

○新井 浩司, 新田 真一郎, 若林 弘樹, 上田 哲也
(株式会社LSIメディエンス)

要約

プロスタグランジンに代表される多価不飽和脂肪酸 (PUFA*) 代謝物は、炎症反応等の様々な生理調節機構に複雑に関与しており、創薬の薬効評価マーカーとしても大変良く知られている。

一般的にバイオマーカーの定量分析において「サンプルの質」が評価を左右する重要なファクターであるが、その中でも溶血は、見た目でも溶血の強さをある程度判断可能で、かつ、サンプルの質に影響を及ぼす可能性がある現象であるが、その確認は目視で行われるため、溶血強度の判定は大きく個人の感覚に頼ることとなり定量性に欠けるものである。そこで我々は、溶血の程度によるバイオマーカーの定量値への影響を評価することを目的として、開発したLC-MS/MSを用いたPUFA代謝物の一斉定量分析法を用いて、血漿中ヘモグロビン値及びPUFA代謝物の定量分析を実施し、それぞれの定量値を比較し評価を行った。 (*Polyunsaturated fatty acid)

方法

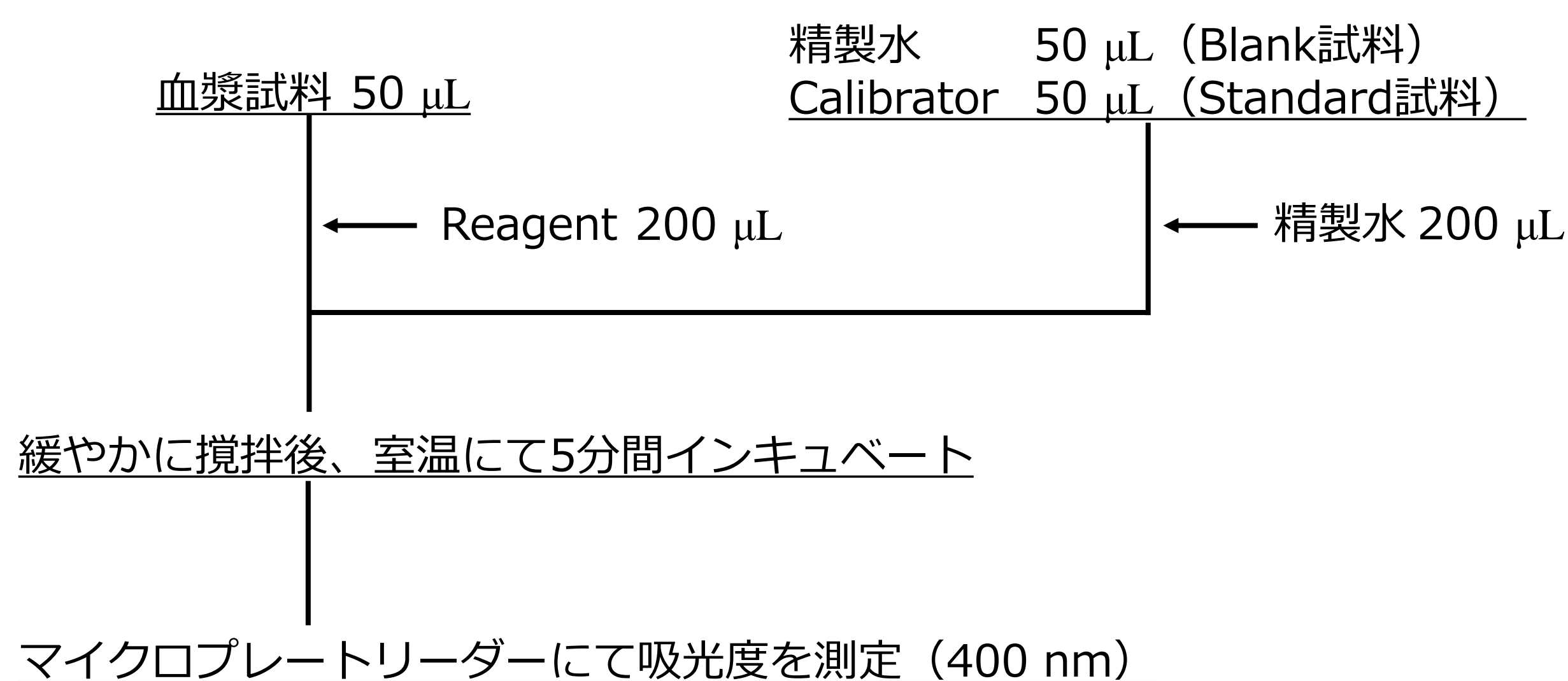
【溶血ヒト血漿の調製方法】

| サンプル名 | 血液から血漿分離までの手順 |
|----------------|---|
| コントロール (未溶血血漿) | 遠心分離のみ |
| Test-1 | 素早く20回転倒混和後、遠心分離 |
| Test-2 | 約30秒間攪拌後、遠心分離 |
| Test-3 | 約2分間攪拌後、遠心分離 |
| Test-4 | 約2分間攪拌し、約30秒間超音波処理後、エタノール1 µL*添加し、数秒攪拌後、遠心分離 (血液に対して約0.17%) |
| Test-5 | 約2分間攪拌し、約30秒間超音波処理後、エタノール 5 µL**添加し、数秒攪拌後、遠心分離 (**血液に対して約0.83%) |

血液採取 (男性3名) 後、600 µLずつ小分けし、上記手順を実施 (各試料 n=3)

【ヘモグロビン濃度測定法】

使用キット: QuantiChrom™ Hemoglobin Assay Kit (BioAssay Systems)



【PUFA代謝物一斉分析法概要】

| 項目 | 内容 |
|-----------|--|
| 前処理法 | 固相抽出 |
| 測定法 | LC-MS/MS |
| 使用機器 | LC: UFLC _{XR} (島津製作所) MS: QTRAP 5500 (AB SCIEX) |
| 対象マトリックス | 血漿 (抗凝固剤: EDTA-2K) |
| マトリックス使用量 | 50 µL / 1 assay |
| 測定対象成分 | 68成分の同時定量 Prostaglandin類、Thromboxane類、Leukotriene類 HETE類、HEPE類、HDHA類及びそれぞれの代謝物 |

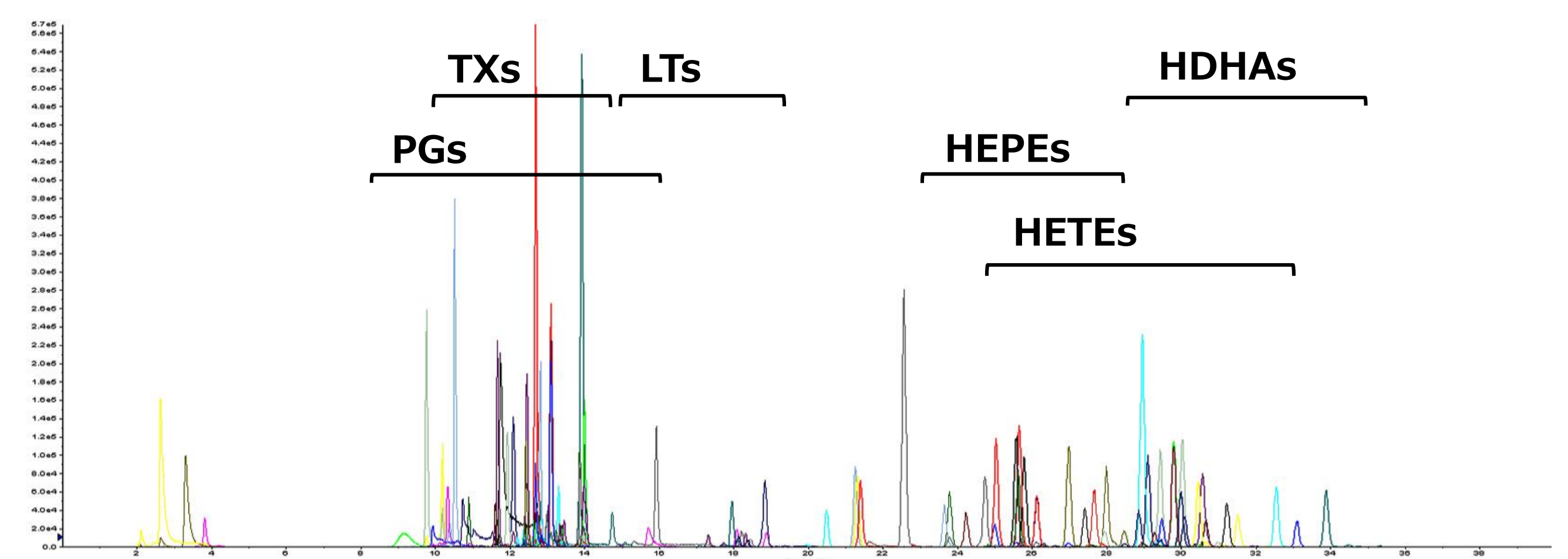


Fig. 1 PUFA代謝物一斉分析法クロマトグラム

PUFA代謝物68成分. 各成分のReference standardを混し、測定したクロマトグラム.
PG: Prostaglandin, TX: Thromboxane, LT: Leukotriene,
HETE: Hydroxy-eicosatetraenoic acid, HEPE: Hydroxy-eicosapentaenoic acid
HDHA: Hydroxy-docosahexaenoic acid

結果

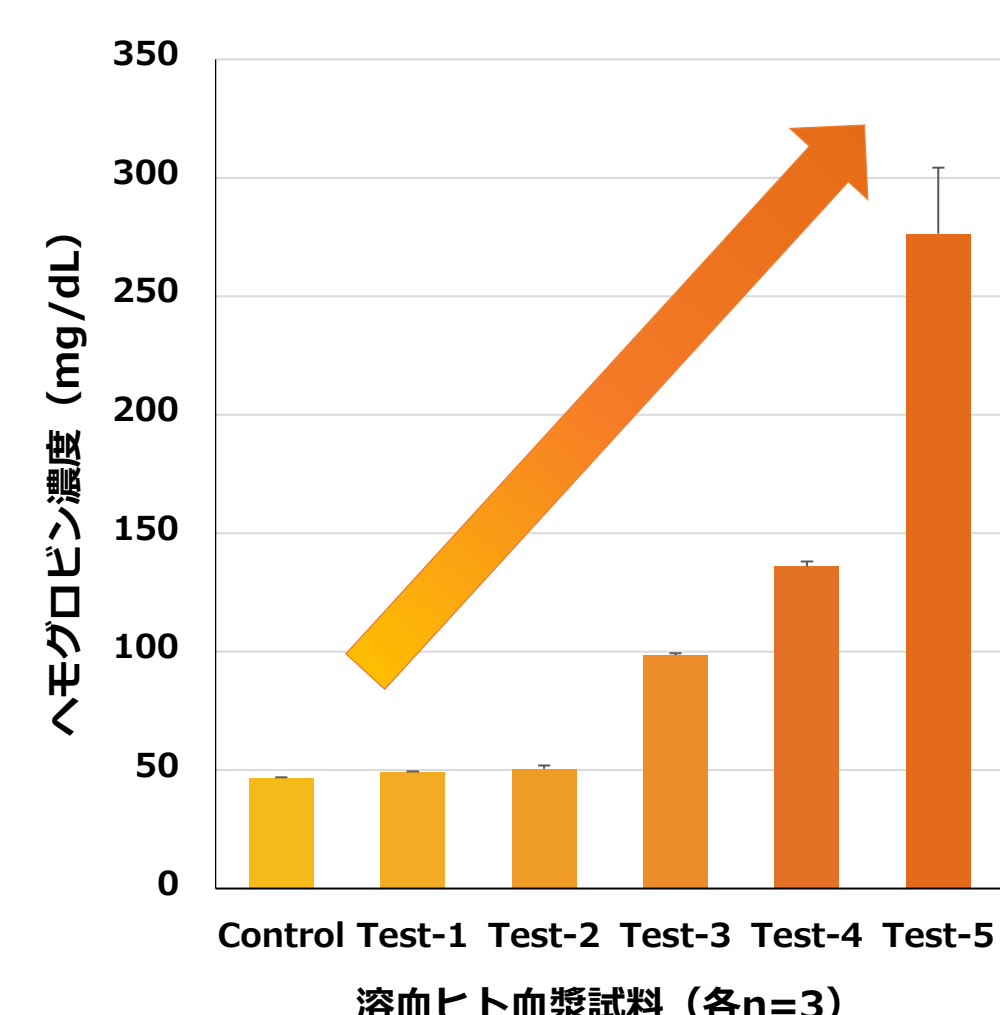
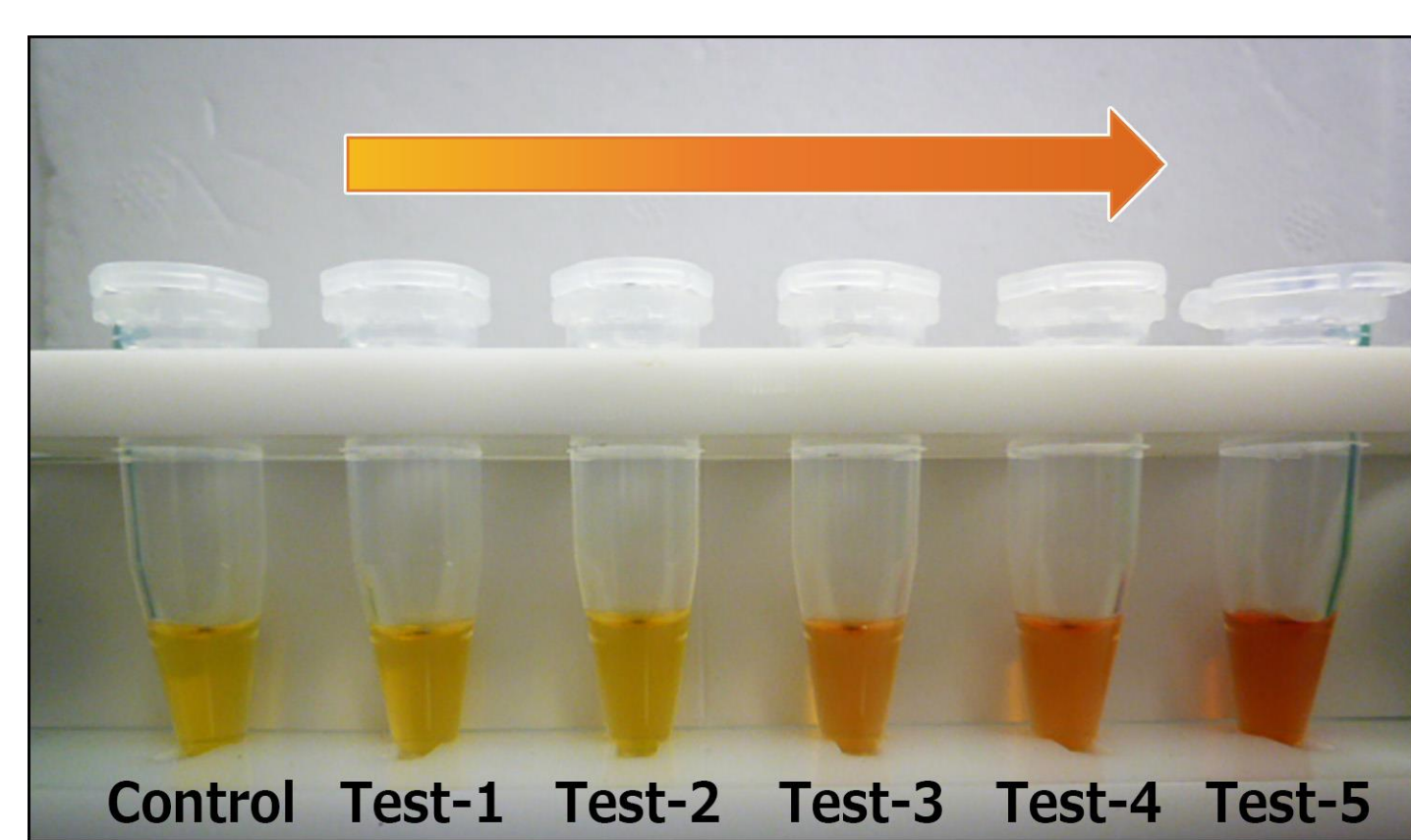


Fig. 2 人為的に溶血させたヒト血漿及びヘモグロビン濃度

個体 No.3 のコントロール血漿及び人為的に溶血させた血漿の画像及びヘモグロビン濃度値. ヘモグロビン濃度値が100 mg/dL付近 (Test-3) から目視でも色の変化が認識できた。

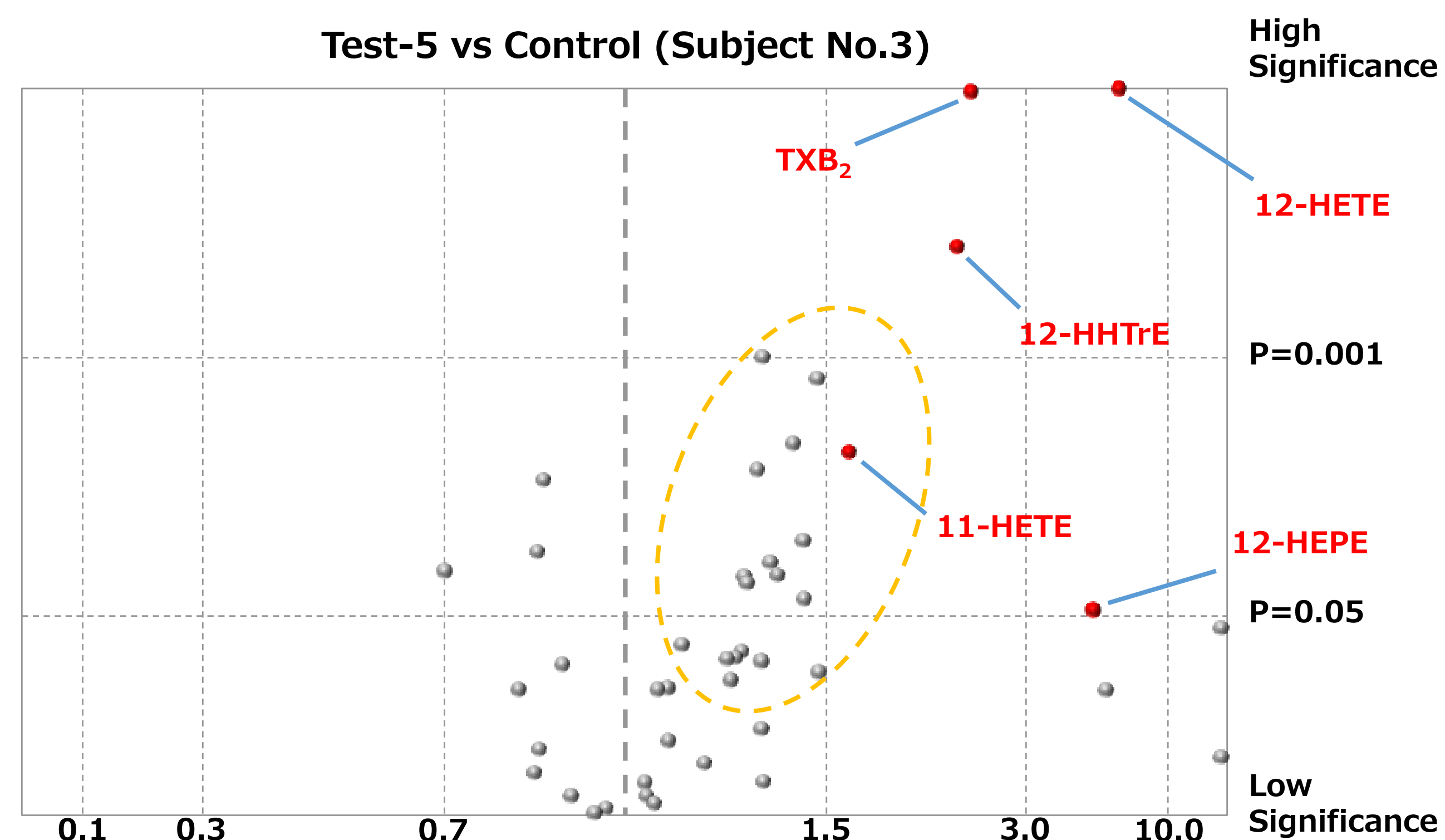


Fig. 3 コントロール血漿と溶血ヒト血漿中PUFA代謝物濃度の比較 (volcano plot)

個体 No.3 のコントロール血漿及び最もヘモグロビン濃度が高かったTest-5の血漿の比較. 全体的に上昇傾向にあることが確認された. ●はコントロールに対して大きく上昇した成分. HHTrE: Hydroxy-heptadecatrienoic acid

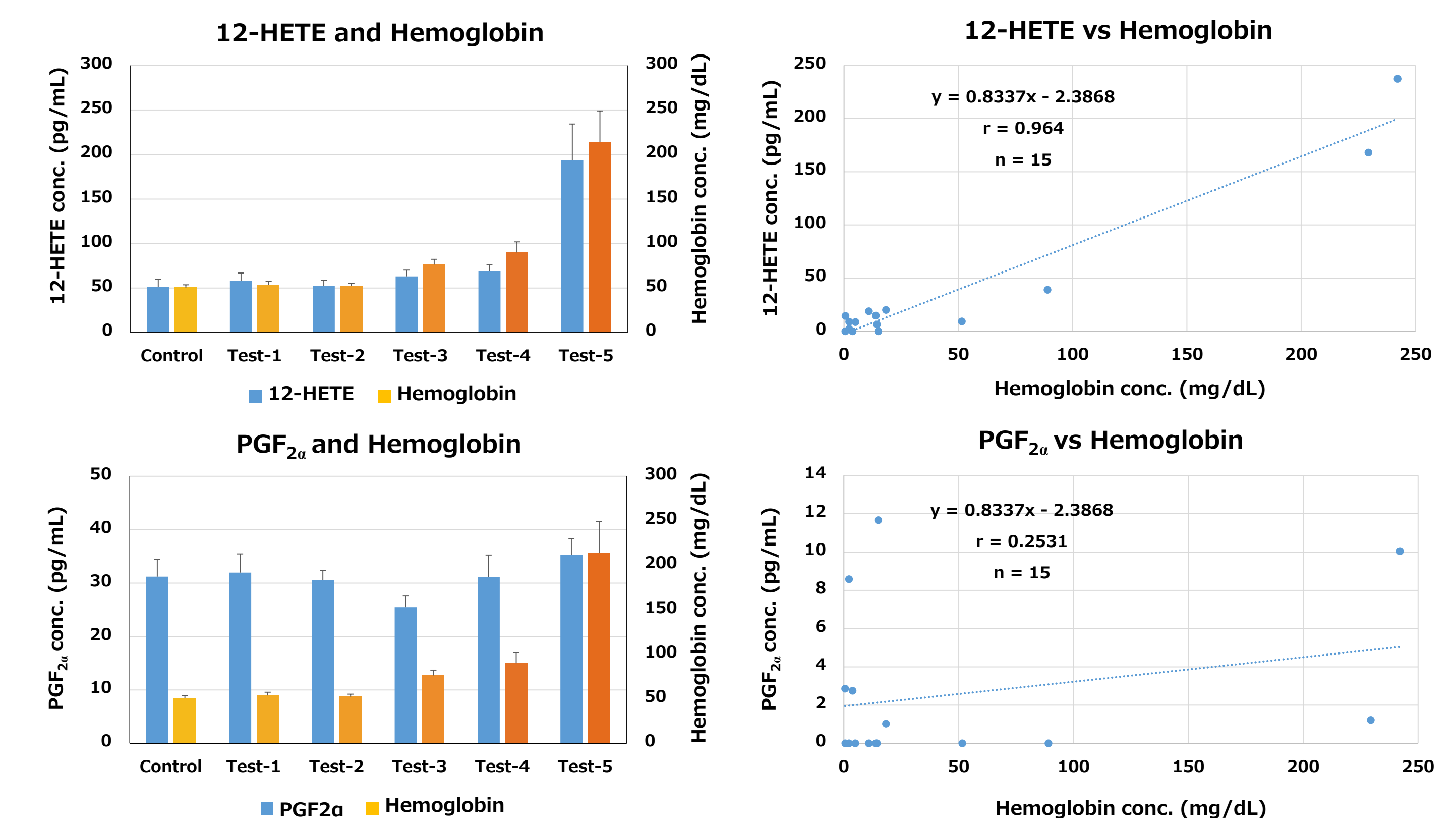


Fig. 4 PUFA代謝物濃度とヘモグロビン濃度の関係

ヘモグロビン濃度値と相関が認められる成分 (上段) と変化のない成分 (下段) が確認された. (上段) 12-HETE の濃度値とヘモグロビン濃度値のグラフ (下段) PGF_{2α} 濃度値とヘモグロビン濃度値のグラフ

考察

- ✓ LC-MS/MS法を用いたPUFA代謝物一斉分析法により、未溶血のヒト血漿、人為的に溶血させたヒト血漿中のヘモグロビン濃度、及び各種PUFA代謝物濃度を比較した。
- ✓ その結果、多くの成分では大きな変化は認められなかったものの、12-HETEや12-HEPEなど、一部の成分でヘモグロビン濃度値と相関が認められた。また、明らかな溶血と判断可能な試料 (Fig.1のTest-5) においては、PUFA代謝物濃度は概ね上昇傾向にあることが示唆された。
- ✓ バイオマーカー分析の解析時においては、溶血試料にはしばしば注釈が付されて解析から除外されていることが見受けられるが、除外するか否かは試料を目視で判断している場合がほとんどであると推察される。
- ✓ 今回の結果より、事前にその影響の有無を確認し、ヘモグロビン濃度値を測定することで、溶血が疑われる血漿試料を予め測定対象から除いたり、解析対象からの除外基準を設けるなど、解析結果の信頼性を向上させる一つの手段となり得ると考えられた。