

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08889

研究課題名(和文) 自然毒投与ラット体内の代謝プロファイリング解析

研究課題名(英文) Metabolic profiling analysis of rat administered natural toxins

研究代表者

小川 匡之 (OGAWA, Tadashi)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：50559937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：自然毒が生体に与える影響、毒性、作用機序を明らかにすることを目的として、ラット体内の代謝プロファイリング解析に取り組んだ。当初目的とした、メタボロミクス解析とiTRAQタンパク質発現・相対定量解析の連結評価法確立には至っていないが、自然毒投与ラットに対して、GC-MS/MS、LC-QTOF-MSを用いた分析を行い、毒性作用機序が不明な自然毒の代謝プロファイリング解析を行うための基礎データの蓄積がなされた。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of clarifying influences, toxicities and action mechanisms given by administration of natural toxins in the living body, internal metabolism profiling analyses were worked on rat. Even though establishment of connected evaluation method of metabolomics analysis and iTRAQ protein expression analysis is uncompleted, various fundamental data of metabolic profiling analyses of rat administered natural toxins were obtained by GC-MS/MS and LC-QTOF-MS.

研究分野：法医学

キーワード：自然毒 GC-MS/MS LC-QTOF-MS 代謝物

1. 研究開始当初の背景

動植物の中には体内に毒成分を持つものが数多く知られており、自然毒と総称されている。毒成分は一般的には常成分であるが、成育のある特定の時期にのみ毒を産生する場合や、食物連鎖を通じて餌から毒を蓄積する場合もある。これら自然毒を含む動植物による食中毒は、細菌性食中毒と比べると件数、患者数はそれほど多いとは言えないが、例えばフグ肝臓による中毒死、トリカブトを山菜であるニリンソウと誤って中毒死した報告、スイセンをニラと間違えた例など、毎年一定数の報告はある。さらに、自然毒はフグ毒やキノコ毒のように致命率の高いものがあり、その解明は極めて重要であると考えられる。

我々は、LC-Q-TOF-MS、LC-QTRAP-MSを用いた血漿中自然毒の一斉 MS スクリーニング法を構築し、その成果を国際学会などで報告してきた。しかし、自然毒の中には構造的問題や代謝、分解速度の問題から、検出が非常に困難で、LC-MS を用いた定量が難しいものも多い。また、自然毒が生体に与える影響やその毒性は極めて多様性に富んでおり、全てが明らかになっている訳ではなく、スイセンに含まれるリコリンなど、その毒性作用機序が明らかになっていないものも多い。

一方で、近年の質量分析計の発展に伴い、オミクス研究が活発に行われている。オミクスとは、生体中に存在する分子全体を網羅的に研究する学問で、膨大なデータを採取し、多変量解析等を用いて傾向を把握し対象物質を特定する手法である。その中でも DNA、RNA、タンパク質以外の生体内代謝産物を包括的・網羅的に解析するオミクスであるメタボロミクスは、ポストゲノム時代における医学生物学研究の主要テーマの一つであり、応用範囲が多岐に渡り、例えば疾患の早期診断バイオマーカー探索から、緑茶の旨味成分の探索まで極めて幅広い。メタボロミクス分析によって、少量の血液からガン等の疾患の超早期診断、予後診断、治療効果などを予測するバイオマーカーの検索が行われ、成果を上げている。法医学分野においても、本研究分担者の財津、石井らが麻薬、覚せい剤、危険ドラッグなどの代謝プロファイリング解析を行い、興味深い知見が得られている。法医学中毒学研究において、自然毒は測定が困難な薬毒物であり、それらの代謝物の測定は中毒の判定におけるバイオマーカーの抽出と、毒性機序の解明への大きな手掛かりとなり得る。自然毒のうち、トリカブトの成分である毒性の強いアコニチン類を用いたメタボロミクス解析に関する報告はいくつかなされてはいるが、自然毒はその種類が極めて多く、研究が進んでいる状況とは言えない。

代謝プロファイリングを解析するに際し、酵素タンパクの発現を解明する事は非常に重要であるが、タンパク質定量解析に好適な安定同位体標識キットである iTRAQ 試薬を用いて、網羅的なタンパク質の発現解析とサン

プル間での比較定量解析を行うことができる。メタボロミクス分析は、代謝物の増減という測定結果の多変量解析であり、それ単体では体内代謝現象の説明が完全ではなく、代謝上流であるプロテオミクスを定量的に行うことが重要であると考えられる。また、バイオマーカーとしてタンパク質を発見する為にも、iTRAQ タンパク質発現・相対定量解析は重要であると考えられる。

2. 研究の目的

自然毒に対する代謝プロファイリング解析でメタボロミクス解析と iTRAQ タンパク質発現・相対定量解析を組み合わせた研究例はなく、本研究では、自然毒が生体に与える影響、毒性、作用機序を明らかにすることを目的として、ラット体内の代謝プロファイリングを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 自然毒一斉検出法の検討

自然毒代謝研究に着手するに先立ち、血漿中自然毒自体の検出法の検討を行った。56 種類の自然毒の血漿からの抽出を、5 種類の方法(アセトニトリル除タンパク、メタノール除タンパク、メタノール、アセトニトリル混合除タンパク、QuEChERS 法、Captiva ND Lipids)で比較した。

(2) LC-Q-TOF-MS を用いた自然毒分析法検討

植物由来自然毒であるピクロトキシンはピクロチン、ピクロトキシニンからなる分子化合物であり、セスキテルペンに属する痙攣薬のひとつである。ピクロトキシンのフラグメンテーションを LC-QTOF-MS を用いて分析方法の検討を行った。

LC は Prominence XR (島津製作所)、分離カラムは Scherzo SM-C18 (インタクト)、QTOF-MS は Triple TOF 5600 (AB Sciex) を用い、ESI 負イオン化モードで測定を行った。

(3) カエル毒同時定量分析法開発

ヤドクガエル由来のバトラコトキシンはフグ毒であるテトロドトキシンと並ぶ猛毒であるが、その毒性発現についての知見は決して多くはなく、本研究の対象毒物とする事は重要であると考えられる。バトラコトキシンの代謝プロファイリング解析に向け、まず、定量法を検討し、同じくカエル毒であるエピバチジンとの同時分析法を検討した。

アセトニトリル、メタノールを用いた除タンパクにより血漿サンプルの前処理を行い、Acquity UPLC-TQD (Waters) を用いて分析法を開発した。内部標準物質は midazolam-d4 を用いた。また、雄性 Wistar ラットにバトラコトキシン、エピバチジンをそれぞれ腹腔内投与し、投与 10 分後の血漿中濃度を測定した。

(4) GC-MS/MS を用いたカエル毒投与ラット

血漿のメタボロミクス分析

シングル GC-MS と比較して高感度な MRM 測定が可能な GC-MS/MS である GCMS-TQ8040(島津製作所)で Smart Metabolites Database を用いることで、475 成分の代謝物の高感度メタボロミクス分析が可能である。カエル由来の猛毒であるバトラコトキシンとエピバチジンをそれぞれ腹腔内投与したラット血漿中代謝物の違いについて測定を行った。採取したデータは Simca 13 (インフォコム) を用い、主成分分析、部分最小二乗判別分析などの多変量解析を行った。部分最小二乗判別分析などの多変量解析を行った。

(5) LC-QTOF-MS を用いた臓器内酵素タンパクの比較定量法検討

キノコ毒である α -アマニチン、カエル毒であるバトラコトキシンをラット腹腔内に投与し、採血後開腹して肝臓、腎臓を摘出し、 -80°C で凍結保存した。

臓器を破砕し、タンパク抽出、限外ろ過、トリプシン消化後、iTRAQ 試薬でラベリングし、陽イオン交換、脱有機溶媒、脱塩処理を行い、nano-LC に接続した Triple TOF 5600 (AB Sciex) での分析を試みた。

(6) LC-QTOF-MS を用いたラット体内アセタミプリド代謝物の経時測定

自然毒では LC-Q-TOF-MS を用いた代謝物分析が困難であるため、ラット血中に投与したネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリドおよびその代謝物の経時変化を分析した。

カニューレ処置を施した 13 週齢の Wistar 系ラットにアセタミプリド(を静脈内に投与し、投与 15 分後から 96 時間後まで経時的に血液サンプルを採取した。血漿を固相抽出 (Oasis HLB, Waters) で前処理後、Xevo G2 QTof (Waters) を用いて MS^E モードで測定した。

4. 研究成果

(1) 自然毒一斉検出法の検討

血漿中自然毒自体の検出法の検討を行った。56 種類の自然毒の血漿からの抽出を、5 種類の方法(アセトニトリル除タンパク、メタノール除タンパク、メタノール、アセトニトリル混合除タンパク、QuEChERS 法、Captiva ND Lipids)で比較し、メタノール、アセトニトリル混合液を用いての除タンパク法が最も回収率が良好である事を確認した。

(2) LC-QTOF-MS を用いた自然毒分析法検討

LC-QTOFMS を用いることで、ピクロチン(分子量 310.2992)とピクロトキシニン(分子量 292.2839)を分離、定性、定量することができた。ピクロトキシニン自体の確認はできなかったが、溶液中での解離が推測された。LC-QTOF-MS を用いて精密質量を測定することにより、代謝物を同定する有力な手法とす

ることができることが示唆された。

(3) カエル毒同時定量分析法開発

LC-MS/MS を用いたバトラコトキシン、エピバチジンの検量線はそれぞれ 2.5-250 ng/mL の範囲で良好な直線性を示し、相関係数は 0.99 以上であった。日内および日間変動は、真度では 94.7-102.3%、精度では 1.0-10.3% であった。回収率は 69.6-98.2% であり、マトリックス効果は 92.7-97.3% であった。ラットの腹腔内に投与 (各 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) されたバトラコトキシン、エピバチジンの血漿中濃度 (n=5) は、それぞれ $4.9 \pm 1.1 \text{ ng/mL}$ 、 $5.8 \pm 2.6 \text{ ng/mL}$ であった。致死量投与後の血漿中バトラコトキシン、エピバチジンを定量することが可能となり、その結果を論文として報告したが、低濃度投与時には測定が困難であり、バトラコトキシン、エピバチジン投与時の代謝プロファイリング解明の必要性が一層強く示唆された。

(4) GC-MS/MS を用いたカエル毒投与ラット血漿のメタボロミクス分析

致死量のバトラコトキシン投与後の血漿中代謝物の生成について解析を行った。475 種類の代謝物の測定データの主成分分析を行った結果、対照群では alanine、phosphoric acid、galactose が特徴的であり、バトラコトキシン投与群では 3-hydroxybutyric acid、valine、leucine、tyrosine が特徴的な成分であることが明らかになった (図 1、2)。

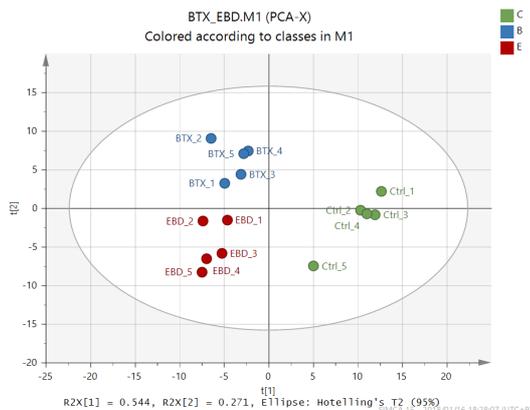


図 1. カエル毒投与ラット血漿の PCA プロット

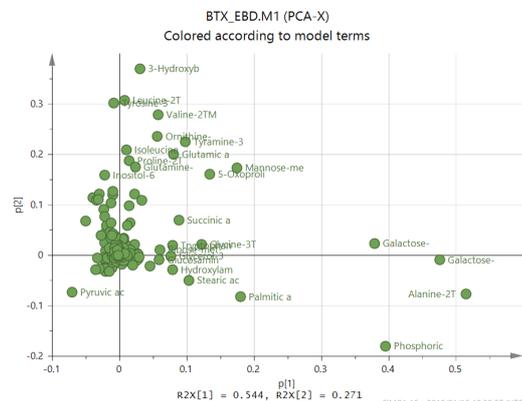


図 2. カエル毒投与ラット血漿の PCA ローディングプロット

(5) LC-QTOF-MS を用いた臓器内酵素タンパクの比較定量法検討

装置の故障など様々な要因が重なり、現時点で十分な考察を行えるだけの結果が得られてはいない。本研究期間内に得られた予備実験の知見を基に今後も実験を重ねて、継続的に研究を続ける予定である。

(6) LC-QTOF-MS を用いたラット体内アセタミプリド代謝物の経時測定

血漿中から、投与したアセタミプリドと5種類の代謝物が検出された。アセタミプリドの半減期は約4時間で、24時間後にはほぼ消失した。最も強く検出された代謝物は desmethyl 体で、投与6時間後に最大値を示し、48時間には消失していた。また、*N*-cyano-*N'*-methylethanimidamide と 6-(methylsulfanyl) nicotinic acid も同様の挙動を示した。一方、desmethyl-acetamide 体の消失時間は72時間と長くなった。LC-QTOF-MS を用いることによって、ラット血漿中におけるアセタミプリドと4種類の代謝物の経時変化を明らかにすることができた。今回の方法を応用することによって、標品の確保が難しい自然毒代謝物経時変化測定法として期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Ishii A, Zaitzu K, Kusano M, Asano T, Ogawa T, Hattori H, Seno H. Identification and quantitation of mifepristone and its *N*-demethyl metabolite in the plasma of an aborted fetus by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-Q-TOFMS) and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS). *Forensic Toxicol*, 33: 409-412, 2015. (査読有)
2. Ogawa T, Tada M, Hattori H, Shiraishi Y, Suzuki T, Iwai M, Kusano M, Zaitzu K, Ishii A, Seno H. Sensitive determination of picrotoxin by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Leg Med*, 20: 8-11, 2016. (査読有)
3. Ogawa T, Murakami K, Yoshino M. Inhibition by fructose 1,6-bisphosphate of transaldolase from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 363: fnw183, 2016. (査読有)
4. Shiraishi Y, Ogawa T, Suzuki T, Iwai M, Kusano M, Zaitzu K, Kondo F, Ishii A, Seno H. Simultaneous quantification of batrachotoxin and epibatidine in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Leg Med*, 25: 1-5, 2017. (査読有)
5. Ogawa T, Ueyama J, Suzuki T, Iwai M, Lee XP, Kumazawa T, Sato K, Kondo F, Seno H. *In vivo* metabolic profiling for acetamiprid in rat plasma by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Med Mass Spectrom*, (in press). (査読有)

[学会発表](計6件)

1. Ogawa T, Zaitzu K, Shiraishi Y, Kusano M, Iwai M, Tsuchihashi H, Ishii A, Seno H. Development of multi-targeted screening method for 56 natural toxins in plasma by LC/Q-TOFMS. The 53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT). *Abstracts*, p152, 2015. Firenze, Italy.
2. 瀧健太郎, 財津桂, 小川匡之, 浅野友美, 草野麻衣子, 妹尾洋, 土橋均, 石井晃. Micro LC/MS/MS による高感度自然毒一斉スクリーニング法の構築. 第63回質量分析総合討論会. *講演要旨集*, p58, 2015. つくば.
3. 小川匡之, 財津桂, 白石洋輔, 草野麻衣子, 岩井雅枝, 土橋均, 石井晃, 妹尾洋. 血漿中自然毒一斉抽出法の検討. 日本法中毒学会第34年会. *講演要旨集*, p75, 2015. 福岡.
4. 白石洋輔, 小川匡之, 鈴木隆佳, 岩井雅枝, 草野麻衣子, 財津桂, 石井晃, 妹尾洋. UPLC-MS-MS を用いた batrachotoxin, bufotenine, epibatidine 血漿中濃度の同時定量. 日本法中毒学会第35年会. *講演要旨集*, p76, 2016. 大阪.
5. 小川匡之, 白石洋輔, 鈴木隆佳, 岩井雅枝, 近藤文雄, 草野麻衣子, 財津桂, 石井晃, 妹尾洋. UPLC-MS/MS を用いた血漿中 batrachotoxin および epibatidine 濃度の同時定量. 第2回日本医用マススペクトル学会西部会. *JSBMS Lett*, 42(2): p39, 2017. 京都.
6. 小川匡之, 上山純, 鈴木隆佳, 岩井雅枝, 李曉鵬, 熊澤武志, 佐藤啓造, 近藤文雄, 妹尾洋. LC-QTOF-MS によるラット血中アセタミプリド代謝物の分析. 第42回日本

医用マスペクトル学会年会. *JSBMS Lett*,
42(Sup): p74, 2017. 東京.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 匡之 (OGAWA, Tadashi)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50559937

(2) 研究分担者

財津 桂 (ZAITSU, Kei)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 30700546

石井 晃 (ISHII, Akira)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30252175

妹尾 洋 (SENO, Hiroshi)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50236113

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし