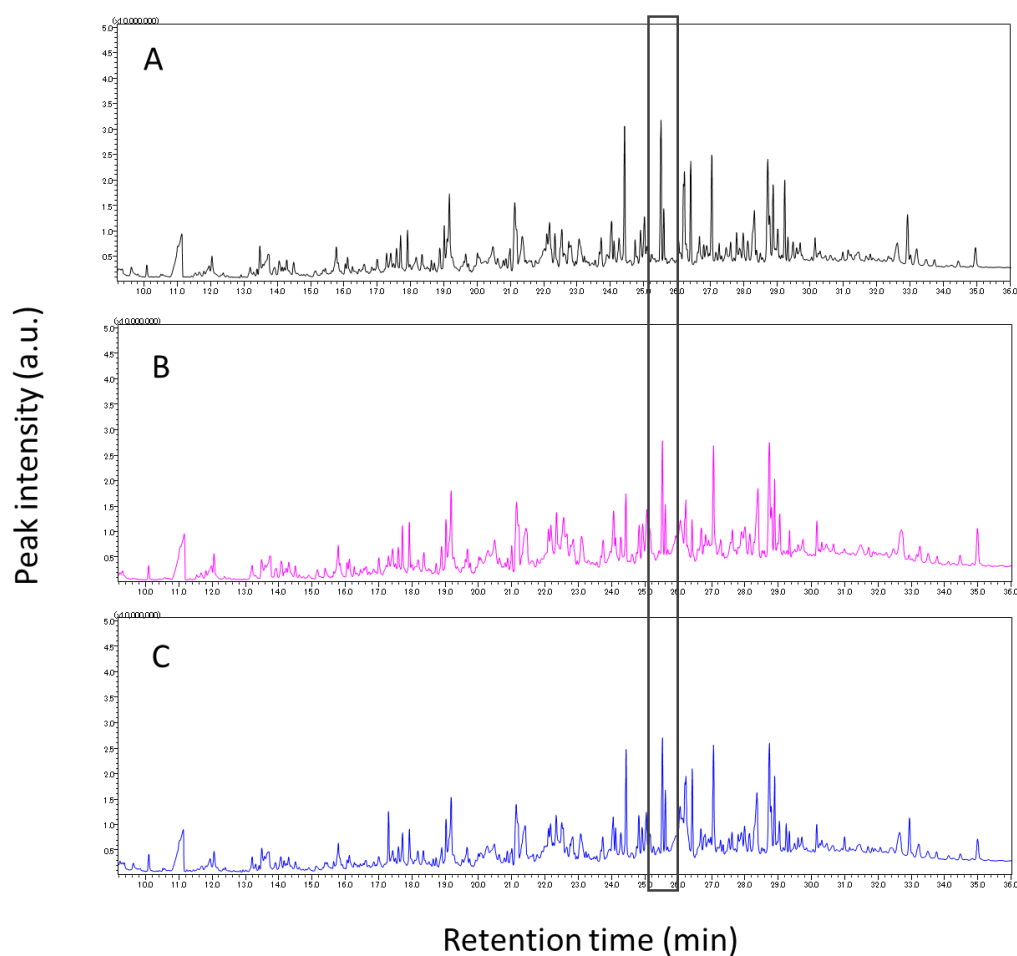


図 3-3 シリカモノリス担体保管の TICC

(A) コントロール, (B) 冷蔵・1 週間保存 (C) 室温・1 週間保存. 黒枠はグルコースのピークを示す.

本研究で採用した GSPD によるメチル化およびアセチル化された代謝物は、専用のマススペクトルライブラリが存在しないため、アミノ酸、有機酸、糖を含む市販の標準試料を用い、マススペクトルおよび保持指標を採取し、代謝物の同定に用いた。同定に使用した代謝物のマススペクトルおよび保持指標は付録 5 に示す。

同定された代謝物の中で、室温や冷蔵での通常保管ではいくつかの代謝物のピーク面積値に変動が見られた。これら代謝物の通常保管およびシリカモノリス担体保管でのピーク面積値をプロットしたボックスプロットを図 3-4 および図 3-5 に示す。グルコ

ース, myo-イノシトール, フェニルアラニンは, 冷蔵での通常保管において, 優位水準 $p<0.01$ の基準において, コントロールと比較して有意な変動が確認された. これらは, 1 週間保管では減少し, その後 3 週間保管では増加する傾向が見られた. 一方で, シリカモノリス保管により, これら代謝物の変動が抑えられており, myo-イノシトールおよびフェニルアラニンはコントロールと比較して有意な変動は見られなかった. しかし, グルコースは, 通常保管よりも変動が抑えられていたものの, シリカモノリス保管においてもコントロールと比較して, 約 60 %の面積値であった.

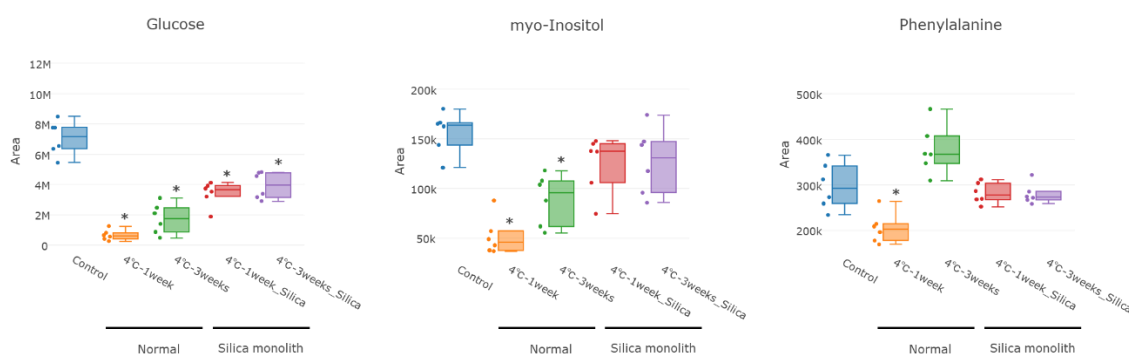


図 3-4 冷蔵(4℃)における通常保管およびシリカモノリス担体保管での代謝物のピーク面積値の変動

ボックスプロット中のアスタリスク(*)は, コントロールと比較した際の有意差を示す(Two-sided Welch's t-test, 優位水準 $p<0.01$). サンプル数は全て N=6.

室温での通常保管では, 上記代謝物の他に, アラニン, イソロイシン, ロイシン, プロリン, バリンといったアミノ酸, グルタミン酸, コハク酸といった有機酸の他, カフェイン+キサンチンで, 優位水準 $p<0.01$ の基準において, コントロールと比較して有意な変動が確認された. なお, キサンチンは誘導体化によりカフェインとなるため, 本分析系ではカフェインとキサンチンを合算として算出される. 冷蔵保存同様, シリカモノリス担体での保管により, これら代謝物の変動は抑えられており, グルコースと myo-イノシトール

ルを除く代謝物で、コントロールと比較して有意な変動は見られなかった。グルコースについては、冷蔵保存同様、変動が抑えられていたものの、ピーク面積値は減少していた。



図 3-5 室温 (22℃) における通常保管およびシリカモノリス担体保管での代謝物のピーク面積値の変動

ボックスプロット中のアスタリスク (*) は、コントロールと比較した際の有意差を示す (Two sided Welch's t-test, 優位水準 $p < 0.01$). サンプル数は、N=6 (通常保管 3days, 通常保管 1week, シリカモノリス担体保管 1day, シリカモノリス担体保管 3days は N=5).

過去の研究で NMR ベースのメタボロミクスにおいて、ヒト血漿を -20°C で1ヶ月保存すると、プロリンの代謝物量が上昇し、グルコースは減少することが報告されている(82). また、冷蔵および室温保管した血漿および血清の CE-MS による代謝物プロファイリングにおいて、イソロイシンやグルタミン酸を含むアミノ酸類が変動することが報告されている(81). LC-MS/MS を用いた研究では、血漿および血清のクールパックおよび室温輸送において、アミノ酸が最も安定性の低い化合物クラスであり、またヘキソースも有意に変動したことが報告されている(38). 本研究において、通常保管でピーク面積値が変動した代謝物は先行研究と比較して概ね一致していた. また、予備実験として実施したヒト血漿の安定性実験とも同様の傾向を示した(付録 6). シリカモノリス担体を用いることで、グルコース以外の代謝物で、冷蔵や室温保存においても、これらの代謝物が安定化することが分かった. グルコースについては、変動が抑えられたものの、ピーク面積値は有意に減少していた. これは、一部水分が MonoTrap に残存していた可能性があり、サンプリング条件の最適化の余地が残っていると考えられる. また、本研究の限界は、同定に使用したライブラリの代謝物を主要な代謝物に限られており、網羅性が低い点である. しかし、本研究において、シリカモノリス担体によるサンプリングにより、代謝物の変動が抑えられることが分かった.

3.4 小括

本章では、ヒト血漿を対象サンプルとして、シリカモノリス担体を用いたサンプリングによる冷蔵および室温での保管時の代謝物の安定化について検討を行った. シリカモノリス担体は、直接サンプルをアプライし不活性ガスにより簡便に乾燥させることができるため、高い温度においても代謝物の変動が抑えられると考えられた. 実験の結果、通常保管ではアミノ酸や有機酸、グルコースなどの代謝物の変動していたが、シリカモノリス保管ではこれらの変動が抑えられることが分かった. グルコースについては、

シリカモノリス保管においても、代謝物の変動が見られたため、サンプリングの最適化の余地が残った。今後、本手法によりサンプルを冷蔵や室温で流通できるようになれば、設備が限れた環境や流通網のサンプルにおいても、簡便にサンプルを保管・輸送することができるようになる。

第4章 総括と展望

4.1 本研究の総括

メタボロミクスでは、代謝物のプロファイリングにいくつかの分析装置が使用される。GC-MS は、低分子親水性代謝物のプロファイリングに用いられる分析装置である。しかし、GC-MS ではサンプルの前処理および代謝物の誘導体化の工程が必要である。サンプルの前処理では脱水に一晩かかり、また誘導体化の選択肢は限られているため、検討の余地があった。本研究では、GC-MS によるメタボロミクスに資するシリカモノリス担体を用いた新しいコンセプトのサンプリングと誘導体化の手法を構築し、気相-固相誘導体化 (Gas-solid phase derivatization; GSPD) として提案した。

第 2 章では、GSPD によるワークフローの実現性検討として、トリカルボン酸 (TCA) サイクルおよび解糖系の中間代謝物である多価有機酸および糖リン酸について、測定ワークフローを構築し、誘導体化試薬、反応条件、分析条件を検討した。GSPD では、シリカモノリス担体にサンプルを直接アプライし、バイアル内のヘッドスペース部でガス状の試薬により誘導体化されるようにした。誘導体化物はマルチモード注入口を用いた加熱脱着法により GC-MS に導入された。多価有機酸は、溶解性の観点から溶媒中では適応が困難であった TMSD によるメチル化を行うことができた。また、糖リン酸では、TMSD によるメチル化と無水酢酸によるアセチル化という溶媒の異なる 2 段階の誘導体化反応を行うことができた。さらに、構築した条件を用いて、生体サンプルであるヒト血漿と植物サンプルであるトマト果肉を分析し、実試料への適応性を確認したところ、従来法と比較して検出能が向上した。

メタボロミクス研究において、サンプルの適切な採取および保存は極めて重要な要素である。しかし、現場の環境や輸送条件によってはこの温度管理が困難な場合も多い。そのため、代謝物の変動を抑えるための新しい保存技術の開発が求められている。そこで、第 3 章では、第 2 章で開発したシリカモノリス担体を用いたサンプリングにより室温や冷蔵での保管において、代謝物の変動抑制についての評価を行った。シリカ

モノリス担体を用いたサンプリングでは、不活性ガスで簡便にサンプルを乾燥させることができるため、酵素活性が抑えられると考えられた。その結果、通常保管では室温や冷蔵ではグルコースやロイシンなどでピーク強度が増加し、コハク酸やプロリンなどでは減少した。一方で、シリカモノリス担体で保管した場合は、これらの変動が抑えられていた。本結果から、シリカモノリス担体で代謝物を保持させることで、従来よりも高い温度で流通させることができる可能性が示唆された。このように、第3章では、メタボロミクス・ロジスティクスの課題に焦点を当て、代謝物の安定性向上に関する技術検討を行った。

4.2 今後の展望

本研究で開発した手法を応用することで、現地でサンプルを担体に直接サンプリングした後、担体ごと室温で輸送・保管を行い、GSPDにより測定する研究フローを構築できる可能性が示された。例えば、ガラスライナーに直接シリカモノリスを保持させることで、現地でサンプリングし、実験室へ輸送後そのまま誘導体化とGC-MS測定に供することができる。また、ガラスライナー自体にバーコードなどを印字することで、サンプルのトレーサビリティを担保することも可能になる。また、誘導体化について、本研究で溶媒に影響しない誘導体化が可能であることが示されたため、これまでは困難で合った誘導体化試薬の適応も可能であり、測定成分の拡張が期待できる。さらに、本研究では誘導体化試薬が入ったバイアルのヘッドスペース部に担体を吊るして反応させる系を構築したが、気相プロテインシーケンサーのように気化した誘導体化試薬を自動で供給できるシステムの構築などにより、効率的かつ再現性良く、多検体を処理することも期待できる。また、シリカモノリス担体から溶媒に逆抽出するメソッドを構築することで、HPLCやLC-MSなどのGC-MS以外の分析装置に適応することも可能にある。このように、本研究で得られた知見をもとに技術開発を進めることで、ロジスティクスやサンプルの前処理の課題を解決し、メタボロミクス研究のより一層の社会実装を進

められることが期待できる.

引用文献

1. Yang, Q., Zhang, A. H., Miao, J. H., Sun, H., Han, Y., Yan, G. L., Wu, F. F. & Wang, X. J.: Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. *RSC Adv*, **9**, 37245–37257 (2019)
2. Putri, S. P., Nakayama, Y., Matsuda, F., Uchikata, T., Kobayashi, S., Matsubara, A. & Fukusaki, E.: Current metabolomics: Practical applications. *J Biosci Bioeng*, **115**, 579–589 (2013)
3. Patti, G. J., Yanes, O. & Siuzdak, G.: Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 263–269 (2012)
4. Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kır, S. & Nemutlu, E.: Integration of GC–MS and LC–MS for untargeted metabolomics profiling. *J Pharm Biomed Anal*, **190**, 113509 (2020)
5. Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-Mcintyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J. D., Halsall, A., Haselden, J. N., Nicholls, A. W., Wilson, I. D., Kell, D.B., Goodacre, R., & Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium.: Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*, **6**, 1060–1083 (2011).
6. Simón-Manso, Y., Lowenthal, M. S., Kilpatrick, L. E., Sampson, M. L., Telu, K. H., Rudnick, P. A., Mallard, W. G., Bearden, D. W., Schock, T. B., Tchekhovskoi, D. V., Blonder, N., Yan, X., Liang, Y., Zheng, Y., Wallace, W. E., Neta, P., Phinney, K. W., Remaley, A. T., Stein, S. E.: Metabolite profiling of a NIST standard reference material for human plasma (SRM 1950): GC-MS, LC-MS, NMR, and clinical laboratory analyses, libraries, and web-based resources. *Anal Chem*, **85**, 11725–31 (2013).
7. Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C. & Holmes, E.: Metabonomics: A

platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 153–161 (2002)

8. **Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E. & Everett, J. R.:** Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn Reson*, **12**, 289–320 (2000).

9. **Nicholson, J. K., Lindon, J. C. & Holmes, E.:** ‘Metabonomics’: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, **29**, 1181–1189 (1999)

10. **Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y. & Wang, X.:** Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, **137**, 293–300 (2012)

11. **Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M. & Wishart, D. S.:** Nmr spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*, **9**, 123 (2019)

12. **Wishart, D. S.:** Quantitative metabolomics using NMR. *Trends Anal Chem*, **27**, 228–237 (2008).

13. **Nagana Gowda, G. A. & Djukovic, D.:** Overview of mass spectrometry-based metabolomics: Opportunities and challenges. *Methods Mol Biol*, **1198**, 3–12 (2014).

14. **Ruiz-Aracama, A., Peijnenburg, A., Kleinjans, J., Jennen, D., van Delft, J., Hellfrisch, C. & Lommen, A.:** An untargeted multi-technique metabolomics approach to studying intracellular metabolites of HepG2 cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *BMC Genom*, **12**, 251 (2011).

15. **Walker, D. I., Marder, M. E., Yano, Y., Terrell, M., Liang, Y., Barr, D. B., Miller, G. W., Jones, D. P., Marcus, M. & Pennell, K. D.:** Multigenerational metabolic profiling in the Michigan PBB registry. *Environ Res*, **172**, 182–193 (2019).

16. **Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T. & Fukusaki, E.:** GC/MS based metabolomics: Development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinform*, **12**, 131(2011).
17. **Tsugawa, H., Bamba, T., Shinohara, M., Nishiumi, S., Yoshida, M. & Fukusaki, E.:** Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis. *J Biosci Bioeng*, **112**, 292– 298 (2011).
18. **Mastrangelo, A., Ferrarini, A., Rey-Stolle, F., García, A. & Barbas, C.:** From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Anal Chim Acta*, **900**, 21–35 (2015)
19. **Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N. & Willmitzer, L.:** Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol*, **18**, 1157– 61(2000).
20. **Matsuo, T., Tsugawa, H., Miyagawa, H. & Fukusaki, E.:** Integrated Strategy for Unknown EI-MS Identification Using Quality Control Calibration Curve, Multivariate Analysis, EI-MS Spectral Database, and Retention Index Prediction. *Anal Chem*, **89**, 6766–6773(2017).
21. **Oliver Fiehn:** Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. *Curr Protoc Mol Biol.*, **7**, 30.4.1– 30.4.32 (2017).
22. **Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. & Fernie, A. R.:** Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc*, **1**, 387–396 (2006).
23. **Villas-Bôas, S. G., Smart, K. F., Sivakumaran, S. & Lane, G. A.:** Alkylation

or silylation for analysis of amino and non-amino organic acids by GC-MS? *Metabolites*, **1**, 3–20 (2011).

24. **Lu, W., Bennett, B. D. & Rabinowitz, J. D.:** Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **871**, 236–42 (2008).

25. **Zhao, S. & Li, L.:** Chemical derivatization in LC-MS-based metabolomics study. *Trends Anal Chem*, **131**, 115988 (2020)

26. **Luo, B., Groenke, K., Takors, R., Wandrey, C. & Oldiges, M.:** Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1147**, 153–164 (2007).

27. **Nakatani, K., Izumi, Y., Takahashi, M. & Bamba, T.:** Unified-Hydrophilic-Interaction/Anion-Exchange Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Unified-HILIC/AEX/MS): A Single-Run Method for Comprehensive and Simultaneous Analysis of Polar Metabolome. *Anal Chem*, **94**, 16877–16886 (2022).

28. **Hirayama, A., Igarashi, K., Tomita, M. & Soga, T.:** Development of quantitative method for determination of γ -glutamyl peptides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry: An efficient approach avoiding matrix effect. *J Chromatogr A*, **1369**, 161–169 (2014).

29. **Kloepfer, A., Quintana, J. B. & Reemtsma, T.:** Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography- electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J Chromatogr A*, **1067**, 153–160 (2005).

30. **Harada, K., Ohyama, Y., Tabushi, T., Kobayashi, A. & Fukusaki, E.:** Quantitative analysis of anionic metabolites for *Catharanthus roseus* by capillary electrophoresis using sulfonated capillary coupled with electrospray ionization-tandem

mass spectrometry. *J Biosci Bioeng*, **105**, 249–260 (2008).

31. **Soga, T., Igarashi, K., Ito, C., Mizobuchi, K., Zimmermann, H. P. & Tomita, M.:** Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem*, **81**, 6165–6174 (2009).

32. **Soga, T.:** Advances in capillary electrophoresis mass spectrometry for metabolomics. *Trends Anal Chem*, **158**, 116883 (2023)

33. **Igarashi, K., Ota, S., Kaneko, M., Hirayama, A., Enomoto, M., Katumata, K., Sugimoto, M. & Soga, T.:** High-throughput screening of salivary polyamine markers for discrimination of colorectal cancer by multisection injection capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1652**, 462355 (2021).

34. **Cajka, T. & Fiehn, O.:** Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal Chem*, **88**, 524–545 (2016)

35. **Lee, D. Y., Kind, T., Yoon, Y. R., Fiehn, O. & Liu, K. H.:** Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma. *Anal Bioanal Chem*, **406**, 7275–86 (2014).

36. **Stevens, V. L., Hoover, E., Wang, Y. & Zanetti, K. A.:** Pre-analytical factors that affect metabolite stability in human urine, plasma, and serum: A review. *Metabolites*, **9**, 156 (2019)

37. **Saude, E. J. & Sykes, B. D.:** Urine stability for metabolomic studies: Effects of preparation and storage. *Metabolomics*, **3**, 19–27 (2007).

38. **Breier, M., Wahl, S., Prehn, C., Fugmann, M., Ferrari, U., Weise, M., Banning, F., Seissler, J., Grallert, H., Adamski, J. & Lechner, A.:** Targeted metabolomics identifies reliable and stable metabolites in human serum and plasma

samples. *PLoS One*, **9**, e89728 (2014).

39. **Beale, D. J., Pinu, F. R., Kouremenos, K. A., Poojary, M. M., Narayana, V. K., Boughton, B. A., Kanojia, K., Dayalan, S., Jones, O. A. H. & Dias, D. A.:** Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics*, **14**, 152 (2018)

40. **Pagliano, E., Campanella, B., D’Ulivo, A. & Mester, Z.:** Derivatization chemistries for the determination of inorganic anions and structurally related compounds by gas chromatography - A review. *Anal Chim Acta*, **1025**, 12–40 (2018).

41. **Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D.:** Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*, **26**, 51–78 (2007).

42. **Takeo, E., Sasano, R., Shimma, S., Bamba, T. & Fukusaki, E.:** Solid-phase analytical derivatization for gas-chromatography–mass-spectrometry-based metabolomics. *J Biosci Bioeng*, **124**, 700–706 (2017).

43. **Yamashita, H., Nishiyama, M., Ohbuchi, K., Kanno, H., Tsuchiya, K., Yamaguchi, J., Mizuno, T., Ebata, T., Nagino, M. & Yokoyama, Y.:** Predicting Inchinkoto efficacy, in patients with obstructive jaundice associated with malignant tumors, through pharmacomicrobiomics. *Pharmacol Res*, **175**, 105981 (2022).

44. **Yamamoto, K., Taniguchi, M., Nakahara, T., Ito, Y., Sasano, R. & Fukusaki, E.:** Metabolomic investigation of differences in components and taste between hon-mirin and mirin-like-seasoning. *J Biosci Bioeng*, **132**, 599–605 (2021).

45. **Aresta, A., Cotugno, P. & Zambonin, C.:** Solid-phase microextraction and on-fiber derivatization for assessment of mammalian and vegetable milks with emphasis on the content of major phytoestrogens. *Sci Rep*, **9**, 6398 (2019).

46. **de Souza, J. R. B., Dias, F. F. G., Caliman, J. D., Augusto, F. & Hantao, L. W.:** Opportunities for green microextractions in comprehensive two-dimensional gas

chromatography / mass spectrometry-based metabolomics – A review. *Anal Chim Acta*, **1040**, 1–18 (2018)

47. **Viñas, P., Campillo, N., Martínez-Castillo, N. & Hernández-Córdoba, M.:** Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1216**, 1279–1284 (2009).

48. **Miyazaki, S., Ota, S., Morisato, K., Nakanishi, K., Ohira, M. & Tanaka, N.:** Preparation and Evaluation of Monolithic Silica Columns for HPLC. *CHROMATOGRAPHY*, **32**, 87–94, (2011).

49. **Mori, A., Taniguchi, M., Kuboniwa, M., Amano, A. & Fukusaki, E.:** Profiling volatile compounds from culture supernatants of periodontal bacteria using gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry analysis with a monolithic silica gel adsorption device. *J Biosci Bioeng*, **134**, 77–83 (2022).

50. **Osafune, Y., Toshida, K., Han, J., Kishimoto, T., Iizuka-Furukawa, S., Isogai, A. & Mukai, N.:** Identification of 2-furanmethanethiol contributing to roast aroma in honkaku shochu and awamori. *J Biosci Bioeng*, **133**, 555–559 (2022).

51. **Liu, C., Liu, X., Tian, X., Zhang, J., Zhang, Z., Shi, J., Xu, J. & Ren, X.:** Determination of volatile profiles inside apple fruit storage facilities using MonotrapTM monolithic silica adsorbent and GC–MS. *Hortic Plant J*, **7**, 267–274 (2021).

52. **Namera, A., Saito, T., Ota, S., Miyazaki, S., Oikawa, H., Murata, K. & Nagao, M.:** Optimization and application of octadecyl-modified monolithic silica for solid-phase extraction of drugs in whole blood samples. *J Chromatogr A*, **1517**, 9–17 (2017).

53. **Usui, K., Kubota, E., Kobayashi, H., Fujita, Y., Hatanaka, K., Kamijo, Y., Funayama, M. & Mimasaka, S.:** Detection of major psychoactive compounds (safrole,

myristicin, and elemicin) of nutmeg in human serum via GC–MS/MS using MonoSpin® extraction: Application in a nutmeg poisoning case. *J Pharm Biomed Anal*, **234**, 115565 (2023).

54. **El Deeb, S.:** Monolithic silica for fast HPLC: Current success and promising future. *Chromatographia*, **74**, 681-691 (2011)

55. **Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. & Dreyer, W. J.:** A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Bio Chem*, **256**, 7990-7997 (1981).

56. 上田昭, 原田亨, 森田直樹, 大杉義彰: タンパク質一次構造分析装置 PSQ-1システムとその応用. 島津評論, **46**, 207–215 (1989).

57. **McCloskey, D., Gangoiti, J. A., Palsson, B. O. & Feist, A. M.:** A pH and solvent optimized reverse-phase ion-pairing-LC–MS/MS method that leverages multiple scan-types for targeted absolute quantification of intracellular metabolites. *Metabolomics*, **11**, 1338–1350 (2015).

58. **Li, P., Su, M., Chatterjee, M. & Lämmerhofer, M.:** Targeted analysis of sugar phosphates from glycolysis pathway by phosphate methylation with liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, **1221**, 340099 (2022).

59. **Rende, U., Niittylä, T. & Moritz, T.:** Two-step derivatization for determination of sugar phosphates in plants by combined reversed phase chromatography/tandem mass spectrometry. *Plant Methods*, **15**, 127 (2019).

60. **Han, J., Tschernutter, V., Yang, J., Eckle, T. & Borchers, C. H.:** Analysis of selected sugars and sugar phosphates in mouse heart tissue by reductive amination and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, **85**, 5965–5973 (2013).

61. **Meng, X., Pang, H., Sun, F., Jin, X., Wang, B., Yao, K., Yao, L., Wang, L. &**

Hu, Z.: Simultaneous 3-Nitrophenylhydrazine Derivatization Strategy of Carbonyl, Carboxyl and Phosphoryl Submetabolome for LC-MS/MS-Based Targeted Metabolomics with Improved Sensitivity and Coverage. *Anal Chem*, **93**, 10075–10083 (2021).

62. **Sheng, N., Zhao, H., Chen, X., Wang, D., Li, M., Wang, Z., Zhang, J. & Jiang, J.:** A novel derivatization strategy for profiling phosphate ester/anhydride metabolic network and application on glioma rats using HILIC-MS/MS. *Talanta*, **228**, 122238 (2021).

63. **Kvitvang, H. F. N., Andreassen, T., Adam, T., Villas-Bôas, S. G. & Bruheim, P.:** Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids. *Anal Chem*, **83**, 2705–2711 (2011).

64. **Smart, K. F., Aggio, R. B. M., Van Houtte, J. R. & Villas-Bôas, S. G.:** Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Nat Protoc*, **5**, 1709–1729 (2010).

65. **Villas-Bôas, S. G., Delicado, D. G., Åkesson, M. & Nielsen, J.:** Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, **322**, 134–138 (2003).

66. **Okahashi, N., Maeda, K., Kawana, S., Iida, J., Shimizu, H. & Matsuda, F.:** Sugar phosphate analysis with baseline separation and soft ionization by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry improves flux estimation of bidirectional reactions in cancer cells. *Metab Eng*, **51**, 43–49 (2019).

67. **Ikeda, A., Nishiumi, S., Shinohara, M., Yoshie, T., Hatano, N., Okuno, T., Bamba, T., Fukusaki, E., Takenawa, T., Azuma, T. & Yoshida, M.:** Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. *Biomedical Chromatography*,

26, 548–558 (2012).

68. **Rahmawati, D., Astawan, M., Putri, S. P. & Fukusaki, E.:** Gas chromatography-mass spectrometry-based metabolite profiling and sensory profile of Indonesian fermented food (tempe) from various legumes. *J Biosci Bioeng*, **132**, 487–495 (2021).

69. **Liebich, H. M. & Gesele, E.:** Profiling of organic acids by capillary gas chromatography-mass spectrometry after direct methylation in urine using trimethyloxonium tetrafluoroborate. *J Chromatogr A*, **843**, 237–245 (1999).

70. **Li, Z., Zhang, H. X., Li, Y., Lam, C. W. K., Wang, C. Y., Zhang, W. J., Wong, V. K. W., Pang, S. S., Yao, M. C. & Zhang, W.:** Method for Quantification of Ribonucleotides and Deoxyribonucleotides in Human Cells Using (Trimethylsilyl)diazomethane Derivatization Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **91**, 1019–1026 (2019).

71. **Li, P. & Lämmerhofer, M.:** Generation of ¹³C-Labeled Inositol and Inositol Phosphates by Stable Isotope Labeling Cell Culture for Quantitative Metabolomics. *Anal Chem*, **94**, 15332–15340 (2022).

72. **Topolewska, A., Czarnowska, K., Haliński, Ł. P. & Stepnowski, P.:** Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **990**, 150–157 (2015).

73. **Amphaisri, K., Palit, M. & Mallard, G.:** Thermally assisted methylation and subsequent silylation of scheduled acids of chemical weapon convention for on-site analysis and its comparison with the other methods of methylation. *J Chromatogr A*, **1218**, 972–980 (2011).

74. **Migowska, N., Stepnowski, P., Paszkiewicz, M., Gołębiowski, M. &**

Kumirska, J.: Trimethylsilyldiazomethane (TMSD) as a new derivatization reagent for trace analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by gas chromatography methods. *Anal Bioanal Chem*, **397**, 3029–3034 (2010).

75. **Ruiz-Matute, A. I., Hernández-Hernández, O., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, M. L. & Martínez-Castro, I.:** Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **879**, 1226–1240 (2011)

76. **Islam, M. A., Lee, J. & Yoo, S. H.:** Effect of oximation reagents on gas chromatographic separation of eight different kinds of mono- and di-saccharides. *Food Chem*, **386**, 132797 (2022).

77. **Dunn, W. B., Broadhurst, D., Ellis, D. I., Brown, M., Halsall, A., O'Hagan, S., Spasic, I., Tseng, A. & Kell, D. B.:** A GC-TOF-MS study of the stability of serum and urine metabolomes during the UK Biobank sample collection and preparation protocols. *Int J Epidemiol*, **37**, i23–i30 (2008).

78. **Laparre, J., Kaabia, Z., Mooney, M., Buckley, T., Sherry, M., Le Bizec, B. & Dervilly-Pinel, G.:** Impact of storage conditions on the urinary metabolomics fingerprint. *Anal Chim Acta*, **951**, 99–107 (2017).

79. **Moriya, T., Satomi, Y. & Kobayashi, H.:** Intensive determination of storage condition effects on human plasma metabolomics. *Metabolomics*, **12**, 179 (2016).

80. **Anton, G., Wilson, R., Yu, Z. H., Prehn, C., Zukunft, S., Adamski, J., Heier, M., Meisinger, C., Römisch-Margl, W., Wang-Sattler, R., Hveem, K., Wolfenbuttel, B., Peters, A., Kastenmüller, G. & Waldenberger, M.:** Pre-analytical sample quality: Metabolite ratios as an intrinsic marker for prolonged room temperature exposure of serum samples. *PLoS One*, **10**, e0121495 (2015).

81. **Hirayama, A., Sugimoto, M., Suzuki, A., Hatakeyama, Y., Enomoto, A., Harada, S., Soga, T., Tomita, M. & Takebayashi, T.:** Effects of processing and storage

conditions on charged metabolomic profiles in blood. *Electrophoresis*, **36**, 2148–2155 (2015).

82. **Pinto, J., Domingues, M. R. M., Galhano, E., Pita, C., Do Céu Almeida, M., Carreira, I. M. & Gil, A. M.:** Human plasma stability during handling and storage: Impact on NMR metabolomics. *Analyst*, **139**, 1168–1177 (2014).

83. **Chen, D., Han, W., Huan, T., Li, L. & Li, L.:** Effects of Freeze-Thaw Cycles of Blood Samples on High-Coverage Quantitative Metabolomics. *Anal Chem*, **92**, 9265–9272 (2020).

84. **Stevens, V. L., Hoover, E., Wang, Y. & Zanetti, K. A.:** Pre-analytical factors that affect metabolite stability in human urine, plasma, and serum: A review. *Metabolites*, **9**, 156 (2019)

85. **Utpott, M., Rodrigues, E., Rios, A. de O., Mercali, G. D. & Flôres, S. H.:** Metabolomics: An analytical technique for food processing evaluation. *Food Chem*, **366**, 130685 (2022)

学術論文

1. **Kawamura, K., & Fukusaki, E.**: Novel sampling and gas-phase derivatization strategy: proof-of-concept by profiling ionic polar metabolites using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Biosci. Bioeng.* 138, 462-468 (2024) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2024.07.019.

※本学位論文に關与する論文

2. **Kawamura, K., & Fukusaki, E.**: Application of silica monoliths for improved storage stability of metabolites in human plasma. *J. Biosci. Bioeng.* (Revised)

※本学位論文に關与する論文

学会発表

国際学会・シンポジウムにおける発表

1. **Kawamura, K.**, & Fukusaki, E. “A Novel Sampling and Gas-Phase Derivatization Strategy: Proof of Concept for Profiling of Ionic Polar Metabolites Using Gas Chromatograph-Mass Spectrometry” Metabolomics 2024, Japan, June (2024).
2. **Kawamura, K.**, & Fukusaki E. “A Novel Sampling and Gas-Phase Derivatization Strategy Using Silica Monoliths for Gas Chromatography-Mass Spectrometry-based Metabolomics” The International Symposium on Chromatography 2024, United Kingdom, October (2024).

国内学会・シンポジウムにおける発表

1. **河村和広**, 福崎英一郎「シリカモノリスを担体としたイオン性極性代謝物の新規ガスフェーズ誘導体化-GC/MS 法の開発」第 17 回メタボロームシンポジウム, 神奈川, 2023 年 10 月.
2. **河村和広**, 熊野泰斗, 福崎英一郎「シリカモノリス担体を用いたサンプル保管における代謝物安定性向上の検討」第 18 回メタボロームシンポジウム, 山形, 2024 年 10 月.

出願特許

1. 河村和広, 福崎英一郎「代謝物の分析前処理方法」, 特願 2023-149345.

書籍等

1. 河村和広, 他, ガスクロ自由自在 Q&A GC/MS 編. 丸善出版株式会社, (2024).

謝辞

本論文は、著者が大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻において行った研究をまとめたものです。

本研究を遂行するにあたり、大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 福崎英一郎 教授には、日頃から多大なるご指導とご鞭撻を賜りました。謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻 松田史生 教授、大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 青木航 教授には、有益なご指導、ご助言およびご校閲を賜りました。厚く感謝申し上げます。

大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 新間秀一 准教授、Sastia Prama PUTRI 准教授には、ご指導ならびに日頃からの貴重なご助言を頂きました。心から感謝申し上げます。

大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所 飯田順子 特任教授、中西博昭 特任教授には、研究の幅を広げる機会を与えていただいたとともに、日頃より温かい激励のお言葉を賜りました。また、研究所メンバーには、研究や実験に関するディスカッションおよび日頃の研究生生活の相談など様々なご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

福崎研究室の研究員、事務員、学生の方々には、研究生生活において様々な面でご協力を賜りました。特に、古野正浩 研究員、宿里ひとみ 研究員、楠香奈 研究員には、日頃より実験や研究生生活での相談に乗っていただきました。心より感謝申し上げます。

株式会社島津製作所分析計測事業部 向紀雄 部長(現 Kratos Group Plc. 副社長)、奥村大輔 部長、田中幸樹 部長(現 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 主幹)、尾島典行 プロダクトマネージャー、近藤友明 プロダクトマネージャー、大林賢一 課長はじめ MS ビジネスユニットのメンバーには、私の博士後

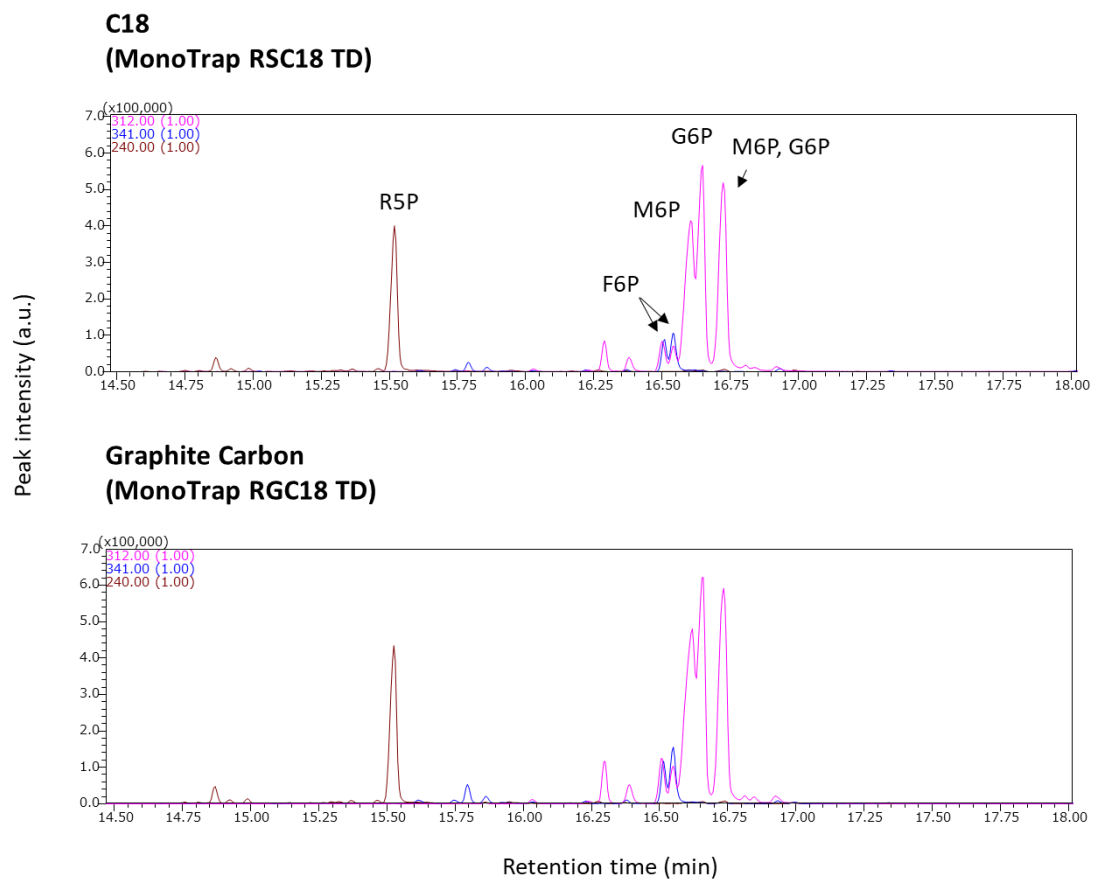
期課程での研究を様々な面でサポートいただきました。厚く感謝申し上げます。

最後に、博士後期課程への挑戦を応援してくれた妻、日々目覚ましい成長を見せてくれた娘に深い感謝の意を表して謝辞とします。

付録

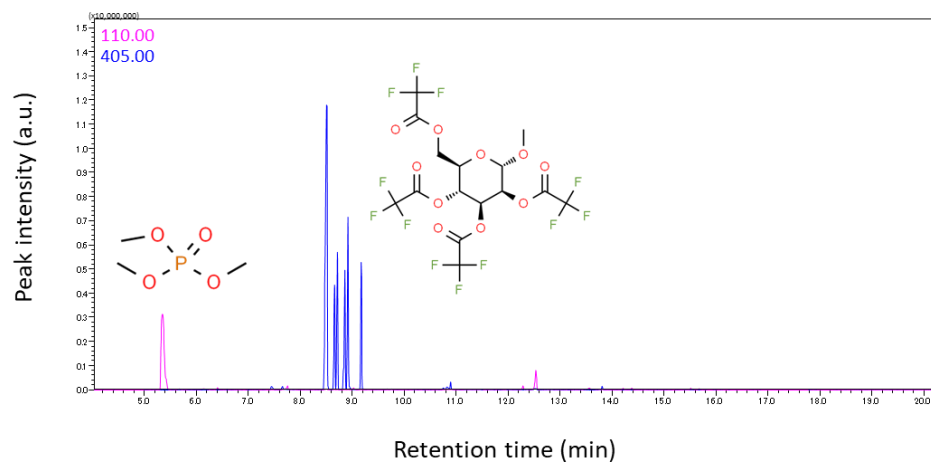
付録 1	異なる表面修飾の MonoTrap による糖リン酸の GSPD および TD-GC/MS 分析	79
付録 2	G6P の TMSD によるメチル化および TFAA によるトリフルオロアセチル化	80
付録 3	異なる加熱脱着温度 (200, 250, 300°C) における糖リン酸誘導体化物のピーク面積の比率	81
付録 4	GSPD によるヒト血漿連続分析の TIC.....	82
付録 5	GSPD によるメチル化・アセチル化された代謝物のマススペクトルおよび保持指標	83
付録 6	GC-MS および LC-MS/MS を基盤としたメタボロームプロファイリングによるヒト血漿の安定性	95

付録 1 異なる表面修飾の MonoTrap による糖リン酸の GSPD および TD-GC/MS 分析



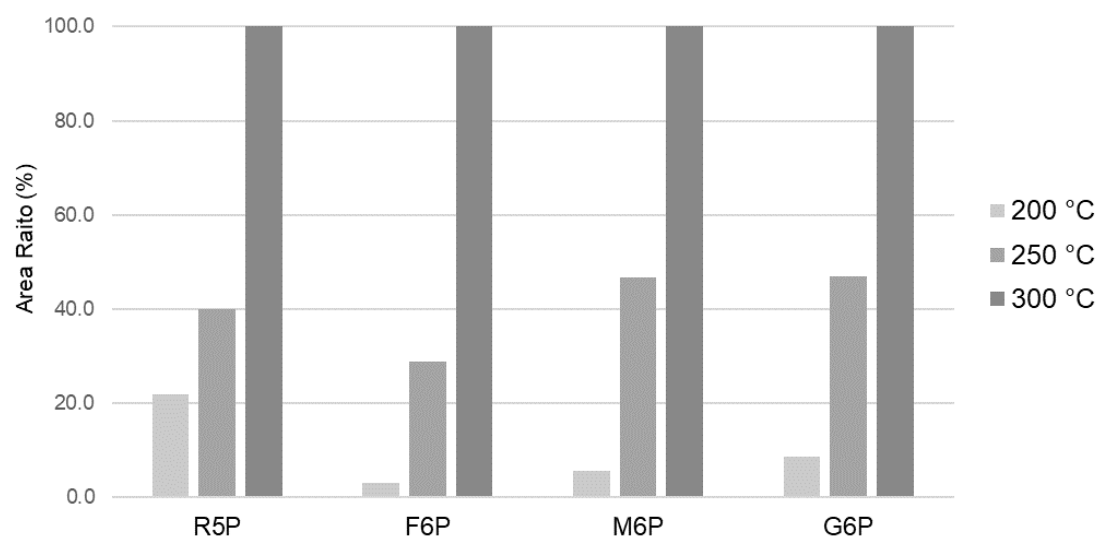
カラムは、SH-I-5 Sil MS カラム (30 m x 0.25 mm i.d., $df=0.25\ \mu\text{m}$) (株式会社島津製作所) を使用した. キャリアガスはヘリウム, スプリット比は 10:1, カラム流量は 1.0 mL/min とした. GC 温度プログラムは, 50°C で 2 分間維持し, 15°C/min で 320°C まで昇温し, 10 分間恒温した.

付録 2 G6P の TMSD によるメチル化および TFAA によるトリフルオロアセチル化

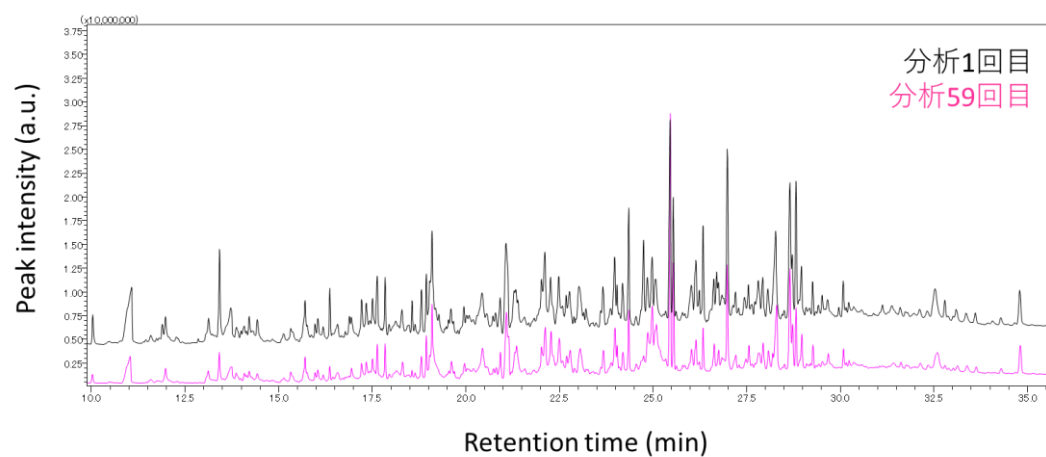


GSPD により、TMSD とメタノールを用いてメチル化 (60℃で 5 分間)を行った後、TFAA とピリジンを用いてトリフルオロアセチル化 (40℃で 30 分間)を行った。

付録3 異なる加熱脱着温度(200, 250, 300℃)における糖リン酸誘導体化物のピーク面積の比率



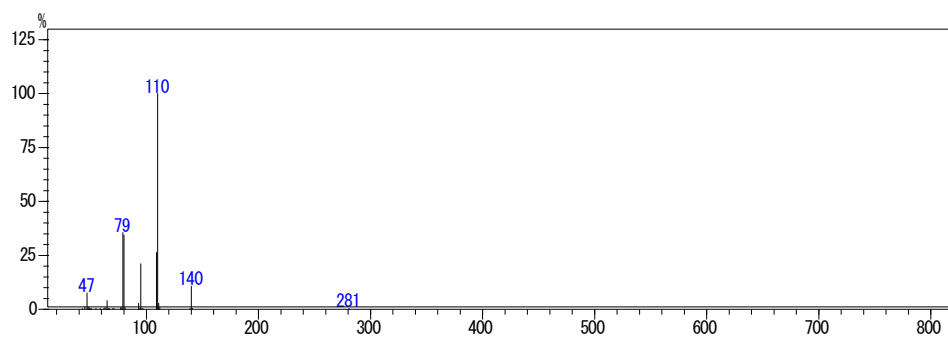
付録 4 GSPD によるヒト血漿連続分析の TIC



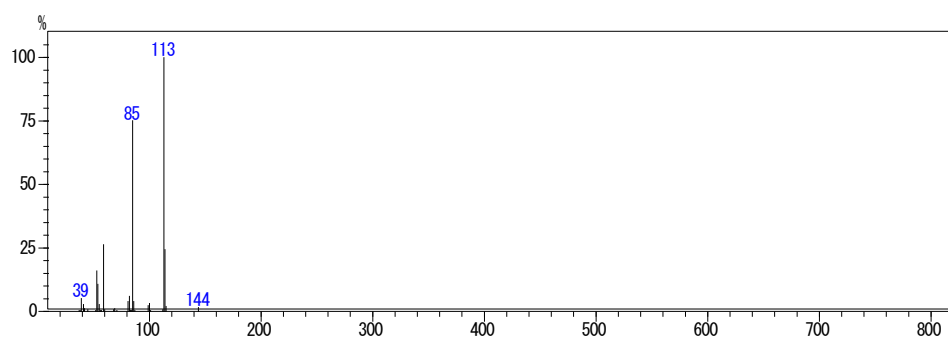
GSPD でメチル化およびアセチル化したヒト血漿連続分析の TIC (1 回目および 59 回目)

付録5 GSPDによるメチル化・アセチル化された代謝物のマススペクトルおよび保持指標

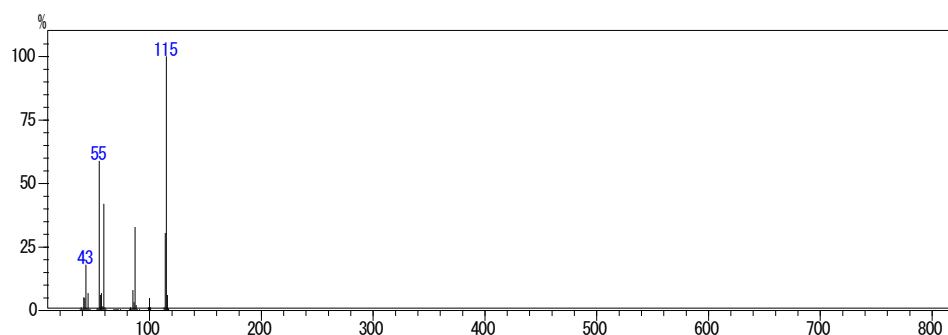
- Phosphoric acid (RI: 932)



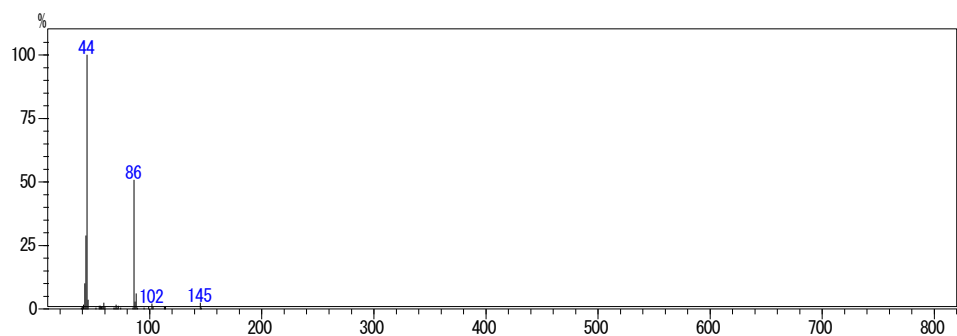
- Fumaric acid (RI: 1024)



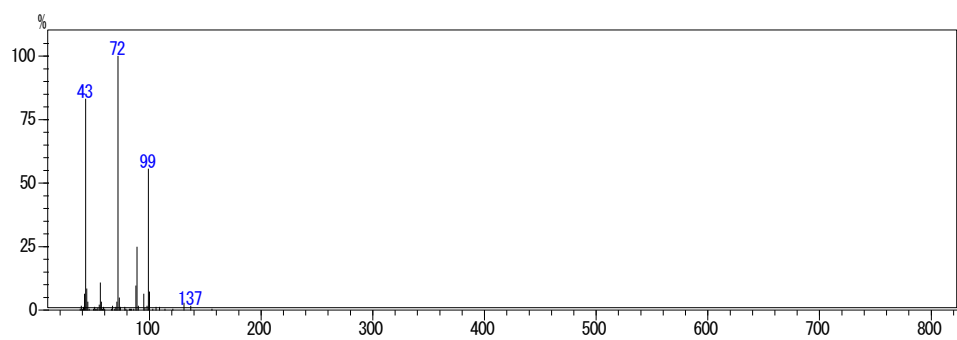
- Succinic acid (RI: 1031)



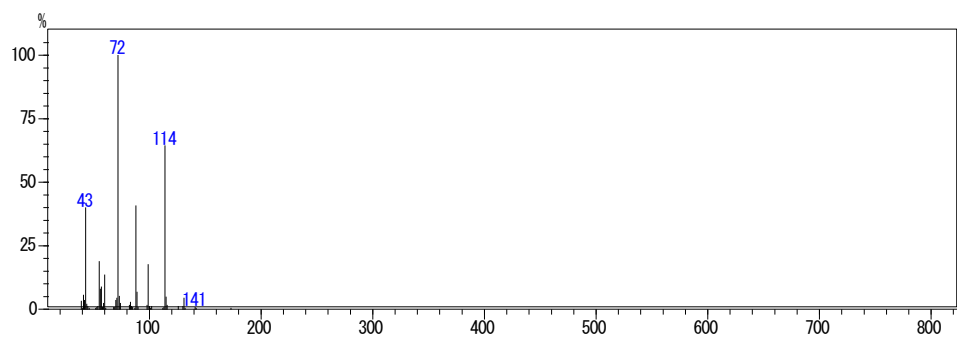
- Alanine (RI: 1123)



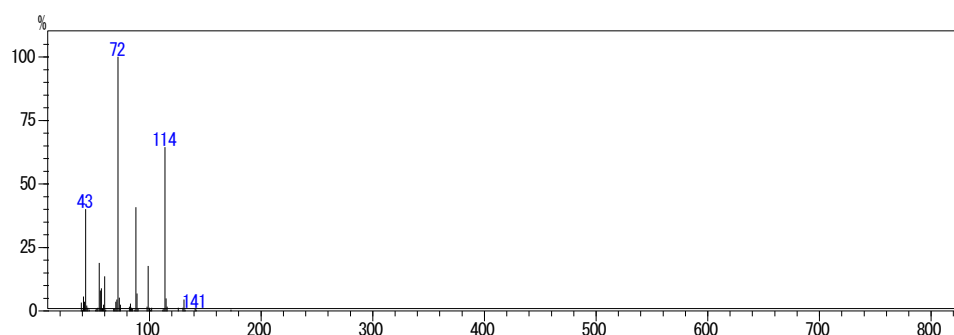
- Glycine (RI: 1129)



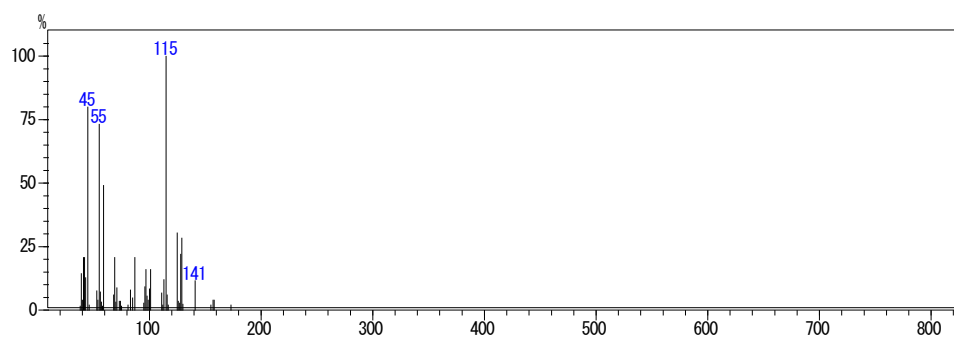
- Valine (RI: 1255)



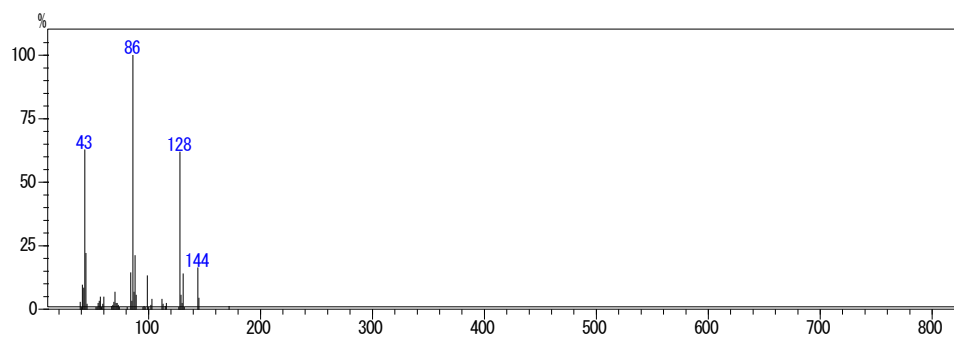
- Glycerol (RI: 1277)



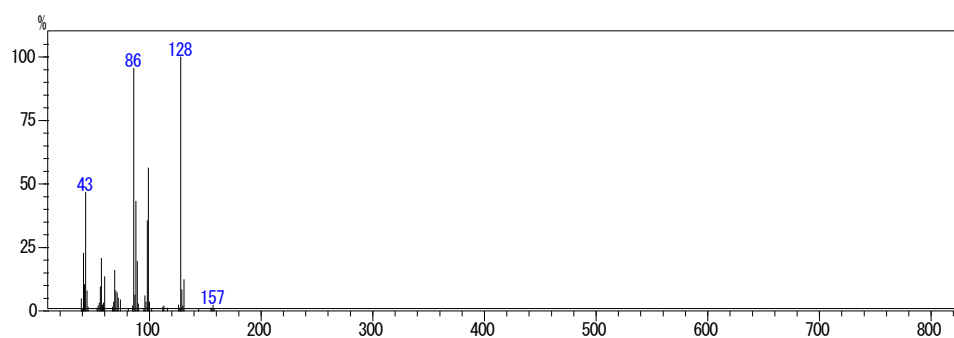
- 2-Ketoglutaric acid (RI: 1337)



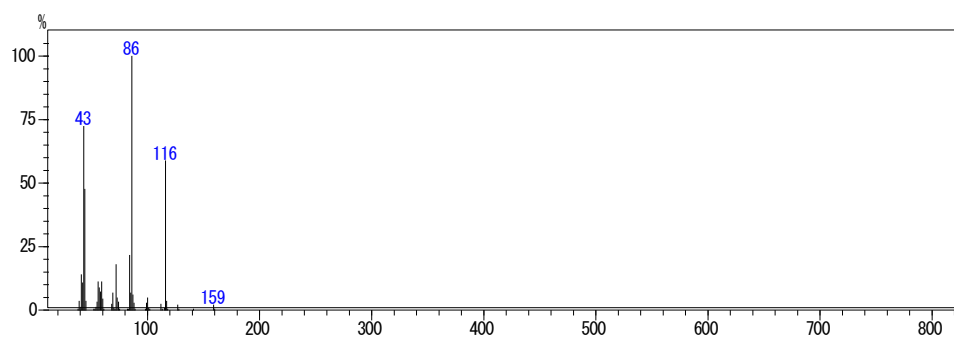
- Leucine (RI: 1337)



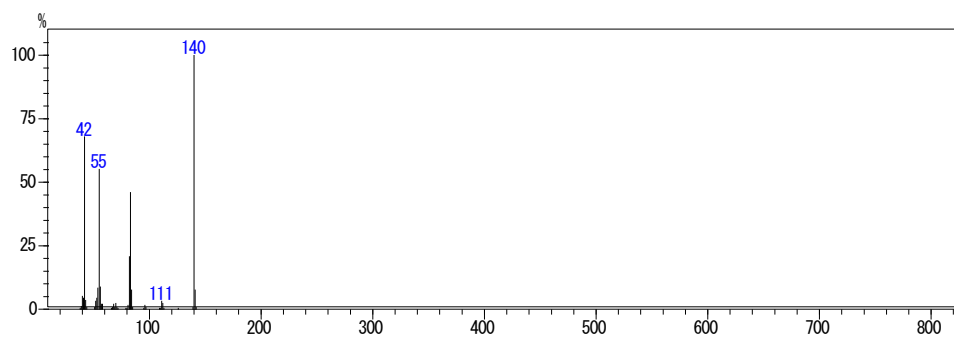
- Isoleucine (RI: 1350)



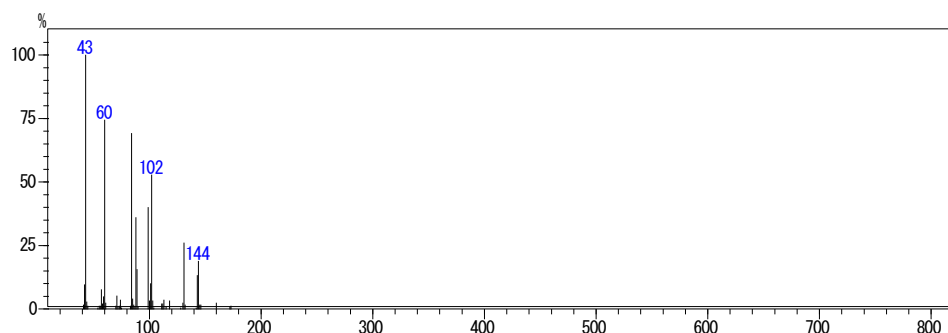
- 4-aminobutyrate (RI: 1365)



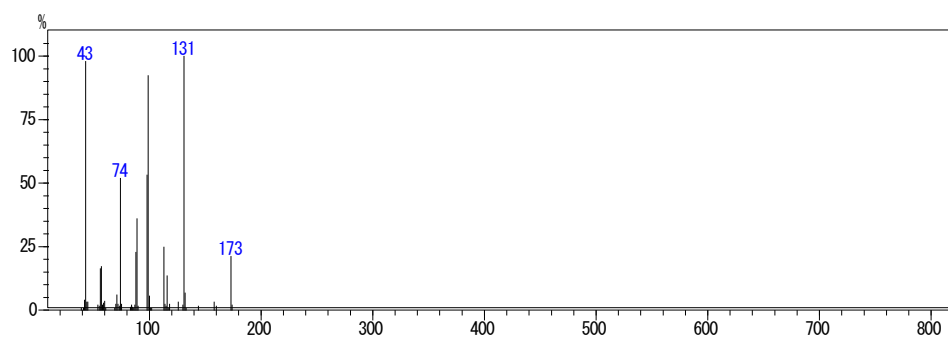
- Uracil (RI: 1420)



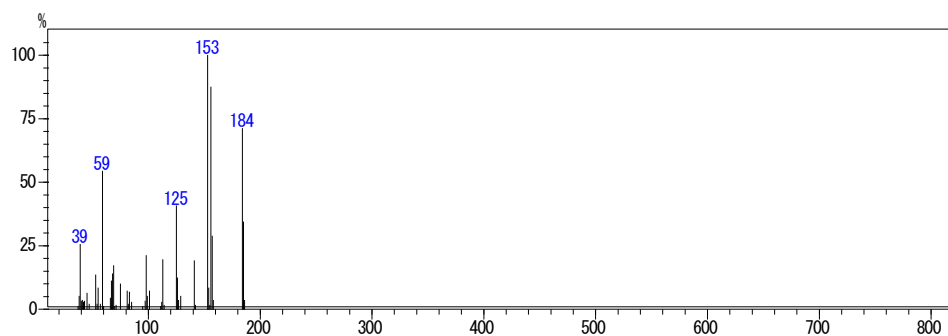
- Serine (RI: 1422)



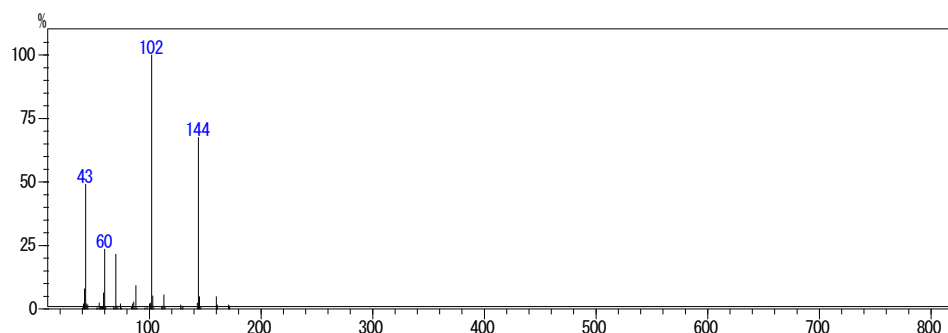
- Threonine (RI: 1425)



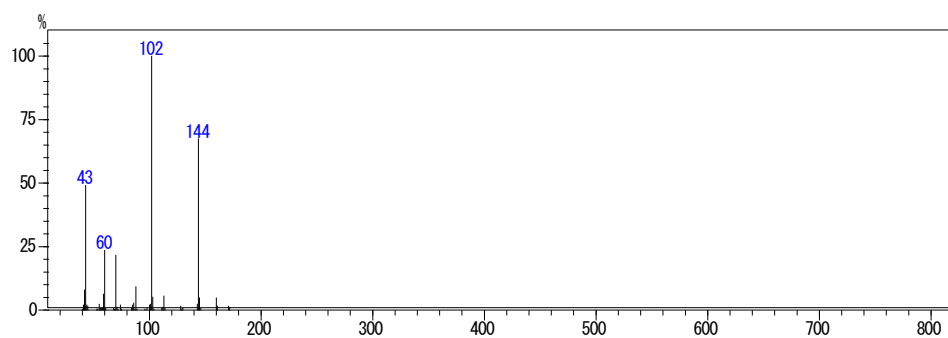
- Aconitic acid (RI: 1439)



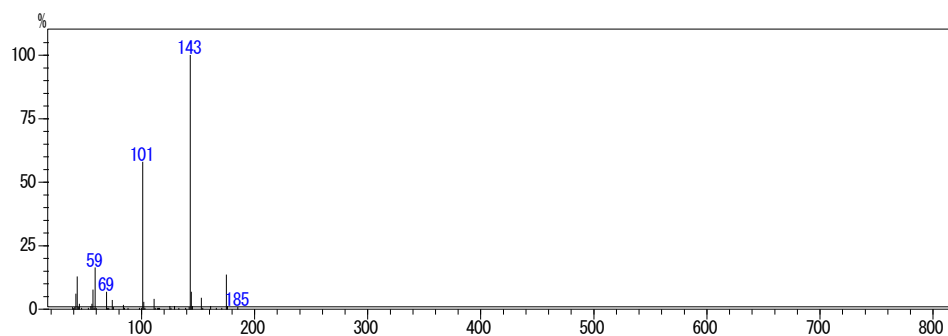
- Aspartic acid (RI: 1447)



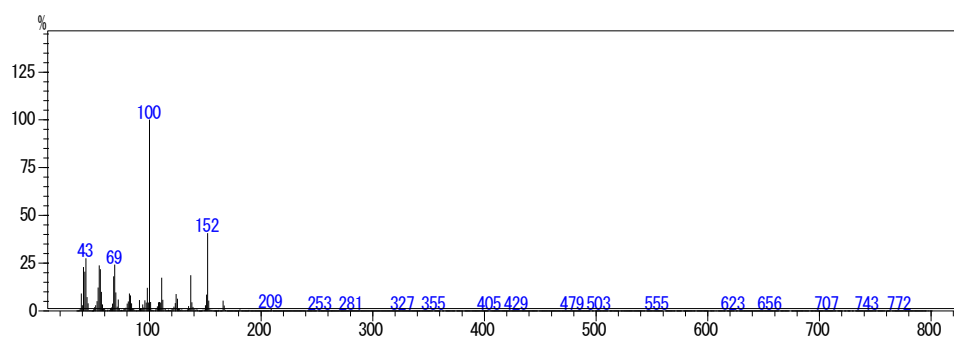
- Proline (RI: 1449)



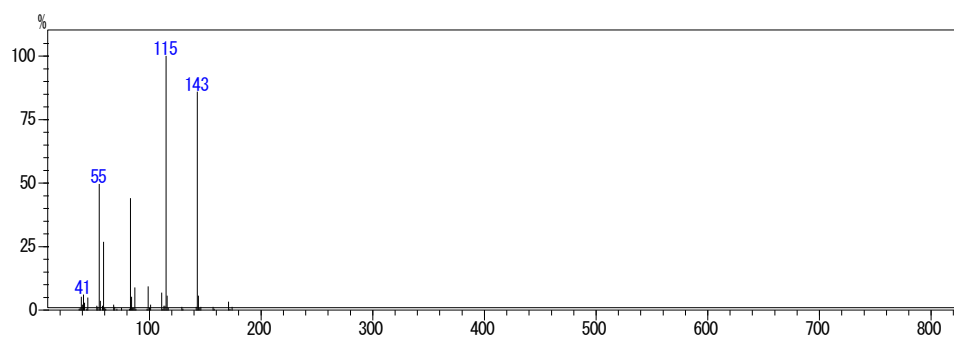
- Citric acid (RI: 1474)



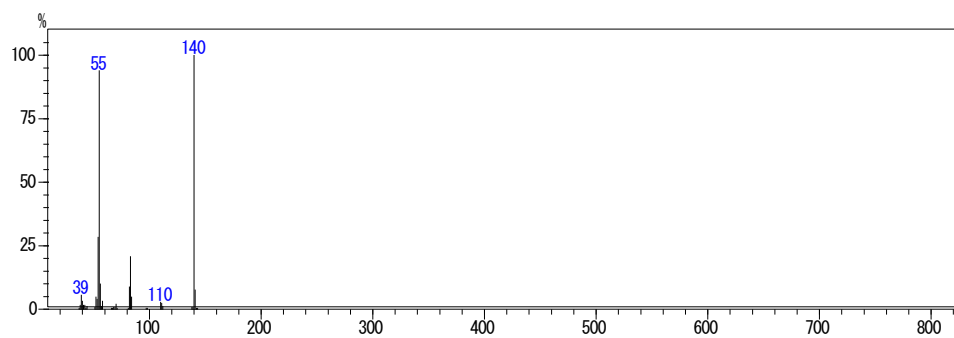
- Cysteine (RI: 1477)



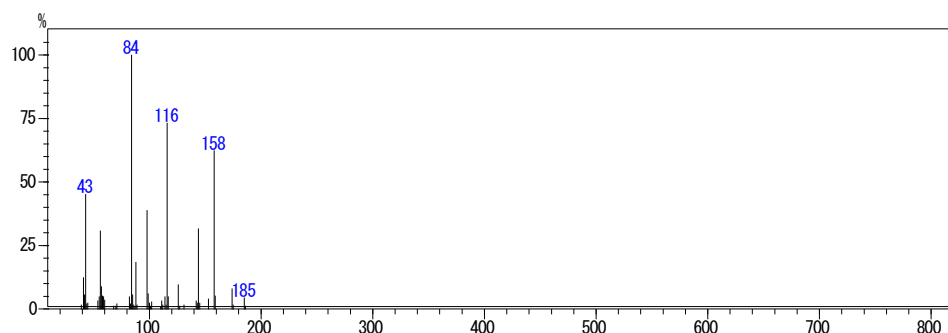
- Isocitric acid (RI: 1511)



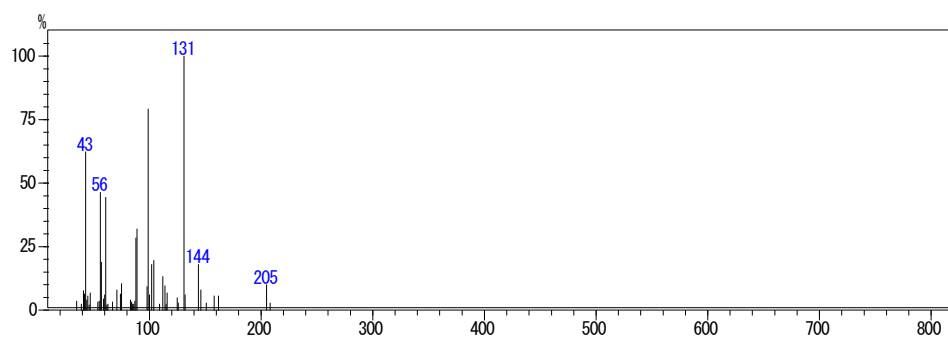
- Thymine (RI: 1573)



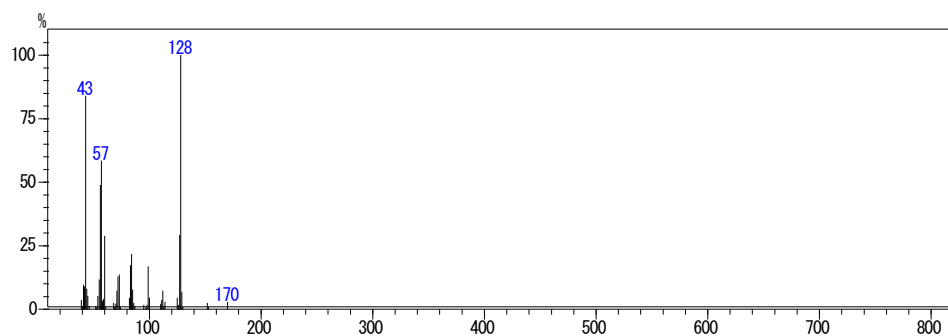
- Glutamic acid (RI: 1582)



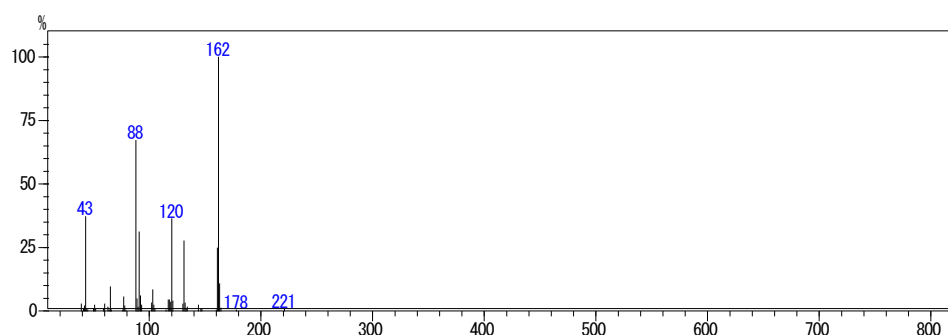
- Methionine (RI: 1607)



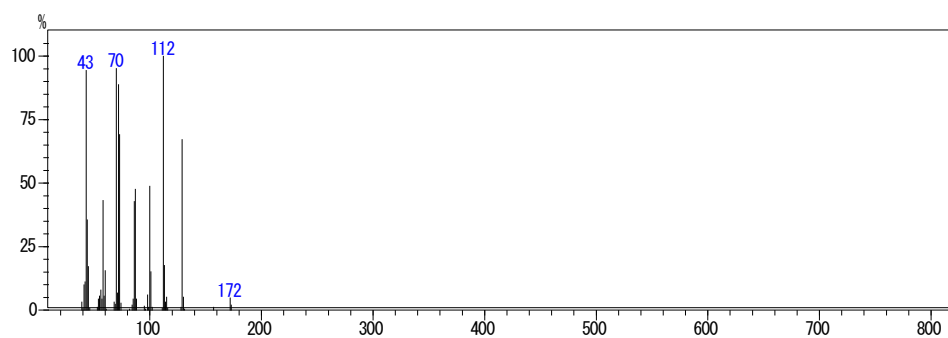
- Glutamine (RI: 1626)



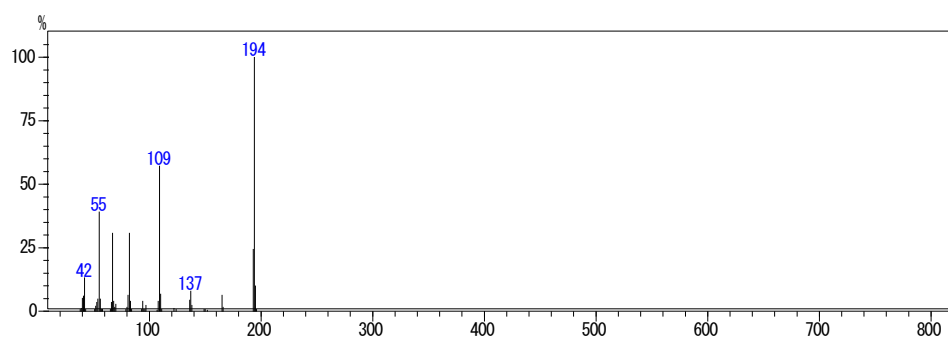
- Phenilalanine (RI: 1732)



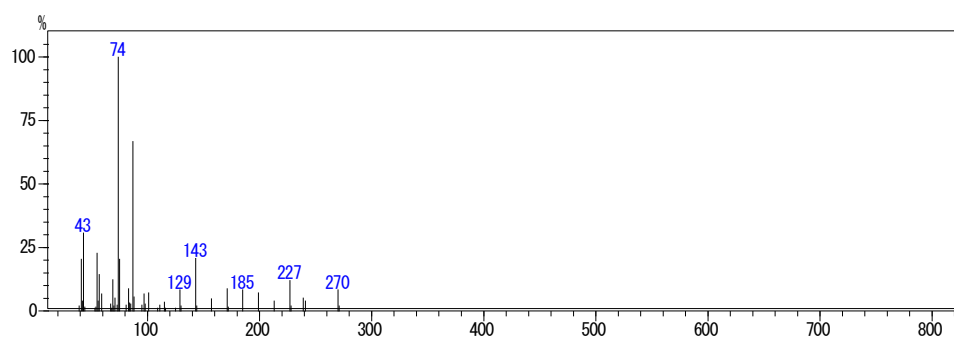
- 1,4-Butanediamine (RI: 1755)



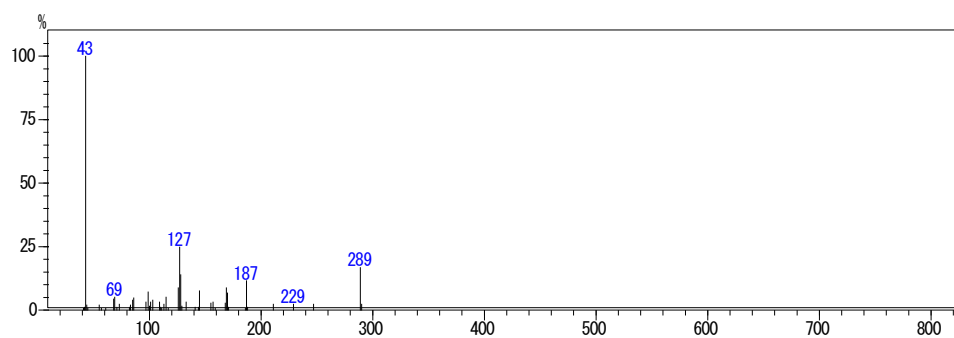
- Caffeine (RI: 1901)



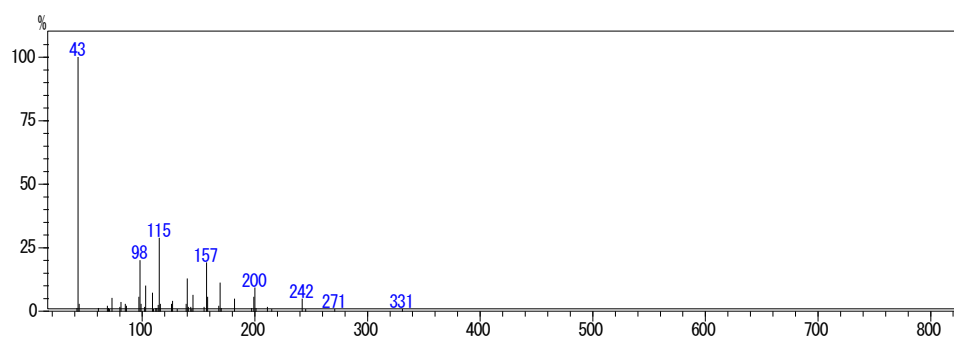
- Palmitic acid (RI: 1938)



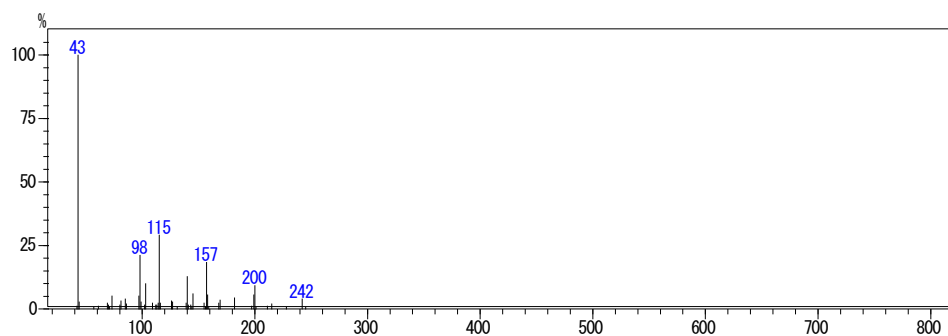
- Fructose (RI: 1957)



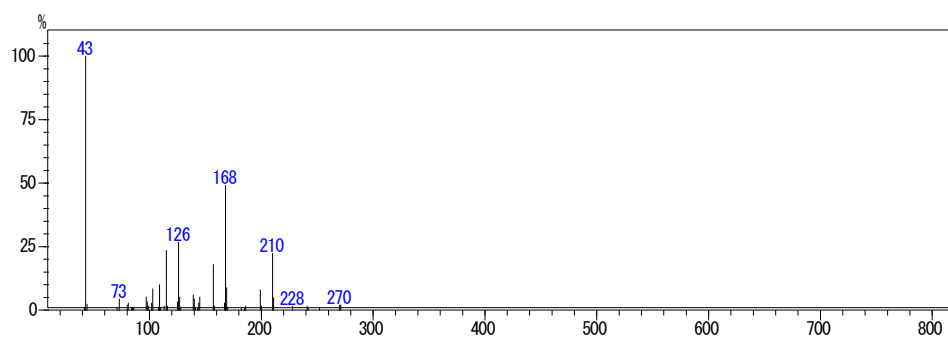
- Glucose isomer-1 (RI: 2042)



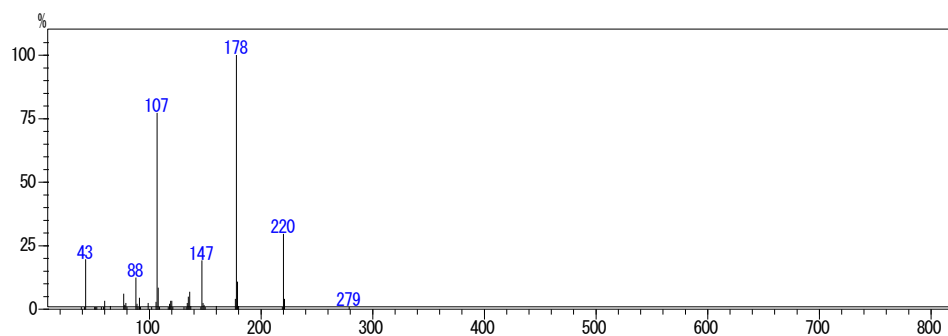
- Glucose isomer-2 (RI: 2052)



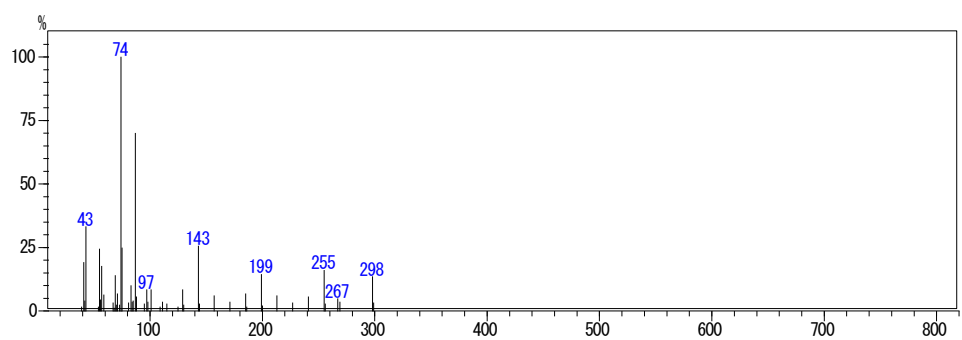
- myo-Inositol (RI: 2101)



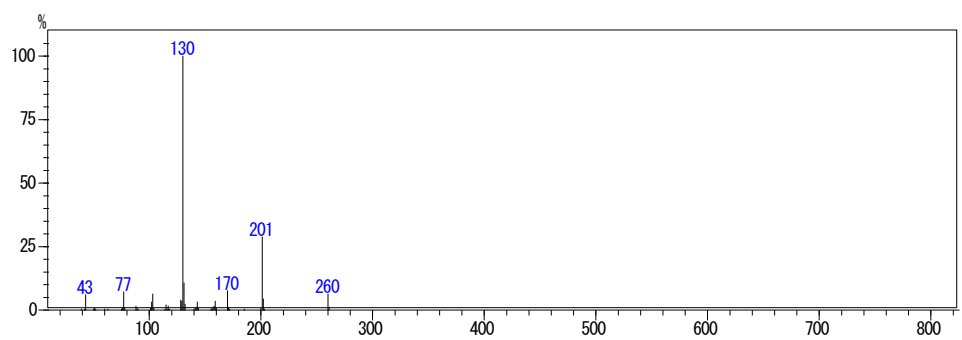
- Tyrosine (RI: 2113)



- Stearic acid (RI: 2141)



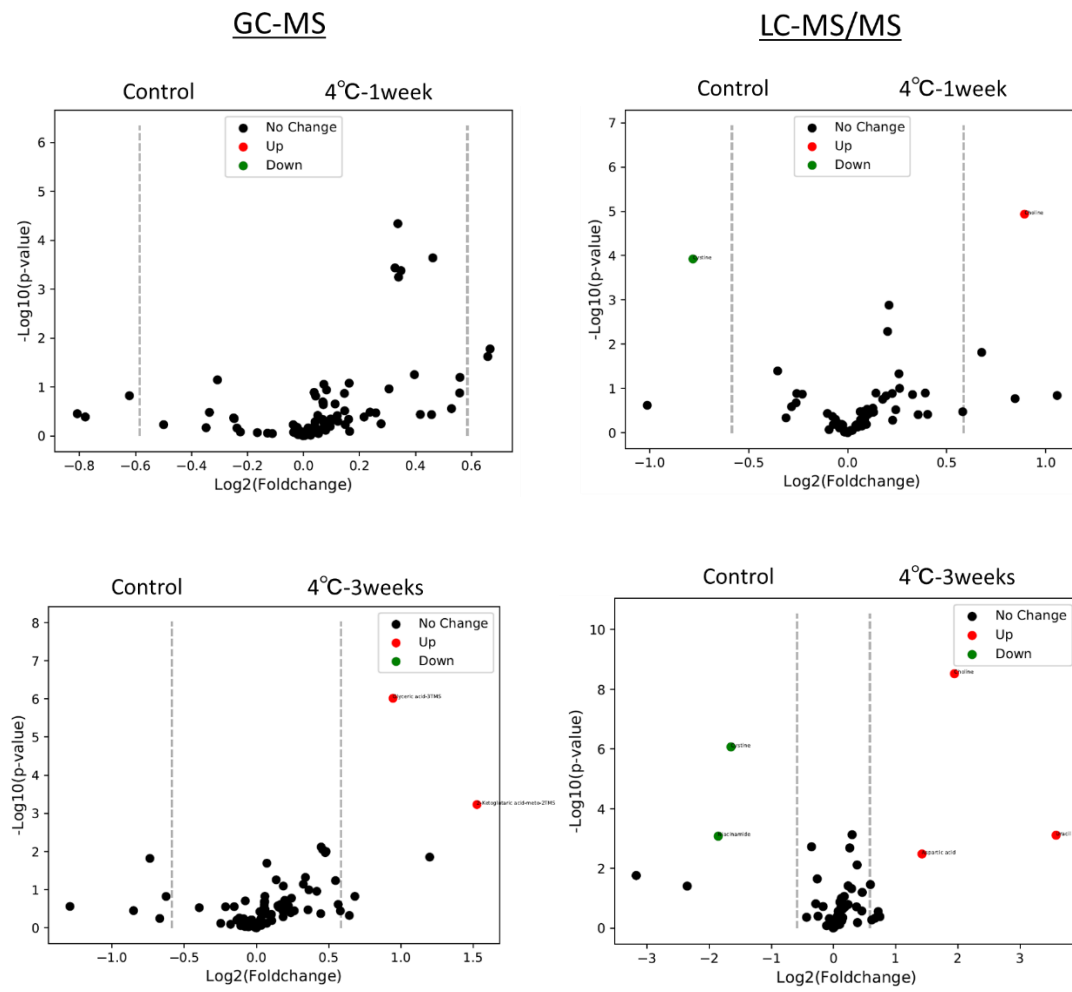
- Tryptophane (RI: 2425)



付録 6 GC-MS および LC-MS/MS を基盤としたメタボロームプロファイリングによるヒト血漿の安定性

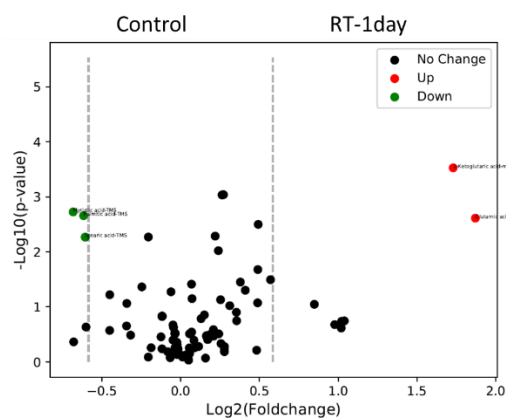
表 3-1 の条件で通常保管したヒト血漿を, GC-MS および LC-MS/MS によるメタボロームプロファイリングを行った. GC-MS は, 「2.2.5 溶液中での誘導体化」の手順で Bligh&Dyer 法による抽出と誘導体化を行った. 測定は, GCMS-TQ8050 NX (株式会社島津製作所)を用い, Smart Metabolites Database (株式会社島津製作所)に収載のメソッド (DB-5 カラム, スキャンモード)に従い測定した. LC-MS/MS は, Bligh&Dyer 法による抽出後, 水層を乾燥させ超純水で再溶解させた. 測定は, LCMS-8060 NX (株式会社島津製作所)を用い LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 (株式会社島津製作所)に収載のメソッド (Discovery HS F5-3 カラム, 非イオンペアメソッド, MRM モード)に従い測定した. 代謝物の同定とピーク面積値の算出には, LabSolutions Insight が用いられた. 統計解析には, マルチオミクス解析パッケージ (株式会社島津製作所)を用いた. 各サンプルは Volcano Plot (優位水準 $p < 0.01$)によりコントロールとの比較がなされた.

● 冷蔵(4℃)保管



● 室温(22℃)保管

GC-MS



LC-MS/MS

