第43回
日本医用マススペクトル学会年会

会　期

2018年9月6日(木)・7日(金)

会　場

北海道大学 学術交流会館

北海道札幌市北区北8条西5丁目

年会長

千葉 仁志

北海道大学大学院保健科学研究院 特別招へい教授

札幌保健医療大学 教授

第43回日本医用マススペクトル学会年会　事務局

年会長

千葉仁志（北海道大学大学院保健科学研究院 特別招へい教授
札幌保健医療大学栄養学科 教授）

事務局長

櫻井俊宏（北海道大学 大学院保健科学研究院）
古川貴之（同上、平成30年4月30日まで）

事務局

北海道大学 大学院保健科学研究院
惠　淑萍　布田博敏　武田晴治　陳　震
趙　瑶瑶　喬　琳　譚　慧　Wageh Darwish

北海道大学 大学院保健科学院
三浦佑介　山本祐輔　阮　郁甯　鈴木拓貴　呉　玥

北海道医療大学
高橋祐司

札幌保健医療大学
津久井隆行

北海道大学病院 検査・輸血部
秋沢宏次　福元達也　岩崎澄央　中野恵一

目 次

開催にあたって.....1

会場案内.....2

年会案内.....4

座長・演者の方へ.....6

ポスター発表の方へ.....7

若手優秀ポスター賞について.....9

日程表.....10

プログラム.....12

講演要旨

特別講演.....31

受賞講演（奨励賞）.....33

シンポジウム.....37

一般演題（ポスター発表）.....65

ランチョンセミナー.....155

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社共催
国際学術セミナー.....161

テクノロジーフォーラム.....163

日本医用マススペクトル学会認定講習会並びに認定試験のご案内.....168

学会賛助会員一覧.....169

年会協賛企業一覧.....170

展示企業一覧.....171

企業広告.....172

次回年会予告・奥付

第43回日本医用マススペクトル学会年会
開催にあたって

第43回日本医用マススペクトル学会年会
年会長　千葉 仁志
北海道大学大学院保健科学研究院 特別招へい教授
札幌保健医療大学栄養学科 教授

第43回日本医用マススペクトル学会年会を開催するにあたり、年会長からご挨拶を申し上げます。初めに、7月の豪雨災害とそれに続く猛暑、台風に被災された皆様には、この場を借りてお見舞い申し上げます。

年会初の北海道開催に感謝と責任を感じております。私と質量分析の出会いは35年前に遡ります。原発性アルドステロン症の診断法開発を目指してステロイドの合成実験をしている時に、GC/MSで構造解析をしました。その後の技術進歩は目覚ましく、第34回年会（池川繁男年会長）から本学会で勉強を続けています。浅学菲才ですが精一杯、努めます。

平成29年度末に質量分析装置が医療用装置として追加され、平成30年度診療報酬改正で細菌同定検査に質量分析装置加算が新設されました。本年会では「臨床と質量分析」をテーマに掲げ、臨床化学、臨床検査医学、自動化、血清・血漿のプロテオミクス、疾患関連リン脂質、薬物、イメージング、加齢・疾病対策の8領域のシンポジウムを設けました。医用質量分析の全容が分かる内容となっています。

特別講演には張新栄教授（清華大学）、国際学術セミナーにはProf. Xianlin Han（University of Texas Health San Antonio）をお招きしました。それぞれ、一細胞分析とリピッドミクスのトップ・ランナーですので、皆様に強い刺激を与えると思います。各種セミナー、展示、テクノロジーフォーラム、広告、寄附でご協力いただいた企業の皆様には厚く御礼申し上げます。

一般演題は89題で史上最多となりました。本学会の急速な成長に驚いています。ポスター討論は1日目の午前と午後に行います。一般演題数の増加を受けて、若手ポスター賞を5名（従来2名）に増やしました。評議員に若手ポスター賞の投票用紙を受付でお渡ししますので、時間内に投票をお済ませください。表彰式は1日目の懇親会（京王プラザホテル）で行います。北海道の素晴らしい食と飲み物を用意して学会参加者全員のご来場をお待ちしています。

第6回医用質量分析認定士講習会・試験は、9月8日(土)に北海道大学大学院保健科学研究院で行います。学会とは別会場ですのでご注意ください。

最後になりましたが、年会開催に至るまでに、直接・間接にお世話になりました全ての皆様に重ねて御礼申し上げます。会期中は、真剣な議論と温かい交流によって、医用質量分析の未来を拓きましょう。

会場のご案内

北海道大学 学術交流会館

〒060-0808　札幌市北区北8条西5丁目

TEL：011-706-2141（管理人室）

URL：https://www.hokudai.ac.jp/bureau/property/s01/01-access/

ご連絡は年会事務局のほうにお願いします。

公共交通機関のご案内

- JRをご利用の場合. . . . . JR**札幌駅**下車、徒歩10分
- 地下鉄をご利用の場合 . . . . . 市営交通・地下鉄南北線・東豊線**さっぽろ駅**下車、徒歩10〜15分
  市営交通・地下鉄南北線**北12条駅**下車、徒歩10分

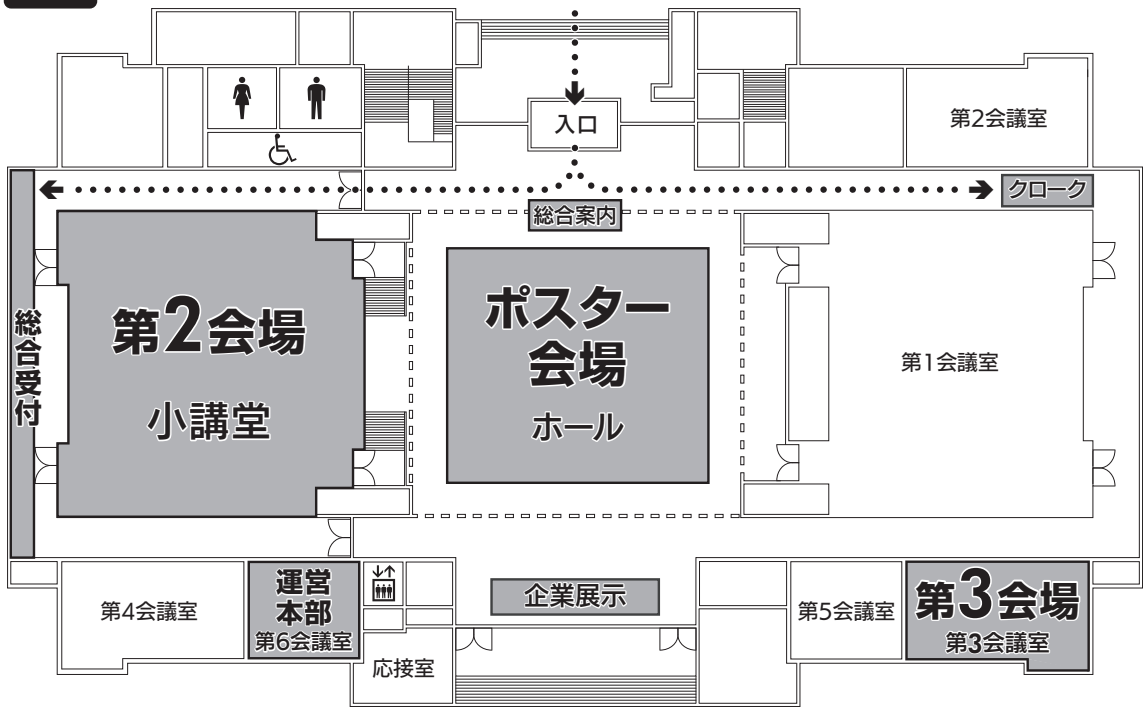
※当施設には駐車場がございません。最寄りの公共交通機関のご利用をお願いいたします。

【懇親会会場】京王プラザホテル札幌 2F エミネンスホールA
〒060-0005　札幌市中央区北5条西7丁目2-1
TEL：011-271-0111

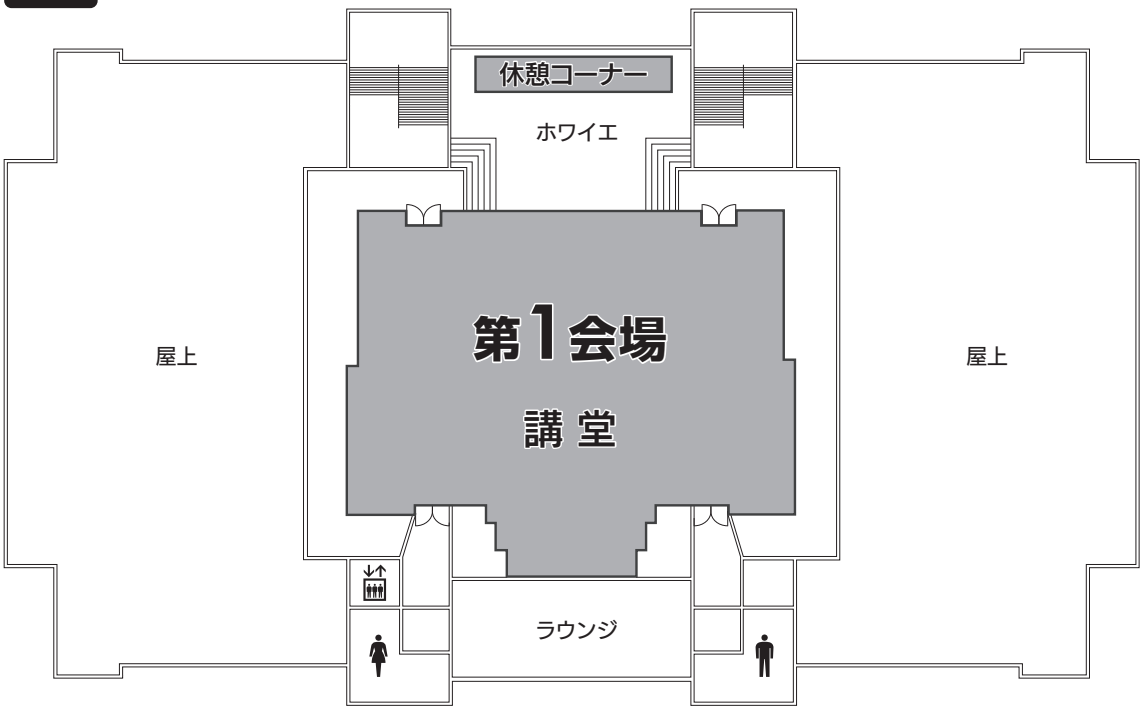
会場案内図

北海道大学 学術交流会館

1F



2F



年会案内

■会　期

平成30年9月6日(木)・7日(金)
(9月8日(土) に第6回日本医用スペクトル学会医用質量分析認定士講習会を開催します)

■年会長

千葉 仁志 (北海道大学／札幌保健医療大学)

■テーマ

臨床と質量分析

■会　場

メイン：北海道大学 学術交流会館 (札幌市北区北8条西5丁目)

懇親会：京王プラザホテル札幌 (札幌市中央区北5条西7丁目2-1)

講習会：北海道大学保健学科 (札幌市北区北12条西5丁目)

■当日参加登録

受付にて参加費・懇親会費 (ご希望の方) をお支払いただき、参加証をお受け取りください。参加証にはご自身でお名前と所属をご記入ください。会期中は常にご着用ください。参加証を身につけていない場合には、スタッフがお声がけする場合がございます。

総合受付：北海道大学 学術交流会館 1F

受付時間：9月6日(木) 8：15～16：30
　　9月7日(金) 8：15～13：30

■年会参加費一覧

	会員				非会員			
	一般		学生		一般		学生	
	事前	当日	事前	当日	事前	当日	事前	当日
参加費	6,000円	7,000円	2,000円	3,000円	10,000円	12,000円	3,000円	3,000円
懇親会費	5,000円	6,000円	3,000円	4,000円	5,000円	6,000円	3,000円	4,000円

＊学生・大学院生は「学生証」をご提示ください。

＊抄録集は会員の皆様には発送済みですが、購入をご希望の方は受付にてお買い求めください。
一冊5,000円 (税込) で販売します。

■ランチョンセミナー・イブニングセミナー

ランチョンセミナーは整理券制です。整理券は当日開催分のみの配布です。

整理券配布場所：学術交流会館 1F 総合受付付近「ランチョンセミナー整理券配布デスク」

整理券配布時間：9月6日(木) 8：15～ 無くなり次第終了
　　9月7日(金) 8：15～ 無くなり次第終了

＊イブニングセミナーには整理券はありません。茶菓・飲み物をご用意しております。

■企業展示

学術交流会館 1F ホールにて展示を行います。

展示時間：9月6日(木) 9：00～18：00
　　9月7日(金) 8：30～15：00

■懇親会

懇親会の参加を希望される方は、参加受付の際に懇親会参加費をお支払いください。多数のご参加をお待ちしております。

日時：9月6日(木) 19：00～21：00
会場：京王プラザホテル札幌 2F エミネンスホールA
　　北海道札幌市中央区北5条西7丁目2-1

■ドリンクコーナー・Wi-Fiコーナー

学術交流会館 2F ホワイエにドリンクコーナーとWi-Fiコーナーを設置しております。ご休憩などにご利用ください。ドリンクは無くなり次第終了します。Wi-FiのIDとパスワードは学術交流会館 1F 総合案内で配布します。

■クローク

学術交流会館 1Fにクロークを設置いたします。正面玄関を入り、左手のつきあたりに設けますのでご利用ください。

開設時間：9月6日(木) 8：15～18：30
　　9月7日(金) 8：15～15：00

＊生鮮品・貴重品はお預かりできません。

＊クローク終了時間までに必ず荷物を御引き取りください。オーバーナイトでのお預かりはお断りいたします。

＊クローク札を紛失された場合は、身分証明書などお名前・ご連絡先を証明できるものをご提示いただきます。その際に荷物の中身を確認させていただく場合もございますので、予めご了承ください。

■撮影・録音

会場内での撮影・録音は禁止です。ポスターセッションも同様に撮影禁止です。無断の撮影・録音を見かけた場合、スタッフがお声がけする場合があります。

＊ただし、事務局の公式記録及び事務局が認めた取材等は除きます。記念撮影の場合も周りの事務局スタッフに念のため許可をお取りください。

■その他

- 駐車場はございませんので、公共交通機関をご利用ください。
- 北大キャンパス内は禁煙です。
- 会場内では携帯電話のご利用はお控えください。マナーモードにするか、電源をお切りください。
- 託児スペースは用意していません。ご了承ください。

座長・演者の方へ

【座長の皆様へ】

当日ご来場の際に、北海道大学 学術交流会館 1F 総合受付内の「座長・演者受付」にて受付をお願いいたします。

担当のセッションの開始10分前までに会場前方の「次座長席」にお座りください。
講演時間・質疑時間を厳守し、セッションの時間内に終了するようお願いいたします。なお会場にはアナウンスがありませんので、時間になりましたらセッションを始めてください。

【演者の皆様へ（ポスター発表者除く）】

当日ご来場の際に、北海道大学 学術交流会館 1F 総合受付内の「座長・演者受付」にて受付をお願いいたします。

担当の講演の開始10分前までに会場前方の「次演者席」にお座りください。
講演時間・質疑時間を厳守し、持ち時間内に終了するようお願いいたします。

■ 発表要領

発表データ受付について：
基本的にご自身のPCを使用しての発表となります。各発表会場にご自身のPCを持参し、会場PC係にお声掛けください。

発表要領：

- プロジェクターへの試写は各発表会場の休憩時間に行ってください。試写は、混雑やトラブル回避のため各会場内のPC係に予めお声掛けください。各会場の休憩時間の確認は、抄録集または第43回日本医用マススペクトル学会年会のホームページ（https://plaza.umin.ac.jp/jsbms43/）をご覧ください。
- 外部出力端子はVGA（D-sub15pin）に限ります。変換ケーブルが必要な機種（Macintosh等）をご使用の場合は、変換ケーブルを必ずご持参ください。
- 発表中にスクリーンセーバーや省電力モードにならぬよう、事前に設定を済ませてください。個々のPCやOSにより設定方法が異なります。
- 画像解像度はXGA（1024×768）、一面投影となります。これより大きい場合、スライドの周囲が切れてしまいます。音声の出力は出来ません。
- 各演台には電源コンセントを用意しております。PC用電源ケーブルは各自ご持参ください。
  バッテリーで発表される場合、電池切れや省電力モードにならぬようご注意ください。
- 万一のトラブルに備え、予備のデータを保存したUSBフラッシュメモリを必ずご持参ください。ご自身でUSBフラッシュメモリのウイルスチェックを事前にお済ませ願います。ご持参のPCが不調の場合に限り、会場で用意するPCで映写いたします。会場でもUSBフラッシュメモリを用意します。必要時は会場PC係にお申し出ください。

会場で用意するPC：

- OS：Windows 10、アプリケーション：Microsoft PowerPoint 2016
- 発表に使用できるデータ
  Microsoft PowerPoint 2007以降で作成されたファイル。
  上記以前のバージョンで制作されたものは表示に不具合が発生する可能性があります。
- 文字のフォント
  【日本語】MSゴシック、MSPゴシック、MS明朝、MSP明朝
  【英　語】Times、Times New Roman、Arial
  上記以外のフォントを使用された場合は、表示に不具合が発生する可能性があります。

■ 利益相反状態開示のお願い

利益相反の有無に関わらず、筆頭演者及び講演者の皆様に、研究内容に関する利益相反状態の開示を行っていただきます。すべての発表者に対して開示をお願いします。
ひな形は年会ホームページからダウンロードしてください。

ポスター発表の方へ

当日ご来場の際に、北海道大学 学術交流会館1F「総合受付」にて受付をお願いいたします (専属の窓口は特にございません)。

■ 発表要領

- 発表は全てポスター発表となります。一般演題選抜に選ばれた方はポスター発表に加えて、口頭発表もございます。
- 発表は自由討論形式です。座長はいません。セッション開始時間にご自身のポスターの前に立ち、研究内容を説明したり、参加者からの質問に答えたり、討論を行ってください。
- 筆頭演者は本学会会員である必要があります。
- 筆頭演者が非会員の場合、発表当日までに入会手続きを必ず完了してください。
- これまでに本学会会員であっても会費未納者は筆頭演題としての発表資格がありませんので、早急に未納分と本年度の年会費を払い込みください。
- 共同演者および参加者は非会員も可能です。
- 第43回年会では「若手優秀ポスター賞」を用意しております。平成30年4月1日時点で年齢35歳以下の若手研究者が筆頭演者として応募される場合は、登録システムでの申込時に (若手優秀ポスター賞へのエントリーを)【希望する】を選択していただきました。この中から、厳正なる審査の上、受賞者を選定いたします。結果は9月6日(木) 16：00頃に学術交流会館の玄関付近の掲示板に通知します (予定)。授賞式は懇親会内で執り行います。

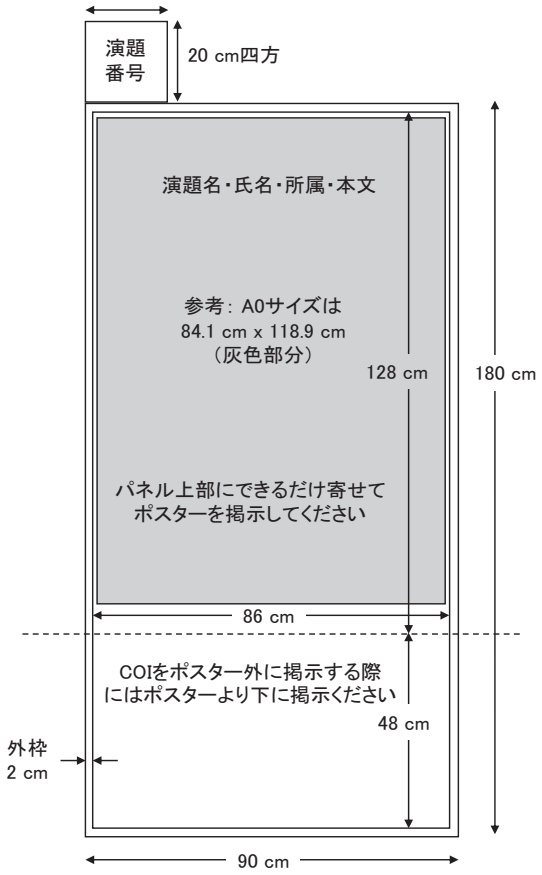
■ ポスターの作成要領

- ポスターパネル内に収まるようなサイズでポスターを作成ください (詳細は次頁参照)。
- 抄録と同様に、演題名・著者・所属は日本語と英語を併記ください。
- 図表のタイトル、図表内の文字、図表の解説文は全て英語で記載ください。
- その他の文章は日本語あるいは英語で記載ください。
- ポスター内あるいはポスター外に必ず利益相反の開示をお願いします (詳細は次項)。
- 演者不在時にも閲覧者にわかりやすいよう、構成、表現、色、画質、文字サイズを工夫してください。

■ 利益相反状態開示のお願い

利益相反の有無に関わらず、筆頭演者及び講演者の皆様に、研究内容に関する利益相反状態の開示を行っていただきます。すべての発表者に対して開示をお願いします。ポスター本文内あるいは別紙をご用意し、ポスター欄外 (ポスター下側) に貼って明示ください。

■ポスターの貼付けと撤去



図：ポスターパネルのサイズと諸注意

貼付け時間：9月6日(木) 8：15～10：30

セッション：9月6日(木) 11：00～12：00
(演題番号が奇数の方)

セッション：9月6日(木) 13：00～14：00
(演題番号が偶数の方)

撤去時間　：9月6日(木) 16：00～18：00

＊ポスターパネルのサイズは幅90 cm、高さ180 cmです。パネル左上に縦20 cm × 横20 cmの演題番号がつきます。ご自身の演題番号を確認し、パネルにポスターを貼ってください。

＊貼付けに必要なピンは事務局で用意します。

＊撤去時間を過ぎても残っているポスターは事務局で撤去いたします。

年会へのお問い合わせ先

■年会事務局

第43回日本医用マススペクトル学会年会事務局
〒060-0812　北海道札幌市北区北12条西5丁目
北海道大学大学院保健科学研究院 病態解析学分野
TEL：011-706-3413 (櫻井俊宏)
E-mail：jsbms43@eis.hokudai.ac.jp

■年会ホームページ

https://plaza.umin.ac.jp/jsbms43/

■後　援

日本マススクリーニング学会
特定非営利活動法人　生物試料分析科学会
公益社団法人　大阪府臨床検査技師会
一般社団法人　北海道臨床衛生検査技師会
札幌保健医療大学

若手優秀ポスター賞について

年会では、優れたポスター発表を行なった若手研究者 (35歳以下) に対して「若手優秀ポスター賞」を贈ります。

■ 若手優秀ポスター賞の審査および受賞者の発表方法

- 若手優秀ポスター賞に応募された方のポスター番号に、年会事務局が目印の為のリボンを付けます。
- 9月6日(木) のポスター発表終了後、審査員 (全評議員が対象) の投票によって審査が行われます。総合受付にて投票用紙を配布しますので、評議員は取りに来てください。
- 総合受付と9月6日(木) 14：00から行われる社員総会の会場 (2F講堂) 入口付近に投票箱を設置します。評議員は当日14：00迄に必ず投票をお願いします。
- ポスター賞受賞者（5名を予定）が決まり次第、学術交流会館入口付近の立て看板に掲示します（当日16：00掲示予定)。
- 9月6日(木) の懇親会会場にて表彰式を行います。

■ 審査基準

以下の審査基準をもとに、総合的に判断します。

○ 研究の質に関する基準項目

- 研究の有用性
- 新規性、独創性
- 実験の組み立ての妥当性
- 科学的な錯誤がないか

○ プレゼンテーションに関する基準項目

- ポスターを見渡して、説明を聞かなくても要点をすぐに理解することができるかどうか
- 文字や図の大きさが適当か。ある程度離れていても解読できるか
- 図表の説明 (英語) が理解できるか
- 情報が過多ではないか
- 用語が正しく使用されているか
- 発表者の説明が簡明かつ分かりやすく、説明時間が適当か
- 質問に対する回答が簡明かつ的確であるかどうか
- その他、体裁が規定を逸脱していないか

日程表

1日目　9月6日（木）

	第1会場 講 堂（2F）	第2会場 小講堂（1F）	第3会場 第3会議室（1F）	ポスター会場 ホール（1F）
8:00				
	8:45 - 8:55 **開会の辞**			
9:00	8:55 - 11:00 **シンポジウム 1** イメージングと質量分析	9:00 - 11:00 **一般演題** 選抜		
10:00			10:00 - 10:55 **テクノロジーフォーラム**	
11:00				11:00 - 12:00 **ポスター発表** 奇数演題番号
12:00	12:00 - 13:00 **ランチョンセミナー 1** 株式会社エスアールエル	12:00 - 13:00 **ランチョンセミナー 2** 日本電子株式会社		
13:00				13:00 - 14:00 **ポスター発表** 偶数演題番号
14:00	14:00 - 14:40 **社員総会**			
	14:40 - 15:10 **会員集会**			
15:00	15:10 - 16:00 **受賞講演**			
16:00	16:05 - 17:00 **サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社共催** **国際学術セミナー**			
17:00	17:05 - 18:20 **シンポジウム 2** トランスオミクス解析の自動化への取組み－現状と今後			
18:00				
19:00	19:00 - 21:00 **懇親会**　京王プラザホテル札幌 2F エミネンスホールA			

2日目　9月7日（金）

	第1会場 講 堂（2F）	第2会場 小講堂（1F）
8:00		
9:00	8:30 - 9:45 **シンポジウム 3** 臨床化学研究における 質量分析の貢献	8:30 - 9:45 **シンポジウム 4** 加齢・疾病対策のための 酸化脂質研究の最前線
10:00	9:50 - 11:05 **シンポジウム 5** 臨床検査の現場で 活躍する質量分析技術	9:50 - 11:05 **シンポジウム 6** 変死体中薬物分析と 質量分析 ― 精神作用薬服用症例
11:00	11:10 - 12:10 **特別講演**	
12:00	12:15 - 13:15 **ランチョンセミナー 3** 株式会社島津製作所	12:15 - 13:15 **ランチョンセミナー 4** ブルカージャパン株式会社
13:00	13:20 - 14:35 **シンポジウム 7** 血清と血漿の プロテオミクス・ ペプチドミクス	13:20 - 14:35 **シンポジウム 8** 疾患関連リゾリン脂質の 臨床診断マーカーへの 応用
14:00	14:35 - 14:45　**閉会の辞**	
15:00		
16:00		
17:00		
18:00		

プログラム

1日目　9月6日（木）

第1会場　［講堂］2F

8:45 - 8:55　**開会の辞**

8:55 - 11:00　**シンポジウム 1**
イメージングと質量分析

オーガナイザー・座長：**瀬藤 光利**（浜松医科大学），**池川 雅哉**（同志社大学）

S1-1　**質量分析イメージングによって発見した、動脈硬化・腹部大動脈瘤における新規病態とそれらを標的とした予防・治療の可能性**
財満 信宏[1,2]
[1]近畿大学大学院 農学研究科，[2]近畿大学 アグリ技術革新研究所

S1-2　**イメージング質量分析法を用いたアミロイドーシスの高深度プロテオミクス**
池川 雅哉[1]，角田 伸人[1]，韮澤 崇[2]，植田 初江[3]
[1]同志社大学生命医科学部 医生命機能研究室，[2]Bruker Japan K.K.，[3]国立循環器病研究センター 病理部・バイオバンクセンター

S1-3　**薬物動態解析のためのイメージング質量分析法の開発**
近藤 豪[1,2]，瀬藤 光利[1,2]
[1]浜松医科大学医学部 細胞分子解剖学講座，[2]浜松医科大学 国際マスイメージングセンター

S1-4　**MALDIイメージング法による生体試料中生理活性物質の静的・動的解析**
中西 豊文[1]，五十嵐 一雄[2]
[1]大阪医科大学 研究支援センター，[2]一般社団法人医薬分析協会

S1-5　**フーリエ変換型質量分析による網羅的な代謝イメージング**
杉浦 悠毅
慶應義塾大学医学部 医化学教室

12:00 - 13:00　**ランチョンセミナー 1**　共催：株式会社エスアールエル

LS1　**新規試薬による高純度エクソソームの調製とプロテオミクス解析**
栗本 綾子
合同会社みらか中央研究所

14:00 - 14:40　社員総会（評議員会）

14:40 - 15:10　会員集会

15:10 - 16:00　受賞講演（奨励賞）

座長：千葉 仁志（北海道大学／札幌保健医療大学）

LC/MS/MSによるビタミンD代謝物・各種ステロイドホルモン測定の臨床検査応用

佐藤 守
千葉大学医学部附属病院 マススペクトロメトリー検査診断学

質量分析によるメタボローム解析の法中毒学的応用ならびに新規質量分析法を用いたリアルタイム・メタボローム解析技術の開発

財津 桂[1,2]
[1]名古屋大学高等研究院 若手新分野創成研究ユニット・フロンティア in vivoリアルタイム・オミクス研究室,
[2]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学

16:05 - 17:00　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社共催 国際学術セミナー

座長：青木 淳賢（東北大学）

Novel strategies and applications of enhanced shotgun lipidomics for metabolism and translational research: Lipidomics sheds light on diabetic neuropathy

Xianlin Han[1,2]
[1]Barshop Institute for Longevity and Aging Studies, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, USA, [2]Division of Diabetes, Department of Medicine, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, USA

17:05 - 18:20　シンポジウム 2
トランスオミクス解析の自動化への取組み－現状と今後

オーガナイザー・座長：飯田 順子（島津製作所），柚木 克之（理化学研究所）

S2-1　トランスオミクスにおけるデータ解析およびその自動化に向けて

柚木 克之[1,2,3,4]

[1]理化学研究所・生命医科学研究センター，[2]JSTさきがけ「疾患代謝」領域，[3]慶應義塾大学・先端生命科学研究所，[4]東京大学・大学院理学系研究科

S2-2　臨床検体を扱うメタボロミクスの落とし穴

杉本 昌弘[1,2,3,4]

[1]東京医科大学 低侵襲医療開発総合センター，[2]慶應義塾大学 先端生命科学研究所，[3]神奈川歯科大学大学院 歯学研究科，[4]筑波大学 プレシジョン・メディスン開発研究センター

S2-3　Garuda Platformを用いたマルチオミクスデータ解析

安田 弘之[1]，山田 洋平[1]，金澤 慎司[1,2]，國澤 研大[1,2]，松田 史生[2]，Samik Ghosh[3]，長谷 武志[3]，Nikolaos Tsorman[3]，松岡 由希子[3]，梶原 茂樹[1]，北野 宏明[3]，福崎 英一郎[2]，飯田 順子[1,2]

[1]株式会社島津製作所，[2]大阪大学，[3]システム・バイオロジー研究機構

S2-4　漢方薬のシステムバイオロジー：漢方薬の成分代謝・生体作用プロファイルの統合解析

西 明紀[1]，大渕 勝也[1]，串田 浩孝[1]，下堀 知香[1]，松本 隆志[1]，山本 雅浩[1]，黒木 春郎[2]，鍋島 茂樹[3]，谷内江 綾子[4]，松岡 由希子[4]，北野 宏明[4]

[1]株式会社ツムラ ツムラ漢方研究所，[2]医療法人社団嗣業の会 外房こどもクリニック，[3]福岡大学病院 総合診療部，[4]特定非営利活動法人 システム・バイオロジー研究機構

第2会場　［小講堂］1F

9:00 - 11:00　一般演題　選抜

オーガナイザー・座長：浅井 清文（名古屋市立大学），東 達也（東京理科大学）

選抜-1（P-7）　Girard試薬Pアイソトポログを用いた副腎静脈血清中アルドステロンのLC/ESI-MS/MS定量法

赤石 美帆[1]，横田 麻衣[1]，小川 祥二郎[1]，杉浦 悠毅[2]，西川 哲男[3]，西本 紘嗣郎[4]，東 達也[1]

[1]東京理科大学 薬学部，[2]慶應義塾大学 医学部，[3]横浜労災病院，[4]埼玉医科大学 国際医療センター

選抜-2（P-13）　ワイドターゲットLC-MS/MSメタボロミクス解析によるアルツハイマー型およびレビー小体型認知症の識別バイオマーカー探索

六車 宜央[1]，筒井 陽仁[1,2]，赤津 裕康[3,4]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大学 薬学部，[2]小野薬品工業，[3]名古屋市立大学 医学部，[4]福祉村病院

選抜-3（P-23）　MALDI-TOF MSを用いた非定型抗酸菌の同定

馬庭 恭平，森山 英彦，竹内 志津枝，川島 史祥，三島 清司，長井 篤

島根大学医学部附属病院 検査部

選抜-4 HepG2細胞内の単一脂肪滴に関するnanoESI-MS直接脂質分析
(P-37)

趙 瑤瑤[1]，呉 玥[1]，陳 震[1]，高 紫君[1]，張 新荣[2]，千葉 仁志[1,3]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]中国 清華大学 化学系，[3]札幌保健医療大学

選抜-5 LC/MS/MSを用いた血漿カテコールアミン測定法の開発
(P-49)

岩沢 勇也[1,2,3]，佐藤 守[1]，上瀧 智巳[4]，宮川 秀則[2]，田中 知明[3]，野村 文夫[1]
[1]千葉大学病院 マススペクトロメトリー検査診断学，[2]株式会社エスアールエル 治験・特殊検査部 分析化学課，[3]千葉大学 分子病態解析学，[4]株式会社エスアールエル 技術推進部 検査開発グループ

選抜-6 糖尿病性腎症モデルラット腎臓のMALDIイメージング質量分析法を用いたIn Situプロテオーム解析法の確立
(P-69)

葛原 由貴[1]，武笠 結天[2]，韮澤 崇[3]，植田 初江[4]，角田 伸人[2]，池川 雅哉[1,2]
[1]同志社大学大学院 生命医科学研究科，[2]同志社大学 生命医科学部，[3]Bruker Japan K.K.，[4]国立循環器病研究センター 病理部

選抜-7 LC-MS/MSを用いた、ろ紙血中ムコ多糖症原因酵素（IDUA, IDS, NAGLU, GALNS, ARSB）の同時スクリーニング法の確立
(P-77)

小林 弘典[1,2]，大國 翼[2]，野津 吉友[2]，田中 美砂[3]，渡辺 淳[3]，折居 建治[4]，深尾 敏幸[4]，戸松 俊治[1,6]，Michael H. Gelb[6]，山口 清次[1]，竹谷 健[1]，長井 篤[2]
[1]島根大学医学部 小児科，[2]島根大学附属病院臨床検査部 難病総合治療センター 検査部門，[3]島津製作所，[4]岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学，[5]Nemours/Alfred I. DuPont Children's Hospital，[6]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Washington

選抜-8 探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI/MS/MS）とScheduled SRM法を用いた生体組織のインタクト・メタボロミクス法の構築
(P-78)

近藤 健太[1]，林 由美[2,3]，村田 匡[4]，土屋 弥月[1]，大原 倫美[1]，石川 哲也[2]，緒方 是嗣[4]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，財津 桂[1,3]
[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学，[2]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，[3]名古屋大学高等研究院，[4]島津製作所

12:00 - 13:00 ランチョンセミナー 2

共催：日本電子株式会社

LS2 LC/ESI-MS/MSにおける誘導体化の威力：ビタミンD代謝物の高感度・高選択的定量

東 達也
東京理科大学 薬学部

第3会場　［第3会議室］1F

10:00-10:55　テクノロジーフォーラム

オーガナイザー・座長：財満 信宏（近畿大学），早坂 孝宏（北海道大学）

TF-1　島津マルチオミクス解析パッケージの紹介

安田 弘之
株式会社島津製作所 分析計測事業部

TF-2　2018年 新商品のご紹介

藤峰 慶徳
大塚製薬株式会社 診断事業部 CIL試薬課

TF-3　LC/MS/MSデータクオリティー向上を目指した前処理カラムのご紹介

吉田 達成
バイオタージ・ジャパン株式会社

TF-4　安定同位体を利用した質量分析技術のご紹介

田辺 芽衣
大陽日酸株式会社

ポスター会場　［ホール］1F

11:00-12:00　ポスター発表（演題番号が奇数）

＊「若手優秀ポスター賞」を設けます.

P-1　ホルマリン固定パラフィン包埋大腸癌組織を用いた新規大腸癌診断マーカーの探索とその定量法の開発

山本 哲志[1]，工藤 光洋[2]，橋本 知樹[1]，三田村 邦子[1]，内藤 善哉[2]，多賀 淳[1]
[1]近畿大学 薬学部，[2]日本医科大学 医学部

P-3　日本人の血漿トリメチルアミン-N-オキシドは頸動脈肥厚と相関関係がない
－Shimane CoHRE Study－

野津 吉友[1]，矢野 省三[2]，山口 一人[3]，田邊 一明[3]，並河 徹[4]，長井 篤[2]
[1]島根大学医学部附属病院 検査部，[2]島根大学医学部臨床検査医学，[3]島根大学医学部循環器内科学第4，[4]島根大学医学部病態病理学

P-5　カラムスイッチングLC-MS/MSを用いたヒト糞便中セロトニンの分析

平林 由紀子[1]，中村 公則[2]，曽根原 剛志[1]，半澤 悟[1]，清水 由宇[3]，相沢 智康[2]，中村 幸志[4]，玉腰 暁子[4]，綾部 時芳[2]
[1]株式会社日立製作所 研究開発グループ，[2]北海道大学大学院 先端生命科学研究院，[3]北海道大学大学院 生命科学院，[4]北海道大学大学院 医学研究院

P-7 Girard試薬Pアイソトポログを用いた副腎静脈血清中アルドステロンのLC/ESI-MS/MS定量法

赤石 美帆[1]，横田 麻衣[1]，小川 祥二郎[1]，杉浦 悠毅[2]，西川 哲男[3]，西本 紘嗣郎[4]，東 達也[1]
[1]東京理科大学 薬学部，[2]慶應義塾大学 医学部，[3]横浜労災病院，[4]埼玉医科大学 国際医療センター

P-9 4種のGirard試薬アナログを用いた誘導体化によるステロイドのハイスループットLC/ESI-MS/MS定量法の開発

亀村 美樹，横田 麻衣，小川 祥二郎，東 達也
東京理科大学 薬学部

P-11 モノリス型SPEスピンチップを用いたUPLC-Q-Tof-MSによるヒト体液中フルニトラゼパムおよび代謝物の迅速高感度分析法

藤城 雅也[1]，李 暁鵬[1]，橋本 茉莉[1]，長谷川 智華[1,2]，熊澤 武志[1,3]，宮崎 将太[4]，丸茂 明美[1]，石井 晃[5]，佐藤 啓造[1]，松山 高明[1]
[1]昭和大学医学部 法医学講座，[2]東邦大学医学部 法医学講座，[3]聖隷クリストファー大学 看護学部，[4]ジーエルサイエンス株式会社，[5]名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学

P-13 ワイドターゲットLC-MS/MSメタボロミクス解析によるアルツハイマー型およびレビー小体型認知症の識別バイオマーカー探索

六車 宜央[1]，筒井 陽仁[1,2]，赤津 裕康[3,4]，井之上 浩一[1]
[1]立命館大学 薬学部，[2]小野薬品工業，[3]名古屋市立大学 医学部，[4]福祉村病院

P-15 GCMS分析による尿中2,3-dihydroxyl-2-methybutyrate上昇の病態検討

張 春花，趙 寧，金 明姫，阮 宗海，王 旭陽
ミルスインターナショナル 研究開発部

P-17 LC/MSによるヒト血清中における分子種別コレステリルエステルの定量分析

三浦 佑介[1]，加藤 颯太[1]，櫻井 俊宏[1]，陳 震[1]，呉 玥[1]，高 紫君[1]，ロジート シュレスタ[1]，中村 幸志[2]，鵜川 重和[2,3]，中川 貴史[4]，玉腰 暁子[2]，千葉 仁志[1,5]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]北海道大学大学院医学研究院 社会医学分野 公衆衛生学教室，[3]大阪市立大学大学院 生活科学研究科，[4]北海道家庭医療学センター，[5]札幌保健医療大学 栄養学科

P-19 血中短鎖脂肪酸と肥満との関連

山村 凌大[1]，陳 震[2]，呉 玥[2]，高 紫君[2]，惠 淑萍[2]，千葉 仁志[2,3]，中川 貴史[4]，鵜川 重和[5,6]，中村 幸志[6]，玉腰 暁子[6]
[1]北海道大学大学院 医学院，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，[3]札幌保健医療大学，[4]北海道家庭医療学センター 栄町ファミリークリニック，[5]大阪市立大学大学院 生活科学研究科，[6]北海道大学大学院 医学研究院

P-21 LC-MS/MSによる糖尿病性腎症患者の尿中コレステリルエステル分析

辻川 諒哉[1]，三浦 佑介[2]，陳 震[1]，高田 康徳[3]，千葉 仁志[2,4]，惠 淑萍[2]
[1]北海道大学医学部 保健学科，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，[3]愛媛大学大学院医学研究科 糖尿病内科学講座，[4]札幌保健医療大学 栄養学科

P-23 MALDI-TOF MSを用いた非定型抗酸菌の同定

馬庭 恭平，森山 英彦，竹内 志津枝，川島 史祥，三島 清司，長井 篤
島根大学医学部附属病院 検査部

P-25 MBT Compassに搭載された*Bacteroides fragilis cfiA*サブタイピングの有用性

鈴木 健之，上村 桂一，小柳 紀人，後藤 宏次
中東遠総合医療センター 臨床検査室

P-27 タンデムマス（TMS）スクリーニング対象疾患のアジア諸国における頻度の多様性：GC/MSとTMSによる代謝異常スクリーニング

山口 清次[1]，柴田 直昭[1]，長谷 川有紀[1]，山田 健治[1]，小林 弘典[1]，重松 陽介[2]，竹谷 健[1]
[1]島根大学 小児科，[2]福井大学 小児科

P-29 グルタミン酸デヒドロゲナーゼ2はアンモニアからグルタミン酸を合成し細胞増殖を助ける

入野 康宏[1]，竹内 由紀子[2]，中山 泰宗[3]，福崎 英一郎[3]
[1]神戸大学大学院医学研究科 立証検査医学分野，[2]神戸大学大学院医学研究科 質量分析総合センター，[3]大阪大学大学院工学研究科 先端工学専攻

P-31 エンドカンナビノイド2-AGによるドーパミンシグナリングの抑制

越智 拓，平田 ゆかり，浜島 誠，磯部 一郎
藤田保健衛生大学 医学部

P-33 腎不全マウスの腸内細菌叢と腸内腐敗物の変化とAST-120による影響

佐藤 恵美子[1]，細見 晃司[2]，三枝 大輔[3]，堰本 晃代[1]，國澤 純[2]，丹羽 利充[4]，佐藤博[1]，高橋 信行[1]
[1]東北大学院 薬学研究科，[2]医薬基盤・健康・栄養研究所，[3]東北メディカル・メガバンク機構，[4]修文大学

P-35 腸内細菌が生成する脂肪酸代謝物の多次元分離分析

池田 和貴[1,2,3]，梶原 里美[1,2]，有田 誠[1,2,4]
[1]理化学研究所 生命医科学研究センター（IMS）メタボローム研究チーム，[2]横浜市立大学大学院生命医科学研究科 代謝エピゲノム科学研究室，[3]AMED PRIME，[4]慶應義塾大学薬学部 代謝生理化学講座

P-37 HepG2細胞内の単一脂肪滴に関するnanoESI-MS直接脂質分析

趙 瑤瑤[1]，呉 玥[1]，陳 震[1]，高 紫君[1]，張 新荣[2]，千葉 仁志[1,3]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]中国 清華大学 化学系，[3]札幌保健医療大学

P-39 マウス腎糸球体内で架橋される組織型トランスグルタミナーゼ基質候補タンパク質の網羅的解析

伊藤 辰将[1,2]，辰川 英樹[2]，山口 央輝[3]，高橋 和男[1]，人見 清隆[2]，湯澤 由紀夫[1]
[1]藤田保健衛生大学医学部 腎内科学，[2]名古屋大学大学院創薬科学研究科 創薬生物科学講座 細胞生化学分野，[3]藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 医高分子学研究部門

P-41 LC/HR-MS/MSを用いた肝硬変ラット肝臓中脂質と過酸化脂質の定量分析

陳 震[1]，玉井 康将[2]，江口 暁子[2]，岩佐 元雄[2]，呉 玥[1]，竹井 謙之[2]，千葉 仁志[1,3]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]三重大学 医学系研究科，[3]札幌保健医療大学 栄養学科

P-43 老化促進モデルマウスSAMP10の加齢による肝臓中抗酸化酵素の変動ならびに活性酸素代謝関連必須微量金属のICP-MS/MSによる動態解析

齋藤 健[1,2]，山﨑 尚二郎[1]，冨原 朋美[1]，Ketema Rahel Mesfin[1]，木村 豪[1]，
Md. Tajuddin Sikder[2]，蔵崎 正明[3]
[1]北海道大学大学院 保健科学院，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，[3]北海道大学大学院 地球環境科学研究院

P-45 マスタードガス代謝物1,1'-sulfonylbis（2-（methylsulfinyl）ethane（SBMSE）のLC-MS/MS分析法の開発

柘 浩一郎，大森 毅
科学警察研究所

P-47 GC-MS定量法を用いたナリンゲニンの新規コレステロール合成抑制作用の解析

不破 史子，清水（太田）美穂，大和 進，中川 沙織
新潟薬科大学薬学部 薬品分析化学研究室

P-49 LC/MS/MSを用いた血漿カテコールアミン測定法の開発

岩沢 勇也[1,2,3]，佐藤 守[1]，上瀧 智巳[4]，宮川 秀則[2]，田中 知明[3]，野村 文夫[1]
[1]千葉大学病院 マススペクトロメトリー検査診断学，[2]株式会社エスアールエル 治験・特殊検査部 分析化学課，[3]千葉大学 分子病態解析学，[4]株式会社エスアールエル 技術推進部 検査開発グループ

P-51 レーザーアブレーションICP-MSを用いた薬理量リチウムの脳内分布の可視化

安井 悠生[1]，亀山 大樹[1]，塚本 傭平[1]，黒木 康夫[2]，本多 和人[2]，角田 伸人[1]，池川 雅哉[1]
[1]同志社大学大学院生命医科学研究科 医生命機能研究室，[2]サーモ・フィッシャー株式会社

P-53 マルチオミクス解析への応用を目指したマウス大脳からのメタボローム・RNA同時抽出法の構築

大原 倫美[1]，窪澤 絢子[1]，土屋 弥月[1]，近藤 健太[1]，井口 亮[2]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，林 由美[3,4]，財津 桂[1,4]
[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学，[2]産業技術総合研究所，[3]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，[4]名古屋大学 高等研究院

P-55 LC-QTRAP-MS/MSとLC-Orbitrap-MS/MSを用いた3名の血清・尿中の合成カンナビノイド5F-NNEIの定量とその代謝物の構造推定

南方 かよ子[1]，鈴木 雅子[2]，北本 卓也[2]，野澤 秀樹[1]，山岸 格[1]，長谷川 弘太郎[1]，齊藤 岳児[3]，吉野 篤人[3]，鈴木 修[1]，渡部 加奈子[1]
[1]浜松医科大学 法医学，[2]浜松医科大学 機器センター，[3]浜松医科大学 救急災害医学

P-57 DSMSプロジェクト －集計－：東京慈恵会医科大学法医薬物スクリーニング分析結果の集計報告

前橋 恭子，坂本 圭菜，岩楯 公晴
東京慈恵会医科大学 法医学講座

P-59 DSMSプロジェクト －集計－：香川大学法医薬物スクリーニング分析結果の集計報告

高倉 彩華，田中 直子，モストファ ジャーマル，伊藤 明日香，木村 正司，飴野 清，木下 博之
香川大学 医学部

P-61 法医試料を用いた糖尿病病態マーカーの探索

成相 舞花[1]，安部 寛子[1]，槇野 陽介[1,2]，岩瀬 博太郎[1,2]
[1]東京大学大学院医学系研究科 法医学教室，[2]千葉大学大学院医学研究院 法医学教室

P-63 喘息モデルマウス肺組織におけるアセチルコリン過剰分泌の質量分析イメージングによる可視化

松田 孟士[1]，鈴木 勇三[2]，藤澤 朋幸[2]，齊藤 伸幸[3]，菅 裕徳[3]，須田 隆文[2]，矢尾 育子[1,4]
[1]浜松医科大学 光尖端医学教育研究センター フォトニクス医学研究部 光イメージング 研究室，[2]浜松医科大学医学部 内科学第二講座，[3]日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社，[4]浜松医科大学 国際マスイメージングセンター

P-65 新規ガラス製試料プレートを用いた、マトリックスフリー表面支援レーザー脱離イオン化法による、低分子量生体分子の高感度分析

橘 ゆう子[1]，塚本 洋子[2]
[1]AGC株式会社 技術本部 商品開発研究所，[2]AGCテクノグラス株式会社

P-67　貫通孔ポーラスアルミナ薄膜を用いたレーザー脱離イオン化法DIUTHAME

内藤 康秀[1]，小谷 政弘[2]，瀧本 未羽[2]，大村 孝幸[2]
[1]光産業創成大学院大学 光医療・健康分野，[2]浜松ホトニクス株式会社 電子管事業部

P-69　糖尿病性腎症モデルラット腎臓のMALDIイメージング質量分析法を用いたIn Situプロテオーム解析法の確立

葛原 由貴[1]，武笠 結天[2]，韮澤 崇[3]，植田 初江[4]，角田 伸人[2]，池川 雅哉[1,2]
[1]同志社大学大学院 生命医科学研究科，[2]同志社大学 生命医科学部，[3]Bruker Japan K.K.，[4]国立循環器病研究センター 病理部

P-71　LC-MS/MSによる短鎖、中鎖、長鎖、極長鎖脂肪酸の一斉定量分析

高 紫君[1]，陳 震[1]，呉 玥[1]，三浦 祐介[1]，千葉 仁志[1,2]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]札幌保健医療大学

P-73　Validation of a multi-analyte flow-injection high resolution / accurate mass method for the quantification of acidic lipid species in human serum

Dayan Goodenowe[1], Yanqiu Jiang[1], Vijitha Senananake[1], Yasuyo Yamazaki[1], Mamoru Satoh[2], Fumio Nomura[2]
[1]Prodrome Sciences Inc. Saskatoon, Canada, [2]Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University Hospital

P-75　ピリミジン系抗がん剤5-FU投与における副作用発現回避のためのdihydropyrimidine dehydrogenase活性測定法の確立

村瀬 美和[1]，前田 康博[1]，中島 葉子[2]，伊藤 哲哉[2]，堀田 祐志[1]，片岡 智哉[3]，木村 和哲[1,3]
[1]名古屋市立大学大学院 薬学研究科，[2]藤田保健衛生大学 小児科，[3]名古屋市立大学大学院 医学研究科

P-77　LC-MS/MSを用いた、ろ紙血中ムコ多糖症原因酵素（IDUA, IDS, NAGLU, GALNS, ARSB）の同時スクリーニング法の確立

小林 弘典[1,2]，大國 翼[2]，野津 吉友[2]，田中 美砂[3]，渡辺 淳[3]，折居 建治[4]，深尾 敏幸[4]，
戸松 俊治[1,6]，Michael H. Gelb[6]，山口 清次[1]，竹谷 健[1]，長井 篤[2]
[1]島根大学医学部 小児科，[2]島根大学附属病院臨床検査部 難病総合治療センター 検査部門，[3]島津製作所，[4]岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学，[5]Nemours/Alfred I. DuPont Children's Hospital，[6]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Washington

P-79　探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI/MS/MS）を用いたin vivoリアルタイム・モニタリングシステムの構築

林由 美[1,2]，財津 桂[1,3]，村田 匡[4]，土橋 均[3]，石井 晃[3]，緒方 是嗣[4]，石川 哲也[2]
[1]名古屋大学 高等研究院，[2]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，[3]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学，[4]島津製作所

P-81　玄米米糠発酵食品（FBRA）のオミクス研究へのアプローチ：LC-MSによるステリルグルコシドの定量

池川 繁男[1], 神 繁樹[2], 伊藤 麻里[3], 根本 英幸[3,4], 堀江 裕紀子[3,4], 東 達也[4], 佐々木 隆浩[5], 村井 毅[5]
[1]（株）玄米酵素，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，[3]（株）コーケン，[4]東京理科大学 薬学部，[5]北海道医療大学 薬学部

P-83　破骨細胞の分化を阻害する化合物（ursolic acid）の新しい標的タンパク質の発見

譚 慧[1]，千葉 仁志[2]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]札幌保健医療大学

P-85 **Lead-induced alterations in lipid hemostasis in human liver (HepG2) cells and protection with rosmarinic and ascorbic acids**

Yonghan LI[1], Wageh Sobhy DARWISH[1,2], Zhen CHEN[1], Yue WU[1], Hitoshi CHIBA[3], Shu-Ping HUI[1]

[1]Laboratory of lipid analysis, Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, Kita 12, Nishi 5, Sapporo, Japan, [2]Food Control Department, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, 44519, Zagazig, Egypt, [3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences, Nakanuma Nishi 4-2-1-15, Higashi Ku, Sapporo 007-0894, Japan

P-87 **環境濃度オゾンによるHepG2細胞の酸化に関する研究**

朱 子健[1]，喬 琳[1]，陳 震[1]，呉 玥[1]，千葉 仁志[1,2]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]札幌保健医療大学

P-89 **発達期における高脂肪食摂取が成熟期の活性酸素代謝に関わる必須微量金属の動態に及ぼす影響 －ICP-MS/MSによる分析－**

山﨑 尚二郎[1]，木村 豪[1]，佐藤 伸[2]，藏崎 正明[3]，Md. Tajuddin Sikder[4]，齋藤 健[4]

[1]北海道大学大学院 保健科学院，[2]青森県立保健大学 栄養学科，[3]北海道大学大学院 地球環境科学研究院，[4]北海道大学大学院 保健科学研究院

13：00 - 14：00 **ポスター発表**（演題番号が偶数）

＊「若手優秀ポスター賞」を設けます.

P-2 **HIBCH遺伝子変異を示された中国人症例1名のメタボローム解析**

王 旭陽[1]，張 春花[1]，阮 宗海[2]，金 明姫[2]，唐 剣慈[2]，万 婷婷[2]

[1]ミルスインターナショナル 研究開発部，[2]ミルスインターナショナル 検査・データ解析部

P-4 **GC/MS尿代謝プロフィル分析によるTCA回路異常の化学診断の検討**

阮 宗海[1]，張 春花[2]，王 旭陽[2]，金 明姫[1]，唐 剣慈[1]，万 婷婷[1]，宋傑[1]

[1]ミルスインターナショナル 検査・データ解析部，[2]ミルスインターナショナル 研究開発部

P-6 **メタボローム解析による食道がん術前化学放射線療法の効果予測代謝物バイオマーカーの探索**

西海 信[1]，藤垣 誠治[1]，小林 隆[1]，本田 一文[2,3]，吉田 優[1,3]

[1]神戸大学大学院 医学研究科，[2]国立がん研究センター研究所 早期診断バイオマーカー開発部門，[3]AMED-CREST

P-8 **MALDI-TOF MS（VITEK MS）を用いて血液培養から*Staphylococcus pettenkoferi*が検出された一症例**

大西 雅人[1]，内池 伸和[1]，李 相太[1]，清松 佐知子[1]，平野 絵美[1]，宇井 孝爾[1]，小泉 章[1]，藤本 育子[1]，問本 佳予子[1]，藪内 博史[1]，田中 忍[1]，矢野 寿一[2]，山﨑 正晴[1]

[1]奈良県立医科大学附属病院，[2]奈良県立医科大学附属病院

P-10 **中国人プロピオン酸血症1例長期フォローアップ経過報告**

唐 剣慈，張 春花，阮 宗海，金 明姫，趙 寧，万 婷婷，王 旭陽

ミルスインターナショナル 研究開発部

P-12 **保存条件と食事がヒト血漿メタボロームに与える影響の網羅的解析**

守谷 岳郎，小林 博幸，安藤 智広

アクセリード・ドラッグディスカバリー・パートナーズ株式会社・統合生物

P-14　極低出生体重児における出生直後からの血中カルニチン濃度の推移

佐々木 菜央[1]，前田 康博[1]，戸川 泰子[2]，後藤 佳奈[1]，堀田 祐志[1]，片岡 智哉[3]，小山 典久[2]，幸脇 正典[2]，木村 和哲[1,3]

[1]名古屋市立大学大学院 薬学研究科，[2]豊橋市民病院 小児科，[3]名古屋市立大学大学院 医学研究科

P-16　LC/MS/MSによる血清/血漿1α,25-ジヒドロキシビタミンD定量および分析前変動要因の評価

石毛 崇之[1]，佐藤 守[2]，小川 祥二郎[3]，西村 基[1]，松下 一之[1]，東 達也[3]，野村 文夫[2]

[1]千葉大学医学部附属病院 検査部，[2]千葉大学医学部附属病院 マススペクトロメトリー検査診断学，[3]東京理科大学 薬学部

P-18　トリメチルアミンNオキシドは心疾患患者の予後予測マーカーとして有用である。

相澤 健一[1]，根岸 経太[2]，齋藤 亨佳[1]，木村 夏花[1]，今井 靖[1,2]，苅尾 七臣[2]，永井 良三[3]，鈴木 亨[3,4]

[1]自治医科大学医学部 薬理学講座 臨床薬理学部門，[2]自治医科大学医学部 循環器内科，[3]自治医科大学 医学部，[4]レスター大学医学部 循環器内科

P-20　薬剤性嗅覚障害モデルマウスにおけるメタボローム解析を用いた生体内代謝変動について

友野 卓哉[1]，亀山 大樹[1]，山本 卓志[2]，藤分 秀司[2]，角田 伸人[1]，中邨 智之[3]，池川 雅哉[1]

[1]同志社大学 生命医科学研究科，[2]島津製作所，[3]関西医科大学 薬理学講座

P-22　胸水から非チフス性*Salmonella*属菌を検出した1例

永田 悠起，加藤 雄大，杉山 裕衣，塩谷 厚代，長坂 日登美，中根 生弥

JA愛知厚生連 豊田厚生病院 臨床検査技術科

P-24　リファレンスライブラリ拡充によるMALDIバイオタイパーを用いた同定性能向上に関する検討 －*Klebsiella oxytoca*

上田 安希子[1]，上田 修[2]，砂田 淳子[1]，満井 友美[1]，木村 圭吾[1]，伊奈野 尚之[1]，吉田 彩夏[1]，米田 菜乃香[1]，大楠 清文[3]，西 功[1]，日高 洋[4]

[1]大阪大学医学部附属病院 医療技術部，[2]ベックマン・コールター株式会社，[3]東京医科大学 微生物学講座，[4]大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

P-26　メタボローム解析で発見したガラクトース血症I型の1例

万 婷婷[1]，張 春花[2]，金 明姫[3]，阮 宗海[1]，唐 剣慈[1]，王 旭陽[2]

[1]ミルスインターナショナル 検査・データ解析部，[2]ミルスインターナショナル 研究開発部

P-28　先天性代謝異常の化学診断は最短・最小コストで提供する必要がある

久原 とみ子，大瀬 守眞

日本疾患メタボローム解析研究所

P-30　HILIC-MS/MSによるラット脳脊髄液中オキシトシンの高感度分析法

塚田 愛[1]，池本 英志[1]，砂川 正隆[1]，李 暁鵬[2]，熊澤 武志[2,3]，松山 高明[2]

[1]昭和大学医学部 生理学講座 生体制御学部門，[2]昭和大学医学部 法医学講座，[3]聖隷クリストファー大学 看護学部

P-32　次亜塩素酸により塩素化された生体膜ホスファチジルコリンのLC-QTOF/MSを用いた分析

星岡 佑美[1]，安部 寛子[1]，矢島 大介[1,2]，槇野 陽介[1,3]，山口 るつ子[1]，齋藤 久子[1]，岩瀬 博太郎[1,3]

[1]千葉大学大学院 医学研究院，[2]国際医療福祉大学 医学部，[3]東京大学大学院 医学系研究科

P-34 LC-MS/MSを用いたヒトがん細胞株におけるDNAメチル化の包括的定量分析

中川 央充[1]，涌井 昌俊[2]，西銘 千代子[3]，林田 哲[4]，村田 満[2]
[1]慶應義塾大学病院 臨床検査科，[2]慶應義塾大学 医学部，[3]実験動物中央研究所，[4]慶應義塾大学医学部 外科学教室

P-36 LC-MS/MSを用いた淡水由来微生物B-9株の機能に関する研究
－アミノ酸トランスポーターの存在－

金 海燕[1]，小久保 縁[2]，植野 花耶[2]，Andrea R. J. ANAS[2]，辻 清美[3]，原田 健一[1,2]
[1]名城大院総合学術，[2]名城大薬，[3]神奈川衛研

P-38 単一脂質滴のトリグリセリド構成に及ぼす中鎖脂肪酸の影響

趙 瑤瑤[1]，陳 震[1]，呉 玥[1]，高 紫君[1]，張 新荣[2]，千葉 仁志[1,3]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]中国 清華大学 化学系，[3]札幌保健医療大学

P-40 LC/Orbitrap-MSを用いた牛卵子中脂質の網羅的解析

呉 玥[1]，植芝 滉己[2]，陳 震[1]，坂口 謙一郎[3]，柳川 洋二郎[3]，片桐 成二[3]，永野 昌志[3]，
千葉 仁志[1,4]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]北海道大学 獣医学部，[3]北海道大学大学院 獣医学研究院，[4]札幌保健医療大学 栄養学科

P-42 脂肪蓄積および酸化ストレス曝露による代謝変化

津久井 隆行[1,2]，郭 先薈[2]，陳 震[2]，惠 淑萍[2]，千葉 仁志[1,2]
[1]札幌保健医療大学 保健医療学部，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院

P-44 LC-MS/MSを用いたマウスin vivoにおけるtriazolam代謝物の分析

峰岸 元気[1]，香月 康宏[2,3]，押村 光雄[2]，秋田 英万[1]，小林 カオル[1]
[1]千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室，[2]鳥取大学 染色体工学センター，[3]鳥取大学大学院 医学系研究科

P-46 GC-MS定量法を用いたスチグマステロールのコレステロール代謝促進作用の解析

中川 沙織，清水（太田）美穂，不破 史子，大和 進
新潟薬科大学薬学部 薬品分析化学研究室

P-48 LC-MS/MSを用いたヒト血漿/血清中レボブピバカイン定量法の確立

森 照代，横畑 和代，渡邉 幸彦，曽我 学
丸石製薬株式会社 研究開発本部 創薬研究部

P-50 LC-MS/MSを用いた神経伝達物質、TSPOおよび関連薬物の同時定量

Andrea Roxanne J. ANAS[1,2]，森崎 潤子[1]，鳥居 優奈[1]，大矢 倫子[2]，鈴木 弘美[2]，今西 進[1]，
澤田 誠[2]，原田 健一[1,3]
[1]名城大学 薬学部，[2]名大 環境医学部，[3]名城大学大学院 総合学術研究科

P-52 LC/DMSO-assisted ESI-QTOF-MSを用いた尿中低分子ペプチドのハイスループット分析法

大田 正規，佐藤 充彦，岡野 雅人
株式会社LSIメディエンス アンチドーピングラボラトリー

P-54 NMDA受容体アンタゴニストによるCB_1受容体アゴニスト由来異常行動の増強効果と性差 －マウス大脳メタボローム解析による検討－

土屋 弥月[1]，井口 亮[2]，林 由美[3,4]，中山 浩[5]，大原 倫美[1]，牧野 宏章[5]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，
高橋 秀依[5]，財津 桂[1,4]
[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学，[2]産業技術総合研究所，[3]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，[4]名古屋大学 高等研究院，[5]東京理科大学 薬学部

P-56 DSMSプロジェクト ー集計ー：千葉大学法医薬物スクリーニング分析結果の集計報告

山岸 由和[1]，安部 寛子[1]，三浦 みゆき[1]，岡馬 圭介[1]，小椋 康光[1,2]，岩瀬 博太郎[1,3]
[1]千葉大学大学院医学研究院附属 法医学教育研究センター，[2]千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学研究室，[3]東京大学大学院医学系研究科 法医学教室

P-58 DSMSプロジェクト ー集計ー：東京医科歯科大学法医薬物スクリーニング分析結果の集計報告

則竹 香菜子，船越 丈司，鵜沼 香奈，上村 公一
東京医科歯科大学 法医学分野

P-60 DSMSプロジェクト ーブラインドテストー：第5回ブラインドテストの実施結果と考察

佐々木 千寿子，佐藤 文子
北里大学医学部 法医学

P-62 質量分析を用いた薬毒物分析が法医解剖事例の死因に及ぼす影響

安部 寛子[1]，緒方 善政[2]，星岡 佑美[1]，山岸 由和[1]，槇野 陽介[4]，小椋 康光[1,3]，岩瀬 博太郎[1,4]
[1]千葉大学大学院医学研究院 法医学教育研究センター，[2]伊勢原協同病院，[3]千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学教室，[4]東京大学大学院医学研究科 法医学

P-64 拡張型心筋症ハムスターモデルの病態解析と超高速イメージング質量分析法を用いたプロテオミック・バイオマーカー探索

新谷 祈[1]，辻 崇[2]，石田 瑞希[1]，韮澤 崇[3]，植田 初江[4]，升本 英利[2]，湊谷 謙司[2]，池川 雅哉[1]
[1]同志社大学生命医科学部 医生命システム学科，[2]京都大学大学院医学研究科 心臓血管外科学，[3]ブルカー ジャパンK. K.，[4]国立循環器病研究センター 病理部

P-66 イメージングマススペクトロメトリー法を用いたホルマリン固定パラフィン包埋バイオプシー試料から腎アミロイドーシスの鑑別診断

武笠 結天[1]，葛原 由貴[1]，寺田 恵[1]，韮澤 崇[2]，ラヴァン・マリオン[3]，
ジャンポール・ドン・バン・ファン[3]，ブルネバル・パトリック[4]，植田 初江[5]，角田 伸人[1]，
池川 雅哉[1]
[1]同志社大学生命医科学部 医生命システム学科，[2]ブルカー・ジャパンK.K.，[3]パリ国立ネッカー小児病院 病理部，[4]パリ公立ポンビドゥ・ヨーロッパ病院 解剖病理部，[5]国立循環器病研究センター 病理部・バイオバンクセンター

P-68 イメージング質量分析法を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスモデルの脳・脊髄解析から多発性硬化症のバイオマーカーと治療標的の発見

田中 那美[1]，山下 浩輝[1]，韮澤 崇[2]，田口 勝敏[3]，田中 雅樹[3]，近藤 誉之[4]，辻 雄大[1]，角田 伸人[1]，
池川 雅哉[1]
[1]同志社大学大学院生命医科学研究科 医生命機能研究室，[2]ブルカー・ジャパンK. K.，[3]京都府立医科大学大学院生体構造科学，[4]関西医科大学 総合医療センター

P-70 GC-MS/MSを用いたメタボローム解析におけるバッチ間データ補正法の検討

野田 沙樹[1]，林 由美[2,3]，井口 亮[4]，大原 倫美[1]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，財津 桂[1,3]
[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学，[2]名古屋大学大学院 医学系研究科，[3]名古屋大学 高等研究院，[4]産業技術総合研究所

P-72 尿ステロイドプロフィルGC-MS法前処理における低溶出サンプルチューブ（prototype, ジーエルサイエンス社製）の使用経験

本間 桂子[1]，中川 央充[1]，野口 昌代[1]，大野 明美[1]，柴田 綾子[1]，長谷川 奉延[2]，涌井 昌俊[3]，
村田 満[3]
[1]慶應義塾大学病院 臨床検査科，[2]慶應義塾大学医学部 小児科，[3]慶應義塾大学医学部 臨床検査医学

P-74 LC-MS/MSを用いたTCA回路代謝物の一斉分析

佐藤 完太[1]，山口 真史[2]，山本 哲志[2]，三田村 邦子[2]，多賀 淳[2]
[1]近畿大学大学院 薬学研究科，[2]近畿大学 薬学部

P-76 キラルカラムによるLC-MSを用いたヒドロキシ脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解析

藤原 優子，濱弘 太郎，横山 和明
帝京大学 薬学部

P-78 探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI/MS/MS）とScheduled SRM法を用いた生体組織のインタクト・メタボロミクス法の構築

近藤 健太[1]，林 由美[2,3]，村田 匡[4]，土屋 弥月[1]，大原 倫美[1]，石川 哲也[2]，緒方 是嗣[4]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，財津 桂[1,3]
[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学，[2]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，[3]名古屋大学 高等研究院，[4]島津製作所

P-80 自動前処理装置「ATLAS」とLC/Q-TOFMSを用いた肝臓中薬物スクリーニング法の構築

松本 謙吾[1]，財津 桂[1]，草野 麻衣子[1]，三浦 仁美[1]，筐 直樹[2]，渡邊 勉[2]，石丸 麗子[3]，地中 啓[3]，片木 宗弘[4]，三木 昭宏[4]，土橋 均[1]，石井 晃[1]
[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学，[2]島津エンジニアリング，[3]石川県警科捜研，[4]大阪府警科捜研

P-82 食餌由来脂肪肝モデルマウスにおいて鮭白子抽出物の摂取は肝機能障害の改善とミトコンドリアを活性化させる

櫻井 俊宏[1,2]，早坂 孝宏[1,2]，関口 博太[2,3]，佐藤 浩志[2,4]，陳 震[1,2]，千葉 仁志[1,2,5]，惠 淑萍[1,2]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]北海道大学 産学・地域協働推進機構フード＆メディカルイノベーション推進本部 日生バイオ・ライフサイエンス研究所 食と健康研究部門，[3]株式会社ライフ・サイエンス研究所，[4]日生バイオ株式会社，[5]札幌保健医療大学

P-84 Estimation of cadmium residues in animal byproducts using ICP/MS: Health risk assessment, in-vitro cadmium induced adverse effects and protection with ascorbic and rosmarinic acids

Wageh Sobhy Darwish[1,2], Hitoshi CHIBA[3], Shu-Ping HUI[1]
[1]Laboratory of lipid analysis, Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, Kita 12, Nishi 5, Sapporo, Japan, [2]Food Control Department, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, 44519, Zagazig, Egypt, [3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences, Nakanuma Nishi 4-2-1-15, Higashi Ku, Sapporo 007-0894, Japan

P-86 低濃度オゾンによる不飽和リン脂質膜の酸化に関する研究

喬 琳[1]，陳 震[1]，高田 俊智[2]，呉 玥[1]，千葉 仁志[1,3]，叶 深[2]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]東北大学大学院 理学研究科，[3]札幌保健医療大学

P-88 混合単分子膜の低濃度オゾンによる酸化に及ぼすコレステロール添加の影響

渡部 勇樹[1]，喬 琳[2]，陳 震[2]，高田 俊智[3]，呉 玥[2]，叶 深[3]，千葉 仁志[1,2,4]，惠 淑萍[1,2]
[1]北海道大学医学部 保健学科，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，[3]東北大学大学院理学研究科 化学専攻，[4]札幌保健医療大学

2日目　9月7日（金）

第1会場　［講堂］2F

8:30 - 9:45　**シンポジウム 3**　共催：日本臨床化学会

臨床化学研究における質量分析の貢献

オーガナイザー・座長：**眞野 成康**（東北大学病院），**中西 豊文**（大阪医科大学）

S3-1　**ソフトイオン化質量分析法を用いた日常生化学検査の確立とその応用研究**

中西 豊文[1]，高橋 利枝[2]，五十嵐 一雄[3]

[1]大阪医科大学 研究支援センター，[2]東京大学大学院医学系研究科 ライフサイエンス研究機器支援室，[3]一般社団法人医薬分析協会

S3-2　**質量分析を活用したアミロイドーシスの病型診断**

城野 博史[1]，田崎 雅義[2]，大林 光念[2]，安東 由喜雄[3]

[1]熊本大学医学部附属病院 薬剤部，[2]熊本大学大学院生命科学研究部 構造機能解析学分野，[3]熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野

S3-3　**治療効果の最大化を目指した経口抗がん薬の治療薬物モニタリング**

髙﨑 新也[1]，川崎 芳英[2]，菊地 正史[1]，田中 雅樹[1]，山口 浩明[1]，眞野 成康[1]

[1]東北大学病院 薬剤部，[2]東北大学病院 泌尿器科

9:50 - 11:05　**シンポジウム 5**　共催：日本臨床検査医学会

臨床検査の現場で活躍する質量分析技術

オーガナイザー：**野村 文夫**（千葉大学），**村上 正巳**（群馬大学）

座長：**野村 文夫**（千葉大学），**木村 孝穂**（群馬大学）

S5-1　**HbA1cの標準化と質量分析**

木村 孝穂[1,2]，村上 正巳[1,2]

[1]群馬大学大学院医学系研究科 臨床検査医学，[2]群馬大学医学部附属病院 検査部

S5-2　**臨床検査における質量分析の現状と課題**

上瀧 智巳[1]，岩沢 勇也[2]，井上 剛[2]，佐藤 照徳[2]，南部 裕里[2]，国分 容子[3]

[1]株式会社エスアールエル 技術推進部 検査開発グループ，[2]株式会社エスアールエル 治験・特殊検査部 分析化学課，[3]株式会社エスアールエル 治験・特殊検査部 治験検査課

S5-3　**微生物検査に大きな影響を及ぼした質量分析技術**

草場 耕二

佐賀大学医学部附属病院 検査部

11:10 - 12:10　特別講演

座長：惠 淑萍（北海道大学）

Single Cells Analysis with Mass Spectrometry

Xinrong Zhang
Department of Chemistry, Tsinghua University, China; Vice President, China Mass Spectrometry Society

12:15 - 13:15　ランチョンセミナー 3

共催：株式会社島津製作所

LS3　**島津製作所質量分析最新情報のご紹介**

渡辺 淳，緒方 是嗣
株式会社島津製作所

13:20 - 14:35　シンポジウム 7
血清と血漿のプロテオミクス・ペプチドミクス

オーガナイザー・座長：小寺 義男（北里大学）

S7-1　**血液の本質を捉えることを目指したタンパク質・ペプチドの存在様式の分析**

小寺 義男[1,2]
[1]北里大学理学部物理学科 物性物理学研究室，[2]北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンター

S7-2　**保存された臨床検体（血清）の質量分析による劣化の評価**

土田 祥央[1]，佐藤 守[1]，梅村 啓史[2]，曽川 一幸[3]，滝脇 正貴[1]，石毛 崇之[4]，西村 基[4]，小寺 義男[5]，松下 一之[4]，野村 文夫[1,4]
[1]千葉大学医学部附属病院 マススペクトロメトリー検査診断学，[2]日本大学医学部病態病理学系 臨床検査医学分野，[3]麻布大学臨床検査技術学科 生化学教室，[4]千葉大学医学部附属病院 検査部/遺伝子診療部，[5]北里大学理学部物理学科 物性物理学講座

S7-3　**ターゲットプロテオミクスを用いた血清エクソソーム中の大腸がん早期診断マーカー開発と臨床応用**

朝長 毅，白水 崇，足立 淳
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 プロテオームリサーチプロジェクト/創薬標的プロテオミクスプロジェクト

14:35 - 14:45　閉会の辞

第2会場　［小講堂］1F

8:30 - 9:45　**シンポジウム 4**　共催：日本過酸化脂質・抗酸化物質学会

加齢・疾病対策のための酸化脂質研究の最前線

オーガナイザー：宮澤 陽夫（東北大学），惠 淑萍（北海道大学）

座長：惠 淑萍（北海道大学），仲川 清隆（東北大学）

S4-1　LC-MS/MSによる過酸化脂質異性体の解析

仲川 清隆

東北大学大学院農学研究科 機能分子解析学分野

S4-2　LC/MSを用いたカルジオリピン過酸化物の分析

陳 震[1]，呉 玥[1]，馬 逸興[1]，小林 悠[1]，趙 瑤瑤[1]，三浦 佑介[1]，千葉 仁志[1,2]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]札幌保健医療大学 栄養学科

S4-3　nanoESI-MSおよびLC/MSによる過酸化脂質の分析

惠 淑萍

北海道大学大学院 保健科学研究院

9:50 - 11:05　**シンポジウム 6**

変死体中薬物分析と質量分析―精神作用薬服用症例

オーガナイザー・座長：五十嵐 一雄（医薬分析協会）

S6-1　変死体解剖試料にみられる向精神病薬の血中濃度と主な死因

五十嵐 一雄[1,2]，巽 信二[2]

[1]一般社団法人医薬分析協会，[2]近畿大学医学部 法医学

S6-2　愛知県2大学における法医解剖薬毒物分析に関する考察

小川 匡之[1]，大瀧 純[2]，鈴木 隆佳[1]，岩井 雅枝[1]，近藤 文雄[1]，菅野 さな枝[2]，福田 真未[2]，加藤 秀章[2]，青木 康博[2]，妹尾 洋[1]

[1]愛知医科大学医学部 法医学講座，[2]名古屋市立大学大学院医学研究科 法医学分野

S6-3　変死体中薬物分析と質量分析 ― 精神作用薬服用症例

ウォーターズ ブライアン[1,2]，原 健二[1,2]，徳安 智子[1,2]，池松 夏紀[1,2]，髙山 みお[1,2]，松末 綾[1,2]，柏木 正之[1,2]，久保 真一[1,2]

[1]福岡大学医学部 法医学教室，[2]福岡大学 薬毒物探索解析研究所

12:15 - 13:15　ランチョンセミナー 4　共催：ブルカージャパン株式会社

LS4　質量分析による分子イメージング最新情報

韮澤 崇
ブルカージャパン株式会社

13:20 - 14:35　シンポジウム 8
疾患関連リゾリン脂質の臨床診断マーカーへの応用

オーガナイザー・座長：三枝 大輔（東北大学）

S8-1　リゾリン脂質メディエーター研究における質量分析計の利用

青木 淳賢[1,2]
[1]東北大学大学院 薬学研究科，[2]AMED-LEAP

S8-2　ヒトサンプルを用いたリゾリン脂質測定系によるヒト疾患病態の解明と臨床応用

蔵野 信，矢冨 裕
東京大学大学院 医学系研究科

S8-3　High-Definition Mass Spectrometryによるヒト肝がん組織のメタボロミクス解析

三枝 大輔[1,2,3]，永井 滉士[4]，Baasanjav Uranbileg[3,5,6]，蔵野 信[3,5,6]，長谷川 潔[6]，國土 典宏[6]，池田 均[3,5,6]，矢冨 裕[3,5,6]，富岡 佳久[4]，青木 淳賢[3,4]
[1]東北大学 東北メディカル・メガバンク機構，[2]東北大学大学院 医学系研究科，[3]AMED-LEAP，[4]東北大学大学院 薬学研究科，[5]東京大学大学院 医学部，[6]東京大学病院

講演要旨

特別講演

Single Cells Analysis with Mass Spectrometry

Xinrong ZHANG

Department of Chemistry, Tsinghua University, China;
Vice President, China Mass Spectrometry Society

The measurement of simultaneous parameters in a single cell is important because useful information can be collected from individual cells to help understanding the disease manifests or precisely correct pathologic processes. In the past years, the fluorescence tags have been widely applied but the technique practically limited to the measurement of maximum 10-15 simultaneous parameters due to the spectral overlap. In past years, my group proposed a strategy by using real-earth elements and their stable isotopes as tags coupling to ICP-MS analysis, and demonstrated the potential application to multicomponent analysis[1]. On the basis of this strategy, other group proposed a mass cytometry to create a detailed response profile for single cells analysis with 34 simultaneously measured cellular parameters, and successfully applied to the study of drug responses across a human hematopoietic continuum. Although the "omics" study was expected to be the next step for single cell analysis, the elemental tagging strategy might never reach the goal due to the limited tags available. Alternatively, it has been demonstrated in our recent study that MS spectra could be obtained by using mass spectrometry with over a hundreds of peaks from a single cell[2-5], so as to help the integrated views of the cell statues such as the cancer cell expression or the diseased cell apoptosis etc.

Acknowledgements

The author gratefully acknowledge the support from the National Natural Science Foundation of China (21390413)

References

1. Liu, R.; Zhang, S.; Wei, C.; Xing, Z.; Zhang, S.; Zhang, X., Metal Stable Isotope Tagging: Renaissance of Radioimmunoassay for Multiplex and Absolute Quantification of Biomolecules. Accounts of Chemical Research 2016, 49 (5), 775-783.
2. Wei, Z.; Han, S.; Gong, X.; Zhao, Y.; Yang, C.; Zhang, S.; Zhang, X., Rapid Removal of Matrices from Small-Volume Samples by Step-Voltage Nanoelectrospray. Angewandte Chemie-International Edition 2013, 52 (42), 11025-11028.
3. Gong, X.; Zhao, Y.; Cai, S.; Fu, S.; Yang, C.; Zhang, S.; Zhang, X., Single Cell Analysis with Probe ESI-Mass Spectrometry: Detection of Metabolites at Cellular and Subcellular Levels. Analytical Chemistry 2014, 86 (8), 3809-3816.
4. Zhang, XC.; Wei, Z.; Gong, X; Si, X; Zhao, Y; Yang, C; Zhang, S.; Zhang, X., Integrated Droplet-Based Microextraction with ESI-MS for Removal of Matrix Interference in Single-Cell Analysis. Scientific Reports 2016, 6.
5. Si, X.; Xiong, X.; Zhang, S.; Fang, X.; Zhang, X., Detecting Low-Abundance Molecules at Single-Cell Level by Repeated Ion Accumulation in Ion Trap Mass Spectrometer. Analytical Chemistry 2017, 89 (4), 2275-2281.

講演要旨

受賞講演

受賞講演　奨励賞

LC/MS/MSによるビタミンD代謝物・各種ステロイドホルモン測定の臨床検査応用

佐藤 守

千葉大学医学部附属病院 マススペクトロメトリー検査診断学

Clinical application of vitamin D metabolite and steroid hormone measurements by LC/MS/MS.

Mamoru Satoh

Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University Hospital

疾患診断マーカーの臨床応用までの道程は検体採取に始まり、マーカー候補の探索、多検体でのバリデーション、検査測定法の開発、検査法の製品化、各種認可取得へ向けたデータ取得と申請等と実に様々なフェーズが存在する。各分析フェーズにおいて質量分析は必要不可欠な存在であり、特にプロテオーム・メタボローム解析では多くの診断マーカー候補の創出に貢献している。では実際の臨床検査室における質量分析の利用状況はどうであろうか。細菌検査室でのMALDI-TOF MSの利用は進んでいるものの、ホルモン・蛋白質・脂質を検査する臨床化学の分野ではほとんど利用されていないのが現状である。その原因はイムノアッセイのような簡便でハイスループットな方法が存在しないこと、質量分析では操作が自動化されておらず煩雑かつ専門的すぎること、前処理を含めた測定に長時間を要し、現在の趨勢である診察前検査が難しいこと、などが挙げられる。この状態では有用な新規診断マーカーが見出されても抗体の作出が困難な場合は実用化できない、または非常に時間がかかってしまうのが現状である。そこで臨床化学分野における新しい検査プラットフォームとしてマーカー候補の探索に使用している質量分析の導入が必要であり、ルーチン的に活用されるためには、現場の利用状況に合わせた問題点の洗い出しと検証が重要だと考える。

これまで千葉大学病院検査部や小児科・婦人科・泌尿器科の御協力のもと様々な検体でビタミンD代謝物やステロイドホルモン測定系の構築と実際の定量測定を経験し、検体の状態が実に様々であることを改めて実感できた。例えば、“長期のルーチン測定中にピークの消失！？”“依頼検体を測定したら非常に強い強度のピークを検出！！”等である。また、臨床検査では再現性に加えトレーサビリティーに基づく値の正確度や年単位の長期安定性も要求されるなど、分析法に求められる堅牢性のレベルが非常に高い。一方で、堅牢性とは相反するハイスループットであることも要求される。直面した問題点は“リン脂質と測定対象は分離したいが分析時間を長くしたくない”“分析時間を短くするとリン脂質の溶出時間が重水標識体と重なってしまう”等である。本発表では、これら方法開発と実際に応用する際の課題について紹介させていただく。

受賞講演　奨励賞

質量分析によるメタボローム解析の法中毒学的応用ならびに新規質量分析法を用いたリアルタイム・メタボローム解析技術の開発

財津 桂[1,2]

[1]名古屋大学高等研究院 若手新分野創成研究ユニット・フロンティア in vivoリアルタイム・オミクス研究室,
[2]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学

Application of MS-based metabolomics to Forensic Toxicology and real-time metabolome analysis using a new mass spectrometric technique

Kei Zaitsu[1,2]

[1]In Vivo Real-time Omics Laboratory, Institute for Advanced Research, Nagoya University,
[2]Department of Legal Medicine & Bioethics, Nagoya University Graduate School of Medicine

メタボローム解析は精緻な表現型解析の1つと解釈でき、病態モデル等の解析に留まらず、法中毒・毒性学分野における急性薬物中毒や薬物依存モデル等の表現型解析にも有効である。一方、生体内におけるメタボロームの変動は、常に”動的平衡状態”にあることから、マウス等を解剖して得られたメタボロームの定点観測結果から、結果を厳密に解釈することには限界がある。特に、動物モデルの解剖を伴う試料採取においては、“死” というイベントが不可避であり、生体内での真のメタボロームの動的変化を可視化するためにはリアルタイム解析が不可欠と考えられる。そこで本発表では、メタボロミクスの法中毒学的応用例[1-3]と共に、近年、我々が開発したリアルタイム・メタボローム解析技術[4-6]について概説する。

【メタボローム解析の法中毒学的応用】カンナビノイド受容体 (CBR) アゴニスト急性中毒モデルラットのメタボローム解析[2]：CBRアゴニストを投与したラットの大脳にメタボローム解析を実施した結果、エネルギー代謝に変動を生じることが示された。セロトニン症候群 (SS) モデルラットのメタボローム解析[3]：SSモデルラットの血漿、骨格筋、肝臓にメタボローム解析を実施した結果、骨格筋の異常収縮によって血中メタボロームの異常集積が生じることを見出した。

【リアルタイム・メタボローム解析技術】探針エレクトロスプレーイオン化法 (PESI) [7]は低侵襲的なサンプリングと対象成分の直接イオン化が可能な手法であり、PESIをタンデム質量分析と組み合わせたPESI/MS/MSを用いることで、生きているマウスの肝臓内におけるメタボライトの動的変化を観察することに成功[4]した。さらに、本手法を脳試料へ拡張[5]し、生きているマウスの脳内メタボライトの動的変化を可視化することに成功した[6]。今後、メタボローム解析の法中毒・毒性学的応用を更に拡張すると共に、“リアルタイム・メタボローム解析” という新たな研究領域の創成を志向したい。

【参考文献】

1) K. Zaitsu et al. ***Anal. Bioanal. Chem.*** 2014
2) K. Zaitsu et al. ***Life Sci.*** 2015
3) K. Zaitsu et al. ***Life Sci.*** (in press)
4) K. Zaitsu et al. ***Anal. Chem.*** 2016
5) Y. Hayashi et al. ***Anal. Chim. Acta*** 2017
6) K. Zaitsu et al. ***Anal. Chem.*** 2018
7) K. Hiraoka et al. ***Rapid Commun. Mass Spectrom.*** 2007

講演要旨

シンポジウム

S1　イメージングと質量分析
オーガナイザー・座長：瀬藤 光利（浜松医科大学），池川 雅哉（同志社大学）

S2　トランスオミクス解析の自動化への取組み－現状と今後
オーガナイザー・座長：飯田 順子（島津製作所），柚木 克之（理化学研究所）

S3　臨床化学研究における質量分析の貢献
オーガナイザー・座長：眞野 成康（東北大学病院），中西 豊文（大阪医科大学）

S4　加齢・疾病対策のための酸化脂質研究の最前線
オーガナイザー：宮澤 陽夫（東北大学），惠 淑萍（北海道大学）
座長：惠 淑萍（北海道大学），仲川 清隆（東北大学）

S5　臨床検査の現場で活躍する質量分析技術
オーガナイザー：野村 文夫（千葉大学），村上 正巳（群馬大学）
座長：野村 文夫（千葉大学），木村 孝穂（群馬大学）

S6　変死体中薬物分析と質量分析―精神作用薬服用症例
オーガナイザー・座長：五十嵐 一雄（医薬分析協会）

S7　血清と血漿のプロテオミクス・ペプチドミクス
オーガナイザー・座長：小寺 義男（北里大学）

S8　疾患関連リゾリン脂質の臨床診断マーカーへの応用
オーガナイザー・座長：三枝 大輔（東北大学）

S1-1

質量分析イメージングによって発見した、動脈硬化・腹部大動脈瘤における新規病態とそれらを標的とした予防・治療の可能性

財満 信宏[1,2]

[1]近畿大学大学院 農学研究科，[2]近畿大学 アグリ技術革新研究所

Novel pathological findings of arteriosclerosis and abdominal aortic aneurysm observed by MALDI-MSI

Nobuhiro Zaima[1,2]

[1]Graduate School of Agriculture, Kindai University, [2]Agricultural Technology and Innovation Research Institute

生体機能の調節に重要や役割を担っている分子の異常変動は様々な疾患の発症・進展に関与している。これまでの優れた基礎研究によって、疾患組織における代謝物の量や質の変動の多くが明らかになってきた。現在はこれらの研究から得られた知見が、疾患によって変動する生体分子の代謝異常の制御を目指した薬物や機能性食品の創出に不可欠なものとなっている。その一方で、疾患組織の「どこ」で代謝の異常が起きているのかという位置情報を解析した研究は少ない。これは、代謝物を可視化して観察することのできる技術の発展が他の技術と比較して遅れていたためであると考えられる。

我々はmatrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) を用いて、疾患 (特に血管疾患) 組織中における代謝物を可視化解析する手法の検討と有効性の実証に取り組んできた。これまでのMALDI-MSIによる疾患組織解析の結果、様々な場所で代謝物の変動が生じていることが明らかになった。本発表では、動脈硬化と腹部大動脈瘤における部位特異的な代謝異常と疾患発症・進展の関わりの解明、さらには動脈硬化と腹部大動脈瘤の新たな予防・治療法の確立を目的として行った我々の研究を紹介する。

また、疾患の予防・治療を目的とした研究を行う場合、摂取した機能性成分が疾患組織のどこにどのような形で到達するのかを明らかにすることが重要である。疾患組織を用いた代謝異常解析と比較すると食品成分の体内動態の可視化は困難であるが、本発表では我々の研究で得られた体内動態に関する知見を交えながら、機能性食品 (もしくは薬物) 創出の際の体内動態解析の有用性についても議論したい。

S1-2

イメージング質量分析法を用いたアミロイドーシスの高深度プロテオミクス

池川 雅哉[1]，角田 伸人[1]，韮澤 崇[2]，植田 初江[3]

[1]同志社大学生命医科学部 医生命機能研究室，[2]Bruker Japan K.K.,
[3]国立循環器病研究センター 病理部・バイオバンクセンター

In-depth Proteomics for the study of amyloidosis using Imaging Mass Spectrometry

Masaya Ikegawa[1], Nobuto Kakuda[1], Takashi Nirasawa[2], Hatsue Ishibashi-Ueda[3]

[1]Genomics, Proteomics and Biomedical Functions, Faculty of Life and Medical Science, Doshisha University,
[2]Bruker Japan K.K., [3]Depertment of Pathology, National Cerebral and Cardiovascular Center

これまで脳・心血管病理学におけるアミロイドーシスの診断は，組織におけるアミロイドタンパク質の存在の有無をCongo red 染色やDirect Fast Scarlet (DFS) 染色によって顕微鏡で判断する方法や，アミロイドタンパク質に特異的な抗体を使用する免疫学的手法による方法が主流であった．一方，免疫組織化学全般において，タンパク質の断片化や立体構造の変化によって抗体反応の損なわれる場合や，偽陽性などの課題が指摘されている．近年，イメージング質量分析 (Imaging Mass Spectrometry; IMS) 法の発展にともない抗体などのプローブを用いずに，組織切片上に存在する生体分子の局在を直接可視化することができるようになった．我々は，脳タンパク質老化研究の一環としてアルツハイマー病や脳アミロイドアンギオパチーの患者剖検脳を対象としたIMS法の確立に成功した．その背景には，1) 組織前処理法の開発、2) 超高速イメージング質量分析装置の導入，3) 解析統計手法の選択が必須であった．特に，病理診断で用いられるFFPE (formalin-fixed paraffin embedded) サンプルは，タンパク質間の強固な架橋により，イオン化が困難である．我々は，脳の剖検サンプルに加え，心臓・腎臓のバイオプシー由来のFFPEサンプルからアミロイドーシス診断に基盤技術の検討を行いIMS法を用いた高深度プロテオミクスを行うことにより，今後の臨床･病理研究への展望について若干の考察を加えた．

S1-3

薬物動態解析のためのイメージング質量分析法の開発

近藤 豪[1,2]，瀬藤 光利[1,2]

[1]浜松医科大学医学部 細胞分子解剖学講座，[2]浜松医科大学 国際マスイメージングセンター

Development of imaging mass spectrometry for pharmacokinetics

Takeshi Kondo[1,2], Mitsutoshi Setou[1,2]

[1]Department of Cellular and Molecular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine,
[2]International Mass Imaging Center, Hamamatsu University School of Medicine

イメージング質量分析法 (Imaging Mass Spectrometry, IMS) の登場は、生体試料中の分子分布をラベルフリーでイメージング可能にした。質量分析で分子種を区別するため、免疫染色等が難しい脂質や代謝物の分布だけでなく、生体内に分布する医薬品の可視化にもIMSは有効である。分子量の違いから、プロドラッグや活性体、代謝物をそれぞれ区別してイメージング可能であるため、薬物動態解析への応用に対する製薬業界からの期待が特に高い。しかし、現在のIMSにおいて主流のマトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) では、標的とする医薬品のイオン化効率が悪く、通常生体に分布する濃度条件で目的の医薬品をイメージングできないケースが多い。

そこでわれわれは、新たに脱離エレクトロンスプレーイオン化法 (Desorption electrospray ionization, DESI) を採用し、薬物動態解析に適したIMS技術の構築に取り組んでいる。イオン化に用いる溶媒条件の最適化と脱離イオンの検出改善機構を備えた装置を新規に構築し、生体組織中の薬物検出に最適な条件設定を可能にしている。これにより従来法よりも優れた薬物イメージング成績を達成しており、今後の薬物動態解析への貢献が期待される。本講演では、本法を用いた薬物イメージングの例について紹介したい。

本研究開発はJST-大学発新産業創出プログラム (START) による支援によりおこなわれ、今年度中を目処に薬物動態を受託解析する大学発ベンチャー企業の設立を予定している。興味のある方はお問い合わせ頂きたい。

S1-4

MALDIイメージング法による生体試料中生理活性物質の静的・動的解析

中西 豊文[1]，五十嵐 一雄[2]

[1]大阪医科大学 研究支援センター，[2]一般社団法人医薬分析協会

Static and dynamic analyses of physiologically active targets in biological samples by MALDI imaging

Toyofumi Nakanishi[1], Kazuo Igarashi[2]

[1]Research Development Center, Osaka Medical College, [2]Association of Medicinal Analysis

光学顕微鏡による画像解析とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOFMS）法による構造解析手法を組み合わせたMALDI-イメージング（IMS）法は、組織切片内に発現している標的分子の局在性やその発現量を直接MS解析出来る新しい解析法である。Caprioli教授らによる最初の報告例以来、早25年が過ぎるが、タンパク質など高分子化合物の解析に関しては当初の期待に反し、得られる情報が標的分子のm/zの検出とその組織内局在性に限定されてしまうこと、20kDa以上になると極端な分解能／感度低下が認められること、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織に対しては、標的タンパク質分子の直接分析は困難であることから、解析対象が薬物・脂質など低分子量物質へと変更を余儀なくされた。しかし、Caprioli教授らは、更に「FFPE組織切片を直接*on-tissue*トリプシン消化した後、生成した断片化ペプチドをMS解析し、更にMSMS解析／データベース検索によって標的タンパク質を同定する方法」を確立し、本IMS法の適用範囲の拡大に大いに寄与した。

本シンポジウムでは、実地医療あるいは実社会への貢献して来たこれまでの我々グループの自検例を中心にIMS法による生理活性物質の静的・動的解析を紹介したい。

S1-5

フーリエ変換型質量分析による網羅的な代謝イメージング

杉浦 悠毅

慶應義塾大学医学部 医化学教室

Pathway tracing / imaging of stable isotope labeled compounds by high resolution imaging mass spectrometry

Yuki Sugiura

Department of biochemistry, school of medicine, Keio University

【目的】*in vitro*では一様な代謝を示す疾患モデル細胞であっても、*in vivo*においては正常細胞と代謝ネットワークを巡らせ、微小環境に応じた異なる代謝特性を示すサブポピュレーションを形成する。私たちはフーリエ変換型質量分析による「代謝物の網羅的な分布イメージング」により、腫瘍内の不均一な代謝特性を明らかにしてきた。

腫瘍内部の微小環境により、同じがん細胞でも全く異なる代謝表現系を有する為、*in vivo*における不均一な代謝特性へのアプローチとしてイメージング質量分析は重要である。

【方法】動物臓器では体液を介した不足/過剰な代謝物の補充/排出が常に行われる。この為、単なる代謝物の増減がどの代謝経路の亢進/減弱の結果かは、同位体標識トレースなくしては解釈が難しい。私たちは、代謝「経路」の異常を見出す為、安定同位体標識を活用した『***in vivo*代謝経路トレース解析・イメージング**』を行っている。これは、担がん動物に13C安定同位体標識グルコースを投与し、例えば13C含有乳酸を定量・イメージングする事で、解糖系がどの程度、また『組織のどの細胞において亢進したか』に解を与える技術として活用している。

【結果と考察】動物モデルにおける皮下移植xenograftにおいても、腫瘍内部の代謝は均一でない。ヒト検体においては、免疫系の介入によりさらに複雑な代謝表現型を示す。私達は、エネルギー代謝に関わる低分子 (e.g., 解糖系やTCAサイクル中間代謝産物) や、レドックス代謝産物 (e.g., NADHやグルタチオン)、さらには微量シグナル伝達分子をフーリエ変換型質量分析計により網羅的に可視化し、これに加え安定同位体標識化合物 (e.g., 13C6-グルコース) の各経路への流入も視覚的に示すことが出来た。これらの結果から、がんの腫瘍内の局所的な増殖能について、血管新生、細胞増殖、さらに免疫浸潤の視点から議論したい。

S2-1

トランスオミクスにおけるデータ解析およびその自動化に向けて

柚木 克之[1,2,3,4]

[1]理化学研究所・生命医科学研究センター，[2]JSTさきがけ「疾患代謝」領域，
[3]慶應義塾大学・先端生命科学研究所，[4]東京大学・大学院理学系研究科

Trans-omic data analysis and automation

Katsuyuki Yugi[1,2,3,4]

[1]RIKEN IMS, [2]JST PRESTO, [3]Keio University, [4]University of Tokyo

【目的】我々は多階層オミクスデータを情報科学的・統計的手法を用いて統合するトランスオミクス解析[1-3)]の方法論を開発し、これを肝細胞や脂肪細胞におけるインスリン作用の代謝制御ネットワーク再構築に適用した[4,5)]。これと併せて、ネットワーク再構築のデータ解析パイプラインを自動化するソフトウェアの開発を進めている。

【方法】階層内のネットワークを再構築するにあたっては、KEGG PATHWAY所収の生化学反応系を事前知識として用いた。また、階層間をつなぐ際には、酵素データベースBRENDA、キナーゼ-基質関係推定ソフトウェアNetPhorestや、各種ID変換ツールを用いて複数階層間にまたがるネットワークを再構築した。

【結果】同一条件下で調製した細胞試料から得られた時系列リン酸化プロテオームデータおよび時系列メタボロームデータから、インスリン刺激直後に応答する多階層代謝制御ネットワークを再構築することに成功している。

【考察】今回は通常の学会発表等ではあまり取り上げない当該データベースおよびソフトウェアを簡単に紹介するほか、各階層のオミクスデータに付されたIDの変換の実際や、トランスオミクスの根底にある反応速度論の考え方など内容を紹介する。また、自動化ソフトウェアの開発状況についても触れる。

参考文献

1) K. Yugi et al., Trends. Biotechnol., 34, 276-290 (2016)
2) K. Yugi and S. Kuroda, Cell Syst., 4, 19-20 (2017)
3) K. Yugi and S. Kuroda, Curr. Opin. Syst. Biol. 8, 59-66 (2018)
4) K. Yugi et al., Cell Rep., 8, 1171-1183 (2014)
5) J.R. Krycer and K. Yugi et al., Cell Rep., 21, 3536-3547 (2017)

S2-2

臨床検体を扱うメタボロミクスの落とし穴

杉本 昌弘[1,2,3,4]

[1]東京医科大学 低侵襲医療開発総合センター，[2]慶應義塾大学 先端生命科学研究所，
[3]神奈川歯科大学大学院 歯学研究科，[4]筑波大学 プレシジョン・メディスン開発研究センター

A pitfall of metabolomics for clinical utility

Masahiro Sugimoto[1,2,3,4]

[1]Research and Development Center for Minimally Invasive Therapies, Tokyo Medical University,
[2]Institute for Advanced Biosciences, Keio University,
[3]Division of Salivary Gland and Health Medicine, Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University, [4]Research and Development Center for Prevision Medicine, Tsukuba University

【目的】メタボロミクスの測定技術やデータ解析技術は既に他の定量オミックスデータのように十分成熟して様々なアプリケーションが創出されている。一方、実験室レベルの測定から、臨床応用までには様々なギャップがあり、様々な基礎検討と、測定データの再現性を高めるための、検体取り扱いの標準化(SOP) の確立が必要である。
【方法】血液・尿・唾液を例として検体処理、採取、保存状態によって代謝物の定量値の変化を調べた。
【結果】定量値の再現性を出すためには自動解析では不十分なケースもあり、適切なデータ処理と品質制御が必要であることが確認できた。また、臨床検体の取り扱いは、わずかな保存時間の違いなどでも代謝物の定量値に影響があることが確認できた。
【考察】品質制御のサンプルや内部標準物質の設計を行うことで、これらの問題を低減することもできる。一方、これらの規格化を行わなければ思わぬ結果が得られることもある。検体を採取する現場で順守できるプロトコルを厳しくするには限界があり、得られる定量値の品質とはトレードオフの関係にあり、これらを加味したSOPの確立が必要である。

S2-3

Garuda Platformを用いたマルチオミクスデータ解析

安田 弘之[1]，山田 洋平[1]，金澤 慎司[1,2]，國澤 研大[1,2]，松田 史生[2]，Samik Ghosh[3]，長谷 武志[3]，Nikolaos Tsorman[3]，松岡 由希子[3]，梶原 茂樹[1]，北野 宏明[3]，福崎 英一郎[2]，飯田 順子[1,2]

[1]株式会社島津製作所，[2]大阪大学，[3]システム・バイオロジー研究機構

Data analysis for multiomics by Garuda Platform

Hiroyuki Yasuda[1], Yohei Yamada[1], Shinji Kanazawa[1,2], Akihiro Kunisawa[1,2], Fumio Matsuda[2], Samik Ghosh[3], Takeshi Hase[3], Nikolaos Tsorman[3], Yukiko Matsuoka[3], Shigeki Kajihara[1], Hiroaki Kitano[3], Eiichiro Fukusaki[2], Junko Iida[1,2]

[1]Shimadzu Corporation, [2]Osaka University, [3]The Systems Biology Institute

【目的】生物システムを理解する上で代謝物、タンパク質や遺伝子発現、代謝フラックスなどの複数の階層をまたいだオミクス解析から、生物システムを理解しようとするマルチオミクス解析が活用されつつある。本研究では、Garuda Platform[1]を用いることで複数のオミクスデータについての解釈支援を行うことを目的としている。

【方法】光合成微生物シアノバクテリアのモデル生物であるSynechocystis sp. PCC 6803 株を異なる3条件下（光独立栄養条件：autotrophic (Auto)，混合栄養条件：mixotrophic (Mixo)，光従属栄養条件：photoheterotrophic (Hetero)) で培養し、それぞれについてトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム、代謝フラックスについて測定されたデータ[2] [3] [4]をGaruda Platform に読み込み、測定結果をパスウェイマップ上に投影する。

【結果】パスウェイマップ上にトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム、代謝フラックスのデータを可視化することでRuBisCO (RbcL/RbcS) が触媒する CO2固定反応経路上の、代謝フラックス (Flux_rbc1) は光独立栄養条件 (Auto)，混合栄養条件 (Mixo)，光従属栄養条件 (Hetero) の順で減少していることが確認できた。基質となる代謝物のRuBP, 生成物の3PG含量、RuBisCOタンパクをコードするrbcL/rbcS遺伝子の発現量は、代謝フラックスと明確な相関がみられなかった。一方、RuBisCOタンパクであるrbcL/rbcSの発現量変化は、代謝フラックスの変化と類似していた。

【考察】Garuda Platformを活用することで、4層の多階層オミクスデータをパスウェイマップ上に容易に可視化することが可能になった。今後、化合物間の相関を計算することで、化合物の変動の傾向を理解することが出来る。Garuda上の他ガジェットとの連携により、データ解釈が可能になると期待される。

[1] Ghosh, S., Matsuoka, Y., Asai, Y., Hsin, K. Y., Kitano, *Nature Rev. Genet*. **12**, 821-832 (2011)

[2] Nakajima et al., *Plant Cell Physiol* **55**, 1605-1612 (2014)

[3] Yoshikawa et al., *Biotechnol J* **8**, 571-580 (2013)

[4] Nakajima. et al., *Plant Cell Physiol* **58**, 537-545 (2017)

S2-4

漢方薬のシステムバイオロジー：
漢方薬の成分代謝・生体作用プロファイルの統合解析

西 明紀[1]，大渕 勝也[1]，串田 浩孝[1]，下堀 知香[1]，松本 隆志[1]，山本 雅浩[1]，黒木 春郎[2]，
鍋島 茂樹[3]，谷内江 綾子[4]，松岡 由希子[4]，北野 宏明[4]

[1]株式会社ツムラ ツムラ漢方研究所，[2]医療法人社団嗣業の会 外房こどもクリニック，
[3]福岡大学病院 総合診療部，[4]特定非営利活動法人 システム・バイオロジー研究機構

Kampo Systems Biology: Integrated analysis of compound metabolism and pharmacological profile of Japanese traditional medicine *"Kampo"*

Akinori Nishi[1], Katsuya Ohbuchi[1], Hirotaka Kushida[1], Chika Shimobori[1], Takashi Matsumoto[1], Masahiro Yamamoto[1], Haruo Kuroki[2], Shigeki Nabeshima[3], Ayako Yachie[4], Yukiko Matsuoka[4], Hiroaki Kitano[4]

[1]Tsumura Kampo Research Laboratories, Tsumura and Co., Ibaraki, Japan,
[2]Sotobo Children's Clinic, Medical Corporation Shigyo-no-kai, Chiba, Japan,
[3]General Medicine, Fukuoka University Hospital, Fukuoka, Japan, [4]The Systems Biology Institute, Tokyo, Japan

漢方薬は複数生薬からなる多成分系の薬剤であり、その特徴的な作用は多様な成分と生体因子との複雑な相互作用によって発揮されると考えられる。我々は現在、オミクス解析により漢方薬成分の代謝プロファイルや、生体作用因子の包括的な解析を実施し、漢方薬作用を統合的に解析するための基盤構築を目指している。今回インフルエンザ様症状に効果を示す麻黄湯において、ラットモデルを用いた包括的な成分・代謝物のプロファイリングおよび生体メタボローム解析・薬理学的解析を実施した取り組みについて紹介する。

漢方薬成分は投与後に様々な代謝を受けることが知られている。その変遷を解析するため、麻黄湯投与後のラット血漿について網羅的成分分析を実施した。その結果、麻黄湯主要成分・麻黄湯成分由来代謝物・投与後に出現した内因性代謝物が検出され、投与により成分プロファイルが大きく変化する可能性が示唆された。

麻黄湯の作用について急性炎症ラットモデルにより評価し、麻黄湯により疾患症状の改善、炎症性サイトカインの抑制が確認された。脂質メディエーターに対するメタボローム解析により、急性炎症モデルにおいてプロスタグランジン類などの炎症性脂質メディエーターが誘導されるのに対し、麻黄湯では広く脂質メディエーターに影響が認められ、炎症時の炎症性脂質メディエーターの亢進を抑制した。さらに麻黄湯の多成分薬としての特徴を明らかにするため、肺組織の遺伝子発現ネットワーク解析により主要成分と麻黄湯の作用を比較し、麻黄湯に特徴的な作用を見出した。

このような包括的解析の取り組みにより、漢方薬の多様な成分が生体因子に幅広い影響を与え、特有の作用を発揮する全体像の一端を明らかにした。

ソフトイオン化質量分析法を用いた日常生化学検査の確立とその応用研究

中西 豊文[1]，高橋 利枝[2]，五十嵐 一雄[3]

[1]大阪医科大学 研究支援センター，[2]東京大学大学院医学系研究科 ライフサイエンス研究機器支援室，
[3]一般社団法人医薬分析協会

Developments of routine laboratory tests and its clinical application by soft-ionization mass spectrometry

Toyofumi Nakanishi[1], Toshie Takahashi[2], Kazuo Igarashi[3]

[1]Research Development Center, Osaka Medical College, [2]Graduate school of Medicine, Tokyo University,
[3]Association of Medicinal Analysis

ソフトイオン化法の開発を契機に、それまで質量分析法（MS）では解析対象外であった高分子量化合物の解析が可能となり、一気に医学／生物学をはじめとした生命科学領域の謎解きが始まった。その解析対象は、糖質・脂質などの低分子からペプチド・タンパク質・核酸の生体高分子化合物など多種多様な生理活性分子であり、疾病診断やその病態解析並びに分子動態解析に寄与する情報を直接、医療現場に提供出来るようになった。

そこで、Richard M. Caprioli教授（当時、Texas大学医学部）の下、超高感度マイクロスプレー MS法の研究グループに参画し帰国し、この経験を基礎に国内外の医療機関から依頼された疾患関連異常タンパク質分析に従事した。先ずは、糖尿病診断指標であるHbA1cの異常パターンを契機に見出される異常Hb解析システムを確立し、ルーチン化に成功した。次に、血清／尿／組織中の微量タンパク質の分離手段として、標的タンパク質に対する特異全抗血清／ポリ・モノクローナル抗体を用い、抗原抗体反応を利用して生成した免疫沈降物を直接MS解析する方法を考案し、糖鎖欠損トランスフェリン（糖鎖合成不全症候群患者）、構造異常トランスサイレチン（家族性アミロイドポリニューロパチー及び類似の神経変性疾患患者）、変異スーパーオキシドジスムターゼ－I（筋萎縮性側索硬化症患者）の検出・同定に応用し、それら疾患の確定診断に寄与した。

最近、MALDI-イメージング（IMS）解析の医学応用が急速に進展している。その自検例として、薬物／嗜好品の定量的動態解析、病理組織切片を用いたアミロイド症起因タンパク質分子の解析、単毛髪縦断面連続走査による薬物／嗜好品経時的動態解析例を提示し、IMS有用性と将来像について議論したい。

質量分析を活用したアミロイドーシスの病型診断

城野 博史[1]，田崎 雅義[2]，大林 光念[2]，安東 由喜雄[3]

[1]熊本大学医学部附属病院 薬剤部，[2]熊本大学大学院生命科学研究部 構造機能解析学分野，
[3]熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野

Diagnosing types of amyloidosis based on mass spectrometric analysis

Hirofumi Jono[1], Masayoshi Tasaki[2], Konen Obayashi[2], Yukio Ando[3]

[1]Department of Pharmacy, Kumamoto University Hospital,
[2]Department of Morphological and Physiological Sciences, Graduate School of Health Science, Kumamoto University,
[3]Department of Neurology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

アミロイドーシスとは、可溶性のタンパク質が遺伝子変異や血中濃度上昇などにより難溶性のアミロイド線維へと構造を変え、全身諸臓器に沈着することで発症する難治性疾患群の総称である。アミロイド線維を形成する原因タンパク質はこれまでに30種類以上報告されており、組織に沈着したアミロイド原因タンパク質の種類によってアミロイドーシスは各病型に分類され、その治療法も大きく異なっている。

近年、いくつかの有効な治療法が臨床応用され、発症早期であればその治療効果が十分期待できることから、アミロイドーシスの治療において、アミロイド原因タンパク質を正確に同定し早期に確定診断を行うことが、適切な治療の早期実施には必要不可欠となっている。しかし、従来から実施されている免疫組織化学染色によるアミロイド原因タンパク質の同定法は、アミロイド原因タンパク質と抗体の反応性の問題から、原因タンパク質の検出が困難となる場合が少なくない。また、臨床症候からある程度の病型を想定できなければ、疾患の原因タンパク質に対する抗体の選択が難しく、技術的な問題に加え、医師の予測状況により正確な診断が困難となるケースも存在する。

このような現状を打破すべく、当院では質量分析の特性を活用し、アミロイド原因タンパク質を正確に同定し適切な治療を施すことを目的として、レーザーマイクロダイセクション (Laser microdissection: LMD) と液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid chromatography tandem mass spectrometry：LC-MS/MS) を組み合わせたアミロイドの病理診断など、各種質量分析装置を活用した新たな診断法を開発してきた。本シンポジウムでは、質量分析装置を活用したアミロイドーシスの病型診断に関する当院の取り組みについて紹介する。

治療効果の最大化を目指した経口抗がん薬の治療薬物モニタリング

髙﨑 新也[1]，川崎 芳英[2]，菊地 正史[1]，田中 雅樹[1]，山口 浩明[1]，眞野 成康[1]

[1]東北大学病院 薬剤部，[2]東北大学病院 泌尿器科

Therapeutic drug monitoring to maximize the therapeutic effect of oral anticancer drugs

Shinya Takasaki[1], Yoshihide Kasawaki[2], Masafumi Kikuchi[1], Masaki Tanaka[1], Hiroaki Yamaguchi[1], Nariyasu Mano[1]

[1]Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital,
[2]Department of Urology, Tohoku University Hospital

【目的】近年、がん化学療法の個別最適化を目的として、経口分子標的抗がん薬の治療薬物モニタリング(TDM) に関する研究が広く行われている。当院薬剤部でも、LC-MS/MSを用いて経口分子標的抗がん薬の血中濃度測定系を構築し[1)]、治療管理における薬物血中濃度把握の有用性を検証すべく臨床研究を行ってきた。今回、日本人の腎癌治療における経口分子標的抗がん薬スニチニブの血中濃度と有害事象や有効性との関連を調査したので報告する[2)]。

【方法】2011年12月～2017年2月に、当院泌尿器科で腎癌治療目的にスニチニブが投与され、同意が得られた患者20例を対象とした。スニチニブ投与7日目以降の投与直前の総血中濃度と有害事象、治療成功期間 (TTF)、無増悪生存期間 (PFS) との関連を調べた。

【結果】スニチニブ投与1コース目において、有害事象が原因で中止、休薬もしくは減量された患者13例の総血中濃度の中央値は92.7 ng/mLであり、2コース目も同量で継続できた患者7例の中央値43.4 ng/mLに比べ、有意に高値を示した。また、最も服薬期間の長かった投与量について最小有効血中濃度とされる50 ng/mLで2群に分けて評価したところ、50 ng/mLを下回っていた患者群の方が、TTF及びPFSの有意な延長が認められた。

【考察】スニチニブの総血中濃度がより低く維持された患者群の治療成績が良く、有害事象の回避が治療成績に大きく影響するものと考えられた。また、海外ではスニチニブの有効血中濃度域は50～100 ng/mLと報告されているが、日本人の有効域はより低い可能性が示唆された。今後、さらに症例数を重ねて精査する必要があると考えられた。

【参考文献】

1) Shinya Takasaki, et al. “Simultaneous analysis of oral anticancer drugs for renal cell carcinoma in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry”, *Biomed Chromatogr*, 2018 Jun; 32(6): e4184

2) Shinya Takasaki, et al. “Relationships between sunitinib plasma concentration and clinical outcomes in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma”, *Int J Clin Oncol*, 2018 in press

LC-MS/MSによる過酸化脂質異性体の解析

仲川 清隆
東北大学大学院農学研究科 機能分子解析学分野

LC-MS/MS analysis of lipid hydroperoxide isomers

Kiyotaka Nakagawa
Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

演者の過酸化脂質研究との出会いは、1993年4月に東北大学農学部食品学研究室に配属された時に遡ります。当時、研究室では宮澤陽夫先生（現 東北大NICHe）を中心に、生体内の脂質過酸化を把握する目的で、LC-化学発光検出法が開発され、ヒト血漿に過酸化脂質（ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド, PCOOH）の存在が示され、当時の非存在説を退け、血漿リポタンパク粒子の酸化変性が証明されたエキサイティングな時でありました。こうした環境の中で、演者は“もし過酸化脂質の酸化された脂肪酸の種類と、そのヒドロペルオキシ基の近傍構造（すなわち酸素の結合部位）を解析できれば、過酸化脂質の生成原因（酵素、ラジカル、一重項酸素）を特定できる？”と考えるようになり、研究に没頭しました。しかし、たとえMS/MSを用いても、酸化した脂肪酸の種類はわかっても、ヒドロペルオキシ基（酸化部位）に由来するフラグメンテーションはほとんど見いだせず、故に食品や生体などの実試料の分析は遠い彼方に感じられました。

そんな中、PCOOHをMS/MSで定量しようとした際に、その$[M+H]^+$と$[M+Na]^+$の強度比が、標品とサンプルで異なる（故に、サンプル中のPCOOHを精確に定量できない）ことに気づきました。そこで、すべての親イオンを$[M+Na]^+$に傾けてしまおうと、測定系にNaイオンを加えたところ、定量が可能となっただけでなく、予想外に、PCOOHのヒドロペルオキシ基（酸化部位）に由来するフラグメントを見いだしました。これが突破口となり、Naイオンを利用したMS/MSに逆相やキラルカラムを組み合わせることで、現在ではPCOOH異性体の分離分析を達成し、さらには脂肪酸ヒドロペルオキシドやトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド、コレステロールエステルヒドロペルオキシド、スクアレンヒドロペルオキシドといった種々の過酸化脂質の酸化部位に特化した異性体の解析を実現しつつあります。こうした経緯から、本法を完成させ、食品や生体などの実試料に応用することで、食品劣化や疾病の進展への脂質過酸化の関わりがより明確となり、さらには過酸化脂質の生成原因（酵素、ラジカル、一重項酸素）の特定により最適な抗酸化物質を選択でき、効果的に食品劣化や疾病の進展を防ぐことができると期待し、研究を進めています。本講演では、こうした我々の取り組みについて、イオンモビリティーを用いた新たなデータも含めて、ご紹介したいと思います。

LC/MSを用いたカルジオリピン過酸化物の分析

陳 震[1]，呉 玥[1]，馬 逸興[1]，小林 悠[1]，趙 瑤瑤[1]，三浦 佑介[1]，千葉 仁志[1,2]，惠 淑萍[1]
[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]札幌保健医療大学 栄養学科

Analysis of cardiolipin peroxidation products by LC/MS

Zhen Chen[1], Yue Wu[1], Yi-Shing Ma[1], Yuu Kobayashi[1], Yao-Yao Zhao[1], Yusuke Miura[1], Hitoshi Chiba[1,2], Shu-Ping Hui[1]
[1]Faculty of health science, Hokkaido university, [2]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

Aim: Cardiolipin (CL) is a characteristic phospholipid that exists in the inner mitochondrial membrane, which plays critical roles on the maintenance of mitochondrial structure and function. Due to the fact that mitochondria serve as the main source of ROS as by-products of mitochondrial respiration, CL may be susceptible to oxidize to form peroxidation products (e.g. CL-OOH), which play the key roles in intermediating oxidative reaction. Thus, the aim of our work is to analyze CL peroxidation products by LC/MS, including molecular species identification and profiling in oxidative stress-modelling cells.

Methods: The CL(18:2)$_4$-OOH standard was prepared by oxidizing the CL(18:2)$_4$ using $CuSO_4/H_2O_2$. The cellar CL-OOH was obtained by oxidizing the extracted cellar total lipids. The oxidized HepG2 cells were induced by AAPH. LC/MS experiments were performed by an LTQ Orbitrap mass spectrometer in ESI negative mode.

Results: The peroxide structure elucidation was performed by comparing the MS fragment differences between the intact CL and its oxidation product. Totally 18 CL-OOH species were identified from cellular lipids, and 9 of them were detected in oxidized cells. Most of the species increased significantly, in which CL68:5- and CL68:4-OOH were the most abundant, while CL70:5-OOH ranked the highest oxidation percentage.

Discussion: The oxidized HepG2 cells showed CL-OOH accumulation and intact CL depletion, indicating possible effect of cellular oxidative stress to mitochondrial membrane. Lipidomic approach on CL and its peroxidation product might be useful for diagnosis of mitochondrial oxidative damage. This study implied CL peroxidation product as potential biomarker for diagnosing cellular and mitochondrial oxidation along with the related pathological changes.

nanoESI-MSおよびLC/MSによる過酸化脂質の分析

惠 淑萍
北海道大学大学院 保健科学研究院

Analyses of Lipid Hydroperoxides by nanoESI-MS and LC/MS

Shu-Ping Hui
Faculty of health science, Hokkaido university

酸化ストレスは動脈硬化症、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、慢性腎臓病 (CKD) など様々な疾患・病態の成立と進展に関連する。過酸化脂質の測定は、従来、チオバルビツール酸法に代表される呈色反応が広く用いられてきた。しかし、呈色反応では過酸化脂質の分子種に関する情報を得ることはできず、過酸化脂質研究の化学的基礎はきわめて脆弱であった。

一方、過酸化脂質は不安定であるために市販標準品がなく、過酸化脂質の分子レベルの研究には合成化学の技術が不可欠である。脂質酸化と病態の関係を分子レベルで明らかにするため、我々は、コレステリルエステル (CE)、トリグリセリド (TG)、ホスファチジルコリン (PC) の各ヒドロペルオキシド (CE-OOH、TG-OOH、PC-OOH) の標準物質と、それぞれに対するISを化学合成し、nanoESI-MSおよびLC/MS (LTQ Orbitrap) の分析法を確立した。

我々はNASHやCKDに関連した細胞内脂肪滴に注目し、肝細胞、ヒト尿細管上皮細胞、脂肪細胞等に酸化剤を単独または脂肪酸とともに負荷して脂肪滴を形成させた。細胞中の脂肪滴の過酸化脂質は、確立したnanoESI-MSおよびLC/MSを用い、分析を行ったところ、多くのTG-OOHとPC-OOH分子種が検出された。なお、低濃度オゾンや重金属存在下の脂質酸化ついても紹介する。

HbA1cの標準化と質量分析

木村 孝穂[1,2]，村上 正巳[1,2]

[1]群馬大学大学院医学系研究科 臨床検査医学，[2]群馬大学医学部附属病院 検査部

Standardization of HbA1c and mass spectrometry

Takao Kimura[1,2], Masami Murakami[1,2]

[1]Department of Clinical Laboratory Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine,
[2]Clinical Laboratory Center, Gunma University Hospital

【はじめに】HbA1cは1959年にSchroederらにより最初に報告され、1993年のDiabetes Control and Complication Trial (DCCT) の研究成果を受けて代表的な血糖コントロール指標となった。2009年には国際糖尿病連合、欧州糖尿病学会と米国糖尿病学会の3団体が合同で新たな糖尿病診断基準を発表し、診断にHbA1cを用い「HbA1c 6.5%以上を糖尿病とする」と提言され、HbA1cを正確に測定することの重要性が示された。日本では2010年に血糖値と共にHbA1cを糖尿病診断基準の第一段階に取り入れたほか特定健診や糖尿病治療の血糖コントロールの指標として幅広く利用されている。糖尿病患者およびその予備軍は全世界的に急増しており、糖尿病の診断、治療、研究に加えて糖尿病予備軍のスクリーニングと生活習慣への介入が積極的に行われるようになってきている。糖尿病治療ならびに研究の国際化が急速に進んでいる現在、HbA1cの国際標準化は不可欠である。

【HbA1c測定法】現在HbA1cの測定法にはHPLC法、免疫法、酵素法があり日本ではHPLC法を用いて測定している施設が多い。日本ではPoint of care testing (POCT) で簡便にHbA1c測定を行い糖尿病予備軍の早期発見につなげる試みも始まっており、HbA1c測定の標準化と精度管理がより一層、重要視されている。国際的なHbA1c標準化作業はInternational Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) で行われている。HbA1cの標準化測定体系における基準分析法は分離分析法である。日本の基準分析法はHPLC法を用いたKO500法であり，IFCCの基準分析法はLC/MS法、HPLCとキャピラリー電気泳動法 (CE) の組み合わせ、同位体希釈質量分析法 (ID-LC-MS) の3法である。

【HbA1cの国内標準化】1980年代はHbA1cの施設間変動係数 (CV%) が約10%と測定値のばらつきが顕著であった。原因は安定型HbA1cだけでなく不安定型HbA1cを合わせて測定している施設が混在していたためであった。2001年にIFCCの定義に従いβ1-fructosyl hemoglobinをHbA1cとして標準化を行ったことで現在ではCVが2.4-3.3 %に改善している。

【HbA1c標準化の課題】HbA1cの表記は米国をはじめとして日本やアジア諸国で使用されているNational Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) 値 (%) と主として欧州諸国で使用されているIFCC値 (mmol/mol) があるが将来的には化学量論に基づくIFCC値に統一されることが望まれる。

臨床検査における質量分析の現状と課題

上瀧 智巳[1]，岩沢 勇也[2]，井上 剛[2]，佐藤 照徳[2]，南部 裕里[2]，国分 容子[3]

[1]株式会社エスアールエル 技術推進部 検査開発グループ，[2]株式会社エスアールエル 治験・特殊検査部 分析化学課，
[3]株式会社エスアールエル 治験・特殊検査部 治験検査課

Current status and problems of mass spectrometry in clinical tests

Tomomi Jotaki[1], Yuya Iwasawa[2], Tsuyoshi Inoue[2], Terunori Sato[2], Yuri Nambu[2], Yoko Kokubun[3]

[1]Laboratory Test Development Group, Department of Fundamental Technology & Development, SRL, Inc.,
[2]Analytical Chemistry Section, Clinical Trials & Special Testing Department, SRL, Inc.,
[3]Clinical Trials Testing Section, Clinical Trials & Special Testing Department, SRL, Inc.

質量分析計 (MS) のフロントエンドにはガスクロマトグラフ (GC)、液体クロマトグラフ (LC)、キャピラリー電気泳動 (CE) などあるが、コマーシャルラボにおける検査サービスでは、早期にGC/MS法が確立され長く利用されてきた。その後、大気圧イオン化 (API) 法の実用化とLC技術の向上により、高速化、高分離化、高感度化および特異性の向上が進み、ルーティン検査においてLC-MS、LC-MS/MSの活用は容易になった。それまで、誘導体化が必要であったGC、GC/MS検査のLC-MS/MS法への移行や、HPLC法のLC-MS/MS法への移行など、クロマトグラフィー検査の方法変更が積極的に行われるようになってきた。臨床検査において質量分析は主に定量を目的に使用されてきたが、近年ではMALDI-TOF MSを用いた細菌同定など定性としての活用も見られるようになってきている。また、高い選択性と高感度および同時分析が可能などの利点から、スループットが高く汎用的に利用されてきたイムノアッセイ検査からLC-MS/MS法に見直す考えもあり、測定原理を超えて質量分析の利用が検討されつつある。その反面、質量分析における欠点 (課題) としては、初期の設備投資費用、前処理の必要性、イオン化抑制、スループットなどがある。

本講演では、当社における導入事例などを紹介しながら、臨床検査における質量分析の現状と課題について解説したいと思う。

微生物検査に大きな影響を及ぼした質量分析技術

草場 耕二
佐賀大学医学部附属病院 検査部

The mass spectrometry technology that had a big influence on the examination of microbe

Koji Kusaba
Department of Laboratory, Saga university Hospital

質量分析技術は微生物検査にとって大きな改革となった。微生物検査の内容は大きく3つに分かれる。グラム染色等の顕微鏡学的検査と培地で培養後の菌種同定検査および薬剤感受性検査があり、この内質量分析技術が大きく関わるのが同定検査である。検査を導入するに当たり必須条件として感度、特異度をはじめ安全性、簡便性、迅速性、経費等色々な要因があるが、質量分析技術はその多くの要因を満たしており、同定検査は大きく改善された。例えば今までの検査法と比較すると、①1株検査するために約1,000円の経費が必要であったものが数十円と大変安価になり、②検体提出から検査結果が臨床へ報告するまで3～4日間必要であったのが、2～3日間に短縮され、③培地上のコロニーよりある程度菌種を予測してその菌種に合った同定試薬を使用する必要があったのが、どんな菌種でも金属プレートに微量の菌を塗布するだけと簡便になるなど今まで色々な改良試薬が開発されてきたが殆ど改善されなかった項目である。また、同定できる菌種もかなり大幅に増え、ある意味質量分析技術は遺伝子検査技術以上に大きな影響となった。このように色々な面で改善された一方で、新たな問題も起こっている。例えば以前の検査法であれば大腸菌と赤痢菌は分けることが出来たが、質量分析技術では分けることが出来ないなど質量分析技術による独特の注意点がある。今回のシンポジウムでは、質量分析技術の導入による利点だけでなく問題点についても述べていく予定である。

S6-1

変死体解剖試料にみられる向精神病薬の血中濃度と主な死因

五十嵐 一雄[1,2]，巽 信二[2]

[1]一般社団法人医薬分析協会，[2]近畿大学医学部 法医学

Analysis of antipsychotics levels detected in forensic autopsies

Kazuo Igarashi[1,2], Shinji Tatsumi[2]

[1]Association of Medicinal Analysis, [2]Kinki University School of Medicine, Faculty of Legal Medicine

近年、変死体の司法解剖でみられる薬物の特徴として、精神作用薬（向精神病薬）服用症例が数多くみられる。睡眠薬、抗うつ薬、抗不安薬、抗精神薬などが検出されている。さらに同種薬物が2種類以上検出されており、これらの薬物による人間の行動に何らかの影響をもたらしていることが予測される。この点について、近畿大学医学部法医学教室が鑑定した2010年～2017年間の司法解剖で検出された向精神薬の血中濃度と主な死因について調査した。

この間の司法解剖数1471例中213例に、麻薬・大麻・覚醒剤・その他規制薬物を除いた薬物が検出されている。この中、ベンゾジアゼピン系薬物が105例に検出された。特に、フルニトラゼパム、エチゾラム、トリアゾラム、ニトラゼパムが多く検出されている。さらにベンゾジアゼピン系薬物以外にベゲタミン成分（フェノバルビタール、プロメタジン、クロルプロマジン）が213例中33例に検出されている。

薬物が検出された症例の主な死因として、自殺が14例、その他死因が199例であった。このその他死因の中、病死が24例、他殺が9例であった。また、転倒・転落死が9例、交通事故死4例、溺死が9例、火災死が10例であった。これらの死因分類の中で、薬物中毒が関与していた症例は8例で合った。その他死因として分類された症例の大半は死因不詳であった。

これらの薬物が検出された症例について評価した場合、薬物が直接関与していたかどうかは不明であるが、人間の行動に何らかの影響をもたらしている可能性は否定できない。今後、更なる調査で検討してみる必要がある。

S6-2

愛知県2大学における法医解剖薬毒物分析に関する考察

小川 匡之[1]，大瀧 純[2]，鈴木 隆佳[1]，岩井 雅枝[1]，近藤 文雄[1]，菅野 さな枝[2]，福田 真未[2]，加藤 秀章[2]，青木 康博[2]，妹尾 洋[1]

[1]愛知医科大学医学部 法医学講座，[2]名古屋市立大学大学院医学研究科 法医学分野

A study on toxicological analyses in forensic autopsies in two universities in Aichi Prefecture

Tadashi Ogawa[1], Jun Otaki[2], Takayoshi Suzuki[1], Masae Iwai[1], Fumio Kondo[1], Sanae Kanno[2], Mamiko Fukuta[2], Hideaki Kato[2], Yasuhiro Aoki[2], Hiroshi Seno[1]

[1]Department of Legal Medicine, Aichi Medical University School of Medicine,
[2]Department of Forensic Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

愛知県には医学部を有する大学が4つあり、県内の法医解剖を分担している。そのうちの2大学、愛知医科大学と名古屋市立大学における過去5年間（2013～2017年）の法医解剖に伴う薬毒物検査の状況をまとめ、他の死因と薬毒物、特に精神作用薬との関連についての考察を行った。

過去5年間で愛知医大、名市大それぞれで386体、658体の法医解剖が行われた。そのうち、簡易薬毒物スクリーニングキットTriage DOAで陽性反応が確認された場合、薬物の関与が明らかな場合、薬物の関与が疑われる場合、さらに名市大では解剖終了時に死因が特定できない場合に、執刀医からの指示により解剖時に採取された試料の薬毒物検査が行われる。分析は主にLC-MS/MSを用い、それぞれ69件、152件で薬毒物が検出された。

死因と薬毒物の関連を調査すると、自殺事例のおよそ半数から薬毒物が検出され、他の死因と比較して自殺時に薬毒物摂取の割合が高い傾向が認められた。検出された薬毒物としては、直接死因が薬毒物中毒でなくても、催眠効果のある薬物を摂取していたケースが多いことが確認された。

死因究明に対するニーズはますます高まっており、薬毒物検査はその重要な役割を担っている。簡易薬毒物検査では判明しない薬毒物も数多く存在しており、法医解剖における薬毒物検査での質量分析の役割は今後ますます大きくなっていくと考えられる。より正確な死因究明のため、質量分析法を用いた新しい薬毒物分析手法に関する研究を発展させていきたいと考えている。

S6-3

変死体中薬物分析と質量分析 ー 精神作用薬服用症例

ウォーターズ ブライアン[1,2]，原 健二[1,2]，徳安 智子[1,2]，池松 夏紀[1,2]，髙山 みお[1,2]，
松末 綾[1,2]，柏木 正之[1,2]，久保 真一[1,2]

[1]福岡大学医学部 法医学教室，[2]福岡大学 薬毒物探索解析研究所

The analysis of drugs in autopsy cases by mass spectroscopy-cases involving psychoactive drugs

Brian Waters[1,2], Kenji Hara[1,2], Tomoko Tokuyasu[1,2], Natsuki Ikematsu[1,2], Mio Takayama[1,2], Aya Matsusue[1,2], Masayuki Kashiwagi[1,2], Shin-ichi Kubo[1,2]

[1]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University,
[2]Fukuoka University Research Institute for Toxicological Detection and Monitoring

【目的】This research focuses on the analysis of psychoactive drugs in forensic autopsy cases and its relationship to the cause of death. A comprehensive screening and quantitation method that targets a wide array of compounds from postmortem specimens was developed. Even if the cause of death was not from intoxication, the analysis of drugs from postmortem specimens provided important information about the circumstances of the case.

【方法】From 2013 to 2017, specimens including blood, urine, and tissues of varying degrees of decomposition from over 400 autopsy cases were analyzed. Samples were treated with urease, acidified or alkalized, and extracted with acetonitrile. Lipid-removal and solid-phase extraction cartridges were used while carefully monitoring the pH of samples to ensure the adequate removal of interfering substances. The extracts were analyzed by both fast GC-MS and LC-MS/MS analysis.

【結果】Over 150 drugs were detected from the samples, including sleep medications, anxiolytics, antidepressants, anticonvulsants, etc. One of the compounds detected during routine screening was a relatively new sleep medication, Suvorexant. Screening and confirmation of Suvorexant were achieved by fast GC-MS and fast GC-MS/MS using tandem columns. Quantitation was performed by LC-MS/MS and a complete tissue distribution was carried out on 3 cases.

【考察】Forensic toxicological analysis on postmortem samples can help determine not only cause of death but also important circumstantial information beneficial to the investigation. Robust preparation and mass spectral analysis methods will be introduced. Examples involving psychoactive drugs such as Suvorexant, case histories, and quantitative analysis will also be discussed.

S7-1

血液の本質を捉えることを目指したタンパク質・ペプチドの存在様式の分析

小寺 義男[1,2]

[1]北里大学理学部物理学科 物性物理学研究室，[2]北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンター

Analysis of native states of proteins and peptides in plasma.

Yoshio Kodera[1,2]

[1]Laboratory of biomolecular physics, Department of Physics, Kitasato University School of Science,
[2]Center for disease proteomics, Kitasato University School of Science

試料中のタンパク質の酵素消化ペプチドを直接質量分析するいわゆるショットガンプロテオミクス技術の急速な発展に伴い、組織や細胞を対象とした分析においては、生命ならびに疾患に関連した鍵タンパク質の検出が可能となってきた。しかし、血液成分の分析は組織・細胞に比べて一般的に非常に困難な部分が多い。この理由は、血液は例えば森の中を流れる小川のように森の中の (体中の) 全ての情報を含んでいるが、それだけに、我々の求める情報が多くの情報の中に埋もれ、かつ、希釈されていること。このため、タンパク質濃度のダイナミックレンジは10^{10}を超え、かつ、個々のタンパク質が非常に多様で複雑な切断や修飾を受けている。さらに、キャリアタンパク質である血清アルブミンや免疫グロブリンなどの影響力の大きい高濃度タンパク質が他のタンパク質の分析を邪魔することも、詳細なプロテオーム変動の理解をより困難にしている。

こうした中で感じたことは、多様な切断や修飾を受けている血液中のタンパク質分析において、酵素消化を起点とする従来のショットガンプロテオミクス技術が試料の複雑性を増やし、本質を捉えにくくしているという点である。そこで当グループでは、現在、2つの観点から血中のタンパク質・ペプチドをその存在様式も含めて分析することに注力している。一つは、電気泳動による分子量分画、ゲル内消化、LC-MS/MSを組み合わせたGeLC-MS/MS法[1]、もう一つは、分子量約5,000以下のペプチドの分析である。前者では各タンパク質の切断情報とともに、比較分析によって部位特異的な修飾情報を取得することを目指している。また、後者では、独自に開発した抽出法[2]を用いて高効率にペプチドを抽出し、酵素消化することなく分析することによって新規生理活性ペプチドの探索を目指して進めている。

シンポジウムでは、血中タンパク質・ペプチドの本質を捉えることを目的として進めている上記2点の研究を中心にお話しし、血中タンパク質の多様で複雑な存在様式について議論させていただきたい。

[1] Schirle, M., et al.. *Mol Cell Proteomics* **2**,1297-1305 (2003).
[2] Kawashima Y, et al. *J Proteome Res* **9**, 1694-1705 (2010).

S7-2

保存された臨床検体（血清）の質量分析による劣化の評価

土田 祥央[1]，佐藤 守[1]，梅村 啓史[2]，曽川 一幸[3]，滝脇 正貴[1]，石毛 崇之[4]，西村 基[4]，
小寺 義男[5]，松下 一之[4]，野村 文夫[1,4]

[1]千葉大学医学部附属病院 マススペクトロメトリー検査診断学，[2]日本大学医学部病態病理学系 臨床検査医学分野，
[3]麻布大学臨床検査技術学科 生化学教室，[4]千葉大学医学部附属病院 検査部/遺伝子診療部，
[5]北里大学理学部物理学科 物性物理学講座

Assessment by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of the Effects of Preanalytical Variables on Serum Peptidome Profiles Following Long-Term Sample Storage.

Sachio Tsuchida[1], Mamoru Satoh[1], Hiroshi Umemura[2], Kazuyuki Sogawa[3], Masaki Takiwaki[1], Takayuki Ishige[4], Motoi Nishimura[4], Yoshio Kodera[5], Kazuyuki Matsushita[4], Fumio Nomura[1,4]

[1]Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University Hospital,
[2]Division of Laboratory Medicine, Department of Pathology and Microbiology, Nihon University School of Medicine,
[3]Department of Biochemistry, School of Life and Environmental Science, Azabu University,
[4]Department of Laboratory Medicine & Division of Clinical Genetics and Proteomics, Chiba University Hospital,
[5]Biomolecular physics, Department of Physics School of Science, Kitasato University

近年，質量分析技術を用いて血液検体のタンパク質・ペプチドをプロファイリングするプロテオーム解析が広く行われ、様々なバイオマーカー候補が報告されてきた。血液検体を対象とした疾患プロテオミクス／ペプチドミクスにおいては、プレアナリシスが大きなバイアスとして存在し、そのため解析結果がミスリードされるという報告もみられるようになってきた。バイオマーカー候補の有用性を検証し，より効率的な探索を可能にするにはサンプル採取・調整・保存条件に統一性を持たせる事が重要と考えられている。

血清のプロテオーム、ペプチドーム解析は関連技術の進歩により現在は詳細に行えるようになっており、今回の解析方法ではその一部を見ているにすぎないが、長期保存の影響をみるための一つのモデルとして検討した。血清検体（健常人ボランティア8名）のペプチドおよびタンパク質に焦点をあて、保存温度・保存期間・凍結方法・融解方法に関して詳細な検討を行った。ペプチドについてはMALDI-TOF-MS ClinProtRobot system（Bruker Daltonics社）を用い、タンパク質についてはSDS-PAGEを用いて評価した。

本講演では最新の知見も含め保存期間・保存温度・凍結方法・融解方法に関しての詳細な検討結果を紹介する。臨床の場において実現可能でかつバイアスの少ないサンプル採取及び保存方法を確立し、常に一定範囲内の条件で採取・保存を行うことが、有用な疾患マーカー開発への道を拓くものだと考えられる。

S7-3

ターゲットプロテオミクスを用いた血清エクソソーム中の大腸がん早期診断マーカー開発と臨床応用

朝長 毅，白水 崇，足立 淳

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
プロテオームリサーチプロジェクト/創薬標的プロテオミクスプロジェクト

Development of early colorectal cancer biomarker in serum extracellular vesicles by targeted proteomics and its clinical application

Takeshi Tomonaga, Takashi Shiromizu, Jun Adachi

Laboratory of Proteome Research/ Laboratory of Proteomics for Drug Discovery, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

【目的】近年、大腸がんの罹患者数は増加傾向であり、大腸がんの早期診断・早期治療が必要である。しかし、現在の大腸がんスクリーニング検査である便潜血検査は、感度・特異度ともに十分とは言えず、特に早期大腸がんの診断には無力に等しい。我々は、最新のプロテオミクス技術を駆使して、新しい大腸がん早期診断マーカー候補タンパク質を同定した。さらに、ターゲットプロテオミクスの手法を用いて、それらのバイオマーカー候補タンパク質を血中の細胞外小胞 (エクソソームを含む) で検出・定量し、臨床検査に応用することを目的とした。

【Methods】まず、大腸がん患者の組織を用いた定量ショットガンプロテオミクスによりバイオマーカーの候補となるタンパク質を探索した。並行して、大腸がんに関連する過去の文献を徹底的に調査し、その中からバイオマーカー候補となりそうなタンパク質をリストアップした。次いで、それらのバイオマーカー候補タンパク質について、SRM/MRM法を使ったターゲットプロテオミクスの手法を用いて、血清中の細胞外小胞 (エクソソームを含む) での検出・定量を試みた。

【Results】上記の探索で得られた約700種類の大腸がんバイオマーカー候補タンパク質のうち、約350種類のタンパク質が細胞外小胞で検出することができ、最終的に22種類のタンパク質に属する37種類のペプチドが大腸がん患者血清中で有意に発現量が増加していることを見出した。特にその中で、アネキシンファミリーに属する4種類のペプチドは、AUC値0.95以上の高い精度で健常人と早期大腸がん患者を見分けることができた。また、AUC値が0.9以上を示す2つ以上のペプチドのコンビネーションを8通り見出した。現在、それらの複数の大腸がんマーカーペプチドを、質量分析計を用いて高感度かつハイスループットに定量するためのシステムを構築中である。

【Discussion】質量分析計を用いたプロテオミクス技術は、100種類以上のバイオマーカーを一度に定量することができ、がんのような多様性に富んだ疾患の早期診断や個別化医療に大きな威力を発揮すると考えられる。その実現のためには、前処理法の簡略化・自動化、質量分析時間の短縮など、簡易かつ迅速に測定できるシステムの構築が重要である。

S8-1

リゾリン脂質メディエーター研究における質量分析計の利用

青木 淳賢[1,2]

[1]東北大学大学院 薬学研究科，[2]AMED-LEAP

Mass spectrometry in the study of lysophospholipid mediators

Junken Aoki[1,2]

[1]Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Tohoku university, [2]AMED-LEAP

生体を構成するタンパク質、核酸、糖質、そして脂質などのさまざまな分子の変動を捉えることは、生命の理解に必須であるだけでなく、病態発症の理解や創薬・バイオマーカーの創出に繋がる。生体分子を解析する従来の古典的な手法では限られた数種類の分子のみを特異的に検出・解析することがほとんどであった。しかし、分子を質量として捉える質量分析計技術の発達により、一度の解析で極めて多数（数万から数10万）の分子を同時に検出・解析することができるようになった。この技術は特に、オミクス技術として発達し、タンパク質（プロテオミクス）、代謝物（メタボロミクス）、そして脂質（リピドミクス）を網羅的に解析することを可能とした。特に、質量分析技術の発達により、生体内には遺伝子の数をはるかにしのぐ数十万もの脂質分子種が存在すると考えられるようになった。これら脂質分子は、新たな創薬標的やバイオマーカーの候補である。これら技術では、主に、液体クロマトグラフィー（LC）と連結した質量分析計（MS）を汎用するが、組織などを解析対象とした場合、解析対象分子の組織内での位置情報は失われてしまう。この点をカバーしたものが質量顕微鏡技術である。質量顕微鏡技術は数10 μm四方の組織切片上で分子をイオン化し検出する技術であり、組織切片上での各分子の分布と発現量を調べることができる。現在、リン脂質分子を含めた脂質分子はイオン化しやすく、また、比較的に生体内で高濃度に存在するため、質量分析計の格好の分析対象となっている。また、リン脂質はその脂肪酸組成により機能が大きく異なることが判明しつつある。本発表では、脂質の分析技術の総論と、特に、質量顕微鏡技術を用いる解析法について解説し、さらに、我々のリゾリン脂質メディエーター研究にどのように応用されているのかについて紹介したい。

S8-2

ヒトサンプルを用いたリゾリン脂質測定系によるヒト疾患病態の解明と臨床応用

蔵野 信，矢冨 裕
東京大学大学院 医学系研究科

Elucidation of the pathogenesis of human diseases and development of novel biomarkers by lysophospholipids measurement in human samples

Makoto Kurano, Yutaka Yatomi
Department of Clinical Laboratory Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

スフィンゴシン1－リン酸 (S1P) やリゾホスファチジン酸 (LPA) に代表されるリゾリン脂質は、基礎研究から、強力な生理活性を持ち、ヒト疾患病態に関与する可能性が提唱されてきた。一方、実際にリゾリン脂質のヒト疾患病態への関与を明らかにしている臨床研究は未だ少ない。このような背景より、我々は、ヒト臨床サンプル (血液、尿、髄液、腹水、組織) 中のリゾリン脂質をLC-MS/MSにて測定することにより、①リゾリン脂質のヒト疾患病態への関与を明らかにする、②リゾリン脂質測定系をヒト疾患病態のバイオマーカーとして臨床検査へ応用することを目的に研究をしている。

その代表的な研究成果をあげると、急性冠症候群患者の血漿検体を測定したところ、22:6 LPAなど多価不飽和LPAが特異的に増加しているとともに、相同する分子種のリゾホスファチジルコリンなどが増加していることから、急性冠症候群では、その病態によりLPAの前駆体であるグリセロリゾリン脂質が増加することにより、LPAが増加し、病態形成に関与している可能性が示唆された。また、肝癌や大腸癌の組織検体および胃癌腹水を測定したところ、癌組織では、S1Pの合成および分解が亢進しており、S1Pがスフィンゴ脂質からグリセロリゾリン脂質への中間体として働く経路が存在する可能性、グリセロリゾリン脂質が癌の病態と関連している可能性を見出した。

このようにヒト疾患病態によって大きく変動するリゾリン脂質の測定系を臨床応用することが期待されているが、疾患関連バイオマーカーとして臨床応用するには、血液サンプルでは、厳格な条件で検体採取、処理を行わないとLPA、S1Pなどは大きく変動してしまう。そこで、我々は、血球成分が少なく、検体の取り扱いによりリゾリン脂質の変動が少ない髄液や尿といったサンプルでの臨床応用を目指している。実際、髄液中のLPA、LPCは神経障害性疼痛疾患で、その重症度に応じて増加することを発見し、痛みの客観的マーカーとしての臨床応用が期待されている。

S8-3

High-Definition Mass Spectrometryによるヒト肝がん組織のメタボロミクス解析

三枝 大輔[1,2,3]，永井 滉士[4]，Baasanjav Uranbileg[3,5,6]，蔵野 信[3,5,6]，長谷川 潔[6]，國土 典宏[6]，池田 均[3,5,6]，矢冨 裕[3,5,6]，富岡 佳久[4]，青木 淳賢[3,4]

[1]東北大学 東北メディカル・メガバンク機構，[2]東北大学大学院 医学系研究科，[3]AMED-LEAP，
[4]東北大学大学院 薬学研究科，[5]東京大学大学院 医学部，[6]東京大学病院

Metabolic profiling of Hepatocellular Carcinoma by High-Definition Mass Spectrometry

Daisuke.Saigusa[1,2,3], Koshi. Nagai[4], Baasanjav Uranbileg[3,5,6], Makoto Kurano[3,5,6], Kiyoshi Hasegawa[6], Norihiro. Kokudo[6], Hitoshi Ikeda[3,5,6], Yutaka Yatomi[3,5,6], Yoshihisa Tomioka[4], Junken Aoki[3,4]

[1]Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University,
[2]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, [3]AMED-LEAP,
[4]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University,
[5]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, [6]The University of Tokyo Hospital

【目的】メタボロミクス解析は、遺伝要因と環境要因により形成されるヒトの表現型を理解することに有用であると考えられており、新規医療技術として疾患マーカー探索に大きく貢献する大きく期待されている。現在までに、質量分析計 (Mass Spectrometry, MS) によるメタボロミクス解析基盤技術の発展は、疾患発症メカニズムの解明のみならず、薬による治療効果の評価、予後の予測、創薬開発等に一定の成果が得られている。しかしながら、網羅的メタボロミクス解析 (Global Metabolomics, G-Met) は、生体内代謝物を一斉に測定することから、未知代謝物の発見や新規治療法の開発が期待されているが、MS測定データの解析プロセスが煩雑であり、臨床への応用性に多くの課題が残されている。

【方法・結果・考察】我々は、Ultra High-Performance liquid chromatography (UHPLC) の分析カラムにマルチモードカラムを選択することで、より網羅的に分子を検出することに加え、MSにイオンモビリティ分離を加えたHigh-Definition MS (HDMS) を活用することで、化合物の同定精度を向上させ、新規G-Met基盤技術を開発した。次に、ヒト肝がん組織メタボロミクス解析を実施し、がん部に特徴的に検出される新規バイオマーカーの同定を試みた。測定により得られた2450成分による多変量解析 (主成分分析、判別分析) の結果、m/z 904.83あるいはm/z 874.79が、癌部で最も有意に高値あるいは低値である成分としてそれぞれ抽出された。HDMS測定の結果、m/z 904.83はTG (16:0/18:1/20:1(11Z))、m/z 874.79はTG (16:0/18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)) と同定され、さらに、Desorption Electrospray Ionization MS imagingによる癌部と非癌部の組織分布解析から、各TGの分布局在を明らかにすることに成功した。今後、AMED-LEAP研究において、脂質分子種の違いによる分子機能を評価し、疾患バイオマーカーとしての感度・特異度の評価を実施する予定である。

講演要旨

一般演題（ポスター）

P-1～P-89

P-1

ホルマリン固定パラフィン包埋大腸癌組織を用いた新規大腸癌診断マーカーの探索とその定量法の開発

山本 哲志[1]，工藤 光洋[2]，橋本 知樹[1]，三田村 邦子[1]，内藤 善哉[2]，多賀 淳[1]

[1]近畿大学 薬学部，[2]日本医科大学 医学部

Proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded colorectal cancer tissue for identification of biomarker and development of its quantitation method.

Tetsushi Yamamoto[1], Mitsuhiro Kudo[2], Tomoki Hashimoto[1], Kuniko Mitamura[1], Zenya Naito[2], Atsushi Taga[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Kinki University, Osaka, Japan,
[2]Departments of Pathology and Integrative Oncological Pathology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

【目的】大腸癌は、罹患者数及び死亡者数が年々増加している疾患の一つであり、大腸癌と診断されたときには進行してしまっていることが多い。そのため、有用な診断法の開発が重要な課題となっている。今回、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 大腸癌組織を用いたプロテオーム解析を行うことで、有用なバイオマーカー候補となり得るタンパク質の同定及び血中での測定法の開発を試みた。
【方法】10例のFFPE大腸癌組織を用い、顕微鏡下で正常部と癌部をそれぞれ採取しタンパク質を抽出した。これらをトリプシン消化した後、得られたペプチドをLC/MSで測定し、タンパク質の同定を行った。次に、スペクトラルカウント法を用いた比較定量を行い、正常部と比べて発現量が変動していたタンパク質を同定し、GO解析を行った。次に、培養大腸癌細胞を用い候補タンパク質の発現を確認した。最後に候補タンパク質の部分ペプチドを合成し、これを用いたLC/MSによる定量法について検討を行った。
【結果】プロテオーム解析及びスペクトラルカウントの結果、癌部で発現が変動している84種類のタンパク質が同定された。GO解析を行った結果、血中で検出することが可能な21種類の候補タンパク質が得られた。培養大腸癌細胞での検討を行った結果、正常細胞よりも癌細胞で発現が上昇しているが、細胞外への分泌が抑制されていたAldolase Aを診断マーカー候補として同定した。定量法について検討を行った結果、0.1-1000ng/mlの範囲で良好な直線性を得ることができた。
【考察】癌患者の血中で発現が低下する可能性のあるAldolase Aは、有用な大腸癌診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。

P-2

HIBCH遺伝子変異を示された中国人症例1名のメタボローム解析

王 旭陽[1]，張 春花[1]，阮 宗海[2]，金 明姫[2]，唐 剣慈[2]，万 婷婷[2]

[1]ミルスインターナショナル 研究開発部，[2]ミルスインターナショナル 検査・データ解析部

The metabolomics of a Chinese girl with HIBCH gene mutation

Xuyang Wang[1], Chunhua Zhang[1], Zonghai Ruan[2], Mingji Jin[2], Jianci Tang[2], Tingting Wan[2]

[1]Department of research & development of MILS International,
[2]Department of examination and data analysis of MILS International

【目的】3-hydroxyisobutyryl CoA hydrolase (HIBCH) 欠損症はバリン代謝経路における極稀な代謝異常症。HIBCH活性の低下によりミトコンドリア内バリン代謝の中間体であるmethacrylyl-CoAとacryloyl-CoAが蓄積し、ATP産生障害が生じる。従来、酵素活性測定と遺伝子解析よる診断が唯一可能とされていたが、2015年James Pittらが本疾患で認められる新たな代謝産物を同定し、質量分析による発見が可能と発表した。今回、2-methyl-2,3-dihydroxybutyric acid (23DH2MB) という化合物に注目し、中国人症例1名の尿中代謝産物分析と血中アシルカルニチン分析を行い、メトボロームの観点から遺伝子検査でHIBCH遺伝子変異を呈した症例1名の代謝プロフィルを解析し、報告する。

【方法】Leigh 症候群と発達障害の原因精査として遺伝子解析が行われ、HIBCH遺伝子変異持つ患児1名(1歳11ヶ月 女児：生後10 ヶ月まで正常な発達。11 ヶ月から下痢、アシドーシス、過眠、呼吸困難、筋緊張低下を発症。血中の乳酸・ピルビン酸高値及びMRIにおける大脳基底核や脳幹の対象性の異常を確認)。尿中代謝産物分析と血中アシルカルニチン分析を行った。尿検体は既報ウレアーゼ処理法で前処理した後、GC/MS分析 (日本電子株式会社JMS-K9) を行った。ろ紙血検体はタンデムマス分析 (株式会社島津製作所LCMS-8040) による血中アミノ酸とアシルカルニチンを分析した。

【結果】尿代謝プロファイルに、23DH2MBは強い排泄増加 (健常者の44.0倍) が見られた。血中に、3-hydroxyisobutyryl-carnitine (C4-OH) は著明 (健常者の4.1倍) で、複数のアミノ酸とアシルカルニチンの軽度上昇も認められた。HIBCH欠損症と確定診断した。

【考察】23DH2MBはHIBCH欠損症以外に、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症とshort-chain enoyl-CoA hydratase (ECHS1) 欠損症等の疾患にも増加すると報告されており、病態を正確に判断するため、包括的な代謝プロフィル解析が必要である。本法は、今後のLeigh症候群の早期病因診断に、遺伝子解析より迅速かつ有効なツールと考えられ、病態の解明や鑑別の方法に寄与することが期待される。

P-3

日本人の血漿トリメチルアミン-N-オキシドは頸動脈肥厚と相関関係がない
ーShimane CoHRE Studyー

野津 吉友[1]，矢野 省三[2]，山口 一人[3]，田邊 一明[3]，並河 徹[4]，長井 篤[2]

[1]島根大学医学部附属病院 検査部，[2]島根大学医学部臨床検査医学，[3]島根大学医学部循環器内科学第4，
[4]島根大学医学部病態病理学

Plasma level of trimethylamine-N-oxide(TMAO) was not correlated to the intima-media thickness in Japanese; Shimane CoHRE Study

Yoshitomo Notsu[1], Shozo Yano[2], Kazuto Yamaguchi[3], Kazuaki Tanabe[3], Toru Nabika[4], Atsushi Nagai[2]

[1]Clinical Laboratory Division, Shimane University Hospital,
[2]Department of Laboratory Medicine, Shimane University Faculty of Medicine,
[3]Department of Internal Medicine IV, Shimane University Faculty of Medicine,
[4]Department of Pathology, Shimane University Faculty of Medicine

【目的】トリメチルアミン-N-オキシド（TMAO）は動脈硬化性疾患を惹起する物質として注目されている。TMAOは食物に含まれるカルニチンやコリンが腸内細菌叢や肝臓で代謝されることで産生される。一方、海産魚類の組織にはTMAOが多く含まれている。日常的に海産魚類を摂取する日本人の血漿TMAO値を調査するために島根県の住民健診受診者を対象として横断的研究をおこなった。

【方法】男性：n=142、女性：n=222を対象とした。年齢の平均は72.7歳（41歳～90歳）であった。動脈硬化の指標としてMax-IMTとプラークスコアを計測した。血漿TMAOの分析はLC/MS/MS 8050型（島津製作所）を使用した。

【結果】血漿TMAO値は0.4～69.4μM、中央値は6.7μMで対数正規分布を示した。多変量解析では年齢と性別はTMAO値に影響を与えていなかった。また、TMAO値とMax-IMT値およびTMAO値とプラークスコア間で有意な相関関係は認められなかった。しかしながら離島部のTMAO平均値（13.3μM±12.3μM）と山間部のTMAO平均値（6.3μM±5.9μM）の間で有意差を認めた（$p<0.0001$）

【考察】今回の研究では日本人の血漿TMAOレベルは直接的にMax-IMT値に影響していなかった。一方、海産魚類の摂取はTMAO値に影響していた。

P-4

GC/MS尿代謝プロフィル分析によるTCA回路異常の化学診断の検討

阮 宗海[1]，張 春花[2]，王 旭陽[2]，金 明姫[1]，唐 剣慈[1]，万 婷婷[1]，宋傑[1]

[1]ミルスインターナショナル 検査・データ解析部，[2]ミルスインターナショナル 研究開発部

A study of chemical diagnosis of TCA cycle disorder by GC/MS urinary metabolite profile analysis

Zonghai Ruan[1], Chunhua Zhang[2], Xuyang Wang[2] , Mingji Jin[1], Jianci Tang[1], Tingting Wan[1], Jie Song[1]

[1]Department of examination and data Analysis of MILS International,
[2]Department of research & development of MILS International

【目的】TCA回路の異常はミトコンドリア代謝に影響を及ぼす稀な疾患群である。その中、α-ケトグルタル酸尿症とフマル酸尿症の化学診断には、尿中α-ケトグルタル酸の排泄は健常者の15～100倍で、フマル酸が健常者の100倍以上と幅広い変動あると報告された。今回GC/MS分析による先天性代謝異常症のスクリーニングで当施設に依頼してきた中国人患者の中、上記基準に準じ、尿中α-ケトグルタル酸の異常増加を呈した26例とフマル酸の異常増加を呈した1例を発見した。それぞれの尿代謝プロフィルを解析し、臨床像との関係を検討したので報告する。

【方法】先天性代謝異常症のハイリスクスクリーニングで当施設に依頼してきた中国人患者24686人（男性：15805名，女性：8881名）の尿を既報ウレアーゼ処理法で前処理した後、GC/MS分析を行った。GC/MSデータ解析は当施設の代謝異常症解析プログラムで病態解析した。異常を示された患者の臨床所見と照合した。

【結果】26例（男性：12名，女性：14名）の尿中α-ケトグルタル酸の異常増加を呈した。検出率は1.05‰であった。1例（女性：1名）の尿中フマル酸の異常増加を発見した。検出率は0.04‰であった。これらの症例には、TIC回路代謝産物の増加も認めた。27例の中に最も多く見られる臨床症状は肝機能異常と黄疸（n=17，63%）で、次に筋緊張低下（n=5，19%）であった。他に心臓疾患とけいれんは（各n=2）で、脳症、低血糖、嘔吐と貧血が（各n=1）を発見された。有機酸代謝異常症の中にメチルマロン酸血症のみがα-ケトグルタル酸の増加を伴うことを確認した。

【考察】化学診断に準じるα-ケトグルタル酸尿症が26例とフマル酸尿症が1例を発見した。酵素活性と遺伝子解析結果は不明であったため、確定診断に至らなかった。α-ケトグルタル酸上昇例がより高頻度で検出することは中国に特有かもしれない。その原因は、肝機能異常や黄疸、メチルマロン酸血症などの病態からミトコンドリア中のTCAサイクルの代謝に何らかの影響を惹き起こされていると推測される。さらに確認するため、細胞レベルでのミトコンドリア機能ならびにTCAサイクル代謝機能評価及び遺伝子解析が必要だと考える。

P-5

カラムスイッチングLC-MS/MSを用いたヒト糞便中セロトニンの分析

平林 由紀子[1]，中村 公則[2]，曽根原 剛志[1]，半澤 悟[1]，清水 由宇[3]，相沢 智康[2]，中村 幸志[4]，玉腰 暁子[4]，綾部 時芳[2]

[1]株式会社日立製作所 研究開発グループ，[2]北海道大学大学院 先端生命科学研究院，
[3]北海道大学大学院 生命科学院，[4]北海道大学大学院 医学研究院

Analysis of Serotonin in Human Feces by Column-switching LC-MS/MS

Yukiko Hirabayashi[1], Kiminori Nakamura[2], Tsuyoshi Sonehara[1], Satoru Hanzawa[1], Yu Shimizu[3], Tomoyasu Aizawa[2], Koushi Nakamura[4], Akiko Tamakoshi[4], Tokiyoshi Ayabe[2]

[1]Research & Development Group, Hitachi, Ltd., [2]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University,
[3]Graduate School of Life Science, Hokkaido University, [4]Faculty of Medicine, Hokkaido University

【目的】セロトニンは脳と腸で産生され，双方で重要な役割を担っており，抑うつや脳腸相関に関係すると言われている。腸で産生されたセロトニンは糞便にも含まれる可能性があり，その濃度は腸のセロトニン産生を反映し抑うつ気分の指標となり得る。しかし糞便は夾雑物が非常に多いため，糞便に含まれる微量成分の分析には固相抽出等の前処理が必須である。そこで，糞便中セロトニン分析法の確立をめざし，固相抽出とカラムスイッチングLC-MS/MSを用いて，糞便に添加したセロトニンの分析を試みた。
【方法】糞便は，北海道大学大学院医学研究院および日立グループ倫理審査委員会の承認のもとで健康な成人被験者12名 (男10,女2) から採取した。採取した糞便を凍結乾燥し，パウダー状に粉砕した。回収率評価には，重水素ラベルセロトニン (Serotonin -α,α,β,β-d4 Creatinine Sulfate Complex, 大塚製薬) を使用した。パウダー糞便20 mgにセロトニン-d4水溶液400 μLを加えて一晩攪拌した後，遠心した上清200 μLを，MonoSpin® CBA (GLサイエンス) で固相抽出し，乾固後水200 μLで再溶解した。LCには日立製超高速液体クロマトグラフLaChromUltra，MSにはSCIEX製3200 Q TRAPを用い，まず除タンパクカラム (CAPCELL PAK MF Ph-1，資生堂) に試料を導入し，タンパク質排出後に流路を切替え，分析カラム (J-Pak Wrapsil C18，ジャスコエンジニアリング) で分離した後，MRMモードで質量分析した。
【結果】セロトニン-d4の回収率は，0.5 μMで日内43.4±2.8 % (n=6)，日間43.2±3.6 % (n=5) だった。また，内因性セロトニン濃度は約0.1～1.1 μM (乾燥糞便含有量0.5～4 ng/mg) だった。
【考察】糞便中のセロトニン濃度の測定に成功した。
【謝辞】本研究に関してご指導・ご協力いただいた，北海道大学大学院農学研究院准教授 石塚敏先生，北海道大学創成研究機構 岡征子氏, 北海道大学大学院先端生命科学研究院　黒石亜衣子氏に感謝いたします。

P-6

メタボローム解析による食道がん術前化学放射線療法の効果予測代謝物バイオマーカーの探索

西海 信[1]，藤垣 誠治[1]，小林 隆[1]，本田 一文[2,3]，吉田 優[1,3]

[1]神戸大学大学院 医学研究科，[2]国立がん研究センター研究所 早期診断バイオマーカー開発部門，[3]AMED-CREST

Discovery of metabolite biomarkers related to the chemoradiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by metabolome analysis

Shin Nishiumi[1], Seiji Fujigaki[1], Takashi Kobayashi[1], Kazufumi Honda[2,3], Masaru Yoshida[1,3]

[1]Kobe University Graduate School of Medicine,
[2]Department of Biomarkers for Early Detection of Cancer, National Cancer Center Research Institute,
[3]AMED-CREST

【目的】局所進行食道がんでは、完全切除率向上や予後改善を目指し、様々な術前化学療法や術前化学放射線療法を試みる。しかし、術前化学放射線療法に反応せず、効果不良の患者の予後は、術前療法を施行せず外科的切除を行った患者よりも悪い場合がある。もし、術前化学放射線療法の効果予測因子が存在すれば、治療効果不良と予測される患者においては無益な術前治療を回避でき、外科的切除を優先することにより予後の改善が期待されることから、本研究では、食道がん患者の術前化学放射線療法に対する治療効果予測に有用な血中代謝物バイオマーカーの探索を実施した。
【方法】国立がんセンター中央病院、ならびに、国立がんセンター東病院にて行われた臨床病期II/III期胸部食道がんに対する5-フルオロウラシル、シスプラチンと放射線同時併用療法による術前化学放射線療法の実施可能性試験に参加した食道扁平上皮がん患者の血清検体を用いた。代謝物分析には、トリプル四重極液体クロマトグラフ質量分析計、ならびに、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計を使用した。
【結果】術前化学放射線療法による病理学的完全奏功例と非奏効例とを比較解析評価を実施した結果、L-Serineが、Cox比例ハザードモデルによる単変量解析において、予後因子となりうる可能性を明らかにできた。また、無増悪期間、および、疾患特異的生存率をカプラン・マイヤー法により評価し、血中L-Serine濃度が有意に影響することを確認できた。
【考察】本研究において、食道がんの術前化学放射線療法における効果予測に有用であり、かつ、治療後の予後にも関連する代謝物候補として、L-Serineを見出すことができた。

P-7

Girard試薬Pアイソトポログを用いた副腎静脈血清中アルドステロンのLC/ESI-MS/MS定量法

赤石 美帆[1]，横田 麻衣[1]，小川 祥二郎[1]，杉浦 悠毅[2]，西川 哲男[3]，西本 紘嗣郎[4]，東 達也[1]

[1]東京理科大学 薬学部，[2]慶應義塾大学 医学部，[3]横浜労災病院，[4]埼玉医科大学 国際医療センター

A method for determination of aldosterone in adrenal tributary venous serum by derivatization with Girard P reagent isotopologues followed by LC/ESI-MS/MS

Miho Akaishi[1], Mai Yokota[1], Shoujiro Ogawa[1], Yuki Sugiura[2], Tetsuo Nishikawa[3], Koshiro Nishimoto[4], Tatsuya Higashi[1]

[1]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,
[2]Department of Biochemistry, Keio University School of Medicine,
[3]Endocrinology & Diabetes Center, Yokohama Rosai Hospital,
[4]Department of Uro-Oncology, Saitama Medical University International Medical Center

【目的】原発性アルドステロン症 (PA) では，副腎腫瘍 (APA) からアルドステロン (ALD) が過剰に分泌され，その結果，高血圧，心血管系疾患が引き起こされる．PA治療ではAPA部位の特定が重要であり，その手法として左右副腎のそれぞれ3か所の静脈支脈から部位選択的に採血するssAVS (super-selective adrenal venous sampling) が注目されている．ssAVSとそれに続くALD濃度測定によってAPA部位を正確に特定できれば，片側性PAばかりでなく，従来は薬物療法のみが選択肢であった両側性PAでも外科的切除 (病変副腎の一部切除) による治療が可能となる．本研究では，感度とスループットの向上を目指し，LC/ESI-MS/MSにGirard試薬Pのアイソトポログ (GP及び$^{2}H_{5}$-GP) を用いる誘導体化を導入し，2検体同時定量法の開発を試みた．

【実験・結果】GP及び$^{2}H_{5}$-GPは既報に基づき合成した．左右副腎のssAVS試料 (血清，それぞれ25 μL) に$^{2}H_{8}$-ALD (IS) を添加後，除タンパク及び固相抽出に付して精製し，次いで，一方の試料をGPで，他方を$^{2}H_{5}$-GPで誘導体化した．得られた2つの試料を混合し，LC/ESI-MS/MS (SRM) に付した．いずれの試薬アイソトポログを用いても検量線は1.0 – 40 ng/mLの範囲で直線性 ($r^{2} \geq 0.996$) を示し，また，日内・日間変動試験でのRSDは ≤ 6.6%，添加回収率は98.2 – 107.0%と良好な結果が得られた．誘導体化によってLOQ (1.0 ng/mL) は4倍改善された．片側性PA患者から得た計22のssAVS試料について，左右副腎の1検体ずつを1組として2検体を同時定量したところ，APAが存在する副腎を確実に同定できた．また，高濃度のALDが検出された試料の採取部位と摘除組織の病理検査によるAPA部位はよく一致していた．このように本法では2つのssAVS試料を同時定量・直接比較することから，片側性/両側性PAの診断やAPA部位の特定の精度向上につながると期待される．さらに，1検体ごとのLC/ESI-MS/MS定量法 (誘導体化なし) に比べて，本法では前処理後の分析時間を2/3 (260分→160分/22検体) に短縮することができ，スループットも改善された．

P-8

MALDI-TOF MS（VITEK MS）を用いて血液培養から*Staphylococcus pettenkoferi*が検出された一症例

大西 雅人[1]，内池 伸和[1]，李 相太[1]，清松 佐知子[1]，平野 絵美[1]，宇井 孝爾[1]，小泉 章[1]，
藤本 育子[1]，問本 佳予子[1]，藪内 博史[1]，田中 忍[1]，矢野 寿一[2]，山﨑 正晴[1]

[1]奈良県立医科大学附属病院，[2]奈良県立医科大学附属病院

A case of bacteremia caused by *Staphylococcus pettenkoferi* identified by MALDI-TOF MS (VITEK MS)

Masahito Ohnishi[1], Nobukazu Utiike[1], Sang-Tae Lee[1], Sachiko Kiyomatsu[1], Emi Hirano[1], Kouji Ui[1], Akira Koizumi[1], Ikuko Fujimoto, Kayoko Toimoto[1], Hiroshi Yabuuti[1], Shinobu Tanaka[1], Hisakazu Yano[2], Masaharu Yamazaki[1]

[1]Central Clinical Laboratory, Nara Medical University Hospital,
[2]Department of Microbiology and Infectious Diseases, Nara Medical University

【目的】*Staphylococcus pettenkoferi*は、2002年に初めて報告されたコアグラーゼ陰性ブドウ球菌（以下CNS）であり、ときに血流感染の原因菌としても報告されている同定困難で稀な菌である。今回、80代女性患者の血液培養からMALDI-TOF MS（VITEK MS）（ビオメリュー・ジャパン社）を用いて*S. pettenkoferi*を同定した稀な一症例を経験したので報告する。

【方法】血液培養は1セットのみ検査依頼があり、その好気ボトル、嫌気ボトル共に陽性となり、グラム陽性球菌が検出された。バイタルメディアTWINプレート6（TSA+HPチョコ）（KYOKUTO）を用いて35°C炭酸ガス環境下で分離培養を行い、24時間後、大小2種類の白色コロニーが発育した。発育したコロニーをVITEK MSにより同定検査を実施した。

【結果】VITEK MS では同定確率が 99.9% で、大コロニーが *Staphylococcus capitis*、小コロニーが *S. pettenkoferi*と2種類のCNSが同定された。さらに、小コロニーを16S rRNA遺伝子解析で解析した結果、*S. pettenkoferi*と同定された。その後、バンコマイシン投与が開始され良好な経過が得られた。

【考察】*S. pettenkoferi*は稀な菌であり、生化学的性状に基づく同定機器であるVITEK2（ビオメリュー・ジャパン社）では同定が不可能であり、VITEK MSにより迅速な同定が可能であった。その結果、バンコマイシン投与が早急に開始する事ができ、VITEK MSを用いた質量分析同定法により迅速な治療が行えた症例と考えられる。

P-9

4種のGirard試薬アナログを用いた誘導体化によるステロイドのハイスループットLC/ESI-MS/MS定量法の開発

亀村 美樹，横田 麻衣，小川 祥二郎，東 達也
東京理科大学 薬学部

Enhanced throughput LC/ESI-MS/MS assay for steroid by derivatization with Girard reagent analogues

Miki Kamemura, Mai Yokota, Shoujiro Ogawa, Tatsuya Higashi
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

【目的】生体試料中のステロイド定量において，LC/ESI-MS/MSは特異性の点でイムノアッセイを凌駕する．しかしその一方で，分析スループットには改善の余地がある．そこで演者らは，pyridinium，trimethylammonium，4-methylpyridinium及びethyldimethylammoniumの荷電部位を有するGirard試薬アナログ（それぞれGP，GT，GMP及びGEDM）による誘導体化とLC/ESI-MS/MSを組み合わせた，新規ハイスループット定量法を考案した．本研究では先天性副腎過形成症の診断マーカーである 17α-hydroxyprogesterone（17OHP）をモデルステロイドとして，血漿4検体一括定量法の開発を試みた．
【方法】GP及びGTは市販品を使用し，GMP及びGEDMは既報に準じて合成した．血漿4検体（各20 μL）を $^{2}H_{7}$-17OHP（IS）を含むMeCNで除タンパク後，17OHP及びISをAcOEtで抽出した．次いで，それぞれを各Girard試薬アナログ（20 μg）により誘導体化［MeOH-AcOH（9:1, v/v）中超音波処理，15 min］した．得られた4試料を混合後，LC/ESI-MS/MSで分析した［装置，Waters Quattro Premier XE；移動相，0.1% HCOOH含有MeCN-10 mM $HCOONH_4$（7:18, v/v）；カラム，Ascentis Express C18（5 μm, 150 × 2.1 mm i.d.）］.
【結果・考察】いずれのGirard試薬アナログを用いた場合でも，3位ケト基を経由して荷電部位が導入され，ESI-MSでは高強度の$[M]^+$が観察された．これらをMS/MSに付すと特徴的なプロダクトイオン（*m/z* 385.2）が得られ，その結果，誘導体化により17OHPの検出感度は約6－12倍向上し，LODは250－500 fg（S/N = 5）に達した．血漿試料からは17OHP及びISに相当するピークが明瞭に観察され，4種の誘導体間のt_Rの差は最大でも2.4 minであった．いずれの試薬を用いた場合でも検量線は0.50－50 ng/mLの範囲で$r^2 \geq 0.995$の直線性を示した．日内・日間変動試験でのRSDは≤ 4.0%，添加回収率は99.2－105.9%と良好な結果が得られ，本法は精度，正確度ともに優れていた．最後に，血漿20検体を用いて従来法（GPを用いた1検体ずつの分析）と本法とを比較した結果，同等の定量値［y（本法）= 0.982x（従来法）+ 0.239，r^2 = 0.996］が得られ，合計のLC/ESI- MS/MS運転時間を600 minから150 minへと4分の1に短縮できた．このように複数の誘導体化試薬アナログを駆使した多検体一括定量法は，LC/ESI-MS/MSのスループット向上に有効であった．

P-10

中国人プロピオン酸血症1例長期フォローアップ経過報告

唐 剣慈，張 春花，阮 宗海，金 明姫，趙 寧，万 婷婷，王 旭陽
ミルスインターナショナル 研究開発部

The follow up report of one Chinese propionic acidemia patient

Jianci Tang, Chunhua Zhang, Zonghai Ruan, Mingji Jin, Ning Zhao, Tingting Wan, Xuyang Wang
Department of research & development of MILS International

【目的】プロピオン酸血症はプロピオニール-CoAカルボキシラーゼの活性欠損により、プロピオニール-CoA蓄積し、プロピオン酸とメチルクエン酸などの有機酸血中濃度上昇し、代謝性アシドーシスに伴う一連の臨床症状を惹き起こされる疾患である。プロピオニール-CoAカルボキシラーゼの残存活性と遺伝子変異型により、臨床経過が異なり、新生児時期死亡例や、無症状で経過する軽症例も多く報告されている。今回、生後間もなく発症、1歳6ヶ月時診断され、20歳までフォローアップしたプロピオン酸血症患者の代謝プロフィルの変動経過を纏めたので報告する。
【症例情報】1998年2月生まれ、中国人男児、生後から1歳6ヶ月までに痙攣、代謝性アシドーシス、肺炎で繰り返し入院治療し、1歳6ヶ月時プロピオニール-CoAカルボキシラーゼの活性が健常者の3.1%低く、遺伝子解析でPCCB遺伝子変異を見付け、プロピオン酸血症と確定診断された。蛋白制限食事療法とビオチン、カルニチン投与で症状をコントロールされ、定期的に尿代謝プロフィルと血中アシルカルニチン測定でフォローアップした。尿プロフィル解析はGC/MS分析で、濾紙血アシルカルニチン解析はタンデムマス分析より行った。尿と濾紙血の分析結果を合わせて、プロピオン酸血症の異常代謝産物をモニターした。
【結果】尿中異常有機酸 (3-ヒドロキシプロピオン酸とメチルクエン酸) の変化は14歳まで繰り返し発作あるため、コントロールうまくできず14歳以降食事治療も安定し、発作がほとんどなくなり、尿中代謝産物排泄レベルも安定していた。血中プロピオニルカルニチン (C3) 継続的高値を示し、遊離カルニチン (C0) が正常レベルで維持できた。重度の発達遅延と言語障害が残った。
【考察】生後間もなく発症、1歳6ヶ月で確定診断されたプロピオン酸血症患者に対して、長期渡り、代謝プロフィルの変化をモニターした。蛋白制限食療法とビオチン、カルニチン投与により症状を改善し、代謝産物の変動も安定したが、重度の発達遅延と言語障害が残った。その原因は確定診断されるまでの発作が脳の発達に重度の影響残されたと考え、早期診断、早期治療の重要性を再度示唆された。

P-11

モノリス型SPEスピンチップを用いたUPLC-Q-Tof-MSによるヒト体液中フルニトラゼパムおよび代謝物の迅速高感度分析法

藤城 雅也[1]，李 暁鵬[1]，橋本 茉莉[1]，長谷川 智華[1,2]，熊澤 武志[1,3]，宮崎 将太[4]，丸茂 明美[1]，石井 晃[5]，佐藤 啓造[1]，松山 高明[1]

[1]昭和大学医学部 法医学講座，[2]東邦大学医学部 法医学講座，[3]聖隷クリストファー大学 看護学部，
[4]ジーエルサイエンス株式会社，[5]名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学

Rapid and high-sensitivity analysis of flunitrazepam and its metabolites in human body fluids using a monolithic C_{18} gel-packed spin tip and UPLC-Q-Tof-MS

Masaya Fujishiro[1], Xiao-Pen Lee[1], Mari Hashimoto[1], Chika Hasegawa[1,2], Takeshi Kumazawa[1,3], Shota Miyazaki[4], Akemi Marumo[1], Akira Ishii[5], Keizo Sato[1], Takaaki Matsuyama[1]

[1]Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine,
[2]Department of Legal Medicine, Toho University School of Medicine,
[3]Seirei Christopher University School of Nursing, [4]GL Sciences Inc.,
[5]Department of Legal Medicine and Bioethics, Nagoya University Graduate School of Medicine

【目的】モノリス型C_{18}固相抽出 (SPE) スピンチップは従来のMonoTip C_{18}を改良し、遠心操作による簡便かつ迅速な微量固相抽出が可能な新しいSPEチップである。本研究では、ヒト体液中フルニトラゼパムとその代謝物7-アミノフルニトラゼパムについて、開発したモノリス型SPEスピンチップ (プロトタイプ) による微量抽出とUPLC-Q-Tof-MS法による分析を検討したので報告する。
【方法】本分析ではフルニトラゼパムとその代謝物7-アミノフルニトラゼパムを分析対象とし、Acquity UPLCおよびQ-Tof-MS装置 (Waters) を用い、正イオンエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法による測定を行った。試料調製としては、ヒト血漿20 μLまたは尿100 μLに2種類の薬物およびそれぞれの内部標準物質を添加した後、1M塩酸10 μLを混和し、超純水で全量を200 μLとした。モノリス型SPEスピンチップには、メタノール、蒸留水 (スピンチップの前処理)、体液試料 (試料負荷)、蒸留水 (チップの洗浄) の順序で各溶液をロードし、各ステップは1000 *g*で15秒の遠心操作を行った。最後にメタノール50 μLによる遠心溶出を行い、その溶出液5 μLをUPLC装置に直接注入した。カラムはAcquity UPLC BEH C_{18} (長さ50 mm、内径2.1 mm、粒径1.7 μm) を用い、0.1%ギ酸水溶液をベースにしたメタノールのリニアグラジエント法の移動相条件下で分析を行った。
【結果】フルニトラゼパム、7-アミノフルニトラゼパムおよび2種類の内部標準物質は、モノリス型SPEスピンチップによって3分以内に固相抽出操作が完了し、血漿および尿中からはそれぞれ4分以内に感度良く検出された。血漿または尿において、内部標準法を用いて作成した検量線は0.4～500 ng/mLの範囲でそれぞれ良好な直線性を示し、回収率は94～104%であった。また、フルニトラゼパム1 mgを服用したボランティアの血漿および尿中から、未変化体フルニトラゼパムおよび代謝物である7-アミノフルニトラゼパムがそれぞれ感度良く同定・定量された。さらに、尿中からは3-ヒドロキシフルニトラゼパム、7-アセトアミドフルニトラゼパムおよび7-アセトアミド-3-ヒドロキシフルニトラゼパムも検出され、それぞれ精密質量同位体マススペクトルによる元素組成解析が可能であった。
【考察】従来、ヒト体液中ベンゾジアゼピン系薬物の抽出では液—液抽出法あるいは固相抽出が用いられてきたが、繁雑な操作や多量の有機溶媒を必要とすることが問題となっている。しかし、本法に用いた新しいモノリス型SPEスピンチップは、遠心操作による簡便、迅速かつ微量固相抽出が可能であり、UPLC-Q-Tof-MSとの組み合わせは、高感度定量分析から精密質量同位体マススペクトルによる元素組成解析も可能なハイスループット分析解析を実現することができた。本法は多くの薬物分析への応用が可能で、臨床および法医学領域において有用であることが示唆された。

P-12

保存条件と食事がヒト血漿メタボロームに与える影響の網羅的解析

守谷 岳郎，小林 博幸，安藤 智広
アクセリード・ドラッグディスカバリー・パートナーズ株式会社・統合生物

Comprehensive analysis of metabolic alteration in human plasma caused by storage condition and meal challenge

Takeo Moriya, Hiroyuki Kobayashi, Tomohiro Andou
Integrated Biology, Axcelead Drug Discovery Partners, Inc.

【目的】近年、医薬品開発においてバイオマーカーによる薬効、安全性評価の重要性が高まり、ヒト血漿中代謝物の網羅的分析やターゲット分析が一般化しつつある。しかし対象となる内在性代謝物は糖、脂質、アミノ酸など多様であり、それらの個人間差、個人内変動 (明暗周期、食事など)、ハンドリングプロセスにおける安定性は大きく異なる。このため、これらに留意した被験者選択、採血タイミング、方法、保存条件等の試験プロトコールデザイン、取得データの統計解析および解釈を行わなければならない。この目的のために、網羅的代謝物解析技術を用い、健常人における血漿中代謝物の変動特性の基盤データを取得した。
【方法】様々な変動因子の中で基本的かつ重要なものとして保存条件と食事の影響に着目した。保存条件の影響を調べるために健常人5人から採取した血漿サンプルを異なる温度と時間を組み合わせた10条件で保存し、-80度で1ヶ月間保管した血漿サンプルをコントロールに代謝物検出量の変動解析を実施した。さらに、食事の影響を調べるために、健常人10人が前夜から絶食し、同一の食事を摂取した際の食前食後の血漿を採取した。そのサンプルを同一被験者内で比較し、血漿中代謝物に対する食事の影響を評価した。
【結果および考察】各試験において、それぞれ約1,000代謝物の保存安定性と食事による変化のデータを取得した。主成分分析の結果、保存条件や食事による同一個人内での変動の方向は全被験者に共通し、個人間差によらない代謝変動の存在が示された。個々の解析では温度依存的な脂質分解や食事による糖利用亢進といった既報の変動が明確に表れた一方で、新規知見が得られた。非常に不安定な代謝物として-SH含有代謝物の他、アラントイン、1-アラキドノイルグリセロール等を認めた。N^6-メチルアデノシンの温度および時間依存的な増加度に個人差が無く、保存条件推定の指標となる可能性が示された。食事の影響として抱合体特異的な胆汁酸の増加や満腹シグナルを表すアナンダミドの減少を確認した。その他の変動代謝物についても類縁体の動きと比較することで、変動メカニズムを推定した。
【結論】得られた結果は各代謝物を分析する際の保存条件やサンプリングタイミングの規定など、試験プロトコール作成に利用される。不確定なデータを除いた統計解析やデータ解釈の精度向上にも利用される。

P-13

ワイドターゲットLC-MS/MSメタボロミクス解析によるアルツハイマー型およびレビー小体型認知症の識別バイオマーカー探索

六車 宜央[1]，筒井 陽仁[1,2]，赤津 裕康[3,4]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大学 薬学部，[2]小野薬品工業，[3]名古屋市立大学 医学部，[4]福祉村病院

Discovery of novel biomarkers for discriminate Alzheimer's disease and dementia with Lewy Body using widely targeted LC-MS/MS metabolomics

Yoshio Muguruma[1], Haruhito Tsutsui[1,2], Hiroyasu Akatsu[3,4], Koichi Inoue[1]

[1]School of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [2]Ono Pharmaceutical Co., Ltd.,
[3]School of Medical Sciences, Nagoya City University, [4]Fukushimura Hospital

【目的】現在，認知症は病態によりいくつかに分類され，主なものにアルツハイマー型 (Alzheimer's disease, AD)，脳血管性型，前頭側頭型，レビー小体型 (Dementia with Lewy Body, DLB) などが挙げられる．それらの臨床診断は，認知機能検査 (MMSE) や画像診断などが存在するが，実際には生前に確定的な診断することは難しく，死後病理解剖に委ねられている．そのため，早期に診断や鑑別が可能となる有益なバイオマーカーが多方面から望まれている．また、早期に認知症の診断や種別判定などができれば、その後の治療方針に大きく貢献できる。そこで，我々は，生体試料中の低分子化合物に着目し，120種類以上の生体内化合物を同時に分析が可能であるWidely targeted Metabolomics (W-TMet) を開発した [Muguruma *et al*. *J. Chromatogr. B*, 1091, 53-66, 2018]．本研究では，病理診断に基づく同一検体から採取した脳脊髄液 (CSF) /血液ペア試料を用いたW-TMetを実施し，得られたデータに対して，KEGG PATHWAYデータベースに基づく代謝パスウェイ解析や統計解析を活用し，認知症種別 (ADおよびDLBなど) の診断・鑑別が可能となる特異的なバイオマーカー候補を探索することを目的とした．
【方法】多くの内因性低分子代謝物を同定・定量するために，アミノ基骨格 ($R\text{-}NH_2$) 特異的に結合する9-Fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc) を用いた官能基特異的な誘導体化法および混合安定同位体試薬を用いた内部標準法を採用した．前処理として，生体試料を除タンパクした後に，誘導体化を行なった．その後，LC-MS/MS (Waters 社製 ACQUITY UPLC H-Class/Xevo TQDシステム) を用いて測定した．
【結果・考察】開発したFmoc誘導体化LC-MS/MS法により，10分以内に125種類のアミノ酸骨格由来の代謝物を一斉定量分析することが出来た．また，混合安定同位体を用いた内標準法による検量線を作成した結果，$R^2 > 0.992$の良好な直線性が得られた．確立した分析法を用いて，死後病理診断に基づくCSF・血液ペア検体を分析し，パスウェイ解析及び主成分分析を行なった．その結果，認知症種別間で有意に変動する複数のマーカー (マルチバイオマーカー) を捉えることが可能であり，ADとDLBの鑑別診断への可能性が見出された．今後は，さらに検体数を増やし，マルチバイオマーカーを利用した診断法の応用性を検討する．本手法を用いたマルチバイオマーカーによる判別法は，疾患の早期診断，進行度の評価，予後の予測などの診断分野のみに留まらず，疾患メカニズム解明や創薬ターゲットの探索，薬剤の薬効・副作用評価などにも利用可能であり，創薬研究の効率化やフェノタイプに応じた層別化医療への応用が期待される。

P-14

極低出生体重児における出生直後からの血中カルニチン濃度の推移

佐々木 菜央[1]，前田 康博[1]，戸川 泰子[2]，後藤 佳奈[1]，堀田 祐志[1]，片岡 智哉[3]，小山 典久[2]，幸脇 正典[2]，木村 和哲[1,3]

[1]名古屋市立大学大学院 薬学研究科，[2]豊橋市民病院 小児科，[3]名古屋市立大学大学院 医学研究科

Fluctuation of blood carnitine concentrations in extremely low birth weight infants

Nao Sasaki[1], Yasuhiro Maeda[1], Yasuko Togawa[2], Kana Gotoh[1], Yuji Hotta[1], Tomoya Kataoka[3], Norihisa Koyama[2], Masanori Kouwaki[2], Kazunori Kimura[1,3]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, [2]Pediatrics Toyohashi Municipal Hospital, [3]Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University

【目的】カルニチンは長鎖脂肪酸をミトコンドリアマトリックス内へ輸送するために必須であり、長鎖脂肪酸のβ酸化によるATP産生に重要な物質である。カルニチンの多くは筋中に貯蔵されるため、筋肉量の少ない極低出生体重児ではカルニチンの貯蔵量が少なく低カルニチン状態にあることが予想される。極低出生体重児の出生から13日間の濾紙血中アシルカルニチン濃度を測定し、カルニチン製剤の必要性を検討する。また、カルニチン補充によるアシルカルニチン濃度の変化も調査する。

【方法】外表奇形を認めない極低出生体重児32名において出生後0，6，13日の濾紙血中遊離カルニチン(C0)、アセチルカルニチン (C2)、パルミトイルカルニチン (C16)、及び捨てアロイルカルニチン (C18)、をUPLC-MS/MSで定量した。

UPLCのカラムにCORTECS UPLC C18 Column (2.1×150 mm, Waters) を使用し、1.5 mmol/Lノナフルオロ吉草酸とMeOHを移動相とした。

【結果】カルニチン未補充児では、濾紙血中のC0濃度はDay 0で12名、Day 6で21名、Day 13で27名において、カルニチン欠乏症の基準値20 μM以下であった。C0, C2, C16, C18濃度はDay 0からDay 13にかけて減少傾向であった。カルニチン補充児では、カルニチンの補充に伴いC0濃度が上昇し、20μM以上の濃度が維持され、C2濃度も上昇した。しかし、C16, C18濃度は変化が見られなかった。

【考察】極低出生体重児では出生から二週間以内にカルニチン濃度が低下すると考えられたため、予防的にカルニチンの投与をすることが望ましいと思われる。しかし、「カルニチン欠乏症の診断・治療指針」上の予防投与量 (2-5mg/kg/day) では長鎖アシルカルニチン濃度が上昇しないことが示唆された。

P-15

GCMS分析による尿中2,3-dihydroxyl-2-methybutyrate上昇の病態検討

張 春花，趙 寧，金 明姫，阮 宗海，王 旭陽
ミルスインターナショナル 研究開発部

Pathological study of high level 2,3-dihydroxyl-2-methybutyrate in urine by GCMS analysis

Chunhua Zhang, Ning Zhao, Mingji Jin, Zonghai Ruan, Xuyang Wang
Department of research & development of MILS International

【目的】2,3-dihydroxyl-2-methybutyrate (2,3H2MB) は、バリンの分解代謝経過程に産生するacrylyl-CoAと methacrylyl-CoA の蓄積により二次的に生成される 1 つの有機酸成分であり、S-(2-caboxypropyl) cysteamine (SCPCM) はacrylyl-CoAとmethacrylyl-CoA蓄積により生成される数種類のアミノ酸抱合体の1つである。この2つの成分が最近Leigh症候群の病態解析に、ミトコンドリ遺伝子HIBCH変異による3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase (HIBCH) 欠損症とECSH1遺伝子変異によるShort-chain enoyl-CoA hydratase (SCEH) 欠損症の化学診断の重要な指標として認識されている。今回われわれは、代謝病態解析の観点から、acrylyl-CoAの蓄積に関連する代謝異常症の患者尿中の2,3H2MBの検出レベルを確認し、SCPCMとの相関性およびその病態解析を試みたので報告する。
【方法】当施設に代謝異常症の検査依頼してきた患者中の尿中2,3H2MB上昇患者のなか53名と遺伝子検査でSCEHとHIBCH欠損症を確定診断した患者各2名の尿中2,3H2MBレベルとうち3名の尿SCPCM濃度を測定し、臨床データと照合した。尿中2,3H2MBの測定は既報ウレアーゼ処理法のGCMSで分析し、尿中SCPCM濃度測定はLCMSMSで行った
【結果】SCEHとHIBCH欠損症患者の尿中2,3H2MBとSCPCM排泄は、コントロールより増加し、また、SCEH患者尿中の2,3H2MBとSCPCMレベルはHIBCH欠損症患者より高く検出された。代謝解析上で確定診断できなかった尿中2,3H2MBのみ上昇した53名患者の2,3H2MB上昇程度は比較的に軽度で、ほかの異常は伴わなかったが、遺伝子解析の結果はうち2名ミトコンドリア遺伝子異常あることが分かった。
【考察】尿中2,3H2MBとSCPCM排泄レベルにより、ミトコンドリ遺伝子変異に由来するSCEHとHIBCH欠損症の診断に導き、有意の代謝指標と考えられる。発達遅延やLeigh症候群を呈した患者の病因診断に繋がる。GCMS分析より尿中2,3H2MBの測定のみでもSCEHとHIBCH欠損症のスクリーニングできるが、LCMSMS分析で得られるSCPCMの結果と合わせてより高感度に化学診断できる。今後尿中2,3H2MB の cutoff 値の設定はさらに検討必要と考え、その臨床意義はさらに異なる病態症例を積み重ね検証してゆきたい。

P-16

LC/MS/MSによる血清/血漿1α,25-ジヒドロキシビタミンD定量および分析前変動要因の評価

石毛 崇之[1]，佐藤 守[2]，小川 祥二郎[3]，西村 基[1]，松下 一之[1]，東 達也[3]，野村 文夫[2]

[1]千葉大学医学部附属病院 検査部，[2]千葉大学医学部附属病院 マススペクトロメトリー検査診断学，
[3]東京理科大学 薬学部

Quantification of serum/plasma 1α,25-dihydroxyvitamin D by LC/MS/MS and evaluation of pre-analytical factors

Takayuki Ishige[1], Mamoru Satoh[2], Shoujiro Ogawa[3], Motoi Nishimura[1], Kazuyuki Matsushita[1], Tatsuya Higashi[3], Fumio Nomura[2]

[1]Division of Laboratory Medicine, Chiba University Hospital,
[2]Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University Hospital,
[3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

【目的】ビタミンDはカルシウム代謝調節に必要な脂溶性ビタミンである。ビタミンDは肝臓において25-ヒドロキシビタミンDに代謝され、次いで、腎臓においてホルモン活性を持つ1α,25-ジヒドロキシビタミンD [1,25$(OH)_2$D]に代謝される。血清/血漿1,25$(OH)_2$Dは、くる病、骨軟化症、慢性腎不全、副甲状腺機能亢進症などの診断に有用である。血清/血漿1,25$(OH)_2$Dの定量にはRIAなどの免疫学的測定法が広く用いられているが、1,25$(OH)_2$D以外のビタミンD代謝物と交差反応することが指摘されている。臨床応用を目指し、LC/MS/MSによる1,25$(OH)_2$Dの精密定量法を開発し、種々の分析前変動要因を評価した。
【方法】血清･血漿の前処理にはイムノアフィニティー抽出を用いた。抽出後、4-(4′-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD) を用いて誘導体化を行った。分析法のバリデーションとして、再現性、回収率、最小定量感度を解析した。分析前変動要因として、リウマチ因子、採血菅、凍結融解、全血放置時間 (24時間；4°C、室温)、血清保存時間 (24時間；4°C、室温)、について評価した。健常者の血清を用いて、RIAとの相関を解析すると共に、血清1,25$(OH)_2$Dの健常者における分布を調べた。
【結果】1,25$(OH)_2D_3$および1,25$(OH)_2D_2$について、LC/MS/MSの基礎性能はぞれぞれ以下の通りであった：同時再現性、5.2%、7.2%；日差再現性、7.0%、8.2%；回収率、78.4%、76.0%；最小定量感度、7.1 pg/mL、7.6 pg/mL。リウマチ因子、採血菅、凍結融解、全血放置時間、血清保存時間、の影響を解析した結果、いずれも有意な変化は見られなかった。本法による定量値とRIAによるそれとの間に、良好な相関が見られたが (R=0.786)、LC/MS/MSと比べてRIAでは高値を示す結果であった。健常者における血清1,25$(OH)_2$Dの分布は、18.7－53.9 pg/mL (2.5－97.5%範囲) であった。
【考察】イムノアフィニティー抽出とDAPTAD誘導体化により、LC/MS/MSにおける感度と選択性が向上し、血清/血漿1,25$(OH)_2$Dを精密に定量することが可能となった。

P-17

LC/MSによるヒト血清中における分子種別コレステリルエステルの定量分析

三浦 佑介[1]，加藤 颯太[1]，櫻井 俊宏[1]，陳 震[1]，呉 玥[1]，高 紫君[1]，ロジート シュレスタ[1]，
中村 幸志[2]，鵜川 重和[2,3]，中川 貴史[4]，玉腰 暁子[2]，千葉 仁志[1,5]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]北海道大学大学院医学研究院 社会医学分野 公衆衛生学教室，
[3]大阪市立大学大学院 生活科学研究科，[4]北海道家庭医療学センター，[5]札幌保健医療大学 栄養学科

Analysis of fatty acid composition of cholesteryl esters in human serum by LC/MS

Yusuke Miura[1], Souta Kato[1], Toshihiro Sakurai[1], Zhen Chen[1], Yue Wu[1], Zijun Gao[1],
Rojeet Shrestha[1], Koshi Nakamura[2], Shigekazu Ukawa[2,3], Takafumi Nakagawa[4],
Akiko Tamakoshi[2], Hitoshi Chiba[1,5], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Faculty of Medicine, Hokkaido University,
[3]Osaka City University Graduate School of Human Life Science, [4]Hokkaido Centre for Family Medicine,
[5]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

【目的】コレステリルエステル (CE) はアテローム硬化性プラークの主要な成分であるなど、動脈硬化症との関連が知られている。しかし、臨床検査ではCE濃度を直接測定する方法は存在せず、その詳細について不明な点も多い。本研究ではヒト血清中のCE濃度を脂肪酸の分子種別に測定し、年齢・性別、総脂肪酸濃度やビタミンDとの比較を行い、CE分子種を測定する意義を明らかにすることを目的とした。
【方法】35-79歳の健常人545例 (男性245例、女性300例、平均年齢58.9±12.4歳) から採取した血清を用いた。コレステロールパルミチン酸エステル (CE16:0)、ステアリン酸エステル (CE18:0)、オレイン酸エステル (CE18:1)、リノール酸エステル (CE18:2)、リノレン酸エステル (CE18:3)、アラキドン酸エステル (CE20:4)、エイコサペンタエン酸エステル (CE20:5)、ドコサヘキサエン酸エステル (CE22:6) の8種についてLC/MSで測定した。
【結果】CE20:5は男女とも加齢に伴い有意に増加しており、35-49歳と60歳以上との間で有意差が見られた。各CE濃度と各脂肪酸濃度との相関は、CE20:5とエイコサペンタエン酸 (EPA) の間に強い正相関が見られた ($r = 0.72$)。各CE濃度と25-OHビタミンD相関は、CE20:5との相関係数が最も高かったが ($r = 0.38$)、相関自体は弱かった。
【考察】過去の研究で魚介類の摂取量が多い人ほど、CE20:5や25-OHビタミンDが高値であることが報告されている。本研究で若年者は、高齢者と比べて、CE20:5が低かったことは、魚介類の摂取不足によるEPAとビタミンDの低値と関係がある可能性が推察された。

P-18

トリメチルアミンNオキシドは心疾患患者の予後予測マーカーとして有用である。

相澤 健一[1]，根岸 経太[2]，齋藤 亨佳[1]，木村 夏花[1]，今井 靖[1,2]，苅尾 七臣[2]，永井 良三[3]，鈴木 亨[3,4]

[1]自治医科大学医学部 薬理学講座 臨床薬理学部門，[2]自治医科大学医学部 循環器内科，
[3]自治医科大学 医学部，[4]レスター大学医学部 循環器内科

Trimethylamine *N*-oxide is useful as a prognostic marker for patients with heart disease

Kenichi Aizawa[1], Keita Negishi[2], Yasushi Imai[1], Kazuomi Kario[2], Ryozo Nagai[3], Toru Suzuki[3,4]

[1]Division of Clinical Pharmacology, Department of Pharmacology, Jichi Medical University,
[2]Division of Cardiovascular Medicine, Department of Medicine, Jichi Medical University, [3]Jichi Medical University,
[4]Department of Cardiovascular Sciences, University of Leicester

【目的】カルニチン代謝産物であるトリメチルアミンNオキシドは腸内細菌叢由来の代謝物であり、近年、心不全や心筋梗塞等の心疾患患者で高値を示し、心血管イベント発症率と相関することが海外で報告されている。しかし、人種差の影響も示唆されており、日本人における病的意義も明らかでない。そこで、我々は日本人における心疾患患者のトリメチルアミンNオキシドを分析し、心血管疾患との相関および予後予測における有用性を検討した。

【方法】末梢血中のトリメチルアミンNオキシドを分析するために、LC-MS/MS質量分析計を用いたアッセイ法を開発した。自治医科大学附属病院循環器内科に入院した連続996症例について入院時採血を行い、血清トリメチルアミンNオキシド濃度を測定した。臨床データマイニングと共に横断研究を行った。また、その一部症例について、同様に縦断研究を行った。

【結果】トリメチルアミンNオキシドは心疾患患者（心不全、狭心症、虚血性心疾患）、高血圧、糖尿病、脂質異常症患者で高値を示した。また、心エコー検査上、退院時の左室重量係数と相関した（$r=0.564$, $p=0.002$）。一方、入院時のそれとは相関しなかった。退院前の定常状態では、トリメチルアミンNオキシドは臓器の表現型（左室肥大）と相関した。また、トリメチルアミンNオキシドはクレアチニン値と相関（$r=0.626$, $p<0.001$）し、推算糸球体濾過量と逆相関した（$r=0.442$, $p<0.001$）。

【考察】トリメチルアミンNオキシドは病態安定期の心筋重量係数と相関し、心疾患の予後を反映する有用なバイオマーカーとなることが明らかとなった。また、トリメチルアミンNオキシドは尿毒症性物質として、腎臓の線維化ないし炎症を惹起し、腎機能を障害することが示唆された。これらのことから、トリメチルアミンNオキシドは心疾患患者の心臓リモデリングを反映するバイオマーカーのみならず、予後改善のための治療標的となる可能性がある。

P-19

血中短鎖脂肪酸と肥満との関連

山村 凌大[1]，陳 震[2]，呉 玥[2]，高 紫君[2]，惠 淑萍[2]，千葉 仁志[2,3]，中川 貴史[4]，鵜川 重和[5,6]，中村 幸志[6]，玉腰 暁子[6]

[1]北海道大学大学院 医学院，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，[3]札幌保健医療大学，
[4]北海道家庭医療学センター 栄町ファミリークリニック，[5]大阪市立大学大学院 生活科学研究科，
[6]北海道大学大学院 医学研究院

Serum short chain fatty acids and obesity

Ryodai Yamamura[1], Zhen Chen[2], Yue Wu[2], Zijun Gao[2], Shu-Ping Hui[2], Hitoshi Chiba[2,3], Takashi Nakagawa[4], Shigekazu Ukawa[5,6], Koshi Nakamura[6], Akiko Tamakoshi[6]

[1]Graduate School of Medicine, Hokkaido University, [2]Graduate School of Health Sciences, Hokkaido University, [3]Sapporo University of Health Sciences, [4]Sakaemachi Family Clinic, Hokkaido Centre for Family Medicine, [5]Graduate School of Human Life Science, Osaka City University, [6]Faculty of Medicine, Hokkaido University

【目的】動物実験より，短鎖脂肪酸はGタンパク質共役受容体を介して食欲抑制ホルモンの分泌亢進，脂肪細胞内への中性脂肪の蓄積の抑制や宿主のエネルギー消費の促進に関与し，肥満の予防に有用な基質として注目されている。ヒトでは，短鎖脂肪酸は腸管内で産生され，体内に吸収されて，その多くが直ちに肝臓で代謝されるため，静脈血中には微量しか存在しない。地域一般住民を対象に，LC/MS法を用いて測定した血中短鎖脂肪酸と肥満との関連を検討することを目的とした。
【方法】北海道内の人口約3300人の町の35歳～79歳の住民を対象に，2015年5～11月に調査を行った。簡易型自記式食事歴法質問票 (BDHQ) を用いた食習慣調査，身長・体重測定，血液採取に協力した者は541名であった。LC/MS法を用いて，血中短鎖脂肪酸 (n-酪酸，カプロン酸) 濃度を測定した。血中短鎖脂肪酸の四分位で対象者を4群に分け，肥満の頻度を比較した。ロジスティック回帰モデルを用いて，性・年齢・エネルギー摂取量を調整し，各血中短鎖脂肪酸群の肥満 (BMI≥25kg/m^2) に対するオッズを計算した。
【結果】n-酪酸に関する肥満のオッズ比 (基準：≤100.4μmol/L) は，100.5-135.1μmol/Lで0.59 (95%信頼区間，0.36-0.98)，135.2-216.3μmol/Lで0.86 (0.51-1.46)，216.4-364.4μmol/Lで0.71 (0.42-1.19) であった (調整：性，年齢，エネルギー摂取量)。一方，カプロン酸に関するオッズ比は0.95～1.15であった (p>0.05)。
【考察】血中n-酪酸の低値の者では肥満が多い傾向がみられ，動物実験のエビデンスを支持しうるものであった。

P-20

薬剤性嗅覚障害モデルマウスにおけるメタボローム解析を用いた生体内代謝変動について

友野 卓哉[1]，亀山 大樹[1]，山本 卓志[2]，藤分 秀司[2]，角田 伸人[1]，中邨 智之[3]，池川 雅哉[1]

[1]同志社大学 生命医科学研究科，[2]島津製作所，[3]関西医科大学 薬理学講座

Systemic Metabolism in Drug-induced Olfactory Dysfunction

Takuya Tomono[1], Daiki Kameyama[1], Takushi Yamamoto[2], Hideshi Fujiwake[2], Nobuto Kakuda[1], Tomoyuki Nakamura[3], Masaya Ikegawa[1]

[1]Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, [2]Shimadzu Corporation, [3]Department of Pharmacology, Kansai medical university

【目的】嗅覚障害は、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の最も病初期に認められる症状で、病気の伝播機構や発症に先行する理由については未解明である。本研究では、メチマゾール投与による薬剤性の嗅覚障害モデルマウスを作製し、組織レベルでの嗅覚障害の進行と生体内の代謝変動についての相関について考察することを目的とした。

【方法】ICRマウス（雄、4週齢）にメチマゾールを腹腔内投与し、嗅覚障害モデルマウスを作製した。マウス脳を摘出後、新鮮凍結切片を作製し、TUNEL染色、免疫染色、顕微質量分析計（iMScope）によるイメージング質量分析をおこなった。マトリクスには、9-アミノアクリジンを用いた。同時に、本モデルの尾静脈から血液を採取し、GC/MSを用いて35-600 m/zのイオン性代謝物質の網羅的解析をおこなった。内部標準には2-イソプロピルリンゴ酸を添加し、サンプル間の相対定量をおこなった。

【結果と考察】モデルマウス嗅球のTUNEL染色の結果、メチマゾール投与後1～3日にかけてアポトーシスによる細胞死がコントロール群に比べて有意に多く認められた。この組織におけるアポトーシスの進行変化の時間軸に対応して採取した血液を対象にGC/MSを用いてメタボローム解析をおこなった。その結果と、メチマゾールは甲状腺機能に影響を及ぼす薬剤であることから、甲状腺機能変化による代謝変動を介して嗅覚障害の進行に関与している可能性について若干の考察を試みた。

P-21

LC-MS/MSによる糖尿病性腎症患者の尿中コレステリルエステル分析

辻川 諒哉[1]，三浦 佑介[2]，陳 震[1]，高田 康徳[3]，千葉 仁志[2,4]，惠 淑萍[2]

[1]北海道大学医学部 保健学科，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，
[3]愛媛大学大学院医学研究科 糖尿病内科学講座，[4]札幌保健医療大学 栄養学科

Analysis of urinary cholesteryl esters in diabetic nephropathy patients by LC-MS/MS

Ryoya Tsujikawa[1], Yusuke Miura[2], Zhen Chen[2],Yasunori Takata[3], Hitoshi Chiba[2,4], Shu-Ping Hui[2]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Graduate School of Health Sciences, Hokkaido University,
[3]Department of Diabetes and Molecular Genetics, Ehime University Graduate School of Medicine,
[4]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

【目的】日本における透析原因の第一位は糖尿病性腎症であり、糖尿病患者の増加が問題となっている。糖尿病性腎症は末期まで症状が無く、尿検査による早期発見が重要となっている一方で、バイオマーカーの確立はできていない。近年、糖尿病性腎症において近位尿細管細胞への脂肪蓄積が報告されるなど、腎と脂質の関連性が注目されている。尿中コレステリルエステルを質量分析法で分析することで、新たなバイオマーカーの探索を行う。
【方法】尿検体は愛媛大学医学部附属病院の糖尿病外来患者から集めた。日本糖尿病学会ガイドラインによって分類された糖尿病性腎症の各ステージ（I～IV期）18名ずつ合計72名を対象とした。尿中のコレステリルエステル（CE）をヘキサンで抽出し、LC-MS/MSで定量した。測定するCE分子種はCE16:0, CE18:0, CE18:1, CE18:2, CE18:3, CE20:4, CE20:5, CE22:6の8種類とした。内標準物質には、それぞれの分子種の重水素標識体を用いた。
【結果・考察】糖尿病性腎症の尿中にCEを検出することができた。今後は、各ステージにおけるCEの濃度や分子種ごとの比率について検討する。また、臨床データとの比較を行う予定である。発表では最新の進捗状況について報告する。

P-22

胸水から非チフス性*Salmonella*属菌を検出した1例

永田 悠起，加藤 雄大，杉山 裕衣，塩谷 厚代，長坂 日登美，中根 生弥
JA愛知厚生連 豊田厚生病院 臨床検査技術科

A case of detecting non typhoid *Salmonella* from pleural effusion

Yuki Nagata, Yuta Kato, Yui Sugiyama, Atsuyo Sioya, Hitomi Nagasaka, Ikuya Nakane
Department of Clinical Laboratory, Toyota Kosei Hospital

【はじめに】非チフス性*Salmonella*属（以下*Salmonella*属）は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、呼吸器感染症の原因菌として検出される事は非常に稀である。今回我々は、胸水から*Salmonella*属菌を検出した1例を経験したので報告する。
【症例】7X歳・男性。倦怠感を主訴に当院を受診した。生活歴として多量の飲酒がある。胸部X線で大量の胸水貯留が疑われた為に、精査加療目的で入院となった。
【来院時検査所見】血液検査はCRP:29.62mg/dl、白血球:4000/μl、PCT:2.15ng/dl、LD:299U/Lであった。胸水検査は外観:茶褐色混濁、LD:3518U/Lであった。
【微生物検査所見】胸水・喀痰・尿・血液培養2セットが提出された。胸水のグラム染色にてグラム陰性桿菌を認め、パニック値として担当医へ連絡をした。35°Cにて1晩培養後にBTB寒天培地に緑色のコロニーを認めた。WalkAway96SI（ベックマン・コールター社）にて第3病日目に*Salmonella*属と同定された。なお本菌は*Salmonella*免疫血清O7群に凝集を認めた。血液培養は約42時間培養後陽性（1/2セット）となり、第4病日目に*Salmonella*属と確定された。喀痰・尿培養からは有意な菌は検出されなかった。胸水から*Salmonella*属が検出された事をうけ便培養が実施され、同じく*Salmonella*属菌が検出された。後日MALDIバイオタイパー（ブルカー・ダルトニクス社）を用いて再度同定を行いScore Value2.33で*Salmonella*属と同定された。
【経過】ABPC/SBTにて治療を開始し、第4病日目にCTRXに変更された。第15病日目に胸腔鏡下膿胸膜掻爬術が施され、第41病日目に軽快退院された。
【考察】今回 *Salmonella* 属菌による胸膜炎を経験した。一般に急性胃腸炎の原因菌として検出される*Salmonella*属であるが、基礎疾患を有する患者や、感染防御機能の低下している患者では腸管外感染症を起こす事があると言われている。今回の患者も多量の飲酒などが感染防御能の低下につながっていた可能性が考えられる。また、今回胸水で認められた*Salmonella*属の推定および同定に2日を要した。検出が稀な菌に対しては早期での菌名推定は困難な場合が多い。この様な症例に対し質量分析装置で同定を行い、迅速に臨床へ菌名報告する事は非常に有益であると考える。

P-23

MALDI-TOF MSを用いた非定型抗酸菌の同定

馬庭 恭平，森山 英彦，竹内 志津枝，川島 史祥，三島 清司，長井 篤
島根大学医学部附属病院 検査部

Identification of Atypical mycobacteria by Matrix-assisted laser desorption/ ionization- time of flight mass spectrometry

Kyohei Maniwa, Hidehiko Moriyama, Shizue Takeuchi, Fumiaki Kawashima, Seiji Mishima, Atsushi Nagai
Clinical Labotatory Division, Shimane University Hospital

【目的】近年、微生物検査の菌同定はMALDI-TOF-MSが利用されるようになり、平成30年度診療報酬改定でも質量分析装置加算40点が新設されるなど、臨床の場で重要なものとなっている。MALDI-TOF-MSを用いた菌同定は多様な菌種を同定することができ、一般細菌だけでなく抗酸菌も同定可能となった。そこで今回MALDI-TOF-MSを用いた非定型抗酸菌の同定検査を検討したので報告する。
【方法】当院に提出されPCRで*Mycobacterium avium*（*M.avium*）、*Mycobacterium intracellulare*（*M. intracellulare*）と同定された菌株各10株、またPCRで同定できなかった抗酸菌10株を無作為に抽出した。検討方法は小川培地からの同定と抗酸菌用液体培地（MGIT培地）からの同定とした。小川培地からの同定は各菌株を培養後、VITEK MS 抗酸菌/ノカルジア前処理キット（ビオメリュー・ジャパン）を用い、標準プロトコールに準じて行った。抗酸菌用液体培地（MGIT培地）からの同定は各菌株をMGIT培地で培養後、陽性となった日から2日間ふ卵器で培養し、同様の前処理キットを用いて同定を行った。MALDI-TOF-MSはVITEK MS（ビオメリュー・ジャパン）を使用し、各菌種の同定解析は臨床用のデータベースであるVITEK MS v3.0 KBを用いて行った。
【結果】小川培地から同定は*M.avium*は10株全て*M.intracellulare*は10株中9株で同定可能であった。PCRで同定できなかった抗酸菌10株は8株が同定可能であった。MGIT培地からの同定は*M.avium*は10株中9株、*M.intracellulare*も10株中9株で同定可能であった。PCRで同定できなかった抗酸菌は10株中7株が同定可能であった。
【考察】MALDI-TOF-MSを用いた抗酸菌の同定は前処理が60分程度、測定が10分とPCRと比べ迅速に同定が可能であるため検査室における有用は高いと考える。今回の検討でMALDI-TOF-MSで同定できなかった原因としてコンタミネーションや、菌量の影響が考えられる。また液体培地であるMGIT培地から培養を行うことなく直接同定も可能であったが、小川からの同定と比べると同定精度は低いため今後検討が必要だと考える。

P-24

リファレンスライブラリ拡充によるMALDIバイオタイパーを用いた同定性能向上に関する検討－*Klebsiella oxytoca*

上田 安希子[1]，上田 修[2]，砂田 淳子[1]，満井 友美[1]，木村 圭吾[1]，伊奈野 尚之[1]，吉田 彩夏[1]，米田 菜乃香[1]，大楠 清文[3]，西 功[1]，日高 洋[4]

[1]大阪大学医学部附属病院 医療技術部，[2]ベックマン・コールター株式会社，[3]東京医科大学 微生物学講座，[4]大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

Improvement of identification of *Klebsiella oxytoca* by MALDI Biotyper with the library expansion.

Akiko Ueda[1], Osamu Ueda[2], Atsuko Sunada[1], Tomomi Mitsui[1], Keigo Kimura[1], Naoyuki Inano[1], Ayaka Yoshida[1], Nanoka Yoneda[1], Kiyohumi Ohkusu[3], Isao Nishi[1] ,Hiroshi Hidaka[2]

[1]Department of Medical Technology, Osaka University Hospital, [2]Beckman Coulter K.K.,
[3]Department of Microbiology, Tokyo Medical University,
[4]Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital

【目的】MALDIバイオタイパーはMALDI-TOF MS型質量分析器を用いた微生物同定システムである。微生物から取得したマススペクトルとリファレンスライブラリとのパターンマッチングにより菌種名が得られるが、遺伝子学的に近縁関係にある菌種間ではマススペクトルのパターンが極めて類似しているため、その判別は困難とされている。そこで本研究では、腸内細菌科細菌の一種である*Klebsiella oxytoca*のMALDIバイオタイパーを用いた同定において、ライブラリ拡充による同定性能向上、特に遺伝学的近縁種である*Raoultella ornithinolytica*との判別に関する検討を実施した。

【方法】*K. oxytoca*臨床分離株13株を用い、メーカー推奨の方法にてライブラリ（以下、新ライブラリ）を作成した。検討①：新ライブラリ作成株とは重複しない*K. oxytoca*臨床分離株41株を対象に、MALDIバイオタイパーリファレンスライブラリv7.0.0.0（以下、既存ライブラリ）単独で測定した場合と既存ライブラリ＋新ライブラリで測定した場合のConsistency Categoriesを比較した。検討②：当院感染微生物検査室にて2018年4月1日～23日の23日間に、ルーチン検査で実施した全1,157回のMALDIバイオタイパーによる測定において、既存ライブラリ＋新ライブラリを用いた場合の新ライブラリ登録MSPの出現測定数および傾向について解析した。

【結果】検討①：3重測定の結果、新ライブラリ追加により上位10位ランキングリストに*R. ornithinolytica*が出現しない測定が増加し、Consistency Categories “A” は平均約87%上昇した。検討②：全測定数1157回（内、*K. oxytoca*の16回、*R. ornithinolytica*の6回、not reliable identification37回含む）中、新ライブラリ出現回数は17回であり、その内訳は*K. oxytoca* 16回、*R. ornithinolytica* 0回、その他1回（4位、5位、9位にそれぞれスコア値1.287、1.259、1.23で出現）であった。

【考察】MALDIバイオタイパーにおける*K. oxytoca*の同定性能は、特に*R. ornithinolytica*との判別に影響を受けていたが、ライブラリ拡充により他菌種の測定に影響を及ぼすことなく、多くの*K. oxytoca*株でその判別が容易となった。今後も、*K. oxytoca*に限らず、日常業務から得た情報を活用し、更なるMALDIバイオタイパーの同定性能向上を図ることにより、日常業務へフィードバックしていきたい。

P-25

MBT Compassに搭載された*Bacteroides fragilis cfiA*サブタイピングの有用性

鈴木 健之，上村 桂一，小柳 紀人，後藤 宏次
中東遠総合医療センター 臨床検査室

Evaluation of *Bacteroides fragilis cfiA* subtyping on MBT Compass

Kenji Suzuki, Keiichi Uemura, Norihito Koyanagi, Koji Goto
Department of Laboratory Medicine, Chutoen General Medical Center

【目的】当院では2013年5月から使用してきたBRUKER社のMALDIバイオタイパーを2017年12月よりMBT Compassに更新した。従来、*Bacteroides fragilis*の薬剤感受性検査の報告は菌種同定後3日を要していたが、MBT Compassに搭載されたサブタイピングモジュールは*B. fragilis*の*cfiA*がコードするカルバペネマーゼを菌種同定と共に検出する。今回、*B. fragilis*の質量分析結果とMEPMのMICを比較した。
【方法】2013年5月から2018年4月までの5年間に臨床から分離された*B. fragilis* 229株のうち凍結保存されていた65株を対象とした。保存菌株をMBT Compassにて再度同定検査を行った。また薬剤感受性検査は栄研ドライプレートを用いCLSI M100-S27に準拠し行った。
【結果】MEPMのMIC値が≧16μg/mLの1株と8μg/mLを示した4株、合わせて5株は質量分析で*cfiA*陽性と判定された。MEPMのMIC値が≦4μg/mLの60株は*cfiA*陰性だった。
【考察】MEPMのMIC値が≧8μg/mLを示した株はすべて質量分析で*cfiA*陽性と判定された。今回、PCRの確認ができていないが、質量分析の結果は*cfiA*遺伝子との相関があることが推定された。MBT Compassのサブタイピングモジュールは抗菌薬選択に有用な情報となりうる。

P-26

メタボローム解析で発見したガラクトース血症I型の1例

万 婷婷[1]，張 春花[2]，金 明姫[3]，阮 宗海[1]，唐 剣慈[1]，王 旭陽[2]
[1]ミルスインターナショナル 検査・データ解析部，[2]ミルスインターナショナル 研究開発部

A case of galactosemia type I discovered using metabolomics

Tingting Wan[1], Chunhua Zhang[2], Mingji Jin[1], Zonghai Ruan[1], Jianci Tang[1], Xuyang Wang[2]
[1]Department of examination and data analysis of MILS International,
[2]Department of research & development of MILS International

【目的】ガラクトース血症はガラクトース代謝経路の先天的な欠損または活性低下により、ガラクトースの蓄積が生じる疾患で、ガラクトース -1-リン酸ウリジルトラスフェーゼ欠損症はI型 、ガラクトキナーゼ欠損症はII型、UDPガラクトース -4-エピメラーゼ欠損症はIII型に分類されている。日本では、新生児マススクリーニングで早期発見につながるが、中国では本疾患の新生児マススクリーニングを実施していない。早期発見と早期診断は難しい。今回、質量分析より尿中代謝産物と血中アシルカルニチンとアミノ酸分析を合わせ、中国人ガラクトース血症症例1名を診断したので報告する。
【方法】症例情報：生後8日、黄疸、肝機能障害、血小板減少、出血傾向、電解質異常などで代謝異常症を疑い、生後13日、当施設に尿と血液濾紙を送ってきた。尿代謝プロファイル解析と血中アシルカルニチンとアミノ酸分析を既報GCMSとLCMSMSより分析をおこなった。解析結果を基づき、低乳糖ミルクに切替え、生後5か月時の再検査並びに遺伝子検査をすすめた。
【結果】初回目の尿代謝プロファイルには、ガラクトース、ガラクチトールおよびガラクトン酸の尿中排泄が著明に増加と伴い，4-ヒドロキシフェニル乳酸および4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の増加も認めた。血中遊離カルニチンの低下はあったが、血中アミノ酸には特に異常がなかった。5ヶ月再検時，尿と血液中初回の異常はすべて正常範囲でした。遺伝子解析でGALT遺伝子およびVWF遺伝子変異を認めされたが、臨床経過からガラクトース血症I型と確定診断した。
【考察】尿中ガラクトース上昇する疾患は、ガラクトース血症、チロシン血症、シトリン欠損症にも共通な代謝プロフィルを示されるが、血中アミノ酸分析を加えて、チロシン血症とシトリン欠損症の鑑別診断が容易にでき、ガラクトース血症の診断に至る。ガラクトース血症の確定診断には、酵素活性や遺伝子解析の結果が決め手ですが、今回のメタボローム解析よりガラクトース血症の早期診断および早期治療に繋がった。最終的な遺伝子解析結果の遺伝子変異の病理的な確認にも貢献できた。

P-27

タンデムマス（TMS）スクリーニング対象疾患のアジア諸国における頻度の多様性：GC/MSとTMSによる代謝異常スクリーニング

山口 清次[1]，柴田 直昭[1]，長谷 川有紀[1]，山田 健治[1]，小林 弘典[1]，重松 陽介[2]，竹谷 健[1]

[1]島根大学 小児科，[2]福井大学 小児科

Diversity in incidence of metabolic disease in Asian countries: symptomatic screening using GC/MS and tandem mass spectrometry

Seiji Yamaguchi[1], Naoaki Shibata[1], Yuki Hasegawa[1], Kenji Yamada[1], Hironori Kobayashi[1], Yosuke Shigematsu[2], Takeshi Taketani[1]

[1]Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine,
[2]Department of Pediatrics, Fukui University Faculty of Medicine

【目的】タンデムマス法を導入した新生児マススクリーニング（TMS-Scr）がアジア諸国でも年々関心が高まっている。TMS-Scr導入前にGC/MSやTMSを用いたハイリスクスクリーニング（HR-Scr）を行って、その国の疾患頻度、重症度等を評価することが望ましい。我々はアジア諸国との共同研究でHR-Scrを行ってきたので、その結果を検討した。

【方法】検体はとして、乾燥尿ろ紙（GC/MSによる有機酸分析）、乾燥血液ろ紙（TMSによるアシルカルニチンAC、アミノ酸AA分析）を用いた。対象は、2000～2015年にアジア諸国から依頼された発症後の検体である。発見された疾患を国ごとに比較検討した。

【結果】HR-Scrの検体数は、日本とアジア諸国全体で39,270であった（日本30,625例；アジア8,645例）。HR-Scrにおける疾患発見頻度は、日本1.2%；中国8.6%；ベトナム9.2%；インド13.9%）などであった。発見された疾患は、日本では,メチルマロン酸血症（MMA）、グルタル酸血症II型、プロピオン酸血症（PPA）などが多かった。中国では、MMAが突出して多く、ついで尿素回路異常症（UCD）などが多かった。ベトナムではメープルシロップ尿症（MSUD）、およびβケトチオラーゼ欠損症（BKTD）が多かった。インドでは、MMA、UCD、MSUD、PKUなどが多かった。

【考察】国ごとの特徴として、日本で多かったPPAは日本人特有のコモン変異の存在に起因していると思われる。中国でMMAが多かった理由として主に東北地方に多いコモン変異を持つCblC異常によるMMAが多いと考えられる。ベトナム人にBKTDが多かった理由として固有のコモン変異の存在が考えられる。MSUDは日本では極めて稀であるが、ベトナムやインドなど南アジアでは比較的多いことが分かった。今後TMS-Scrの普及、共同研究によって、疾患頻度の違いが遺伝背景とともに明らかにされるであろう。

P-28

先天性代謝異常の化学診断は最短・最小コストで提供する必要がある

久原 とみ子，大瀬 守眞
日本疾患メタボローム解析研究所

Chemical diagnosis for congenital metabolic disorders needs to be provided at the shortest and minimum cost

Tomiko Kuhara, Morimasa Ohse
Japan Clinical Metabolomics Institute

先天性代謝異常症の検査では、どのクラスの代謝物を調べるとよいかわからない場合が多い。仮に有機酸血症が疑われれば尿有機酸分析を優先する。一方、尿酸値異常なら有機酸分析、アミノ酸分析、狭義のタンデムマスでなく、ヒポキサンチンやキサンチン等のプリン体分析が優先されるべきである。高精度プリン体を含む検査が小児科医に周知されないと小児期に見逃され､腎移植も無効な悲惨な状態となる一方、保険申請もされない。また、1生月内のシトリン欠損症 (CD) では糖、アミノ酸、有機酸などを一斉評価するGC/MS-based urine metabolomicsは文献的に新規性がないと主張する人もいるが、一斉に測ることで迅速・高精度に診断支援でき、採血も不要、入院させ多種の検査をする必要もない。保険大国日本において患者や国民が負担するコストへの意識が低いと、GC/MS-based urine metabolomicsの現代的意味も理解されない。

測定から判断までを含む代謝物レベルの診断 (化学診断) は高度な学際的知識が必要で、同じ装置、同じ手法でも施設ごとに検査の精度は異なる。有機酸分析の検査施設が外部認証を得ることの必要性を国際的な専門学会が痛感し、ERNDIMのような優れた国際認証機関が誕生し活動している。わが国の有機酸分析施設もウレアーゼ処理法を採用している施設も当分野の国際常識に従い、“定性的有機酸分析” の国際認証を毎年受ける必要があると考える。

代謝異常検査の品質に関し科学的な議論がなされない現状ではプロピオン酸血症のように1回の代謝物検査で確定する疾患も全て遺伝子解析が必須となり、やがて、遺伝子解析から始めるという流れを加速させ、患者や国民の負担が増大する。診断の目的は治療で、化学診断は最短・最小コストで提供するのでなければ、研究会発足から医療に貢献してきた本学会の柱の一つが形骸化するのではと危惧される。

P-29

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ2はアンモニアからグルタミン酸を合成し細胞増殖を助ける

入野 康宏[1]，竹内 由紀子[2]，中山 泰宗[3]，福崎 英一郎[3]

[1]神戸大学大学院医学研究科 立証検査医学分野，[2]神戸大学大学院医学研究科 質量分析総合センター，
[3]大阪大学大学院工学研究科 先端工学専攻

Glutamate dehydrogenase 2 produces glutamate from ammonia to support cell proliferation in cancer cells

Yasuhiro Irino[1], Yukiko Takeuchi[2], Yasumune Nakayama[3], Eiichiro Fukusaki[3]

[1]Evidence-based Laboratory Medicine, Graduate School of Medicine, Kobe University,
[2]The Integrated Center for Mass Spectrometry, Graduate School of Medicine, Kobe University,
[3]Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

【目的】がん細胞が炭素源または窒素源として大量のグルタミンを消費することは、グルタミノリシスとして知られている。しかし、培地中のグルタミンがおおむね枯渇した後も、継続して増殖する様子が観察される。一方で、培地中のグルタミンを除去すると、がん細胞の増殖は著しく抑えられることから、増殖中の細胞はグルタミンに依存しない代謝経路を使い増殖していることを示唆される。しかし、がん細胞が栄養飢餓下にどのように応答して生存しているかについてはいまだ不明な点が多い。
【方法】がん細胞をグルタミン飢餓状態で培養したときの影響を調べた。代謝物変化はガスクロマトグラフ-質量分析計を用いて分析した。
【結果】がん細胞がアンモニアを利用してα-ケトグルタル酸を基質としてグルタミン酸を合成し、部分的にではあるがグルタミン飢餓下における細胞増殖を維持していた。グルタミン酸デヒドロゲナーゼをノックダウンするとアンモニアによるグルタミン酸合成と細胞増殖は抑制された。さらに、アンモニアを増殖の維持に利用するがん細胞は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ2 (GDH2) を発現しており、GDH2はアンモニアからグルタミン酸を合成することで、がん細胞の増殖を助けていることが分かった。
【考察】本発見は、栄養 (グルタミン) 飢餓下においてがん細胞がどのように生存するかについて新たな考察を加え、がん細胞の増殖のメカニズム解明に寄与するものであると考えられる。

P-30

HILIC-MS/MSによるラット脳脊髄液中オキシトシンの高感度分析法

塚田 愛[1]，池本 英志[1]，砂川 正隆[1]，李 暁鵬[2]，熊澤 武志[2,3]，松山 高明[2]

[1]昭和大学医学部 生理学講座 生体制御学部門，[2]昭和大学医学部 法医学講座，[3]聖隷クリストファー大学 看護学部

High sensitive analysis of oxytocin in rat cerebrospinal fluids by HILIC-MS/MS

Mana Tsukada[1], Hideshi Ikemoto[1], Masataka Sunagawa[1], Xiao-Pen Lee[2], Takeshi Kumazawa[2,3], Takaaki Matsuyama[2]

[1]Deptment of Physiology, Showa University School of Medicine,
[2]Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine,
[3]Seirei Christopher University School of Nursing

【目的】オキシトシンは、視床下部の室傍核と視索上核の神経分泌細胞で合成される神経ペプチドであり、9個のアミノ酸からなる (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly)。臨床においては自閉症スペクトラム、アレルギーなどのバイオマーカーとしても注目され、オキシトシンは高感度分析が要求されている。本研究では、モノリス型 SPE スピンチップによる微量抽出と順相カラムを用いた超高速液体クロマトグラフィー (UFLC) –タンデム質量分析 (MS/MS) によるラット脳脊髄液 (CSF) 中オキシトシンの迅速かつ高感度な分析条件を設定したので報告する。

【方法】本分析システムにはProminenceカラムスイッチングUFLC装置 (島津製作所) およびトリプル四重極とリニアイオントラップ機能を搭載したAPI4000 Q Trap MS装置 (PE SCIEX) を用いた。動物実験では、7週齢Wistar系ラットを一週間馴化させ、①Control群、②拘束ストレスモデル (Stress) 群、③漢方薬・加味帰脾湯を前投与した拘束ストレスモデル (KKT+Stress) 群に分類し、90分間の拘束ストレス負荷中およびその前後30分間のCSFを分析試料とした。得られたCSFはモノリス型SPEスピンチップによる固相抽出を行った後、その上清20 μLをHILIC-MS/MS分析システムにアプライした。分離カラムにはImtakt社製の順相カラムUK-Amino (長さ50 mm、内径3 mm、粒径3 μm) を使用し、移動相は0.1%ギ酸含有アセトニトリルをベースにした0.1%ギ酸水溶液のリニアグラジエントを用いた。

【結果】ラットCSFはモノリス型SPEスピンチップによって3分以内に固相抽出操作が完了した。また、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いたSRM測定により、オキシトシンは2分以内に感度よく検出された。ラットCSF中オキシトシン濃度は①Control群が1.20-1.98 ng/mL、②Stress群が1.06-2.37 ng/mLおよび③KKT+Stress群が0.91-1.44 ng/mLであった。

【考察】従来、生体試料中オキシトシンの分析にはELISA法が用いられてきたが、その低選択性または低感度などが問題となっている。しかし、本法は、遠心操作による簡便かつ迅速なモノリス型スピンチップによる微量固相抽出後、上清をそのままHILIC-MS-MSシステムダイレクトに注入するだけの簡便かつ高感度な分析法であり、微量な実サンプルを用いた高感度分析ができることが明らかとなった。今後、本法は他のバイオマーカーへの応用も期待され、臨床領域において有用であることが示唆された。

P-31

エンドカンナビノイド2-AGによるドーパミンシグナリングの抑制

越智 拓，平田 ゆかり，浜島 誠，磯部 一郎
藤田保健衛生大学 医学部

Suppression of dopamine signaling by endocannabinoid 2-AG

Hiroshi Ochi, Yukari Hirata, Makoto Hamajima, Ichiro Isobe
Department of Legal Medicine, Fujita Health University School of Medicine

【目的】エンドカンナビノイドシステム (ECS) は、生体内に広く存在し、様々な生理機能に関与することが知られている。その中でも我々は、脳内報酬系との関わりに着目した研究を行なっており、これまでに高濃度のドーパミン (DA) に長期間曝露されることで、培養ラットグリオーマ細胞におけるエンドカンナビノイド産生能が亢進することを報告してきた。同様の変化は、グルタミン酸やγ-アミノ酪酸への曝露では認められなかったことから、DAシグナリングとECSとの間には密接な関係性が存在するものと推測される。そこで本研究では、DA神経モデル細胞としてPC12細胞を用い、これらの細胞におけるDA動態に対するエンドカンナビノイドの影響について検討した。
【方法・結果】PC12細胞は神経成長因子 (NGF) への曝露により、神経様突起を伸長させ神経細胞様に分化することが知られている。そのため、分化に伴いエンドカンナビノイドに対する感受性も変化している可能性が考えられるため、PC12細胞をNGFにて一定期間処理した分化群 (NGF(+)-PC12) と、NGF未処理の未分化群とを作成し、それぞれの細胞におけるカンナビノイド受容体 (CB1、CB2) の発現状況について確認した。CB1についてはNGF(+)-PC12において有意な発現上昇を認めたのに対し、CB2については分化に伴う顕著な発現変化を認めなかった。NGF(+)-PC12をDA産生細胞として用い、DA分泌に対するエンドカンナビノイド (2-AG) の影響について検討した結果、ヘキサナールによるDA分泌の誘導は、2-AG処理によって有意に抑制された。また、2-AGによるDA分泌抑制機構への細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化の関与について検討した結果、ヘキサナールによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇は、2-AG処理により抑制された。
【考察】一般的に、シナプス終末におけるDA分泌は、$[Ca^{2+}]_i$の上昇に依存して惹起される。また、カンナビノイド受容体はGタンパク質共役型受容体であり、$G_{i/o}$タンパクが共役しているため、これらの受容体の活性化によって$[Ca^{2+}]_i$の上昇が抑制される。従って、2-AGによるDA分泌抑制は、これらの作用により生じたものと思われる。これまでの検討で認められた結果が生体内で再現すると仮定すると、様々な原因によりDAシグナリングが亢進することで、シナプス近傍に存在するグリア細胞の2-AG産生が高まり、産生された2-AGがDA神経に作用することでDAシグナリングが抑制されるものと思われる。従って、グリア細胞由来の2-AGを介したDAシグナル抑制機構の存在が示唆される。

P-32

次亜塩素酸により塩素化された生体膜ホスファチジルコリンのLC-QTOF/MSを用いた分析

星岡 佑美[1]，安部 寛子[1]，矢島 大介[1,2]，槇野 陽介[1,3]，山口 るつ子[1]，齋藤 久子[1]，岩瀬 博太郎[1,3]

[1]千葉大学大学院 医学研究院，[2]国際医療福祉大学 医学部，[3]東京大学大学院 医学系研究科

Liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis of biomembrane phosphatidylcholine chlorinated by hypochlorous acid

Yumi Hoshioka[1], Hiroko Abe[1], Daisuke Yajima[1,2], Yohsuke Makino[1,3], Rutusko Yamaguchi[1], Hisako Saitoh[1], Hirotaro Iwase[1,3]

[1]Graduate School of Medicine, Chiba University, [2]School of Medicine, International University of Health and Welfare, [3]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

【目的】好中球は細菌などの異物処理に重要な役割を果たしている。好中球が異物を貪食すると、好中球内顆粒のミエロペルオキシダーゼ (MPO) によって次亜塩素酸 (HOCl) が産生され、HOClは抗菌活性を示す。ヒト細胞膜リン脂質の中で最も多いホスファチジルコリン (PC) とHOClが反応すると、PCの脂肪酸基の二重結合部にHOClが作用して塩素化されることが知られている。今回、好中球による異物処理における脂質酸化の実態解明を目的に、細菌感染などによる炎症をターゲットとして死後サンプル中の塩素化PCを分析した。

【方法】まず、試薬のPCと次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) の反応で作られたPC反応産物を分析し、主要なPC反応産物を見出した。次いで解剖事例から得られたヒト心筋組織をNaOClと反応させ、反応液から抽出した脂質を分析した。更に、生体内で好中球による細菌貪食後に産生されたと考えられる膿瘍を解剖事例から採取し、そこから抽出された脂質を分析した。脂質分析には液体クロマトグラフ—飛行時間型質量分析計 (LC-QTOF/MS) を用いた。

【結果】試薬のPCとNaOClの反応において、PC+OHCl (クロロヒドリン)、PC+Cl-H (塩素置換)、PC+O (+ヒドロキシル基またはエポキシ基)、PC+2O (+ヒドロペルオキシル基)、リゾPCなど様々な産物が検出された。心筋とNaOClの反応においては、試薬のPCとNaOClの反応で見られたPC反応産物と同様の産物が検出された。一部の膿瘍サンプルでは、酸化PCは検出されたが、塩素化PCは検出されなかった。

【考察】生体膜PCも試薬のPCと同様に塩素化や酸化がなされることを示した。これらの産物が解剖事例の組織から検出された場合、これらがMPOによるHOCl産生のバイオマーカーとなる可能性がある。今後より多くの膿瘍や炎症組織等の更なる検討が必要である。

P-33

腎不全マウスの腸内細菌叢と腸内腐敗物の変化とAST-120による影響

佐藤 恵美子[1]，細見 晃司[2]，三枝 大輔[3]，堰本 晃代[1]，國澤 純[2]，丹羽 利充[4]，佐藤博[1]，高橋 信行[1]
[1]東北大学院 薬学研究科，[2]医薬基盤・健康・栄養研究所，[3]東北メディカル・メガバンク機構，[4]修文大学

Impact of the oral adsorbent AST-120 on gut microbiota and products of intestinal putrefaction in renal failure mouse

Emiko Sato[1], Koji Hosomi[2], Daisuke Saigusa[3], Akito Sekimoto[1], Jun Kunisawa[2], Toshimitsu Niwa[4], Hiroshi Sato[1], Nobuyuki Takahashi[1]
[1]Division of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
[2]1 Laboratory of Vaccine Materials and Laboratory of Gut Environmental System, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition,
[3]Department of Integrative Genomics, Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University,
[4]Shubun University

【目的】腎不全では、腎機能の低下により尿毒素が血中に蓄積する。我々はこれまでにLC-MS/MSおよびイメージングMSで、血中に蓄積した尿毒素が全身臓器に取り込まれ蓄積し、経口吸着炭AST120により組織内尿毒素蓄積が軽減することを明らかにした。しかしながら、インドキシル硫酸 (IS) とp-クレシル硫酸 (pCS) のAST-120への吸着は同等であるにも関わらず、AST-120による尿毒素の減少効果が、ISよりもpCSで大きかった。そこで本研究では、ISとpCSの産生に関わる腸内細菌叢および便中ISとPCSの前駆体を調べ、AST-120の腸内細菌への影響を検討した。
【方法】腎不全マウスとしてアデニン誘発腎不全マウスを用いた。またAST-120による影響を評価するため、腎不全マウスに8%AST-120を4週間与えた。これらのマウスの便を用いて、メタゲノム解析により腸内細菌叢を評価した。さらに便中腐敗物の測定をGC-MSで測定した ((株)テクノスルガ・ラボ)。
【結果】腎不全マウスやAST-120投与で腸内細菌叢が変化していた。また腎不全マウスにおけるISとpCSの蓄積は、産生菌が増加したのではなく、腎機能低下によること可能性が高いことが示された。AST-120投与でISの前駆物質indoleの産生に関わる菌叢に変化は認められなかったが、pCSの前駆物質p-cresol産生菌が減少していた。便中のindoleはAST-120投与で有意に増加していたが、p-cresolはAST-120投与で便中に検出されなかった。
【考察】ISはindoleがAST-120に吸着し便中に排泄されるため減少するのに対し、pCSはAST-120によりp-cresolの産生に関わる菌叢が変化するため減少することが明らかになった。さらにAST-120は尿毒素産生に関与する菌叢に影響を与えることが示唆された。

P-34

LC-MS/MSを用いたヒトがん細胞株におけるDNAメチル化の包括的定量分析

中川 央充[1]，涌井 昌俊[2]，西銘 千代子[3]，林田 哲[4]，村田 満[2]

[1]慶應義塾大学病院 臨床検査科，[2]慶應義塾大学 医学部，[3]実験動物中央研究所，[4]慶應義塾大学医学部 外科学教室

Quantitative analysis by LC-MS / MS of DNA methylation in human cancer cell lines

Terumichi Nakagawa[1], Masatoshi Wakui[2], Chiyoko Nishime[3], Tetsu Hayashida[4], Mitsuru Murata[2]

[1]Clinical Laboratory, Keio University Hospital, [2]Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine,
[3]Central Institute for Experimental Animals, [4]Department of Surgery, Keio University School of Medicine

【目的】DNAメチル化はエピジェネティクス事象の1つであり、遺伝子発現調節、ゲノム安定性、ゲノム刷り込みや細胞分化に関連し、その異常はがんをはじめとする種々の疾患の発症・進行に関与する。これを観察する方法の一つにLC-MS/MSによるDNAメチル化測定法がある。本研究はLC-MS/MSによるDNAメチル化の定量分析の改良法に期待される有用性を、実際の培養細胞におけるDNAメチル化の検出に用いることで検証した。

【方法】既存の方法における問題点を改良したLC-MS/MSによるDNAメチル化検出法を用いて、Human pancreatic cancer cells (MIA PaCa-2, AsPC-1、BxPC-3) とHuman colorectal cancer cells (HT29、Caco-2、HCT116)、breast cancer cell line (SKBR, MCF7, MDAMB231, MDAMB468, T47D) のDNAメチル化率を検出した。またそれらのうちMCF7, T47Dの2種類の細胞株に対して、それぞれ2種類のDNAメチル化阻害剤 (5-Azacytidine (5, 10, 20μM) または 5-Aza-2'-deoxycytidine (1, 5, 10μM)) 入り培養液による培養の後、培養前後のDNAメチル化率を検出した。

【結果】解析対象とした全てのヒトがん細胞株について、再現性のある良好な結果が得られた。5-Azacytidineまたは5-Aza-2'-deoxycytidineで培養したヒトがん細胞株については、期待された通りに、それぞれのDNAメチル化阻害剤非添加細胞と比較して、有意なDNAメチル化率の低下を示した。

【考察】LC-MS/MSによるDNAメチル化検出の改良法は、複数のヒトがん細胞株についてDNAメチル化の包括的な定量分析を可能とし、DNAメチル化阻害剤添加培養により引き起こされるDNAメチル化減少も検出できた。今後臨床検体による検討の集積を通じて、検査実地への応用を確立する必要がある。

P-35

腸内細菌が生成する脂肪酸代謝物の多次元分離分析

池田 和貴[1,2,3]，梶原 里美[1,2]，有田 誠[1,2,4]

[1]理化学研究所 生命医科学研究センター (IMS) メタボローム研究チーム，
[2]横浜市立大学大学院生命医科学研究科 代謝エピゲノム科学研究室，[3]AMED PRIME，
[4]慶應義塾大学薬学部 代謝生理化学講座

Analysis of fatty acid metabolites from intestinal bacteria by multidimensional separation techniques

Kazutaka Ikeda[1,2,3], Satomi Kajiwara[1,2], Makoto Arita[1,2,4]

[1]Laboratory for Metabolomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS),
[2]Cellular and Molecular Epigenetics Laboratory, Yokohama City University, [3]AMED PRIME,
[4]Division of Physiological Chemistry and Metabolism, Keio University

【目的】腸内細菌と宿主の共生関係から生まれる代謝クロストークの総体を分子レベルで捉えようとするメタボローム研究が注目されている。腸内細菌は二重結合の位置や結合様式が異なる様々な脂肪酸の構造異性体を産生し、その立体構造の違いにより生理活性も異なることから、これらを判別することが重要である。しかしながら、現状のLC-MS分析技術では、これらの構造が類似しているために、それぞれを分離分析するのが困難である。本研究では、この技術的な課題を克服するために、LC-MS分析法にイオンモビリティー分離法を組み合わせた多次元の分離分析技術の構築に取り組んだ。
【方法】LCシステムはACQUITY UPLC (Waters) を適用し、逆相分離カラムとしてBEH C18 (1.7μm, 2.1×50mm (Waters)) を用いた。イオンモビリティーシステムは、Differential Mobility Spectrometry (DMS) 型 (SCIEX) を適用した。MS分析では、QTRAP 6500 (SCIEX) を用いて約40種類の脂肪酸代謝物 (オレイン酸、リノール酸、リノレン酸由来) のMultiple Reaction Monitoring (MRM) 測定を行った。
【結果・考察】水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸の異性体は、LC条件の最適化によってほとんど分離できたが、リノール酸など由来の共役型脂肪酸や非メチレン型脂肪酸の異性体は、LC分離の困難なものが多かった。そこで、これらの脂肪酸ついてイオンモビリティーによる分離を試みた結果、逆噴射窒素ガス (DR) の増加やポジティブイオンクラスター形成させることで分離可能であることが分かった。本研究で構築した多次元の分離分析技術により、従来のLC技術では判別できなかった脂肪酸の構造異性体を識別できるようになり、より詳細に腸内細菌の脂肪酸代謝を捉えることが可能になり、腸内細菌から産生される脂肪酸の機能解明にも繋がることも期待できる。

P-36

LC-MS/MSを用いた淡水由来微生物B-9株の機能に関する研究 －アミノ酸トランスポーターの存在－

金 海燕[1]，小久保 縁[2]，植野 花耶[2]，Andrea R. J. ANAS[2]，辻 清美[3]，原田 健一[1,2]
[1]名城大院総合学術，[2]名城大薬，[3]神奈川衛研

Investigation of the functions of B-9 strain collected from freshwater using LC-MS/MS -A novel amino acid transporter in B-9 strain-

HaiYan Jin[1], Yosuga Kokubo[2], Kaya Ueno[2], Andrea R. J. Anas[2], Kiyomi Tsuji[3], Ken-ichi Harada[1,2]
[1]Grad. Scho. Environ. Hum. Sci., [2]Meijo Univ., Meijo Univ., [3]Kanagawa Pref. Inst. Pub. Health,

【目的】Microcystin分解性細菌B-9株は*Sphingosinicella*に属するグラム陰性菌であり、複数の加水分解酵素 (MlrA、MlrB、MlrC) および新たな加水分解酵素MlrE、ペプチドトランスポーターと考えられるMlrDの存在が確認されている。さらに、最近の研究によりB-9株はペプチドトランスポーターであるMlrDだけではなく、新たなアミノ酸トランスポーター (輸送担体) を含有することが示唆された。今回、このアミノ酸トランスポーターを詳細に検討するため、各種ペプチド類 (ジ～テトラ) の分解・阻害実験および発色団を有するアミノ酸 (Trp, Phe, Tyr) を用いて取り込みの実験 (阻害剤添加) を行った。また、D-アミノ酸 (Trp, Phe, Tyr) の取り込み実験を行い、L/D-アミノ酸の取り込みを比較した。
【方法】B-9株の培養液 (凍結融解) とL-アミノ酸から構成される各種ペプチド、発色団を有するアミノ酸 (Trp, Phe, Tyr) をそれぞれ反応させ、その反応液を一定時間ごとに採取し、HPLCおよびLC/MSにて分析を行った。また、酵素阻害剤であるEDTAやPMSFを添加し、それぞれ分解阻害実験をも併せて行った。
【結果及び考察】発色団を有するTrp、PheおよびTyrは72時間後には完全に消失したが、阻害剤EDTAまたはPMSFの添加によってアミノ酸は消失せず残存することが観察され、アミノ酸トランスポーターの存在が確認された。また、L-アミノ酸に比べ、D-アミノ酸の取り込みが多少遅れることも判明した。以上の結果からペプチド類はB-9株が有している加水分解酵素MlrA、MlrB、MlrCおよびMlrEによってジ/トリペプチドさらにアミノ酸まで分解され、ジ/トリペプチドはペプチドトランスポーターであるMlrDによって、アミノ酸はアミノ酸トランスポーターによって細胞内に取り込まれることが示された。一方、ペプチドトランスポーターはEDTAやPMSF により阻害されないが、アミノ酸トランスポーターは阻害されることも判明した。今後、本アミノ酸トランスポーターに関する遺伝子の探索を行い、ペプチドトランスポーターとともにB-9株のペプチドおよびアミノ酸の取り込み挙動を詳細に検討する予定である。

P-37

HepG2細胞内の単一脂肪滴に関するnanoESI-MS直接脂質分析

趙 瑤瑤[1]，呉 玥[1]，陳 震[1]，高 紫君[1]，張 新荣[2]，千葉 仁志[1,3]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]中国 清華大学 化学系，[3]札幌保健医療大学

Direct lipid analysis of single lipid droplets in HepG2 cells by nanoESI-MS

Yaoyao Zhao[1], Yue Wu[1], Zhen Chen[1], Zijun Gao[1], Xinrong Zhang[2], Hitoshi Chiba[1,3], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Department of Chemistry, Tsinghua University, China, [3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

Aims: Lipid droplets (LDs) has been attracting more attention due to its crucial role in energy reservoir and lipid metabolism. Regulation of lipid storage and mobilization underlies significant human health issues: obesity, diabetes and cardiovascular disease. Actually, recent reports have suggested possible roles for LDs in the development of various common diseases. However, the analytical study on LDs analysis by using mass spectrometry on the level of a single LD is still limited and incomplete. Here, we aim to develop a novel technique for direct analysis of single lipid droplet in mammalian cells by using nanospray mass spectrometry.

Methods: HepG2 cells were incubated with long chain fatty acid (e.g. oleic acid and palmitic acid) to produce LDs. The glass nanospray emitter was used to get only one LD from cells by using multifaceted nanomanipulator and then the nanospray emitter was filled with organic solvent capable of extracting the lipid contents out of LDs and directly detected by nanoESI-MS. Besides, we obtained the structural information of all lipid components by using LC-MS/MS.

Results: LDs were successfully induced by oleic acid and palmitic acid in HepG2 cells. Triglycerides (TGs) and phospholipids are the major components of LDs. Both TGs and phospholipids were detected from only one single lipid droplet in positive-ion mode. By using multifaceted nanomanipulator, it was possible to choose the LDs in the same size. The two different kinds of LDs (induced by oleic acid and palmitic acid) in the same size (8 μm) were analyzed by this method. The structure of all TGs and phospholipids were identified through the MS/MS data.

Discussion: This method has been successfully used for in-situ analysis of LDs in mammalian cells by mass spectrometry and to compare the composition content of two different kinds of LDs at single LD level. This single lipid droplets analytical method has the potential to be widely applied to diverse areas of cell biology and help us to understand the mechanisms of lipid production, packaging into cytosolic LDs, and pathophysiological roles of LDs.

P-38

単一脂質滴のトリグリセリド構成に及ぼす中鎖脂肪酸の影響

趙 瑤瑤[1]，陳 震[1]，呉 玥[1]，高 紫君[1]，張 新荣[2]，千葉 仁志[1,3]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]中国 清華大学 化学系，[3]札幌保健医療大学

Effect of medium-chain fatty acid on triglyceride profile of single lipid droplets

Yaoyao Zhao[1], Zhen Chen[1], Yue Wu[1], Zijun Gao[1], Xinrong Zhang[2], Hitoshi Chiba[1,3], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Department of Chemistry, Tsinghua University, China, [3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

Aims: Diets rich in long-chain fatty acids (LCFAs, 14 or more carbon atoms) promote lipid accumulation and insulin resistance, whereas medium-chain fatty acids (MCFAs) are associated with increased oxidative metabolism and reduced adiposity, with few deleterious effects on insulin action. Lipid droplets (LDs) emerge as an important intracellular organelle relevant for lipid homeostasis and development of metabolic diseases. However, the relationship between MCFAs and the LDs composition has been poorly investigated. This study aims to investigate the effect of medium-chain fatty acid (MCFA) on triglyceride (TG) profile of LDs in HepG2 cells.

Methods: HepG2 cells were cultured with MCFAs (caprylic acid, C8:0 or capric acid, C10:0) or with the mixture of MCFAs and LCFAs (oleic acid, C18:1 or linoleic acid, C18:2). Cell viability was studied with CKK-8 assay. Aspirated LDs from living HepG2 cells were analyzed with nanoESI-MS. The structural information of all lipid components was obtained by using LC-MS/MS.

Results: The LCFAs decreased the cell viability compared with the MCFAs. The LCFAs induced LDs in the cells, but the MCFAs did not, at least, at a microscopic level. Triglycerides containing MCFAs were increased in the LDs induced by the mixture of MCFAs and LCFAs.

Discussion: The present results suggests that MCFAs can be involved in TG synthesis in HepG2 cells in the presence of LCFAs. This finding is different to recent studies, which considered that MCFA undergoes preferential oxidation and behaves more like glucose rather than fat. This research might help us to find a way to manipulate LD metabolism in the human liver using dietary MCFAs.

P-39

マウス腎糸球体内で架橋される組織型トランスグルタミナーゼ基質候補タンパク質の網羅的解析

伊藤 辰将[1,2]，辰川 英樹[2]，山口 央輝[3]，高橋 和男[1]，人見 清隆[2]，湯澤 由紀夫[1]

[1]藤田保健衛生大学医学部 腎内科学，[2]名古屋大学大学院創薬科学研究科 創薬生物科学講座 細胞生化学分野，
[3]藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 医高分子学研究部門

Global Identification of Crosslinked Potential Tissue Transglutaminase Substrates in the Mouse Glomeruli

Yoshimasa Ito[1,2], Hideki Tatsukawa[2], Hisateru Yamaguchi[3], Kazuo Takahashi[1], Kiyotaka Hitomi[2], Yukio Yuzawa[1]

[1]Department of Nephrology, School of Medicine, Fujita Health University,
[2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University,
[3]Division of Biomedical Polymer Science, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University

【目的】トランスグルタミナーゼ (TG) は、特定のタンパク質間のグルタミン残基とリジン残基を架橋する酵素である。このうち組織型TG (TG2) はヒトIgA腎症において糸球体での発現が上昇していることが報告されているものの、その架橋基質は未だ明らかでない。本研究では正常マウスから糸球体を単離し、TG2基質候補タンパク質の同定を試みた。
【方法】雄性6週齢C57BL/6Jマウス腎に磁気ビーズを灌流し、磁石を用いて糸球体画分と非糸球体画分に分けて回収した。これらの画分の組織抽出液とTG2特異的に認識されるグルタミン供与基側の基質ペプチド (pepT26) とを反応させ、リジン供与基側の基質候補タンパク質をpepT26標識した。アフィニティーレジンによる精製を経て、LC-Q-OT-qIT hybrid MSによるタンパク質同定を行った。同様にTG2-遺伝子欠損 (TG2KO) マウスによる検討も行い、Wild type (WT) およびTG2KOのノンラベリング定量により得られた結果について検出量が多いピークを選択し、TG2基質候補タンパク質とした。
【結果】糸球体画分では40個、非糸球体画分では33個のTG2基質候補タンパク質が同定され、両画分で同定された共通のタンパク質はTG2のみであった。同定タンパク質の中にはすでに他臓器においてTG2の基質と報告のあるタンパク質や、糸球体画分において慢性糸球体腎炎進展に関連するタンパク質が含まれていた。
【考察】本研究で同定されたタンパク質の中には既知のTG2基質や腎疾患に関与するものが含まれており、他の同定タンパク質も新規のTG2基質およびTG2を介した腎疾患進展に関与するものである可能性がある。また、糸球体画分と非糸球体画分では全く異なるタンパク質が同定されており、TG2は糸球体と間質で異なる役割をもつ可能性が示唆された。

P-40

LC/Orbitrap-MSを用いた牛卵子中脂質の網羅的解析

呉 玥[1]，植芝 滉己[2]，陳 震[1]，坂口 謙一郎[3]，柳川 洋二郎[3]，片桐 成二[3]，永野 昌志[3]，
千葉 仁志[1,4]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]北海道大学 獣医学部，[3]北海道大学大学院 獣医学研究院，
[4]札幌保健医療大学 栄養学科

Lipidomic profiling in bovine oocytes by LC/Orbitrap-MS

Yue Wu[1], Hiroki Ueshiba[2], Zhen Chen[1], Kenichiro Sakaguchi[3], Yojiro Yanagawa[3], Seiji Katagiri[3], Masashi Nagano[3], Hitoshi Chiba[1,4], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]School of Veterinary Medicine, Hokkaido University,
[3]Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University,
[4]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

【目的】For mammals, delivery and lactation will increase the energy demand and result in the negative energy balance. It is known that the changes of blood lipid composition can affect cumulus-oocyte complex morphology and embryo quality, and different fatty acids show different effects on oocyte developmental competence. However, the relationship between the status of oocyte and oocyte lipid component is unknown. Thus, the aims of the study are to establish the method for lipid profiling in bovine oocytes by LC/Orbitrap-MS, and to investigate the factors that affect lipid component, especially the energy balance-related triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA).

【方法】The oocytes from different follicular sizes (diameter ≤ 4, 4–8, > 8 mm) were investigated. Approximately 5 oocytes were aspirated from ovary and maintained in PBS solution, then the total lipid was extracted by Folch's method. LC/MS analysis was performed in both positive- and negative-ion modes for molecular species identification and semi-quantitation of each lipid class.

【結果】In total, 35 molecular species of TG, 13 species of phosphatidylcholine (PC), 9 phosphatidylethanolamine (PE), 3 phosphatidylinositol (PI), and 6 FFA were identified in bovine oocyte samples. There contents varied along with different lipid class ($P < 0.05$). Although there was no significant difference of TG and FFA intensities in different sizes of follicles, the fatty acyl composition in TG showed longer chain length and higher unsaturation degree in smaller follicles.

【考察】The current method is might be useful in studying lipid changes in oocyte during the period of delivery and lactation, as well as the relationship of bovine oocyte and body energy metabolism.

P-41

LC/HR-MS/MSを用いた肝硬変ラット肝臓中脂質と過酸化脂質の定量分析

陳 震[1]，玉井 康将[2]，江口 暁子[2]，岩佐 元雄[2]，呉 玥[1]，竹井 謙之[2]，千葉 仁志[1,3]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]三重大学 医学系研究科，[3]札幌保健医療大学 栄養学科

Quantitative profiling of lipids and their hydroperoxides in cirrhotic rats by LC/HR-MS/MS

Chen Zhen[1], Yasuyuki Tamai[2], Akiko Eguchi[2], Motoh Iwasa[2], Yue Wu[1], Yoshiyuki Takei[2], Hitoshi Chiba[1,3], Hui Shu-Ping[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University,
[2]Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medicine, Mie University,
[3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

Aim: Lipid peroxidation are considered as key intermediates of oxidative reaction, which plays important roles on pathogenesis of metabolism dysfunction and organ damage, such as cirrhosis of liver. The metabolomic investigation of lipids and their hydroperoxides would be an effective way to clarify the mechanism and development of those pathological changes. In the present work, we are focusing on the profiling changes of lipids and their hydroperoxides in the livers of cirrhotic rats.

Methods: Rats were administrated with carbon tetrachloride for 10 weeks to induce cirrhosis. The rat liver tissue samples were homogenized and then extracted by Folch's method. Orbitrap LC/MS analysis was performed in both positive- and negative-ion modes for molecular species identification and quantitation of each lipid class.

Results: In total, 61 molecular species of triglyceride (TG), 9 species of free fatty acid (FFA), 33 of phosphatidylcholine (PC), 22 of phosphatidylethanolamine (PE), 20 phosphatidylinositol (PI), 16 phosphatidylserine (PS), 22 of cardiolipin (CL) were identified in rat liver samples, as well as 7 lysoPC, 7 lysoPE, 6 lysoPI, and 5 lysoPS. Furthermore, lipid hydroperoxides consisted of 4 TG-OOH and 11 PC-OOH were also found. For the intact lipids, CL species showed decreased tendencies in cirrhotic rats, while for the levels of the hydroperoxides, TG-OOH 52:3, 52:4, and PC-OOH 34:2, 34:3, 36:4, 36:5, 38:5, 38:6 exhibited a significant increasing ($P < 0.01$).

Discussion: The present results suggested that the cirrhotic of liver would cause mitochondrial damage and the accumulation of lipid hydroperoxides, which might contribute to the diagnosis and the monitoring of the treatment.

P-42

脂肪蓄積および酸化ストレス曝露による代謝変化

津久井 隆行[1,2]，郭 先薈[2]，陳 震[2]，惠 淑萍[2]，千葉 仁志[1,2]

[1]札幌保健医療大学 保健医療学部，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院

Metabolic change by lipid accumulation and oxidative stress exposure

Takayuki Tsukui[1,2], Xian-Hui Guo[2], Zhen Chen[2], Shu-Ping Hui[2], Hitoshi Chiba[1,2]

[1]Department of nutrition, Sapporo university of health sciences, [2]Faculty of health science, Hokkaido university

【目的】肝臓は脂質をリポタンパク質として分泌するため、肝臓に対する酸化ストレスの暴露は、肝臓を全身に対する酸化ストレス供給源とする可能性が予想される。また脂肪蓄積に伴い形成される脂肪滴も酸化ストレスに対して何らかの役割を担っている可能性が予想される。そこで、脂肪酸を曝露した肝細胞における脂肪滴の粒子数および脂質過酸化について観察した。続けて酸化剤に曝すことで、肝細胞の代謝変化について観察し、培養液中に放出された過酸化脂質の変動を分析した。

【方法】(実験1) ヒト肝細胞 (HepG2) にオレイン酸 (OA) を負荷して脂肪滴を形成させた。脂肪滴および過酸化脂質の蛍光イメージングを行い、脂肪滴および過酸化脂質陽性の脂肪滴 (以下、酸化型脂肪滴) を定量した。(実験2) HepG2にOAを負荷して脂肪滴を形成させ、さらにフリーラジカル発生剤の2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) を添加して酸化ストレスを負荷した。培養液を毎日新鮮なものに交換し、4日間培養した。炎症関連遺伝子 (RT-PCR)、脂肪滴・過酸化脂質・ミトコンドリア・ミトコンドリア過酸化脂質の蛍光イメージング、培養液中に放出された脂質のLC/MS分析を行った。

【結果】(実験1) OAの負荷により形成された脂肪滴は、小滴性脂肪滴 (粒子面積3 μm^2未満) と大滴性脂肪滴 (3 μm^2以上) のいずれも時間依存的に増大した。また、酸化型脂肪滴は8時間後から検出され、同様に増大した。(実験2) 培養時間に依存して炎症関連因子 (TNF-α、IL-8) および線維化関連因子 (TGF-β) の遺伝子発現に増加が認められた。培養液中に放出された脂質のLC/MS解析では、18:1-コレステリルエステルモノヒドロペルオキシドはAAPH単独および共存下でも増加を認めた。一方、トリオレインモノヒドロペルオキシドはOA群とOA+AAPH群で増加傾向を示し、AAPH群では変化が認められなかった。

【結論】これらの結果は、脂肪蓄積および酸化ストレスに曝された肝臓が酸化ストレスを過酸化脂質として全身臓器に拡散する可能性を支持している。

P-43

老化促進モデルマウスSAMP10の加齢による肝臓中抗酸化酵素の変動ならびに活性酸素代謝関連必須微量金属のICP-MS/MSによる動態解析

齋藤 健[1,2]，山﨑 尚二郎[1]，冨原 朋美[1]，Ketema Rahel Mesfin[1]，木村 豪[1]，
Md. Tajuddin Sikder[2]，蔵崎 正明[3]

[1]北海道大学大学院 保健科学院，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，[3]北海道大学大学院 地球環境科学研究院

Changes in antioxidant enzymes with aging in liver of SAMP 10 and dynamic analysis of essential trace metals related to active oxygen metabolism by ICP-MS/MS

Takeshi Saito[1,2], Shojiro Yamasaki[1], Tomomi Tomiharai[1], Ketema Rahel Mesfin[1], Go Kimura[1], Md. Tajuddin Sikder[2], Masaaki Kurasaki[3]

[1]Graduate school of health science, Hokkaido university, [2]Faculty of health science, Hokkaido university, [3]Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University

【目的】老化促進モデルマウスSAMP10は成長後、老化促進を呈するマウスである。老化促進の原因は過剰な活性酸素発生によるとの報告があるが、その機構は依然として不明である。本研究では、SAMP10の活性酸素代謝酵素、過酸化生成物および活性酸素代謝に密接に関わる必須微量金属に着目し、1. SAMP10の肝臓における抗酸化酵素、酸化DNAおよび必須微量金属の加齢に伴う変動の有無を明らかにすること、2. 1で明らかとなった変動がどのように老化促進へ関与しているかを明らかにすることを目的とした。
【方法】金属測定は、試料を硝酸で分解後ICP-MS/MS (8800 ICP-QQQ) を用いて行った。酵素量の測定はウェスタンブロット法を用いた。8-OHdGの測定はキッドを用いて行った。
【結果】若齢期のSAMP10のMn-SOD, GPxおよびCatalaseの酵素量はコントロール群に比較して有意な高値を示したが、老齢期ではCatalaseが有意な低下を示し、他の酵素量には有意差が認められなかった。SAMP10の肝臓中8-OHdGは、若齢期では有意な変動は認められなかったが、老齢期では有意な高値を示した。
【考察】SAMP10では、若齢期にから活性酸素が多量に発生しているが、代謝酵素が誘導されることで活性酸素による障害が制御されているが、成熟後活性酸素代謝酵素の低下が起こり、過酸化物質が生成され、老化が促進することが強く示唆された。この変動に、代謝酵素制御系の異常とミトコンドリアからの活性酸素の放出が関与していることが示唆された。

P-44

LC-MS/MSを用いたマウスin vivoにおけるtriazolam代謝物の分析

峰岸 元気[1]，香月 康宏[2,3]，押村 光雄[2]，秋田 英万[1]，小林 カオル[1]

[1]千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室，[2]鳥取大学 染色体工学センター，[3]鳥取大学大学院 医学系研究科

Analysis of triazolam metabolites in mice *in vivo* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Genki Minegishi[1], Yasuhiro Kazuki[2,3], Mitsuo Oshimura[2], Hidetaka Akita[1], Kaoru Kobayashi[1]

[1]Grad. Sch. of Pharm. Sci., Chiba Univ., [2]Chrom. Engn. Res. Ctr., Tottori Univ., [3]Grad. Sch. of Med. Sci., Tottori Univ.

【目的】Cytochrome P450 3A (CYP3A) の阻害および誘導による薬物間相互作用は臨床上重要な問題である。この相互作用をマウスを用いて予測する場合、CYP3A基質であるトリアゾラム (TRZ) およびTRZ水酸化体 (HT) の血中濃度がCYP3A活性の指標とされている。しかし、CYP3A欠損 (Cyp3a-KO) マウスにTRZを静脈内投与したところ、TRZおよびHTの血中濃度推移が野生型 (WT) マウスと同様であった。このことより、HTがCYP3A以外の酵素で生成するか、あるいはTRZがCYP3A以外の酵素で代謝される可能性が考えられた。そこで本研究では、マウスにおけるTRZ代謝経路を明らかにするため、HT以外の代謝物を探索した。

【方法】Cyp3a-KOおよびWTマウスにTRZ (2 mg/kg) を静脈内投与し、血漿中TRZ代謝物をLC-MS/MSを用いて検出した。

【結果】Cyp3a-KOおよびWTマウスのいずれの血漿においても、m/z = 519および535のプリカーサーイオンが検出された。m/z = 519および535のプロダクトイオンからは、それぞれTRZおよびHTのプリカーサーイオンと同じ大きさであるm/z = 343および359のイオンが検出された。この結果より、m/z = 519および535のプリカーサーイオンはそれぞれTRZグルクロン酸抱合体およびHTグルクロン酸抱合体由来であると推定した。

【考察】マウス*in vivo*において、TRZおよびHTからグルクロン酸抱合体が生成することが示された。ヒト尿中にはHTのグルクロン酸抱合体が検出されているが、TRZのグルクロン酸抱合体はこれまで報告がない。TRZがCYP3Aだけでなくグルクロン酸抱合酵素による代謝を受けることが示唆されたことから、マウス*in vivo*におけるTRZの血中濃度のみをCYP3A活性の指標とするには注意が必要であると考えられた。

P-45

マスタードガス代謝物1,1'-sulfonylbis (2- (methylsulfinyl) ethane (SBMSE) のLC-MS/MS分析法の開発

柘 浩一郎，大森 毅
科学警察研究所

Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of mustard gas metabolite 1,1'-sulfonylbis(2-(methylsulfinyl)ethane (SBMSE)

Kouichiro Tsuge, Takeshi Ohmori
National Research Institute of Police Science

【目的】マスタードガスは第一次世界大戦から使用されている化学兵器であり、化学兵器禁止法で所有、使用等が規制されている。本物質は生体内に入った場合、加水分解によりチオジグリコール (TDG) を生じ、さらに代謝され、チオジグリコールスルホキシド (TDGO) や1,1'-sulfonylbis- (2-(methylsulfinyl)ethane (SBMSE) を生じる。我々はこれまでにTDGおよびTDGOの生体試料からのLC-MS/MS分析法を確立したが、TDGおよびTDGOは生体内の常成分としても存在することから、マスタードガス曝露の証明法としては、特異的の高いSBMSEの検出が求められるようになった。本研究では、高分解能LC-MS/MSを用い、尿試料からのSBMSEの分析法を確立した。
【方法】健常人尿にSBMSE (Toronto Research Chemicals, Canada) を添加し、0.45 μmメンブランフィルターを通じたものをLC-MS/MS用試料とした。
LC-MS/MS分析：[LC] Thermo Scientific Ultimate 3000 液体クロマトグラフ、移動相 A = 0.1%ギ酸水溶液、B =アセトニトリル、溶出条件 0% B (5分間)- 10% B/分- 50% B (5分間) リニアグラジエント、流速 200 μL/分、カラム L-column2 ODS 150 mm x 1.5 mm, 5 mm、カラム温度 40°C。[MS] Thermo Scientific Q Exactive、ESI(+)、分解能17,500 (MS/MSによる定量時) および170,000 (MS分析による定性時)
【結果】SBMSEの検出限界は水溶液、尿試料いずれでも　1.4 ng/注入であり、検量線は4.1～1000 ng/注入の範囲で直線性を示した。尿によるマトリクス効果はほとんど認められず、尿試料における回収率は約95%であった。また、日内・日間変動ならびに真度も良好であった。
【考察】これまでに当研究室で確立した血漿タンパク質のアダクト分析、TDGおよびTDGOの分析および本法を組み合わせることで、マスタードガス曝露被害者試料からの特異性の高い高感度曝露証明が可能となった。

P-46

GC-MS定量法を用いたスチグマステロールのコレステロール代謝促進作用の解析

中川 沙織，清水（太田）美穂，不破 史子，大和 進
新潟薬科大学薬学部 薬品分析化学研究室

Promotion of cholesterol metabolism of stigmasterol by GC-MS

Saori Nakagawa, Miho Shimizu-Ohta, Fumiko Fuwa, Susumu Yamato
Department of Bio-analytical Chemistry, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

【目的】脂質異常症の治療薬としては、コレステロール合成経路を抑制するスタチン系薬物や食餌由来コレステロールの小腸からの吸収を抑えるエゼチミブが多用されており、コレステロール代謝を促す薬物は少ない。そこで、本研究では、ヒト肝がん由来HepG2細胞を用いて植物ステロールであるスチグマステロールのコレステロール代謝に対する作用を検討した。
【方法】ヒト肝がん由来HepG2細胞を用いて、スチグマステロールを添加（終濃度として、0.5, 1, 3, 5, 10 μg/mL）あるいは無添加で72時間培養し、細胞内のコレステロールおよび胆汁酸の前駆体である7α-ヒドロキシコレステロールおよび27-ヒドロキシコレステロールを定量した。定量方法は、細胞をジルコニアビーズで破砕し、ケン化、*n*-ヘキサンによる溶媒抽出後、固相抽出（2OH）カートリッジを用いて、大量のコレステロールを除去し、トリメチルシリル（TMS）誘導体化を行い、27-ヒドロキシコレステロールの重水素体を内標準物質に用いて、GC-MSで高感度定量を行った。
【結果】スチグマステロール存在下で培養を行ったところ、コレステロールの微減が認められた（5 μg/mL vs control, $p < 0.05$, student t test）。また、7α-ヒドロキシコレステロールについては、有意差は認められなかったものの微増傾向であった。これは、HepG2細胞は、7α-ヒドロキシコレステロールを通って胆汁酸が合成される古典経路があまり働かないため、産生量が少ないためと考えられる。一方、27-ヒドロキシコレステロールについては、微減が認められた（1,3,5 ,10 μg/mL vs control, $p < 0.05$, student t test）。
【考察】スチグマステロールには、コレステロールが減少し、7α-ヒドロキシコレステロールが微増し、27-ヒドロキシコレステロールが減少していたことから、コレステロールの代謝経路に対して何らかの作用があることが推察される。
　今後は、胆汁酸（コール酸、ケノデオキシコール酸およびその抱合体）を定量し、胆汁酸合成促進作用を検討するとともに、古典経路についても、古典経路が活性化するヒト肝腫瘍由来HepaRG細胞などを用いて評価を行いたいと考えている。

P-47

GC-MS定量法を用いたナリンゲニンの新規コレステロール合成抑制作用の解析

不破 史子，清水（太田）美穂，大和 進，中川 沙織
新潟薬科大学薬学部 薬品分析化学研究室

New inhibitory effect of Naringenin on cholesterol biosynthesis using GC-MS method.

Fumiko Fuwa, Miho Shimizu - Ohta, Susumu Yamato, Saori Nakagawa
Department of Bio-Analytical Chemistry, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, Japan

【目的】コレステロールの合成は、アセチルCoAからラノステロールを経て合成され、ラノステロールからは、ラソステロールあるいはデスモテロールを介する2つの経路が存在しているが、ラノステロールより下流をターゲットとした治療薬は少ない。

そこで本研究では、細胞培養系を用いて産生されるコレステロール合成の下流の前駆体をGC-MS定量することで、コレステロール合成経路に対する柑橘由来ポリフェノールであるナリンゲニンの作用について検討した。

【方法】ヒト肝がん由来HepG2細胞を、脂質含量の少ないLipoprotein Deficient Bovine Calf Serum (LPDS) 含有培地で培養することにより、コレステロール合成系を亢進させる細胞培養条件を用いて検討した。この実験系に、柑橘由来のフラバノン類であるナリンゲニンを添加し、40時間（コレステロール合成前駆体）あるいは72時間（コレステロール）培養後、細胞サンプルを得た。ジルコニアビーズによる細胞サンプルの破砕、けん化および溶媒抽出後、トリメチルシリル誘導体化を行い、コレステロール合成前駆体であるスクアレン、ラノステロール、デスモステロール、ラソステロール、7-デヒドロコレステロールおよびコレステロールをGC-MS定量した。

【結果および考察】ナリンゲニンの評価を行ったところ、コレステロール合成前駆体のスクアレン、ラノステロールおよびデスモステロール量には、大きな変化が認められなかった。一方、ラソステロールおよび7-デヒドロコレステロール量は、コントロールと比べてそれぞれ約150 %、約350 %と増加し、コレステロール量は、コントロールと比べ約56 %と微減が認められた ($p < 0.05$, Student t - test , $n = 3$)。このことから、ナリンゲニンには、コレステロール合成におけるラソステロール経路中の7-デヒドロコレステロールからコレステロールの経路を抑制し、コレステロールを低下させる新しい作用が推察された。

P-48

LC-MS/MSを用いたヒト血漿/血清中レボブピバカイン定量法の確立

森 照代，横畑 和代，渡邉 幸彦，曽我 学

丸石製薬株式会社 研究開発本部 創薬研究部

Establishment of quantification method of levobupivacaine in human plasma and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Teruyo Mori, Kazuyo Yokohata, Yukihiko Watanabe, Manabu Soga

Discovery research development, pharmaceutical research and development division, Maruishi pharmaceutical corporation

【目的】レボブピバカインは現在臨床で用いられている局所麻酔薬の1種であるポプスカイン®の有効成分であり、手術時や集中治療室等において硬膜外麻酔や術後鎮痛等を目的に使用されている。しかしながら、その定量法はこれまでUV検出器を用いたHPLC法が主流であり、採血量として2mL以上が必要であるが、小児や循環血液量低下等採血が困難な症例では充分な量の採血量を得ることが困難であった。また上記方法では検体量が血漿または血清として1mL程度必要であり、その試料前処理法にも時間を要した。そのため、今回エレクトロスプレーイオン化（ESI）を用いたLC-MS/MSにより、少量の血漿または血清を用いた簡便な定量法を検討した。

【方法】ヒト血漿あるいは血清20μLに標準品及び内標準物質（プラジクアンテル）を添加後、アセトニトリルによる除タンパク法により前処理を実施し、測定試料を調製した。その測定試料をLC-MS/MSを用いて、定量した。

【結果】20μL の血漿または血清から得られた測定試料をLC-MS/MSを用いて定量した結果、レボブピバカインの検量線は0.5～2000ng/mLの範囲で相関係数0.99以上となり、良好な直線性が得られた。日内及び日間再現性は真度が±15.0%以内、精度15.0%以下となり、再現性も良好であった。レボブピバカイン及び内標準物質の回収率も90%以上と良好であった。安定性は、10°Cに設定したオートサンプラー中では48時間まで、-20°C以下では150日間、また凍結融解操作は3回まで安定であることを確認した。希釈妥当性は、ブランク血漿または血清による希釈において50倍までの希釈が可能であることを確認した。

【考察】ヒト血漿または血清量を20 μLと設定した今回のLC-MS/MSを用いた定量法の直線性と再現性が良好であることが確認されたことから、今後は少量の血漿または血清を用いることで小児や採血困難な症例においても、簡便にレボブピバカインの定量を行うことができることを確認した。

P-49

LC/MS/MSを用いた血漿カテコールアミン測定法の開発

岩沢 勇也[1,2,3]，佐藤 守[1]，上瀧 智巳[4]，宮川 秀則[2]，田中 知明[3]，野村 文夫[1]

[1]千葉大学病院 マススペクトロメトリー検査診断学，[2]株式会社エスアールエル 治験・特殊検査部 分析化学課，
[3]千葉大学 分子病態解析学，[4]株式会社エスアールエル 技術推進部 検査開発グループ

Deveropment of a plasma catecholamine measurement method by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Yuya Iwasawa[1,2,3], Mamoru Satoh[1], Tomomi Jotaki[4], Hidenori Miyagawa[2], Tomoaki Tanaka[3], Fumio Nomura[1]

[1]Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University Hospital,
[2]Analytical chemistry Section, Clinical Trials & Special Testing Department, SRL, Inc.,
[3]Department of Molecular Diagnosis, Graduate School of Medicine, Chiba University,
[4]Laboratory Test Development Group, Department of Fundamental Technology & Development, SRL, Inc.

【目的】血漿中のカテコールアミンの測定は、一般に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行われるが、極性が高く、カテコールアミンの濃度が低いためにその測定は非常に困難である。今日までに報告された質量分析法に基づく方法は、前処理から測定までの操作が煩雑であり、日常的な使用には適していない。この研究の目的は、従来のHPLCと比較し、血漿中カテコールアミン測定のための簡便かつ高感度で正確な液体クロマトグラフィー三連四重極質量分析法 (LC / MS / MS) を開発し、その分析性能を評価することである。
【方法】血漿100 μLを酸によりタンパク沈殿させ、上清をHPLCに注入した。高極性物質を保持する親水性相互作用クロマトグラフィーカラムと親水性化合物を保持するペンタブロモベンジル基を含有するカラムの2つのHPLCカラムを使用した。カテコールアミンは、3種類の移動相を用いて2つのカラムを切り替えるカラムスイッチングを用い、LC/MS/MSによって選択的に検出した。
【結果・考察】カテコールアミンの選択性、再現性、希釈直線性、および添加回収試験に関して、満足のいく分析性能が得られた。定量の下限は、ノルエピネフリン、エピネフリンおよびドーパミンについて5 pg / mLであった。LC / MS / MSで得られた結果は、従来のHPLCの結果と良好な相関を示した。従来法と比較し検体使用量の減少、スループットの向上、有害廃液の発生抑制を実現した。本法は臨床検査法として有用と考えられる。

P-50

LC-MS/MSを用いた神経伝達物質、TSPOおよび関連薬物の同時定量

Andrea Roxanne J. ANAS[1,2]，森崎 潤子[1]，鳥居 優奈[1]，大矢 倫子[2]，鈴木 弘美[2]，今西 進[1]，澤田 誠[2]，原田 健一[1,3]

[1]名城大学 薬学部，[2]名大 環境医学部，[3]名城大学大学院 総合学術研究科

Simultaneous LC-MS/MS Analysis of Neurotransmitters, Translocator Protein (TSPO) Ligands and Related Drugs using HILIC system

Andrea Roxanne J. Anas[1,2], Junko Morisaki[1], Yuna Torii[1], Michiko Oya[2], Hiromi Suzuki[2], Susumu Y. Imanishi[1], Makoto Sawada[2], Ken-ichi Harada[1,3]

[1]Faculty of Pharmacy, Meijo University, Tempaku, Nagoya 468-8503, Japan,
[2]Department of Brain Function, Division of Stress Adaptation and Protection, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan,
[3]Graduate School of Environmental and Human Sciences, Meijo University, Tempaku, Nagoya 468-8503, Japan

【目的】With the advent of emerging technologies in neuroscience, we have devised a hydrophobic interaction liquid chromatography (HILIC) system, coupled with multiple reaction monitoring (MRM) in API4000 spectrometer. We have optimized a single LC-MS/MS condition for neurotransmitters, translocator protein (TSPO) ligands, and related drugs based on log D. This study aims to optimize three sets of analytes- pilocarpine and rivastigmine with acetylcholine, choline, gamma-aminobutyric acid (GABA) and Glu; haloperidol together with catecholamine; sumatriptan and serotonin metabolites together with L-amino acids, neurotransmitters, and related drugs by MRM in API4000 based on log D.

【方法】We computed the log D of analytes using the software (Advanced Chemistry Development, Inc.) ACD/Percepta Phychem Profiler V2016 Vup from V12 Academia. SciFinder further verified the results of the software above. The log D was set to pH 3, pH of the solvent used in liquid chromatography. We tested different column systems in the experiment, *i.e.,* C18, HILIC and graphite to test the effects of stationary phase in the analytes. Among the three stationary phases, HILIC was optimized all throughout the experiment. The HILIC system utilized MeCN/H_2O/HCOOH as solvents using 95% MeCN with 0.1% HCOOH to 85% MeCN with 0.1% HCOOH for 15 mins, 80% MeCN with 0.1%HCOOH for 20 mins, 95% MeCN with 0.1% HCOOH for 40 mins. The column used was Inertsil® HPLC 3 μm, 2.1x 150 mm (P), peek, 200 μL/min, 40°C column temperature.

【結果】Pilocarpine and rivastigmine exhibited a log D of -2.1 and -0.8, respectively. The neurotransmitters GABA, Ach, and Cho, gave a negative log D of -3.7, -3.5, and -3.8, respectively. The L-amino acids presented a log D ranging from -5.5 (Arg) to -1.1 (Trp). Haloperidol and raclopride exhibited a positive log D of 0.4, FEPPA of 1.6, and PK1195 of 4.9. Dopamine, L-Tyr, norepinephrine, 3-methoxytyramine (MT), L-DOPA, L-Glu, and L-Lys have negative log D with values -3.0, -2.3, -4.2, -3.8, -2.7, -2.7, -4.1, and -4.8, respectively. Sumatriptan succinate has log D of -1.8, serotonin of -2.5, kynurenine of -2.1, 5-hydroxytryptophan of -2.7, L-Trp of -1.1. However, kynurenic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid, and quinolinic acid have positive log D of 1.3, 0.9, and 0.1, respectively. The elution order of the analytes is TSPO ligands, drugs and neurotransmitters; amino acids co-elute with serotonin, kynurenine, 3-MT, GABA, 5-HIAA. The last to elute are Cys, Arg, and Lys.

【考察】We were able to optimize different neurotransmitters, translocator protein (TSPO) ligands and related drugs in the study using a HILIC system.

P-51

レーザーアブレーションICP-MSを用いた薬理量リチウムの脳内分布の可視化

安井 悠生[1]，亀山 大樹[1]，塚本 傭平[1]，黒木 康夫[2]，本多 和人[2]，角田 伸人[1]，池川 雅哉[1]

[1]同志社大学大学院生命医科学研究科 医生命機能研究室，[2]サーモ・フィッシャー株式会社

Visualization of lithium distribution in mouse brain using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)

Yuki Yasui[1], Daiki Kameyama[1], Yohei Tsukamoto[1], Yasuo Kuroki[2], Kazuto Honda[3], Nobuto Kakuda[1], Masaya Ikegawa[1]

[1]Genomics, Proteomics and Biomedical Functions, Department of Life and Medical Systems, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan, [2]Thermo Fisher, Tokyo, Japan

【目的】双極性障害は、うつ症状と躁症状を繰り返し患者や家族のQOL (Quality of Life) を著しく低下させる深刻な疾患である。治療薬として用いられるリチウムは、気分安定剤としての治療効果を発揮する一方、生体への作用機序の詳細は、未解明の部分も多い。また、効果領域の幅の少ない薬剤のため、副作用の回避のための薬物動態の解明は急務である。本研究では、薬理量リチウム投与マウスモデルを作製し、リチウムの脳内分布の可視化をレーザーアブレーションICP-MSを用いて試みた。

【方法】C57Bl/6マウス (雄，7週齢) に対し、塩化リチウム含有水を非投与群, 低濃度 (200 mg/l) 投与群, 高濃度 (600 mg/l) 投与の3群に分け自由飲水により摂取させた。経過中、0、2、7，14日目に血清中リチウム濃度のモニタリングを発光分析を用いて行った。14日目に、マウスを解剖して脳を摘出し, クライオスタットを用いて10μm厚の新鮮凍結切片を作成し、LA-ICP-MSを用いて、リチウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛についてKEDモードで測定を行った。

【結果と考察】リチウム投与後7日目に、高濃度投与群では、明らかに血清中リチウム濃度の上昇が認められた。このモデルを用いてLA-ICP-MSによる薬理量リチウム投与マウスモデル脳組織の元素分析の結果、コントロール群マウスでは、脳内リチウム分布は検出限界以下であったが高濃度投与群では、海馬や嗅球への選択的な脳内局在が認められた。脳内マンガン、鉄、銅、亜鉛の分布についてはすべての試料において脳内局在の可視化に成功した。今後は、リチウムの海馬や嗅球への集積の過程で、個体にどのような行動的・代謝的変動が生じているかを解析し若干の考察を試みた。

P-52

LC/DMSO-assisted ESI-QTOF-MSを用いた尿中低分子ペプチドのハイスループット分析法

大田 正規，佐藤 充彦，岡野 雅人
株式会社LSIメディエンス アンチドーピングラボラトリー

High-throughput screening of small peptides in human urine by means of liquid chromatography coupled DMSO-assisted ESI-QTOF mass spectrometry

Masanori Ohta, Mitsuhiko Sato, Masato Okano
Anti-Doping Laboratory, LSI Medience Corporation

【目的】スポーツにおいて成長ホルモン分泌刺激物質 (GHS) や性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRHs) 等の低分子ペプチドの不正使用は、世界アンチ・ドーピング機構 (WADA) によって禁止されている。これら低分子ペプチドの分析は、尿試料を固相抽出により精製・濃縮し、LC/MS/MSによる選択反応モニタリングにより実施していた。しかし、回収率やスループットが低い課題があった。そこで、我々は尿試料のDilute-and-shoot法と高分解能質量分析によるハイスループットな精密質量分離、さらにはイオン化促進剤ジメチルスルホキシド (DMSO) のポストカラム添加による高感度分析の開発を試みた。
【方法】尿試料180 μLと内部標準水溶液20 μLを混和後、40 μLをLC/QTOF-MSに注入した。LC/QTOF-MSは、ACQUITY UPLC I-Class/Xevo G2-XS Qtof (Waters)、トラップカラムはAccucore Phenyl/Hexyl (2.6 μm 3.0 × 10 mm, Thermo)、分析カラムはHSS T3 (1.8 μm 2.1 × 100 mm, Waters) を使用した。移動相は0.1%ギ酸水溶液および0.1%ギ酸含有アセトニトリルとし、流速800 μL/minで1分間トラップし、バックフラッシュ後、流速350 μL/minで2液混合グラジエント溶出した (分析時間18分)。イオン化はDMSOのポストカラム添加 (流速3.5 μL/min) を用いたESI(+) とし、各ペプチドのプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを高分解能ターゲット分析 (TOF-MRM) モードにより検出した。
【結果】DMSOのポストカラム添加により一部多価イオンの検出パターンが変化したが、カラム分離には影響せずにイオン化が数倍促進した。一般に、尿試料のDilute-and-shoot法ではバックグラウンドシグナルの影響が大きい。しかしながら、TOF-MRMモードでは、対象とした42種類すべてのペプチドにおいてWADAの指定する検出下限 (1 ng/mL) が良好なS/N比で検出可能であった。
【考察】DMSO添加によるTOF-MRMモードによるLC/QTOF-MS分析は、ドーピング検査における検体分析に対しても高感度かつ精密質量分離を可能とする有効なツールであった。Dilute-and-shoot法を適用することで、固相抽出法と比較し高いスループット分析が可能となり、即日報告が必要な大規模競技会において有効となることが期待される。

P-53

マルチオミクス解析への応用を目指したマウス大脳からのメタボローム・RNA同時抽出法の構築

大原 倫美[1]，窪澤 絢子[1]，土屋 弥月[1]，近藤 健太[1]，井口 亮[2]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，林 由美[3,4]，財津 桂[1,4]

[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学，[2]産業技術総合研究所，
[3]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，[4]名古屋大学 高等研究院

Simultaneous extraction method of metabolome and RNA in mouse cerebrum for applying multi-omics analysis

Tomomi Ohara[1], Ayako Kubosawa[1], Mitsuki Tsuchiya[1], Kenta Kondo[1], Akira Iguchi[2], Hitoshi tsuchihashi[1], Akira Ishii[1], Yumi Hayashi[3,4], Kei Zaitsu[1,4]

[1]Dept. of Legal Med. & Bioethics, Nagoya Univ. Grad. School of Med.,
[2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
[3]Dept. of Radiological and Medical Laboratory Sciences, Nagoya Univ. Grad. School of Med.,
[4]Institute for Advanced Research, Nagoya Univ.

【目的】マルチオミクス解析[1)]を生体試料に適用する際には、オミクスの階層ごとにターゲット分子の抽出を行なう必要がある。特に脳試料では、メタボライトやmRNAの局所分布が機能発現等に深く関与しているため、“同一試料” に対してマルチオミクスを適用することが不可欠と考えられる。そこで本研究では、植物細胞に関する既報[2)]を参考に、マウス脳試料からのメタボロームおよびRNAの同時抽出法を確立し、GC/MS/MSによるメタボローム解析及びリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を実施し、その有用性を検証した。

【方法】ICRマウスの大脳に冷MeOHを加えてホモジナイズし、ホモジネートに$MeOH/CHCl_3$を加えて30分撹拌し、メタボライトを抽出した。メタボローム抽出画分（M画分）を遠心濃縮・凍結乾燥し、誘導体化後、GC/MS/MSを行った。M画分を分取したクロロホルム層および固形状のペレットに、水飽和フェノール/$CHCl_3$を加えてRNAを抽出し、エタノール沈殿によって得られたペレットを乾燥後、水溶出し、RNA抽出画分とした。

【結果および考察】マウス大脳（n=6）について、従来のBligh-Dyer法を用いてメタボローム解析を行った場合[3)]、176成分が検出されたが、本法では230成分が検出された。また、検出した成分の面積値がRSD30%以下のものは207成分（全体の90%）であり、良好な再現性が得られた。一方、RNAの回収率を市販キットと比較したところ、やや回収率は低かったものの、タンパク混入指標であるA260/280および使用溶媒等の混入指標であるA260/230は平均1.8および2.2を示したことから、抽出RNAの純度は良好であった。本法で得られたRNAについてReal-time PCRにより3種の遺伝子発現量を測定し、得られたCt値のRSDを求めたところ、3.2～7.1%と極めて良好な再現性が得られた。さらに本法を薬物投与マウスに適用した結果、同一の大脳試料からのメタボローム解析と遺伝子発現解析を達成した。本法は動物組織へのマルチオミクス解析の一助となることが強く期待される。

1) Kim et al. *Nat. Commun*. 7, 2016
2) Weckwerth et al. *Proteomics* 2004
3) Zaitsu et al. *Life Sci.* 2015.

P-54

NMDA受容体アンタゴニストによるCB_1受容体アゴニスト由来異常行動の増強効果と性差 －マウス大脳メタボローム解析による検討－

土屋 弥月[1]，井口 亮[2]，林 由美[3,4]，中山 浩[5]，大原 倫美[1]，牧野 宏章[5]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，高橋 秀依[5]，財津 桂[1,4]

[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学，[2]産業技術総合研究所，
[3]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，[4]名古屋大学 高等研究院，[5]東京理科大学 薬学部

Enhancement effect of NMDA receptor antagonist on the abnormal behaviors caused by CB_1 receptor agonist and its sex differences -approach by metabolome analysis of mouse cerebrum-

Mitsuki Tsuchiya[1], Akira Iguchi[2], Yumi Hayashi[3,4], Hiroshi Nakayama[5], Tomomi Ohara[1], Kosho Makino[5], Hitoshi Tsuchihashi[1], Akira Ishii[1], Hideyo Takahashi[5], Kei Zaitsu[1,4]

[1]Department of Legal Medicine and Bioethics, Nagoya University Grad. School of Medicine,
[2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
[3]Department of Radiological and Medical Laboratory Sciences, Nagoya University Grad. School of Medicine,
[4]Institute for Advanced Research, Nagoya University,
[5]Faculty of pharmaceutical sciences, Tokyo University of Science.

【目的】近年、乱用薬物として流通が確認されているジフェニジン (DPH) は、非競合的NMDA受容体アンタゴニストであり、カンナビノイド受容体アゴニスト (CBRアゴニスト) や合成カチノン等と混合した状態での流通例が確認されている。実際、我々の研究室においてもCBRアゴニストとDPHの混合物摂取による急性中毒死例を経験しているが[1)]、DPHの毒性機序や生体影響等の詳細は不明である。我々はこれまでに、マウスにDPHとCBRアゴニストを同時に投与すると、自発運動量およびCBRアゴニスト由来の異常行動 (飛び跳ね行動) [2)]がDPHによって増強されること、また、その増強効果には性差があることを確認している[3)]。そこで本研究では、DPHによるCBRアゴニスト由来の異常行動の増強効果および性差の原因について、マウス大脳のメタボローム解析を用いて検討した。

【方法】8-10週齢のICR雄性および雌性マウスを薬剤投与2時間前に絶食させた。マウスにDPH (saline溶液、5 mg/kg) あるいはCBRアゴニストであるAM-2201 (DMSO溶液、2 mg/kg) を単剤あるいは混合剤として腹腔内投与した。コントロール群 (Ctl) には等量のsalineとDMSOを投与した。薬剤投与1時間後に解剖を行い、大脳を迅速に分離した後、ホモジナイズ、メタボライトの抽出・誘導体化を行い、GC-MS/MSを用いて分析した。

【結果と考察】メタボローム解析の結果、雄からは270成分、雌からは262成分が検出された。主成分分析 (PCA) を行った結果、雄・雌の何れもPCAスコアプロットにおいて、Ctl群とDPH投与群が重なりAM-2201投与群とDPH+AM-2201混合物投与群が重なった。すなわち、4つの投与群が2つの群に分離した。さらに、OPLS-DAを用いた場合もPCAの結果と同様、スコアプロット上では2つの群に分離した。よって、DPHは大脳メタボロームには顕著な変動を来たさないことから、DPHによる増強効果の主因を追究するためには、大脳の局所的な解析が必要であることが示唆された。

【参考文献】
1) M. Kusano et al., *Drug Test. Anal.* 2018
2) K. Zaitsu et al., *Life Sci.* 2015
3) 土屋ら、第37回日本法中毒学会 2018.

P-55

LC-QTRAP-MS/MSとLC-Orbitrap-MS/MSを用いた3名の血清・尿中の合成カンナビノイド5F-NNEIの定量とその代謝物の構造推定

南方 かよ子[1]，鈴木 雅子[2]，北本 卓也[2]，野澤 秀樹[1]，山岸 格[1]，長谷川 弘太郎[1]，齊藤 岳児[3]，吉野 篤人[3]，鈴木 修[1]，渡部 加奈子[1]

[1]浜松医科大学 法医学，[2]浜松医科大学 機器センター，[3]浜松医科大学 救急災害医学

Sensitive quantification of 5F-NNEI and characterization of its several metabolites in authentic urine and/or serum specimens obtained from three individuals by LC-QTRAP-MS/MS and high-resolution LC-Orbitrap-MS/MS

Kayoko Minakata[1], Masako Suzuki[2], Takuya Kitamoto[2], Hideki Nozawa[1], Itaru Yamagishi[1], Koutaro Hasegawa[1], Takeji Saitoh[3], Atsuto Yoshino[3], Osamu Suzuki[1], Kanako Watanabe[1]

[1]Department of Legal Medicine, [2]Research Equipment Center, [3]Department of Emergency and Disaster, Hamamatsu University School of Medicine

【目的】ヒト生体物質中の合成カンナビノイド5F-NNEIとその代謝物については今まで報告されていない。今回我々は5F-NNEIのヒト血清と尿中の高感度定量法を確立し、その代謝物の構造推定をすることを目的とした。

【方法】5F-NNEIとその代謝物はβ-glucuronide加水分解と未分解の血清と尿から液-液抽出した。血清0.1 mLに緩衝液0.3 mL、内部標準AB-PINACA 0.002 mL、ステンレスビーズ2個、CH_3COONa、$MgSO_4$を加え、1-chlorobutane 0.6 mLで2回抽出した。5F-NNEIの同定と定量はLC-QTRAP-MS/MSにて、代謝物の構造推定はLC-QTRAP-MS/MS並びにLC-Orbitrap-MS/MSにて行った。試料は2名の血清と尿、1名の尿である。

【結果】添加実験における5F-NNEIの検出限界と定量域は血清では6 pg/mLと10 - 2000 pg/mL、尿でのそれらは3 pg/mLと5 - 1000 pg/mLであった。Case 1と2の血清中の5F-NNEI濃度は11.6と3680 pg/mLであり、case 2と3の尿中のそれは5.07と7.90 pg/mLであった (case 1は定量不能)。尿中には数種類の代謝物が存在していた。それらはアミド水解、OH化、脱フッ素化後のOH化、脱フッ素化後のCOOH化、グルクロン酸抱合等による代謝であった。これらの代謝物の標準物質は入手できないので、AB-PINACAのピークを基準とした相対濃度をLC-QTRAP-MS/MSで測定した。LC-Orbitrap-MS/MSで測定した代謝物の分子イオンとプロダクトイオンの精密質量は理論値とよく一致していた。

【考察】5F-NNEI、NNEI、5-chloro-NNEI、NNEI indazole analogが粉末やハーブに存在する旨の報告があり、その後NNEIによる中毒死1例とドライバーの血中濃度1例の報告がなされたが、その尿中濃度や代謝物の報告はなされていなかった。今回、5F-NNEIの血清と尿中濃度を非常に高感度に測定し、かつ5F-NNEIの代謝物の構造を推定することができた。

P-56

DSMSプロジェクト －集計－：
千葉大学法医薬物スクリーニング分析結果の集計報告

山岸 由和[1]，安部 寛子[1]，三浦 みゆき[1]，岡馬 圭介[1]，小椋 康光[1,2]，岩瀬 博太郎[1,3]

[1]千葉大学大学院医学研究院附属 法医学教育研究センター，[2]千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学研究室，
[3]東京大学大学院医学系研究科 法医学教室

DSMS project : report of drug screening in forensic autopsy cases performed by Chiba University

Yoshikazu Yamagishi[1], Hiroko Abe[1], Miyuki Miura[1], Keisuke Okaba[1], Yasumitsu Ogra[1,2], Hirotaro Iwase[1,3]

[1]Center of Education and Research in Legal Medicine, Chiba University,
[2]Department of Toxicology and Environmental Health, Chiba University,
[3]Department of Forensic Medicine, The University of Tokyo

【目的】現在、10大学の法医学教室が連携して取り組んでいる***Drug Screening Method Sharing***プロジェクトにおいて、参加大学が各大学で実施した薬物分析結果を集計している。第42回日本医用マススペクトル学会年会にて、我々は千葉大学の薬物スクリーニング分析結果の集計報告を行った。昨年に引き続き、その後薬物スクリーニング分析を実施した事例を追加し、集計を実施したので報告する。
【方法】2016年1月～2018年3月までに千葉大学で解剖を実施した事例 (773事例) 中、薬物スクリーニング分析を実施した事例 (703事例) の内、心臓血の分析結果 (582事例) を、ドラッグスクリーニングレポートシステムを用いて集計した。薬物スクリーニング分析法は、解剖時に採取した法医試料をアセトニトリルによる除タンパク後、その上清を分析試料とし、LC-MS/MSによる約270化合物のターゲット分析法を用いた。集計化合物から、Lidocaine, Caffeine, Theophylline, Phenethylamine (腐敗アミン) は除いた。
【結果】集計対象事例582事例中404事例 (69%) において、薬物スクリーニング分析の対象化合物が検出された。また集計対象化合物269化合物中146化合物 (54%) が検出された。最も頻繁に検出された化合物はAmlodipineで、次いでAcetaminophen, Ephedrine, DiphenhydramineなどのOTC医薬品が続き、その次に覚せい剤 (Amphetamine, Methamphetamine) の検出率が高かった。覚せい剤検出事例は40-59歳の年代に集中し、男性で有意に検出された。女性では、向精神薬の検出頻度が高い傾向を示した。
【考察】今後更に分析結果データを蓄積し、将来的には集計結果を他機関の集計結果と比較、もしくは他機関のデータと合わせて集計することで、日本の法医解剖事例における薬物統計を目指す。

P-57

DSMSプロジェクト －集計－：
東京慈恵会医科大学法医薬物スクリーニング分析結果の集計報告

前橋 恭子，坂本 圭菜，岩楯 公晴
東京慈恵会医科大学 法医学講座

DSMS project : report of drug screening in forensic autopsy cases performed by The Jikei University School of Medicine

Kyoko Maebashi, Kana Sakamoto, Kimiharu Iwadate
Department of Forensic Medicine, The Jikei University School of Medicine

【目的】10大学（旭川医大、医歯大、医療福祉大、香川大、北里大、信州大、千葉大、東大、横浜市大、慈恵医大）の法医学教室で進めている薬物分析連携プロジェクト（DSMS：Drug Screening Method Sharing Project）について、第41回および第42回日本医用マススペクトル学会年会にて報告した。DSMSでは、現在、法医中毒統計調査に向けて、ドラッグスクリーニングレポートシステム（ドラレポ）を用いた機関毎の分析結果の集計を試みている。

東京慈恵会医科大学法医学講座では死因究明を目的として、液体クロマトグラフタンデム型質量分析装置（LC-MS/MS）およびNAGINATA薬毒物データベースを用いたガスクロマトグラフ質量分析装置（GC-MS）による薬物スクリーニング分析を実施している。今回、2016年6月から2017年12月までの期間に当講座で実施した法医解剖事例1547例のうち、心臓内血液の薬物スクリーニング検査を実施した1207事例についてドラレポを利用して集計を行ったので報告する。

【方法】スクリーニング対象薬物はLC-MS/MSが253化合物、GC/MSが249化合物で合計361化合物である。個々の症例の分析結果をドラレポを用いて集計し、性別、年代別、解剖の種類（司法解剖・承諾解剖・調査法解剖）による検出薬物の傾向を解析した。

【結果】集計の結果、試料からスクリーニング対象薬物（ニコチン、ニコチン代謝物および腐敗アミン類、通常量のカフェイン、テオフィリンおよびリドカインは除く）が検出された事例は1207例中749例であった。全般的に市販薬とアムロジピンの検出率が高かった。向精神薬は女性、30-49歳群および承諾解剖群で多く検出された。50歳以上のグループでは高血圧症治療薬のアムロジピン、80歳以上では認知症治療薬のドネペジルなど年齢に特有の医薬品が検出された。なお、違法薬物は全般的に少なかった。

【まとめ】本研究では、検出率と検出化合物に着目することで薬物使用の傾向と剖検評価の重要性を明らかにした。引き続き、他大学と協力し、現在の成果に基づいて薬物分析の質を向上させることに取り組んでいきたい。

P-58

DSMSプロジェクト －集計－：
東京医科歯科大学法医薬物スクリーニング分析結果の集計報告

則竹 香菜子，船越 丈司，鵜沼 香奈，上村 公一
東京医科歯科大学 法医学分野

DSMS project: report of drug screening in forensic autopsy cases performed by Tokyo Medical and Dental University

Kanako Noritake, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Koichi Uemura
Department of Forensic Medicine, Tokyo Medical and Dental University

【目的】当教室では、法医解剖における死因究明の一環として液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC-MS/MS) による薬物スクリーニング分析を実施している。今回、検出された薬物の傾向を検討するため分析結果の集計を行ったので報告する。
【方法】剖検試料にQuEChERS抽出塩およびアセトニトリルを加え撹拌し、遠心分離を行い得られた上清を乾固した後、メタノールに再溶解したものをLC-MS/MS (島津製作所社製NexeraX2 + LCMS-8040) により分析した。当教室において、2014年8月から2016年3月に実施された法医解剖事例386例のうち、薬物スクリーニング分析を実施した308例について検出薬物 (通常量のカフェイン、ニコチンおよびリドカインは除く) の集計を行った。
【結果】剖検試料からスクリーニング対象成分が検出された事例は308例中217例 (70%) であった。全体ではアセトアミノフェンやジフェンヒドラミンなどのOTC医薬品成分が多く、次いで向精神薬であるフルニトラゼパムの代謝物、覚せい剤 (メタンフェタミン、アンフェタミン) が多く検出された。男女別では、どちらもOTC医薬品成分が多く検出されたが、次いで男性では覚せい剤、女性では向精神薬が多かった。年齢別では、20 歳代では向精神薬が多く、30 歳代ではOTC医薬品成分や向精神薬に加え、危険ドラッグを含む違法薬物が検出された。40-50歳代では向精神薬および覚せい剤、60歳以上ではOTC医薬品成分が多く検出される傾向があった。また、10歳未満で覚せい剤を検出した事例も認められた。
【考察】今回の集計結果から当教室の法医解剖事例で検出される薬物の傾向を把握することが出来た。また思いがけない薬物が検出された事例もあり、薬物スクリーニング分析の重要性を改めて認識した。今後は､薬物分析連携プロジェクト (DSMS) において他機関と協力して薬物スクリーニング分析の問題点を見直し精度向上に努めたい。

P-59

DSMSプロジェクト －集計－：
香川大学法医薬物スクリーニング分析結果の集計報告

高倉 彩華，田中 直子，モストファ ジャーマル，伊藤 明日香，木村 正司，飴野 清，木下 博之
香川大学 医学部

DSMS project : report of drug screening in forensic autopsy cases performed by Kagawa University

Ayaka Takakura, Naoko Tanaka, Jamal Mostofa, Asuka Ito, Shoji Kimura, Kiyoshi Ameno, Hiroshi Kinoshita
Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Kagawa University

【目的】第42回日本医用マススペクトル学会年会において、慈恵医大・千葉大がドラッグスクリーニングレポートシステム（ドラレポ）を用いた薬物スクリーニング分析結果の集計結果を報告した。香川大学の法医解剖事例について、検出される薬物の種類や傾向を検討するため集計を行った。
【方法】2017年1月から12月までの期間に香川大学で法医解剖を行った123例のうち、LC-MS/MSで静脈血の薬物スクリーニング分析を実施した106例を対象とした。解剖時に採取した静脈血をアセトニトリルで除タンパク後、その上清を検査試料とした。スクリーニング対象薬物は255化合物で、集計にはドラレポを用いた。
【結果・考察】静脈血からスクリーニング対象薬物（カフェイン、テオフィリン、腐敗アミン、リドカインは除く）が検出された事例は106例中70例（66%）であった。アセトアミノフェン、アムロジピン、7-アミノフルニトラゼパムが高頻度に検出された。20～50歳代の事例では向精神薬が検出された割合が高く、なかでもフルニトラゼパムが多く検出された。60歳代以上の事例では、市販薬成分の検出が多かった。薬物スクリーニング分析を中心に、薬物分析の品質管理および法医中毒統計調査を目指した薬物分析連携プロジェクト（Drug Screening Method Sharing project）を10大学（旭川医大、医歯大、医療福祉大、北里大、慈恵医大、信州大、千葉大、東大、横浜市大、香川大）の法医学教室で進めている。今後、プロジェクト内で得られた各大学の集計結果を踏まえて、スクリーニング対象薬物を見直し、さらに薬物分析の品質向上を目指している。

P-60

DSMSプロジェクト －ブラインドテスト－：第5回ブラインドテストの実施結果と考察

佐々木 千寿子，佐藤 文子
北里大学医学部 法医学

DSMS project: Results and discussion of the fifth blind test

Chizuko Sasaki, Fumiko Satoh
Department of Legal Medicine, Kitasato University School of Medicine

【目的】現在10大学の法医学教室が参加するDrug Screening Method Sharing Project (DSMS) では，薬物分析の品質管理および法医解剖における薬物分析結果の統計調査を目的とした連携を行っている．品質管理の一環として年2回のブラインドテストを実施しており，第41回日本医用マススペクトル学会年会では，6機関で実施したブラインドテスト結果について，施設間で抽出法やLC/MSの機種が異なっても，スクリーニング対象薬物を統一させたことによりブラインドテスト結果が向上したことを報告した．今回，分析メソッドのさらなる向上と精度管理のため，対象機関を11機関に増やし，第5回目となるブラインドテストを実施した．
【方法】ブランク血液および尿に複数の標準化合物を添加し凍結したものを2症例分作成しブラインドテストの試料とした．試料は添加化合物名を伏せて各機関へ配布され，薬物スクリーニング検査を実施した．メソッドは各機関が使用している前処理方法，分析装置および測定条件を用い，可能であれば半定量値を算出した．
【結果および考察】偽陰性出現率は14%，偽陽性出現率は4%，検査対象外による不検出は6%であった．今回みられた偽陰性の原因として，サンプルの希釈倍率が影響したと予想されるものが多くみられた．またスクリーニング対象薬物を統一していない機関では，検査対象外のため不検出となった化合物がみられた．分析結果を法医中毒統計調査に応用するためには，施設間での結果のばらつきをなくすことが求められる．今後も定期的なブラインドテストの実施と結果の検証を行い，薬物分析のさらなる改善を行っていく．

共同研究者：旭川医大 (奥田勝博，清水惠子)，香川大 (高倉彩華，田中直子，木下博之)，医療福祉大 (矢島大介)，信州大 (林德太郎，小林寛也，浅村英樹)，千葉・東京大 (安部寛子，山岸由和，岩瀬博太郎)，医歯大 (船越丈司，則竹香菜子，上村公一)，慈恵医大 (前橋恭子，岩楯公晴)，横浜市大 (那須亜矢子，井濱容子)

P-61

法医試料を用いた糖尿病病態マーカーの探索

成相 舞花[1]，安部 寛子[1]，槇野 陽介[1,2]，岩瀬 博太郎[1,2]

[1]東京大学大学院医学系研究科 法医学教室，[2]千葉大学大学院医学研究院 法医学教室

Biomarker profiling of postmortem blood for diabetes mellitus

Maika Nariai[1], Hiroko Abe[2], Yohsuke Makino[1,2], Hirotaro Iwase[1,2]

[1]Department of Forensic Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo,
[2]Department of Legal Medicine, Graduate School of Medicine, Chiba University

【目的】メタボローム解析は、様々な疾患マーカー探索に応用されており、またそこから得られた知見は、その疾患の病理学的な発症・進行メカニズムを探るのに有用である。その試料としては、もっぱら生体の血液・尿などが用いられているが、我々は、法医解剖時に採取されたご遺体の血液を用いてメタボローム解析を行い、慢性疾患の一つである糖尿病を反映するマーカー物質が見出せるか検討した。

【方法】千葉大学で司法解剖されたご遺体において、通院歴などから糖尿病の既往があった事例10例（DM群）、糖尿病の既往がない事例10例（Ng群）、計20事例の解剖時採取血液を試料とした。これら血液のHbA1c(%) 値は、DM群：8.79±2.16、Ng群：5.43±0.61であった。採取した血液を、①血液：0.1%ギ酸：アセトニトリル＝1:1:8で除タンパク処理、②Bligh & Dyer法（脂質を中心とした抽出）の2通りで前処理し、それぞれLC-QTOF/MSを用いて分析を行った。一試料につきn=5で測定、検出されたイオンのデータリストを作成し、多変量解析にて各群に特徴的なイオンを抽出し、そのイオンの化合物推定を行った。

【結果】イオンのピーク強度が群間で有意な差を示したイオンが41イオン存在した。DM群で有意に強度が小さいイオンの化合物推定を行ったところ、スフィンゴミエリン（SM）、プラズマローゲン脂質などであった。またDM群で有意に強度が高いイオンの化合物推定を行ったところ、リゾリン脂質などが候補として挙げられた。

【考察】群間で有意差を示す化合物が認められ、法医試料を用いたメタボローム解析により慢性疾患を反映するマーカー物質を発見できる可能性を見出すことができた。

生体試料を用いた分析や動物実験においてSMは糖尿病をはじめとする慢性炎症をもたらす疾患に関連があるとの報告がある。また糖尿病の原因の一つに酸化ストレスの関連が報告されているが、酸化ストレスからの保護に関わるプラズマローゲン脂質の減少、および脂質酸化後の分解産物としてのリゾリン脂質の増加は、今回の実験でも認められた。このように、法医試料の分析から得られた結果と、糖尿病の脂質代謝学的背景との対応についても見出すことができた。

P-62

質量分析を用いた薬毒物分析が法医解剖事例の死因に及ぼす影響

安部 寛子[1]，緒方 善政[2]，星岡 佑美[1]，山岸 由和[1]，槇野 陽介[4]，小椋 康光[1,3]，岩瀬 博太郎[1,4]

[1]千葉大学大学院医学研究院 法医学教育研究センター，[2]伊勢原協同病院，
[3]千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学教室，[4]東京大学大学院医学研究科 法医学

Effects of drug analysis using mass spectrometry on the cause of death of autopsy cases

Hiroko Abe[1], Yoshimasa Ogata[2], Yumi Hoshioka[1], Yoshikazu Yamagishi[1], Yosuke Makino[4], Yasumitsu Ogura[1,3], Hirotaro Iwase[1,4]

[1]Center of Education and Research in Legal Medicine, Chiba University, [2]Isehara Kyodo Hospital,
[3]Department of Toxicology and Environmental Health, Chiba University,
[4]Department of Forensic Medicine, The University of Tokyo

【目的】近年、多くの法医学教室に質量分析計が設備され、精密な薬毒物分析が実施されている。しかし、つい数年前まではこれらの機器導入は難しく、薬物検査簡易キットのみを使用して死因への薬物関与を判断せざるを得なかった。千葉大学法医学教室でも質量分析計を導入した2009年以前は、簡易キットのみを用いて薬物検査を実施していた。今回我々は、質量分析計の導入により可能となった精密な薬毒物分析が、実際どれほど死因判断に寄与するのかを検証するため、質量分析計を導入する以前に千葉大学法医学教室で解剖された法医解剖事例において、質量分析による薬毒物分析を実施し、当時つけられた死因と、今回薬毒物分析を実施後に再検討した死因がどれほど異なるか、検討を行ったので報告する。
【方法】2009年以前に千葉大学法医学教室で解剖され、保管されていた法医試料に、LC/QTOF-MSを用いて、約3000成分を分析対象とした薬物スクリーニング分析を実施した。今回検出した薬物と、解剖当時に実施した簡易キットの結果を比較、さらに死因の再検討を実施し、解剖当時につけられていた死因との相違について検討した。
【結果・考察】簡易キットで陽性反応が認められていた事例は約4割であったのに対し、質量分析による分析の結果、約7割の事例において薬毒物が検出された。またその6割の事例で簡易キットは陰性であった。死因に関して、薬毒物分析を実施することで直接的に死因が変更した事例は存在しなかったものの、例えば火事場の事例で、簡易キットは陰性であったが、質量分析では高濃度の睡眠導入剤が検出された事例など、質量分析を用いることで死因判断に更なる考察を加えることが可能な事例が数事例存在した。これら事例を詳細に解析し、薬毒物分析の死因に与える影響について報告する。

P-63

喘息モデルマウス肺組織におけるアセチルコリン過剰分泌の質量分析イメージングによる可視化

松田 孟士[1]，鈴木 勇三[2]，藤澤 朋幸[2]，齊藤 伸幸[3]，菅 裕徳[3]，須田 隆文[2]，矢尾 育子[1,4]

[1]浜松医科大学 光尖端医学教育研究センター フォトニクス医学研究部 光イメージング 研究室,
[2]浜松医科大学医学部 内科学第二講座，[3]日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社,
[4]浜松医科大学 国際マスイメージングセンター

Visualization of acetylcholine hypersecretion in lung tissues of asthma model mice by imaging mass spectrometry

Takeshi Matsuda[1], Yuzo Suzuki[2], Tomoyuki Fujisawa[2], Nobuyuki Saito[3], Yasunori Suga[3], Takafumi Suda[2], Ikuko Yao[1,4]

[1]Department of Optical Imaging, Institute for Medical Photonics Research, Preeminent Medical Photonics Education & Research Center, Hamamatsu University School of Medicine,
[2]Respiratory medicine, Second Division, Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine,
[3]Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd.,
[4]International Mass Imaging Center, Hamamatsu University School of Medicine

【目的】神経伝達物質であるアセチルコリンは、延髄から伸びる副交感神経により、肺組織の気管、気管支、細気管支に分泌され、気道の平滑筋細胞に存在するムスカリン性アセチルコリン受容体に結合することで平滑筋の収縮をもたらす。かねてより、慢性的な気道炎症により気管支収縮を起こす喘息病態の肺組織においてアセチルコリンが増加していることが仮説として考えられていたが、アセチルコリンの量や局在を肺組織内にて直接的に、感度よく検出・測定することは難しく、喘息病態における肺組織内のアセチルコリンの動態はこれまで不明であった。今回我々は、喘息における肺組織アセチルコリンの関わりを解明することを目的とし、喘息モデルマウス肺組織内におけるアセチルコリンの質量分析イメージングを試み、肺におけるアセチルコリンの量や分布の変化を解析した。
【方法】喘息モデルマウスとしてダニ抗原を鼻腔内投与したマウスを用い、さらに重症喘息モデルマウスとしてアジュバントとダニ抗原を組み合わせてより強い炎症反応を肺に誘導したマウスを用いた。液体窒素により急速凍結したマウス肺組織から切片を作製し、DHBマトリクスを塗布してアセチルコリン測定に供した。測定はフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置 (Solarix XR, Bruker Daltonics) を用い、fleximagingソフトウェア (Bruker Daltonics) で画像化と解析を行った。
【結果】喘息モデルマウスにおいて、肺組織内のアセチルコリンの分布量は生理食塩水を同様に投与したコントロールマウスに比べ、有意な増加が認められた。また、重症喘息モデルマウスでは、喘息モデルマウスと比較してさらなるアセチルコリンの増加が観察され、肺組織に誘導された炎症反応との高い関連性が見出された。
【考察】我々は質量分析イメージングにより、マウス肺組織におけるアセチルコリンを検出・測定できることを見出し、さらに喘息モデルマウス肺組織においてアセチルコリンが増加していることを明らかにした。我々が確立した肺組織内のアセチルコリン計測技術は喘息をはじめとする様々な肺疾患を研究する一つの手法として有用であると考えられる。

P-64

拡張型心筋症ハムスターモデルの病態解析と超高速イメージング質量分析法を用いたプロテオミック・バイオマーカー探索

新谷 祈[1]，辻 崇[2]，石田 瑞希[1]，韮澤 崇[3]，植田 初江[4]，升本 英利[2]，湊谷 謙司[2]，池川 雅哉[1]

[1]同志社大学生命医科学部 医生命システム学科，[2]京都大学大学院医学研究科 心臓血管外科学，
[3]ブルカー ジャパンK. K.，[4]国立循環器病研究センター 病理部

Revisiting pathogenesis of Dilated Cardiomyopathy of J2-k hamster model in search of proteomic biomarker using ultra high speed imaging mass spectrometry

Inori Shintani[1], Takashi Tsuji[2], Mizuki Ishida[1], Takashi Nirasawa[3], Hatsue Ishibashi-Ueda[4], Hidetoshi Masumoto[2], Kenji Minatoya[2], Masaya Ikegawa[1]

[1]Faculty of Life and Medical Science, Department of Life and Medical Systems, Doshisha University,
[2]Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University,
[3]Bruker Japan, K.K., [4]Department of Pathology, National Cerebral and Cardiovascular Center

【目的】J2N-kハムスターはδ-サルコグリカン遺伝子の欠損によりヒト拡張型心筋症（DCM）と類似の病態を示すモデル動物である。生後約20週齢で心臓の拡張および機能不全を示し、最終的に約1年でうっ血性心不全をきたし死亡することが知られている。本研究では、DCM形成過程である若齢期J2N-k心筋における病態解析と超高速イメージング質量分析（Imaging Mass Spectrometry: IMS）法を用いたプロテオームレベルのバイオマーカー探索を行うことを目的とした。

【方法】J2N-kおよびJ2N-n（正常コントロール）の4～13週齢の若齢期心臓病理所見を解析した。心筋採取後、液体窒素にて急速凍結保存し、一部はHE染色や免疫組織化学染色、一部をイメージング解析のためにITOスライドガラスに10μmの薄切切片を新鮮凍結切片とした。質量分析には、rapifleX を用い、取得データはfleximagingとSCiLS Lab 2018を用いて解析を行った。

【結果と考察】4週齢J2N-kの心筋に明らかな病変を認めず、5週齢J2N-kから軽微な炎症細胞浸潤を認め、6、7週齢で炎症巣の拡大を観察した。7週齢から比較的小さな肉芽腫性炎症巣にCD68陽性の多核巨細胞が出現し、9週齢では多巣性で顕著となった。10週齢で多核巨細胞は消褪し、13週齢では線維化が出現、炎症細胞の浸潤は減少し、石灰化を認めた。IMS法により上記J2N-k心筋組織の病態進行に一致したシングルピークの抽出ならびにクラスタリングに成功した。本法によりプロテオームレベルの拡張型心筋症の発症メカニズムと新たな炎症性心筋症に関する病態への理解や治療への発展が期待された。

P-65

新規ガラス製試料プレートを用いた、マトリックスフリー表面支援レーザー脱離イオン化法による、低分子量生体分子の高感度分析

橘 ゆう子[1]，塚本 洋子[2]

[1]AGC株式会社 技術本部 商品開発研究所，[2]AGCテクノグラス株式会社

High sensitive analysis of low molecular weight biomolecules by matrix-free surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) using the new SALDI glass plate

Yuko Tachibana[1], Hiroko Tsukamoto[2]

[1]New Product R&D Center, Technology General Division, AGC Inc., [2]AGC Techno Glass Co., Ltd.

【背景と目的】マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) では、しばしばマトリックス剤・カチオン化剤の塗布法が、得られるマススペクトルに大きく影響する。さらにマトリックス剤由来の煩雑なピークが、低分子量 (m/z1000以下) の目的物質の検出を困難にする場合もある。今般、新規ガラス製SALDI試料プレートを用い、マトリックス剤・カチオン化剤を別途添加することなく表面支援レーザー脱離イオン化法 (SALDI) による質量分析を行った。得られたマススペクトルをMALDIマススペクトルと比較し、新規ガラス製SALDI試料プレートの有用性を検証した。

【方法】(a) 新規ガラス製SALDI試料プレート上に、コレステロール$C_{27}H_{46}O$ 1wt%溶液 (溶媒：IPA) を1μl滴下し、マトリックス剤・カチオン化剤を別途添加することなくSALDIにて質量分析を行った。また (b) ITOガラスプレート上に、(a) と同様に前記試料を滴下し、マトリックス剤及びカチオン化剤としてDHB及びNaIを加え調製し、MALDIにて質量分析を行った。(a) (b) におけるレーザー照射条件・検出条件は揃えた。

【結果】(a) では、試料プレートに由来する銀イオンが付加した、銀付加試料分子イオンが高感度で検出された。m/z 600以下の低分子領域には、主には銀由来3ピークと試料分子由来ピークのみ検出された。最も検出強度の高いピークの強度を100とすると、試料分子由来ピークの検出強度は56であった。(b) では、m/z 600以下の低分子領域に、マトリックス剤由来の煩雑なピークが多数検出された。最も検出強度の高いピークの強度を100とすると、試料分子由来ピークの検出強度は19であった。なお、(a) の試料分子由来ピークは、(b) の9倍の検出強度で観測された。

【考察】新規ガラス製SALDI試料プレートにより、マトリックス剤・カチオン化剤を別途添加することなく、試料分子由来ピークが高感度に検出されることを示した。ノウハウが必要なマトリックス剤・カチオン化剤の塗布が不要となることで、安定して再現性の良いマススペクトル取得が可能になることが期待される。またマトリックス剤の面内分布に由来するイオン化効率の面内分布がなく、試料本来のマスイメージが得られる可能性も期待される。さらに、低分子領域の妨害ピークが極めて少ないマススペクトルが得られる本試料プレートは、低分子量の目的物質の検出に有用と考えられる。

報告では、上記試料におけるマススペクトルと共に、他の材料への適用事例も合わせて示し、イオン化支援機構についても議論する。

P-66

イメージングマススペクトロメトリー法を用いたホルマリン固定パラフィン包埋バイオプシー試料から腎アミロイドーシスの鑑別診断

武笠 結天[1]，葛原 由貴[1]，寺田 恵[1]，韮澤 崇[2]，ラヴァン・マリオン[3]，
ジャンポール・ドン・バン・ファン[3]，ブルネバル・パトリック[4]，
植田 初江[5]，角田 伸人[1]，池川 雅哉[1]

[1]同志社大学生命医科学部 医生命システム学科，[2]ブルカー・ジャパンK.K.，[3]パリ国立ネッカー小児病院 病理部，
[4]パリ公立ポンビドゥ・ヨーロッパ病院 解剖病理部，[5]国立循環器病研究センター 病理部・バイオバンクセンター

Dissecting renal amyloidosis using Imaging Mass Spectrometry for formalin-fixed paraffin embedded biopsied samples

Yume Mukasa[1], Yuki Kuzuhara[1], Megumi Terada[1], Takashi Nirasawa[2], Marion Rabant[3], Jean-Paul Duong Van Huyen[3], Patrick Bruneval[4], Hatsue Ishibashi-Ueda[5], Nobuto Kakuda[1], Masaya Ikegawa[1]

[1]Genomics, Proteomics and Biomedical Functions, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan, [2]Bruker Japan K.K. Yokohama, Japan, [3]Necker-Enfants malads Hospital, Paris, France, [4]Georges-Pombidou European Hospital, Anatomy-Pathology, Paris, France, [5]National Cerebral and Cardiovascular Research Center, Osaka, Japan

【目的】腎アミロイドーシスの病理診断は，ホルマリン固定パラフィン包埋バイオプシー試料を用い，組織内のアミロイドタンパク質の存在をDirect Fast Scarlet (DFS) 染色などで判断するか，アミロイドタンパク質に特異的な抗体を使用する免疫学的手法が主流である．一方，タンパク質の断片化や立体構造の変化により抗体反応の損なわれる場合や，偽陽性の反応が検出されるなどの理由で抗体を用いた方法で診断のつかないことがある．我々は、イメージング質量分析法 (Imaging mass Spectrometry; IMS) 法を用いFFPEからプロテオームレベルのIMS法プロトコルの確立を試みた．
【方法】腎アミロイドーシスのFFPE試料は，臨床診断後の残余物を利用した．FFPEブロックの前処理法として脱パラフィン，再水和，高湿度環境でのインキュベーションなどの各ステップの適正化の検討に加え，マトリクス・トリプシン塗布に自動化デバイスを使用した．質量分析には，rapifleXを用い，解析ソフトには，SCiLS Lab 2018を用いた．また，Laser Micro Dissection (LMD) 法を用いて，ショットガン・プロテオミクス解析法とIMS法の統合的解析を試みた．
【結果と考察】プロトコルを検討した結果，FFPEから安定したスペクトラムを取得することに成功した．その結果，ALタイプなどの診断に有効なシングルピークやクラスタリングに成功した．さらにアミロイド形成の背景となる腎組織特異的プロテオームに関して若干の考察を加えた．

P-67

貫通孔ポーラスアルミナ薄膜を用いたレーザー脱離イオン化法DIUTHAME

内藤 康秀[1]，小谷 政弘[2]，瀧本 未羽[2]，大村 孝幸[2]

[1]光産業創成大学院大学 光医療・健康分野，[2]浜松ホトニクス株式会社 電子管事業部

DIUTHAME —Desorption Ionization Using Through Hole Alumina Membrane

Yasuhide Naito[1], Masahiro Kotani[2], Miu Takimoto[2], Takayuki Ohmura[2]

[1]The Graduate School for the Creation of New Photonics Industries, [2]Hamamatsu Photonics K.K.

【目的】サブミクロンの直径の貫通孔が規則的に配列しているポーラスアルミナ薄膜を用いるレーザー脱離イオン化法DIUTHAME (Desorption Ionization Using Through Hole Alumina Membrane) を開発し、様々な試料について有効性を検証した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) における分析対象成分をマトリックス結晶に取り込ませる工程が、DIUTHAMEでは不要になる。その一方で、MALDIは分析対象成分の種類に合わせてマトリックス化合物を選定することにより、広範な対象物に適用されている。そこで本研究は、DIUTHAMEの汎用性の確認を主な目的として検証を行った。

【方法】貫通孔ポーラスアルミナ薄膜は陽極酸化法で作製した。孔径はØ300 nm、膜厚は5 μmとした。表面の導電性を得るため片面のみPtでコーティングし、Ø3 mmの開口 (有効面) を設けたTi製フレームに接着してDIUTHAME用基板とした。(イメージング質量分析実験の場合は有効面Ø18 mmの基板を使用。) 基板上に試料をピペットで滴下しターゲットプレートに貼付、あるいはターゲットプレートに載せた試料の上に基板を貼付し、薄膜への試料の吸収を確認して十分乾燥させてから、市販のMALDI-TOF質量分析計 (UltraFlex TOF/TOF, Bruker) を用いて測定を行った。

【結果】各種の化合物を極性溶媒に溶解した試料について、一価プロトン付加分子または一価アルカリ付加イオンのマススペクトルが得られた。フラグメントイオンはほとんど観測されなかった。マトリックス由来イオンが不在であることを除けば、MALDIに類似したソフトイオン化マススペクトルが得られている。また、各種の切片化した試料について、きわめて簡便な操作でイメージング質量分析を実施でき、再現性の高いイメージング結果が得られることを確認した。

【考察】ポーラスアルミナ基板を用いた表面支援レーザー脱離イオン化の先行研究はあるが、貫通孔構造の利用については前例がない。貫通孔を採用したことにより、使いやすさや測定再現性が大幅に向上し、またイメージング質量分析への適用が初めて可能になった。MALDIと異なり低m/z域の妨害ピークが存在しないので、低分子測定に特に有効といえる。

P-68

イメージング質量分析法を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスモデルの脳・脊髄解析から多発性硬化症のバイオマーカーと治療標的の発見

田中 那美[1]，山下 浩輝[1]，韮澤 崇[2]，田口 勝敏[3]，田中 雅樹[3]，近藤 誉之[4]，辻 雄大[1]，角田 伸人[1]，池川 雅哉[1]

[1]同志社大学大学院生命医科学研究科 医生命機能研究室，[2]ブルカー・ジャパンK. K.，[3]京都府立医科大学大学院 生体構造科学，[4]関西医科大学 総合医療センター

Identification of Biomarkers and Therapeutic Targets of Multiple Sclerosis through Imaging Mass Spectrometry for the brains and spinal cords of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) mouse model

Nami Tanaka[1], Hiroki Yamashita[1], Takashi Nirasawa[2], Katsutoshi Taguchi[3], Masaki Tanaka[3], Takayuki Kondo[4], Yudai Tsuji[1], Nobuto Kakuda[1], Masaya Ikegawa[1]

[1]Genomics, Proteomics and Biomedical Functions, Department of Life and Medical Systems,Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan, [2]Bruker Daltonics K.K., Yokohama, Japan, [3]Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan, [4]Kansai Medical University Medical Center, Osaka, Japan

【目的】多発性硬化症 (Multiple sclerosis; MS) は、中枢神経系 (Central nervous system; CNS) における炎症、脱髄、軸索変性などを主徴とする自己免疫疾患である。本研究では、MSのモデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis：EAE) マウスのCNS実質組織に対して、タンパク質・ペプチドレベルのイメージング質量分析 (Imaging mass spectrometry; IMS) 法をおこない、多発性硬化症のバイオマーカーと治療標的の探索を行った。

【方法】SJL/Jマウス (雌，10週齢) に，Proteolipid protein (PLP) の139-151番目のアミノ酸配列に該当するペプチドを、完全フロイントアジュバントと共に免疫し、EAEを誘導した。臨床症状を定法に従い、6段階で毎日評価を行った。ペプチド免疫後9日目 (pre EAE)、11-12日目 (acute EAE)、21-22日目 (chronic EAE) にマウスを解剖し、CNS試料を採取した。クリオスタットで10 μm厚の新鮮凍結切片を作製し、質量分析にはUltrafleXtremeおよびrapifleX、マトリクスにはSinapinic acidを用いた。

【結果】IMS法によるEAEマウス脳･脊髄の解析により、細胞浸潤巣と共局在する分子を複数認めた。先行研究や抗体を用いたIHCによる検証を行った結果、これらの分子群はS100Aタンパク質ファミリーであることを特定した。さらに、このタンパク質の抑制剤を用いEAEの予防および治療効果を確認した。

【考察】IMS法によるEAEマウス脳･脊髄の解析によりMSのバイオマーカーと治療標的を発見した。

P-69

糖尿病性腎症モデルラット腎臓のMALDIイメージング質量分析法を用いた In Situプロテオーム解析法の確立

葛原 由貴[1]，武笠 結天[2]，韮澤 崇[3]，植田 初江[4]，角田 伸人[2]，池川 雅哉[1,2]

[1]同志社大学大学院 生命医科学研究科，[2]同志社大学 生命医科学部，
[3]Bruker Japan K.K.，[4]国立循環器病研究センター 病理部

In Situ Proteomics of Kidney from Diabetic Nephropathy Rat Model using MALDI-Imaging Mass Spectrometry

Yuki Kuzuhara[1], Yume Mukasa[2], Takashi Nirasawa[3], Hatsue Ishibashi-Ueda[4], Nobuto Kakuda[2], Masaya Ikegawa[1,2]

[1]Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University,
[2]Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, [3]Bruker Japan K.K.,
[4]Depertment of Pathology, National Cerebral and Cardiovascular Center

【目的】糖尿病性腎症は、糖尿病の三大合併症の一つで、末期には腎不全から透析にいたる重篤な状態を引き起こす。本研究では、糖尿病モデルラット腎臓の新鮮凍結切片を対象に、超高速MALDI-TOF/TOF MSを用いたプロテオームレベルのイメージング質量分析法（IMS）と、連続凍結切片から抽出したペプチド・タンパク質のLC-MS/MS測定を組み合わせて施行し、糖尿病性腎症における腎組織プロテオーム解析手法の確立を試みた。

【方法】SDT fattyラットの腎臓を摘出後、液体窒素で急速冷凍し-80°Cにて保存した。クライオスタットで10 μmの凍結切片を作製後、Indium-Tin-Oxide（ITO）ガラススライドに貼付し、トリプシン酵素処理を施した。α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid（HCCA）とSinapinic Acid（SA）を用いて、10 mg/mlとなるように70% ACN, 1% TFA溶液もしくは50% ACN, 0.1% TFA溶液で約7 ml調製し、組織切片に添加した。その後, MALDI-TOF/TOF MS（Bruker Daltonics）を用いて50–100 μm の空間分解能で測定した。また、連続凍結切片から抽出したペプチド・タンパク質をLC-MS/MSで測定し、一連の結果をImaging IDソフトを用いて解析した。

【結果と考察】腎臓の組織構造を反映したプロテオミック・イメージング画像と腎機能に関する病態を反映した機能タンパク質のイメージング画像を得た。本課題はMALDI-TOF/TOF MSを用いたイメージング質量分析法とLC-MS/MS測定を組み合わせることで、腎機能に関わる分子の測定・解析を行うことに成功した。一連のワークフローによる測定・解析法の検討により、糖尿病性腎症における腎組織プロテオーム解析手法を確立し若干の考察を試みた。

P-70

GC-MS/MSを用いたメタボローム解析におけるバッチ間データ補正法の検討

野田 沙樹[1]，林 由美[2,3]，井口 亮[4]，大原 倫美[1]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，財津 桂[1,3]

[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学，[2]名古屋大学大学院 医学系研究科，
[3]名古屋大学 高等研究院，[4]産業技術総合研究所

Correction method for different-batch metabolome data obtained by GC-MS/MS

Saki Noda[1], Yumi Hayashi[2,3], Akira Iguchi[4], Tomomi Ohara[1], Hitoshi Tsuchihashi[1], Akira Ishii[1], Kei Zaitsu[1,3]

[1]Department of Legal Medicine & Bioethics, Nagoya University Grad. School of Medicine,
[2]Department of Radiological & Medical Laboratory Sciences, Nagoya University Grad. School of Medicine,
[3]Institute for Advanced Research, Nagoya University,
[4]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

【目的】メタボロミクスにおいて多検体を分析する際には、前処理や機器分析を同一グループ内（分析バッチ）では処理できなくなるため、いわゆる「バッチ間補正」が必要となる。一般に、メタボロミクスではバッチ間を跨ぐと結果の相対比較が難しいとされていることから、これまでにもバッチ間データの補正法が考案されている[1,2)]が、生体試料の最適なバッチ間データ補正法は確立されていない。特に、GC-MS(/MS）によるメタボロミクスでは、バッチ間データの相対比較が難しくなる要因として前処理操作の影響も大きいと考えられる。

そこで本研究では、GC-MS/MSによるメタボロミクスにおけるバッチ間データの変動に影響を及ぼす要因を検証し、メタボローム・データのバッチ間比較を可能とする手法を検討した。

【方法】分析方法：マウスの血漿にISを加え、クロロホルム/メタノール混液によるメタボロームの抽出を行った。遠心濃縮及び凍結乾燥後、誘導体化を行い、島津製作所製ガスクロマトグラフタンデム質量分析計GCMS-TQ8040を用いてメタボローム解析を行った。凍結融解数の影響：血漿試料の凍結融解数を変えた試料と揃えた試料を3日間に分けて分析した。前処理操作の検討：遠心濃縮操作を除いて前処理を行い、遠心濃縮操作の影響を検証した。解析法の検討：5種類の異なる補正法を適用し、結果を検証した。実試料への応用：最適な解析手法を病態モデルラットの血漿試料に応用し、実用性を評価した。

【結果・考察】バッチ間データの変動要因として、試料の凍結融解数や遠心濃縮操作が影響していることが明らかとなった。特に、バッチ間補正を行うためには遠心濃縮操作を省くことが好ましいと考えられた。また、検討した補正法のうち、中央値強度または全強度を用いた補正法が良好な結果を示した。そこで、セロトニン症候群モデルラットの解析に本法を応用した結果、バッチ間データ補正が可能であることが明らかとなった。本研究成果は、メタボロミクスにおける多検体処理法の発展に大きく寄与すると考えられる。

1) N. Kawase et al., *J Biosci Bioeng*, 2017.
2) C. Thonusin et al., *J Chromatogr A*, 2017.

P-71

LC-MS/MSによる短鎖、中鎖、長鎖、極長鎖脂肪酸の一斉定量分析

高 紫君[1]，陳 震[1]，呉 玥[1]，三浦 祐介[1]，千葉 仁志[1,2]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]札幌保健医療大学

Simultaneous quantitation of short-, medium-, long-, and very long-chain fatty acids by LC-MS/MS

Zijun Gao[1], Zhen Chen[1], Yue Wu[1], Yusuke Miura[1], Hitoshi Chiba[1,2], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

Aim: LC-MS/MS is advantageous to gas chromatography because it can achieve low running temperature, high sensitivity, high selectivity, and high-throughput. Approaches with derivatization could further improve separation and sensitivity. We have reported the utility of acidic 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride (2-NPH·HCl) in HPLC for fatty acid (FA) (Anal Sci 34:575-82,2018; 33:1297-303,2017; Ann Clin Biochem 52:588-96,2015). Here, we report for the first time a method of simultaneous determination of FAs ranging from 4:0 to 26:0 with NPH-derivatization in LC-MS/MS.

Methods: All preparation procedures was done in a 1.5-mL Eppendorf tube. FA 17:0 was spiked as internal standard. After saponification by KOH in ethanol (30 min), the total FA was derivatized with 2-NPH·HCl and extracted in organic solvent (15 min). Diethyl ether was found to be the most efficient in extraction. The best LC separation was obtained by using the Supelco Ascentis Express Phenyl-Hexyl column (50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm) along with a gradient elution by aqueous ammonium acetate and methanol. After optimization of SRM conditions in ESI-negative mode, validation study was done.

Results: Under the optimized condition, the purposed method showed these advantages: The total instrument operating time was shortened from the previous 2 hours to the current 13 minutes; the required blood sample volume was reduced from previous 50 μL to 10 μL; the derivatization reagent consumption was saved by 75%. Also, satisfactory linearity, reproducibility, and accuracy for all the targeted FAs were shown by method validation.

Discussion: The proposed method is simple and rapid in sample preparation, and is high in sensitivity and specificity. It might be useful in studying yet unclear role for short-, medium-, and very-long-chain FAs as well as long-chain FAs in metabolic disorders.

P-72

尿ステロイドプロフィルGC-MS法前処理における低溶出サンプルチューブ（prototype, ジーエルサイエンス社製）の使用経験

本間 桂子[1]，中川 央充[1]，野口 昌代[1]，大野 明美[1]，柴田 綾子[1]，長谷川 奉延[2]，涌井 昌俊[3]，村田 満[3]

[1]慶應義塾大学病院 臨床検査科，[2]慶應義塾大学医学部 小児科，[3]慶應義塾大学医学部 臨床検査医学

Pretreatment with Low elution sample tubes (prototype, GL Sciences Inc.) for Urinary steroid profile analysis using Gas chromatography-mass spectrometry

Keiko Homma[1], Terumichi Nakagawa[1], Masayo Noguchi[1], Akemi Ohno[1], Ayako Shibata[1], Tomonobu Hasegawa[2], Masatoshi Wakui[3], Mitsuru Murata[3]

[1]Clinical Laboratory, Keio University Hospital, [2]Department of Pediatrics, School of Medicine, Keio University, [3]Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University

【背景】ステロイド産生異常症診断に有用な尿ステロイドプロフィルは、尿中ステロイド代謝物63種をGC-MSで一斉分析する検査である。前処理（加水分解-有機溶媒抽出-誘導体化）に用いる容器には、耐薬性、耐熱性、防湿のための密閉性が必要なため、従来、共栓付ガラス管（以下ガラス管）を使用していたが、高価で洗浄に手間取るため、低溶出サンプルチューブ（prototype,　ジーエルサイエンス社製，溶媒耐性ポリマーコーティングポリプロピレン製2mlチューブ）（以下低溶出チューブ）への移行を検討した。

【方法】前処理において、耐薬性、耐熱性を求められるステップは、加水分解処理後遊離ステロイドを抽出した酢酸エチル・ジクロロメタン（3:1）混液の60°C窒素乾固、メトキシム化試薬ピリジン溶液の53°C 1時間加温、TMS化試薬TSIMの80°Cまたは60°C16時間加温、TSIM試薬洗浄に用いるジクロロメタンの40°C窒素乾固である。これらのステップにガラス管または低溶出チューブを用い前処理後、GC-MSにてSIM分析した。

【結果】低溶出チューブで、TSIMによるTMS化を80°Cで行うと、1）ガラス管で認めなかった未知ピークが一部の測定イオンに干渉、2）イオンソース洗浄、カラム交換を要するまでの期間が、ガラス管（6アッセイ毎、6ヶ月毎）に比し短い傾向（4アッセイ毎、4ヶ月毎）を認めた。同TMS化を60°Cに変更したところ、全ステロイドの反応性に問題なく、未知ピークの低下・干渉の消失を認め、イオンソース、カラムの劣化速度は共栓と同レベルとなった。

【考察】低溶出チューブは、耐熱限界60°Cとやや低く、60°Cで未知成分溶出ゼロではなかった。しかし、強アルカリ容器洗浄不要な安全性、ガラス管と同等の反応性（吸着性も含む）、簡便なふた開閉に基づく防湿性･効率性を根拠に、本検査では低溶出チューブを使用可能と判定した。

P-73

Validation of a multi-analyte flow-injection high resolution / accurate mass method for the quantification of acidic lipid species in human serum

Dayan Goodenowe[1], Yanqiu Jiang[1], Vijitha Senananake[1], Yasuyo Yamazaki[1], Mamoru Satoh[2], Fumio Nomura[2]

[1]Prodrome Sciences Inc. Saskatoon, Canada, [2]Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University Hospital

Objectives: Abnormal serum levels of acidic lipids such as fatty acids (EPA, DHA, etc.) ultra-long chain fatty acids (GTA-446, PC-594, etc.), plasmalogens, phosphatidylethanolamines, and phosphatidylserines are associated with various diseases such as colorectal cancer, pancreatic cancer, ovarian cancer, multiple sclerosis, Parkinson's and dementia. Measuring each of these species using independent analytical methods is time and labor intensive. An analysis method using a single sample preparation procedure and a single mass spectrometer analysis mode was investigated.

Methods: Human serum (10 ul) was sequentially extracted three times using acidic aqueous buffer and ethyl acetate. The combined ethyl acetate extract was then analyzed by direct flow injection using a Thermo Orbitrap-XL mass spectrometer equipped with an APCI probe in the negative ionization mode. The mass spectrometer was operated in the full scan mode at 100,000 resolution. The complete injection cycle was 1.5 minutes per sample and injection to injection carry-over was <1%. The data was processed using proprietary software which performed a scan by scan analysis and then stored the accurate mass and intensity values in an indexed rapid retrieval file format.

Results: Over 1500 accurate mass species were reliably detected in human serum using the described method. Fatty acids, ultra-long chain fatty acids, phosphadidylethanolamine, phosphatidylserine, ethanolamine plasmalogen, and phosphatidylglycerol phospholipid species were reproducibly measured using the method.

Discussion: A simple, high-throughput, reproducible method for detecting and quantifying key acidic lipid species in human serum has been developed, validated and applied to over 3000 patient samples. Multiple databases can easily be created by combining any combination of samples and accurate masses of interest for further statistical analyses relating to clinical variables such as age, sex, and disease. The simplicity and robustness of the method makes comprehensive metabolomic analyses of large patient populations economically viable. In addition, the complete mass list can be used for the discovery of new biomarkers and biomarker combinations for detecting disease and disease risk.

P-74

LC-MS/MSを用いたTCA回路代謝物の一斉分析

佐藤 完太[1]，山口 真史[2]，山本 哲志[2]，三田村 邦子[2]，多賀 淳[2]
[1]近畿大学大学院 薬学研究科，[2]近畿大学 薬学部

Simultaneous analysis of TCA cycle metabolites by LC-MS / MS

Kanta Sato[1], Masafumi Yamaguchi[1], Tetsushi Yamamoto[2], Kuniko Mitamura[2], Atsushi Taga[2]
[1]Graduate School of Pharmacy, Kindai University, [2]Faculty of Pharmacy, Kindai University

【目的】癌細胞は、正常細胞とはエネルギー産生の挙動が異なっており、それにより代謝産物の量にも差異が生じるとされている。その中でもクエン酸回路上の代謝中間体の発現に癌患者と健常者の間で違いが生じることが報告されている。しかし、これらの違いは相対的なものであることから、高感度定量分析法を開発することで、癌細胞におけるクエン酸回路代謝産物の発現異常をより詳細に解明することができると考えらえる。そこで本研究では、LC-ESI-MS/MSを用いて、クエン酸回路上の代謝物の一斉分析・高感度微量分析を可能とする測定法を開発した。
【方法】LC-MS/MSには、TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific) を用いた。オキサロ酢酸やクエン酸をはじめとするTCAサイクル上の代謝物9種に、アミノ酸代謝に関わるグルタミン、グルタミン酸を加えた計11種を分析対象とした。カラムには、3種類の市販の逆相、HILIC、およびイオン交換カラムを用いた。種々の濃度のギ酸溶液を移動相とし、アイソクラティック溶出を行った。ネガティブモードでイオン化し、SRM法での最適化を行い、その条件で測定を行った。
【結果・考察】YMC Triart PFP (150×2.1 mm, 3 μm) カラムを用い、酸性条件で行うことで11種類の代謝物の一斉分析が可能であった。移動相に用いたギ酸濃度によりピーク形状、再現性に差があったが、11種代謝物一斉分析において、移動相に0.5%ギ酸を用いることにより、良好な結果が得られた。また、この条件で培養癌細胞中の代謝物を分析したところ、細胞内の11種類の代謝物を高感度で測定することが可能であった。以上の結果より、*in vitro*実験系での細胞内や各種癌細胞におけるTCA回路代謝物の高精度な一斉定量が可能であり、代謝物を標的にしたバイオマーカーの探索が可能になると考えられた。

P-75

ピリミジン系抗がん剤5-FU投与における副作用発現回避のための dihydropyrimidine dehydrogenase活性測定法の確立

村瀬 美和[1]，前田 康博[1]，中島 葉子[2]，伊藤 哲哉[2]，堀田 祐志[1]，片岡 智哉[3]，木村 和哲[1,3]

[1]名古屋市立大学大学院 薬学研究科，[2]藤田保健衛生大学 小児科，[3]名古屋市立大学大学院 医学研究科

Development of dihydropyrimidine dehydrogenase activity measurement method for 5-FU related toxicity

Miwa Murase[1], Yasuhiro Maeda[1], Yoko Nakajima[2], Tetsuya Ito[2], Yuji Hotta[1], Tomoya Kataoka[3], Kazunori Kimura[1,3]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,
[2]Department of Pediatrics, Fujita Health University, [3]Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University,

【目的】Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) は、生体内uracil, thymineの異化代謝のみならず、抗がん剤として使用される5-fluorouracil (5-FU) の不活性化反応経路の第一段階の反応を触媒する律速酵素である。ヒトにおいて、投与された5-FUの約85%が本経路により代謝分解される。そのため、DPD欠損患者に5-FUを投与すると重篤な副作用が発現することが知られている。DPD欠損症は常染色体劣性遺伝であり、無症状である劣性遺伝子の保因者が存在する。無症状例では、5-FU投与時の副作用発現が初発症状になる場合がある。

そこで5-FU による重篤な副作用を未然に防ぐ方法として、ヒト末梢血リンパ球を用いたDPD酵素活性測定法を確立することを目的とした。

【方法】ヒト末梢血リンパ球を分離し、$MgCl_2$、dithiothreitol (DTT)、NADPHを加え、基質としてthymineを添加し、37 °Cで4時間インキュベートした。$HClO_4$で反応を停止し、遠心後に上清をUPLC-MS/MSで分析した。生成したdihydrothymine (DHT) を定量し、健常人と患者で生成量を比較し、患者の酵素活性値とした。

【結果】UPLCのカラムにCOSMOSIL PBr Column (2.0 × 150 mm, NACALAI TESQUE) を使用し、0.1% HCOOHとアセトニトリルでgradient分析することで、DHTの保持時間は、4.2分となった。健常人コントロール11名のDHT産生量は、3.27 pmol/h/μg protein ± 0.64であった。

【考察】反応基質濃度、反応時間を検討し、DHTが生成する最適な反応条件を決定した。生成したDHTは、UPLC-MS/MSによる分析で、低濃度までの定量を可能にした。以上より、ヒト末梢血リンパ球を利用した、DPD活性測定法を確立した。

現在のところ低DPD活性の患者は見つかっていないが、今後、5-FU投与前における保因者の特定に有用な手段であると考えられる。

P-76

キラルカラムによるLC-MSを用いたヒドロキシ脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解析

藤原 優子，濱弘 太郎，横山 和明
帝京大学 薬学部

LC-MS analysis of Glycosphingolipids containing 2-hydroxy fatty acid with a chiral column

Yuko Fujiwara, Kotaro Hama, Kazuaki Yokoyama
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

【目的】スフィンゴ糖脂質は、多様な糖鎖構造、構成脂肪酸、スフィンゴイド長鎖塩基のため、これまで分子種レベルの網羅的解析方法は確立されていない。本研究では、LC-MSを用いて、スフィンゴ糖脂質のクラスごと、分子種ごとの定量系を確立する事を目標にし、これまでに、キラルカラムが液体クロマトグラフィーの糖脂質クラスおよびセラミド分子種の分離に有効であることを見出した。今回は、これまでに最適化した実験系を用いて、脳に多く存在すると報告がある2-ヒドロキシ脂肪酸を有するスフィンゴ糖脂質の測定を行った。
【方法】Galactosylceramide (GalCer) 標品、および、ブタ脳由来sulfatide混合物 (Avanti Polar Lipids) を試料として用いた。LC-ESI-MS/MS装置にはQTRAP 4500 (AB SCIEX) にNexera XR (島津) を接続したシステムを、カラムはChiralPak IF-3 (2.1x250mm, i.d. 3μm, Daicel Corporation) を使用した。スフィンゴ糖脂質は、セラミド由来のプロダクトイオンを用いたMRMで測定し、MultiQuant Software (SCIEX) を用いて定量解析した。
【結果】GalCer d18:1-C18:0とGalCer d18:1-C18:0hの溶出時間はヒドロキシ脂肪酸を含むGalCer d18:1-C18:0hの方が約4.5 min早く溶出された。またms/msによりフラグメント解析を行ったところ、positive ion modeでは、糖鎖部分が分離したフラグメント、セラミドおよびスフィンゴイド長鎖塩基のフラグメントが検出された。一方negative ion mode では、2-ヒドロキシ脂肪酸に由来するフラグメントが確認できた。続いて、ブタ脳由来のsulfatideの混合物を用いて脂肪酸プロファイルを解析したところ、セラミドにd18:1-C24:1, d18:1-C24:0, d18:1-C18:0, d18:1-C26:1, d18:1-C22:0およびd18:1-C24:1hを持つsulfatideが主に検出され、さらに微量ながらもd18:1-C26:1h,d18:1-C24:0hおよびd18:1-C22:0hなどヒドロキシ脂肪酸をもつsulfatideも検出された。
【考察】キラルカラム分離法と多段階MRMを組み、今後は微量なスフィンゴ糖脂質の網羅的な解析を行うことで、未知の分子種に対して分子種レベルでの代謝変動を解析することが可能となる。

P-77

LC-MS/MSを用いた、ろ紙血中ムコ多糖症原因酵素（IDUA，IDS，NAGLU, GALNS, ARSB）の同時スクリーニング法の確立

小林 弘典[1,2]，大國 翼[2]，野津 吉友[2]，田中 美砂[3]，渡辺 淳[3]，折居 建治[4]，深尾 敏幸[4]，
戸松 俊治[1,6]，Michael H. Gelb[6]，山口 清次[1]，竹谷 健[1]，長井 篤[2]

[1]島根大学医学部 小児科，[2]島根大学附属病院臨床検査部 難病総合治療センター 検査部門，[3]島津製作所，
[4]岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学，[5]Nemours/Alfred I. DuPont Children's Hospital，
[6]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Washington

LC-MS/MS method to measure simultaneously 5 enzyme activities (IDUA, IDS, NAGLU, GALNS, ARSB) of mucopolysaccharidoses

Hironori Kobayashi[1], Tubasa Oguni[2], Yoshitomo Notsu[2], Misa Tanaka[3], Jun Watanabe[3], Kenji Orii[4], Toshiyuki Fukao[4], Shunji Tomatsu[1,5], Michael H. Gelb[6], Seiji Yamaguchi[1], Takeshi Taketani[1], Atsushi Nagai[2]

[1]Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine,
[2]Clinical Laboratory Division, Shimane University Faculty of Medicine, [3]SHIMADZU,
[4]Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University,
[5]Nemours/Alfred I. DuPont Children's Hospital,
[6]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Washington

【緒言】ムコ多糖症（MPS）は、ライソゾーム病の1つに分類される疾患であり、グリコサミノグリカン（GAG）の代謝経路における酵素群の先天的異常によって発症する。MPSの酵素群はろ紙血中であっても比較的安定であることから、ろ紙血中の酵素活性を測定することでスクリーニングを行う手法が実用化されている。今回我々は、日本で頻度の高いMPS I, II型を含む5疾患の酵素活性をLC-MS/MSを用いて分析する方法を確立した。

【対象・方法】健常新生児672例、およびMPS患者のろ紙血（I 1例、II型 10例、IIIB型 1例、IVA型 2例、VI型2例）を測定比較した。分析には96穴マイクロプレートのウェル中で3mmの血液ろ紙片1枚と5種類の酵素における基質、内部標準液を含むカクテルおよび緩衝液を16時間反応させた。UHPLC＋LC-MS/MS（Nexera、LCMS-8050、島津製作所）を用い、カラム（Penomenex Kinetex XB-C18 150 mm x 2.1 mm, 1.7 μm）分離による分析を行った。移動相は0.1%ギ酸＋水（A）および0.1%ギ酸＋アセトニトリル（B）とし、1検体の分析時間は6分、MRMモードで測定した。

【結果・考察】健常児の平均酵素活性はI型で4.19（標準偏差1.51、以下同）μM/h、II型8.39（3.08）μM/h、IIIB型1.96（0.56）μM/h、IVA型で0.50（0.21）μM/h、VI型2.64（1.01）μM/hであった。分析の再現性は良好であり、患者検体との区別が可能であった。これまで、I型とII型の酵素活性を同時分析する事は困難であったが、本法では良好なピーク分離を達成した。今後は分析時間の短時間化し、新生児マススクリーニングのために改良予定である。

P-78

探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI/MS/MS）とScheduled SRM法を用いた生体組織のインタクト・メタボロミクス法の構築

近藤 健太[1]，林 由美[2,3]，村田 匡[4]，土屋 弥月[1]，大原 倫美[1]，石川 哲也[2]，緒方 是嗣[4]，土橋 均[1]，石井 晃[1]，財津 桂[1,3]

[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学，[2]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，[3]名古屋大学 高等研究院，[4]島津製作所

Intact metabolomics for tissue samples by probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) with a scheduled SRM method

Kenta Kondo[1], Yumi Hayashi[2,3], Tasuku Murata[4], Mitsuki Tuchiya[1], Tomomi Ohara[1], Tetsuya Ishikawa[2], Koretsugu Ogata[4], Hitoshi Tsuchihashi[1], Akira Ishii[1], Kei Zaitsu[1,3]

[1]Department of Legal Medicine and Bioethics, Nagoya University Grad. School of Medicine, [2]Department of Radiological and Medical Laboratory Sciences, Nagoya University Grad. School of Medicine, [3]Institute for Advanced Research, Nagoya University, [4]Shimadzu Corporation

【目的】探針エレクトロスプレーイオン化法（PESI）は、前処理操作なしで対象成分を直接イオン化することが可能である。我々はPESIとタンデム質量分析を組み合わせたPESI/MS/MSによるインタクト・メタボローム解析法の構築を進めてきた[1,2)]が、多成分を一斉分析するためにはScheduled SRM法との組合せが不可欠であった。Scheduled SRMを用いた場合、PESIとMSの取込み周期の微細なずれから「ばらつき」が生じ易くなるが、臓器試料の直接分析ではIS補正が難しいため、補正法の検討が不可欠となる。そこで本研究ではPESI/MS/MSとScheduled SRM法を組合せたインタクト・メタボロミクス法を構築し、データ補正法を検討した。さらに本法を急性肝障害モデルマウスに応用し、実用性を検証した。

【方法】装置: 島津製作所製PESIイオン源およびLCMS-8040タンデム質量分析計を用いた。補正法の検討：外部標準法（ES法）あるいは総強度補正法（TI法）を検討した。ES法：5種類の安定同位体標識化合物の混合液を試料測定前に分析し、得られたピーク面積値の平均で試料各成分の面積値を補正した。TI法：試料の分析で検出された全代謝物のピーク面積値の総和で、試料各成分の面積値を補正した。動物実験：10～11週齢ICR雄性マウスにアセトアミノフェン生理食塩水溶液（250 mg/kg）または生理食塩水を腹腔内投与した（n=5）。投与後15時間絶食した後、肝臓を採取して急速凍結した。得られた結果について、TI補正を行った後、SIMCA-P+による多変量解析およびRによる有意差検定を行った。

【結果及び考察】ES補正では、データのばらつきが抑えられず、有効な補正法とならなかったが、TI補正法を用いることで約50成分のRSDを30%以内に抑えることができた。コントロールおよび肝障害モデルマウスの肝臓試料に本法を適用した結果、PCAスコアプロットにおいて2群は良好に分離し、特定の成分において有意な変動が観察されたことから、本法の高い実用性が示された。

【引用文献】

1)K. Zaitsu et al. ***Anal. Chem.*** 2016

2) Y. Hayashi et al. ***Anal Chim. Acta*** 2017.

P-79

探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI/MS/MS）を用いたin vivoリアルタイム・モニタリングシステムの構築

林由 美[1,2]，財津 桂[1,3]，村田 匡[4]，土橋 均[3]，石井 晃[3]，緒方 是嗣[4]，石川 哲也[2]

[1]名古屋大学 高等研究院，[2]名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学，
[3]名古屋大学大学院医学系研究科 法医生命倫理学，[4]島津製作所

In vivo real-time monitoring of metabolites in a living mouse by probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS)

Yumi Hayashi[1,2], Kei Zaitsu[1,3], Tasuku Murata[4], Hitoshi Tsuchihashi[3], Akira Ishii[3], Koretsugu Ogata[4], Tetsuya Ishikawa[2]

[1]Institute for Advanced Research, Nagoya University,
[2]Department of Radiological and Medical Laboratory Sciences, Nagoya University Grad. School of Medicine,
[3]Department of Legal Medicine & Bioethics, Nagoya University Grad. School of Medicine, [4]Shimadzu Corporation

【目的】これまでに我々はin vivo実験系とメタボローム解析による病態解析[1)]や妊娠期低栄養が胎児へ及ぼす影響[2)]を評価してきた。しかし、マウス等の解剖によって得られた生体試料から観察されたメタボロームの変化を解釈するためには、恒常性による復元過程を加味する必要があり、結果の解釈に難渋することもある。さらに、解剖は生体の死を伴うため、観察されたメタボローム・プロファイルには死後変化の影響が否定できない。これらの問題を解決するためには、生きている生体から直接、メタボライトの変化を観察する手法が不可欠と考えられる。我々はこれまでに低侵襲サンプリングと化合物の直接イオン化を達成でき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を組み合わせたPESI/MS/MS[3)]を用いてリアルタイム分析を達成している[4)]。そこで本研究では、PESI/MS/MSに可動型ステージを組み合わせたin vivoリアルタイム・モニタリングシステムを構築した。
【方法】装置：島津製作所製LCMS-8040およびPESIイオン源を用いた。三軸方向に微細制御が可能な可動型ステージを質量分析計の前段部に設置した。動物実験：ICR雄性マウスについて、麻酔下で開頭手術あるいは開腹手術を行い、イオン化を促進するための特殊サンプルカップを固定した。その後、マウスを可動型ステージに移し、穿刺位置を微調整後、麻酔下でPESI/MS/MSによる分析を行った。分析条件：各化合物に最適なSRM transitionを設定し、0.05～0.1 Hzの周期でリアルタイム・モニタリングを行った。
【結果】本システムによって、生きているマウスの脳内メタボライトを最大3時間リアルタイム・モニタリングすることに成功した[5)]。肝臓内メタボライトについても最大1時間、リアルタイム・モニタリングすることに成功した。本手法は、メタボライトの恒常性を可視化する技術として、今後の応用展開が強く期待できる。

【引用文献】
1) K. Zaitsu, Y, Hayashi et al. *Life Sci.* 2015
2) 林ら、第87回日本衛生学会総会，2017
3) Y. Hayashi et al. *Anal. Chim. Acta.* 2017
4) K. Zaitsu, Y. Hayashi, et al. *Anal. Chem.* 2016
5) K. Zaitsu, Y. Hayashi, et al. *Anal. Chem*. 2018

P-80

自動前処理装置「ATLAS」とLC/Q-TOFMSを用いた肝臓中薬物スクリーニング法の構築

松本 謙吾[1]，財津 桂[1]，草野 麻衣子[1]，三浦 仁美[1]，篁 直樹[2]，渡邊 勉[2]，石丸 麗子[3]，地中 啓[3]，片木 宗弘[4]，三木 昭宏[4]，土橋 均[1]，石井 晃[1]

[1]名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学，[2]島津エンジニアリング，
[3]石川県警科捜研，[4]大阪府警科捜研

Non-target screening system for drugs in liver using an automated sample pretreatment apparatus “ATLAS” and LC/Q-TOFMS

Kengo Matsumoto[1], Kei Zaitsu[1], Maiko Kusano[1], Hitomi Miura[1], Naoki Takamura[2], Tsutomu Watanabe[2], Reiko Ishimaru[3], Satoshi Chinaka[3], Munehiro Katagi[4], Akihiro Miki[4], Hitoshi Tsuchihashi[1], Akira Ishii[1]

[1]Dept. of Legal Medicine & Bioethics, Nagoya University Graduate School of Medicine, [2]Shimadzu Engineering Inc., [3]Forensic Science Laboratory, Ishikawa Prefectural Police Headquarters,
[4]Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police Headquarters

【目的】法医学分野では血液や尿試料の採取が困難な場合、臓器を分析する必要が生じるため、臓器試料を対象とした薬物スクリーニング法の確立が不可欠である。しかし、臓器試料の前処理は一般に煩雑であり、簡便な薬物スクリーニング法は未だ確立されていない。そこで本研究では、肝臓試料を対象とし、自動前処理装置「ATLAS」と液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析 (LC/Q-TOFMS) を組み合わせた薬物スクリーニング法の構築を試みた。

【方法】試料：睡眠薬、三･四環系向精神薬、覚せい剤･麻薬類を添加したブタ肝臓150 mgに溶媒 (0.2 M KCl/0.2 M NaOH, pH=12.4) 750 μLを加え、細胞破砕機にてホモジェナイズを行い、遠心後に得られた上清を試料とした。この上清500 μLを島津エンジニアリング製「ATLAS」を用いて、酢酸エチルによる液-液抽出法にて自動処理したものを分析試料とした。分析装置：島津製作所製NexeraX2及び Sciex製TripleTOF5600、分析条件：L-column 2 ODS (1.5 x 50 mm, 3 um; 化学物質評価研究機構)、移動相：[A] 10 mMギ酸アンモニウム-5%メタノール溶液、[B] 10mMギ酸アンモニウム-95%メタノール溶液によるリニアグラジエント (0-15 minで[A]100% → [B]100%)、イオン化法：ESI法 (positive)、測定モード：IDA およびプロダクトイオンスキャン (PIS)。

【結果と考察】ATLASによる肝臓中薬物の回収率は睡眠薬が24～76%、三･四環系向精神薬が22～78%、覚せい剤・麻薬類が28～86%であった。さらに、薬物添加肝臓試料 (各10 ng/g) をATLASで処理した後、LC/Q-TOFMSによるスクリーニング分析を実施した。IDAおよびPISモードによる分析を組み合わせることで、全ての対象薬物を検出することが可能であり、本手法が臓器からの薬物スクリーニング法として有効であることが示された。

P-81

玄米米糠発酵食品（FBRA）のオミクス研究へのアプローチ：LC-MSによるステリルグルコシドの定量

池川 繁男[1]，神 繁樹[2]，伊藤 麻里[3]，根本 英幸[3,4]，堀江 裕紀子[3,4]，東 達也[4]，佐々木 隆浩[5]，村井 毅[5]

[1]（株）玄米酵素，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，[3]（株）コーケン，
[4]東京理科大学 薬学部，[5]北海道医療大学 薬学部

Approach to Omics Research of Fermented Brown Rice and Rice Bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA): Quantitation of Steryl Glucosides by LC-MS

Shigeo Ikegawa[1] Shigeki Jin[2], Mari Itoh[3], Hideyuki Nemoto[3], Yukiko Horie[3,4], Tatsuya, Higashi[4], Takahiro Sasaki[5], Tsuyoshi Murai[5]

[1]Genmaikoso Co. Ltd., [2]Department of Health Sciences, School of Medicine, Hokkaido University,
[3]Koken Co. Ltd., [4]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,
[5]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Health Science University

【目的】近年、玄米と米糠を黄麹菌によって発酵させた健康食品「Fermented Brown rice and Rice bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA)」の認知症や生活習慣病の予防に果たす役割に多くの期待が寄せられている。しかしながら、農産物に由来するFBRAは種々の要因によって成分が質的・量的に大きく変動し、FBRAの機能性担保や品質管理は困難な課題である。そこで今回、LC -MSによるオミクス研究法の有用性に着目し、発酵の効果の実証、機能性担保と品質評価のみならず機能性成分の体内動態解析の一助として、糖尿病や動脈硬化症の改善効果が示されているステリルグルコシド (SG) のLC -MSによる定量法に検討を加えた。

【方法】植物ステロール3種 (カンペステロール、β-シトステロール、スチグマステロール) のグルコシド並びに内標準物質としてのコレステリルグルコシドをKoenigs-knorr反応によって合成した。LC-MSは装置に4000 QTRAP® LC/MS/MS System (Sciex)、分離カラムにKinetex XB-C18 (5 cm × 2.1 mm i.d., 2.6 μm)、移動相に5 mMギ酸アンモニウムを含むメタノール/2-プロパノール/水 (9:1:1) を用いた。

【結果】始めに、正イオン検出 ESI-MS スペクトルを測定し、いずれのSGもアンモニウム付加イオン$[M+NH_4]^+$を与え、MS/MSスペクトルでは糖部が脱離した$[M+NH_4\text{-glucose}]^+$を相対強度の強いイオンとして与えることを明らかにした。また、これらのSRMトランジションによって3種のSGが明確に分離され、1-200 pmol/mL の範囲でr^2が0.9980以上の良好な直線性を示す検量線が得られ、測定感度は0.5 pmol/mL (S/N=5) であった。固相抽出法を組み合わせて未発酵原料とFBRA中SGの定量法を開発し、本法によってβ-シトステロールの含量が最も高く、糖部6位水酸基が発酵によってアシル化される可能性を明らかにした。

【考察】今回開発した定量法は感度・特異性に優れ、FBRAの発酵の効果の実証、機能性担保と品質評価のみならず、SGの体内動態を解析する上にも大きく役立つものと期待される。

P-82

食餌由来脂肪肝モデルマウスにおいて鮭白子抽出物の摂取は肝機能障害の改善とミトコンドリアを活性化させる

櫻井 俊宏[1,2]，早坂 孝宏[1,2]，関口 博太[2,3]，佐藤 浩志[2,4]，陳 震[1,2]，千葉 仁志[1,2,5]，惠 淑萍[1,2]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院,
[2]北海道大学 産学・地域協働推進機構フード＆メディカルイノベーション推進本部 日生バイオ・ライフサイエンス研究所 食と健康研究部門，[3]株式会社ライフ・サイエンス研究所，[4]日生バイオ株式会社，[5]札幌保健医療大学

Dietary salmon milt extracts diminished liver injury and induced mitochondrial activation in diet-induced mice

Toshihiro Sakurai[1,2], Takahiro Hayasaka[1,2], Hirotaka Sekiguchi[2,3], Hiroshi Satoh[2,4], Zhen Chen[1,2], Hitoshi Chiba[1,2,5], Shu-Ping Hui[1,2]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University,
[2]Department of Food and Health Research, Life Science Institute Co. Ltd. and Nissei Bio Co. Ltd, Center for Food and Medical Innovation, Institute for the Promotion of Business-Regional Collaboration, Hokkaido University,
[3]Life Science Institute Co., Ltd., [4]Nissei Bio Co. Ltd., [5]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

【目的】核酸の経口摂取は生体に様々な効果をもたらすことが報告されてきた。本研究では核酸成分が豊富な鮭白子抽出物 (Salmon milt extract, SME) の経口摂取が肝障害の緩和に効果があるかどうかについて、食餌由来の脂肪肝モデルマウスを用いて調査した。また、脂肪肝の患者ではミトコンドリアの活性低下が見られることから、脂肪肝の予防はミトコンドリア機能の維持に重要である。我々はそのモデルマウスの肝のプロテオミクス解析を行い､特にミトコンドリア機能に関連するタンパク質の発現量を調査した。
【方法】21匹の7週齢雄のddYマウスを普通食群 (normal chow diet, NCD) (n = 3)、高炭水化物食群 (high carbohydrate diet, HCD) (n = 6)、1% SME添加HCD群 (n = 6)、10% SME添加HCD群 (n = 6) の4群に分けた。後者の3群では過食状態にするために、マウスを2日間絶食させた後、それぞれの飼料を5日間与えた。屠殺後、肝臓及び血清を得た。
【結果】NCD群に比較して、HCD群では血清ALTは1.7倍の高値を示した。1%SME群及び10%SME群では血清ALTが低値を示した ($P < 0.05$)。HCD群、1%SME群及び10%SME群では肝組織切片のOil Red O染色陽性脂肪滴の著増が観察されたが、その3群間で有意な差はなかった。肝*Tnfα*のmRNA発現量は、HCD群に比べて10%SME群で有意に減少した ($P < 0.05$)。プロテオーム解析により、HCD群に比べてSME添加群でミトコンドリア関連タンパク質 (PPARGC1A, PPARα, CPT1, Thioredoxin, cardiolipin synthase) の増加がみられた。
【考察】SMEの経口摂取は食餌由来脂肪肝モデルマウスの肝障害を改善し、また、ミトコンドリアの機能を活性化させる可能性が示唆された。

P-83

破骨細胞の分化を阻害する化合物（ursolic acid）の新しい標的タンパク質の発見

譚 慧[1]，千葉 仁志[2]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]札幌保健医療大学

Nuclear export exportin -5 as a target for ursolic acid regulates bone resorption

Hui Tan[1], Hitoshi Chiba[2], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of health science, Hokkaido university, [2]Sapporo University of Health Sciences

【目的】Osteoclasts are multinucleated cells that are responsible for the resorption of bone, and thus conventional strategies for treating osteoporosis have focused on eliminating these cells. Ursolic acid (UA) is a pentacyclicterpenoid carboxylic acid that is present in a wide variety of plant foods. There are many beneficial health effects that are attributed to the properties of UA. Our previous study revealed that UA suppressed osteoclastogenesis, but the mechanism of action of UA on osteoclastogenesis is not totally understood.

【方法】To help clarify the mechanism of action, we performed an affinity-based proteomic screening using polymer-coated magnetic nanobeads and LC/MS to identify the potential target proteins.

【結果】We examined structure-activity relationship between UA and its analogs, and we found the carboxyl group (-COOH) of UA did not influence its activity so much. So we use various concentrations (0.4, 2 and 10 mM) of UA (-COOH) fixed to magnetic beads with NH2 linker, and incubate with four different cell fractionations. Through intensively binding, washing and elution in different cell lysis, three UA-binding proteins target candidates were purified from cytosolic fraction. By competitive inhibition in screening, which by adding free UA in advance in cytosolic protein, we confirmed the one candidates for target protein were dramatically vanished. By LC/MS, we identified exportin 5 (XPO5), a nuclear exporter protein, as a possible target protein of UA. Further studies demonstrated that XPO5 knockdown significantly blocks osteoclast differentiation.

【考察】Collectively, our findings provided novel mechanistic insight into the actions of XPO5 as a cellular target of UA and into the function of XPO5 in osteoclastogenesis. This study revealed a potential target for drug intervention and a new therapeutic treatment for bone-related diseases.

P-84

Estimation of cadmium residues in animal byproducts using ICP/MS: Health risk assessment, in-vitro cadmium induced adverse effects and protection with ascorbic and rosmarinic acids

Wageh Sobhy Darwish[1,2], Hitoshi CHIBA[3], Shu-Ping HUI[1]

[1]Laboratory of lipid analysis, Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, Kita 12, Nishi 5, Sapporo, Japan,
[2]Food Control Department, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, 44519, Zagazig, Egypt,
[3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences, Nakanuma Nishi 4-2-1-15, Higashi Ku, Sapporo 007-0894, Japan

Purpose: Cadmium (Cd) is one of the toxic metals that are found ubiquitous in nature and can contaminate human food and environment. Cadmium is of no known biological function, but it is linked to many human health toxicological implications including hepatic failure, nephropathy, neurological syndromes, mutagenesis and carcinogenesis. Therefore, this study was undertaken to estimate the residual concentrations of Cd in human food of animal origin distributed in Egypt. A health risk assessment was conducted via estimation of daily intake (EDI), hazard quotients (HQ) and incremental lifetime cancer risk (ILCR). In addition, an *in-vitro* study was taken to investigate Cd-induced cytotoxic and genotoxic effects in human Hepatoma (HepG2) cells under food-relevant concentrations. Finally, protection trials against Cd-induced adverse effects were conducted using ascorbic and rosmarinic acids.

Methods: Cadmium residual concentrations were measured in 15 animal-derived food matrices including meat, milk, cheese, edible offal, fish and shellfish marketed in Egypt using inducible coupled-plasma mass spectrometry. HepG2 cells were exposed to food-relevant concentrations of Cd and subsequently cytotoxicity was checked using CCK-8 assay, reactive oxygen species (ROS) was measured using DCFDI as a substrate. Transcriptomic alterations in mRNA expressions of xenobiotic metabolizing enzymes (XMEs), antioxidant enzymes and their transcriptional factors were investigated using real-time quantitative PCR. Protection with either ascorbic or rosmarinic acids against Cd-induced adverse effects were analyzed. Cadmium-EDI, HQs and ILCR were calculated.

Results: The achieved results indicated relatively higher residual concentrations of Cd compared to the recommended maximum permissible limits by World Health Organization and European Union. The highest content of Cd was recorded in catfish, oyster, crab, cattle liver and kidney. EDI, HQ and ILCR indicated potential risks for Egyptian population because of the repetitive chronic exposure of such toxicant. Cadmium induced HepG2 cytotoxicity at 10 μM. Additionally, Cd led to production of ROS in a concentration-dependent fashion. Moreover, Cd caused significant downregulation on antioxidant, detoxification enzymes and drug transporters. Unlikely, Cd induced inflammation markers and growth factors. Co-exposure of HepG2 cells to both Cd and either ascorbic or rosmarinic acids significantly recovered HepG2 cells and modulated the cytotoxic and genotoxic effects on a mechanistic-dependent way.

Discussion: This study indicated the potential exposure of Egyptian population to elevated concentrations of Cd, which might have significant health hazards. Cadmium had significant cytotoxic and genotoxic effects, which can be prevented by micronutrients such as ascorbic and rosmarinic acids.

P-85

Lead-induced alterations in lipid hemostasis in human liver (HepG2) cells and protection with rosmarinic and ascorbic acids

Yonghan LI[1], Wageh Sobhy DARWISH[1,2], Zhen CHEN[1], Yue WU[1], Hitoshi CHIBA[3], Shu-Ping HUI[1]

[1]Laboratory of lipid analysis, Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, Kita 12, Nishi 5, Sapporo, Japan,
[2]Food Control Department, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, 44519, Zagazig, Egypt,
[3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences, Nakanuma Nishi 4-2-1-15, Higashi Ku, Sapporo 007-0894, Japan

Purpose: Lead (Pb) is a ubiquitous environmental contaminant that is released in the environment via car exhausts, tobacco smoke and other anthropogenic activities. Lead is classified as a human carcinogen and it is responsible for many deaths around the world as in Zambia, Nigeria and China. Lead is also linked to multiple neurological and hepatic dysfunctions. Our previous report indicated induction of oxidative stress in human HepG2 cells exposed to environmental-relevant concentrations of Pb. However, studies related to Pb-induced alterations in lipid hemostasis are less informed. Therefore, this study was taken to firstly, confirm Pb-induced cytotoxic and oxidative stress in human Hepatoma (HepG2) cells under food-relevant concentrations of Pb. Secondly, to investigate Pb-induced alterations in lipid hemostasis in this liver cell line. Thirdly, to investigate the possible mechanisms behind these effects. Finally, to examine the protective effects of either ascorbic or rosmarinic acids against Pb-induced cytotoxicity, oxidative stress and alterations in lipid metabolism in HepG2 cells.

Methods: HepG2 cells were exposed to food-relevant concentrations of Pb alone or in combination with ascorbic or rosmarinic acids and subsequently cytotoxicity was checked using CCK-8 assay, reactive oxygen species (ROS) was measured using 2',7'-dichlorofluorescin diacetate as a substrate. Alterations in lipid profile was tested using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Transcriptomic alterations in mRNA expressions of lipid metabolizing enzymes were investigated using real-time quantitative PCR. Finally, protective effects of ascorbic or rosmarinic acids against Pb-induced cytotoxicity and oxidative stress in HepG2 cells were examined.

Results: The achieved results indicated HepG2 cytotoxicity after exposure to food-relevant concentrations of Pb. Furthermore, Pb induced oxidative stress, in terms of high production of ROS, in a concentration-dependent model. In parallel, Pb caused a significant production of lipid radicals, demonstrated by the high production of the hydroperoxides of either triglycerides or phosphatidyl cholines.. Interestingly, Pb caused significant transcriptomic changes in lipid metabolizing and antioxidant enzymes. As a protection approach, both ascorbic and rosmarinic acids significantly reduced Pb-induced ROS in a mechanistic way.

Conclusions: This study indicated that ROS production by Pb might occur through its modulatory effects on lipid hemostasis. The protective effects of both ascorbic and rosmarinic acids against Pb-induced cytotoxicity and oxidative stress are very promising and the mechanisms behind these effects were explained.

P-86

低濃度オゾンによる不飽和リン脂質膜の酸化に関する研究

喬 琳[1]，陳 震[1]，高田 俊智[2]，呉 玥[1]，千葉 仁志[1,3]，叶 深[2]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]東北大学大学院 理学研究科，[3]札幌保健医療大学

Study on the Oxidation of the Unsaturated Phospholipid Monolayer in Low-level Ozone

Lin Qiao[1], Zhen Chen[1], Shunchi Takada[2], Yue Wu[1], Shen Ye[2], Hitoshi Chiba[1,3], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of health science, Hokkaido university,
[2]Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, [3]Sapporo University of Health Sciences

Aim: As one of the major components of the cell membrane, the unsaturated lipids play essential biofunctions. But the C=C bond in the alkyl chain is a weak spot that can be easily attacked by reactive oxidation species (ROS) such as ozone, which is a universal air pollutant with high oxidation reactivity. In our daily life, the influence of ozone is often ignored since its concentration in the air is extremely low, only few tens of ppb. In the present study, the oxidative degradation of the unsaturated phospholipid in *low-level* ozone (20-40ppb) is studied at a molecular level.

Methods: The single or binary mixed monolayers of a saturated lipid (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) and two unsaturated lipids (dipalmitoylphosphatidylcholine, DOPC and 1-palmitoyl-2-oleoyl -sn-glycero-3-phosphocholine POPC) were made by LB method on the water surface (22°C) in an atmosphere-controlled chamber. The ozone concentration was kept in range of 20-40ppb. The phase states, molecular structure and surface morphology of these monolayers were characterized by pressure-area (π–A) isotherms, atomic force microscopy (AFM), and *in-situ* sum frequency generation (SFG) vibrational spectroscopy respectively. The oxidation products of POPC were further analyzed by high-resolution Orbitrap LC-MS/MS system.

Results and Discussion: All the lipid monolayers are stable in the nitrogen environment. However, when a small amount of ozone (20-40 ppb) is introduced into the chamber, only the saturated lipid, DPPC, keep stable, while all the monolayers which contains unsaturated lipids become quite instable. SFG observations demonstrated C=C bond in unsaturated lipid is attacked by ozone, and the terminal nine-carbon portion is get away from the monolayer. The results of LC-MS show several kinds of oxidized lipids are generated after ozone exposure, and the amount of them are strong related with surface pressure and exposure time. The present study provides important information for understanding the properties and stabilities of the cell membranes in ambient environment.

P-87

環境濃度オゾンによるHepG2細胞の酸化に関する研究

朱 子健[1]，喬 琳[1]，陳 震[1]，呉 玥[1]，千葉 仁志[1,2]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]札幌保健医療大学

Study on the Oxidation of Ambient-level Ozone on HepG2 Cells

Zijian Zhu[1], Lin Qiao[1], Zhen Chen[1], Yue Wu[1], Hitoshi Chiba[1,2], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of health science, Hokkaido university, [2]Sapporo University of Health Sciences

Aims: Ozone is famous for preventing harmful ultraviolet radiation to reaching the earth in the stratosphere, but it is also a common environmental toxicant to the individuals on a daily basis near the earth surface, because of its extremely high oxidative reactivity. The concentration of ozone near the earth surface is low, typically a few tens of ppb. But in many polluted suburban areas it can increase to 100 ppb or even higher. Ozone is hypothesized to initiate intracellular oxidative stress and induce the inflammation in human body through the formation of lipid peroxide. These lipid peroxide are likely to activate gene transcription through a redox-mediated signaling pathway that governs the cascade of injury, repair, and other cellular responses associated with the oxidant burden. On the other hand, the liver plays a key role in lipid metabolism and is the hub of fatty acid synthesis and lipid circulation in human body. The present study aims to study on the effects of ambient-level ozone on the human liver cancer cell HepG2 by analyzing oxidized lipids qualitatively and quantitatively.

Methods: The human liver cancer cell HepG2 were cultured as the study models. The cells were exposed to ozone in vitro in a concentration-controlled exposure chamber. The ozone concentration is controlled in the range of 0-150 ppb. Then, the cytotoxicity assay and the cell viability assay were measured. Furthermore, the lipids composition of the cell, both before and after ozone exposure, were qualitative and quantitative analyzed by high-resolution Orbitrap LC-MS system.

Results and Discussion: The results of the cytotoxicity and the cell viability studies shows the ambient-level ozone has strong effect on the cell activity. And various oxidized lipids are identified by the LC-MS/MS. The amount and molecular species of the oxidized lipids have strong relationship with the concentration of ozone and the exposure time in ozone.

P-88

混合単分子膜の低濃度オゾンによる酸化に及ぼすコレステロール添加の影響

渡部 勇樹[1]，喬 琳[2]，陳 震[2]，高田 俊智[3]，呉 玥[2]，叶 深[3]，千葉 仁志[1,2,4]，惠 淑萍[1,2]

[1]北海道大学医学部 保健学科，[2]北海道大学大学院 保健科学研究院，
[3]東北大学大学院理学研究科 化学専攻，[4]札幌保健医療大学

Effect of Cholesterol on the Oxidation of Mixed Monolayer under Low-level Ozone

Yuki Watanabe[1], Lin Qiao[2], Zhen Chen[2], Shunchi Takada[3], Yue Wu[2], Shen Ye[3], Hitoshi Chiba[1,2,4], Shu-Ping Hui[1,2]

[1]Department of Health Sciences, School of Medicine, Hokkaido university,
[2]Faculty of health science, Hokkaido university,
[3]Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, [4]Sapporo University of Health Sciences

【目的】オゾンは酸化力が強く、高濃度では眼や上気道など人体の様々な部位を傷害する。しかし、大気中に存在する低濃度オゾンの健康への影響はあまり知られていない。一方、細胞膜に含まれるコレステロールは、膜の流動性の維持や、細胞膜の透過性の減少に関係している。本研究では、低濃度オゾン下の脂質膜酸化にコレステロール添加がどのような影響を及ぼすかを観察し、反応機構について考察する。
【方法】実験で使用した脂質はコレステロール、不飽和リン脂質PC 16:0/18:1、飽和リン脂質PC16:0/16:0の三種類である。これらの脂質を用いて水表面に脂質の単分子膜を作製し、オゾンに暴露した。この際、三種類の脂質の割合、脂質膜の密度、オゾン暴露時間、オゾン濃度を変化させた。暴露終了後の脂質は回収し、高分解能質量分析法 (Orbitrap LC/MS) により酸化脂質の分子種や量を解析した。
【結果】酸化脂質としてSecond ozonide (SOZ) が検出された。また、コレステロールを含む脂質膜では、PC 16:0/18:1単分子膜やPC 16:0/18:1とPC16:0/16:0の混合分子膜 (1:1) よりもSOZが増加した。そして、オゾン濃度が高くなると、コレステロールを含む膜では、他の単分子膜より、酸化された脂質の量が大きい変化を発見した。
【考察】以上の結果から、低濃度オゾン下の脂質単分子膜の酸化に関して、コレステロールは大きな影響を与えることが明らかとなった。コレステロールの膜への導入は、膜のパッキング状態を変化させ、脂質酸化に影響を与えたと考えられる。

P-89

発達期における高脂肪食摂取が成熟期の活性酸素代謝に関わる必須微量金属の動態に及ぼす影響 －ICP-MS/MSによる分析－

山﨑 尚二郎[1]，木村 豪[1]，佐藤 伸[2]，藏崎 正明[3]，Md. Tajuddin Sikder[4]，齋藤 健[4]

[1]北海道大学大学院 保健科学院，[2]青森県立保健大学 栄養学科，
[3]北海道大学大学院 地球環境科学研究院，[4]北海道大学大学院 保健科学研究院

Effects of high-fat diets during developmental stage on the dynamics of trace metals involved in reactive oxygen metabolism in adult male rat -Analysis by inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry-

Shojiro Yamasaki[1], Goh Kimura[1], Shin Sato[2], Masaaki Kurasaki[3], Md. Tajuddin Sikder[4], Takeshi Saito[4]

[1]Graduate school of health science, Hokkaido University,
[2]Department of Nutrition, Aomori University of Health and Welfare,
[3]Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University, [4]Faculty of health science, Hokkaido University

【目的】NAFLDなどの生活習慣病の要因の一つとして、体内の活性酸素及び酸化ストレスがあげられるが、その代謝には必須微量金属が関わっている。胎児期や乳児期といった、発達期における母親の高脂肪食摂取が子どもの将来的な生活習慣病リスクを増加させることが明らかになってきているが、必須微量金属の体内動態に及ぼす影響は明らかになっていない。本研究は発達期における高脂肪食摂取が活性酸素代謝及び必須微量金属動態への影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】Wister系雌ラットに妊娠中 (3週間)、授乳中 (3週間) を通じて高脂肪食 (HF; 45% Fat) または標準食 (C; 5% Fat) を与えた。離乳後の雄性仔ラットにはHFあるいはCを与え、51週齢まで飼育したのち、血液と肝臓を採取した。その後、ICP-MS/MSを用いて肝臓中必須微量金属 (Mn、Fe、Cu、Zn、Mo) を測定した。加えて、肝臓中の活性酸素代謝酵素量及び活性酸素代謝物の測定を行った。
【結果】ICP-MS/MSによる金属元素量の測定により、HF摂取が仔ラットの肝臓へのFe蓄積を誘導する一方で、Mn、CU、Zn、Mo量には影響を及ぼさないことが示された。さらに、活性酸素代謝酵素及び活性酸素代謝物の測定により、若干の知見を得ることができた。
【考察】肝臓への過剰なFeの蓄積は活性酸素の発生を誘導することが報告されている。今回の結果より、発達期におけるHF摂取は成熟期において酸化ストレスを増加させる可能性が示唆された。

講演要旨

ランチョンセミナー

LS1　新規試薬による高純度エクソソームの調製とプロテオミクス解析

演者：栗本 綾子（合同会社みらか中央研究所）

共催：株式会社エスアールエル

LS2　LC/ESI-MS/MSにおける誘導体化の威力：ビタミンD代謝物の高感度・高選択的定量

演者：東 達也（東京理科大学 薬学部）

共催：日本電子株式会社

LS3　島津製作所質量分析最新情報のご紹介

演者：渡辺 淳，緒方 是嗣（株式会社島津製作所）

共催：株式会社島津製作所

LS4　質量分析による分子イメージング最新情報

演者：韮澤 崇（ブルカージャパン株式会社）

共催：ブルカージャパン株式会社

新規試薬による高純度エクソソームの調製とプロテオミクス解析

栗本 綾子
合同会社みらか中央研究所

Proteomic analysis of exosome purified using a novel reagent

Ayako Kurimoto
Miraca Research Institute G.K.

【目的】細胞外小胞は様々な細胞から分泌される膜構造を有する微小な小胞であり、その分泌経路や大きさにより、エクソソーム (40-120nm)、マイクロベシクル (50-1,000nm)、アポトーシス小体 (500-2,000nm) などに分けられている。これら細胞外小胞は血液・尿・唾液など様々な体液中に存在することが知られている。なかでもエクソソームおよびマイクロベシクル内に存在するタンパク質、mRNA, miRNA等が他の細胞に取り込まれることで細胞間の情報を伝達し、癌の転移、血管新生など様々な疾患に関与すると考えられている。

近年、エクソソームを含む細胞外小胞を対象とした診断及び創薬に関する応用研究が盛んに進められている。しかしながら、エクソソームの回収方法及び解析方法は統一化や、標準化がなされておらず、再現性や回収してきたエクソソームの質についてばらつきがあると指摘されている。そこで、我々は高純度なエクソソームの回収法の確立を試みた。

【方法】我々が調製した試薬を培養細胞の培養上清、血液検体及び尿検体に添加したのち、免疫沈降法及び超遠心法によりエクソソームを回収した。これら回収サンプルについてウエスタンブロッティング、ナノサイト及び質量分析にて本方法の性能を評価した。

【結果】本方法を用いることで、免疫沈降法及び超遠心法でエクソソームが高純度で回収できることがウエスタンブロッティング、ナノサイトにより示された。また、質量分析においても同定数が増える、非特異的なタンパク質の検出が抑えられるなど良好な結果が示された。さらには、前処理に用いる界面活性剤の種類を変えた際に同定されるたんぱく質が異なることが明らかとなった。

【考察】本方法を用いることで、培養上清および各種検体より高純度にエクソソームが回収されることが明らかとなった。今後は、本方法により回収されるエクソソームの解析方法の確立を進めていく予定である。

LC/ESI-MS/MSにおける誘導体化の威力：ビタミンD代謝物の高感度・高選択的定量

東 達也
東京理科大学 薬学部

Derivatization is a powerful tool for sensitive and specific determination of vitamin D metabolites by LC/ESI-MS/MS

Tatsuya Higashi
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

LC/ESI-MS/MS では複数の手法，すなわち，① LC = 疎水性 / 親水性などの物性に基づいて分ける；②MS = 質量 (正確には*m/z*) に基づいて分ける；③SRM = フラグメンテーションによって分ける；④内標準物質 (IS) を用いて比較して測る，これらの連結により高い特異性とS/N，精度，正確度が得られ，低分子化合物定量のゴールドスタンダードとも言われる．しかし，測定対象のESI-MS応答性が低い場合，感度不足が問題となる．また，汎用される三連四重極型装置ではMS/MSにおけるフラグメンテーションが限定され，SRMが困難なことも多い．さらにMS (/MS) では立体異性体の識別は基本的に不可能で，それによる測定妨害を排除するにはLCによる分離に依存するしかない．ビタミンD代謝物の定量では，正にこれらの問題が立ちはだかる．ビタミンD欠乏は，くる病，骨粗鬆症などの骨疾患のみならず，がん，糖尿病，多発性硬化症，統合失調症などとの関連が明らかとされ，ビタミンD代謝物の測定需要が高まっている．

ESI活性原子団の導入と共に適度にフラグメンタブルな部位が形成される誘導体化は，上記問題の有効な解決策の一つである．我々は新規Cookson型誘導体化試薬，4-(4-dimetylanimo- phenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD) を開発した．DAPTADはビタミンD代謝物と選択的かつ定量的に反応し，ESI活性な誘導体を与えると共に，それはMS/MSにおいて特徴的プロダクトイオンを生成する．さらに，本誘導体化により通常の逆相分配LCにおいて，25-ヒドロキシビタミンD_3 [25(OH)D_3，ビタミンD供給状態の指標] とその3-epi体 (不活性妨害代謝物) との十分な分離が達成される．その結果，同位体希釈－LC/ESI-MS/MSによって血漿 (5 μL) 中の25(OH)D_3が高い精度・正確度で定量可能であった．また，上記手法にDAPTADアイソトポログ ($^2H_0$-，$^2H_3$-及び$^2H_6$-DAPTAD) を組み合わせると，分析スループットの向上も可能である．すなわち，血漿3検体にISを加え，それぞれを前処理し，DAPTADアイソトポログで誘導体化後，混合してLC/ESI-MS/MSに付した．その結果，高い精度・正確度を維持したまま，3検体の同時定量が可能になり，LC/MS/ MS運転時間が従来の1/3に短縮された．なお，DAPTAD誘導体化は血清/血漿中活性型ビタミンD_3 [1,25(OH)D_3] の定量 (千葉大・野村先生らとの共同研究) にも有効である．本セミナーではビタミンD代謝物分析を中心に，LC/ESI-MS/MSにおける誘導体化の “威力” を紹介したい．

島津製作所質量分析最新情報のご紹介

渡辺 淳，緒方 是嗣
株式会社島津製作所

Introduction of the Shimadzu mass spectrometry latest information

Jun Watanabe, Koretsugu Ogata
Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation

【四重極-飛行時間型質量分析計 (Q-TOF) LCMS-9030をリリース！】

島津製作所では、本年6月、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8000シリーズで培われた高速性能と高いイオン収束力を継承し、新たに飛行時間型質量分析の技術を開発・搭載した四重極-飛行時間型質量分析計 (Q-TOF) LCMS-9030を発売しました。

LCMS-9030は、UFgrating (高強度微細格子電極)、iRefTOF (理想リフレクトロン)、高精度温度コントロールシステムなど当社の独自技術を集積しており、優れた質量精度および高感度と高分解能の両立を実現。分子の構造解析に有効な情報を得ることができるHRAM (高分解能精密質量分析装置) を提供します。

【トリプル四重極型質量分析計LCMS-8000シリーズ最新アプリケーションの紹介】

トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8000シリーズでは、アミノ酸、糖、脂質など、多岐にわたる分析対象化合物の条件をパッケージ化したLC/MS/MSメソッドパッケージを製品化しております。

本年、腸内細菌叢 (腸内フローラ) によって産生される短鎖脂肪酸 (酢酸、プロピオン酸，酪酸など) および腸内細菌の中心代謝経路に代表される有機酸の定量分析をサポートする短鎖脂肪酸を対象としたメソッドパッケージ、イオンペア試薬を使わない画期的な分析メソッドで、日本、米国、EUにおいて規制対象となっている抗生物質を分析対象としたアミノグリコシド系抗生物質を対象としたメソッドパッケージ、をリリースしました。

本発表では、LCMS-9030など質量分析装置の最新情報、ならびに、メソッドパッケージなどアプリケーションの最新情報をご紹介いたします。

質量分析による分子イメージング最新情報

韮澤 崇
ブルカージャパン株式会社

Frontier of molecular imaging by mass spectrometry

Takashi Nirasawa
Bruker Japan K.K.

CT（コンピュータ断層撮影）、MRI（核磁気共鳴画像法）やPET（ポジトロン断層法）などの医療モダリティによる分子イメージングに加え、1994年以降、質量分析機を使用したイメージング質量分析（IMS）が開発されてきました。これは既存の方法とは異なり、物質固有の質量を用いて可視化させるため、より詳細な局在を捕らえることが可能です。さらに、放射性同位体ラベルを必要とせず、汎用性の高い可視化法の一つと言えます。生体組織切片等の平面状サンプルをX,Y軸、等間隔ピクセル状に分析を行い、分子量ごとに2次元で色分けして可視化する簡便な手法です。使用する質量分析計は、対象物質や目的に合わせて最適なものを選択します。タンパク質等の高分子量領域の解析には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）を、脂質や薬物・代謝物等の低分子量領域にはMALDIイオン源を搭載したフーリエ変換質量分析計（FT-ICR MS）を使用します。MALDI-TOF MSは広い質量領域を広い視野で高速スキャン（最大で50pixel/秒）できることが大きな特徴です。また、FT-ICR MSは、2000万以上の質量分解能を持ち、薬物・代謝物および内因性物質などのアイソバリックな物質を完全に分離し、可視化することができます。

IMSで得られるデータは膨大であり、手動での解析は非常に困難です。現在では、膨大なデータを利用したクラスタリング解析、主成分分析およびその他のアルゴリズムを駆使した解析が簡便に実行できるソフトウエアの開発が進み、バイオマーカーの探索にもその威力を発揮しています。

本セミナーでは、質量分析による分子イメージング解析を飛躍的に発展させる、装置および解析ソフトウエアに関する最新情報をご紹介いたします。

講演要旨

サーモフィッシャー
サイエンティフィック株式会社共催
国際学術セミナー

Novel strategies and applications of enhanced shotgun lipidomics for metabolism and translational research: Lipidomics sheds light on diabetic neuropathy

演者：Xianlin Han
(University of Texas Health Science Center at San Antonio)

Novel strategies and applications of enhanced shotgun lipidomics for metabolism and translational research: Lipidomics sheds light on diabetic neuropathy

Xianlin Han[1,2]

[1]Barshop Institute for Longevity and Aging Studies, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, USA,
[2]Division of Diabetes, Department of Medicine, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, USA

We have developed a shotgun lipidomics platform, referred to as "multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics (MDMS-SL)". Very recently, this technology has been extended to analyze polyphosphoinositides (PPI), bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), and fatty acid esters of hydroxyl-fatty acids (FAHFA), all of which are important, but low abundance classes of cellular lipids. Analysis of PPI species is very challenging as they are present in numerous fatty acyl chain isomers and phosphate positional isomers. Analysis of BMP species has been hindered due to its difficulties to be resolved from its structural isomer (i.e., phosphatidylglycerol (PG), another low abundance class of phospholipids). FAHFA is a novel class of lipokine lipids discovered very recently. We have developed novel methods for analysis of these classes of lipids after simple derivatization. The enhanced MDMS-SL platform with these newly developed methods has been applied for quantitative analysis of cellular lipidomes present in diabetic mouse samples, particularly nerve tissues. Lipidomics analysis allowed us to reveal the significant changes of lipidomes in the samples of diabetic mice and unravel the molecular mechanisms responsible for the altered lipids.

References

1. Wang, M., Han, R.H., and Han, X. (2013) Fatty acidomics: global analysis of lipid species containing a carboxyl group with a charge-remote fragmentation assisted approach. *Anal. Chem.* 85, 9312-9320.
2. Wang, C., Palavicini, J.P., Wang, M., Chen, L., Yang, K., Crawford, P.A., and Han, X. (2016) Comprehensive and quantitative analysis of polyphosphoinositide species by shotgun lipidomics revealed their alterations in *db/db* mouse brain. *Anal. Chem.* 88, 12137-12144.
3. Wang, M., Palavicini, J.P., Cseresznye, A., and Han, X. (2017) Strategy for quantitative analysis of isomeric bis(monoacylglycero)phosphate and phosphatidylglycerol species by shotgun lipidomics after one-step methylation. *Anal. Chem.* 89, 8490-8495.
4. Wang, M., Wang, C., Han, R.H., and Han, X. (2016) Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine. *Prog. Lipid Res.* 61, 83-108.
5. Han, X. (2016) Lipidomics for studying metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol*. 12, 668-679.

講演要旨

テクノロジーフォーラム

TF-1　島津マルチオミクス解析パッケージの紹介

演者：安田 弘之（株式会社島津製作所 分析計測事業部）

株式会社島津製作所

TF-2　2018年　新商品のご紹介

演者：藤峰 慶徳（大塚製薬株式会社 診断事業部 CIL試薬課）

大塚製薬株式会社

TF-3　LC/MS/MSデータクオリティー向上を目指した前処理カラムのご紹介

演者：吉田 達成（バイオタージ・ジャパン株式会社）

バイオタージ・ジャパン株式会社

TF-4　安定同位体を利用した質量分析技術のご紹介

演者：田辺 芽衣（大陽日酸株式会社）

大陽日酸株式会社

TF-1

島津マルチオミクス解析パッケージの紹介

安田 弘之
株式会社島津製作所 分析計測事業部

Introduction of Shimadzu Multi-omics Analysis Gadget Pack

Hiroyuki Yasuda
Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation

近年の質量分析の高速化・高感度化に伴い計測データが飛躍的に増加してきている。オミクス解析（リピドミクス、メタボロミクスなど）においても同様で、さらに、ノンターゲット、ワイドターゲットの分析では、測定対象となる化合物数が非常に多くなる。こうしたことから、大量なデータを処理でき、かつマルチオミクスのデータを扱うことができるソフトウェアが必要になってきている。

島津マルチオミックス解析パッケージは、Garuda Platform[1)]上で動作するガジェットの集まりであり、様々なオミクスデータを解析することが可能である。今回は、本パッケージについてデモを交えながら紹介する。

1) http://www.garuda-alliance.org

TF-2

2018年 新商品のご紹介

藤峰 慶徳

大塚製薬株式会社 診断事業部 CIL試薬課

2018 New products

Yoshinori Fujimine

CIL products section, Diagnostic division, Otuska pharmaceutical Co., Ltd.

安定同位体で標識した研究用試薬をご紹介します。
2018年の新規開発商品として，先天代謝異常やメタボローム分野に特化した製品群をご紹介します。

【先天代謝異常分野】

- CAH (先天性副腎過形成) スクリーニング用 高濃度の内部標準物質
- 各種アミノ酸，アシルカルニチン
- ステロイド類

【メタボローム研究分野】

- ^{13}C完全標識 酵母抽出物
- ^{13}C完全標識 大腸菌抽出物
- 脂肪酸，有機酸類
- 各種内因性物質

TF-3

LC/MS/MSデータクオリティー向上を目指した前処理カラムのご紹介

吉田 達成
バイオタージ・ジャパン株式会社

Introduction of the useful pre-treatment column for the purpose of LC/MS/MS data quality improvement

Tatsunari Yoshida
Biotage Japan

【緒言】近年、LC/MS/MS分析は、高感度及び高い選択性の優位点を持つ故、血液中の薬物濃度定量分析などに広く使用されている。本企業講演では簡便な前処理工程だけで、LC/MS/MS分析における夾雑物を除去し、そのデータクオリティーを向上させる手法を提案する。

【尿サンプル前処理用 デュアルモード抽出カラム、ISOLUTE ® HYDRO DME+】
尿試料の場合、イオン交換水で希釈する手法が広く用いられている。しかし、添加実験では、夾雑物の影響により、100分析程度で定量値の減少が確認された。Dual Mode Extraction (DME) は、2種類の異なった分離モードを連結した弊社独自の技術 (特許申請中) であり、尿試料と混合したアセトニトリルをISOLUTE ® HYDRO DME+に通液するだけで、尿中夾雑物のクリーンナップが完了する。これにより連続900分析以上の安定したLC/MS/MS分析が可能となった。

【徐タンパク＆リン脂質除去カラム、ISOLUTE ® PLD+】
ISOLUTE ® PLD+ は、血漿、血清、尿試料などを対象とし、試料中のタンパク質とリン脂質を効果的に且つ簡便に除去する前処理カラムである。ISOLUTE® PLD+は特殊なフリットを有しており、アセトニトリルを保持するため、高い効率での除タンパクを可能とする「Solvent First法」が利用できる。更に、そのまま通液するだけで、特殊な充填剤により試料溶液からリン脂質を特異的に除去する。ターゲット化合物 (一般的な薬物) のみを簡便に回収することが可能であった。

【結論】本講演では、DME+とPLD+の2つの異なった前処理カラムによる迅速且つ簡便で、効果的に夾雑物が除去できる手法を紹介した。これにより、スループット低下を妨げる事無く、LC/MS/MS分析のデータクオリティー向上とデータ安定性を確保した分析手法を提案した。

TF-4

安定同位体を利用した質量分析技術のご紹介

田辺 芽衣

大陽日酸株式会社

安定同位体 (D、^{13}C、^{15}N、^{18}O) で標識した低分子化合物やタンパク質等は、質量分析計を用いた定量分析の内部標準物質として利用されている。今回は、以下3つの製品について紹介する。

1. 質量分析用安定同位体標識アミノ酸 (20種) カクテル

「質量分析用アミノ酸 (20種) カクテル」とは、アミノ酸の定量分析に最適な20種の安定同位体標識アミノ酸の混合物である。20種類のアミノ酸 (表1) は各25 nmol含まれており、試料との混合後に分解しても標的と区別可能な安定同位体標識パターンで構成されている。製品には各成分のプロダクトイオンとプリカーサーイオンの情報が含まれており、簡便に20種のアミノ酸の定量分析が可能である。

アラニン-$^{13}C_3$,^{15}N	グルタミン-$^{15}N_2$	ロイシン-$^{13}C_6$	セリン-$^{13}C_3$,^{15}N
アルギニン-$^{13}C_6$,$^{15}N_4$	グルタミン酸-$^{13}C_5$,^{15}N	リジン-$^{13}C_6$,$^{15}N_2$	スレオニン-$^{13}C_4$,^{15}N
アスパラギン-$^{15}N_2$	グリシン-$^{13}C_2$,^{15}N	メチオニン-$^{13}C_5$,^{15}N	トリプトファン-$^{15}N_2$
アスパラギン酸-$^{13}C_4$,^{15}N	ヒスチジン-$^{15}N_3$	フェニルアラニン-$^{13}C_9$,^{15}N	チロシン-$^{13}C_9$,^{15}N
シスチン-d_4	イソロイシン-$^{13}C_6$, ^{15}N	プロリン-$^{13}C_5$,^{15}N	バリン-$^{13}C_5$,^{15}N

表1.安定同位体標識アミノ酸カクテル　構成成分一覧

2. 安定同位体標識タンパク質合成キット「無細胞くん」

安定同位体標識ペプチドは、内部標準物質としてサンプルに添加することにより、標的タンパク質・ペプチドの絶対定量に利用されている。標識ペプチドは比較的入手しやすいものの、ペプチド配列が測定対象タンパク質に特異的であることや、化学修飾を受けるシステインやメチオニンを含まない配列であること等の制約があり、分析に最適なペプチドの選択には手間と時間を要する。一方、安定同位体標識タンパク質を内部標準とした場合は、内部標準となるペプチド選択の工程が削減される。さらに、試料に安定同位体標識タンパク質を添加後に酵素消化等の前処理をおこなうため、実験操作による試料損失や酵素消化の効率を補正し、より正確な定量分析となる。安定同位体標識タンパク質の合成には、短時間・低コストなタンパク質合成キット「無細胞くん」を使用することにより、簡便に標識タンパク質を調製し、分析に供することが可能である。

3. 安定同位体標識タグ試薬「Py-Tag」

GCMSやLCMSの高感度分析には、対象化合物の揮発性や熱安定性の向上や、イオン化効率の増大、クロマトグラフィー分離の向上のために誘導体化試薬が利用されている。誘導体化試薬を安定同位体標識し、質量数 ($^{13}C_6$と$^{13}C_{12}$等) を変えることで、同時に多検体の比較定量が可能である。安定同位体標識誘導体化試薬のひとつであるPy-Tag試薬は、一級アミンを特異的に修飾する。7つの標識バリエーション ($^{13}C_0$、$^{13}C_2$、$^{13}C_4$、$^{13}C_6$、$^{13}C_8$、$^{13}C_{10}$、$^{13}C_{12}$) をもつPy-Tag試薬を用いると、7試料中の一級アミンの検出および比較定量分析がわずか1回の測定で可能になる。

一般社団法人日本医用マススペクトル学会認定

第6回医用質量分析認定士講習会並びに認定試験のご案内

近年，質量分析の著しい進歩に伴い，医療分野においても質量分析技術が幅広く用いられるようになってきました．日本医用マススペクトル学会では質量分析技術の臨床応用への基盤を共有することを目的に，平成25年度より認定士制度をスタートさせました．2017年3月には「質量分析装置」が医療機器として追加されましたので，医用質量分析認定士の活躍の場が飛躍的に広がります．タンデムマス・スクリーニング検査，臨床微生物検査，薬毒物分析など質量分析の臨床応用に従事されている各分野の方々のご参加をお待ちしております．

期 日：2018年9月8日（土）（第43回日本医用マススペクトル学会年会翌日）

会 場：北海道大学保健学科 1F 多目的室（札幌市北区北12条西5丁目）

プログラム：

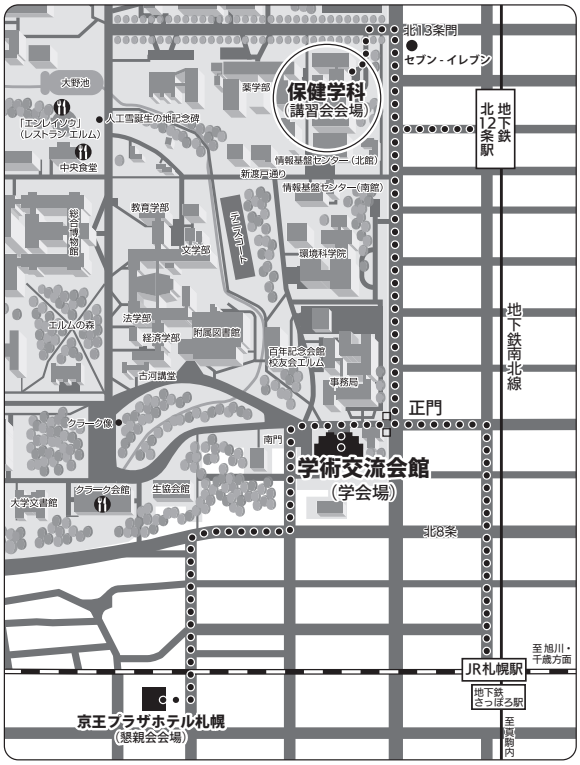
9：30～ 9：35	開会の辞　丹羽 利充　日本医用マススペクトル学会理事長
9：35～10：15	**講義1**「質量分析の基礎と使用に際して留意すべき事項について」 窪田 雅之（サーモフィッシャーサイエンティフィック（株））
10：20～11：00	**講義2**「質量分析計を用いる新生児代謝異常スクリーニング」 花井 潤師（北海道薬剤師会公衆衛生検査センター）
11：05～11：45	**講義3**「臨床化学領域における質量分析検査診断」 野村 文夫（千葉大学医学部附属病院）
12：00～13：00	**ランチョンセミナー**「質量分析を用いた分子イメージング解析」 韮澤　崇（ブルカージャパン株式会社）
13：10～13：50	**講義4**「臨床微生物検査で使用される質量分析装置の現状と課題」 渡　智久（旭川医科大学病院 臨床検査・輸血部）
14：00～14：10	医用質量分析認定士制度の概要説明
14：10～14：30	試 験
14：30	閉 会

受講料（テキスト代を含む）：
5,000円．但し，第43回年会登録者は3,000円．

申し込み方法：年会ホームページでの事前登録はすでに締め切りましたが、当日受付が可能です。奮ってご参加ください。

認定要件：

1. 日本医用マススペクトル学会会員であること．
2. 日本医用マススペクトル学会主催の医用質量分析認定士講習会に参加し，筆記試験に合格すること．筆記試験は主に講習会における講義内容から出題する．



年会・講習会事務局：

第43回日本医用マススペクトル学会年会事務局
事務局長：櫻井 俊宏　　担当：布田 博敏
TEL：011-706-3413（櫻井 俊宏）
E-mail：jsbms43@eis.hokudai.ac.jp

学会賛助会員一覧
（2018年度）

日本電子株式会社

株式会社大阪ソーダ

株式会社エービー・サイエックス

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

株式会社島津製作所

株式会社エスアールエル

日本ウォーターズ株式会社

ブルカー・ダルトニクス株式会社

丸石製薬株式会社

林純薬工業株式会社

株式会社LSIメディエンス

（11社）

年会協賛企業・団体一覧

この度の年会開催にあたり、下記の企業・団体の皆様から協賛金、展示、広告掲載、
その他のご協力を頂戴しました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

アークレイマーケティング株式会社

株式会社エスアールエル

大塚製薬株式会社

キリン株式会社

札幌保健医療大学

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

株式会社島津製作所

大陽日酸株式会社

日生バイオ株式会社

一般社団法人日本食品安全協会

日本電子株式会社

バイオタージ・ジャパン株式会社

林純薬工業株式会社

ブルカージャパン株式会社

株式会社フロンティア・サイエンス

ベックマン・コールター株式会社

株式会社渡辺オイスター研究所

（17社　五十音順・敬称略）

展示企業一覧

大塚製薬株式会社

株式会社島津製作所

大陽日酸株式会社

バイオタージ・ジャパン株式会社

林純薬工業株式会社

（5社　五十音順・敬称略）

第44回 日本医用マススペクトル学会年会のお知らせ

年会長：浅井 清文（名古屋市立大学 教授）

会　期：2019年9月12日（木）～13日（金）
（9月14日（土）：医用質量分析認定士　第7回講習会開催予定）

場　所：ウィンクあいち

一般社団法人 日本医用マススペクトル学会 JSBMS Letters VOL.43 Supplement, 2018
第43回 日本医用マススペクトル学会年会　プログラム・抄録集

発　行　日：2018年8月25日

編　集　者：第43回日本医用マススペクトル学会年会　年会長：千葉仁志

発行責任者：丹羽利充

編集委員会：浅井清文（委員長）／有田　誠／池川雅哉／瀬藤光利
千葉仁志／堤内　要／東　達也／眞野成康

発　行　所：一般社団法人 日本医用マススペクトル学会事務局
〒491-0938　愛知県一宮市日光町6　修文大学
E-mail：jsbms.office@gmail.com
ホームページ：http://www.jsbms.jp/

印　刷　所：株式会社国際文献社
〒162-0801　東京都新宿区山吹町358番地5
TEL：03-5937-0249　FAX：03-3368-2822