# 第47回

# 日本医用マススペクトル学会年会

会期

**2022年9月9日（金)・10日（土)**

開催形式

**オンライン**

(拠点：東京理科大学)

年会長

**東 達也**

東京理科大学薬学部 教授

# 第47回日本医用マススペクトル学会年会　実行委員会

**年会長**

東 達也　　(東京理科大学薬学部)

**事務局**

楠瀬 翔一　　(東京理科大学薬学部)

**実行委員**

井之上 浩一　(立命館大学薬学部)

三枝 大輔　　(帝京大学薬学部)

杉浦 悠毅　　(京都大学大学院医学研究科)

東 恭平　　(東京理科大学薬学部)

(五十音順，敬称略)

# 目次

開催にあたって ..... 1

年会案内 ..... 2

参加者の皆様へ ..... 4

日程表 ..... 7

プログラム ..... 9

講演要旨 ..... 29

依頼講演 ..... 29

受賞講演 ..... 33

国際シンポジウム ..... 37

シンポジウム ..... 43

ミニワークショップ ..... 57

一般演題 (ポスター発表) ..... 61

ランチョンセミナー ..... 121

テクノロジーフォーラム ..... 127

第10回医用質量分析認定士講習会並びに認定試験のご案内 ..... 137

学会賛助会員一覧 ..... 139

年会協賛企業一覧 ..... 140

ランチョンセミナー共催企業・展示企業一覧 ..... 141

企業広告

第48回年会のお知らせ・奥付

# 第47回日本医用マススペクトル学会年会　開催にあたって

第47回日本医用マススペクトル学会年会長
東 達也

2022年9月9日 (金)～10日 (土) の2日間，第47回日本医用マススペクトル学会年会を開催させていただきます．今年に入ってからのオミクロン株による感染拡大，感染者数の高止まりを考慮し, 理事会においてオンライン形式での開催 (拠点: 東京理科大学) に決定されました．本年会の開催にあたり，多大なご支援・ご協力を賜りました企業の皆様，依頼講演をお引き受けくださいました先生方，シンポジウムやミニワークショップの企画・立案にご協力を賜りましたオーガナイザー・シンポジストの先生方，多くの一般演題をご登録くださいました各演者の先生方に心から感謝いたします．さらには本年会では，第45回年会 (京都) から2年振りとなるMSACLとの国際シンポジウムも開催されます．ご尽力くださいましたオーガナイザー・シンポジストの先生方に御礼申し上げます．

医療が益々高度化，複雑化する中で患者が必要とするそれを提供するためには，信頼のできる検査・診断技術や病因・病態の解析技術が不可欠なことは言うまでもありません．また，新しい治療薬の開発，その安全性と有効性の保証，そしてそれらに資する優れたバイオマーカーの探索と開発が積極的に進められています．これらの全てに質量分析は不可欠な手法であり，それらの成否は質量分析の進歩・発展・活用に依存しているとも言えます．このような観点から本年会においても，質量分析を基礎生化学・分析化学的な面から臨床応用，創薬に至るまで様々な角度から議論したいと考えております．

依頼講演 (9日) としまして, 水野 初 先生 (名城大学) と財津 桂 先生 (近畿大学) からご講演を賜ります．両先生とも質量分析の医用応用に関する素晴らしい成果を挙げられ，本年4月より教授になられた，勢いのある研究者です．MSACLとの国際シンポジウム (9日) では，A. Hoofnagle 先生 (Univ. Washington)，D. Holmes 先生 (Univ. British Columbia)，池川 雅哉 先生 (同志社大学), 中山 憲司 先生 (新潟医療福祉大学) にご講演をお願いしております. その他に，2日間を通して3つのシンポジウム，1つのミニワークショップ，58件の一般演題 (ポスター発表)，3つのランチョンセミナー，8つのテクノロジーフォーラム (企業展示発表) がございます．ご参加の皆様の活発なご討論を是非宜しくお願いします．

さらに10日には，三枝 大輔 先生 (帝京大学) の奨励賞受賞講演が行われます．また，本年よりMMS (Medical Mass Spectrometry誌) 優秀論文賞が設けられ，最初の受賞者として六車 宜央 先生 (立命館大学) の講演も行われます．参加者の皆様におかれましては，この優秀論文賞を目指して研究成果を是非，MMS誌にご投稿いただければ幸いです．

また，第10回医用質量分析認定士の講習会もオンライン形式で開催します．今後も医用質量分析認定士の活躍の場が飛躍的に広がりますことから，奮ってご受講くださいますようお願い申し上げます．既に認定士の資格をお持ちの先生方におかれましては，周囲へのお声掛けも宜しくお願いします．

実行委員一同鋭利準備を進めてまいります．多くの皆様のご参加を心よりお待ちしております．宜しくお願い申し上げます．

# 年会案内

## ■ 年会日程

2022年9月9日 (金)・10日 (土)
9月2日 (金) ~ 9月10日 (土) に第10回医用質量分析認定士講習会 (オンデマンド形式), 9月10日 (土) に認定試験を実施します.

## ■ 年会長

東 達也　(東京理科大学薬学部 教授)

## ■ 開催形式

オンライン (拠点：東京理科大学)
・各講演，ポスター示説，企業展示 ：Zoomミーティング
・ポスター閲覧 (オンデマンド)　　：参加者専用Webページ

## ■ 年会参加費一覧

| | 会員 | | 非会員 | |
|---|---|---|---|---|
| | 一般 | 学生 | 一般 | 学生 |
| 参加費 | 6,000 円 | 2,000 円 | 10,000 円 | 3,000 円 |

※事前参加登録 (8/30締切) のみです.
※一旦払い込まれた参加費は返却できませんのでご了承ください.

## ■ ランチョンセミナー

9月9日 (金), 10日 (土) の両日にZoomミーティングで実施します. 参加人数の制限はございません．奮ってご参加ください.

## ■ 企業展示

会期中，Zoomのブレイクアウトルームにて企業展示を行います．また，参加者専用Webページより出展企業のカタログ・動画等をご覧いただけます.

## ■ 交流会

1日目 (9月9日) のプログラム終了後に，バーチャル空間「oVice」を使用したオンライン交流会を行います．詳細は参加者専用Webページよりご案内します．多数のご参加お待ちしております.

# 参加者の皆様へ

## 【共通のご案内】

・ 様々な事由により要旨集に記載されている事項が変更される場合がございます．最新の情報は必ず年会ホームページ (https://jsbms47th-ridai.jimdofree.com/) にて確認してください．

・ 参加者は他者の発表内容に関して，研究者倫理を順守することが求められます．参加者は，著作物及び知的財産の保護の観点から講演及びポスター発表内容の保存 (画面キャプチャを含む)，動画・音声の録画・録音をしてはいけません．
参加登録は参加登録した本人のみが有効であり，参加に伴い得た情報を参加登録者以外 (SNSなどオンライン媒体を含む) へ開示してはいけません．
上記をお守りいただけない場合や本年会の進行を妨げる行為があった場合には，事務局は非違行為者の参加資格を剥奪することがあります．ご了解ください．

・ 本年会ではビデオ会議システムZoomを利用します. Zoomを初めて使われる方は事前にダウンロードしてください．また，すでに利用されたことがある方は，最新版にアップデートしてください．

・ ZoomミーティングID，パスコードにつきましては参加者専用Webページ (年会ホームページ内に開設します) でご案内します. 参加者専用Webページ閲覧のためのPWは別途ご案内いたしますが，他者に公開しないよう，ご協力をお願いします．

・ 当該Zoomミーティングやブレイクアウトルームに入りましたら, Zoom上に表示する名前を「氏名_所属」 (例：理大太郎_東京理大薬) のように設定し，参加者名がわかるようにしてください．

・ 講演聴講時はビデオOFF，マイクOFFでお願いします．

・ 講演に対する質問がございましたら，チャット/コメント欄に「質問」とだけ入力してください (質問内容は不要です)．その後，座長から指名がありましたらビデオON，マイクONにし，ご発言ください．座長が気づいていない様子の場合は，マイクをONにし，ご発言ください．

・ ポスターは本年会開催期間中 (9月9日～10日)，参加者専用Webページにて公開します． 演者への質問はポスター示説時間内 (奇数番号：9日13:15～14:35，偶数番号：10日10:45～12:05) にZoomの各ブレイクアウトルームにて行ってください．

## 【座長の皆様へ】

・ ご担当のセッションの開始5分前までに当該Zoomミーティングにご参加ください．こちらで共同ホストに設定します． 名前は氏名_所属 (例 : 理大太郎_東京理大薬) のように表示してください．

・ 質疑応答の際，質問のある参加者には，チャット欄に「質問」とだけ入力していただきます．座長は質問者を指名し，ビデオON，マイクONにしてご発言いただくよう，声掛けをお願いします．指名する順番は原則として，チャット入力時刻の早い順にしてください．

・ スケジュールがタイトですので，セッションの予定時間内に終了するように進行をお願いします．

## 【演者の皆様へ】

・ ご講演されるセッションの開始5分前までに当該Zoomミーティングにご参加ください．こちらで共同ホストに設定します．名前は氏名_所属（例：理大太郎_東京理大薬）のように表示してください．

・ ご講演用のファイルを開き，講演開始をお待ちください．座長から合図がありましたら，ビデオON・音声ONにし，画面共有を選択した後，ご講演を開始してください．

・ 講演終了後は画面共有を停止し，ビデオOFF・音声OFFにしてください．

・ スケジュールがタイトですので，指定された講演時間内に終了するようお願いします．

## 【ポスター発表者の皆様へ】

・ ポスターは年会参加者専用Webページにて公開し，本年会開催期間中 (9月9日～10日) はいつでも閲覧可能とします．これに加えて発表者は，該当日時に指定されたZoomブレイクアウトルームにて示説を行ってください (80分間)．示説の際，発表ポスターを画面共有で表示していただいて構いません．

・ ポスター閲覧のためのパスワードは年会参加者のみにお知らせします．ポスターは閲覧のみ可 (ダウンロード不可) の設定で公開されますが，スクリーンショットを撮られてしまう可能性を考慮して，発表内容についてご検討いただけると幸いです．

・ 利益相反の有無に関わらず，共同演者を含む全ての発表者について，研究内容に関する利益相反をポスター本文内に開示してください．ひな形は年会ホームページよりダウンロードしてください．

### 若手優秀ポスター賞について

・ 本年会では，優れたポスター発表を行った若手研究者 (35歳以下) に対して，「若手優秀ポスター賞」を贈呈します．

・ 年会に参加した理事，評議員が審査員を務めます．審査員の先生方には，年会事務局より審査依頼を別途連絡いたします．

・ 9月10日の16:55 (予定) より，若手優秀ポスター賞受賞者を発表します．また，後日年会ホームページに受賞者を掲載します．

### 審査基準

- 研究が有用であるか
- 新規性があるか
- 独創性があるか
- 実験方法は妥当であるか
- 科学的な錯誤が無いか
- 用語が正しく使用されているか
- 説明が簡明でわかりやすいか
- 質問に対する回答が簡明かつ的確であるか

# 日程表

1日目：9月9日 (金)

| 時間 | 内容 | 講演番号 | 登壇者 | 座長 | 企業展示 |
|---|---|---|---|---|---|
| 9:00～9:15 | 開会挨拶・事務連絡 | ー | 東 達也 | ー | 終日，Zoomのブレイクアウトルームにて企業展示を実施します. |
| 9:15～10:55 | シンポジウム① | S-1-1<br>S-1-2<br>S-1-3<br>S-1-4 | 松岡 悠太<br>杉浦 悠毅<br>西本 紘嗣郎<br>杉山 栄二 | 杉浦 悠毅 | |
| 10:55～11:05 | 休憩 | | | | |
| 11:05～11:35 | ミニワークショップ | MW-1 | 重松 陽介<br>張 春花 | 重松 陽介 | |
| 11:35～12:05 | 依頼講演① | I-1 | 水野 初 | 東 達也 | |
| 12:15～13:05 | ランチョンセミナー①<br>(エービー・サイエックス) | L-1 | 片木 宗弘 | ー | |
| 12:05～13:15 | 休憩・昼食 | | | | |
| 13:15～14:35 | ポスター発表① | P-奇数番号 | 奇数番号<br>発表者 | ー | |
| 14:35～14:45 | 休憩 | | | | |
| 14:45～15:25 | テクノロジーフォーラム①<br>(ブルカージャパン)<br>(林純薬工業)<br>(島津製作所)<br>(あすか製薬メディカル) | T-1-1<br>T-1-2<br>T-1-3<br>T-1-4 | 坂本 太郎<br>井之上 浩一<br>渡辺 淳<br>加藤 和彦 | 楠瀬 翔一 | |
| 15:25～15:55 | 依頼講演② | I-2 | 財津 桂 | 東 達也 | |
| 15:55～16:05 | 休憩 | | | | |
| 16:05～18:05 | The 2nd International Joint Symposium of JSBMS and MSACL | IS-1<br>IS-2<br>IS-3<br>IS-4 | M. Ikegawa<br>K. Nakayama<br>A. Hoofnagle<br>D. Holmes | 五十嵐 一雄<br>中山 憲司 | |

2日目：9月10日 (土)

| 時間 | 内容 | 講演番号 | 登壇者 | 座長 | 企業展示 |
|---|---|---|---|---|---|
| 9:00～9:10 | 事務連絡 | ー | 東 達也 | ー | 終日，Zoomのブレイクアウトルームにて企業展示を実施します. |
| 9:10～9:25 | MMS優秀論文賞受賞講演 | AP-1 | 六車 宜央 | 有田 誠 | |
| 9:25～9:55 | 奨励賞受賞講演 | AY-1 | 三枝 大輔 | 眞野 成康 | |
| 9:55～10:35 | テクノロジーフォーラム②<br>(日本ウォーターズ)<br>(Noster)<br>(シグマアルドリッチ)<br>(大陽日酸) | T-2-1<br>T-2-2<br>T-2-3<br>T-2-4 | 窪田 雅之<br>清水 秀憲<br>松島 江里香<br>谷 日向子 | 楠瀬 翔一 | |
| 10:35～10:45 | 休憩 | | | | |
| 10:45～12:05 | ポスター発表② | P-偶数番号 | 偶数番号<br>発表者 | ー | |
| 12:15～13:05 | ランチョンセミナー②<br>(日本ウォーターズ)<br>ランチョンセミナー③<br>(島津製作所) | L-2<br>L-3 | 窪田 雅之<br>渡辺 淳 | ー | |
| 12:05～13:15 | 休憩・昼食 | | | | |
| 13:15～14:55 | シンポジウム② | S-2-1<br>S-2-2<br>S-2-3<br>S-2-4 | 赤津 裕康<br>六車 宜央<br>岩崎 雄介<br>石井 雄二 | 井之上 浩一 | |
| 14:55～15:05 | 休憩 | | | | |
| 15:05～16:45 | シンポジウム③ | S-3-1<br>S-3-2<br>S-3-3 | 江口 盛一郎<br>吉見 陽<br>川上 大輔 | 財津 桂 | |
| 16:45～16:55 | 準備 | | | | |
| 16:55～17:15 | 若手優秀ポスター賞発表・<br>第48回年会学会予告・<br>閉会挨拶 | ー | 東 達也 | ー | |

# プログラム

## 1日目　9月9日 (金)

9:00 ~ 9:15　開会挨拶・事務連絡

9:15 ~ 10:55　シンポジウム①
医化学研究における質量分析の応用
～イメージングから血液マーカー開発まで～

オーガナイザー：杉浦 悠毅 (京都大学)

S-1-1　酸化リン脂質の包括的解析および可視化技術
○松岡 悠太
京都大学大学院医学研究科がん免疫総合研究センター

S-1-2　COVID-19患者の予後判定に有用なアミノ酸カタボライトマーカー
○杉浦 悠毅
京都大学大学院医学研究科附属 がん免疫総合研究センター

S-1-3　アルドステロンの質量分析イメージング
○西本 紘嗣郎[1, 4]，杉浦 悠毅[2]，東 達也[3]，末松 誠[4]
[1]埼玉医科大学国際医療センター泌尿器腫瘍科，[2]京都大学大学院医学研究科がん免疫総合研究センター マルチオミクスプラットフォーム，[3]東京理科大学薬学部臨床分析科学研究室，[4]慶應義塾大学医学部医化学教室

S-1-4　ジアステレオマー誘導体化によるキラル分子のエナンチオ選択的イメージング
○杉山 栄二[1]，水野 初[1, 2]，轟木 堅一郎[1]
静岡県大薬[1]，名城大薬[2]

## 11:05 ~ 11:35　ミニワークショップ

オーガナイザー：重松 陽介 (福井大学)

MW-1　GC-MS尿有機酸分析の精度管理-化学診断委員会からの提言と推奨

○重松 陽介[1]，○張 春花[2]
[1]福井大学小児科，[2]ミルスインターナショナル研究開発部

## 11:35 ~ 12:05　依頼講演①

座長：東 達也 (東京理科大学)

I-1　１細胞質量分析法の開発　現状と今後の展開

○水野 初
名城大学薬学部

## 12:15 ~ 13:05　ランチョンセミナー①

共催：株式会社 エービー・サイエックス

L-1　毛髪中睡眠薬の超高感度質量分析とそこに潜む危険

○片木 宗弘
大阪医科薬科大学法医学教室

## 13:15 ~ 14:35　ポスター発表① (奇数番号)

## 14:45 ~ 15:25　テクノロジーフォーラム①

座長：楠瀬 翔一 (東京理科大学)

T-1-1　timsTOF HTで実現できるハイスループット・4D-プロテオミクス

○坂本 太郎
ブルカージャパン株式会社

T-1-2　安定同位元素標識化合物を利用した$^{13}$Cフル置換抗生物質の供給へ

○井之上 浩一[1]，原田 修一[2]
[1]立命館大学，[2]林純薬工業株式会社

T-1-3　最新！ 四重極飛行時間型質量分析計 LCMS-9050ご紹介

○渡辺 淳，遠山 敦彦
株式会社島津製作所

T-1-4　LC-MS/MSを活用した毛髪中ホルモンの測定

○加藤 和彦
株式会社あすか製薬メディカル

## 15:25 ~ 15:55　依頼講演②

座長：東 達也 (東京理科大学)

I-2　質量分析を介した複合生命情報へのBioinformaticsによるアプローチ

○財津 桂
近畿大学 生物理工

## 16:05 ~ 18:05 The 2nd International Joint Symposium of JSBMS and MSACL

オーガナイザー：五十嵐 一雄 (医薬分析協会)
中山 憲司 (新潟医療福祉大学)

### IS-1 Mass Spectrometry Imaging in Alzheimer's Disease

○Masaya Ikegawa
Department of Life and Medical Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

### IS-2 qShot MALDI Phospholipidomics and Its Clinical Applications

○Kenji Nakayama[1, 2], Xin Li[1, 3], Koji Shimizu[4], Shusuke Akamatsu[1], Takahiro Inoue[5], Takashi Kobayashi[1], Osamu Ogawa[1, 6], Takayuki Goto[1]
[1]Department of Urology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, [2]Department of Clinical Engineering and Medical Technology, Faculty of Medical Technology, Niigata University of Health and Welfare, [3]Department of Urology, Peking University Third Hospital, [4]Clinical Research Center for Medical Equipment Development, Kyoto University Hospital, [5]Department of Nephro-Urologic Surgery and Andrology, Mie University Graduate School of Medicine, [6]Japanese Red Cross Otsu Hospital

### IS-3 Measuring Proteins by LC-MS/MS: Improving Clinical Research and Patient Care

○Andrew N. Hoofnagle
University of Washington, Seattle, WA, USA

### IS-4 IgG4 Related Disease Diagnosis and Monitoring Using LC-MS/MS: Advantages over Nephelometry

○Daniel T Holmes[1, 2], Andre Mattman[1, 2]
[1]Department of Pathology and Laboratory Medicine, Providence Health, Vancouver, BC, Canada, [2]Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

## 9:00 ~ 18:05　企業展示

※終日，Zoomのブレイクアウトルームにて実施

展示企業一覧 (五十音順)

- あすか製薬株式会社
- シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社
- 株式会社 島津製作所
- 大陽日酸株式会社
- 日本ウォーターズ株式会社
- Noster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

## 2日目　9月10日（土）

9:00 ~ 9:10　事務連絡

9:10 ~ 9:25　MMS優秀論文賞受賞講演

座長：有田 誠 (慶應義塾大学)

AP-1　Application of a UHPLC-MS/MS Method to Investigate the Metabolic Pathways of Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies Using Postmortem Cerebrospinal Fluid and Serum Samples

○六車 宜央[1, 2]，赤津 裕康[3]，井之上 浩一[1]
[1]立命館大院薬，[2]日本学術振興会特別研究員 (DC1)，[3]名市大院医

9:25 ~ 9:55　奨励賞受賞講演

座長：眞野 成康 (東北大学病院)

AY-1　生体内メタボローム解析技術開発と疾患バイオマーカー探索研究への応用

○三枝 大輔[1, 2]
[1]帝京大薬，[2]東北大メガバンク

9:55 ~ 10:35　テクノロジーフォーラム②

座長：楠瀬 翔一 (東京理科大学)

T-2-1　Waters最新のタンデム四重極質量分析計 Xevo TQ Absolute

○窪田 雅之
日本ウォーターズ株式会社クリニカル事業部

T-2-2　腸内細菌とその代謝産物の相互把握による新たな研究領域への展開

○清水 秀憲
Noster株式会社

T-2-3　分析の次の一手、多孔質グラファイトカーボンカラム

○松島 江里香，植田 泰輔
シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社

T-2-4　安定同位体標識試薬のご紹介

○谷 日向子，池田 明夏里，田邉 芽衣
大陽日酸株式会社

10:45 ~ 12:05　ポスター発表② (偶数番号)

12:15 ~ 13:05　ランチョンセミナー②

共催：日本ウォーターズ株式会社

L-2　マルチリフレクティングTofを搭載したSELECT SERIES MRT四重極-飛行時間型質量分析計

○窪田 雅之
日本ウォーターズ株式会社クリニカル事業部

12:15 ~ 13:05　ランチョンセミナー③

共催：株式会社島津製作所

L-3　LC/MS/MSメソッドパッケージ・試薬キットDOSIシリーズご紹介

○渡辺 淳，箕畑 俊和
株式会社島津製作所

## 13:15 ~ 14:55　シンポジウム②
## ストレス社会と質量分析

オーガナイザー：井之上 浩一 (立命館大学)

S-2-1　高齢者、地域住民のデジタルブラッドデータベース構築を目指した医療系学生教育を並走させた地域コホート体制の構築

○赤津 裕康
名古屋市立大学大学院医学研究科地域医療教育学

S-2-2　ワイドターゲットメタボロミクスおよび機械学習によるヒト体内代謝環境の解析

○六車 宜央[1,2]，赤津 裕康[3]，井之上 浩一[1]
[1]立命館大院薬，[2]日本学術振興会特別研究員 (DC1)，[3]名市大院医

S-2-3　酸化ストレスを評価するための生体内バイオマーカーの分析

○岩崎 雄介
星薬科大学

S-2-4　病理学から見た化学物質安全性評価におけるイメージング質量分析の有用性

○石井 雄二
国立衛研

## 15:05 ~ 16:45　シンポジウム③
## 脳科学・脳疾患における質量分析の応用

オーガナイザー：財津 桂 (近畿大学)

S-3-1　脳腫瘍研究における質量分析の応用と今後の課題

○江口 盛一郎
東京女子医大・脳神経外科

S-3-2　オミックス技術による精神疾患の病態解明と診断技術開発

○吉見 陽[1, 2]
[1]名城大薬，[2]名城大トランスレーショナルリサーチセンター

S-3-3　PESI/MS/MSとベイズ統計モデリングを用いた脳科学への新たなアプローチ

○川上 大輔
Shimadzu Europa GmbH

16:55 ~ 17:15　若手優秀ポスター賞発表・第48回年会予告・閉会挨拶

9:00 ~ 16:45　企業展示

※終日，Zoomのブレイクアウトルームにて実施

出展企業一覧 (五十音順)

- あすか製薬株式会社
- シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社
- 株式会社 島津製作所
- 大陽日酸株式会社
- 日本ウォーターズ株式会社
- Noster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

# ポスター発表

ポスター掲示期間：9月9日 (金) ~ 9月10日 (土)

ポスター発表①　奇数番号　9月9日 (金) 13:15 ~ 14:35
ポスター発表②　偶数番号　9月10日 (土) 10:45 ~ 12:05

P-01　保存期間がD型及びL型βアミノイソ酪酸の血漿濃度に及ぼす影響

(若手)

○外山 雄大[1]，野津 吉友[2]，小林 弘典[2]，堺 弘道[3]，國澤 研大[4]，渡辺 淳[4]，矢野 彰三[2]，金崎 啓造[1]，並河 徹[5]
[1]島根大学医学部内科学講座内科学第一，[2]島根大学医学部附属病院検査部，[3]島根大学総合科学研究支援センター生体情報・RI実験部門，[4]島津製作所，[5]島根大学医学部

P-02　ステルス型ベクターによるイズロン酸-2-スルファターゼの発現

○真嶋 隆一[1]，大平 麻里[1]，菊池 亜美花[1]，奥山 虎之[1]，小野寺 雅史[1]，水田 志織[2]，吉田 尚美[2]，中西 真人[2]
[1]国立成育医療研究センター，[2]ときわバイオ株式会社

P-03　LC/MS/MSによるレッシュ-ナイハン症候群患者のHPRT活性測定 ― 赤血球と乾燥ろ紙血での比較 ―

○前田 康博[1]，中島 葉子[2]，張 春花[3]，横井 克幸[2]，伊藤 哲哉[2]
[1]藤田医科大学 オープンファシリティセンター，[2]藤田医科大学 医学部 小児科学，[3]ミルスインターナショナル

P-04　ろ紙血長鎖アシルカルニチンC16、C18、C18:1上昇の特徴と臨床意義の検討

○阮 宗海，張 春花，王 旭陽，金 明姫，趙 寧，謝 宏傑，唐 剣慈，万 婷婷
ミルスインターナショナル

P-05　GCMSを用いた体液分析による非ケトーシス型高グリシン血症の化学診断

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

P-06　メタボローム解析による高プロリン血症Ⅰ型とⅡ型鑑別診断

○金 明姫，張 春花，阮 宗海，王 旭陽，唐 剣慈
ミルスインターナショナル　検査・研究開発部

P-07　東京都における拡大新生児スクリーニングの試験研究

○石毛 信之[1,5]，渡辺 和宏[1]，長谷川 智美[1]，小林 正久[2]，加藤 環[3]，齋藤 加代子[3]，阿部 裕一[4]，森岡 一朗[5]，石毛 美夏[5]，大石 公彦[2]
[1]東京都予防医学協会，[2]東京慈恵医大小児科，[3]東京女子医大ゲノム診療科，[4]国立成育医療研究センター神経内科，[5]日本大医学部小児科

P-08　簡便なスクリーニング・精度管理ソフトNeonatal Solutionの応用

○渡辺 淳，服部 考成，前田 見吾
株式会社島津製作所

P-09　乾燥濾紙DNAを用いたMALDI-TOF MSによる遺伝性疾患の診断

○竹内 敦子[1]，三村 昂大[1]，都出 千里[1]，西尾 久英[2]
[1]神戸薬科大，[2]神戸学院大リハビリテーション学部

P-10　MALDI-TOF MSにおけるピロリ菌の生物学的多様性の解析
(若手)

○橋本 優佑[1]，志田 隆史[1]，島 圭介[2]，竹内 啓晃[1]
[1]国福大 成田保健医療 医学検査，[2]株式会社島津製作所

P-11　Multiplex-Nested-PCR法で偽陰性、質量分析法で*Staphylococcus aureus*が検出された敗血症の1症例

○麻生 さくら[1]，高野 さかえ[1]，浦 邦子[1]，斉木 由美子[1]，新藤 純子[1]，新福留 茜[1]，久恒 順三[2]，菅井 基行[2]
[1]独立行政法人　東京都立病院機構　東京都立多摩総合医療センター　検査科，[2]国立感染症研究所　薬剤耐性研究センター

P-12　カンナビノイド類物質のLC-MS分析

(若手)　○太田 有紗[1]，安部 寛子[2, 3]，東 恭平[2]，斎藤 顕宜[2]

[1]東京理大院薬，[2]東京理大薬，[3]株式会社バイオデザイン

P-13　LC-MS/MSを用いた血液･尿中24種類の合成カンナビノイド代謝物の同時定量

○南方 かよ子[1]，野澤 秀樹[1]，山岸 格[1]，長谷川 弘太郎[1]，三由 尚知[1]，鈴木 雅子[1]，北本 卓也[2]，近藤 未菜子[2]，鈴木 修[1]

[1]浜松医大 法医学，[2]浜松医大 先進機器共用推進部

P-14　国内未承認薬Zaleplonが検出された法医解剖事例

○前橋 恭子，坂本 圭菜，岩楯 公晴

慈恵医大法医

P-15　シアン代謝物ATCAのLC−MS分析法の開発と剖検試料への応用

○西尾 忠，東海林 洋子，星 智昭，新井 智美，野上 誠

帝京大学医学部法医学講座

P-16　塩素化されたTyrosineのLC-MS/MS分析法の検討

○神 繁樹[1]，的場 光太郎[1]，赤川 有希[1]，早田 璃菜[1]，魚住 諒[2]

[1]北海道大学大学院医学研究院 法医学教室，[2]日本医療大学保健医療学部 臨床検査学科

P-17　胃内容物中のメソミル分析法の開発

○一瀬 貴大[1]，田中 亜紀[2]，池中 良徳[1]，石塚 真由美[1]

[1]北海道大学，[2]日本獣医生命科学大学

P-18　Discovery of Food Derived Inhibitor for Sphingolipid Metabolism Associated to Obesity

(若手)　○Yusuke Minami[1], Siddabasave Gowda B. Gowda[2], Divyavani Gowda[2], Hitoshi Chiba[3], Shu-Ping Hui[2]

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

P-19 Investigation on Protective Effect of Flazin against Lipid Overloading in Renal Cells Using LC/MS and NanoESI-MS

(若手) ○Xunzhi Wu[1], Zhen Chen[2], Yifan Chen[2], Nianqiu Shen[1], Hitoshi Chiba[3], Shu-Ping Hui[2]

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

P-20 LC/MSによるリピドミクスを用いた海藻由来植物ステロールの神経細胞に対する脂質異常改善作用の検討

(若手) ○竹内 美音[1]，陳 震[2]，Nianqiu Shen[3]，Yue Wu[2]，Xunzhi Wu[3]，千葉 仁志[4]，惠 淑萍[2]

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

P-21 酸化LDLの肝カルジオリピン生合成への影響

(若手) ○佐﨑 生[1]，櫻井 俊宏[1]，茂木 すみれ[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-22 脂肪肝モデル細胞におけるサケ白子抽出物のカルジオリピン代謝改善作用

○櫻井 俊宏[1]，吉貝 あみ[1]，茂木 すみれ[1]，山端 ありさ[1]，関島 将人[1]，佐藤 美涼[1]，佐藤 浩志[2]，千葉 仁志[3]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院保健科学研究院，[2]日生バイオ株式会社，[3]札幌保健医療大学

P-23 Tackling Unknown Lipids in Eleven Dietary Fish and Their Composition Analysis by Untargeted LC/MS

○Siddabasave Gowda B. Gowda[1, 2], Yusuke Minami[3], Divyavani Gowda[1], Hitoshi Chiba[4], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Graduate School of Global Food Resources, Hokkaido University, [3]Graduate School of Health Sciences, Hokkaido University, [4]Depart of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

P-24 Synthesis and Development of a Facile Analytical Method for Short Chain Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids

(若手) ○Fengjue Hou[1], Siddabasave Gowda B. Gowda[2], Divyavani Gowda[2], Hitoshi Chiba[3], Shu-Ping Hui[2]

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

P-25 血中リゾホスファチジン酸を正確に定量するための血漿調整方法の検討

○可野 邦行[1]，松本 宏隆[2]，河野 望[1]，蔵野 信[3]，矢冨 裕[3]，青木 淳賢[1]

[1]東京大院薬，[2]東北大院薬，[3]東京大医学部附属病院

P-26 アルツハイマー病剖検脳でのスフィンゴ脂質、グリセロリン脂質の変動

○蔵野 信[1]，齊藤 祐子[2]，矢冨 裕[1]

[1]東京大学・医，[2]東京都健康長寿医療センター

P-27 腸内細菌由来の機能性脂肪酸類のターゲットリピドミクス

○辻 光倭[1,2,3]，嶋田 渉[3]，岸野 重信[4]，小川 順[4]，有田 誠[1,2]

[1]慶大薬創薬研究センター，[2]理研IMS，[3]Noster株式会社，[4]京大院農

P-28 Sterol-O acyltransferase阻害は高脂肪食による虚血再灌流障害後の腎臓三次リンパ組織形成と線維化の促進を抑制する

(若手) ○有安 由紀[1,2]，佐藤 有紀[2]，磯部 洋輔[1,3,4]，柳田 素子[2,5]，有田 誠[1,3,4]

[1]理研IMS，[2]京大院医，[3]慶大院薬，[4]横市大院生命医，[5]京大ASHBi

P-29 1細胞質量分析によるがん特異的代謝物の探索

(若手) ○阪田 晟[1]，水野 初[1,2]，古庄 仰[1]，杉山 栄二[1]，轟木 堅一郎[1]

[1]静岡県大薬，[2]名城大薬

P-30 糸球体性疾患における尿中グリセロリン脂質の解析

○中嶋 和紀[1,5]，袴田 知也[2]，堀 秀生[2]，伊藤 辰将[3]，釘田 雅則[4]，長尾 静子[4]，湯澤 由紀夫[3]，坪井 直毅[3]，高橋 和男[5]

[1]岐阜大学・糖鎖生命コア研究所，[2]藤田医科大学・医療科学部，[3]藤田医科大学・医学部腎臓内科学，[4]藤田医科大学・研究支援，[5]藤田医科大学・医学部解剖学II

P-31　高分解能LC-MSによるヒト涙液中脂肪酸の分析

○藤城 雅也[1]，草野 麻衣子[1]，山中 秀徳[2]，坂牧 寛[2]，瀬戸 遼也[2]，中内 暁博[1, 3]，長谷川 智華[1, 4]，恩田 秀寿[5]，熊澤 武志[1, 6]，佐藤 啓造[1]，松山 高明[1]

[1]昭和大学医学部法医学講座，[2]一般財団法人化学物質評価研究機構，[3]東都大学沼津ヒューマンケア学部，[4]東邦大学医学部法医学講座，[5]昭和大学医学部眼科学講座，[6]聖隷クリストファー大学看護学部

P-32　MSイメージングを用いたリン脂質生合成活性の可視化

(若手)

○岩間 大河[1]，可野 邦行[1]，川名 裕己[1]，河野 望[1]，長田 克之[2]，橋立 智美[2]，進藤 英雄[2, 3]，青木 淳賢[1]

[1]東大院薬，[2]国立国際医療研究センター・脂質シグナリングプロジェクト，[3]東大院医

P-33　MALDIイメージング質量分析法とリピドミクスを融合したアルツハイマー病の脳病理解析

○外山 友美子[1]，徳平 壮一郎[1]，角田 伸人[1]，韮澤 崇[2]，森島 真帆[3]，村山 繁雄[3]，齊藤 祐子[3]，池川 雅哉[1]

[1]同志社大学生命医科学研究科，[2]Bruker JAPAN，[3]東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク

P-34　脳腫瘍研究のためのマウス脳の包括的代謝イメージング

(若手)

○小林 奈央*[1]，近藤 夏子*[2]，櫻井 良憲[2]，鈴木 実[2]，山口 真一[3]，池川 雅哉[1]　＊: equal contribution

[1]同志社大生命医，[2]京大複合原子力粒子線腫瘍学，[3]島津製作所

P-35　イメージング質量分析法を用いたメダカ脳の神経情報伝達物質の可視化

(若手)

○金丸 公暉[1]，中村 芹奈[1]，日下部 りえ[2]，韮澤 崇[3]，坂本 太郎[3]，日下部 岳広[4]，池川 雅哉[1]

[1]同志社・生命医，[2]理研・生命機能科学，[3]ブルカージャパン，[4]甲南・理工生物

P-36　イメージング質量分析法を用いたリチウム投与マウス脳の代謝変動について

○大原 啓吾[1]，山本 卓志[2]，山口 真一[2]，平田 岳史[3]，池川 雅哉[1]

[1]同志社・生命医，[2]島津製作所，[3]東大理・最先端計測化学

P-37　拡張型心筋症モデルハムスターの網羅的代謝イメージング解析

(若手)　○岡邑 舞子[1]，山口 真一[2]，山本 卓志[2]，袴田 圭祐[3]，新谷 祈[1]，辻 崇[3]，植田 初江[4]，雨宮 妃[4]，湊谷 謙司[3]，升本 英利[3]，池川 雅哉[1]

[1]同志社・生命医，[2]島津製作所，[3]京大院医・心外，[4]国立循環器病・病理部

P-38　MALDI-MSイメージング用自動スプレイヤーを用いたマトリックス塗布量の最適化

(若手)　○天野 晴貴，Chanudporn Sumpownon-Sugiyama，杉山 栄二，古庄 仰，轟木 堅一郎

静岡県大薬

P-39　LA-ICPを用いた免疫組織を中心とした生体元素イメージング解析

(若手)　○小山 遥[1]，辻 雄大[1]，奥田 晃士[2]，山口 真一[2]，池川 雅哉[1]

[1]同志社・生命医，[2]島津製作所

P-40　架橋質量分析による免疫複合体抗原のエピトープ特定

(若手)　○相原 希美[1]，濵崎 まや[2]，松木 優弥[2]，忽那 幸紀[1]，中嶋 幹郎[1]，大山 要[1, 3]

[1]長崎大院医歯薬，[2]長崎大薬，[3]長崎大病院薬剤部

P-41　網羅的免疫複合体解析による強皮症の新たな病態研究

(若手)　○忽那 幸紀[1]，岩本 直樹[2]，一瀬 邦弘[2]，相原 希美[1]，中嶋 幹郎[1]，川上 純[2]，大山 要[1, 3]

[1]長崎大院医歯薬，[2]長崎大病院リウマチ・膠原病内科，[3]長崎大病院薬剤部

P-42　JNK制御リン酸化GAP-43はヒトの神経成長を同定できる

○岡田 正康[1, 2]，金子 奈穂子[3, 4]，金村 米博[5]，澤本 和延[3]，藤井 幸彦[1]，五十嵐 道弘[2]

[1]新潟大脳研脳外科，[2]新潟大医神経生化学，[3]名市大大学院医学研究科脳神経科学研究所　神経発達・再生医学分野，[4]同志社大大学院脳科学研究科・神経再生機構部門，[5]国立病院機構 大阪医療センター・臨床研究センター・先進医療研究開発部

P-43　血液ペプチドミクスを基盤とした新規生理活性ペプチドの探索

○小寺 義男[1]，七里 眞義[2]
[1]北里大理・疾患プロテオミクスセンター，[2]東京共済病院

P-44 (若手)　ヒト脳切片を用いたJAL-TA9のAmyloid-β42加水分解活性

○中村 里菜[1,2]，小西 元美[3]，林 芳弘[1]，齊藤 源顕[1]，秋澤 俊史[1,2]
[1]高知大学医，[2]O-Force 合同会社，[3]摂南大薬

P-45 (若手)　Aβ25-35の細胞毒性に対する酵素ペプチドJAL-TA9の効果

○岡田 百加[1]，中村 里菜[1,2]，齊藤 源顕[1]，秋澤 俊史[1,2]
[1]高知大学医，[2]O-Force 合同会社

P-46　ポリアミン類を用いた新たな細胞外小胞回収法による培養細胞由来試料の特性解析

○山田 美結[1]，成瀬 有純[2]，菊池 有純[2]，髙木 公暁[3]，堤内 要[1]
[1]中部大学応用生物学部，[2]大雄会医科学研究所，[3]大雄会第一病院泌尿器科

P-47　ラットにおけるエルゴステロールのコレステロール合成経路の抑制効果およびビタミン$D_3$合成の促進作用

○中川 沙織，不破 史子，桑原 直子，佐藤 眞治
新潟薬大

P-48　LC/MS/MSを用いるニーマンピック病C型モデル細胞におけるステロイドホルモンの代謝変動解析

阿部 愛[1,2]，○前川 正充[1,2]，佐藤 紀宏[2]，佐藤 裕[2]，公文代 將希[2]，
高橋 勇人[2]，菊地 正史[1,2]，檜垣 克美[3]，小倉 次郎[2,4]，眞野 成康[1,2]
[1]東北大薬，[2]東北大病薬，[3]鳥大研究基盤セ，[4]山形大院医

P-49 (若手)　腎不全モデルマウスの血漿および筋・腎・肝組織の代謝物解析

○逸見 佳宣[1]，木村 有那[2]，三枝 大輔[2]，佐藤 恵美子[1]
[1]東北大学薬学部　臨床薬学部分野，[2]帝京大学薬学部　臨床分析学研究室

P-50　尿中遊離糖鎖の検出と疾患マーカーとしての可能性

(若手)　○半澤 健[1,2]，岡本 三紀[2]，村上 博子[2]，中嶋 和紀[1]，宮本 泰豪[2,3]

[1]岐阜大・糖鎖生命コア，[2]大阪国際がんセ・研，[3]大阪国際がんセ・臨床検査学

P-51　新規CYP1A2活性評価法の開発に向けたAUC法と1点採血法の比較検討

(若手)　○大木 聖矢，髙野 大輝，尾川 慎悟，島﨑 隼人，深江 桃花，降幡 知巳，柴崎 浩美，横川 彰朋

東京薬大・薬

P-52　メラトニン尿中排泄量算出のための脱抱合反応における内標準物質としての安定同位体標識の比較

○横川 彰朋，尾川 慎悟，髙野 大輝，大木 聖矢，島﨑 隼人，深江 桃花，降幡 知巳，柴崎 浩美

東京薬大薬

P-53　安定同位体誘導体化LC-MS/MSを用いたヒト血清中におけるAGEsの一斉分析法の開発：アルツハイマー型認知症への応用

(若手)　○木下 真千佳[1]，六車 宜央[1]，赤津 裕康[2]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大薬，[2]名市大院医

P-54　誘導体化LC-MS/MS法を用いたシェーグレン症候群モデルマウス組織中短鎖脂肪酸プロファイル

(若手)　○長友 涼介[1]，金子 東暉[1]，清水 真祐子[2]，石丸 直澄[2]，常山 幸一[2]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大院薬，[2]徳島大院医歯薬

P-55　安定同位体誘導体化LC-MS/MSを用いたヒト胆汁中における腸内細菌叢由来代謝物の解析

(若手)　○金子 東暉[1]，六車 宜央[1]，宮部 勝之[2]，赤津 裕康[3]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大院薬，[2]日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院，[3]名市大院医

P-56　新規荷電Cookson型試薬のデザイン・合成とその性能評価

○小川 祥二郎，平田 結衣

福山大薬

P-57　SH-SY5Y細胞におけるprogesterone代謝物の同定

(若手)　○渋谷 斗磨[1]，楠瀬 翔一[2]，東 達也[2]
[1]東京理大院薬，[2]東京理大薬

P-58　GUS処理したヒト尿中に遊離される主要なビタミン$D_3$代謝物

(若手)　○髙田 一成[1]，萩原 雪乃[1]，冨樫 萌香[2]，橘高 敦史[3]，川越 文裕[3]，上杉 志成[4, 5]，楠瀬 翔一[2]，東 達也[2]
[1]東京理大院薬，[2]東京理大薬，[3]帝京大薬，[4]京大化研，[5]京大物質－細胞システム拠点

# 講演要旨

## 依頼講演

# １細胞質量分析法の開発　現状と今後の展開

〇水野 初

名城大学薬学部

## Achievements and Future Prospects of Live Single-Cell Mass Spectrometry

○Hajime Mizuno

Faculty of Pharmacy, Meijo University

生命を理解するためには、その最小単位である細胞内における分子の動きを正確に捉えることが必要であるが、大量の細胞をホモジナイズする従来の分析法では平均的な情報しか得ることができず、細胞個々の情報は失われてしまう。そこで私たちは、生きている細胞1個を顕微鏡で観察しながら細胞現象の発現と同時に起こる細胞内分子変化を検出するため、1個の細胞内成分を採取してそのまま質量分析することができる、単一生細胞質量分析法（Live Single-cell MS）を開発してきた。

本方法は、顕微鏡観察下において分析対象とする培養細胞に対し、マイクロマニピュレーターを用いて細胞1個を金属コーティングしたガラスキャピラリー（Cellomics Tip、先端口径 10 μm、HUMANIX）内に採取してそのまま質量分析するため、細胞現象観察とリンクした迅速な細胞内分子分析が可能である。さらに、キャピラリーの先端口径を2～3 μmと細くすることにより、細胞内のオルガネラなどの微小領域を選択的にサンプリング、質量分析することで細胞内の特定部位に局在する分子分析も可能となった。

本講演では、Live Single-cell MS法によるアプリケーション例として、細胞内の内因性代謝物および薬物などの外因性物質の細胞内局在解析について最近の研究結果を報告するとともに、現在研究を進めている、キャピラリー内誘導体化による極微量細胞内成分の高感度イオン化法の開発や、細胞の自動サンプリング装置開発について紹介する。

E-mail: hmizuno@meijo-u.ac.jp

# 質量分析を介した複合生命情報へのBioinformaticsによるアプローチ

〇財津 桂

近畿大学 生物理工

## Multimodal Informatics and Wide-data Analytics for Bioinformation via Mass Spectrometry

○Kei Zaitsu

Multimodal Informatics and Wide-data Analytics Laboratory, Department of Computational Systems Biology, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University

Omicsの普及によって生命情報に容易にアクセスできるようになり、近年ではsingle cell RNA-seqやメタゲノム解析の応用に加え、これらの計測手法を組み合わせて得られる生命情報を理解しようとする傾向が年々高まっている。さらに今後、マルチモーダルな計測手法から得られる、より複合的な生命情報を統合し、それらを視覚的に解釈することやデータ駆動型解析を行うためにはBioinformaticsが不可欠である。

これまでに演者はメタボローム解析で得られた多変量データに対してPCAやPLS-DAといった多変量解析に加え、PLSRなどを用いた予測モデルの構築などを行ってきた[1-5]。特にRやPythonを用いればBioinformaticsの実装は比較的容易であることから、既にBioinformaticsは研究者・科学者にとって基礎技術の1つであるといえるかもしれない。一方で、アンビエントイオン化質量分析（AIMS）のような計測技術とBioinformaticsを組み合わせることで、社会実装性の高い新たな技術の開発が期待できることから、演者はAIMSとBioinformaticsを組み合わせた新たなデータパイプライン: PiTMaPを開発した[6]。また、ベイズ統計モデリングによる時系列データ解析を用いた解析手法の開発[7]や、相関ネットワーク解析による媒介中心性を指標としたハブ分子の抽出[8, 9]、また、機械学習を用いたバイオマーカーの選定[9]などを行ってきた。本講演では、上記のBioinformaticsを用いた研究例を紹介すると共に、質量分析と他の計測手法で得られた多変量データを統合した複合生命情報に対するBioinformaticsによるアプローチと今後の展望について述べる。

【参考文献】

1) Zaitsu et al. Anal Bioanal Chem 2014, 2) Zaitsu et al. Life Sci 2015, 3) Zaitsu et al. Anal Chem 2016, 4) Hayashi, Zaitsu et al. Anal Chim Acta 2017, 5) Zaitsu et al. Anal Bioanal Chem 2019, 6) Zaitsu et al. Anal Chem 2020, 7) Kawakami, Zaitsu et al. Talanta 2021, 8) Zaitsu et al. Life Sci 2018, 9) Zaitsu et al. ACS Omega 2022.

# 講演要旨

## 受賞講演

### AY　奨励賞受賞講演

### AP　MMS優秀論文賞受賞講演

AY-1

# 生体内メタボローム解析技術開発と疾患バイオマーカー探索研究への応用

○三枝 大輔[1, 2]

[1]帝京大薬，[2]東北大メガバンク

# Technological Development of Metabolome Analysis and Application for Disease Biomarker Discovery

○Daisuke Saigusa[1, 2]

[1]Faculty of Pharma-Science, Teikyo University, [2]Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University

未来型医療は、病気の早期診断や個別化医療に加え、高精度な疾患予防に向けた新たな医療技術の開発が期待されている。現在までに、疾患発症には遺伝要因と環境要因の双方が影響し合うことが判っており、ゲノム医療技術の発展が目覚ましい一方で、環境要因は生活習慣や日常のストレスを含む外的要因に加え、腸内細菌叢の影響を受けるため、予防を目的としたリスク因子（バイオマーカー）の同定に課題が残されている。従って、環境要因が生体にもたらす影響を理解するためには、新たな解析技術開発が必要とされている。

生体内の代謝物（メタボローム）は、遺伝要因と環境要因によって形成される表現型を最も反映する分子群であることが示唆されており、メタボロームを解析することは、疾患の発症や病態の機能を理解するために好適であると考えられている。一般に、生体内メタボロームは、試料を前処理した後に、質量分析計（mass spectrometry, MS）に代表される機器分析による手法で測定される。特にMSを基盤とするメタボローム解析手法は、近年の検出感度や網羅性の向上、堅牢性の改善により、多種の分子群の測定が可能になったことから、基礎研究のみならず臨床研究における疾患バイオマーカー探索に大きく貢献している。しかしながら、MSによるメタボローム解析は再現性、定量および同定精度に課題があることも示唆されている。

また、メタボローム解析による疾患バイオマーカー探索は一般に血漿試料を用いるが、さらに組織による機能解析を実施する必要がある。しかしながら、組織に含まれるメタボロームを解析する場合、前処理過程で抽出操作を行うため、分子の位置情報が失われる。近年開発された、MSイメージング法は、組織切片上に分布する代謝物の位置情報を保持したまま直接可視化できるため、分子機能解析に大きく貢献している。従って、MSイメージング法を網羅的なメタボローム解析手法による疾患バイオマーカー探索研究に組み合わせることで、より信頼度の高い解析を実施することができると考えられている。

本発表では、我々がこれまでに取り組んできたMSによるメタボローム解析の課題解決に向けた技術開発ならびにMSイメージング法を組み合わせた疾患バイオマーカー探索研究の応用例を挙げ、今後の未来型医療の発展にどのように貢献できるかについて述べる。

E-mail: saigusa.daisuke.vf@teikyo-u.ac.jp

# Application of a UHPLC-MS/MS Method to Investigate the Metabolic Pathways of Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies Using Postmortem Cerebrospinal Fluid and Serum Samples

○六車 宜央[1,2]，赤津 裕康[3]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大院薬，[2]日本学術振興会特別研究員（DC1），[3]名市大院医

○Yoshio Muguruma[1,2], Hiroyasu Akatsu[3], Koichi Inoue[1]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [2]Japan Society for the Promotion of Science, [3]Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University

**【目的】**認知症は，脳病態により主にアルツハイマー型（AD），脳血管性型，前頭側頭型，レビー小体型（DLB）に分類されている．現在，それらの臨床診断には，認知機能検査や画像診断等が存在するが，実際には早期・軽度の段階における病態生理を正確に把握することは難しく，死後剖検の病理診断結果と異なることも多い．そのため，早期診断や種別判定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．そこで我々は，生体試料中の低分子化合物に着目し，99種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．本研究では，認知症種別の病理診断に基づく脳脊髄液（CSF）及び血清にW-TMetを応用し，認知症種別の鑑別が可能となるバイオマーカー候補化合物を探索した．

**【方法】**アミノ基に特異的に結合する9-Fluorenylmethyl chloroformate（Fmoc）を用いた官能基特異的な誘導体化法及び33種の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】**Fmoc誘導体化の反応性やイオン化等を最適化し，99種の内因性アミンを10分以内に一斉分析が可能な分析系を構築した．また内標準検量線において，$R^2$ ＞0.992と良好な結果が得られた．本法をAD及びDLB患者から採取されたCSF・血清試料に応用し，パスウェイ解析及び多変量解析を実施した．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を捉えることができ，AD及びDLBを二群に選別することが可能であったことから，マルチバイオマーカーを利用した鑑別診断への可能性が見出された．本法は，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．

E-mail: kinoue@fc.ritsumei.ac.jp

# 講演要旨

---

## 国際シンポジウム

**The 2nd International Joint Symposium of JSBMS and MSACL**

オーガナイザー：五十嵐 一雄 (医薬分析協会)
中山 憲司 (新潟医療福祉大学)

# Mass Spectrometry Imaging in Alzheimer's Disease

○Masaya Ikegawa

Department of Life and Medical Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

Amyloid-beta (Aβ) pathology, the major pathological hallmark of Alzheimer's disease (AD), has been established to precede other pathological events in AD and to be critical in driving AD pathogenesis. Although it is still not fully understood why, where and when Aβ accumulates in the brain and what are the upstream events that lead to Aβ plaque for the majority of cases, recently, matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry based chemical imaging (MALDI MSI) has been successfully introduced to comprehensively delineate spatial Aβ peptide- and neuronal lipid patterns in brains with AD. This rather new approach overcomes major limitations inherent to commonly used biochemical methods and opens up for both static and dynamic biochemical interrogation of amyloid aggregation *in situ*. Here we introduce the methodological concepts and challenges of MALDI MSI to dissect the spatial distribution pattern of diverse Aβ isoforms including various C- and N-terminal truncations associated with cerebral amyloidosis in AD brain tissue. Moreover, we will show how MALDI MSI covered *in situ* lipidomics in terms of plaque pathology. Together, in this talk, how MALDI MSI can contribute and exceed common techniques to study neuroproteomics and to further shed light on complex molecular mechanisms underlying neurodegeneration will be discussed.

References

1) Kakuda N. et al., Acta Neuropathol Commun. 5: 73, 2017.

2) Park H. et al., Acta Neuropathol Commun. 10(1):28, 2022.

E-mail: mikegawa@mail.doshisha.ac.jp

# qShot MALDI Phospholipidomics and Its Clinical Applications

Kenji Nakayama[1, 2], Xin Li[1, 3], Koji Shimizu[4], Shusuke Akamatsu[1], Takahiro Inoue[5], Takashi Kobayashi[1], Osamu Ogawa[1, 6], Takayuki Goto[1]

[1]Department of Urology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, [2]Department of Clinical Engineering and Medical Technology, Faculty of Medical Technology, Niigata University of Health and Welfare, [3]Department of Urology, Peking University Third Hospital, [4]Clinical Research Center for Medical Equipment Development, Kyoto University Hospital, [5]Department of Nephro-Urologic Surgery and Andrology, Mie University Graduate School of Medicine, [6]Japanese Red Cross Otsu Hospital

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) is a powerful technique that provides extremely sensitive detection of biomolecules such as lipids, metabolites, peptides, and proteins. This technology has been widely embraced by laboratories worldwide because of its fast, simple, and inexpensive analysis. MALDI offers some essential attributes for biomolecular detection, but its application to quantitative analysis requires careful optimization of the experimental parameters. This is considered the primary disadvantage of MALDI analysis. The normalization of signal intensity is extremely important to minimize variations in peak intensity during the MALDI process. Internal standard (interSTD) normalization by mixing standard compounds into analyte mixtures was thought to be the optimal approach to minimize such uncertainties. A good interSTD for quantification should have similar physical and chemical properties to those of the analyte. As such, choosing an appropriate molecule as interSTD for particular analytes plays a significant role in successful quantification. In the MALDI process, the interSTD should also have an ionization efficiency comparable to that of the analyte. For instance, an ideal interSTD is a stable isotope-labeled form of the target analyte. However, these are typically expensive and/or commercially unavailable. Hence, it has been necessary to explore the application of non-isotope-labeled interSTDs with stable properties and low cost. The present study used PLs and LPLs as representative analytes for MALDI analysis, as they have been attracting attention as disease biomarkers. This study investigates and validates whether only two ionization STDs (ionSTDs) can be used for the normalization of the whole PL species in a complex bio-lipid background (i.e., urinary lipid extracts).

In this presentation, we would like to explain “qShot MALDI analysis" which was defined as a cost-effective, rapid, simple, convenient, and reliable quantitative method using only two ionSTDs.

Email: kenji-nakayama@nuhw.ac.jp or knakayam@kuhp.kyoto-u.ac.jp

IS-3

# Measuring Proteins by LC-MS/MS: Improving Clinical Research and Patient Care

○Andrew N. Hoofnagle
University of Washington, Seattle, WA, USA

*Background*: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry holds the promise of better patient care via precise and specific biomarker quantification. While the technology has been used in the clinical laboratory to analyze small molecules for many years, we are still learning about optimal measurements of peptides and proteins. There are two important areas of clinical care and translational research that our laboratory has been involved in for the past decade. First, vitamin D biology has helped build a solid foundation for targeted mass spectrometry in the clinical laboratory. However, the definition of vitamin D deficiency has been a source of controversy for many years and the appropriate treatment for observed insufficiency is unclear. Significant effort has been invested in trying to understand if there is a better biomarker of deficiency in order to provide more accurate diagnosis and to monitor for the response of potential novel interventions. Second, patients with differentiated thyroid cancer often develop autoantibodies making the monitoring of the tumor marker thyroglobulin after treatment complicated. Many laboratories have now developed approaches to quantifying this protein that avoid interference from endogenous interferences, such as autoantibodies.
*Objectives*: To discuss our current understanding of vitamin D binding protein as an analyte and biomarker and to describe an effective workflow for the quantification of thyroglobulin in clinical samples.
*Methods*: We developed a trypsin digestion-LC-MS/MS assay for the quantification of vitamin D binding protein. Using protein purified from the plasma of homozygous individuals, we assessed the influence of polymorphisms on our ability to quantify proteins using bottom-up approaches. We applied the assay to different research studies and clinical situations. In addition, we have developed a clinical assay for thyroglobulin, which was compared with four other similar assays being run in North America.
*Results*: Our methods can serve as examples of quantitative LC-MS/MS assays of other proteins in human plasma. For vitamin D binding protein, calibration curves of purified protein spiked into chicken serum or human serum had similar slopes, demonstrating that protein polymorphisms and post-translational modifications can have little influence on the quantitative data provided by bottom-up protein measurements. The assay was also used to diagnose the first two cases of complete vitamin D binding protein deficiency. For thyroglobulin, the four clinical laboratories compared significantly better with each other than four commercially available immunoassays all run in the same laboratory.
*Conclusions*: The lessons learned from vitamin D binding protein and thyroglobulin will help assure the field that better results for translational research and patient care are attainable in clinical laboratories.

E-mail: ahoof@uw.edu

# IgG4 Related Disease Diagnosis and Monitoring Using LC-MS/MS: Advantages over Nephelometry

○Daniel T Holmes[1, 2], Andre Mattman[1, 2]

[1]Department of Pathology and Laboratory Medicine, Providence Health, Vancouver, BC, Canada, [2]Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

*Background*: IgG4 related disease (IgG4RD) is a chronic multiorgan fibro-inflammatory disease histologically characterized by dense infiltrates of IgG4 positive lymphocytes into affected tissues. Common clinical presentations include enlargement of the major salivary glands, autoimmune pancreatitis, tubulointerstitial nephritis, retroperitoneal fibrosis and ocular disease primarily attributable to painless swelling of the lacrimal glands. The traditional laboratory approach to the identification of this disease is the measurement of IgG subclasses using immuno-nephelometry (IN). However, we have noted a phenomenon of paradoxically normal IgG4 and concomitant IgG2 elevation in patients with new-onset IgG4RD. We describe the resolution of this paradox using an in-house LC-MS/MS method for the IgG subclasses. Additionally, we will discuss a 5 year-experience of a province-wide diagnostic program using LC-MS/MS.

*Methods*: Proteotypic peptides for the respective IgG subclasses and for total IgG are quantified by LC-MS/MS after reduction, alkylation and trypsinization using two multiple reaction monitoring transitions per subclass and internal standard peptides added after digestion.

*Results*: Results of LC-MS/MS IgG subclass quantitation were compared with IN results revealing multiple inter-subclass antibody cross reactivities affecting both major vendors. One vendor has addressed the most serious cross reactivity affecting their IgG2 assay which was causing clinical researchers to incorrectly implicate IgG2 in IgG4RD pathophysiology. In the course of 5 years of clinical production, we have encountered some challenges including: an unanticipated single nucleotide polymorphism in the proteotypic peptide for IgG4, marked increase in clinical demand requiring a consideration for utilization management and attendant operational challenges related to assay scaling. However, the rate of diagnosis of IgG4RD in our jurisdiction and the opportunity to correctly identify affected individuals has increased while reagent cost savings are approximately $80-100K per year.

*Conclusions*: We describe an LC-MS/MS assay for the simultaneous quantitation of all IgG subclasses and of total IgG which eliminates antibody mediated interferences, decreasing diagnostic confusion and distraction, and reducing cost without increasing technologist time.

E-mail: dtholmes@mail.ubc.ca

# 講演要旨

---

## シンポジウム

### S-1　医化学研究における質量分析の応用
### ～イメージングから血液マーカー開発まで～

オーガナイザー：杉浦 悠毅 (京都大学)

### S-2　ストレス社会と質量分析

オーガナイザー：井之上 浩一 (立命館大学)

### S-3　脳科学・脳疾患における質量分析の応用

オーガナイザー：財津 桂 (近畿大学)

S-1-1

# 酸化リン脂質の包括的解析および可視化技術

〇松岡 悠太

京都大学大学院医学研究科がん免疫総合研究センター

## Structural Library and Visualization of Endogenously Oxidized Phospholipids

○Yuta Matsuoka

Graduate School of Medicine, Kyoto University, Center for Cancer Immunotherapy and Immunobiology

酸化リン脂質は、細胞死や炎症反応など様々な疾患発症イベントにおいて、重要な役割を担うと考えられている。一方、これまでに生体内で観測された酸化リン脂質の数・種類は極めて少ない。この要因として、酸化リン脂質の構造情報およびデータベースの不足が挙げられる。

そこで本研究では、試験管内にて生成させた酸化リン脂質に対して、探索性に優れた分析手法であるノンターゲット分析を実施し、そのデータベースの拡大・包括的解析技術の開発を行った[1]。

ノンターゲット分析の結果、計465種類の酸化ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC)構造情報からなるデータベースを構築した。さらに本技術をアセトアミノフェン誘発肝障害モデルマウスへと応用し、障害時にて計70種の酸化PC量が上昇することを見出した。中でも、特にPCに分子内にエポキシ基/水酸基を有する化学種(PC PUFA;O2)が顕著に増加することを明らかとした。

続いて、これら酸化PCの組織内局在を精査するため、18O2ラベル化法およびMALDI-MS2を用いたMSイメージング法を新たに構築した。本可視化技術を応用し、酸化PCが、特に重度の組織障害を生じる中心静脈付近に多く蓄積することを見出した。

本研究にて開発した構造解析・可視化法は、酸化リン脂質の疾患発症時における生理学的役割を理解する上で極めて有用であり、今後その応用が期待される。

Reference

(1) Matsuoka Y. *et al*., *Nat. Commun.* **12**, 6339 (2021)

E-mail: matsuoka.yuta.6r@kyoto-u.ac.jp

S-1-2

# COVID-19患者の予後判定に有用なアミノ酸カタボライトマーカー

〇杉浦 悠毅

京都大学大学院医学研究科附属 がん免疫総合研究センター

## Amino Acid Catabolite Markers for Early Prognosis of Pneumonia in Patients with COVID-19

○Yuki Sugiura

Center for Cancer Immunotherapy and Immunobiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

SARS-CoV-2（COVID-19）感染者の多くは重症肺炎を発症し、また軽症の患者が突然重症肺炎を発症し、しばしば致命的な結果をもたらす症例が存在する。そのため、早期の予後判定と層別化に基づく治療介入が急務である。しかし、現在のところ、SARS-CoV-2感染初期段階における有効な予後予測マーカーは十分に検討されていない。我々は、患者血清サンプルの包括的なメタボローム解析を通じて、発症後5日以内の代謝物組成の明らかな変化が、将来の重症度と直接相関することを確認した。これらの変化のうち、de novoヌクレオチド合成経路のアミノ酸異化物の濃度が上昇し、kynurenineと分岐鎖ケト酸（BCKA）が初期のウイルス量を反映する早期予後マーカーとして同定された。SARS-COV2およびインフルエンザ感染マウスの肺組織では、このようなアミノ酸の分解が、感染初期にのみ見られる気道組織細胞の異常増殖に伴うヌクレオチドのde novo合成に関与していることを明らかにした。このように、呼吸器系ウイルス感染症の初期段階における気道組織のリモデリングは、全身の代謝リモデリングを誘導し、この過程で産生されるアミノ酸異化物は、後期段階における過剰な免疫炎症反応を予測する有効なマーカーとなる。

E-mail: yuki.sgi@gmail.com

S-1-3

# アルドステロンの質量分析イメージング

○西本 紘嗣郎[1, 4]，杉浦 悠毅[2]，東 達也[3]，末松 誠[4]

[1]埼玉医科大学国際医療センター泌尿器腫瘍科，[2]京都大学医学研究科附属がん免疫総合研究センター マルチオミクスプラットフォーム，[3]東京理科大学薬学部臨床分析科学研究室，[4]慶應義塾大学医学部医化学教室

## Mass Spectrometry Imaging of Aldosterone

○Koshiro Nishimoto[1, 4], Yuki Sugiura[2], Tatsuya Higashi[3], Makoto Suematsu[4]

[1]Department of Uro-Oncology, Saitama Medical University International Medical Center, [2]Graduate School of Medicine, Kyoto University, [3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, [4]Department of Biochemistry, Keio University School of Medicine

原発性アルドステロン症はアルドステロン産生腺腫 (APA) と特発性アルドステロン症 (IHA) に分類される。前者は片側副腎摘除術により治癒する一方、後者は生涯にわたるミネラルコルチコイド受容体阻害薬の服用が必要となる。この治療の原則は数十年変わりがない。新しい治療法の開発にはこれらの病態を十分に把握することが重要である。2010年に我々は、アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) とコルチゾールの合成酵素 (CYP11B1: CYP11B2と93%のアミノ酸配列が同一) を区別して検出できる免疫組織化学染色に成功した[1]。結果、正常ヒト副腎皮質は従来から知られる球状層・束状層・網状層の3層構造に加え、アルドステロン産生細胞クラスター (APCCと新規命名) が検出されることが判明した。APCCにはAPAで報告されたイオンチャネルポンプ遺伝子の体細胞変異が検出されること[2]、APCCは加齢とともに増加すること[3]、APCCからAPAに移行すると推測される病変が検出されること[1,4]、IHAにはAPCCが検出されること[5]などより、APCCの増加や増大はそれ自体が病変となりさらにはAPCCがAPAの発生母地となると考えられる。しかしAPCCにアルドステロンが局在するかは不明のままであった。副腎の凍結組織切片上にマトリクス処理およびステロイドの誘導体化を行うことにより、APCCに高濃度のアルドステロンが検出されることを報告した[6]。この検出には、アルドステロンと同一分子量でコルチゾン ($C_{21}H_{28}O_5$: コルチゾールの不活性型)を区別する必要があった。本シンポジウムではアルドステロンの質量分析イメージングを通じて、ステロイドの質量分析に関する意義や問題点について議論したい。文献: 1 *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 2296–2305 (2010); 2 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4591-9 (2015); 3 *Int. J. Endocrinol.* **2016**, 7834356 (2016); 4 *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 6–9 (2016); 5 *Hypertens. Res.* **44**, 498–507 (2021); 6 *Hypertension* **72**, 1345–1354 (2018).

E-mail: kn7961@5931.saitama-med.ac.jp

S-1-4

# ジアステレオマー誘導体化によるキラル分子のエナンチオ選択的イメージング

○杉山 栄二[1]，水野 初[1,2]，轟木 堅一郎[1]

静岡県大薬[1]，名城大薬[2]

## Enantio-Selective Imaging of Chiral Molecules by Diastereomeric Derivatization

○Eiji Sugiyama[1], Hajime Mizuno[1,2], Kenichiro Todoroki[1]

[1]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [2]Faculty of Pharmacy, Meijo University

【目的】生理活性分子の多くはキラルであり、そのエナンチオマーは異なる生物学的性質を示す。薬効を示す分子のエナンチオマーが重篤な毒性を示す場合があるため、それらの分離は創薬における重要課題の一つである。また、生体内でマイナーな立体構造を持つキラル分子ががんや慢性腎臓病に伴い増加することが明らかとなっており、それらの分布解析は病理学的新知見をもたらすと考えられる。しかし、各エナンチオマーの分布を選択的に可視化するのは通常極めて困難である。そこで演者らは、質量分析イメージングにジアステレオマー誘導体化とイオンモビリティースペクトロメトリー（IMS）を組み合わせ、キラル分子の各エナンチオマーを選択的に可視化するための検討を進めている。

【方法】アミノ酸や有機酸の各エナンチオマーに対して種々の誘導体化試薬を反応させ、得られた誘導体から生じる各種イオンの移動度をIMSにより測定した。比較的良好な分離度を示した誘導体化試薬の構造を基に、新規誘導体化試薬を合成し、その評価を行った。

【結果・考察】種々のがんで異なる鏡像異性体が蓄積する有機酸（D-, L-2-ヒドロキシグルタル酸）をIMSで分離することに初めて成功した[1]。また、比較的広範な分析対象に対して良好な分離度を示す誘導体化試薬を数種見出した。それらを基に合成した新規誘導体化試薬は、IMS/質量分析において、従来試薬を大幅に上回るシグナル強度と高い分離度を与えた。この試薬をマウス組織に含まれるキラル有機酸の分布解析に適用し、各エナンチオマーが組織内で異なる分布を示す様子を可視化した。本シンポジウムでは、以上の成果について紹介する。

【参考文献】[1] Fukui and Sugiyama *et al*. J Sep Sci., 4, 3489-3496, 2021.

E-mail: esugiyama@u-shizuoka-ken.ac.jp

S-2-1

# 高齢者、地域住民のデジタルブラッドデータベース構築を目指した医療系学生教育を並走させた地域コホート体制の構築

○赤津 裕康

名古屋市立大学大学院医学研究科地域医療教育学

# Establishment of the Cohort System with Medical Student Education to Build Digital Blood Database of the Elderly and Local Residents

○Hiroyasu Akatsu

Department of Community-Based Medical Education, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

【目的】

少子高齢化、人口減少が進む中で労働人口も減少し、高齢化率は40%近く成る事が予想されている。今後の保健・医療体制は疾病発症による病院受診と言うスタイルから主体的な予防・発症予測が求められ、その体制を構築せねばならない。

【方法】

地域包括ケアの推進と並行し文部科学省の未来医療研究人材養成拠点形成事業が平成25年度から全国15拠点で始まった。名古屋市立大学も拠点校となり、学生教育と連動させた地域住民への健康活動の啓蒙・啓発を行い、その基盤を継承し国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）IoT等活用行動変容研究、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）の「共創の場形成支援プログラム（共創分野・育成型）で地域介入研究を展開した。

血液成分解析のデジタル化（デジタルブラッド）は立命館大学の協力を得て、ワイドターゲットメタボロミクス解析が可能となった。

【結果】

学生教育を並行させた地域活動は地域高齢者への好影響をもたらし、恒常的な観察。介入研究基盤を構築することが出来た。

AMEDで展開した介入研究において、生活・食事状態、日常活動状態などが基盤情報として整えられた血液サンプルを収集することが出来た。

【考察】

今後、収集血液をワイドターゲットメタボロミクス解析に掛ける事で代謝マップ上でのダイナミックな変化とともに、基盤情報とも連携させた深層機械学習を展開することでデジタルブラッドの構築を目指していく。デジタルブラッドの時間軸解析をさらに行う事で、超高齢社会における疾病予測、予防を可能とする貴重な情報源を確立できると考えている。

---

E-mail: akatu@med.nagoya-cu.ac.jp

S-2-2

# ワイドターゲットメタボロミクスおよび機械学習によるヒト体内代謝環境の解析

○六車 宜央[1,2]，赤津 裕康[3]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大院薬，[2]日本学術振興会特別研究員（DC1），[3]名市大院医

# Analysis of the Human Metabolic Environment by Widely Targeted Metabolomics Combined with Machine Learning

○Yoshio Muguruma[1,2], Hiroyasu Akatsu[3], Koichi Inoue[1]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [2]Japan Society for the Promotion of Science, [3]Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University

【目的】近年における人工知能（AI）技術の発展は目覚ましく、医療分野においてもAIを活用した機序解明や診断・治療支援が進んでいる。我々は現在までに、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）を用いて、内因性代謝物を包括的に捉える手法（Widely targeted metabolomics, W-TMet）を開発し、疾患特異的なメタボロームデータを取得・解析してきた。しかしながら、得られる膨大なデータの複雑さ・不均一さから、人の知見のみでデータに内在する微小な変化を捉え、処理することは困難であった。そこで、包括的かつ検出力の高いデータの処理方法として、新しくAIのディープラーニングを用いた解析を検討している。本発表では、アルツハイマー型認知症（AD）を対象疾患として、死後剖検により得られた脳脊髄液（CSF）への応用例について報告する。

【方法】前処理として、CSFを除タンパクした後に9-Fluorenylmethyl chloroformate（Fmoc）を用いて誘導体化を行なった。その後、LC-MS/MS（ACQUITY UPLC H-Class/Xevo TQD, Waters）により測定し、定量データを得た。定量は、内標準法を採用し、内標準物質として各種安定同位体を用いた。

データ解析には、対照群23例およびAD群15例を全データセットとして利用し、Python 3.7.0による畳み込みニューラルネットワーク（CNN）を用いた画像認識を実施した。また、CNNにおける特徴量の可視化には、Grad-CAM（Gradient-weighted Class Activation Mapping）を利用した。

【結果および考察】Fmoc誘導体化LC-MS/MSにより、10分以内に120種以上の測定対象物質を一斉分析することに成功した。本法を対照群およびADのCSFに応用し、得られた定量データを最適化した後、教師データとしてAIに学習させることで、AD特異的な代謝変化を見出すニューラルネットワークを構築した。ホールドアウト法を用いてデータセットを分割し、モデルの汎化性能を評価した結果、ADおよび対照群を83%以上の正答率で判別することが可能であった。またGrad-CAMを用いて、AIがどの部分を認識して識別しているのかを可視化した結果、様々な代謝物が関与していることが判明し、新たなバイオマーカー候補化合物を特定できる可能性が示唆された。

E-mail: kinoue@fc.ritsumei.ac.jp

S-2-3

# 酸化ストレスを評価するための生体内バイオマーカーの分析

〇岩崎 雄介

星薬科大学

## Analysis of Biomarker for the Assessment of Oxidative Stress

○Yusuke Iwasaki

Laboratory of Biopharmaceutics and Analytical Sciences, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

【目的】生体内で過剰に産生された活性酸素種（ROS）は、生体内分子を損傷することから、さまざまな疾患を引き起こすと考えられている。そのため、生体内におけるROSの産生状態を客観的に把握することができれば、疾患の原因や発症の予防に貢献できると考えられているが、高い反応性を示すROSを直接分析することは困難とされているため、ROSの生成量と相関性が高い酸化ストレスマーカーを分析することでROSの産生量は評価されている。一方、糖尿病患者はうつ病などの精神疾患に高い割合で罹患することが示されており、この原因の一つとして脳内の酸化ストレス状態がこれらの疾患を惹起させると考えられている。そこで本研究では、糖尿病モデルマウスの脳内における酸化ストレスマーカーの量と神経伝達物質の量との関連性について、LC/MS/MSを用いた分析を行い評価した。

【方法】生体内の酸化ストレス状態を評価するためのバイオマーカーとして、グルタチオン、位置異性体のチロシン、8-OHdGを選定した。実験動物から得られる極微量の生体試料から、それぞれの生体内バイオマーカーを高感度かつ選択的に測定するために、質量分析用誘導体化試薬によって測定対象物質の誘導体化を行った。得られた試料は、LC/MS/MSによって分析を実施した。

【結果】グルタチオンは、試料の前処理過程における自動酸化を防ぐ目的で、マレイミドによるチオール基の保護を行った。位置異性体のチロシンは、MS/MSにおける感度の向上を達成するために、DEEMMによる誘導体化を行った。それぞれのバイオマーカーを同一試料から高感度に測定する方法を開発し、糖尿病に罹患したモデルマウスの脳内における酸化ストレス状態を評価した。その結果、糖尿病モデルマウスの脳内において、神経伝達物質の量が変化しており、さらにグルタチオン類の濃度も変化していた。

E-mail: iwasaki@hoshi.ac.jp

S-2-4

# 病理学から見た化学物質安全性評価における質量分析イメージングの有用性

〇石井 雄二

国立衛研

## Potential of Mass Spectrometry Imaging in Safety Assessment of Chemical Substances from the Viewpoint of Pathology

○Yuji Ishii

Division of Pathology, National Institute of Health Sciences

毒性病理学分野では、生体分子の可視化に古くから免疫組織化学染色法が用いられてきた。本法はタンパク等の高分子を高感度に検出できるが、抗体を要することから検出できるのは既知の分子に限られる。一方、質量分析イメージングでは既知の分子だけでなく未知の分子についてもその位置情報と同時に構造情報を得ることができ、低分子化合物であっても検出が可能であることから、毒性病理学分野においても新たな研究ツールとして期待されている。また、脱離エレクトロスプレーイオン化法（DESI）を用いた質量分析イメージングは1）マトリックス塗布などの複雑な前処理が不要である、2）イオン化機構が質量分析装置で一般的に用いられるエレクトロスプレーイオン化法（ESI）と類似しており、ESIでイオン化する分子は本法により比較的容易に質量分析イメージングが得られる、3）レーザーを使用しないため非破壊的であり、イメージング後の試料を染色して病理組織学的解析と比較できるといった利点がある。このような背景から、我々はDESIによる質量分析イメージングの毒性病理学研究への応用として、ラット腎臓の髄質外帯外層に発がん性を示すアカネ色素をモデルに、アカネ色素投与後のラット腎臓における構成成分及び代謝物の分布解析による発がん原因成分の検索と、その発がん原因成分が引きおこす腎臓の病理組織学的変化、DNA損傷及び遺伝子変異と分布との関連について検討を行ってきた。本講演ではこれらの研究結果を紹介し、化学物質の安全性評価における質量分析イメージングの有用性と今後の展望について考察する。

E-mail: y-ishii@nihs.go.jp

S-3-1

# 脳腫瘍研究における質量分析の応用と今後の課題

〇江口 盛一郎

東京女子医大・脳神経外科

## Brain Tumor Research Applying Mass Spectrometry and the Future Tasks

○Seiichiro Eguchi

Department of Neursurgery, Tokyo Women's Medical University

様々な脳腫瘍においてゲノム解析が進み、多くの腫瘍で病理組織診断に遺伝子異常・変異の確認が必須の時代となった。良性脳腫瘍の代表例ともいえる髄膜腫（meningioma）においても複数の変異遺伝子が同定されているが、ゲノムの変異が全て腫瘍の表現型に直接影響するわけではない。この点において、質量分析法（探針エレクトロスプレーイオン化法）を応用したメタボローム解析（PESI/MS/MS）は腫瘍の判別分析が可能である。我々は髄膜腫を対象に、病理組織学的な悪性度の異なる腫瘍間で代謝プロファイルを解析、比較することで、腫瘍の悪性化に関与する代謝経路の検証を行った。対象は2014年1月から2020年8月の期間に当院で摘出術を施行した髄膜腫の症例で、腫瘍検体は採取後、代謝物の変化を抑えるため液体窒素で速やかに凍結を行った後、マイナス80度のDeep freezer内で凍結保存した。これらの凍結保存中の脳腫瘍検体のうち、病理組織学的悪性度の異なる3種類のmeningioma、Meningothelial（WHO Grade 1)：20、Atypical（G2）：10、Anaplastic（同G3）：10検体に対して、PESI/MS/MSを用いて代謝物の解析を行った。72成分の代謝プロファイリングを行い、統計ソフトRを用いて多変量解析を行うと、これら3群の代謝プロファイルには明確な相違が認められた。PLS-DA score plotsからは3群は異なる軸方向に分離され、G1からG2、G3への代謝プロファイルの変化が非連続であることが確認された。また、同じG2群の中に代謝プロファイルが明らかに異なる亜群（G2m）の存在が確認され、このG2m群では癌と同様にグルタミノリシスが亢進していることが確認された。

本研究から、これまで髄膜腫はG1→G2→G3と段階的に悪性転化が進行すると考えられていたが、AtypicalとAnaplastic meningiomaは別系統の腫瘍である可能性が示唆される。また、良性腫瘍に分類される髄膜腫でもグルタミノリシスが亢進していることは興味深く、障害されているクエン酸回路の正常化は腫瘍の悪性化を抑制できる可能性があるのではないかと考える。今後はメタボローム解析にトランスクリプトーム解析を追加して、悪性化に伴い発現している遺伝子を網羅的に解析し、髄膜腫の悪性化機序の解明を進めたい。

Reference: Zaitsu K, Eguchi S et al. Analytical Chemistry 2020

E-mail: eguchi.seiichiro@twmu.ac.jp

S-3-2

# オミックス技術による精神疾患の病態解明と診断技術開発

○吉見 陽[1, 2]

[1]名城大薬，[2]名城大トランスレーショナルリサーチセンター

# Elucidation of the Pathophysiology of Psychiatric Disorders and Development of Diagnostic Tools Using Omics Technologies

○Akira Yoshimi[1, 2]

[1]Faculty of Pharmacy, Meijo University, [2]Clinical OMICs and Translation Research Center, Meijo University

*Background*: Although a number of studies have identified several convincing candidate genes or molecules, the pathophysiology of schizophrenia has not been completely elucidated. Therapeutic optimization based on pathophysiology should be performed as early as possible to improve functional outcomes and prognosis; to detect useful biomarkers for schizophrenia, which reflect pathophysiology and can be utilized for timely diagnosis and effective therapy. To elucidate pathophysiology and search for biomarkers, we have conducted research using omics technologies (next-generation sequencing, microarray, and mass spectrometry). Here, I would like to present about the proteome analysis of lymphoblastoid cell lines derived from patients with schizophrenia.

*Methods*: We employed fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis and differentially expressed proteins (DEPs) were sequenced by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. DEPs were confirmed by western blotting and multivariate logistic regression analysis was performed to identify an optimal combination of biomarkers to create a prediction model for schizophrenia.

*Results*: Among the eight candidate proteins (HSPA4L, MX1, GLRX3, UROD, MAPRE1, TBCB, IGHM, and GART), we successfully constructed logistic regression models comprised of 4- and 6-markers with good discriminative ability between SCZ and CON. In both WB and gene expression analysis of LCL, MX1 showed reproducibly significant associations. Moreover, Mx1 and its related proinflamatory genes (*Mx2*, *Il1b*, and *Tnf*) were also up-regulated in poly I:C-treated mice.

*Conclusions*: Differentially expressed proteins might be associated with molecular pathophysiology of SCZ, including dysregulation of immunological reactions and potentially provide diagnostic and prognostic biomarkers.

E-mail: ayoshimi@meijo-u.ac.jp

S-3-3

# PESI/MS/MSとベイズ統計モデリングを用いた脳科学への新たなアプローチ

○川上 大輔

Shimadzu Europa GmbH

# A New Approach to Neuroscience Using PESI/MS/MS and Bayesian State-Space Model

○Daisuke Kawakami

Shimadzu Europa GmbH

高次脳機能は、グルタミン酸(L-Glu)を神経伝達物質とする興奮性シナプスと、γ-アミノ酪酸(GABA)を神経伝達物質とする抑制性シナプスの働きにより維持されていることから、神経伝達物質の挙動を観察することは、複雑な脳機能の解明に大変重要と考えられている。マイクロダイアリシス(MD)法は、in vivo条件下においてマウス脳内の細胞外成分を回収する手法として用いられている。従来、MDで回収した神経伝達物質等の測定法として、液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）等が用いられてきたが、比較的多量のサンプルを必要とし、結果的に時間分解能が低下することに加え、灌流液中の高濃度塩を除去するための煩雑な前処理が必要であった[1)]。そこで、前処理操作を必要としない新たな質量分析法PESI/MS/MS[2)]を用いて、MDで回収したL-GluおよびGABAの定量法を構築した。さらに、高濃度$K^+$誘導脱分極時の線条体中L-GluおよびGABAの変化を観察し、得られた時系列データについてベイズ統計モデリングによる状態空間モデルを適用し、本手法の実用性の評価を行った。マウス線条体にMDプローブを留置し、自由行動下で高濃度$K^+$を含む人工脳脊髄液（aCSF）を灌流し、脱分極誘導時のL-GluとGABAの濃度変化を観察した結果、高$K^+$誘導脱分極により、L-GluおよびGABAの濃度は、それぞれ定常状態の約2倍および7倍のレベルまで増加し、状態空間モデルから推定した95%信用区間よりも高い数値であることが示された[3)]。本手法を用いることで自由行動下のマウス脳内神経伝達物質の挙動を簡便に、1分毎に観察することができる。また、得られた時系列データに状態空間モデルを適用することで、1匹のマウスの結果から、脳内神経伝達物質の挙動を解析できる。本手法を各種神経変性疾患のモデルマウスなどに適用すれば、各病態における脳内神経伝達物質の挙動をより詳細に解析することができ、新たな病態機序の解明に繋がることが期待できる。

【Reference】

1) Buck K., et al., J. Neurosci. Methods 182 (2009) 78-84.
2) Zaitsu K., et al., Anal. Chem. 88 (2016) 3556-3561.
3) Kawakami D., et al., Talanta. 234 (2021) 122620.

E-mail: kawakami@shimadzu.eu

# 講演要旨

## ミニワークショップ

### GC-MS尿有機酸分析の精度管理-化学診断委員会からの提言と推奨

オーガナイザー：重松 陽介 (福井大学)

# GC-MS尿有機酸分析の精度管理-化学診断委員会からの提言と推奨

○重松 陽介[1]，○張 春花[2]

[1]福井大学小児科，[2]ミルスインターナショナル研究開発部

## Quality Control in Urinary Organic Acid Analysis by GC-MS

○Yosuke Shigematsu[1], ○Chunhua Zhang[2]

[1]Department of Pediatrics, University of Fukui, [2]Department of research & development, MILS International

［緒言］公的事業である新生児マススクリーニングの対象疾患や指定難病には有機酸代謝異常症が数多く含まれ、その診断用検査である「尿中有機酸分析」は診療報酬を算定出来る。2020年度の診療報酬改定では「尿中有機酸分析」を含む特殊検査の実施医療機関側の要件が設定される一方、実施検査所の要件は緩和されたが、精度管理を含む検査の質が問われることに変わりはない。

日本医用マス学会・化学診断委員会は、上記検査を提供している検査機関に対して、既にERNDIM（European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism）の外部精度管理を推奨してきたが、2020年度の診療報酬改定を踏まえ推奨内容を再検討し、今後の精度管理に関して提言を行い、学会HPの委員会報告とした。

［ERNDIM精度管理の特徴］①多彩な有機酸代謝異常症の患者尿が配布される、②新疾患の尿も数年以内に配布されている、③ERNDIMが主催する教育セミナーや年1回のシンポジウムへ参加できる、といったメリットがある一方、④外国の精度管理事業であるため英語が公用語であり、結果報告も英語で行う必要がある、⑤配布検体の都合で新規参加施設が制限されたり、検体数が減ったりしている、⑥参加費が少しずつ値上げされている、⑦組織運営システムの改修が比較的高頻度で行われ対応に時間を要することがある、などの問題点もある。

［ERNDIM精度管理の実際］精度管理コースとして「尿有機酸定性スキーム」と「有機酸定量スキーム」があり、前者が一般的である。ともに有機溶媒抽出法での前処理が想定されており、主催ラボも有機溶媒抽出法で検体管理を行っているが、ウレアーゼ法での参加もOKである。後者では一般的な26種の有機酸の定量値の精度管理を行う。「尿有機酸定性スキーム」での新疾患や希な疾患ではこれら以外の“特殊な有機酸”も測定する必要がある。例えば、Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency検体では3-O-methyl-dopa、Vanillactic acid、Acetylvanilalanineも定量する必要がある。結果報告では、診断名に関係した代謝物の濃度を記入して異常度を選択し、次に疑い病名・鑑別病名と必要な確認検査法を記入した上で、一般臨床医師に対して病態や治療法に関する簡単なアドバイスを記入する。最後にクロマトグラムチャートなどの図やデータを添付する。

［我が国での精度管理］上記のようにERNDIM精度管理にはメリットが多いものの外国の精度管理であるための困難性も存在する。本学会でERNDIMと併行して精度管理が行われれば国内の検査所にとって有益と考えられるので、化学診断委員会の検討課題としたい。

E-mail: yosuke3321181@gmail. com

# 講演要旨

## 一般演題 (ポスター発表)

## P-01 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 保存期間がD型及びL型βアミノイソ酪酸の血漿濃度に及ぼす影響

○外山 雄大[1]，野津 吉友[2]，小林 弘典[2]，堺 弘道[3]，國澤 研大[4]，渡辺 淳[4]，矢野 彰三[2]，金崎 啓造[1]，並河 徹[5]

[1]島根大学医学部内科学講座内科学第一，[2]島根大学医学部附属病院検査部，[3]島根大学総合科学研究支援センター生体情報・RI実験部門，[4]島津製作所，[5]島根大学医学部

# Effect of Storage Period on Plasma Concentration of D-, L-β-Aminoisobutyric Acid

○Yuta Toyama[1], Yoshitomo Notsu[2], Hironori Kobayashi[2], Hiromichi Sakai[3], Akihiro Kunisawa[4], Jun Watanabe[4], Shozo Yano[2], Keizo Kanasaki[1], Toru Nabika[5]

[1]Department of Internal Medicine 1, Faculty of Medicine, Shimane University, [2]Clinical Laboratory Division, Shimane University Hospital, [3]Department of Biosignaling and Radioisotope Experiment, Interdisciplinary Center for Science Research, Organization for Research and Academic Information, Shimane University, [4]Shimadzu Corporation, [5]Faculty of Medicine, Shimane University

【目的】近年、生活習慣関連疾病群予防に貢献する可能性を有するβアミノイソ酪酸（β-aminoisobutyric acid: BAIBA）が同定された。BAIBAには、異なる基質をもつ鏡像異性体（D-, L-BAIBA）や同じ分子量（103.12）である類似物質（L-AABA, D-AABA, L-BABA, GABA）がある。そのため、それぞれの物質を定量化することは容易ではなく、十分な知見が蓄積されていない。特に、測定に適した条件についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、その基礎的検討として、D-, L-BAIBAとその類似物質の血漿濃度が、保存期間の長さにより変化するか否かについて検討することを目的とした。

【方法】健常ボランティア4名（男性2名、女性2名）から血漿を採取した。採取した血漿を用いて、採血直後（ベースライン: BL）、1日、1週間、1か月、6か月（採血直後を除いて-80℃で保管）の条件下でD, L-BAIBAおよびその類似物質の測定を行った。前処理では、血漿100μlに対して内部標準10 μlおよび30%スルホサリチル酸10μlを添加した。分析にはNexeraX3（島津製作所）およびLCMS-8060（島津製作所）を使用し、カラムはZWIX(+) 250×4.0 mm, 3 μm（DAICEL社）を使用した。

【結果】血漿D-BAIBA, L-AABA, GABA濃度は、保存期間の違いによる有意差は認められなかった。一方、血漿L-BAIBA濃度は、保存期間の影響は有意であったが（$p = 0.034$）、各条件間（BL、1日、1週間、1か月、6か月）における有意差は認められなかった。また、D-AABAは検出下限以下のため、L-BABAは内部標準物質がないため、定量化できなかった。

【考察】本研究では、生体内で検出が報告されているD-, L-BAIBA , L-AABA, GABAの血漿濃度は保存期間の長さによって変化しないことを明らかにした。つまり、保存検体においてもD-, L-BAIBA , L-AABA, GABAを定量できる可能性が示唆された。今後の研究では、本研究の測定手法を用いることで臨床応用を目指したD-, L-BAIBAのさらなる機能解析が可能だと考えられる。

E-mail: yt-ars@med.shimane-u.ac.jp

P-02

# ステルス型ベクターによるイズロン酸-2-スルファターゼの発現

○真嶋 隆一[1]，大平 麻里[1]，菊池 亜美花[1]，奥山 虎之[1]，小野寺 雅史[1]，水田 志織[2]，吉田 尚美[2]，中西 真人[2]

[1]国立成育医療研究センター，[2]ときわバイオ株式会社

# Examination of Therapeutic Iduronate-2-sulfatase Enzyme with a Novel Single-Stranded RNA Vector

○Mashima Ryuichi[1], Ohira Mari[1], Kikuchi Emika[1], Okuyama Torayuki[1], Onodera Masafumi[1], Mizuta Shiori[2], Yoshida Naomi[2], Nakanishi Mahito[2]

[1]National Center for Child Health and Development, [2]TOKIWA-Bio Inc.

Introduction: Stealth-typed virus vector has received a lot of attention due to its broad tropism for mammalian cells (1). This vector is capable to express multiple genes with high protein expression efficiency in a single vector. To prove this benefit, we examined the efficacy of this novel RNA vector harboring the human iduronate-2-sulfatase (IDS) gene, a causative gene for mucopolysaccharidosis type II, also known as a disorder of lysosomal storage disorders (2).

Methods: Enzyme activity was determined using a multiplexed LC-MS/MS assay (3). Other biochemical assays were performed under standard procedures.

Results: First, as expected, we found a markedly high expression of the human IDS gene, together with EGFP, when the vector was infected with mammalian cells. Other LSD enzyme activity was not apparently altered under this experimental condition. Second, the BHK-21 transformant cells stably expressing the human IDS gene persistently generated an active human IDS enzyme extracellularly. Thirdly, the exogenously added enzyme was incorporated into mammalian cells with significant inhibition of cellular uptake by mannose-6-phosphate, suggesting that the produced enzyme may be used for therapeutic use by cross-correction-based mechanism.

Conclusion: Taken together, these results suggest that our novel RNA vector may apply to various clinical applications.

References:

1) Yamaki Y et al. Utilization of a novel Sendai virus vector in ex vivo gene therapy for hemophilia A. Int J Hematol. 2021;113(4):493-499.
2) Ohira M et al. Production of therapeutic iduronate-2-sulfatase enzyme with a novel single-stranded RNA virus vector. Genes Cells. 2021;26(11):891-904.
3) Ohira M et al. Quantification of 11 enzyme activities of lysosomal storage disorders using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Mol Genet Metab Rep. 2018;17:9-15.

E-mail: mashima-r@ncchd.go.jp.

P-03

# LC/MS/MSによるレッシュ-ナイハン症候群患者のHPRT活性測定 — 赤血球と乾燥ろ紙血での比較 —

○前田 康博[1]，中島 葉子[2]，張 春花[3]，横井 克幸[2]，伊藤 哲哉[2]

[1]藤田医科大学 オープンファシリティセンター， [2]藤田医科大学 医学部 小児科学，[3]ミルスインターナショナル

# Measurement of an HPRT Activity by LC-MS/MS in Lesch-Nyhan Syndrome - Comparison Between Dried Blood Spot and Erythrocyte -

○Yasuhiro Maeda[1], Yoko Nakajima[2], Chunhua Zhang[3], Katsuyuki Yokoi[2], Tetsuya Ito[2]

[1]Open Facility Center, Fujita Health University, [2]Department of Pediatrics, Fujita Health University, [3]Mils International

【目的】レッシュ-ナイハン症候群(LNS)は、プリン代謝におけるサルベージ経路を触媒するhypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)の活性低下により、高尿酸血症、精神発達遅滞、自傷行為などを呈する疾患であり、X連鎖性疾患のためほとんどが男性に発症する。我々はLNS診断及び重症度判定法としてHPRT活性の測定法を開発し、本学会第44会年会で報告した。今回、赤血球または乾燥ろ紙血 (DBS)を利用したHPRT活性値について比較し、その有用性を評価した。

【方法】赤血球または7 mm径DBSからの抽出液にhypoxanthine, phosphoribosyl diphosphate, $MgCl_2$を加え37°Cで20分間インキュベートした。反応停止後、生成したinosinic acidをLC/MS/MSで定量した。LNS患者9名について、赤血球とDBSでの酵素活性値を比較した。

【結果】赤血球を用いた反応では、3名の活性値がそれぞれ1.09%, 1.65%および12.8%であり、6名は感度以下であった。同一患者のDBSを用いた酵素反応では、2名が活性0.49%, 12.4%であり、７名は感度以下であった。

【考察】赤血球、DBS 共に感度以下であった患者6名は臨床的に重症であった。赤血球を用いた反応で酵素活性値を測定できた患者3名はいずれも高尿酸血症のみで、神経症状は見られていない。活性12%の患者のDBSでの測定では同様の結果を示したが、1%程度であった患者2名では、DBSでの測定では0.49%または感度以下と低値であった。DBSでは酵素量が少ないため生成するinosinic acidの量が少なく、定量限界値付近となったためと考えられる。HPRT 活性測定を赤血球またはDBSを用いる反応で比較した結果、DBSはLNSのスクリーニングに有用であるが、重症度判定には赤血球による測定が必要であると考えられた。

E-mail: ymaeda@fujita-hu.ac.jp

P-04

# ろ紙血長鎖アシルカルニチンC16、C18、C18:1上昇の特徴と臨床意義の検討

○阮 宗海，張 春花，王 旭陽，金 明姫，趙 寧，謝 宏傑，唐 剣慈，万 婷婷

ミルスインターナショナル

# A Study of Characteristics and Clinical Significance of Increased Long-Chain Acylcarnitine C16, C18, C18:1 in Dried Blood Spot

○Zonghai Ruan, Chunhua Zhang, Xuyang Wang, Mingji Jin, Ning Zhao, Hongjie Xie, Jianci Tang, Tingting Wan

MILS International

【目的】血中長鎖アシルカルニチンC16、C18、C18:1の上昇はカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼⅡ(CPTⅡ)欠損症の診断指標とされている。長鎖アシルカルニチン全般の上昇が特徴的で、実際にろ紙血のみの検査結果で確定診断にほとんど至らない。そして、C16或C18:1単独上昇、C16とC18:1ともに上昇する症例も多数発見されている。今回 C16、C18、C18:1が参考基準値より一倍以上超える症例を集計し、臨床症状、病態特徴と鑑別診断などを検討した。

【方法】当施設に依頼してきたハイリスクスクリーニング患者35143人の乾燥濾紙血と尿液検体を用いた。ろ紙血検体はタンデムマス新生児マススクリーニング法で処理とLC-MS/MS分析を行った。尿液検体は、ウレアーゼ処理法で前処理した後に、GC/MS分析を行った。

【結果】血中C16、C18、C18:1が参考基準値より一倍以上超える症例を次の４群に分類した。

A) 単独C16上昇群(n=1106)：検出率は3.15%、男/女比率が2.18です。

B) 単独C18:1上昇群(n=1541)：検出率は4.39%、男/女比率が1.75です。

C) C16とC18:1上昇群(n=83)：検出率は0.24%、男/女比率が1.86です。

D) C16,C18,C18:1上昇群(n=21)：検出率は0.06%、男/女比率が1.63です。

各グループの年齢分布は、A群は41.4%が１～2才で、57.8%が2才以上で、B群とC群と共に99%が1～6ヶ月で、D群がほぼ50%ずつ1～6ヶ月と1～2才の年齢層に分布されている特徴がある。C群とD群の臨床症状と疾患集計した結果に、臨床症状は共に肝機能異常・乳児胆汁うっ滞の症例が最も多い。C群は72.3%、D群は35%の割合である。メタボローム解析結果によりC群とD群の中にシトリン欠損症(C=6, D=1)、グルタル酸血症2型(C=1,D=1)、メチルマロン酸血症(C=3, D=1)と診断された。D群の中に１例が極長鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ欠損症で判明した。CPT IIと鑑別診断するために、(C16+C18:1)/C2およびC14/C3比値を組み合わせて、D群症例の相違を検討した。グルタル酸血症2型と極長鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ欠損症の場合は(C16+C18:1)/C2とC14/C3比値が有意義に上昇したが、その他の症例がほぼ正常範囲でした。

【考察】今回検討された長鎖アシルカルニチンC16、C18、C18:1上昇例の年齢分布や性別比率から、CPTⅡ欠損症の疫学に相応したが、その高頻度に検出された原因がまだ不明です。(C16+C18:1)/C2およびC14/C3比値の上昇にともない特徴で、CPTⅡ欠損症の診断に至らなかった。その比率の追加で偽陽性減少に有意義な指標で、文献と一致した。また肝機能異常・乳児胆汁うっ滞の症例は長鎖アシルカルニチン上昇との強い関連性で、一過性または二次的な長鎖脂肪酸代謝障害ではないかと考えられる。その病態との関連性について、更なる検討が必要である。

E-mail: zonghai_ruan@mils-int.jp

P-05

# GCMSを用いた体液分析による非ケトーシス型高グリシン血症の化学診断

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

## Chemical Diagnosis of Nonketotic Hyperglycinaemia by GCMS Body Fluid Analysis

○Chunhua Zhang, Mingji Jin, Xuyang Wang, Jianci Tang and Zonghai Ruan
Department of Research & Development of MILS International

【目的】非ケトーシス型高グリシン血症は、4つの蛋白質P、T、H、Lからなる複合酵素グリシン開裂酵素系のそれぞれのGLDC, AMT, GCSH, DLD遺伝子変異により、血漿や髄液などの体液中に大量のグリシンが蓄積し、重篤な神経障害をきたす先天性アミノ酸代謝異常症である。新生児スクリーニング対象疾患外のため、症状は現れてからの診断が現状である。血中アミノ酸分析で必ずしもグリシンの異常増加が認めないため、診断は遺伝子検査に依存している。われわれはGCMSを用いた体液（尿、血清、髄液）中のグリシン分析で、異なる体液中のグリシン濃度の関係で迅速且つ精度高く、非ケトーシス型高グリシン血症の化学診断ができたので報告する。
【症例と方法】症例は、過去3年間、グリシン血症の疑いある6例（男：4名、女：2名；年齢9生日～29歳）患者の尿検体5件、血清検体6件、脳髄液検体6件のグリシン濃度をメタボローム解析法で分析した。既報文献参考に髄液と血清中グリシンの比を計算し、臨床からの遺伝子解析結果とあわせ、最終診断を行った。
【結果】上記6例中5例尿中のグリシンレベルは健常者と比べ有意に増加した。6例髄液中のグリシンレベルは健常者の0.13に対して0.16～2.62で、血清グリシンレベルは健常者の1.27に対して4例が2.11～57.01上昇したが、2例はそれぞれ1.13と1.19正常レベルであった。しかし、髄液／血清グリシン比はいずれもCutoffの0.04より高かった。6例中4例は遺伝子解析結果が、2例GLDC、1例AMT、1例GLRX5遺伝子病原性変異を見つけ、高グリシン血症と確定診断した。残りの２例は遺伝子検査行わず、臨床症状と併せて化学診断した。
【考察】体液中のグリシン濃度測定と髄液/血清グリシン濃度比より、高グリシン血症の迅速且つ正確な化学診断ができ、GLDC、AMT遺伝子変異による非ケトーシス型高グリシン血症の診断や、GLRX5遺伝子変異に由来した高グリシン血症の病態確認に繋がった。本法は、メタボローム解析を兼ねてグリシン測定できるため、遺伝子検査より短時間で結果が得られ、遺伝子変異の病態確定にも有用で、今後原因不明神経障害児の病態解明や、高グリシン血症の早期発見に応用できる。

E-mail: chunhua_zhang@mils-int.jp

P-06

# メタボローム解析による高プロリン血症Ⅰ型とⅡ型鑑別診断

○金 明姫，張 春花，阮 宗海，王 旭陽，唐 剣慈

ミルスインターナショナル　検査・研究開発部

## Differential Diagnosis of Hyperprolinemia Type I and II by Metabolomics

○Mingji Jin, Chunhua Zhang, Zonghai Ruan, Xuyang Wang, Jianci Tang

Department of Research & Development of MILS International

【目的】高プロリン血症はPRODH遺伝子コードするプロリン酸化酵素、またはALDH4A1遺伝子コードするΔ1-ピロリン-5-カルボン酸デヒドロゲナーゼの欠損により、血中プロリンが上昇する常染色体劣性遺伝性疾患である。Ⅰ型とⅡ型に分類され、臨床症状は一定しない。重症者は難治性けいれんや精神発達遅延を呈するが、臨床症状を全く示さない例もある。確定診断は酵素活性と遺伝子解析に依存している。今回我々は、GC/MSを用いた尿メタボローム解析でI型とⅡ型それぞれ3例を経験したので報告する。

【方法】症例は当施設に依頼してきた血中プロリン濃度が高い症例3例、遺伝子検査で高プロリン血症I型を疑う症例１例、ERNDIM精度管理検体1例、CAP精度管理検体1例合計6例である。上記症例の尿検体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。メタボロームデータ解析の上、高プロリン血症の診断マーカーとしてのピロリン-5-カルボン酸（P5C），プロリン，ヒドロキシプロリンとグリシンの上昇の有無を検索した。P5C上昇例はII型と判断し、P5C正常者はI型とした。

【結果】血中プロリン濃度が高い症例1(8Y、男)の上記診断マーカーはすべて正常に対し、症例2(8Y、女)の尿中プロリンのみが軽度の上昇を認めた。症例3(12Y、男)の上記診断マーカーすべて著明な上昇を認めた。遺伝子検査でI型を疑った症例4(10M、女)の上記診断マーカーがすべて正常に伴い、血中プロリン濃度も正常でした。後で知った高プロリン血症Ⅱ型のERNDIM精度管理検体症例5(5Y、性別不明)とCAP精度管理検体症例6（10Y、女)はいずれも尿中P5C，プロリン，ヒドロキシプロリンとグリシンが著明な上昇を認めた。

【考察】上記の結果より症例1と症例2の尿中からP5Cが検出されなかったので、血中プロリンの上昇原因はⅠ型と推測し、確定診断には遺伝子検査が必要である。遺伝子PRODH変異を認めた症例4は血中プロリン濃度と尿中すべての診断マーカーが正常だったので、高プロリン血症Ⅰ型の軽症例と考え、酵素活性の測定が必要と判断した。高プロリン血症Ⅱ型（症例3、5、6）の尿中P5C，プロリン，ヒドロキシプロリンおよびグリシンの同時著明な上昇があったため、 P5CがⅡ型の特異的な診断指標として確認できた。またI型の尿中プロリンの異常は軽度もしくは正常な結果が得られ、今後血中プロリン濃度と併せ尿中P5Cの異常の有無で高プロリン血症の迅速な鑑別診断に応用できると信じる。

---

E-mail: mingji_jin@mils-int.jp

P-07

# 東京都における拡大新生児スクリーニングの試験研究

○石毛 信之[1]，渡辺 和宏[1]，長谷川 智美[1]，小林 正久[2]，加藤 環[3]，齋藤 加代子[3]，阿部 裕一[4]，森岡 一朗[5]，石毛 美夏[5]，大石 公彦[2]

[1]東京都予防医学協会，[2]東京慈恵医大小児科，[3]東京女子医大ゲノム診療科，[4]国立成育医療研究センター神経内科，[5]日本大医学部小児科

## A Pilot Study for Expanded Newborn Screening in Tokyo Metropolitan Area

○Nobuyuki Ishige[1], Kazuhiro Watanabe[1], Satomi Hasegawa[1], Masahisa Kobayashi[2], Tamaki Kato[3], Kayoko Saito[3], Yuichi Abe[4], Ichiro Morioka[5], Mika Ishige[5], Kimihiko Oishi[2]

[1]Division of Newborn Screening, Tokyo Health Service Association, [2]Department of Pediatrics, Jikei University School of Medicine, [3]Institute of Clinical Genomics, Tokyo Women's Medical University, [4]Division of Neurology, National Center for Child Health and Development, [5]Department of Pediatrics and Child health, Nihon University School of Medicine

【緒言】現在わが国では自治体が実施主体となった新生児マススクリーニングとは別に、新生児期早期の発見、治療開始が有効な数疾患の検査（拡大スクリーニング）が有償の任意検査として急速に広まっている。本会では2020年度から東京慈恵会医科大学と共同で拡大スクリーニングの試験研究を開始しており、2022年度は複数の医療施設の協力を得た試験研究(拡大試験研究)を7月より開始した。本学会ではそのうちのライソゾーム病（LSD）検査を中心に検査成績を報告する。

【対象と方法】対象疾患は、4疾患のLSD（Pompe病(PD)、Fabry病(FD、男児のみ対象)、ムコ多糖症Ⅰ型(MPS1)、ムコ多糖症Ⅱ型(MPS2)）、重症複合免疫不全症(SCID)、B細胞欠損症(BCD)、脊髄性筋萎縮症(SMA)で、新生児およそ3,000～4,000名（予定）のろ紙血（DBS）を研究対象とした。基礎検討では東京慈恵医大で治療中の成人LSD患者ろ紙血（PD3名，FD男性4名、MPS2 3名）も使用した。なお、協力医療施設のうち国立成育医療研究センターはSMAのみを対象疾患とした。ろ紙血中ライソゾーム酵素GAA、GLA、IDUA、I2S活性測定には、タンデム質量分析法によるNeoLSD MSMSキット+I2S用特注試薬（Perkin Elmer）を使用した。分析装置はNexera/LCMS-8050（島津製作所）ならびにExionLC/Triple Quad 4500（AB Sciex）を使用した。分離カラムはKinetex XB-C18 (2.6μm、2.1×30または50 mm、Phenomenex)カラムを接続した。

【結果とまとめ】 LCMS-8050とTriple Quad 4500の間で同一検体を測定した結果、いずれもLSD患者の酵素活性値は健常新生児の10%程度で両者の区別は容易であった。基礎検討によって暫定カットオフ値を設定し、これに基づいて拡大試験研究を開始することとした。拡大試験研究では、暫定カットオフ値の適正性とNBS要精査例の診断アルゴリズム、診断精度を確認したのち、本会を実施主体とした、東京都全域対象の有償検査を導入する。そして実績を重ねた上で、東京都をはじめとした関係各所と連携し、拡大スクリーニングの公費助成、公費実施を目指す。

E-mail: n.ishige@yobouigaku-tokyo.jp

P-08

# 簡便なスクリーニング・精度管理ソフトNeonatal Solutionの応用

〇渡辺 淳，服部 考成，前田 見吾

株式会社島津製作所

## Application of Simple Screening and Quality Control Software Neonatal Solution

○Jun Watanabe, Takanari Hattori, Kengo Maeda

Shimadzu Corporation

新生児代謝異常スクリーニングにタンデム型質量分析計を用いることにより，アミノ酸・アシルカルニチンなど多くの指標物質を約1分間という短い時間で同時測定する。1日で100検体以上のサンプルを分析することも多く、測定データは膨大な量となり，データ管理が大きな課題である。Neonatal Solutionは, 新生児代謝異常スクリーニングにおける膨大な分析データの解析から日々の精度管理まで一貫して行うことができるソフトウエアとして開発され、広く使用されている。今回、本ソフトウエアの機能強化により可能になった応用事例について発表する。

１．クロマト分離したデータへの応用

タンデムマスによるスクリーニングは、基本的に、カラムを付けない、フローインジェクション分析であるため､従来のNeonatal Solutionは､クロマト分離したデータの解析には対応していなかった。昨今、ステロイド分析、ライソゾーム病関連分析など、カラムを用いたオプショナルスクリーニングが行われるようになっている。この要望に対し、化合物毎にピーク時間を指定できる機能を追加することで、クロマト分離したデータにも適用できるようになった。

２．複雑なIndex計算の応用

複数化合物の解析結果からIndex式を算出・評価するべく、

（(化合物Aの濃度）＋（化合物Ｂの濃度)）／（(化合物Cの濃度）＋（化合物Dの濃度)）

までの演算ができる機能がある。これを用い、C5アシルカルニチンの異性体判別への応用を検討した。NBS検査におけるC5アシルカルニチンの分析では、抗菌薬の投与が原因での誤検出が多く、抗菌薬由来のピバロイルカルニチン（p-C5）と、本来の指標物質であるイソバレリルカルニチン（i-C5）を識別することが課題であったが、昨年発表した島津服部らの手法により、確認イオン比を用いることで、その識別が可能となっている。その比の算出をNeonatal Solutionで行なったところ、評価のindex比率でi-C5とp-C5を識別することが可能となった。

E-mail: jun_wtnb@shimadzu.co.jp

P-09

# 乾燥濾紙DNAを用いたMALDI-TOF MSによる遺伝性疾患の診断

○竹内 敦子[1]，三村 昂大[1]，都出 千里[1]，西尾 久英[2]

[1]神戸薬科大，[2]神戸学院大リハビリテーション学部

## Analysis of DNA Segment Using MALDI-TOF MS

○Atsuko Takeuchi[1], Takahiro Mimura[1], Chisato Tode[1], Hisahide Nishio[2]

[1]Kobe Pharmaceutical University, [2]Kobe Gakuin University

【目的】脊髄性筋萎縮症（SMA）は、筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする下位運動ニューロン病の一つで、乳幼児では最も頻度が高い遺伝性疾患の難病であるが、臨床診断は必ずしも容易ではない。SMAの原因遺伝子は*SMN1*遺伝子であり、その欠失の割合は９割を超えることが明らかになっている。また、SMAは数少ない治療できる神経・筋の疾患であり、運動機能に異常をきたす前に確定診断を行い、治療を開始することが重要である。しかし、従来の診断方法は、採血が必要であり、確定診断が遅れる例が多く、擬陽性や未診断の存在も懸念される。今回、血液を染み込ませた乾燥濾紙（Dried Blood Spot；DBS）および非侵襲的な唾液を染み込ませた乾燥濾紙（Dried Saliva Spot；DSS）を試料とし、MALDI-TOF MSを用いる分析法の確立を目的として研究を行った。

【方法】DBSまたはDSSから直径1.2mmのサークルを切り抜き、出発材料とした。SMAの病因遺伝子である*SMN*遺伝子のエキソン7の変異部分を含む*SMN1*と*SMN2*のセグメントを増幅するためにプライマーを設計した。まず、濾紙サークルから、DNA抽出操作をせずにDNAポリメラーゼ（KOD FX Neo）を用いて直接PCRを行い、アガロース電気泳動で目的産物の生成を確認した。次に、その目的産物を用いてジデオキシ法でさらに目的遺伝子を増幅した。最後に、適切な方法で精製し、MALDI-TOF MS（autoflex maX、Bruker社）を用いて分析した。 健常者ならびにSMA患者由来のDBSおよびDSSを用いて得られた結果を比較した。

【結果】MALDI-TOF MSの分析条件を検討することにより、DBSおよびDSSを試料としてDNA抽出操作をすることなく、*SMN1*と*SMN2*のセグメントのピークを確認することができた。健常者ならびにSMA患者由来の試料を測定し、いずれもMALDI-TOF MS分析で*SMN1*と*SMN2*のセグメントのピークを分離分析することができた。DBSおよびDSSを用いて得られた結果を比較したところ、差異は認められなかった。

【考察】以上の結果、DBSまたはDSSを試料としたMALDI-TOF MS分析による本法は、SMAの診断への応用性が示された。MALDI-TOF MSを用いた分析では、遺伝子の量を視覚的に表示することにより、*SMN1*遺伝子と*SMN2*遺伝子の比率を明らかにすることができるので、SMAの重症度の診断にも有用であると考えられた。

E-mail: takeuchi@kobepharma-u.ac.jp

## P-10 （若手優秀ポスター賞エントリー）

# MALDI-TOF MSにおけるピロリ菌の生物学的多様性の解析

○橋本 優佑[1]，志田 隆史[1]，島 圭介[2]，竹内 啓晃[1]

[1]国福大 成田保健医療 医学検査，[2]株式会社島津製作所

# Analysis of Biodiversity of *Helicobacter pylori* in MALDI-TOF MS

○Yusuke Hashimoto[1], Takashi Shida[1], Keisuke Shima[2], Hiroaki Takeuchi[1]

[1]Department of Medical Laboratory Sciences, Health and Sciences, International University of Health and Welfare, [2]Shimadzu China Innovation Center

【背景・目的】近年，*Helicobacter pylori*は胃内の感染部位別でピロリ菌叢が異なることが報告され，その検出法，感受性試験と治療薬選択，感染率と疾患発生率の齟齬などの観点から生物学的多様性が注目されている．今回は*H. pylori*を胃前庭部と胃体部から複数株採取し質量分析により比較検討した．また，癌部と非癌部間の差異も検討した．

【対象・方法】各6名の胃癌と非癌患者を対象に，胃前庭部と胃体部および癌周囲部から複数生検し，1患者10 colonyを釣菌した臨床分離株 計147株を対象とした．MALDI-TOF MSはAXIMA微生物同定システム（島津製作所）を用い，得られたマススペクトル（MS）について系統樹作成機能を利用しクラスター分析を行った．

【結果】全12患者の感染部位別は，胃前庭部と胃体部間でピロリ菌のMSパターンに明らかな差異を認めた．クラスター分析では，患者間で形成パターンが異なり，胃体部の方が胃前庭部よりも多様性に富む傾向を示した．また，胃癌と非癌患者間もピロリ菌のMSパターンに明らかな差異を認めた．クラスター分析では，非癌患者が胃癌患者よりも多様性に富む傾向を示した．さらに，癌患者における癌周囲部と非癌部間もピロリ菌のMSパターンに明らかな差異を認めた．クラスター分析の結果，癌周囲部のピロリ菌は多様性が欠如している傾向を認めた．

【考察】胃内感染部位別および癌患者と非癌患者間でMSに明らかな差異を認めた．また，癌周囲部のピロリ菌多様性が欠如していたことは，がん微小環境がピロリ菌のclonalな増殖を誘導する可能性が示唆される．ピロリ菌は高いgenetic diversityからbiodiversityを創出すると考えられていたが，本結果は初めてその一部を証明した．本菌感染症は他の感染症と異なり，胃内感染状態の実態（叢形成・集団）とその特徴を把握した解析により，検査診断・治療および未だ不明な本菌関連疾患の病態解明に繋がると考えている．

E-mail: y.hashimoto@iuhw.ac.jp

P-11

# Multiplex-Nested-PCR法で偽陰性、質量分析法で*Staphylococcus aureus*が検出された敗血症の1症例

○麻生 さくら[1]，高野 さかえ[1]，浦 邦子[1]，斉木 由美子[1]，新藤 純子[1]，新福留 茜[1]，久恒 順三[2]，菅井 基行[2]

[1]独立行政法人　東京都立病院機構　東京都立多摩総合医療センター　検査科，[2]国立感染症研究所　薬剤耐性研究センター

# A False Negative Case of *Staphylococcus aureus* Bacteremia on Multiplex PCR Assay, Detected by MALDI-TOF-MS Mass Spectrometry

○Sakura Aso[1], Sakae Takano[1], Kuniko Ura[1], Yumiko Saiki[1], Junko Shindo[1], Akane Shinfukudome[1], Junzo Hisatsune[2], Motoyuki Sugai[2]

[1]Department of Clinical Laboratory, Tokyo Metropolitan Tama Medical Center, [2]Antimicrobial Resistance Research Center, National Institute of Infectious Diseases

【はじめに】当院ではFilmArray（ビオメリュー・ジャパン、以下、FA）を用い、血液培養陽性検体の微生物検索結果を従来法よりも早く臨床へ報告している。今回、FA血液培養パネルで陰性であったが、培養検査で菌の発育を認め、最終的に質量分析法で*S. aureus*が確定した症例を経験したので報告する。

【細菌学的検査結果】血液培養よりcluster状のGPCが検出されFAを実施したが、結果は陰性であった。しかし、培地上に菌の発育を認め、生化学性状検査では*S. aureus*と同定された。両者の結果が乖離したため精査を依頼し、質量分析法で*S. aureus*と確定された。*spa*遺伝子を含む遺伝子解析の結果、*spa*遺伝子陽性、*spa*-type t3345、ST15型と判明した。

【考察】*spa*遺伝子変異による偽陰性事例は過去にも報告されているが、本症例では*spa*遺伝子に変異は見られなかった。当初は、*S. argenteus*の可能性も考えられたが、質量分析法の結果により否定された。偽陰性の原因としてFAのプライマー結合不良が推測されたが、プライマーの配列等は公表されていないため詳細は不明である。遺伝子検査は従来法よりも感度や精度は高いが、機器間差が大きいため活用法には注意を要する。一方、質量分析法は同定精度が高く、結果報告時間の大幅な短縮が可能である。質量分析法による同定検査結果と薬剤耐性遺伝子検査結果の迅速報告が、抗菌薬適正使用支援には有用であると考えられた。

E-mail: sakura_asou@tmhp.jp

## P-12 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# カンナビノイド類物質のLC-MS分析

○太田 有紗[1]，安部 寛子[2,3]，東 恭平[2]，斎藤 顕宜[2]

[1]東京理大院薬，[2]東京理大薬，[3]株式会社バイオデザイン

# LC-MS Analysis of Cannabinoids

○Arisa Ohta[1], Hiroko Abe[2,3], Kyohei Higashi[2], Akiyoshi Saitoh[2]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, [2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, [3]Bio Design Inc.

【目的】近年、大麻草中含有成分であるカンナビノイド類が日本においてもヘルスケア・美容業界で流行し、特に美容業界ではサンプル品などといって無料で配布されるなど、リラクゼーション目的に日常的に利用され始めている。カンナビノイド類のなかでも主流で利用されている物質は、カンナビジオール：CBDであるが、インターネット等ではCBDだけでなく、カンナビノール：CBN、カンナビゲロール：CBG、カンナビクロメン：CBCなどといった他のカンナビノイド類も複数含有された商品なども多く販売され、更には (既に指定薬物として指定された) HHC：ヒドロキシヘキサヒドロカンナビノールなど天然物由来ではない合成物質まで出回るなど、ヘルスケア・美容業界のカンナビノイド類の流行に乗じて、様々なカンナビノイド類類似物質が商品に含有され販売され始めた。そこで、今後これら物質の体内動態・薬理作用等を評価していくことを目的とし、これら物質の検出系を構築したので報告する。

【方法】分析試料は、標準品の他、実際に商品として販売されているカンナビノイド類含有製品や、また生体試料を模して、購入したブランク血液・尿にカンナビノイド類物質および購入可能な代謝物を添加した試料を作成、評価した。分析には、含有されているカンナビノイド類の定性分析用としてSCIEX社製X500RQTOFシステムを、定量分析用としてSCIEX社製TripleQuad5500+ LC-MS/MSシステムを使用し、カラムはWaters社製CORTECS T3 Column, 120 Å, 2.7 µm, 2.1 mm×100 mm、移動相はA液 ; 0.1%ギ酸水溶液、B液 ; アセトニトリルを用い、カンナビノイド類の分析系を構築した。

【結果・考察】今回作製した分析系において、入手可能であったカンナビノイド類標準試料すべてにおいて1 ng/mL程度検出可能であった。またそれら化合物を添加した添加血液・尿をそれぞれ100 µLを使用し前処理をした分析用試料においては、5～10 ng/mLレベルが検出下限であった (物質により異なる)。今後この構築した分析系を用い、代謝物推定や体内動態を評価する。

E-mail: 3B21512@ed.tus.ac.jp

P-13

# LC-MS/MSを用いた血液･尿中24種類の合成カンナビノイド代謝物の同時定量

○南方 かよ子[1]，野澤 秀樹[1]，山岸 格[1]，長谷川 弘太郎[1]，三由 尚知[1]，鈴木 雅子[1]，北本 卓也[2]，近藤 未菜子[2]，鈴木 修[1]

[1]浜松医大 法医学，[2]浜松医大 先進機器共用推進部

## Simultaneous Quantification of 24 Synthetic Cannabinoid Metabolites in Blood and Urine by LC-MS/MS

○Kayoko Minakata[1], Hideki Nozawa[1], Itaru Yamagishi[1], Koutaro Hasegawa[1], Naotomo Miyoshi[1], Masako Suzuki[1], Takuya Kitamoto[2], Minako Kondou[2], Osamu Suzuki[1]

[1]Department of Legal Medicine, [2]Advanced Research Facilities and Services, Hamamatsu University School of Medicine

【目的】合成カンナビノイド類は毒性が強いので使用量が低濃度であったり,代謝され易かったり,親油性が高いので尿に排出され難いなどによりそれ自体の検出が困難であることが多く，代わりに尿中の代謝物の検出定量が多々報告されてきた。尿と比較して血液中の代謝物濃度は低い傾向があり，かつ血液成分が代謝物の抽出を妨害することが多いためか血中代謝物の定量法は報告されていない。今回, 24種類の血中代謝物の同時定量法を考案し，解剖検体中の6種類に適用した。

【方法】24種の代謝物と内部標準5F-NNEIはCayman Chemicalから購入した。血液から以下のようにして抽出を行なった。血液100 μLに3 mmのビ―ズ2個，水100 μL, 5F-NNEI (1 ng/mL 血液)を含むacetonitrile 100 μLを加え緩く混合した。acetonitrile 700 μLを加えvortexで混合し10,000 *g*で遠心除タンパク後，上清を採取した。そこにchlorobutane 300 μL, $MgSO_4$ 150 mgを加え混合遠心後，有機層を採取し，蒸発させた。残渣をacetonitrile 150 μLに溶解し, LC-MS/MSで定量した。

【結果･考察】2008年から2014年にかけて報告された合成カンナビノイドの中で種々の構造をした24種類の代謝物を選択した。これらのpeak counts間には約200倍の差があるため定量域はa: 0.03-0.6, b: 0.1-2.0, c: 0.5-10 ng/mLの3 groupsとした。代謝物を添加した血液と尿を用いて行なったこの方法のvalidationの結果は良好であった。抽出した試料は4℃で1週間安定であった。実際の尿試料はグルクロン酸抱合を水解後にこの方法を適用した。組織からはhomogenatesを除タンパクした後に上記の方法を適用することにより代謝物を抽出することができることがわかった。

E-mail: kminakat@hama-med.ac.jp

P-14

# 国内未承認薬Zaleplonが検出された法医解剖事例

〇前橋 恭子，坂本 圭菜，岩楯 公晴

慈恵医大法医

## An Autopsy Case Intaking Zaleplon, an Unapproved Drug in Japan

○Kyoko Maebashi, Kana Sakamoto, Kimiharu Iwadate

Department of Forensic Medicine, The Jikei University School of Medicine

【目的】日本では有効性、安全性が確認されていない未承認薬をインターネット等を通じて購入するケースが増えており、それらの使用による健康被害も報告されている。Zaleplonは、不眠症の治療に使用される非ベンゾジアゼピン系の睡眠薬で、GABAの作用を増強、不安や緊張を和らげ寝付きを良くし、夜間の睡眠を持続させる効果がある。「ソナタ®」や「ハイプロン®」という商品名で海外で流通しているが、日本国内においては、現在、未承認のため処方されていない。今回、当講座でZaleplonが検出された事例を経験した。LC-MS/MSを用いて、法医解剖試料に含まれるZaleplonとその代謝物である5-Oxo-Zaleplonの定量分析を行ったので報告する。

【事例概要】引きこもり状態の無職の50代男性。自宅内で倒れているところを発見され、搬送先病院で死亡。死後約41時間で法医解剖が施行され、死因は虚血性心不全と推定された。

【主要所見】177cm、80kg。左冠状動脈前下行枝狭窄。心肥大（428g）の他、一般的な急性循環不全の所見。その他諸臓器に明らかな病変を認めず。エタノール未検出。

【薬毒物検査結果】薬物スクリーニングの結果、血液、尿および胃内容物からZaleplon、Quetiapine、Sildenafil、Dextromethorphanなどが検出された。いずれもZaleplon以外は治療域の範囲内であった。そこで、Zaleplon とZaleplonの代謝物である5-Oxo-Zaleplonの定量分析を内部標準物質としてZaleplon-d4を用いて行った。その結果、血液、尿および胃内容物からZaleplonおよび、代謝物である5-Oxo-zaleplonが検出された。

【考察】分析結果から、死亡者がZaleplonなどの薬物を摂取していたことが証明された。ZaleplonのCmax（10mg Dose）は10-20、致死域は1000以上（単位：ng/mL）との報告がある。今回の事例の血液中Zaleplon濃度は治療域以上に相当するが致死域には達していなかったため、直接の死亡原因と判断されなかった。今回検出されたZaleplonのような未承認の医薬品やサプリメントを個人で購入し使用するケースはしばしば見受けられる。摂取薬物がスクリーニング検査の対象ではない場合、死亡時の薬物摂取の状況や死亡者の生前の情報などが無い限り、見逃してしまう恐れが大きい。これらの薬物の情報を共有して、スクリーニングの対象化合物に加え、対応できる体制を整えておくことが必要であると考えられる。

E-mail: maebashi@jikei.ac.jp

P-15

# シアン代謝物ATCAのLC−MS分析法の開発と剖検試料への応用

○西尾 忠，東海林 洋子，星 智昭，新井 智美，野上 誠

帝京大学医学部法医学講座

## Development and Application of LC−MS Method for Quantification of ATCA

○Tadashi Nishio, Yoko Toukairin, Tomoaki Hoshi, Tomomi Arai, Makoto Nogami

Department of Legal Medicine, Teikyo University School of Medicine

【目的】シアン中毒の診断は法医学上極めて重要であるが，体内に吸収されたシアン化合物やシアン化水素ガスは速やかに消失するため，検体の採取時期，現場環境又は保存期間によって直接検出や精密定量は困難であることが多い．シアン代謝物の一つである2-aminothiazoline-4-carboxylic acid (ATCA) はその高い化学的安定性からシアン中毒における代替マーカーとして近年注目されている．しかし, ATCAは低分子量かつ高極性化合物であり，剖検試料中からの抽出や分析には煩雑な工程を有する．この様な背景から我々は, ATCAの誘導体化を利用した新規なLC−MS/MS分析法を開発した．さらに本法を剖検試料に応用し，その有用性を評価した．

【方法】法医解剖時に採取した心臓血 (20 μL) に内部標準物質 (IS, 2-aminothiazole-4-carboxylic acid) を添加し，アセトニトリルで蛋白沈殿処理を行った．次いで，塩基性条件下，4-bromoethyl-7-methoxycoumarineを用いた誘導体化反応を行い (60ºC, 1 h), ジクロロメタンによる液-液抽出後，LC−MS/MS分析に付した [Shimadzu LCMS-8050, YMC-Triart PFPカラム, 10mM $HCO_2NH_4$aq-MeOH (7:13, v/v), 0.2 mL/min, MRM; *m/z* 335.1→101.1 (ATCA誘導体), *m/z* 333.1→127.1 (IS誘導体)].

【結果・考察】LC−MS/MS分析において, ATCA及びISの誘導体はいずれも$[M+H]^+$をベースピークとして強く与えたほか，それぞれ特異的なプロダクトイオンが得られたため，これらを用いる分析法を構築できた．また，本誘導体化により，分析対象物の疎水性及びPFPカラム固定相との親和性が著しく向上し，良好な回収率 (>94%) と保持係数が得られた．検量線は10−15,000 ng/mLの範囲で良好な直線性を示し ($r$=0.999)，各種バリデーション試験の結果も良好であった (日内変動係数; <5%, 日間変動係数; <6%)．本法を剖検試料に適用し，シアン服用群 ($n$=4)，焼死群 ($n$=20) 及び対照群 ($n$=20) におけるATCA濃度をそれぞれ測定した所，対照群と他2群間に有意差が見られたが ($P$<0.0001)，シアン服用群-焼死群間では有意差は見られなかった．この結果は，日本では欧米に比べて焼死体の血中ATCA濃度が高値を示すという先行研究のものと一致していた．さらに，焼死体におけるATCA濃度とシアン濃度を比較したところ両者には正の相関がみられた ($r$=0.309, $P$<0.05)．焼死の際にみられるガス中毒は一酸化炭素が主原因とされているが，本研究によりシアン化水素ガスの死因への寄与度の評価が可能であることが示唆された．

E-mail: tnishio@med.teikyo-u.ac.jp

# 塩素化されたTyrosineのLC-MS/MS分析法の検討

○神 繁樹[1]，的場 光太郎[1]，赤川 有希[1]，早田 璃菜[1]，魚住 諒[2]

[1]北海道大学大学院医学研究院 法医学教室，[2]日本医療大学保健医療学部 臨床検査学科

# Investigation of Analytical Method for Chlorinated Tyrosines Using LC-MS/MS

○Shigeki Jin[1], Kotaro Matoba[1], Yuki Akagawa[1], Rina Hayata[1], Ryo Uozumi[2]

[1]Department of Forensic Medicine, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, [2]Department of Clinical Laboratory Sciences, Faculty of Health Sciences, Japan Healthcare University

【目的】Tyrosineの芳香環部の水素が塩素に置換された3-chlorotyrosineや3,5-dichlorotyrosineは塩素ガス中毒のマーカーとして注目されている。塩素ガスは次亜塩素酸塩と塩酸などの強酸を混合すると発生し，家庭での清掃時や自殺目的での中毒が問題となっている。塩素ガス中毒による死亡例の法医解剖の報告は少なく，塩素ガス中毒に特異的な解剖所見や検査所見はないとされてきた。近年，法医解剖において塩素ガス中毒例で3-chlorotyrosineおよび3,5-dichlorotyrosineを血液中からGC-MSやLC-MSによって検出したという報告があるものの，いずれも検体の前処理において誘導体化を行っている。本研究では前処理を含め，より簡便な分析法の検討を行った。

【方法】血液検体の前処理は出来るだけ簡素に且つ回収率が高い方法を検討し，限外濾過を用いた。分析条件の検討には市販の研究用血清にそれぞれ5, 50, 100 ng/mLの濃度で3-chlorotyrosineおよび3,5-dichlorotyrosineを添加し疑似検体を作製して用いた。測定サンプルのマトリクス効果の評価はLCカラム後の流路に分析対象の化合物を常時添加するシステムを構築し，前処理を施したサンプルのインジェクション後のクロマトグラムのベースライン（イオン）をモニターして行った。LC-MSの分析条件は以前報告のあったハロゲン化合物に優れた保持力と選択性を発揮するとされるPFP（ペンタフルオロフェニル）カラムを用いた方法をベースに種々のアレンジを加えた。

【結果と考察】LC-MS分析について過去に報告のあった条件での測定では，目的化合物の保持時間においてイオン化阻害を受けていることが判明したが，LCカラムの変更と移動相の条件を変更することによりイオン化阻害の回避に成功した。検量線は1～100 ng/mLの範囲で良好な直線を与え，健常者の血清もしくは血漿では10 ng/mL以下と報告されていることから測定範囲としては十分であると考える。限外濾過における回収率も良好であった。

E-mail: s-jin@hs.hokudai.ac.jp

P-17

# 胃内容物中のメソミル分析法の開発

○一瀬 貴大[1]，田中 亜紀[2]，池中 良徳[1]，石塚 真由美[1]

[1]北海道大学，[2]日本獣医生命科学大学

## Development of Methomyl Analysis Method in Stomach Contents

○Takahiro Ichise[1], Aki Tanaka[2], Yoshinori Ikenaka[1], Mayumi Ishizuka[1]

[1]Hokkaido University, [2]Nippon Veterinary and Life Science University

【目的】

環境省が2018年度に公表している動物虐待に関する事例集によると、2013年～2018年までに72件の殺傷事例があったと報告されている。大半は暴力的な手段による虐待であるが、中には毒殺されたものも含まれていた。

カーバメート系殺虫剤のメソミルは毒劇物に指定されているが、一部通販サイトでは劇物譲受書の提出で購入が可能なため、動物虐待で使われる事も多い。そこで本研究ではメソミルに着目し、虐待が疑われたイヌ、ネコ、鳥類の胃内容物から分析をおこなった。

【方法】

日本獣医生命科学大学で集められたイヌ17検体、ネコ100検体、ウサギ2検体、鳥類4検体、毒餌1検体、合計124検体の胃内容物を用いた。

胃内容物0.1gに内部標準物質を添加し、1%酢酸含有アセトニトリル10mlにより抽出後、酢酸ナトリウムバッファー10mlを加えた。さらに硫酸マグネシウム3.5gを加えて脱水し、精製を行った。10,000Gで10分の遠心分離後、上清100μlと蒸留水900μlを混和させ、LC/MS/MSの分析に供した。

LC/MS/MS（LCMS-8040、島津製作所）ではメソミル (m/z 162.8＞88.0) の条件で分析を行い、内部標準法により定量を行った。移動相は0.1%ギ酸水と0.1%ギ酸水メタノールを用いてグラジエント分析を行った。カラムはShim pack FC-ODS（150mm×2.0mm、島津GLC）を用いた。

【結果と考察】

124検体の分析を行い、メソミルが検出された35検体（イヌ9検体、ネコ24検体、鳥類1検体）のうち、最大濃度822μg/g、最小濃度0.2ng/g、平均77μg/gであった。またメソミルは青色の粉末で販売されており、高濃度に含まれている場合は胃内容物が青くなっていることを目視で確認できた。

これらのことから動物虐待にメソミルが使用されていることは明らかである。

E-mail: ichise@vetmed.hokudai.ac.jp

## P-18 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# Discovery of Food Derived Inhibitor for Sphingolipid Metabolism Associated to Obesity

○Yusuke Minami[1], Siddabasave Gowda B. Gowda[2], Divyavani Gowda[2], Hitoshi Chiba[3], Shu-Ping Hui[2]

[1]Graduate school of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

*Background*: Obesity is a worldwide epidemic and a preventable disease. Inhibition of lipid-metabolizing enzymes such as sphingomyelin synthase (SMS) is known to be a potential target for the treatment of fatty liver and obesity. Previous studies have identified SMS inhibitors by screening medicinal plants, but many have been less effective. There were also synthetic compounds that showed high SMS inhibitory activity but were toxic. Therefore, in order to identify the compounds that are less toxic and more effective, we conducted a survey of dietary marine products that are generally said to have high nutritional value and screened for SMS inhibition.

*Methods*: 14 kinds of marine products were extracted with methanol, and SMS inhibitory activity was screened using SMS-expressing cells by the HPLC with fluorescence detection. Specifically, the SMS inhibitory activity is investigated by adding C6 ceramide and an extract to SMS-expressing cells and measuring the amount of C6 sphingomyelin produced. The extract with the highest inhibitory activity was separated and purified by column chromatography, and the characteristics of the components were evaluated by HRMS and NMR techniques.

*Results*: Among the marine products, Shishamo methanol extract showed the potential inhibitory effect on SMS. Hence, it is further separated into 5 solvent fractions (hexane, diethyl ether, ethyl acetate, butanol, water) and the SMS screening was performed for each fraction. Interesting, $IC_{50}$ of hexane fraction 3 of Shishamo was found to be 2 μg/mL and most potently inhibit SMS compared to other fractions. Further purification and characterization of the active compound by column chromatography, high-resolution masses and NMR indicates that the inhibitory molecule is a lipid of fatty acyl family.

*Conclusions*: The compounds in Shishamo have been shown to be promising SMS inhibitors. The use of this compound in pharmaceuticals and health foods may be effective in treating obesity.

E-mail: minami.yusuke.t2@elms.hokudai.ac.jp

## P-19 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# Investigation on Protective Effect of Flazin Against Lipid Overloading in Renal Cells Using LC/MS and NanoESI-MS

○Xunzhi Wu[1], Zhen Chen[2], Yifan Chen[2], Nianqiu Shen[1], Hitoshi Chiba[3], Shu-Ping Hui[2]

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

*Background*: Dysregulation of lipid metabolism has been verified as the main cause of many metabolic diseases. Lipid droplets (LDs) not only serve as a reservoir for lipid deposition but act a crucial role in maintaining lipid homeostasis. Flazin is a β-carboline-derived alkaloid found in Japanese fermented foods. This study aimed to investigate the effect of flazin on the lipid metabolism of cells under the overloading of fats. Moreover, considering the crucial role of LDs in lipid metabolism, the present study further focused on the dynamics of LDs of cells with flazin treatment.

*Methods*: Palmitic acid and oleic acid were used to induce lipid-overloading in HK-2 cells and flazin was added to determine the beneficial effect of flazin. Cellular lipids and LD lipids were analyzed using LC/MS and nanoESI-MS, respectively. Potential mechanism of the regulatory effects on lipid metabolism of flazin was determined using real time RT-PCR.

*Results*: Flazin showed less cytotoxicity when the concentration is lower than 80 $mg \cdot mL^{-1}$. Within this concentration range, flazin lowered cellular TG content, modulated cellular TG profile, and improved cellular FFA characteristics. Moreover, flazin exhibited LD regulatory effects, including LD TG level, LD size, and LD membrane properties. PCR test showed that flazin promoted the mRNA expression of ATGL and inhibited the mRNA expression of ACC, FAS and SCD-1, indicating the potential mechanisms might be the promotion of lipolysis and the inhibition of lipogenesis.

*Conclusions*: This study discovered the improving effects of flazin on lipid metabolism at the cell level and organelle level. Flazin ameliorated cellular lipid accumulation and regulated LD dynamics in HK-2 cells under lipid overloading. Considering these effects, flazin may serve as a promising nutraceutical candidate for preventing or treating metabolic diseases related to lipid disorders and lipid-storage disorders. Moreover, this study proposed a strategy combining biological assays and chemical analyses covering both cells and organelles, which may contribute to discovering and evaluating other nutraceuticals and nutrition supplements for preventing or treating metabolic diseases related to lipid disorders and lipid-storage disorders.

E-mail: xunzhi.wu.m6@elms.hokudai.ac.jp

## P-20 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# LC/MSによるリピドミクスを用いた海藻由来植物ステロールの神経細胞に対する脂質異常改善作用の検討

○竹内 美音[1]，陳 震[2]，Nianqiu Shen[3]，Yue Wu[2]，Xunzhi Wu[3]，千葉 仁志[4]，惠 淑萍[2]

[1]北海道大学　医学部保健学科，[2]北海道大学　大学院保健学科研究院，[3]北海道大学　大学院保健科学院，[4]札幌保健医療大学　栄養学科

# Investigation on Protective Effects of Seaweed Phytosterols Against Lipid Dysregulation in Neuron Cells Using LC/MS-Lipidomics

○Minato Takeuchi[1], Zhen Chen[2], Nianqiu Shen[3], Yue Wu[2], Xunzhi Wu[3], Hitoshi Chiba[4], Shu-Ping Hui[2]

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

【目的】脂質異常は脳血管障害の危険因子であり、アルツハイマー病や他の神経の退化変性に対する疾患を誘引すると言われている。海藻由来植物ステロールは、脂質代謝異常を調節し、コレステロールを低下させることが知られている。しかし、神経細胞の脂質異常に対する保護効果についてはほとんど研究されていない。そこで本研究は、LC/MSを用いて、海藻由来植物ステロールが神経細胞の脂質改善に及ぼす影響を探索することを目的とする。

【方法】脂質の異常蓄積を受けたPC12細胞に対する海藻由来植物ステロールの保護効果を調べた。パルミチン酸（PA）の過剰投与を行い、神経の脂質異常蓄積モデルを形成した。PC12細胞をNGFで分化させ、PAと植物ステロールを同時添加し、細胞生存率、神経突起長の測定を行った。また、これらの細胞の脂質抽出を行い、LC/MSにより網羅的に分析を行った。

【結果】250 μMのPAを添加した群では、強い細胞毒性が見られた。PA毒性に対して、海藻由来植物ステロールは10 μg/ml以上で強い保護活性効果を記した。また、神経突起長はPAによって、低値を記したが、海藻由来植物ステロール添加において、改善傾向を記した。LC/MSによるリピドミクスから、PA添加群では、脂質プロファイルにおいて、特異的な変化が見られたが、海藻由来植物ステロールを添加することにより、これらの異常が軽減された。

【考察】本研究では、PC12細胞において、海藻由来植物ステロールがPAによる脂質異常蓄積による脂質異常において、保護作用を示した。今後はこれらの機序に対するさらなる研究が必要である。

E-mail: mt0808anzu@eis.hokudai.ac.jp

## P-21 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 酸化LDLの肝カルジオリピン生合成への影響

○佐﨑 生[1]，櫻井 俊宏[1]，茂木 すみれ[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

# Effects of Oxidized LDL on Hepatic Cardiolipin Biosynthesis

○Iku Sazaki[1], Toshihiro Sakurai[1], Sumire Mogi[1], Hitoshi Chiba[2], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty Health Sciences, Hokkaido University, [2]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Science

【目的】肝の脂肪蓄積はミトコンドリアの機能低下と関連する。以前我々は肝培養細胞C3Aを用いて、酸化LDLによる脂肪蓄積とミトコンドリア機能低下（ATP産生低下）を見いだした。カルジオリピン（CL）はミトコンドリア機能に不可欠なミトコンドリア固有の膜脂質であるが、この条件においてCLの分布や代謝は明らかになっていない。そこで本研究では、肝培養細胞C3Aを用いて酸化LDLが肝のCL生合成へ与える影響について調査することを目的とした。

【方法】超遠心法及びゲル濾過HPLC法により、健常者の空腹時血清からLDLを分離した。200 ng/μL（タンパク質濃度）のLDLに硫酸銅を終濃度0.06 mMで加えて37℃で2時間反応させ、EDTAで酸化を停止した。24穴プレートにC3Aを播種し、24時間後にPBS（コントロール群）、未酸化LDLまたは酸化LDL溶液（$1.0\times10^4$ cellsに対して200 ng protein）をそれぞれ含む無血清培地に交換した（n = 6）。24時間後、細胞を回収し、クロロホルムで脂質成分を抽出した。そのサンプル中のCLの分子種をLC-MS/MSで測定後、各ピーク面積を細胞数で補正した。また刺激後に細胞からRNAを抽出し、real-time PCR法を用いてエネルギー産生を促進する*PPARGC1A*やそれを制御するパートナーである*PPARA*、ミトコンドリア転写因子*TFAM*の発現量を測定した。各標的遺伝子の発現量をハウスキーピング遺伝子（*GAPDH*）の発現量で補正した。

【結果】CLの分子種は39種検出され、コントロール群と酸化LDL群に比べて未酸化LDL群では11分子種が有意に高値を示した。同様に、未酸化LDL群では*PPARGC1A*と*PPARA*の発現量が有意に増加した。さらに、酸化LDL群では未酸化LDL群に比べて*PPARGC1A*と*PPARA* 、*TFAM*の発現量が有意に減少した。

【考察】未酸化LDLは肝ミトコンドリアの生合成と特定のCL分子種の生合成を活性化させる可能性が示唆された。未酸化LDLと異なり、酸化LDLは肝ミトコンドリアとCLの生合成の低下を誘導し、ミトコンドリア機能を低下させた可能性が考えられた。

E-mail: zaki-ry-0925@eis. hokudai.ac.jp

P-22

# 脂肪肝モデル細胞におけるサケ白子抽出物のカルジオリピン代謝改善作用

○櫻井 俊宏[1]，吉貝 あみ[1]，茂木 すみれ[1]，山端 ありさ[1]，関島 将人[1]，佐藤 美涼[1]，佐藤 浩志[2]，千葉 仁志[3]，惠 淑萍[1]

[1]北海道大学大学院保健科学研究院，[2]日生バイオ株式会社，[3]札幌保健医療大学

# Improvement of Cardiolipin Metabolism by Salmon Milt Extract in Fatty Liver Cell

○Toshihiro Sakurai[1], Ami Kikkai[1], Sumire Mogi[1], Arisa Yamahata[1], Masato Sekijima[1], Misuzu Sato[1], Hiroshi Satoh[2], Hitoshi Chiba[3] Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Hokkaido Research Institute, Nissei Bio Co. Ltd, [3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

【目的】サケ白子抽出物（Salmon milt extract、SME）には核酸やアミノ酸が豊富に含まれている。当研究室ではSMEがミトコンドリアでのエネルギー代謝亢進に寄与する可能性を報告した。脂肪肝ではミトコンドリア特異的膜脂質のカルジオリピン（CL）の低下及びモノリゾカルジオリピン（MLCL）の増加が見られ、エネルギー産生の低下に寄与する。我々はSMEがCL代謝改善作用を持つと予測し、脂肪肝モデル細胞にSMEを添加した際のCL及びMLCLの分子種プロフィールを解析した。【方法】24穴プレートに1.25 x $10^5$ cells/wellの肝培養細胞C3Aを10％ FBS入りMEMを用いて播種し、$CO_2$インキュベータで24時間培養した。その後、培地をMEM（0％ FBS）と交換し、飢餓状態にした。24時間培養後、コントロール群にはPBSを、脂肪肝モデル群としてグルコース、フルクトース、インスリン、オレイン酸（GFIO）、あるいは、GFIO＋SME添加群としてGFIOとSME（終濃度200 μ g/mL）を添加した。24時間刺激後、細胞中の脂質を抽出した。Orbitrap LC-MS/MSを用いてCL及びMLCLの分子種を分析し、各分子種のピーク面積を細胞数で補正した。【結果】 31種類のCL分子種が検出された。CLの総和は３群間で有意な差が見られなかった。MLCLは10種類検出された。MLCLの総和はコントロール群と比べてGFIO群で有意に増加し、その増加はSME添加で正常化した。Total CL / Total MLCL比も同様に、コントロール群と比べてGFIO群で有意に増加し、その増加はSME添加で正常化した。【結論】過去の実験で観察されたSMEのエネルギー代謝亢進作用について、本実験結果からSMEは肝のCL代謝の改善に関与する可能性が示唆された。CLの代謝改善に関わる機能性物質が健康増進等に将来貢献することを期待する。

E-mail: sakura@hs.hokudai.ac.jp

P-23

# Tackling Unknown Lipids in Eleven Dietary Fish and Their Composition Analysis by Untargeted LC/MS

○Siddabasave Gowda B. Gowda[1, 2], Yusuke Minami[3], Divyavani Gowda[1], Hitoshi Chiba[4], Shu-Ping Hui[1]

[1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Graduate School of Global Food Resources, Hokkaido University, [3]Graduate School of Health Sciences, Hokkaido University, [4]Depart of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

*Background*: Fish is an important dietary nutritional source because its lipids, mainly ω-3 fatty acids which shown to have beneficial effects on huma health and disease. Bioactive lipids obtained from fish are known exhibit a series of potent bioactivities, such as anti-oxidant, anti-bacterial, anti-inflammatory, and anti-atherogenic activities. However, studies focusing on the detection, characterization, composition, and nutritional value comprehensive lipidome of Japanese dietary fish are limited. Hence, this study focused on lipid analysis in fillets of eleven commonly consumed dietary fish.

*Methods*: Detection, characterization and lipid profile in fish fillet was performed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with linear-ion trap-Orbitrap mass spectrometry (UHPLC/LTQ-Orbitrap-MS).

*Results*: Characterization of 287 molecular species from five major lipid classes was accomplished by their MS/MS analysis. Lipids such as N-acyl lysophosphatidylethanolamine (LNAPE) were detected and characterized for the first time in fish fillets by the aid of untargeted mass spectrometry. Multivariate principal component analysis revealed the distinct lipid composition in shishamo smelt and Japanese sardine compared to other fish types. Glycerophospholipids (GPs) were the abundant lipid class followed by glycerolipids in most fish fillets. The assessment of nutritional indices based on the levels of free fatty acid such as index of atherogenicity, P:S ratio, and health promotion index scores suggested that among the ten other fish types, shishamo smelt is highly beneficial for health. Hierarchical cluster correlations indicated the predominance of GPs and sphingolipids in sardine, whereas fatty acyls and triacylglycerols (TAGs) were predominant in shishamo smelt. The high levels of polyunsaturated fatty acid-enriched GPs and TAGs in dietary fish endow it with great potential as a health-promoting food for human consumption.

*Conclusions*: This study offers identification of previously undetected LNAPEs and comprehensive analysis of lipids and their compositions in fish fillets, demonstrating their potential use in the nutritional assessment of functional foods

---

E-mail: keino@hs.hokudai.ac.jp

## P-24 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# Synthesis and Development of a Facile Analytical Method for Short Chain Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids

○Fengjue Hou[1], Siddabasave Gowda B. Gowda[2], Divyavani Gowda[2], Hitoshi Chiba[3], Shu-Ping Hui[2]
[1]Graduate School of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [3]Department of Nutrition, Sapporo University of Health Sciences

*Background*: Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids (FAHFAs) represent a novel endogenous lipids class with important physiological functions in mammals. They are known to improve glucose tolerance and insulin sensitivity by stimulating insulin secretion, and exert anti-diabetic and anti-inflammatory effects. Their recent discovery as created a great interest in the field of human health and disease. Short-chain fatty acid esterified hydroxy fatty acids (SFAHFAs), is a new structural isomer of FAHFAs and reported to be significantly decreased in colon contents of rats fed with high-fat diet. So far, SFAHFAs research and bioactivities are limited due to lack of authentic standards and sensitive analytical techniques to determine their level in biological samples.

*Methods*: In this research we aim to overcome these limitations by establishing synthetic and analytical methods for SFAHFAs production and facile determination using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).

*Results*: We had successfully synthesized and characterized 55 isomers from C16 to C26 carbon chain by high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The method for SFAHFAs solid-phase extraction and targeted analysis using LC/MS were completed. Further, we applicated this method in high-fat diet rat model, and found SFAHFAs showed different variation trend in high lard diet rat intestine.

*Conclusions*: Overall development of an analytical method for biologically important lipids such as SFAHFAs will help to discover their novel functions and potential application in clinical studies.

E-mail: fengjue.hou.n5@elms.hokudai.ac.jp

P-25

# 血中リゾホスファチジン酸を正確に定量するための血漿調整方法の検討

○可野 邦行[1]，松本 宏隆[2]，河野 望[1]，蔵野 信[3]，矢冨 裕[3]，青木 淳賢[1]

[1]東京大院薬，[2]東北大院薬，[3]東京大医学部附属病院

## Suppressing Postcollection Lysophosphatidic Acid Metabolism Improves the Precision of Plasma LPA and Phospholipids Quantification

○Kuniyuki Kano[1], Hirotaka Matsumoto[2], Nozomu Kono[1], Makoto Kurano[3], Yutaka Yatomi[3], Junken Aoki[1]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, [3]University of Tokyo Hospital

リゾホスファチジン酸（LPA）は、Gタンパク質共役型受容体に認識されることで様々な生理活性を示すリゾリン脂質である。LPAには結合する脂肪酸の違いによって様々な分子種が存在し、これまでにLC-MS/MS解析によって、冠動脈疾患をはじめとする多くの病態において血漿LPA濃度が変動することが明らかとなっている。しかし、血漿中のLPA濃度は、たとえ健常人のものであっても、報告されている論文によって100 nMから10 μMの範囲で大きく異なっている。さらに同一試験内においても検体間の差（ぶれ）が大きく、このことが血漿LPAを疾患バイオマーカーとして使用する際の大きな障壁となっている。これらの問題は、採血後の検体の取り扱いにおいてLPAのアーティファクトな産生・分解が生じていることに大きく起因していると想定される。そこで本研究では、生体を循環しているLPA濃度を正確に反映することが可能な血漿調製法の構築を試みた。
循環血液中でLPAは、リゾホスファチジルコリン（LPC）からオートタキシン（ATX）のリゾホスホリパーゼD活性によって常に産生され、同時に主に血球細胞が有するホスファターゼの働きで分解されることで恒常性が保たれている。今回確立した血漿調製法の特徴は、全血を低温に保つことで採血後のLPAの産生・分解の両方を抑制し、さらに血漿調整後にATX阻害剤を添加することである。これによって、採血後の時間経過、血漿の凍結融解においてLPA濃度は変化しないことが確認された。さらに興味深いことに、本手法で調整した血漿は、LPAのみならず、その他のリゾリン脂質、さらにはホスファチジルセリン（PS）などのジアシルリン脂質においても、その濃度を保てることがわかった。そこで、この手法によって健常なヒトおよびマウスの血中LPA濃度を決定したところ、40～50 nMと、従来報告されている値よりも低値であり、個体間のブレもわずかであった。このことは、多くの既報論文での検体では、アーティファクトなLPA産生が起きてしまっていることを示唆している。さらに本手法を様々なマウスモデルに適用したところ、LPAを含む様々なリン脂質において、その特定の分子種の血中濃度が概日リズムを示すことがわかった。以上の結果は、本手法が生体内の血中LPA、さらにはリン脂質全般の濃度を決定するために有用な手法であることを示している。

---

E-mail: k-kano@mol.f.u-tokyo.ac.jp

P-26

# アルツハイマー病剖検脳でのスフィンゴ脂質、グリセロリン脂質の変動

○蔵野 信[1]，齊藤 祐子[2]，矢冨 裕[1]

[1]東京大学・医，[2]東京都健康長寿医療センター

## Modulations of Sphingolipids and Glycerophospholipids in the Autopsy Brains of Alzheimer's Disease

○Makoto Kurano[1], Yuko Saito[2], Yutaka Yatomi[1]

[1]Department of Clinical Laboratory Medicine, The University of Tokyo, [2]Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology

【目的】アルツハイマー病は、その診療におけるアンメットニーズが大きく、その病態生理の解明が求められている。スフィンゴシン1-リン酸（S1P）などのスフィンゴ脂質、リゾホスファチジン酸（LPA）、リゾホスファチジルセリン（LPS）などのグリセロリン脂質は、その生理活性より、アルツハイマー病の病態にも関与している可能性があるが、特に剖検脳を用いたリピドミクス解析は未だ少なく、本研究では、剖検脳でのこれらの脂質の変動を明らかにすることを目指した。

【方法】対照群（N群、n＝6）、Cerad-b患者（C群、n＝7）、アルツハイマー病患者（A群, n＝6）の剖検脳を用いて、スフィンゴ脂質、グリセロリン脂質をLC-MS/MSにて測定した。また、同一検体のS1P、LPA、LPS受容体の発現量をリアルタイムPCRにて測定した。

【結果】A群、C群にて、複数の分子種のセラミド、リゾホスファチジルグリセロール（LPG）、リゾホスファチジルコリン（LPC）、ホスファチジルセリン（PS）の上昇がみられた。また、C群では、N群およびA群と比べて、複数の分子種のリゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルイノシトール（PI）、スフィンゴミエリン（SM）の増加がみられた。臨床情報を含めてSparse PLS-DAを行うと、3群は弁別能よくわかれたが、C群＞A群， H群と弁別する軸は、LPE、PEが強い寄与を持ち、A群＞C群＞H群と弁別する軸は、Braak score、老人班の程度、アミロイドβ量とともに、特に複数のLPG分子種の寄与が大きかった。

S1P受容体、LPA受容体、LPS受容体の発現は、N群と比較して、C群にてS1P2, S1P5, LPA1, LPA2, LPA6, LPS2, LPS3が低下し、A群にてS1P5が低下していた。

【結論】アルツハイマー病では、多くのスフィンゴ脂質、グリセロリン脂質の変動がみられた。特にLPGは、アミロイド沈着や老人班といったアルツハイマー病に特徴的な病理像と関連がある可能性がある。また、アルツハイマー病の前病変と考えられるCerad-bでは、アルツハイマー病よりも一部の脂質含有量が大きく、また、S1P・LPA・LPS受容体発現低下が著しかった。アルツハイマー病へと進行する過程で何らかの病態生理上の意義を持っていると考えられる。

E-mail: kurano-tky@umin.ac.jp

P-27

# 腸内細菌由来の機能性脂肪酸類のターゲットリピドミクス

○辻 光倭[1, 2, 3]，嶋田 渉[3]，岸野 重信[4]，小川 順[4]，有田 誠[1, 2]

[1]慶大薬創薬研究センター，[2]理研IMS，[3]Noster株式会社，[4]京大院農

# Targeted Lipidomics of Fatty Acid-Derived Functional Metabolites Produced by Gut Microbiota

○Kowa Tsuji[1, 2, 3], Wataru Shimada[3], Shigenobu Kishino[4], Jun Ogawa[4], Makoto Arita[1, 2]

[1]Research Center for Drug Discovery, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University, [2]Laboratory for Metabolomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, [3]R&D, Noster Inc., [4]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

【目的】

腸内細菌は宿主と異なる脂肪酸代謝経路を持つことが知られており、リノール酸代謝物の1つである10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid(HYA)をはじめとする代謝物は様々な生理機能を有することが知られている。これらの代謝物を生体内で包括的にモニターすることは、生理的意義や治療能力を探る上で重要である。本研究では、LC-MS/MSを用いたリノール酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸を基質とする脂肪酸代謝物を包括的に解析する手法の確立を目的とした。

【方法】

脂肪酸代謝物45種を合成し、LC条件およびMS条件の最適化を行った。既知濃度の標準溶液を使用して分析の精度・真度について評価した。構築した分析法を生体試料に適用し、様々な条件で代謝物プロファイルを評価した。

【結果】

LC及びMS条件の最適化により多くの代謝物を個々に定量することができた。本手法を用いて糞便中の代謝物が腸内細菌依存的に産生されていることを確認した。また、特徴的な脂肪酸を含む油を摂取することによる糞便及び生体中の由来の代謝物プロファイルを明らかにした。

【結論】

腸内細菌が産生する脂肪酸代謝物を包括的に解析する手法を開発し、生体試料中の代謝物を同時解析することが可能となった。本分析法は、宿主の健康や疾病を制御する細菌由来脂肪酸代謝物の生物学的意義を解明するために役立てられることが期待される。

E-mail: ko.tsuji@noster.inc

## P-28 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# Sterol-O acyltransferase阻害は高脂肪食による虚血再灌流障害後の腎臓三次リンパ組織形成と線維化の促進を抑制する

○有安 由紀[1,2]，佐藤 有紀[2]，磯部 洋輔[1,3,4]，柳田 素子[2,5]，有田 誠[1,3,4]

[1]理研IMS，[2]京大院医，[3]慶大院薬，[4]横市大院生命医，[5]京大ASHBi

# Sterol-O Acyltransferase Inhibition Ameliorates High-Fat Diet-Induced Renal Fibrosis and Tertiary Lymphoid Tissue Maturation After Ischemic Reperfusion Injury

○Yuki Ariyasu[1,2], Yuki Sato[2], Yosuke Isobe[1,3,4], Motoko Yanagita[2,5], Makoto Arita[1,3,4]

[1]RIKEN IMS, [2]Graduate School of Medicine, Kyoto University, [3]Keio University Faculty of Pharmacy, [4]Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, [5]ASHBi, Kyoto University

【目的】高齢化とメタボリックシンドロームの増加を背景に慢性腎臓病が増加しており社会問題となっている。我々は、加齢に伴い腎障害後に三次リンパ組織（TLT）と呼ばれる異所性リンパ組織が腎臓に誘導され、炎症が持続し線維化が増悪することを報告してきた。一方で、メタボリックシンドロームとTLT形成との関係は不明である。そこで、本研究では高脂肪食の給餌によりTLT形成と脂質代謝異常の関連について解析を行うとともに、LC-MS/MSを用いたリピドミクス解析によってTLT形成に寄与する脂質代謝系の解明を目指した。

【方法と結果】高脂肪食を事前給餌し虚血再灌流による腎障害を誘導した高齢マウスでは、通常食を給餌したマウスと比較し有意なTLTの拡大・成熟傾向をみとめ、炎症性サイトカインの増加と線維化の増強をみとめた。また、TLT形成に関わる脂質変化を捉えるため、TLTを誘導した高齢マウスの障害腎臓と、TLTを形成しない若齢マウスの障害腎臓とを、LC-QTOF/MSを用いたノンターゲットリピドミクスによって比較した。その結果、TLTを誘導した腎臓において顕著なコレステリルエステル (CE) の増加がみとめられ、CE合成酵素であるSterol-O acyltransferase (SOAT) 1のmRNA発現が有意に上昇していた。また、高脂肪食投与マウスに対してSOAT阻害薬を投与した結果、TLTの成熟度、炎症性サイトカイン産生と線維化が有意に抑制された。

【考察】脂質代謝異常、特にSOATによるCE産生系の亢進がTLTの形成・成熟を伴う慢性腎臓病の進展に寄与する可能性が示唆された。

E-mail: kosakayuki.18@gmail.com

## P-29　(若手優秀ポスター賞エントリー)

# 1細胞質量分析によるがん特異的代謝物の探索

○阪田 晟[1]，水野 初[1,2]，古庄 仰[1]，杉山 栄二[1]，轟木 堅一郎[1]

[1]静岡県大薬，[2]名城大薬

# Identification of Unique Metabolites in Tumor Cells by Single Cell Mass Spectrometry

○Jo Sakata[1], Hajime Mizuno[1,2], Aogu Furusho[1], Eiji Sugiyama[1], Kenichiro Todoroki[1]

[1]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [2]Faculty of Pharmacy, Meijo University

【目的】リン脂質は細胞膜の構成やシグナル伝達などの重要な役割を担う生体内分子の一つである。これまでに私たちは、生きた細胞1個をサンプリングし直接質量分析することができるLive Single-cell MS法を用いて細胞膜成分を分析し、正常細胞とがん細胞間でリン脂質プロファイルが異なることを見出した。1細胞レベルでのがん細胞の検出や正常細胞との識別は、代謝メカニズムの研究や臨床検査での早期診断等に有用であると考えられる。そこで本研究では、１細胞分析の時に指標となるリン脂質を検出するべく、がん細胞株と正常細胞株を用いて、がん細胞に特異的な代謝物を探索した。さらに1細胞質量分析での高感度検出を実現するべく分析条件を検討し、がん細胞に特異的なリン脂質の検出を試みた。

【方法】本研究ではヒト血球細胞モデルとして、EBウイルス形質転換B細胞株（正常細胞モデル）とバーキットリンパ腫由来のRaji細胞株（がん細胞モデル）を用いた。LC/MS/MS分析では、各細胞$1\times10^6$個をそれぞれ回収し、Bligh & Dyer法で細胞内の脂溶性成分を抽出して試料とした。LCの分離カラムにはACQUITY UPLC BEH Amide Column（1.7 µm, 2.1×150 mm, Waters）を用い、Q-TOF型質量分析計（Xevo G2-XS QTOF, Waters）のポジティブおよびネガティブイオンモードで検出した。データ解析にはMS-DIALおよびProgenesisQIを用い、各細胞で特異的に検出されたピークをそれぞれ抽出して代謝物データベース（KEGG, LIPID MAPS）で分子を推定した。１細胞分析ではnano ESI用 Nanospray Tip（Humanix Cellomicstip）を用いて細胞を採取し、MeOHで細胞成分を抽出した。このTipをnanoESIプローブとしてQ-TOF型質量分析計のポジティブイオンモードで測定した。

【結果】大量細胞抽出液のLC/MS/MS分析により、*m/z* 400～1,200の範囲でポジティブイオンモードでは約18,000本、ネガティブイオンモードでは約22,000本のピークが検出された。得られたピークをOPLS-DA解析した結果、ポジティブイオンモードでは79本、ネガティブイオンモードでは138本のピークがRaji細胞で有意に強く検出された。これらのピークの保持時間やMS/MSフラグメントイオンパターンをデータベースと併せて解析した結果、ポジティブイオンモードでは*m/z* 731.61 (TG(41:0))や*m/z* 759.64 (SM (38:1))、ネガティブイオンモードでは、*m/z* 700.54 (PE (P-34:1))、*m/z* 728.57 (PC (35:2), PE (O-32:0)), *m/z* 800.69 (PS (37:2))などが同定された。なかでもTG (41:0)、PE (O-32:0)、PS (37:2)は、胃がんや直腸がんにおいて増加するとの報告があり[1),2)]、がん細胞検出の特異的な指標となる可能性が示された。また１細胞を測定した結果（n=3）、Raji細胞の抽出液で有意に検出された*m/z*731.61のピークや*m/z*759.64のピークが認められた。現在、有意差が認められたその他のリン脂質を含めて高感度かつ高精度に検出するための質量分析条件を検討しており、1細胞レベルでの網羅的リン脂質分析およびがん細胞と正常細胞の識別分析の実現を目指している。

参考文献

1) Y. Abouleila *et al.*, *Cancer Sci.*, **110**(2), 697–706 (2019).

2) J. Hofmanová *et al.*, *PLOS One,* **15**(1), e0228010 (2020).

E-mail: todoroki@u-shizuoka-ken.ac.jp

P-30

# 糸球体性疾患における尿中グリセロリン脂質の解析

○中嶋 和紀[1, 5]，袴田 知也[2]，堀 秀生[2]，伊藤 辰将[3]，釘田 雅則[4]，長尾 静子[4]，湯澤 由紀夫[3]，坪井 直毅[3]，高橋 和男[5]

[1]岐阜大学・糖鎖生命コア研究所，[2]藤田医科大学・医療科学部，[3]藤田医科大学・医学部腎臓内科学，[4]藤田医科大学・研究支援，[5]藤田医科大学・医学部解剖学II

## Urinary Phospholipid Profiling in Glomerular Disease

○Kazuki Nakajima[1, 5], Tomoya Hakamata[2], Hideo Hori[2], Yoshimasa Ito[3], Masanori Kugita[4], Shizuko Nagao[4], Yukio Yuzawa[3], Naotake Tsubo[3], Kazuo Takahashi[5]

[1]iGCORE, Gifu University, [2]Clinical Laboratory Sciences, Fujita Health University, [3]Department of Nephrology, [4]Research Promotion and Support Headquarters, [5]Department of Anatomy II, Fujita Health University

【目的】尿検体は侵襲性の低さから実臨床応用がしやすく、腎疾患のバイオマーカー探索によく利用される。しかし尿の上清に含まれる脂質は含有量が極めて少なく、そのリピドミクスを実施することは困難である。一方、脂質は糸球体性疾患の病態と深くかかわることが知られているが、アルブミン尿より優れた糸球体性疾患のバイオマーカーは見出されていない。そこで本研究は病態モデルマウスと臨床検体からの尿中のグリセロリン脂質を捉える解析プラットフォームを構築した。特に煩雑な脂質抽出の作業を自動化して、高感度なリン脂質解析メソッドを用いることにより、尿細管障害と糸球体障害の脂質変化を解析した。

【方法】リン脂質の前処理はブタノールーメタノール：BUME 法(Sci. Report, 2012）を採用して、前処理ロボット（PAL-RTC 社）のプログラムを構築した。測定はリン脂質メソッドパッケージ（島津製作所製）を使用した。得られた定量値は尿中クレアチニン値と尿蛋白量で補正した。尿細管障害のモデルマウスは多発性嚢胞腎モデルマウス(*Pcy*マウス、*Pck*ラット)、糸球体障害モデルにはアドリアマイシン投与ラットを採尿した。臨床検体は IgA 腎症、腎硬化症、微小変化型ネフローゼ症候群、膜性腎症患者から得た尿、約40例を解析した。

【結果・考察】脂質抽出条件を最適化した後、自動化プログラムを構築した。メソッドの測定誤差は、ロボットでは手動作業に比べて小さかった。多発性嚢胞腎モデルマウス(100μl)から70成分の脂質を同定した。一方、アドリアマイシン投与ラットの尿を解析したところ、血中リポタンパク質が混入したことによるリゾホスファチジルコリン(LPC)の上昇、ならびに糸球体障害にともなうホスファチジルエタノールミンの減少が観察された。臨床検体の解析ではタンパク尿と LPC の発現量に差が認められた。微小変化型ネフローゼ症候群と膜性腎症患者において興味深い差異が認められている。今後、本法が種々のバイオマーカー探索に利用されることが期待される。

E-mail: knakaji@gifu-u.ac.jp

P-31

# 高分解能LC-MSによるヒト涙液中脂肪酸の分析

○藤城 雅也[1]，草野 麻衣子[1]，山中 秀徳[2]，坂牧 寛[2]，瀬戸 遼也[2]，中内 暁博[1,3]，長谷川 智華[1,4]，恩田 秀寿[5]，熊澤 武志[1,6]，佐藤 啓造[1]，松山 高明[1]

[1]昭和大学医学部法医学講座，[2]一般財団法人化学物質評価研究機構，[3]東都大学沼津ヒューマンケア学部，[4]東邦大学医学部法医学講座，[5]昭和大学医学部眼科学講座，[6]聖隷クリストファー大学看護学部

## Determination of Fatty Acids in Human Tear Samples by LC–HR/MS

○Masaya Fujishiro[1], Maiko Kusano[1], Hidenori Yamanaka[2], Hiroshi Sakamaki[2], Ryoya Seto[2], Akihiro Nakauchi[1,3], Chika Hasegawa[1,4], Hidetoshi Onda[5], Takeshi Kumazawa[1,6], Keizo Sato[1], Takaaki Matsuyama[1]

[1]Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine, [2]Chemicals Evaluation and Research Institute, [3]Faculty of Numazu Human Care, Tohto University, [4]Department of Legal Medicine, Toho University School of Medicine, [5]Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine, [6]Seirei Christopher University School of Nursing

【目的】涙液中には脂質、タンパク質など多くの成分が存在し、薬物の体内動態の解析だけでなく早期診断バイオマーカーの探索にも有用である。今回我々は、TS-1®服用による涙道障害が惹起された臨床患者と健常人の涙液について、高分解能LC-MSを用いた涙液中脂肪酸の比較によりバイオマーカー探索および検討を行った。

【方法】昭和大学病院附属東病院眼科受診中の患者のうち、TS-1®服用による涙道障害が惹起された2症例および健康成人ボランティア1例の涙液10 μLを0.5 M水酸化カリウムエタノール水溶液でけん化後、酢酸エチルで抽出を行った。上清は蒸発乾固を行い、エタノールで再溶解後、高分解能LC-MSに供した。高分解能LC-MSはProminenceシリーズ (SHIMADZU)およびLTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)を用い、カラムは*L*-column 2 ODS(一般財団法人化学物質評価研究機構)を用いた。データ解析は、Thermo Fisher Xcalibur 2.1.0を用いて行った。検出限界は$s/n \geq 3$またはピーク強度20,000に設定した。

【結果】比較解析により疾患群（がん患者AおよびB計2名）の涙液は脂肪酸組成が、C18:0,C18:1n-9,C18:2n-6の総計が半分以上を占めるなど比較的類似していた。また、健常人との比較では、疾患群では極長鎖脂肪酸（C24以上）が多く認められた。健常人は1価不飽和脂肪酸および飽和脂肪酸が多く認められた。

【考察】涙液の分析は採取法や微量である点などから報告が少なく、我々は今後マーカーとなりうる涙液中タンパク質の解析結果について第44回の本会で報告した。本研究では、疾患群と健常人の涙液の比較において含有脂肪酸組成に違いがあり、以前報告した涙液中タンパク質の解析と同様に、これら含有脂肪酸組成パターンが今後マーカーになる可能性が示唆された。しかし、例数が少なく、正確性についてはさらに検討が必要である。また、健常人においては脂肪酸総量が多く、皮脂などによる汚染の可能性も考えられるため、今後、疾患群だけでなく健常人群も例数を増やし、分析および解析を進める。

E-mail: mashall@med.showa-u.ac.jp

## P-32 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# MSイメージングを用いたリン脂質生合成活性の可視化

○岩間 大河[1]，可野 邦行[1]，川名 裕己[1]，河野 望[1]，長田 克之[2]，橋立 智美[2]，進藤 英雄[2,3]，青木 淳賢[1]

[1]東大院薬，[2]国立国際医療研究センター・脂質シグナリングプロジェクト，[3]東大院医

# Visualization of Phospholipids Synthetic Activities Using MS Imaging

○Taiga Iwama[1], Kuniyuki Kano[1], Hiroki Kawana[1], Nozomu Kono[1], Katsuyuki Nagata[2], Tomomi Hashidate[2], Hideo Shindou[2,3], Junken Aoki[1]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, [2]Department of Lipid Signaling, National Center for Global Health and Medicine, [3]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

【目的】生体内には1000種類以上の多様なリン脂質分子種が存在し、組織・細胞ごとに特異性を持って分布する。このリン脂質分子種の特異的な局在はリン脂質のde novo合成反応、脂肪酸リモデリング反応、リモデリング反応の基質となるアシルCoAの合成反応（ACSL反応）など複数の酵素反応により規定されると考えられている。したがって、これらの反応が組織中のいつ・どこで生じているのかを明らかにすることが、リン脂質局在形成機構を理解するうえで必要である。そこで本研究では、質量分析（MS）イメージング法を応用することで、これらリン脂質分子種形成に関わる複数の酵素活性を組織切片上で可視化する新たな手法の開発を試みた。

【方法】標的酵素の反応基質となるリゾリン脂質、アシルCoA、脂肪酸などを含む反応液をマウス組織凍結切片にスプレーし、加温して酵素反応を進め、反応産物となるリン脂質をMSイメージングにより検出した。基質は重水素体を用いることで、内在性のリン脂質と反応産物を区別した。

【結果】種々の条件検討の結果、脳切片上においてリン脂質de novo合成として知られるグリセロール-3-リン酸アシル基転移反応(GPAT反応)およびリゾホスファチジン酸アシル基転移反応(LPAAT反応)を可視化できた。さらに、リン脂質リモデリングに関わるリゾリン脂質アシル基転移（LPLAT）反応、ACSL反応、さらにはACSLとLPLATの連続反応(ACSL/LPLAT反応)の可視化にも成功した。これらの活性イメージング法を脳組織に適用したところ、GPAT反応、LPAAT反応、LPLAT反応といった脂肪酸を導入する酵素反応においては、導入する脂肪酸の種類によってその活性が組織上で全く異なっていることがわかった。LPCAT3などのLPLAT欠損マウス組織を用い検証を行った所、欠損マウス組織では確かにこれらの酵素が担う脂肪酸導入活性が減弱することが確認された。

【考察】本研究ではリン脂質局在の形成機構解明に有用な解析手法の開発を目的に、組織切片上でのリン脂質生合成活性の可視化を行った。特定のLPLAT欠損マウス由来の切片では活性が減弱していたことから、本手法が目的の酵素活性を正しく可視化できていることも担保された。今後は、イメージング結果の妥当性の検証をさらに進めるとともに、リン脂質極性頭部の交換反応やホスホリパーゼ反応といったその他のリン脂質代謝活性の可視化にも取り組んでいく予定である。

E-mail: iwama-taiga393@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

P-33

# MALDIイメージング質量分析法とリピドミクスを融合したアルツハイマー病の脳病理解析

○外山 友美子[1]，徳平 壮一郎[1]，角田 伸人[1]，韮澤 崇[2]，森島 真帆[3]，村山 繁雄[3]，齊藤 祐子[3]，池川 雅哉[1]

[1]同志社大学生命医科学研究科，[2]Bruker JAPAN，[3]東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク

# Brain Pathological Analysis of Alzheimer's Disease Combining MALDI Imaging Mass Spectrometry and Lipidomics

○Yumiko Toyama[1], Soichiro Tokuhira[1], Nobuto Kakuda[1], Takashi Nirasawa[2], Maho Morishima[3], Shigeo Murayama[3], Yuko Saito[3], Masaya Ikegawa[1]

[1]Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, [2]Bruker JAPAN, [3]The Brain Bank for Aging Research, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology

【Introduction】

Neuropathology of Alzheimer's disease (AD) is characterized by the accumulation and aggregation of Amyloid β (Aβ) peptides into extracellular plaques of the brain. Aβ is deposited not only in cerebral parenchyma but also in leptomeningeal and cerebral vessel walls, known as cerebral amyloid angiopathy (CAA). Here, we develop a novel protocol of MALDI-imaging mass spectrometry (MALDI-IMS) on human autopsy brain tissues to obtain a comprehensive mapping of Aβ peptide species. Furthermore, we use a method of MALDI-IMS in combination with lipidomic imaging on human autopsy brain tissues to visualize a multi layered mapping.

【Method】

Human cortical specimens for IMS were obtained from those brains that were removed processed and placed in -80°C within 8h postmortem at the Brain bank at Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology. Frozen tissue sections were cut on a cryostat at a 10 mm thickness onto ITO glass slides. Spectra were acquired using the rapifleX MALDI Tissuetyper and timsTOF fleX in positive linear mode, whereas ions were detected with spatial resolution of 50-70 mm. Lipidomic mapping from serial sections of MALDI - IMS were attempted using timsTOF flex with nanoElute system.

【Results】

MALDI-IMS with rapifleX MALDI Tissuetyper demonstrated the detailed distributions of both Aβx-40 and Aβx-42 (x = 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 11pE) in AD accompanied with moderate CAA brain. MALDI-IMS with timsTOF flex detected shorter Aβ peptide, including Aβ1-29, Aβ10-40 and Aβx-42 (x = 3, 3p). By the current protocol, single ion images of the individual Aβ peptides observed with MALDI-IMS are almost assigned to Aβ species. By contrast, acquired image data can be investigated using unsupervised multivariate statistics in order to obtain image segmentation of anatomical regions of interest for further analysis of undefined proteins. Moreover, proteomic profile of white matter from AD brains reveals an altered pattern between SP rich vs SP rare areas. As the next step, we have challenged to delineate background structures of the brains with typical ions, for example, m/z 772 as phosphatidylcholine (32:0) for grey matter and m/z 851 as potassiated cerebroside for white matter. Among those metabolites, we have determined m/z 616 as heme with MS/MS analysis which is also detected in certain distribution manner. We believe that the current strategy accelerates the diagnosis and the clarification of the pathogenesis of AD.

E-mail: cygg2002@mail4.doshisha.ac.jp

## P-34 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 脳腫瘍研究のためのマウス脳の包括的代謝イメージング

○小林 奈央*[1]，近藤 夏子*[2]，櫻井 良憲[2]，鈴木 実[2]，山口 真一[3]，池川 雅哉[1]

＊: equal contribution

[1]同志社大生命医，[2]京大複合原子力粒子線腫瘍学，[3]島津製作所

# Global Metabolomic Imaging of the Mouse Brains for the Studies of Brain Tumors

○Nao Kobayashi[1]*, Natsuko Kondo[2]*, Yoshinori Sakurai[2], Minoru Suzuki[2], Shinichi Yamaguchi[3], Masaya Ikegawa[1]　＊: equal contribution

[1]University of Doshisha, [2]Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, University of Kyoto, [3]SHIMADZU Co.

【目的】悪性脳腫瘍の治療には、外科的治療、化学療法、放射線療法があり、放射線療法においては選択的に癌組織のみを破壊することが望まれている。本研究では、脳腫瘍移植マウスに放射線療法のホウ素中性子捕捉療法（Boron Neutron Capture Therapy; BNCT）を施し大変有効であったシステムに対し、その治療効果や脳全体への影響を代謝面から解析するため、低分子代謝物質を対象とした質量分析イメージング解析を行った。

【方法】C57BL/6Jマウス（7週齢・雄）のブレグマから左に2mm、深さ3mmに、GL261細胞を$3\times10^5$個移植し、3週間後にBNCTを行った。BNCT未治療、BNCT2日後、BNCT14日後の各条件下のマウス脳を速やかに取り出し凍結した。実験日に脳腫瘍のある左脳とない右脳について位置を合わせて順に連続切片として10μm厚の薄切片を作製し、iMScopeを用いて、空間解像度を40μmとして解析を行った。マトリクスは、9-Aminoacridine (9-AA)を用い、プリン・ピリミジン系代謝物および解糖系代謝物について、それぞれ質量範囲を変えて測定を行った。画像の統計解析には、IMAGEREVEAL MSを用い、解析後の試料はHE染色を行った。

【結果と考察】HE染色画像によって、BNCT未治療での腫瘍の存在と、BNCTの治療効果による腫瘍の消失が確認された。これらのマウス脳内でのイメージング質量分析を行った結果、プリン・ピリミジン系代謝物および解糖系代謝物の腫瘍を中心とした局在が明らかとなった。また、BNCTにより対側の脳室周辺に時間的に変動した代謝物が抽出された。さらに次元削減の方法としてUMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection)法をイメージング画像解析へ応用することにより脳腫瘍の治療前後での脳全体に与える代謝の影響を俯瞰できることが明らかとなった。

E-mail: ctuh2012@mail4.doshisha.ac.jp

## P-35（若手優秀ポスター賞エントリー）

# イメージング質量分析法を用いたメダカ脳の神経情報伝達物質の可視化

〇金丸 公暉[1]，中村 芹奈[1]，日下部 りえ[2]，韮澤 崇[3]，坂本 太郎[3]，日下部 岳広[4]，池川 雅哉[1]
[1]同志社・生命医，[2]理研・生命機能科学，[3]ブルカージャパン，[4]甲南・理工生物

# Visualization of Neurotransmitters of Medaka Brains with Imaging Mass Spectrometry

○Kohki Kanamaru[1], Serina Nakamura[2], Rie Kusakabe[2], Takashi Nirasawa[3], Taro Sakamoto[3], Takehiro G Kusakabe[4], Masaya Ikegawa[1]
[1]Department of Life and Medical Systems, Doshisha University, Kyoto, Japan, [2]Evolutionary Morphology Laboratory, RIKEN, Kobe, Japan, [3]Bruker Japan KK, [4]Department of Biology, Faculty of Science and Engineering, Konan University, Kobe, Japan

メダカやゼブラフィッシュなどの小型魚類は、多産かつ世代交代期間も短く、飼育の容易なことやゲノム解析の完結していることから脊椎動物の疾患モデルとして有用である。体の透明性や個体サイズの小ささから神経回路の研究に有用で、パーキンソン病をはじめとする様々な神経変性疾患モデルとしても有効であるとの報告がある。我々は、これまで主にげっ歯類の脳を対象にイメージング質量分析法を用いて代謝物やタンパク質・ペプチドのイメージングを行ってきた。また、近年、誘導体化法を用いることによりマウス脳内モノアミンの局在を高感度で可視化することにも成功していることから、本研究ではメダカ脳を対象とした神経情報伝達物質の可視化を試みた。成魚メダカを凍結し、速やかに脳切片を作製した。細胞組織学的評価にはMedaka Brain Atlasを参考に HE 染色や免疫組織化学を行い脳内分子局在のマッピングの枠組みを作製した。定法に従いtimsTOF flexを用いたイメージング質量分析を施行した. マトリクスには 2,5-Dihydroxybenzoic Acid (DHB)を用い， 誘導体化試薬としてPy-tagを用いた。代謝物の解析には，MetaboScape2021、画像・統計解析にはSCiLS2022bおよびflexImaging7.0ソフトウェアを用いた。以上の実験より， メダカ脳の詳細な細胞組織マップをもとに、神経情報伝達物質を含む脳内代謝物の局在を可視化し若干の考察を加えた。

E-mail: cgsd2036@mail4.doshisha.ac.jp

P-36

# イメージング質量分析法を用いたリチウム投与マウス脳の代謝変動について

○大原 啓吾[1]，山本 卓志[2]，山口 真一[2]，平田 岳史[3]，池川 雅哉[1]

[1]同志社・生命医，[2]島津製作所，[3]東大理・最先端計測化学

# Visualization of Metabolomic Profiles of Mouse Brains Induced by Lithium Administration with Imaging Mass Spectrometry

○Keigo Ohara[1], Takushi Yamamoto[2], Shinichi Yamaguchi[2], Takafumi Hirata[3], Masaya Ikegawa[1]

[1]Department of Life and Medical Systems, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan, [2]SHIMADZU Co., [3]Geochemical Research Center, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

双極性障害の第1選択薬として用いられるリチウム（Li）は，長期間投与による副作用の報告があり，その予防のためにはLiの生体への作用機序と薬物動態を解明することは重要である．これまで我々は，薬理量Liを経口投与したマウス脳におけるLiの分布をTOF-SIMSやLA-ICP-MSを用いたイメージング質量分析法によって解析してきた．本研究では，Liを経口投与法に加えて腹腔内投与を施行した場合の脳を含むマウス全身におけるLi分布について観察を行うこと、Li投与マウス脳内の代謝変動をイメージング質量分析法によって解析することを目的とした．実験にはICRマウス(雌, 4週齢)を用い, Li腹腔内投与群には炭酸リチウム8 mEq/kgを24時間に1回, 合計2回腹腔内注射した。コントロール群にはミリQ水を投与した．実験日にリトラトームを用いて15 μm厚の凍結切片を作製した．代謝物の質量分析イメージングには顕微質量計iMScopeを用い，プリン・ピリミジン系代謝物と解糖系代謝物を測定する条件を検討した。これまでの解析によりLiは，嗅球や海馬などに特徴的に局在することが報告されている．代謝物を対象としたイメージングの画像解析に次元削減法（Uniform Manifold Approximation and Projection: UMAP）を応用することによりLiの局在と最も関連のあった代謝物質から脳および全身におけるLiの薬理効果について若干の考察を加えた．

E-mail: ctuh2024@mail4.doshisha.ac.jp

## P-37 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 拡張型心筋症モデルハムスターの網羅的代謝イメージング解析

○岡邑 舞子[1]，山口 真一[2]，山本 卓志[2]，袴田 圭祐[3]，新谷 祈[1]，辻 崇[3]，植田 初江[4]，雨宮 妃[4]，湊谷 謙司[3]，升本 英利[3]，池川 雅哉[1]

[1]同志社・生命医，[2]島津製作所，[3]京大院医・心外，[4]国立循環器病・病理部

# Dissecting Pathogenesis of Dilated Cardiomyopathy (DCM) on J2N-k Hamster Model Using Global Metabolomic Mass Imaging Method

○Maiko Okamura[1], Shinichi Yamaguchi[2], Takushi Yamamoto[2], Keisuke Hakamada[3], Inori Shintani[1], Takashi Tsuji[3], Hatsue Ishibashi-Ueda[4], Kisaki Amemiya[4], Kenji Minatoya[3], Hidetoshi Masumoto[3], Masaya Ikegawa[1]

[1]Department of Life and Medical Systems, Doshisha University, [2]SHIMADZU Co., Japan, [3]Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, [4]Department of Pathology, National Cerebral and Cardiovascular Center

【目的】拡張型心筋症（Dilated Cardiomyopathy; DCM）は，左室の拡大と心筋の収縮機能障害を主体とする進行性の予後不良の疾患群である. J2N-kハムスター（以下 J2N-k）は，δ-サルコグリカン遺伝子欠損によりDCMに類似した病態を自然発症する動物モデルである．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．我々は，これまでJ2N-k心筋を対象とした病態進行の時間的・空間的変化を細胞組織病理学的観点から追跡してきた．本研究で用いた9週齢J2N-kの個体における代謝プロファイルから病態進行について再考察することを目的とした.

【方法】9週齢J2N-kと健常対照のJ2N-nハムスター（以下 J2N-n）を対象に, whole animal sectioning の方法により作成した胸腔横断面凍結組織切片をスライドグラスに融解接着した．本手法では心臓を中心に胸腔組織を1枚のスライド上で観察可能である．定法に従い顕微質量計（iMScope）を用いたイメージング質量分析を施行した．マトリクスには, 9-Aminoacridine (9-AA) を用いて，プリン・ピリミジン代謝系および解糖系の分子群を可視化するプロトコルを各々作成した．画像・統計解析には， IMAGEREVEALソフトウェアを用いた．病理組織学的評価には HE 染色，免疫組織化学を用いた.

【結果と考察】DCMハムスター心筋を中心とした胸腔内代謝変動解析を目的とし, J2N-k心筋においてリンパ球浸潤などの炎症性組織病理変化や線維化・石灰化などの病巣に一致した代謝プロファイルの抽出を試みた．プリン・ピリミジン代謝と解糖系代謝に関わる分子群のうち病巣特異的な代謝物の特定を試み，炎症性心筋症からDCMへの病態進行を反映する情報について代謝面から考察することが可能となった．また画像解析に次元削減の方法（Uniform Manifold Approximation and Projection）を応用することにより発症の予測や病態形成理解につながるバイオマーカーとして有用な代謝物を特定・検証できる可能性について若干の考察を加えた.

E-mail: cgsd2067@mail4.doshisha.ac.jp

## P-38 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# MALDI-MSイメージング用自動スプレイヤーを用いたマトリックス塗布量の最適化

○天野 晴貴，Chanudporn Sumpownon-Sugiyama，杉山 栄二，古庄 仰，轟木 堅一郎
静岡県大薬

# Optimization of Matrix Amounts Using an Automatic Sprayer for MALDI-MS Imaging

○Haruki Amano, Chanudporn Sumpownon-Sugiyama, Eiji Sugiyama, Aogu Furusho, Kenichiro Todoroki
School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

【目的】近年、MALDI-MSイメージングに必要なマトリックスの塗布を自動で行うスプレー装置の普及が進んでいる。しかし、各研究者がそれぞれの経験に基づき条件設定しており、同様の試料や標的分子に対して異なる条件が報告されているため、初心者が適切な初期条件を設定するのは難しい。本研究では、自動スプレイヤーとして普及しているHTX Technologies社の装置において、入力した設定値から塗布される面積あたりのマトリックス重量が理論値として表示されることに着目した。最適な理論値は、他の試料を用いて実験を始める際の有用な情報となることが期待できる。本研究では、酸性代謝物のMALDI-MSイメージングに広く用いられている9-Aminoacridine（9-AA）を対象に、比較的均一な切片を得やすいマウス精巣に対して適切な塗布量を求めた。
【方法】8週齢のC57BL/6J雄マウス精巣から得られた8 μm厚の新鮮凍結切片を、ITOコートスライドガラス一枚あたり3枚貼付した。9-AAの塗布にはHTX M5 Sprayer（HTX Technologies, USA）を使用した。塗布回数を1, 2, 4, 8, 12, 16回と変更し、他のパラメーターを固定して得られた試料をMALDI-MS (autoflex maX, Bruker, USA)で測定した。各試料で検出された代表的なピークを11種選択し、それらのピーク強度と塗布回数の関係を調べた。
【結果・考察】塗布回数が8回（理論値として2.667 μg/mm$^2$）の時、11種のピーク強度はいずれも最大であった。この理論値は、本実験条件（組織種や切片厚）を考慮した上で、他の実験を行う際の有用な参考値になると考えられる。現在、脳切片を用いた同様の検討を進めており、その結果についても本会で報告予定である。今後、他の組織種や切片厚を用いた検討により体系化することで、MALDI-MSイメージングに適したマトリックス塗布条件の効率的探索が可能になると考えられる。

E-mail: todoroki@u-shizuoka-ken.ac.jp

## P-39 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# LA-ICPを用いた免疫組織を中心とした生体元素イメージング解析

○小山 遥[1], 辻 雄大[1], 奥田 晃士[2], 山口 真一[2], 池川 雅哉[1]

[1]同志社・生命医, [2]島津製作所

# Immuno-Elemental Imaging of Biological Samples Using Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

○Haruka Koyama[1], Yudai Tsuji[1], Koji Okuda[2], Shinichi Yamaguchi[2], Masaya Ikegawa[1]

[1]Doshisha University Faculty of Life and Medical Sciences, [2]Shimadzu Corporation

胸腺は、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色で濃染される皮質と淡染される髄質から成るリンパ組織である。骨髄から胸腺内に移行したT前駆細胞は、胸腺の皮質･髄質間を移動して様々なシグナルを受け取り、成熟したT細胞へ分化・選択される。このプロセスは、胸腺微小環境が鍵を担っていると考えられるが、詳細については、まだ未解明の点が多い。我々は胸腺組織を中心とした代謝を組織レベルで理解するため、マウス胸部組織を対象にiMScopeを用いプリン・ピリミジン系低分子代謝物の局在やプロテオームレベルの解析について考察を行ってきた。本研究では, 島津ICP質量分析計およびレーザーアブレーションを用い、マウスの胸部組織を一枚のスライド上に冠状断として調整し, P, Fe, Cu, Zn, Mnの局在を可視化することを試みた。その結果、骨髄、胸腺、リンパ節、平滑筋、食道、気管、肺、脊髄、脂肪、動静脈血管、血液の各成分が同一スライド上で観察可能で、良好なマススペクトルを得た。また、空間解像度を100 μmから50 μmに向上させることによりFeの局在が 血球由来分子である2,3 BPGの分布とほぼ一致することに加え定量性にも優れている可能性が示唆された。またIMAGEREVEALを用い多変量解析を行った結果、各器官の構造や分布に対応する代謝物質の分布がクラスターマップとして可視化された。特に胸腺は、皮質、髄質に加え皮質・髄質境界領域、皮質内では、腹側・背側に特徴的な分子プロファイルがあることが明らかとなった。今後は,今回得られた知見をmultiplexに理解することに加え重症筋無力症や胸腺腫などの胸腺病理解析や治療への応用について検討を行う。

E-mail: kymhrk1103@gmail.com

## P-40 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 架橋質量分析による免疫複合体抗原のエピトープ特定

○相原 希美[1]，濵崎 まや[2]，松木 優弥[2]，忽那 幸紀[1]，中嶋 幹郎[1]，大山 要[1, 3]

[1]長崎大院医歯薬，[2]長崎大薬，[3]長崎大病院薬剤部

# Epitope Identification of Immune Complex Antigens by Cross-Linking Mass Spectrometry

○Nozomi Aibara[1], Maya Hamasaki[2], Yuya Matsugi[2], Yuki Kutsuna[1], Mikiro Nakashima[1], Kaname Ohyama[1, 3]

[1]Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, [2]School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, [3]Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital

**【目的】**架橋質量分析法はタンパク質複合体の構造や相互作用の解析に使われる。タンパク質複合体の一種である抗原-抗体複合体 (免疫複合体) は、体内の免疫反応で形成され、自己免疫疾患をはじめ多くの疾患で病態に関与するとされている。そのため、免疫系 (抗体) の標的である抗原のエピトープ (抗体が認識する部位) は、疾患特異性の高い診断法ならびに治療法の開発につながる重要な情報となりうる。本研究では、架橋質量分析法を用いて免疫複合体抗原からエピトープを特定するための手法の構築に取り組んだ。

**【方法】**エピトープが既知の抗原-抗体医薬品から成る複合体 (TNFα-Adalimumab、TNFα-Infliximab、HER2-Trastuzumab、HER2-Pertuzumab) を免疫複合体モデルとし、架橋質量分析法で各複合体からそれぞれのエピトープを特定できるか確認した。具体的には、あらかじめ混合して作製した上記の免疫複合体モデルにスペーサーアーム長が異なる 3 種の架橋剤 (BS3, BS2G, CDI) を添加し、トリプシン消化後 nano-LC-MS/MSに供した。データベース解析で架橋ペプチド (エピトープ-架橋剤-パラトープから成るペプチド) を絞り込み、既知のエピトープ配列が含まれているか確認した。

**【結果・考察】**TNFα-Adalimumab、TNFα-Infliximabでは、架橋ペプチドはほとんど検出されずエピトープを含むペプチドは確認できなかった。TNFα は分子量が比較的小さい (18 kDa) ため、架橋剤が結合できる部分 (リジン残基など) が限られていることが原因だと思われた。一方、HER2-Trastuzumab、HER2-Pertuzumabでは、それぞれ 48 種、44 種の架橋ペプチドが検出され、CDIを用いることにより既知のエピトープを含む架橋ペプチドが検出されることが分かった。CDI は最もスペーサーアームが短く (2.6 Å) 近接したペプチドを緩みなく架橋するため、構造をより正確に反映した架橋が可能である。そのため、3 種の架橋剤のうち CDI が最もエピトープ特定に適した架橋剤であるといえる。

E-mail: nozomi-ai@nagasaki-u.ac.jp

## P-41 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 網羅的免疫複合体解析による強皮症の新たな病態研究

〇忽那 幸紀[1]，岩本 直樹[2]，一瀬 邦弘[2]，相原 希美[1]，中嶋 幹郎[1]，川上 純[2]，大山 要[1,3]

[1]長崎大院医歯薬，[2]長崎大病院リウマチ・膠原病内科，[3]長崎大病院薬剤部

# New Pathological Study by Immune Complexome Analysis in Systemic Sclerosis

○Yuki Kutsuna[1], Naoki Iwamoto[2], Kunihiro Ichinose[2], Nozomi Aibara[1], Mikiro Nakashima[1], Atsushi Kawakami[2], Kaname Ohyama[1,3]

[1]Department of Molecular Pathochemistry and [2]Department of Immunology and Rheumatology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, [3]Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital

【目的】強皮症 (SSc) は自己免疫疾患の1つで、皮膚や内臓の線維化および血管障害が現れる。一般に自己免疫疾患では抗原抗体複合体 (IC) が形成され、その組織沈着で炎症や機能消失による組織障害が起きる。最近、SSc 患者の血清中で IC の存在が確認され、IC の形成が炎症や線維化などを促進することが示された。そこで本研究では、血清IC 中の抗原をイムノコンプレキソーム解析法で一斉に同定し、ICの質 (種類数および疾患特異性) を調べるとともに、IC濃度を測定することで、ICの観点から強皮症病態の考察を行った。

【方法】イムノコンプレキソーム解析法 : Protein A 固定化磁気ビーズを用いて、各患者の血清 (10 μL) から IC を捕集し、パパイン消化により抗体 (Fab) と抗原をビーズから溶出させた。溶出液を還元アルキル化、トリプシン消化後、得られたペプチドの nano-LC-MS/MS 分析とデータベース検索で抗原タンパク質を同定した。サンプル : SSc 患者47名、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者36名の血清を用いた。また SLE 患者は、SLE Disease Activity Indexを用いて活動期患者と非活動期患者に分類した。倫理関連 : 長崎大学病院臨床研究倫理委員会 (No. 16042536, No. 12012397) 。

【結果・考察】同定された IC の種類数は SLE 活動期患者、SSc 患者、SLE 非活動期患者、IC 濃度は SLE 活動期患者、SLE 非活動期患者、SSc 患者の順で多かった。 SLE はICとの関連が最も顕著な疾患で、そのSLEと同程度の種類のICがSScで形成されることから、SScでのICの重要性が示唆された。他方、SSc に特異的なIC 抗原として、Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 30 (MED30) に着目した。MED は30以上のサブユニットで構成され、RNA ポリメラーゼ II の転写活性を促進する。MED30はこのサブユニットに含まれ、血管内皮分化を制御する。さらに、SSc 患者の線維芽細胞ならびに血管の免疫組織染色から、SSc 患者の MED30 発現量は健常人に比べ有意に増加していることがわかった。よって、SSc では多様なタンパクが抗原化することで炎症が誘発される一方で、MED30 のようなタンパクの機能消失や機能障害によって線維化や血管障害が引き起こされる可能性が考えられた。

E-mail: bb55322402@ms.nagasaki-u.ac.jp

P-42

# JNK制御リン酸化GAP-43はヒトの神経成長を同定できる

○岡田 正康[1,2]，金子 奈穂子[3,4]，金村 米博[5]，澤本 和延[3]，藤井 幸彦[1]，五十嵐 道弘[2]

[1]新潟大脳研脳外科, [2]新潟大医神経生化学, [3]名市大大学院医学研究科脳神経科学研究所　神経発達・再生医学分野，[4]同志社大大学院脳科学研究科・神経再生機構部門，[5]国立病院機構大阪医療センター・臨床研究センター・先進医療研究開発部

# JNK-Dependent Phosphorylation Sites of GAP-43 Are the Novel Markers for Axonal Growth in Rodent and Human Neurons

○Masayasu Okada[1, 2], Naoko Kaneko[3, 4], Yonehiro Kanemura[5], Kazunobu Sawamoto[3], Yukihiko Fujii[1], Michihiro Igarashi[2]

[1]Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University, [2]Department of Neurochemistry, Niigata University, [3]Department of Developmental and Regenerative Neurobiology, Institute of Brain Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, [4]Laboratory of Neuronal Regeneration, Graduate School of Brain Science, Doshisha University, [5]Department of Biomedical Research and Innovation, Institute for Clinical Research, National Hospital Organization Osaka National Hospital

【目的】神経成長中の軸索先端に位置する動的構造体の成長円錐 (新生仔齧歯類) をリン酸化プロテオミクス解析し，神経成長関連タンパク質 (GAP-43) において未報告の172番目のトレオニン (T172) と 142番目のセリン (S142) のリン酸化を同定した。哺乳類 (齧歯類， Common marmoset, ヒトiPS細胞) における神経成長とGAP-43のリン酸化の関連性を検証した。

【方法】GAP-43 のリン酸化 (pT172 / pS142) 検出抗体をそれぞれ作成し，バイオインフォの結果から制御キナーゼを検証し，細胞染色，組織染色，質量分析を含む生化学的解析を行い，pT172 / pS142と神経成長との関連を検証した。

【結果】(1) pT172 / pS142抗体は，齧歯類の神経成長や再生を定量的に検出できた。(2) pT172 / pS142をリン酸化するプロテインキナーゼは，c-jun *N*-terminal kinase (JNK) であった。(3) 霊長類であるmarmoset新生仔脳のリン酸化プロテオミクス解析からGAP-43 T172 / S142のリン酸化を検出し，組織学的に伸長中の神経軸索でpT172 / pS142の発現を確認した。(4)ヒトiPS由来神経細胞の伸長軸索でGAP-43 T172 / S142のリン酸化を質量分析及び組織学的検索で検出できた。

【考察・結論】齧歯類から見出したGAP-43 T172 / S142のリン酸化検出抗体は共に，ヒトの神経伸長軸索を同定できる分子マーカーである (Okada et al., Molecular Brain 2021; Neurochem Res. 2022)。

E-mail: masayasu_okd@bri.niigata-u.ac.jp

P-43

# 血液ペプチドミクスを基盤とした新規生理活性ペプチドの探索

○小寺 義男[1]，七里 眞義[2]

[1]北里大理・疾患プロテオミクスセンター，[2]東京共済病院

## Discovery of Novel Bioactive Peptides Based on Blood Peptidomics

○Yoshio Kodera[1], Shichiri Masayoshi[2]

[1]Center for Disease Proteomics, School of Science, Kitasto University, [2]Tokyo Kyosai Hospital

【目的】ペプチドホルモンは生体の恒常性や健康維持に非常に重要な役割を担っている。本研究では血漿を対象とした高効率ペプチド抽出法を基盤に血中のペプチドを網羅的に分析し、その中から新たな生理活性ペプチドを探索することを目的としている。

【方法】当研究室で独自に開発した高効率ペプチド抽出法Differential Solubilization 法（DS法）で血漿200μLからペプチドを抽出し、各種分画によって得られた計約50分画物を様々なパラメターでLC-MS/MS分析した。この結果を*de novo* sequencing を基盤としたデータベース検索ソフトウエアPEAKS Studio X で同定解析した。同定されたペプチドの中から約150種類について高純度なペプチドを化学合成し、各種細胞応答、動物実験にて生理活性の有無を調べた。探索した生理活性ペプチドに関しては、その安定同位体標識ペプチドを用いてLC-MSにて定量解析した。

【結果】測定したLC-MSデータをデータベース検索した結果、1,369タンパク質（Gene Name）にユニークに帰属される擬陽性率 (FDR) 1%の11,256種類のペプチドの同定に成功した。その中の7,959種類はFDR 0%であった。11,256種類のペプチドの中にはN端アセチル化、C末端アミド化、メチオニン残基の酸化、ピログルタミル化されたペプチドが合計約3,000種類含まれていた。各種活性を調べた結果、Gastric inhibitory polypeptideに由来し、マウスにおいて血管の動脈硬化惹起することが確認されたペプチド　GIP_HUMAN[22-51]（Uniprot にGIP_HUMANで登録されたアミノ酸配列の22番目から55番目に対応するペプチド）[1]をはじめ、Suprabasin由来の3種類のペプチド（SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN [243-259]、SBSN_HUMAN [279-295]）[2]、AngiotensinogenのC末端付近に位置するANGT_HUMAN[0448-0462][3]を新規生理活性ペプチドとして報告した。

【参考文献】

1. Masaki, T., et al. Scientific Reports 11:14470, 2021.
2. Taguchi, T., et al. Scientific Reports 11:1047, 2021.
3. Sasaki, S., et al. Journal of the Endocrine Society 6:bvac082, 2022.

E-mail: kodera@kitasato-u.ac.jp

## P-44 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# ヒト脳切片を用いたJAL-TA9のAmyloid-β42加水分解活性

○中村 里菜[1,2]，小西 元美[3]，林 芳弘[1]，齊藤 源顕[1]，秋澤 俊史[1,2]

[1]高知大医，[2]O-Force 合同会社，[3]摂南大薬

# Hydrolase Activity of JAL-TA9 Against Deposited Amyloid-β42 in Human Brain Slice

○Rina Nakamura[1,2], Motomi Konishi[3], Yoshihiro Hayashi[1], Motoaki Saito[1], Toshifumi Akizawa[1,2]

[1]School of Medicine, Kochi University, [2]O-Force Co., Ltd., [3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University

【目的】我々の発見した代表的な低分子酵素ペプチド (Catalytide) の一つである JAL-TA9 (YKGSGFRMI) は Amyloid-β42 (Aβ42) を加水分解することから アルツハイマー病 (AD) の治療薬への可能性が示唆された[1-3]。本研究では JAL-TA9 の臨床応用を目指し、ヒト脳内に蓄積した Aβ42 に対する分解活性と AD モデルマウスの認知機能改善効果を評価した。

【方法】ヒト AD 患者の脳切片を作成し、脱パラフィン後、JAL-TA9 (終濃度 1 mM) と 37℃ で 7 日間反応させた。反応液中の分解物を HPLC 及び質量分析 (MALDI-TOF) により解析し、切断点の同定を行なった。また、AD モデルマウス (C57B/6-App; 11 ヶ月齢) の脳室内に JAL-TA9 を単回投与し、IntelliCage を用いて約 1 ヶ月間連続して基礎活動量及び学習・行動柔軟性を観察し、認知機能を評価した。行動観察終了後にマウスの脳切片を作成し、抗 Aβ42 抗体を用いて免疫染色により脳内 Aβ42 量を評価した。

【結果】ヒト AD 患者脳切片を用いた検討では、JAL-TA9 の自己消化由来のフラグメントペプチドに加えて、Aβ42 由来のフラグメントペプチドが確認できた。また、AD モデルマウスを用いた検討にでは、JAL-TA9 の脳室内投与により認知機能・学習機能を改善させることが明らかとなった。加えて、脳切片の免疫染色の結果、JAL-TA9 投与群において明らかな Aβ42 の減少が確認された。

【結論・考察】今回の検討により、JAL-TA9 が脳内 Aβ42 を加水分解することにより認知機能を改善していることが明らかとなった。JAL-TA9 はこれまでの AD 治療薬とは異なった作用機序による新規の AD 治療薬となり得ることが期待できる。

【文献】

1. Patent: US2019/0023741, NOVEL PEPTIDE EXHIBITING HYDROLYTIC ACTIVITY AND USE THEREOF
2. Rina Nakamura, *et. al.*, *Peptides* 116, 71-77 (2019)
3. Rina Nakamura, *et. al.*, *Journal of Royal Science*, 1, (2) 30-35 (2019)

E-mail: b19d6b02r@kochi-u.ac.jp

## P-45 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# Aβ25-35の細胞毒性に対する酵素ペプチドJAL-TA9の効果

○岡田 百加[1]，中村 里菜[1,2]，齊藤 源顕[1]，秋澤 俊史[1,2]

[1]高知大学医，[2]O-Force 合同会社

# Effects of Catalytic Peptide, JAL-TA9, Against Cell Toxicity Induced by Aβ25-35

○Momoka Okada[1], Rina Nakamura[1,2], Motoaki Saito[1], Toshifumi Akizawa[1,2]

[1]School of Medicine, Kochi University, [2]O-Force Co., Ltd.

【目的】アルツハイマー病 (AD) は、高齢者の認知症の中で最も頻度が高く、神経細胞死や脳内炎症等を特徴とする神経変性疾患である。我々の発見した低分子合成酵素ペプチド (Catalytide) の一つである JAL-TA9 は、アミロイドβ (Aβ) を加水分解することより新たな AD 治療薬として期待できる[1]。本研究では、Aβ の凝集の核となる Aβ25-35 の細胞毒性に対する JAL-TA9 の効果を検討した。

【方法】各濃度の Aβ25-35 を 37 ℃、PBS 中で 3 日間反応を行ない作成した凝集体 Aβ25-35 をマウス神経芽細胞株 (Neuro 2A) に添加して 24 時間培養後に WST-8 にて細胞生存率の解析を行なった。可溶性 Aβ25-35 への効果は JAL-TA9 添加後に 3 日間反応を行ない Neuro 2A に添加して評価した。一方、凝集体 Aβ25-35 に対する効果は、3 日間反応を行ない作成した凝集体 Aβ25-35 に JAL-TA9 を添加、さらに 7 日間反応を行った後、Neuro 2A に添加して同様に評価した。加えて、各反応液を逆相 HPLC 及び質量分析器を用いて解析し切断点の同定を行なった。

【結果】各濃度 (終濃度 12.5, 25, 50, 100 μM) の凝集体 Aβ25-35 を添加し Neuro 2A 細胞の生存率を算出した結果、終濃度 25 μM では 12.5 μM に比べさらに細胞生存率に低下が認められたが 50, 100 μM では 25 μM と同程度であった。JAL-TA9 存在下においては、可溶性及び凝集体 Aβ25-35 共に生存率が Aβ25-35 単独に比べ高くなった。反応液の解析の結果、JAL-TA9 は Aβ25-35 を加水分解していた。

【結論・考察】本研究において、JAL-TA9 は凝集体 Aβ を分解することで、神経細胞死を抑制することが明らかとなった。AD の発症は、不溶性凝集体 Aβ42 が脳内に蓄積し神経細胞死が誘導されることで認知機能の低下が引き起こされるとされており、JAL-TA9 がこれまでのストラテジーとは異なった新規の AD 治療薬となり得ることが期待できる。

【文献】

1. US2019/0023741, NOVEL PEPTIDE EXHIBITING HYDROLYTIC ACTIVITY AND USE THEREOF

E-mail: b215a018@s.kochi-u.ac.jp

P-46

# ポリアミン類を用いた新たな細胞外小胞回収法による培養細胞由来試料の特性解析

○山田 美結[1]，成瀬 有純[2]，菊池 有純[2]，髙木 公暁[3]，堤内 要[1]

[1]中部大学応用生物学部，[2]大雄会医科学研究所，[3]大雄会第一病院泌尿器科

# Characterization of Extracellular Vesicles from Cultured Cells by a Novel Recovery Method with Polyamine

○Miyuu Yamada[1], Azumi Naruse[2], Arizumi Kikuchi[2], Kimiaki Takagi[3], Kaname Tsutsumiuchi[1]

[1]College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, [2]Daiyukai Research Institute for Medical Science, Daiyukai Health Systems, [3]Department of Urology, Daiyukai Daiichi Hospital

【目的】細胞はエクソソームという細胞外小胞（EV）を分泌しており、それらを介して細胞間で情報を伝達し、機能していることが報告されている[1,2]。ゆえに、ヒトの血液や尿などからEVを採取して成分分析を行えば、病気の診断に利用できると期待される。EV抽出法として最も標準的な方法である超遠心法は特殊な装置が必要で、時間もかかり、EVの回収率も低い[3]。磁気ビーズを用いた免疫沈殿法やカラム吸着に基づく方法などが発表されているが、これらの方法もEV収量が低く、試薬等が高価である。そこで我々はポリアミン類を用いた新たなEV回収法を検討した。

【方法・結果】培養細胞としてヒト慢性骨髄性白血病由来細胞K562を用いた。EVの回収操作を行う際、培地を無血清培地に置換して48時間培養し、その細胞培養上清を実験に用いた。EV回収法にはポリアミン類を用いた新規回収法、比較対象として超遠心法とアフィニティー法（MagCapture エクソソームアイソレーションキット PS, 富士フィルム和光）を検討した。得られた試料がエクソソームであることの確認は、ウエスタンブロッティングによりポジティブマーカーであるCD81、Flotilin 1とネガティブマーカーのCalnexinの有無を確認することで行った。これらの試料を膜タンパク質可溶化試薬（MPEX PTS Reagents, GL Sciences）で可溶化し、ペプチド脱塩・濃縮チップ（GL-Tip GC）で前処理した後、水-アセトニトリル（97：3）混合溶媒（0.1%ギ酸含有）に溶解してLC-MS/MS測定用試料溶液とした。LC-MS/MSの装置はNexera X2 - LCMS-8060（島津製作所）を用いた。カラムにはInertsil WP300 C18 5μm (ϕ1.0 ×150 mm)、溶媒には（A）水（0.1%ギ酸含有）、（B）アセトニトリル（0.1%ギ酸含有）を用い、流速50 μL/min、溶媒Bの組成を3% (0 min) – 30% (30 min) – 90% (35-45 min) – 3% (47-60 min) としたグラジエント溶出を行った。観測質量範囲をm/z 100-1300 としてプロダクトイオンスキャンを行い、EVに含まれるペプチド成分の分析を行った。今回検討した新たな回収法により得られたEVに含まれるペプチド成分の特性解析の結果、従来法と共通する点と異なる点がそれぞれ認められた。詳細はポスターにて紹介する。

[1] H. Valadi *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654-659 (2007). [2] A. Zomer *et al.*, *Cell*, **161**, 1046-1057 (2015).
[3] P. Li *et al.*, *Theranostics*, **7**, 789-804 (2017).

E-mail: gr21032-4313@sti.chubu.ac.jp

P-47

# ラットにおけるエルゴステロールのコレステロール合成経路の抑制効果およびビタミン$D_3$合成の促進作用

○中川 沙織，不破 史子，桑原 直子，佐藤 眞治

新潟薬大

# Ergosterol Inhibits Cholesterol Biosynthesis Pathway and Increases 7-Dehydrocholesterol (Precursor of Vitamin $D_3$) in Rat

○Saori Nakagawa, Fumiko Fuwa, Naoko Kuwabara, Shinji Sato

Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

【目的】キノコなどに含まれるエルゴステロール（ES）は、プロビタミン$D_2$として知られている化合物であり、7-デヒドロコレステロールレダクターゼ（DHCR7）によってブラジカステロールに代謝される。DHCR7はコレステロール合成経路中の7-デヒドロコレステロール（7-DHC）からコレステロールへの変換にも関与するため、競合作用によりコレステロール合成が阻害されると考えられる。また、この7-DHCはビタミン$D_3$の前駆体としても知られている化合物である。我々はこれまでにヒト肝がん由来細胞を用いて、ESと7-DHCがDHCR7に対して互いに競合的に作用することを報告している。そこで本研究では、ラットを用いてESの長期摂取によるコレステロールおよびビタミン$D_3$合成経路に対する作用を検討したので報告する。

【方法】Wistar系雄性ラットを通常飼料摂取群（CONT群）、高脂肪高ショ糖飼料摂取群（HFHS群）、高脂肪高ショ糖飼料にESを混餌した群（HFHS＋ES群）の3群に分け、100日間摂取させた後に採血を行った。血漿中コレステロール合成前駆体、コレステロール、ビタミン$D_2$、ビタミン$D_3$、ESおよびその代謝物であるブラジカステロールをGC-MSおよびLC-MS/MSを用いて測定した。

【結果および考察】コレステロールとその前駆体の血漿中濃度は、HFHS群においてCONT群に比べ有意に増加した。次にESを投与した群については、コレステロール濃度はHFHS群に比べ大きな変動は認められなかったが、7-DHC濃度は有意に増加し、デスモステロールおよびスクワレン濃度は有意に減少した。当然のことながらES投与群においてESおよびその代謝物であるブラジカステロール濃度が検出され、ビタミン$D_2$も CONT群およびHFHS群に比べ有意に増加し、ビタミン$D_3$濃度も増加傾向を示した。以上より、エルゴステロールによって、コレステロール合成経路中の7-DHCからコレステロール経路が阻害され、細胞で発見されたDHCR7の競合作用と同じ作用がラットにおいても認められた。また、7-DHCが増加し、ビタミン$D_3$合成経路にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

E-mail: saorin@nupals.ac.jp

P-48

# LC/MS/MSを用いるニーマンピック病C型モデル細胞におけるステロイドホルモンの代謝変動解析

阿部 愛[1, 2]，○前川 正充[1, 2]，佐藤 紀宏[2]，佐藤 裕[2]，公文代 將希[2]，高橋 勇人[2]，菊地 正史[1, 2]，檜垣 克美[3]，小倉 次郎[2, 4]，眞野 成康[1, 2]

[1]東北大薬，[2]東北大病薬，[3]鳥大研究基盤セ，[4]山形大院医

## Metabolic Alteration Analysis of Steroid Hormones in Niemann–Pick Disease Type C Model Cells Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

Ai Abe[1, 2], ○Masamitsu Maekawa[1, 2], Toshihiro Sato[2], Yu Sato[2], Masaki Kumondai[2], Hayato Takahashi[2], Masafumi Kikuchi[1, 2], Katsumi Higaki[3], Jiro Ogura[2, 4], Nariyasu Mano[1, 2]

[1]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, [2]Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital, [3]Research Centre for Bioscience and Technology, Faculty of Medicine, Tottori University, [4]Graduate School of Medicine, Yamagata University

ニーマンピック病C型（NPC）は、リソソーム内のコレステロール輸送タンパク質の機能的欠損によって引き起こされる常染色体劣性遺伝性疾患であり、さまざまな臨床症状を呈する。近年、NPCにおけるミトコンドリア機能障害が報告されていたことから、コレステロールの異化代謝物であるステロイドホルモンの代謝産生異常と、それに基づいて内分泌作用が損なわれる可能性が考えられた。そこで本研究では、液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（LC/MS/MS）を用いて13種類のステロイドホルモン分析法を開発し、NPCモデル細胞におけるステロイドホルモンの挙動変化を解析した。

正イオンモードで10種、負イオンモードで3種のステロイドホルモンのMS/MS条件を最適化した。両イオンモードにおける分離条件の検討を行い、全ての異性体を相互に分離可能な条件を見出した。分析法バリデーションを実施し、精度、真度に問題の無いことも確認した。フィリピン染色とオルガネラの形態観察により、モデル細胞の表現型を確認した。

細胞懸濁液および細胞培養培地中のステロイドホルモンを分析した結果、野生型細胞に比べてモデル細胞内および培地中で6種類のステロイドホルモンが有意に減少していることがわかった。以上の結果から、NPC病態においては、ミトコンドリア異常に伴ってステロイドホルモン代謝が変化している可能性が考えられた。今後、臨床検体中のステロイドホルモンの分析も行いたい。

E-mail: masamitsu.maekawa.a2@tohoku.ac.jp

## P-49 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 腎不全モデルマウスの血漿および筋・腎・肝組織の代謝物解析

○逸見 佳宣[1]，木村 有那[2]，三枝 大輔[2]，佐藤 恵美子[1]

[1]東北大学薬学部　臨床薬学部分野，[2]帝京大学薬学部　臨床分析学研究室

# Analysis of Metabolites in Muscle, Kidney, Liver, and Plasma of Renal Failure Model Mouse

○Yoshinobu Henmi[1], Yuna Kimura[2], Daisuke Saigusa[2], Emiko Sato[1]

[1]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, [2]Faculty of Pharma-Science, Teikyo University

【目的】慢性腎臓病（CKD）は腎機能の低下や腎障害が慢性的に持続する疾患である。この合併症の一つに筋萎縮(サルコペニア)が挙げられ、CKD患者での発症はウレミックサルコペニアと呼ばれる。腎障害が進むと体内に蓄積した尿毒素が代謝変化を引き起こす。我々はこれまでに、尿毒素であるインドキシル硫酸やメチルグリオキサールが筋細胞内に蓄積し、細胞内代謝変化を誘導しウレミックサルコペニアの発症・進展に関与していることを報告している。しかしながら、腎不全時の臓器内の代謝変化については、不明な点が残っている。そこで本研究では腎不全モデルマウスを用いて、臓器の代謝物を解析し、CKDにおける臓器内代謝変化を解析することとした。

【方法】オス8週齢のC57BL/6JJclマウスに0.2%のアデニンを含んだ餌を6週間与えアデニン誘発性腎不全モデルマウスを作製した。対象群には通常の餌を与えた。6週間後に採血、灌流を行った後に腎臓、筋肉、血漿、肝臓を採取した。血漿および組織はクロロフォルム/メタノール/水の溶液で代謝物を抽出後、凍結乾燥させた。その後、オキシム化およびトリメチルシリル化の誘導体化を行い、GC-MS/MS(GCMS-TQ8040) で分析を行った。データ解析には Smart Metabolites Database と MetaboAnalyst 5.0を用いた。

【結果】アデニン誘発腎不全モデルマウスにおいて有意に変化した化合物は筋肉で27化合物、血漿で43化合物、腎臓で55化合物、肝臓で25化合物であった。血漿、腎臓、筋肉ではTCA回路の代謝物のクエン酸、フマル酸、リンゴ酸が有意に上昇したが、コハク酸のみ腎臓と筋肉において有意に減少した。さらに尿素回路の化合物が上昇した。肝臓ではケトン体が有意に上昇した。また筋肉ではアミノ酸の一部が有意に上昇した。

【考察】腎不全時における臓器内の代謝物の変化は各臓器で異なっており、血漿の代謝物の変化は特定の臓器の代謝を反映しておらず、新たなバイオマーカーの開発する際には、各臓器の代謝物の変化を考慮し、疾患との関連を把握する必要がある。

E-mail: yoshinobu.henmi.s1@dc.tohoku.ac.jp

## P-50 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 尿中遊離糖鎖の検出と疾患マーカーとしての可能性

○半澤 健[1,2]，岡本 三紀[2]，村上 博子[2]，中嶋 和紀[1]，宮本 泰豪[2,3]

[1]岐阜大・糖鎖生命コア，[2]大阪国際がんセ・研，[3]大阪国際がんセ・臨床検査学

# Detection of Free-Glycans in Urine and Their Potential as Disease Markers

○Ken Hanzawa[1,2], Miki Tanaka-Okamoto[2], Hiroko Murakami[2], Kazuki Nakajima[1], Yasuhide Miyamoto[2,3]

[1]iGCORE, Gifu Univ., [2]Research center, OICI, [3]Endocrinol Metab, Clin Lab. OICI

【背景・目的】

糖タンパク質・糖脂質に関連する糖鎖は、腫瘍マーカー（CA19-9, SLX, STNなど）として臨床的に利用されている。一方で、他の分子に結合せずに存在する遊離糖鎖に関しては、リソソーム酵素に関する疾患との関連はよく知られているが、腫瘍マーカー候補としてはあまり注目されておらず、新規マーカー候補が見つかる可能性が考えられた。体内で産生された遊離糖鎖は尿に豊富に含まれ、また、尿は検体採取が容易である。そこで尿中遊離糖鎖を対象として、がんに関連した変化の解析を行った。

【方法】

尿試料はがん患者（胃、大腸、膵、胆管がん）と健常者（非担がん）の検体を使用し、その量はそのクレアチニン濃度を基準とした。尿中遊離糖鎖は陽イオン交換、グラファイトカーボンクロマトグラフィーにより抽出され、ピリジルアミノ（PA）化蛍光標識した後、HPLCおよび質量分析に基づいた手法により解析した。糖鎖の検体間の存在量比較は、まず、多段階HPLC分離後の蛍光クロマトグラム、および細かく分画した後の選択イオンモニタリング（SRM）により行った。また、分析のスループット向上のために、逆相HPLC分離とSRMによるPA化糖鎖の測定系を構築した。

【結果・考察】

一部のがん患者において健常者と比較して明らかな糖鎖の増加傾向が見られた。増加傾向が見られた代表的な遊離糖鎖は、主鎖がラクトース（Galβ1-4Glc)およびN-アセチルラクトサミン（Galβ1-4GlcNAc)をコアとして伸長された糖鎖、遊離*N*-結合型糖鎖、Galβ1-4Xylα1-3Glcタイプの糖鎖などで、修飾としてシアル酸、フコースおよび/または硫酸エステルを有することが特徴として挙げられる。遊離*N*-結合型糖鎖は断片状の分解生成物からほぼ分解を受けていない3・4分枝型の大きなサイズのものまで見られた。今回は進行がん患者のみを対象として測定を行っているものの、既存マーカー（CEA、CA19-9、DuPan-2）陰性の患者においても増加する糖鎖があり、そのような患者において有用なマーカーとなる可能性がある。また、ギ酸系移動相を用いた逆相HPLCはPA化糖鎖（2～20残基程度まで）の異性体分離能が高くかつ質量分析において高い感度で検出できることも確認した。

現在、遊離糖鎖と疾患との関連の研究をさらに発展させることを目指し、遊離糖鎖が、非がん性細胞増殖性疾患である嚢胞性腎疾患群の診断のマーカーとなりうるのか、培養細胞レベルではあるが、検証を進めている。

E-mail: kehnzw22@gifu-u.ac.jp

## P-51 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 新規CYP1A2活性評価法の開発に向けたAUC法と1点採血法の比較検討

○大木 聖矢，髙野 大輝，尾川 慎悟，島﨑 隼人，深江 桃花，降幡 知巳，柴崎 浩美，横川 彰朋

東京薬大・薬

# AUC Versus Single Point Blood Collection Methods for the Development of a Novel Evaluation Method for CYP1A2 Activity

○Seiya Ohki, Hiroki Takano, Shingo Ogawa, Hayato Shimazaki, Momoka Fukae, Tomomi Furihata, Hiromi Shibasaki, Akitomo Yokokawa

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

【目的】

当研究室では，血中メラトニン (MEL) のAUC ($AUC_{MEL}$) と尿中排泄されたMEL代謝物 (6-O-MEL) の排泄量より算出したMEL部分代謝クリアランス ($CL_{6MEL}$) による新規CYP1A2活性評価法の開発に取り組んでいる．一方，この方法は$AUC_{MEL}$を算出するために最低でも3回の採血が必要となり, 侵襲性が大きいことが課題となる. この課題に対して, 採血点を少なくすることができれば, より侵襲性の低い活性評価法として臨床応用に繋がることが期待できる．そこで本研究では，1点採血による$CL_{6MEL}$算出法 (1点採血法) が, 従来の$AUC_{MEL}$を用いた$CL_{6MEL}$算出法 (AUC法) よりも簡便な新規CYP1A2評価法として利用可能であるか検証することを目的とした.

【方法】

健常人9名から採血 (10，11，12時) と2 時間蓄尿 (10－12時) を，1 週間ごとに計3回行った．得られた生体試料をそれぞれ固相抽出デバイス (MEL : Sep-pak C18，6-O-MEL : Oasis HLB) で前処理後，LC-MS/MS (Xevo TQD，Waters) で血中MELと尿中6-O-MELを測定し，AUC法と1点採血法でそれぞれ$CL_{6MEL}$を算出した．モニターイオンは，MELでm/z 233→174，6-O-MELでm/z 249→190とした．なお，本研究は東京薬科大学倫理審査委員会から承認を得ている (承認番号: 18-02).

【結果】

従来のAUC法では，9名の平均$CL_{6MEL}$が43.3±18.5 L/hrとなった．一方，1点採血法ではそれぞれの採血時間で，30.3±12.9 L/hr (10時)，48.3±22.4 L/hr (11時; 中点)，64.7±37.2 L/hr (12時) となった．AUC法に対する1点採血法のそれぞれのタイムポイントにおける相関係数は，0.848，0.984，0.897となり，2時間の蓄尿時間の中点で採血した1点採血法が，最も高い相関を示した.

【考察】

本研究では，血中MEL濃度と尿中6-O-MEL排泄速度から$CL_{6MEL}$を算出し，2時間蓄尿の中点における1点採血法は，従来のAUC法と同様に$CL_{6MEL}$が算出できることを明らかとした．これにより1点採血法が，より簡便な新規CYP1A2活性評価法となることを証明した. 今後は新規CYP1A2活性評価法の確立に向けて，多数の被験者の生体試料を測定する必要がある.

E-mail: y161036@toyaku.ac.jp

P-52

# メラトニン尿中排泄量算出のための脱抱合反応における内標準物質としての安定同位体標識の比較

○横川 彰朋，尾川 慎悟，髙野 大輝，大木 聖矢，島﨑 隼人，深江 桃花，降幡 知巳，柴崎 浩美

東京薬大薬

# Comparative Study of Stable Isotope-labeled Internal Standard Substances Used in the Deconjugation Reaction for the Calculation of Urinary Melatonin Excretion

○Akitomo Yokokawa, Shingo Ogawa, Hiroki Takano, Seiya Ohki, Hayato Shimazaki, Momoka Fukae, Tomomi Furihata, Hiromi Shibasaki

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

【目的】メラトニン (MEL) は，分泌後大部分がCYP1A2により6位水酸化体 (6-O-MEL) へ代謝された後，硫酸抱合体 (6-S-MEL) やグルクロン酸抱合体となり尿中へ排泄される．したがって，これら抱合体を脱抱合し得られた6-O-MELの排泄量は，メラトニン分泌評価やCYP1A2活性評価へ応用することができる．LC-MS/MSで抱合体を定量する際の内標準物質には，脱抱合前に抱合体である6-S-MELの安定同位体標識体 (6-S-MEL-$^2H_4$) を加える方法と，脱抱合後に6-O-MELの安定同位体標識体 (6-O-MEL-$^2H_4$) を加える方法が考えられる．本研究では両方の安定同位体を利用したデータを比較し，それぞれの安定同位体標識体を使用する定量法の特徴を明らかとした．

【方法】装置はLC-MS/MS (Xevo TQD, Waters) を使用し，カラムはACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 μm)，モニターイオンはm/z 249→190とした．脱抱合反応条件は，酵素にRoche Glucuronidase/Arylsulfatase を用い37℃で60分の反応とした．内標準物質には6-O-MEL-$^2H_4$と6-S-MEL-$^2H_4$を用い，健常人の尿中6-O-MEL排泄量を両方の内標準物質で測定した結果を比較した．

【結果】6-O-MEL-$^2H_4$を使用した場合，脱抱合酵素の使用量を増やすに従い脱抱合率と6-O-MEL定量値が上昇したことから，6-O-MEL濃度の定量には脱抱合率がプラトーに達する脱抱合酵素量400 μLが必要であった．一方，6-S-MEL-$^2H_4$を使用した場合，脱抱合酵素の使用量を100から400 μLへ増やすに従い脱抱合率は増加するものの，6-O-MEL定量値は変化なく，脱抱合酵素100 μLで定量を行えた．健常人から得た尿 (n=18，0.07～2.25 μg/2hr) を両方の内標準物質で測定し相関係数を算出したところ，r=0.97の直線が得られ，どちらの方法でも正しく測定できることが明らかとなった．

【考察】6-S-MEL-$^2H_4$を利用することで脱抱合率が100%でなくとも定量値への影響がないことが明らかとなった．そのため6-S-MEL-$^2H_4$を利用する方法は，脱抱合酵素の使用量が少なくコスト面で優れていると言える．

E-mail: yokokawa@toyaku.ac.jp

## P-53 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 安定同位体誘導体化LC-MS/MSを用いたヒト血清中におけるAGEsの一斉分析法の開発：アルツハイマー型認知症への応用

○木下 真千佳[1]，六車 宜央[1]，赤津 裕康[2]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大薬，[2]名市大院医

# Development of Simultaneous Analysis Method for Advanced Glycation End Products in Human Serum by Stable Isotopes Labeled LC-MS/MS : Application to Alzheimer's Disease

○Machika Kinoshita[1], Yoshio Muguruma[1], Hiroyasu Akatsu[2], Koichi Inoue[1]

[1]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [2]Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University

【目的】生体内で起こる糖化では、糖とタンパク質や脂質が熱により非酵素的に反応し、最終産物としてAGEs（Advanced glycation end products）が産生される。これは、代表的な糖化ストレスマーカーとされ、老化に伴い体内に蓄積し、タンパク質が変性することで慢性疾患を引き起こすと示唆されている。そこで、慢性疾患であるアルツハイマー型認知症（AD）とAGEsの関係性に注目した。現在、AD病変の進展は老人斑と神経原繊維変化（NFT）のブラークステージ（BS）で判断されるが、重症度とAGEsの関係性は未だ解明されていない。そこで本研究では、誘導体化LC-MS/MSを用いて、ヒト血清中のAGEsの一斉分析法を開発し、各BSにおけるAD患者の血清中AGEs濃度を測定し、BSのグレーディングに応じたAGEsの量的変化における関係性解明を目的とした。

【方法】誘導体化試薬としては1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)piperidine-4-carboxylic acid succinimidyl ester （DMT-PCA-OSu）及び、その重水素置換体iDMT-PCA-OSuを合成し、利用した。11種のAGEsをWaters社製LC-MS/MS （ACQUITY UPLC H-Class Plus/Xevo TQD）によって測定した。以下にLC-MS/MS条件を示す。カラム：InertSustain PFP（2.1×150 mm, 3 μm）、移動相：0.1%ギ酸水溶液及び0.1%ギ酸アセトニトリル溶液、流速：0.2 mL/min、イオン化法：ESI positive mode
定量は内標準法を採用し、内標準物質としてiDMT-PCA-OSu反応体を用いた。

【結果及び考察】LC-MS/MS条件を最適化した結果、15分以内に11種AGEsの一斉分析法を構築できた。各種バリデーション試験を行った結果、検出限界は1-10 nM、定量限界は5-25 nMであり、また、5 nM-10 μMの内標準検量線では、$R^2$=0.999以上の良好な直線性が得られた。さらに、血清における添加回収試験では、91-103%の回収率が得られた。本法をAD患者から採取された血清に応用した結果、数種のAGEsが確認できた。今後は今回構築した分析法を用いて、様々な疾患に応用していく。

E-mail: kinoue@fc.ritsumei.ac.jp

## P-54 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 誘導体化LC-MS/MS法を用いたシェーグレン症候群モデルマウス組織中短鎖脂肪酸プロファイル

○長友 涼介[1]，金子 東暉[1]，清水 真祐子[2]，石丸 直澄[2]，常山 幸一[2]，井之上 浩一[1]
[1]立命館大院薬，[2]徳島大院医歯薬

# Short-Chain Fatty Acids Profiling in Biological Samples from a Mouse Model of Sjögren's Syndrome Based on Derivatized LC-MS/MS Assay

○Ryosuke Nagatomo[1], Haruki Kaneko[1], Mayuko Shimizu[2], Naozumi Ishimaru[2], Koichi Tsuneyama[2], Koichi Inoue[1]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [2]Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University

【目的】短鎖脂肪酸（short-chain fatty acids，SCFAs）は腸内細菌の主な代謝物として知られている．腸管で産生されたSCFAsは全身循環により各組織に分布し，宿主への生理活性，生活習慣や病態へ大きく関与していることが報告されている．そのため，組織別の分布を示し，生理活性や病態影響との関連性検証は今後必要となる．そこで本研究ではマウス体液及び組織（血清，唾液，便，肝臓及び脳）に含有されるSCFAsのLC-MS/MS分析法を開発することとした．SCFAsは低分子及び高極性であるため，逆相系LCにおける保持容量の向上を目的として2-ピコリルアミン（2-picolylamine，2-PA）誘導体化法を行っている．また，各組織の前処理にはQuEChERS法を採用した．
【方法】本研究ではプロピオン酸，酪酸，イソ酪酸，吉草酸，イソ吉草酸，2-メチル酪酸，2,2'-ジメチルプロピオン酸，カプロン酸，4-メチル吉草酸，3-メチル吉草酸，2-エチル酪酸，2,2'-ジメチル酪酸の12種類のSCFAs構造異性体を対象とした．2-PA存在下のもと誘導体化反応を行い，2-PA誘導体として逆相系カラム（ACQUITY UPLC BEH $C_{18}$，2.1×150 mm，1.7 μm）にて分離を行った．移動相はA相に0.1%ギ酸水溶液，B相に0.1%ギ酸メタノールを使用し，流速は0.2 mL/minとした．生体試料としてシェーグレン症候群（SS）モデルマウス由来の血清，唾液，便，肝臓及び脳を用いて組織網羅的なSCFAsプロファイルを行った．
【結果・考察】MS/MSでは，$[M(2\text{-}PA\text{-}derivative)+H]^+$のプレカーサーイオン及び2-PA由来のプロダクトイオン（*m/z* 109）を検出しSRM測定を行った．QuEChERS法を用いた前処理は，各組織（血清，唾液，便，肝臓及び脳）において70%以上の回収率が得られた．本手法を実際にSS試料に応用したところ，各試料において特徴的なピークパターンを示し，特に唾液中SCFAs濃度と病態進行度との間に相関性が観測された．この結果から，SSマウスにおけるSCFAsのバイオマーカーとしての有用性ならびに複数の生体試料を用いた全身分布解析の新奇性を示唆することができた．今後，対象とする病態を拡大し病態網羅的なSCFAsプロファイルを行っていくこととする．

E-mail: kinoue@fc.ritsumei.ac.jp

## P-55 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# 安定同位体誘導体化LC-MS/MSを用いたヒト胆汁中における腸内細菌叢由来代謝物の解析

○金子 東暉[1]，六車 宜央[1]，宮部 勝之[2]，赤津 裕康[3]，井之上 浩一[1]

[1]立命館大院薬，[2]日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院，[3]名市大院医

# Analysis of Metabolites Derived from Intestinal Flora in Human Bile Samples with a Stable Isotope Labeling Derivatization Based LC-MS/MS

○Haruki Kaneko[1], Yosio Muguruma[1], Katsuyuki Miyabe[2], Hiroyasu Akatsu[3], Koichi Inoue[1]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [2]Japanese Red Cross Aichi Medical Center Nagoya Daini Hospital, [3]Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University

【目的】近年のオミクス解析の発展により、腸内細菌叢変化に起因した腸内細菌叢由来代謝物に注目が集まっている。肝胆道疾患において、胆汁中の細菌叢変化が報告されている一方で、腸内細菌と胆汁内細菌の関連性、その代謝物の疾患への関与については明らかにされていない。また、これまでにヒト胆汁を測定した研究やデータが少なく、腸内細菌叢由来代謝物の体内動態を理解するために、正確なメタボロームデータが必要となってくる。そこで本研究では、ヒト胆汁中の腸内細菌叢由来代謝物を測定することで、疾患と代謝物間の相関や代謝物の体内動態を評価することを目的とした。

【方法】本研究では、抱合体を含む21種類の胆汁酸と7種類の短鎖脂肪酸の計28種類を分析対象とした。カルボキシル基と特異的に結合する1-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)piperidin-4-amine（DMT-4-APi）及びその重水素標識体（iDMT-4-APi）を用いた安定同位体標識誘導体化法を行った。分析には、ACQUITY UPLC CSH C18 カラム（2.1×100 mm, 1.7 μm, Waters社製）を用いて、LC-MS/MS（ACQUITY UPLC H-Class Plus/Xevo TQD, Waters社製）にて測定した。移動相に0.1%ギ酸水溶液及び0.1%アセトニトリル溶液を用いて、流速0.4 mL/min、ESI positive modeで測定した。

【結果及び考察】28種類の分析対象化合物を20分以内に一斉分析することができた。重水素標識体を内標準物質とした検量線は10 nM-10 μMの範囲で$R^2$=0.99以上であった。さらに胆汁を用いた添加回収試験において良好な回収率が得られ、本手法を用いて生体試料へ応用することができた。実際に生体試料に応用した結果、数種の胆汁酸が観察され、胆汁酸と短鎖脂肪酸の関連性も示唆された。今後は本手法を血清に応用し、胆汁との濃度比較や組成の変化などを評価していく予定である。

E-mail: kinoue@fc.ritsumei.ac.jp

P-56

# 新規荷電Cookson型試薬のデザイン・合成とその性能評価

○小川 祥二郎，平田 結衣

福山大薬

# Design and Synthesis of Novel Permanent Charged Cookson-Type Reagents and Evaluation of the Performance by LC/MS/MS

○Shoujiro Ogawa, Yui Hirata

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University

【目的】生体試料中のビタミン$D_3$代謝物やある種のステロール類のLC/MS/MSによる分析にはこれら測定対象のESI効率の向上を目的として4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione :PTADに代表されるCookson型試薬による誘導体化は効果的である．また，演者らは先の研究でPTADの感度向上を目的としてその4位にプロトン親和性原子団であるジメチルアミノ基を導入したDAPTAD [4-(4-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione]も開発し，その有効性を示した．しかし，荷電構造を有したCookson型試薬はこれまでに殆ど検討されていない．本研究ではこの点に着目し，新たに荷電構造を有するCookson型試薬を合成し，LC/MS/MSによる性能評価を行うこととした．

【方法】2,6-difluoroisoniconic acid (**1**) を既法に従って4段階で中間体である4-(2,6-difluoropyridiyl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione (**5**) へと導いた．即ち，DPPAにより1を酸アジド体 (**2**) に変換し，続いてクルチウス転移によりイソシアナート体 (**3**) へと導いた．**3**は精製することなくethyl carbazateを作用させセミカルバジド体 (**4**) とした．**4**を炭酸カリウム水溶液中で加熱撹拌させ**5**とした．**5**を$(CF_3SO_2)_2O$とmethanol存在下で置換ピリジンの窒素原子をメチル化させ，4-(2,6-difluoro-1-methyl-pyridinium)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione (**6**) を得た．**6**は使用前にdiacetoxy iodobenzeneで酸化し，4-(2,6-difluoro-1-methyl-pyridinium)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (FMPTAD: **7**) の酢酸エチル溶液として使用した．

【結果】7をSmith-Lemli-Opitz症候群のマーカーとしても知られる7-dehydrocholesterolと反応させた所，*m/z* 611の分子カチオンを基準ピークとして与え，続くMS/MSではm/z 171の試薬の解離に伴うものと考えられるプロダクトイオンが得られた (装置: Waters Quatro micro)．現在開発した試薬による感度向上能やLC/MS/MS挙動を精査しているため，合わせて発表する予定である．

E-mail: sho-ogawa@fukuyama-u.ac.jp

## P-57 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# SH-SY5Y細胞におけるprogesterone代謝物の同定

○渋谷 斗磨[1]，楠瀬 翔一[2]，東 達也[2]

[1]東京理大院薬，[2]東京理大薬

# Identification of Progesterone Metabolites Formed in SH-SY5Y Cells

○Toma Shibuya[1], Shoichi Kusunose[2], Tatsuya Higashi[2]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, [2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

【背景・目的】Progesterone (PROG) は脳内で様々な代謝物に還元され，それらの中には神経興奮の調節作用を有するものも存在する．例えば，PROGの3α,5α-還元体であるallopregnanolone (AP) は$GABA_A$受容体のアロステリックモジュレータとして抗不安，抗うつ作用を示す．ところで，神経芽細胞腫由来のSH-SY5Y細胞は，ヒト神経細胞モデルとして種々の研究に用いられているが，本細胞におけるPROG代謝には不明な点が多い．そこで本研究では，PROG代謝物 [AP，epiallopregnanolone (EAP)，pregnanolone (P)，epipregnanolone (EP)，3α-/3β-/5α-/5β-/20α-/20β-dihydroprogesterone (DHP)] の計10種のプレグナンステロイドのLC/ESI-MS/MS分析法を構築し，この点を明らかにすることを目的とした．

【方法・結果】特異性の向上を目的として，ステロイドのケト基と反応するGirard試薬P (GP) で誘導体化後，LC/ESI-MS/MSに付した．GP誘導体化を導入すると，いずれのステロイドからもMSでは高強度の$[M]^+$が，MS/MSでは3-ケトステロイドからは$[M–C_5H_5N]^+$と$[M–C_5H_5N–CO]^+$の，20-ケトステロイドからは$[C_6H_9N_2O]^+$と$[M–C_5H_5N]^+$の特徴的なプロダクトイオンが得られ，各々2通りのSRMを用いて代謝物を同定した．カラムにYMC-Triart C18を，移動相にMeCN-10 mM $HCOONH_4$ (1:2，v/v) を用いるとき，AP，P，3α-DHPを，また，MeOH-10 mM $HCOONH_4$ (1:1，v/v) を用いるとき，EAP，EP，3β-DHP，20α-DHP，20β-DHPを他のステロイドから分離して検出することができた．そこで，この2つのLC条件を補完的に用いて各ステロイドを検出することにした．一方，種々のLC条件においても5α-DHPと5β-DHP相互の分離は達成できなかった．次いで，無血清培地にPROGを100 nMとなるよう添加し，そこでSH-SY5Y細胞を24 h培養後，培養上清に放出されたステロイドをAcOEtで抽出した．上記LC/ESI-MS/MS条件で分析したところ，培養上清からAP，EAP，3β-DHP，20α-DHP，20β-DHPに対応するピークが検出された．また，培養上清から5α/β-DHPに相当するピークも検出され，AP，EAP (5α-DHP由来) のピークが検出されたのに対して，P，EP (5β-DHP由来) のそれらが認められなかったことから，SH-SY5Y細胞ではPROGの5位還元体については，α体のみが生成すると考えられた．なお，PROGを添加しない場合は，いずれのステロイドも検出されなかった．また，SH-SY5Y細胞にPROGと同時にフィナステリド (5α-還元酵素阻害剤) を処理した際の培養上清中プレグナンステロイドのレベル変動についても報告する．

E-mail: 3B22544@ed.tus.ac.jp

## P-58 (若手優秀ポスター賞エントリー)

# GUS処理したヒト尿中に遊離される主要なビタミン$D_3$代謝物

○髙田 一成[1]，萩原 雪乃[1]，冨樫 萌香[2]，橘高 敦史[3]，川越 文裕[3]，上杉 志成[4, 5]，楠瀬 翔一[2]，東 達也[2]

[1]東京理大院薬，[2]東京理大薬，[3]帝京大薬，[4]京大化研，[5]京大物質－細胞システム拠点

# Major Vitamin $D_3$ Metabolites Liberated in Human Urine after GUS Treatment

○Kazunari Takada[1], Yukino Hagiwara[1], Moeka Togashi[2], Atsushi Kittaka[3], Fumihiro Kawagoe[3], Motonari Uesugi[4, 5], Shoichi Kusunose[2], Tatsuya Higashi[2]

[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, [2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, [3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, [4]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [5]Institute for Integrated Cell-Material, Kyoto University

【背景・目的】ヒトにおける余剰の25-ヒドロキシビタミン$D_3$ [25(OH)$D_3$，循環型代謝物] の体外排泄については未だ不明な点が多い．先に演者らは24,25-ジヒドロキシビタミン$D_3$ [24,25$(OH)_2D_3$] の24-グルクロニドを主要な尿中代謝物として同定し，その量 (数十ng/g クレアチニン) も明らかとした．一方，尿中に23,25-ジヒドロキシビタミン$D_3$ [23,25$(OH)_2D_3$] のグルクロニドの存在も報告したが, その量的情報を得るには至らなかった. そこで本研究では尿をβ-グルクロニダーゼ (GUS) 処理後に遊離する23,25$(OH)_2D_3$と24,25$(OH)_2D_3$の同時定量法を開発し，それらの量比を精査した．

【方法・結果】健常成人男性の随時尿 (1.0 mL) にISとして$^2H_6$-24,25$(OH)_2D_3$を添加し，GUS (1,000 U) で処理後，除蛋白及び固相カードリッジにより精製した．感度及び特異性の向上を目的として4-(4-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dioneによる誘導体化後，LC/ESI-MS/MSに付した．検量線は両代謝物ともに10－500 pg/mLの範囲で良好な直線性を示した．また，23,25$(OH)_2D_3$と24,25$(OH)_2D_3$の量比は, 検量線法により求めた23,25$(OH)_2D_3$濃度を24,25$(OH)_2D_3$濃度で除して算出した．午前中に採取した尿の23,25$(OH)_2D_3$と24,25$(OH)_2D_3$の量比は0.91 ± 0.19 (平均 ± SD，$n$ = 24) であり，23,25$(OH)_2D_3$のグルクロニドは24,25$(OH)_2D_3$ 24-グルクロニドとともに量的に主要な尿中代謝物であることが確認された．この量比は夕方の尿でもほぼ変化しなかった．さらに，ビタミン$D_3$サプリメント (1,000 IU/日) を一週間服用した後では，GUS処理した尿中の23,25$(OH)_2D_3$及び24,25$(OH)_2D_3$濃度 (クレアチニン補正値) は明らかに上昇したが，量比は0.89 ± 0.14から0.96 ± 0.11 ($n$ = 16) と，その上昇はわずかであった．以上の結果から，ヒトではビタミン$D_3$の供給状態にかかわらず，常にほぼ同量の23,25$(OH)_2D_3$と24,25$(OH)_2D_3$がグルクロニドとして尿中に排泄されるものと考えられた．さらに，ヒト血漿中に24,25$(OH)_2D_3$ (0.98－1.33 ng/mL, $n$ = 5) が検出される一方で，23,25$(OH)_2D_3$ (< 20 pg/mL) は検出されなかった．このことから23,25$(OH)_2D_3$は生成後，24,25$(OH)_2D_3$よりも速やかにグルクロン酸抱合を受け, 体外へ排出されるものと推測された. 以上より, 25(OH)$D_3$の23位水酸化とその後のグルクロン酸抱合は, 余剰の25(OH)$D_3$の尿中排泄に重要な役割を持っていると結論付けられた．

E-mail: 3B21538@ed.tus.ac.jp

# 講演要旨

## ランチョンセミナー

L-1

# 毛髪中睡眠薬の超高感度質量分析とそこに潜む危険

○片木 宗弘

大阪医科薬科大学法医学教室

## Ultra-Sensitive Mass Spectrometric Determination of Hypnotics in Hair and Its Risk

○Munehiro Katagi

Department of Legal Medicine, Osaka Medical and Pharmaceutical University

薬物が関係する犯罪における質量分析（MS）の果たす役割は非常に大きい。この三十余年で、MS は様々な進歩を遂げ、特に検出感度の向上は、尿あるいは血液から薬物使用を証明する上でその検出可能期間に顕著な効果をもたらした。中でも睡眠薬を悪用した性犯罪における薬物の摂取証明は、検出が最も困難であるトリアゾラムでも摂取後 2〜3 日間は可能となってきた。しかしながらこのことは裏を返せば、それ以上の日数を経過してしまえば、最新鋭の装置を使用しても尿や血液からの摂取証明が不可能であることを意味し、薬物を悪用した性犯罪の解決にとって大きな障壁となっていた。そこで我々は、「毛髪には薬物を摂取した履歴が残る」という特徴に着目し、睡眠薬摂取後日数が経過した場合でも毛髪からの薬物摂取証明が可能な分析法の確立をめざした。毛髪を試料とした薬物分析では、摂取した時期に相当する毛髪の部位が残存していれば、摂取証明が可能である。しかし、我々が目指していた睡眠薬の分析では、摂取量が極めて少ない上に、性犯罪等への悪用を想定していることから 1 回の摂取が想定される。そのため、毛髪中の含有量は極めて少ないことが予想され、超微量分析が可能な高感度機種が必要であった。我々は、平成 24 年に大阪府に脱法ドラッグ条例が制定され、その際当時世界最高感度の LC/MS/MS を導入できたことを機に、毛髪の前処理法を検討すると共に、カラムや配管の内径を細くする、高感度エレクトロードを使用するなど機器の高感度化に取り組み、我が国で市販されている睡眠薬のほぼ全てを対象とする毛髪中睡眠薬の分析法を確立した。現在ではその手法を利用し、多くの性犯罪の解決に貢献している [1)]。

一方、このような毛髪中睡眠薬分析の中で、超高感度分析であるが故のリスクも見えてきた。MS の感度が飛躍的に向上してくると、これまで汎用型の装置を使用した MS では見えなかったものが見えてくる。それが分析に大きな影響を及ぼし、場合によっては誤判定、更には冤罪にまで発展する危険がある。今回我々は、毛髪中睡眠薬の分析の際、睡眠改善薬として市販され、性犯罪にも使用される可能性のあるジフェンヒドラミンのごく微量のコンタミネーションに遭遇し、その由来が移動相であることを特定すると共に、ディレイカラムを用いることでその影響を回避し得た [2)]。

このように MS の高感度化はこれまで不可能であったことを可能にしてきた。しかしそこで見えてくるものは見たい物ばかりではない。本セミナーでは、MS による毛髪中睡眠薬分析を中心に、超高感度分析の効果とそこに潜む危険について実例と共に紹介する。

【参考文献】1) 志摩典明，片木宗弘．性犯罪における毛髪中睡眠薬の鑑定．法科学技術．2021 ; **26** : 137．2) 新田篤志，志摩典明，片木宗弘．高感度分析に忍び寄る水の脅威．ぶんせき．**2022**, 9-13.

E-mail: munehiro.katagi@ompu.ac.jp

L-2

# マルチリフレクティングTofを搭載したSELECT SERIES MRT四重極-飛行時間型質量分析計

〇窪田 雅之

日本ウォーターズ株式会社クリニカル事業部

## Waters SERECT SERIES MRT Q-Tof Equipped with Multi-Reflecting Device

○Masayuki Kubota

Nihon Waters K.K.

ウォーターズは四重極 - 飛行時間型質量分析計をいち早く上市し、発展をリードしてきました。Tofの性能は半導体技術の発展とともに性能が向上すると言われています。確かに、上市当初はADコンバータの時間分解能が十分ではなく、定量分析に重要なビット数も低いものでした。これが、現在では実用的には十分な質量分解能と、タンデム四重極質量分析計に及ばないまでも十分な定量性を有しています。ここでさらなる進化のためにもうひとつ、ブレイクスルーとなる技術が要望されている中で、私たちはマルチリフレクトロンTofを搭載したQ-Tofを上市しました。本講演では、Tofの原理をおさらいして、そこからマルチリフレクトロンの利点、特長をデータを交えて紹介します。

Tofの質量分解能はドリフト長に依存しており、長くなればなるほど分解能は向上しますが、装置の大きさに制限され、これまでの市販装置では分解能性能は頭打ちとなっていました。また，無電位のドリフト空間内では、イオン間のクーロン反発力によって拡散が生じるので、ドリフト長を単純に長くしても計算通りに分解能が向上しないという原因もあります。この課題を解決し、分解能を向上させる技術として、今回、MRT（Multi Reflecting Time-of Flight）技術を紹介します。この技術はドリフト空間内でリフレクターによって何度も反射させることによってドリフト長を最大47mにする技術です。リフレクターによってイオンの拡散が抑えられるので、分解能の低下を低減することが出来ます。結果として、この装置の質量分解能は200,000（20万FWHM）という上市されているTof製品では最も高い性能を発揮します。質量精度は500ppb以内（内標準物質使用時）と、MSの基本性能も大きく向上しています。この装置は当初はMALDI専用機として上市しましたが、現在は大気圧イメージング技術のDESI、そして通常のESIを用いたLC-MSを切り替えて使用でき、MSとしての高性能と分析法の柔軟性を併せ持っています。

E-mail: masayuki_kubota@waters.com

L-3

# LC/MS/MSメソッドパッケージ・試薬キットDOSIシリーズご紹介

〇渡辺 淳，箕畑 俊和

株式会社島津製作所

## Introduction of LC/MS/MS Method Package and Reagent Kit DOSI Series

○Jun Watanabe, Toshikazu Minohata

Shimadzu Corporation

島津製作所では、LC/MS/MSを簡便に導入いただくために、アプリケーションベースでメソッドを提供しているたくさんのメソッドパッケージや様々な用途向けの試薬キットDOSIシリーズを販売しております。

今回は、メソッドパッケージの最新情報、およびDOSIシリーズのご紹介をいたします。

LC/MS/MS MRMライブラリ　トリグリセリド

これまで、脂質メディエーター、リン脂質、胆汁酸といった脂質成分を分析するメソッド製品を販売してきましたが、今回紹介するのは、血漿中のトリグリセリド（TG）のプロファイリングを目的としたMRMライブラリです。1分析11分で血中トリグリセリド47種を測定でき、前処理方法の実例が紹介され、また、トリグリセリドの帰属をサポートするリファレンスブックも収載されています。ここでは、本ライブラリについての詳しい情報、分析事例をご紹介いたします。

LC/MS/MS用試薬キット「DOSIMMUNE」「DOSIMYCO」「DOSINACO」

今回、LC/MS/MS用免疫抑制剤分析キット「DOSIMMUNE」「DOSIMYCO」と抗凝固薬分析キット「DOSINACO」を紹介します。DOSIMMUNEは全血中の免疫抑制剤4種（タクロリムス、シクロスポリンA、エベロリムス、シロリムス）、DOSIMYCOは血漿中のミコフェノール酸、DOSINACOは9種類の抗凝固薬の濃度を調べる際に必要な試薬、移動相、カラムなどをオールインワンに揃えたキットです。個別に試薬を購入したり、調整したりという手間が省けるため、病院の臨床検査部や薬剤部、大学医学部、臨床検査会社などで実施されている業務の効率化につながります。さらに全自動LC/MS前処理装置と組み合わせることで、採血管をそのままセットするだけで前処理と分析が全自動で行われます。前処理によるミスやばらつき、感染リスクを低減でき、安全で迅速簡便なワークフローを実現します。

本セミナーでは、これらの製品のほか、LC/MS製品や試薬キットなどの最新情報もいろいろとご紹介いたします。乞うご期待ください。

E-mail: jun_wtnb@shimadzu.co.jp　minohata@shimadzu.co.jp

# 講演要旨

## テクノロジーフォーラム

T-1-1

# timsTOF HTで実現できるハイスループット・4D-プロテオミクス

○坂本 太郎

ブルカージャパン株式会社

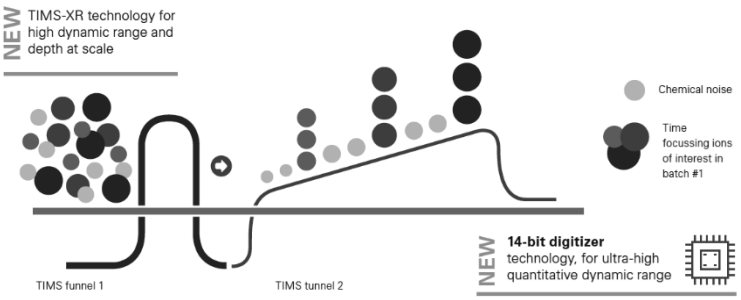
## Expanding the Capabilities of High-Throughput, 4D-Proteomics

○Taro Sakamoto

Bruker Japan K.K.

timsTOF は、QTOF型質量分析計の前段にイオンモビリティデバイスであるTrapped Ion Mobility Spectrometry（TIMS）を配置しており、HPLCの保持時間ならびにm/zによる分離に加え、イオンモビリティにより分子の形状による分離が可能となります。TIMSの心臓部であるデュアルTIMSカートリッジでは、前方でイオンの濃縮を、後方でイオンの分離を行うことで、イオンを損失することなく100%に迫るイオンの利用効率を実現しています。このTIMSの特徴を最大限に活用したMS/MS測定であるParallel Accumulation SErial Fragmentation（PASEF）は、時間的、空間的に濃縮されたイオンを観測することで、これまでにない高感度・高分解能・高速MS/MSを可能にします。

このたびブルカーは、第4世代のTIMS-XRカートリッジと先進のデジタイザー技術を搭載したtimsTOF HTをリリース致しました。timsTOF HTでは、これまでの10倍のイオンキャパシティーを持つTIMS-XRカートリッジと14bit digitizerにより、細胞や組織の定量プロテオミクスにおける幅広いダイナミックレンジと分析深度を実現します。本テクノロジーフォーラムでは、この新しいtimsTOF HTと、それがもたらすハイスループットな4D-プロテオミクスについてご紹介致します。



timsTOF HT

E-mail: taro.sakamoto@bruker.com

T-1-2

# 安定同位元素標識化合物を利用した$^{13}$Cフル置換抗生物質の供給へ

○井之上 浩一[1]，原田 修一[2]

[1]立命館大学，[2]林純薬工業株式会社

# Stable Isotope Labeling Technique in Bacteria Culture for the Providing $^{13}$C-Full Antibiotic Regents

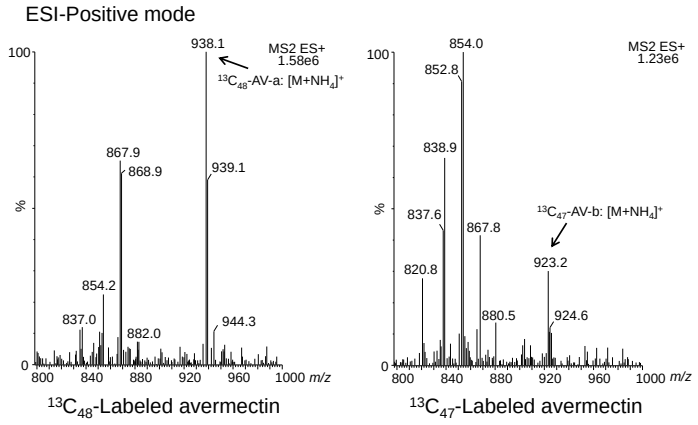
○Koichi Inoue[1], Shuichi Harada[2]

[1]Ritsumeikan University, [2]Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd

安定同位元素標識体の標準品は、質量分析を用いた定量解析には欠かせないものとなり、医薬品を含めて様々な試薬類が市販されている。実際には、その殆どが化学合成による重水素置換が主となっている。一方で、化学合成が難しい（もしくは多段階が必要な）化合物では未だ十分な供給には至っていない。特に、抗生物質は構造が複雑であるうえ、不安定もしくは異性体混合物などの問題もあり、化学合成による安定同位元素標識体の安定的な供給は困難を極めている。そこで、我々は共同研究のもと、生合成による安定同位元素標識体の抗生物質合成を検討し始めた。

今回、テクノロジーフォーラムでは、「$^{13}$C置換のアベルメクチン標準品の生合成」について紹介する。アベルメクチン（Avermectin）は、16員環ラクトン（マクロライド）化合物の一群であり、駆虫活性や殺虫活性を有し、主にアバメクチン$B_{1a}$とアバメクチン$B_{1b}$の異性体混合化合物である。構造はいずれも複雑で、化学合成による安定同位標識標識を体供給するのは難しい。そこで、安定同位元素標識体を栄養源とする培養技術を用いて、主要な2成分(B1a、B1b)を$^{13}$C-フル置換として

獲得することができ、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法の定量解析へ応用することも可能であった。本技術は、様々な抗生物質、生体内因性物質などへ応用でき、幅広い供給体制を整えていくことを目指している。




参考文献：Beppu K, *et al.*, *Anal. Sci.* 37, 1385-1390. (2021)

E-mail: s-harada@hpc-j.co.jp

T-1-3

# 最新！ 四重極飛行時間型質量分析計 LCMS-9050ご紹介

〇渡辺 淳，遠山 敦彦

株式会社島津製作所

## Introduction of Quadrupore Time-of-Flight Mass Spectrometer LCMS-9050

○Jun Watanabe, Atsuhiko Toyama

Shimadzu Corporation

島津製作所では、2018年にLCMS-9030で初めて四重極飛行時間（Q-TOF）型MS市場に参入しておりますが、今年6月に、その後継機種となるLCMS-9050をリリースしました。本発表ではLCMS-9050の特長をご紹介いたします。

安定した質量精度　Trusted mass accuracy

LCMS-9050は、LCMSシリーズから継承した島津独自の特許技術により、優れた質量精度を実現します。高精度温度コントロールシステムが外的要因による精密質量変化を抑制するため、質量較正を意識することなく精密質量を測定できます。

新しいアプリケーションの可能性を開く正負極性切替　Ultra-stable polarity switching

優れた質量精度を基盤として新たな独自技術を融合させることで、世界トップクラスの安定した正負極性切替を実現しました。これまでのQ-TOF分析の常識を打ち破る新技術により、まだ見ぬアプリケーションへの挑戦を可能にします。

多彩なニーズへ柔軟に対応できる拡張性　Truly versatile with flexible extensions

島津が誇る技術を結集し、多彩なオプションラインナップをご用意しました。いずれのオプションユニットも、島津Q-TOFと簡単に組み合わせたり、交換したりすることができます。基本の分析にプラスすることで、質量分析の世界がさらに広がります。

E-mail: jun_wtnb@shimadzu.co.jp　toyama@shimadzu.co.jp

T-1-4

# LC-MS/MSを活用した毛髪中ホルモンの測定

〇加藤 和彦

株式会社 あすか製薬メディカル

## A Method of Measuring Hormones in Human Hair Utilizing LC-MS/MS

○Kazuhiko Kato

ASKA Pharma Medical, Co., Ltd.

【はじめに】株式会社あすか製薬メディカルは「最新の測定技術を通して豊かな健康社会づくりに貢献する」という理念のもと、検査事業を中心に事業を展開しています。
当社は、あすか製薬ホールディングスの一員として、これまでに培われた高度な技術と豊富なノウハウを生かし、ステロイドホルモンをはじめとする生理活性物質の測定を中心に、基礎研究、臨床研究、診断などの幅広い分野への貢献を目指しております、特に当社独自の技術により精度・感度を高めた液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析（LC-MS/MS）を活用した測定法の開発により、皆様のニーズに応じた様々な検査測定を実施しております。
【新製品】2021年夏よりこの技術を活用し、毛髪中ジヒドロテストステロン（DHT）量を測定する事で、男性型脱毛症（AGA）リスク評価をお知らせするキット製品の販売を開始しました。毛髪5本を採取しキットに入っている封筒で毛髪5本を当社に郵送して頂ければ、LC-MS/MSにてDHT量を測定し4段階でAGAのリスクを評価します。各々のリスクに対応した生活習慣や薄毛対策をメールでお知らせしています。
【今後の予定】LC-MS/MSを用いる事で同様にテストステロンやコルチゾールといったステロイドホルモンの測定も可能です。毛髪中テストステロン濃度はLOH症候群の指標となることが確認されています。また毛髪中コルチゾール濃度はストレスとの関係も示唆されています。私たちは今後毛髪による非侵襲性検査により、通院せず自分の健康状態を知るサービスを広めていきたいと考えています。そのことが未病に繋がり、豊かな健康社会つくりに貢献すると確信しています。

E-mail: kato-k@aska-pharma.co.jp

T-2-1

# Waters最新のタンデム四重極質量分析計 Xevo TQ Absolute

〇窪田 雅之

日本ウォーターズ株式会社クリニカル事業部

## Waters Xevo TQ Absolute Latest Tandem Mass Spectrometer

○Masayuki Kubota

Nihon Waters K.K.

ウォーターズはこれまでのタンデム四重極質量分析計Xevo TQシリーズの最上位モデルとしてXevo TQ Absoluteを上市しました。シリーズとして装置名に Xevo が入っていますが、制御ソフトウェアから検出器までまったく新しいシステムとなっています。本講演では、従来機と何が異なるのか、データも含めて紹介します。

【 新設計の検出器 】

質量分析計にとって、イオン検出器は最重要な構成パーツのひとつです。さまざまな検出器がありますが、ウォーターズは広いダイナミックレンジと長期安定性に優れたフォトマルチプライヤを採用してきました。しかし、この検出器に到達するイオンが減衰していたり、ノイズレベルを高めてしまうバックグラウンドイオンが存在していては高感度検出は達成できません。ウォーターズはフォトマルチプライヤの直前に位置するコンバージョンダイノードの最適化を行い、この２つの課題を解決することで高感度化を実現しました。

【 装置の設置場所に柔軟性を与える小型、省電力設計 】

- 主要な競合TQMSよりも設置面積が45%小さい
- ネガティブイオン化合物で最大15倍の高感度化
- 他の主要なTQMSと比較して、電力とガスの消費量が最大50%削減され、発熱量が最大50%削減されます。
- 新しい解析プラットフォーム waters_connectを用いて定量データのレビュー時間を50%節約できます。

E-mail: masayuki_kubota@waters.com

T-2-2

# 腸内細菌とその代謝産物の相互把握による新たな研究領域への展開

〇清水 秀憲

Noster株式会社

# Expansion into New Research Areas by the Correlation Between Gut Bacteria and Their Metabolites

○Hidenori Shimizu

Noster inc.

ヒト腸管内腔には約1000種類、100兆個以上の腸内細菌が互いに共生・拮抗関係を築きながら安定したコミュニティを形成しており、この複雑な微生物群集は総称して腸内細菌叢と呼ばれている。腸内細菌の多くは偏性嫌気性菌であるため、培養が難しいことが知られているが、各々の腸内細菌（*Akkermansia*属、*Bacteroides*属、*Bifidobacterium*属、*Blautia*属、*Clostridium*属など）の培養技術を確立し、これに次世代シーケンサーを活用した腸内菌叢のメタゲノム解析を組み合わせることで、定性的かつ定量的な腸内細菌叢の解析を可能にした。また、京都大学の小川順教授、岸野重信准教授らとの共同研究により、腸内細菌には宿主と異なる脂質代謝経路が存在し、食事由来の脂質からヒトにはつくれない特異な脂質代謝物が産生されることを発見している。これら腸内細菌が作る脂質代謝物が、ヒトの健康にもかかわる多様な生理活性を有していることを見出しており、腸内細菌の脂質代謝物ライブラリーを構築することで、これら代謝産物を網羅的に解析することを可能にした。これにより、腸内細菌およびその脂質代謝物の解析を組み合わせることで、腸内細菌叢と宿主における脂質代謝相互作用と健康状態や病態への寄与・関連性を見出す研究を推進することが可能となり、現在では各研究機関との共同研究を順次進めている。本セミナーでは、我々が開発した腸内細菌叢およびその代謝産物の解析方法および今後の展望について紹介する。

E-mail: h.shimizu@noster.inc

T-2-3

# 分析の次の一手、多孔質グラファイトカーボンカラム

○松島 江里香，植田 泰輔

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社

# Next Steps in HPLC Analysis, Porus Graphite Carbon Columns

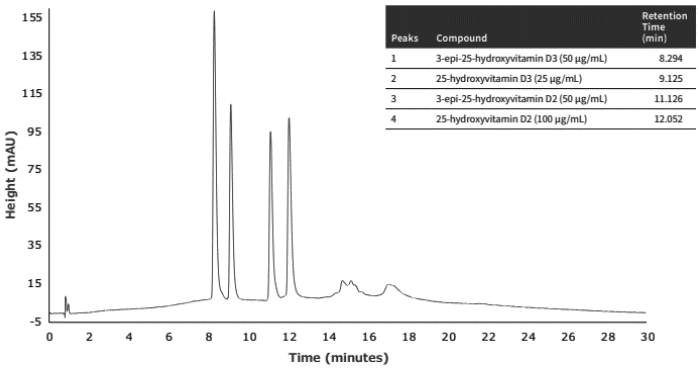
○Erika Matsushima, Taisuke Ueda

Sigma Aldrich Japan G.K.

【要旨】

多孔質グラファイトカーボンカラムは汎用的なシリカゲルもしくはポリマーを基材とした化学結合型充填剤を利用したカラムとは異なる保持挙動を示し、耐圧性、化学的、高温安定性に優れている特性がある。弊社のSupelカーボンLCカラムは独自の保持機構（PREG（Polar Retention Effect on Graphite））で親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）条件下で極性化合物や帯電化合物を保持することが可能で、この機構による幾何異性体の分離も可能となる。

Supel™ カーボンLCの優れた分離能を示すアプリケーションの1つに、ビタミンD2およびD3代謝物の分離がある。これらの代謝物は極性が高く構造的に類似しているため、従来のシリカベースの逆相カラムでは分離が困難であったが、Supel™ カーボンLCカラムは4種のビタミンD関連物質をきちんと分離することができた。




| Peaks | Compound | Retention Time (min) |
|---|---|---|
| 1 | 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 (50 µg/mL) | 8.294 |
| 2 | 25-hydroxyvitamin D3 (25 µg/mL) | 9.125 |
| 3 | 3-epi-25-hydroxyvitamin D2 (50 µg/mL) | 11.126 |
| 4 | 25-hydroxyvitamin D2 (100 µg/mL) | 12.052 |

測定条件:

HPLC カラム: Supel Carbon LC, 10 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 μm

移動相溶媒: [A] 2-Propanol; [B]Tetrahydrofuran

グラジエント条件:

0% B to 70% B in 15 min; hold at 70% B for 5 min

流速: 0.3 mL/min

カラム温度: 25℃　検出器: UV 275 nm　注入量: 2.0 μL

分析サンプル:Vitamin D2 and D3 metabolites mix, varied concentration, ethanol

E-mail: erika.matsushima@merckgroup.com

T-2-4

# 安定同位体標識試薬のご紹介

〇谷 日向子，池田 明夏里，田邉 芽衣
大陽日酸株式会社

## Introduction of Stable Isotope Products

○Hinako Tani, Akari Ikeda, Mei Tanabe
TAIYO NIPPON SANSO Corporation

弊社では、各種安定同位体（D、13C、15N、18O）標識試薬を豊富に取り揃えています。この度は、自社開発した質量分析用試薬を中心にご紹介いたします

1. 安定同位体標識タグ試薬（誘導体化試薬）

「Py-Tag®」試薬は、一級アミノ基を特異的に誘導体化する質量分析用試薬です。ドーパミン等のモノアミン神経伝達物質やヒスタミンを含む不揮発性アミンのLCMS分析、イメージングMS用の誘導体化に最適な試薬としてご利用いただけます。さらに、タンパク質やペプチドのリジン残基側鎖のアミノ基の高効率な誘導体化も可能です。その他、プロテオーム解析における還元ジメチル化に使用する重水素標識ホルムアルデヒドなどの各種誘導体化試薬も取り揃えております。

2. 質量分析用安定同位体標識カクテルシリーズ

「質量分析用安定同位体標識カクテルシリーズ」は、安定同位体標識化合物を混合した試薬です。アミノ酸や有機酸の定性・定量分析に最適な試薬としてご利用いただけます。選択反応モニタリング（Selected reaction monitoring : SRM法）に必要な「プリカーサーイオン、プロダクトイオン情報」などと共にご提供しております。

3. 安定同位体標識タンパク質合成キット「無細胞くん®」

「無細胞くん®」に、各種安定同位体標識アミノ酸を添加することで目的とする安定同位体標識タンパク質・ペプチドが簡単に合成できます。プロテオーム解析などにご利用いただけます。

4. Water-$^{18}$O 、酸素- $^{18}O_2$ その他$^{18}$O標識化合物

自社製造のWater-$^{18}$O 、酸素- $^{18}$O2品やその他$^{18}$O標識化合物（塩酸 - 18O、リン酸-$^{18}O_4$等）は、内部標準物質やトレーサー解析にご利用いただけます。

E-mail: tanih.qjl@tn-sanso.co.jp

# 一般社団法人　日本医用マススペクトル学会認定

# 第10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「医用質量分析認定士」制度をスタートさせ，今回は，第10回目の講習会・認定試験となります．質量分析に関係する各分野の方々のご参加をお待ちしております．

**形式**　：オンライン形式

**日時**　：講習は2022年9月2日 (金) ~ 10日 (土) に行います (オンデマンド形式).
試験は2022年9月10日 (土) 13:15 ~ 14:00に行います．

**受講登録方法**

第47回日本医用マススペクトル学会年会ホームページより講習会登録申込書をダウンロードし，必要事項を記入の上，メールにてお申し込みください．
※メール送付先 (年会事務局) ：jsbms47th@gmail.com
受講申込者に講習の動画が視聴できるパスワードを送付します．
※申込締切：2022年9月1日 (木)

**受講料** (資料代を含む)

年会参加あり：3,000円
年会参加なし：5,000円
※受講料振込締切：2022年9月2日 (金) 15:00

**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を受講し，認定試験に合格すること

**プログラム**

9月2日 (金) ~ 10日 (土)　**講習会** (オンデマンド形式)

講義1：基礎

中山 憲司 (新潟医療福祉大学)

講義2：臨床微生物検査領域における質量分析

橋本 優佑 (国際医療保健福祉大学)

講義3：臨床化学関連

中川 央充 (慶應義塾大学病院)

講義4：代謝異常症関連

小林 弘典 (島根大学医学部附属病院)

講義5：薬物分析と質量分析　– クロマト分離法による薬物分析 –

五十嵐 一雄 (医薬分析協会)

9月10日 (土) 13:15 ~ 14:00　**認定試験**

**合否発表**

JSBMS Letters Vol.47 No.3に掲載予定です.

**試験に関する注意事項**

✧ 受講者には事前に受講者専用WebページのURL・ログインPWを別途お知らせします. 10日 (土) 13:15になりましたら, 前述Webのページ内「認定試験を受ける」ボタンをクリックし，必要事項を記入の上，解答を開始してください．問題数は40問，試験時間は45分です.

✧ 万が一，認定試験問題にアクセスできない場合は，年会事務局まで至急メールにてご連絡下さい.

✧ 全問解答できない場合でも, 14:05までに送信ボタンを押し認定試験を完了して頂きますようお願いいたします．それ以降に送信されても，ファイルを受け取ることはできませんのでご注意ください.

**第47回日本医用マススペクトル学会年会事務局**

〒278-8510　千葉県野田市山崎2641 東京理科大学薬学部 臨床分析科学研究室内

事務局：東 達也，楠瀬 翔一

TEL：04-7121-3660 (東 達也)　　E-mail：jsbms47th@gmail.com

**年会ホームページ**

講習会登録申込書のダウンロードはこちらからお願いいたします.

https://jsbms47th-ridai.jimdofree.com/

# 学会賛助会員一覧

# (2022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

ブルカージャパン株式会社

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

日本疾患メタボローム解析研究所

(12社)

# 年会　協賛企業一覧

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，ランチョンセミナー, 展示, 広告掲載のご支援を賜りました. この場を借りて心より御礼申し上げます.

あすか製薬株式会社

株式会社 あすか製薬メディカル

株式会社 エービー・サイエックス

O-Force合同会社

一般財団法人 化学物質評価研究機構

株式会社 玄米酵素

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社

株式会社 島津製作所

大陽日酸株式会社

日本ウォーターズ株式会社

日本電子株式会社

Noster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

(15社，五十音順・敬称略)

# ランチョンセミナー共催企業一覧

株式会社 エービー・サイエックス

株式会社 島津製作所

日本ウォーターズ株式会社

(3社，五十音順・敬称略)

# 展示企業一覧

あすか製薬株式会社

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社

株式会社 島津製作所

大陽日酸株式会社

日本ウォーターズ株式会社

Noster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

(8社，五十音順・敬称略)