

主論文の要旨

**One-Pot Extraction and Quantification Method for
Bile Acids in the Rat Liver by Capillary Liquid
Chromatography Tandem Mass Spectrometry**

ラット肝臓中胆汁酸のワンポット抽出法および
キャピラリー液体クロマトグラフィータンデム質量分析を
用いた胆汁酸定量方法の構築

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
社会生命科学講座 法医・生命倫理学分野

(指導：石井 晃 教授)

浅野 友美

【緒言】

胆汁酸は脂質の消化吸収を助ける一方、界面活性作用により毒性を示す種もあり、特に肝臓における胆汁酸の蓄積や組成変化は慢性肝疾患のリスクファクターにもなるため、胆汁酸分析法の構築は肝疾患の病態解析に不可欠である。しかし、生体内の胆汁酸には多くの異性体が存在するため、胆汁酸の同定のためには高い分離能を有する手法を用いる必要がある。そこで本研究では、高分離能を有し、高い同定能力を持つ capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry (cLC/MS/MS) を用いたラット肝臓中胆汁酸の新規分析法の構築を試みた。また、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルラットに本法を適用し、その有用性を検証した。

【方法】

分析装置は nano LC システム Dina-2A (KYA tech) および 4000QTRAP (Sciex) を用いた。対象胆汁酸は市販購入可能な遊離胆汁酸 8 種、グリシン抱合型胆汁酸 6 種、タウリン抱合型胆汁酸 8 種の計 22 種とし、内部標準として 4 種の安定同位体標識胆汁酸を用いた (Table 1)。

まず初めに、MS/MS 条件および cLC 分離条件の最適化およびラット肝臓中胆汁酸の抽出条件の検討を行った。次に、肝臓中の内因性胆汁酸を活性炭処理により除去した肝臓ブランク溶液を作成し、これに胆汁酸標準品を添加することで検量線の作成およびメソッドバリデーションを実施した。メソッドバリデーションでは、既知濃度の試料 QC1 として 100 ng/g liver、QC2 として 750 ng/g liver を用いた。

脂肪肝および肝線維化病態を呈する NASH モデルラットは、SHRSP5/Dmcr ラットに高脂肪・高コレステロール (HFC) 食を 8 週間摂取させ作成した (NASH 群)。また、コントロール食を与えたラットを normal ラットとして対照に用い (normal 群)、両群の肝臓中胆汁酸の定量を行うことで分析法の有用性を検証した。

【結果および考察】

cLC/MS/MS 条件の最適化

最適化した MS/MS パラメータの結果は Table 1 に示した。cLC 分離条件の検討では、酢酸アンモニウム (NH₄OAc)―メタノール (MeOH) 系と NH₄OAc―アセトニトリル (ACN) 系の移動相での分析を比較したところ、NH₄OAc―MeOH 系の移動相による、57 分のグラジエント溶出で各胆汁酸を良好に検出できた。最適条件下での胆汁酸標準品の分析結果を Figure 1 に示した。

ラット肝臓中胆汁酸の抽出方法の検討

従来のラット肝臓中胆汁酸の抽出方法は、50%MeOH で肝臓をホモジナイズにより抽出後、アルカリ性 ACN を加え、脱塩・除タンパクを行っており、2 段階の処理が必要であった。本研究では、抽出と脱塩・除タンパクを 1 つの容器すなわちワンポットで行う方法を検討したところ、MeOH/ACN 混液による抽出で、従来法と同等、最大で

2 倍程度の高い回収率が得られた。これにより、ラット肝臓中胆汁酸の効率的な抽出が可能となった。

メソッドバリデーション

メソッドバリデーションの結果を Table 2 に示した。最終的に用いる NASH モデルラットの肝臓を事前にプレ分析したところ、normal 群、NASH 群の肝臓からはリトコール酸(LCA)は検出されなかったため、LCA はメソッドバリデーションの対象から外した。

検量線は、2.5-1000 ng/g liver の範囲で、概ね良好な直線性($r^2=0.990-0.999$)を示した。検出下限(LOD)および定量下限(LOQ)は、それぞれ 0.9-10 および 2.3-27 ng/g liver であり、高感度な胆汁酸一斉分析が可能であることを示した。マトリックス効果は、ほとんどの胆汁酸で 80%以上であったが、一部の遊離胆汁酸ではわずかに低値を示した(約 70%)。回収率は概ね 80%以上の良好な値であったが、ケノデオキシコール酸(CDCA)、デオキシコール酸(DCA)、グリコ(G-)LCA、タウロ(T-)LCA では僅かに低値であった(約 70-76%)。

日内および日間における確度は、それぞれ QC1 で 83.7-106、88.9-116%、QC2 で 84.0-111、84.4-130%であった。また日内および日間の精度は、それぞれ QC1 で 0.8-9.8、2.1-11%相対標準誤差(RSD)、QC2 で 0.4-12、0.9-16%RSD であった。このように QC2 における α -MCA の確度(+30%)を除き、確度は $\pm 20\%$ 、精度は 20%RSD 未満であり、本分析法の高い定量性と再現性が示された。

Normal および NASH ラットの肝臓中胆汁酸プロファイリング

本研究で構築した cLC/MS/MS 法を、NASH を発症していない normal ラットと、脂肪肝および肝線維化を発症した NASH ラットに適用し、その有用性を確認した。両群のラット肝臓中胆汁酸の定量結果を Table 3 に示した。21 種の胆汁酸が両群で検出された。これらのデータを主成分分析(PCA)したところ、PCA スコアプロット(Figure 2a)において、normal 群と NASH 群は良好に分離し、胆汁酸プロファイルが明確に異なることが示された。PCA ローディングプロット(Figure 2b)において、この群分離に寄与する胆汁酸は G-CDCA、G-コール酸(CA)や、タウリン抱合体であることが示された。さらに多重比較を考慮した有意差検定の結果、normal 群と NASH 群の間で、10 種の胆汁酸(β -MCA, G-CA, G-CDCA, T-CA, T-DCA, T-ウルソデオキシコール酸(UDCA), T-LCA, T-ヒオデオキシコール酸(HDCA), T- α -MCA, T- β -MCA)に有意な差(有意水準 0.05)が認められた(Table 3)。このうち G-CA および G-CDCA は NASH 群で有意に高く、他の胆汁酸は有意に低値を示した(Figure 3)。

これらの結果より、本分析法によりラット肝臓中胆汁酸の一斉分析が可能であることが示された。特に、低濃度胆汁酸の高精度分析により、normal 群と NASH 群の肝臓における僅かな胆汁酸組成の変化を特定することができた。

【結論】

本研究では、cLC/MS/MS を用いたラット肝臓中の胆汁酸定量法を構築した。ラット肝臓中胆汁酸は、MeOH/ACN 混液でのワンポット抽出により、簡易かつ高い回収率で抽出が可能となった。分析対象胆汁酸は、NH₄OAc—MeOH 系の移動相を用いたグラジエント溶出により、良好に検出された。また、バリデーション結果から、日内および日間の確度と精度は概ね±20%と 20%RSD 未満であり、LOD、LOQ 値からも高い定量性と再現性が示された。最後に、本法を NASH モデルラットに適用した結果、normal 群と比較し、明確な胆汁酸プロファイルの変動を確認し、10 種の胆汁酸の有意な変化を捉えた。

これらのことより、本法は、様々な疾患モデルにおける胆汁酸の病態生理学的特性の解明に役立つことが示唆された。