

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659337

研究課題名(和文)バイオマーカーとしての胆汁酸の法医学的応用

研究課題名(英文)Application of bile acids as biomarkers for forensic medicine

研究代表者

石井 晃 (Ishii, Akira)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30252175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸は胆汁中に存在するステロイド誘導体であり、多数の異性体及びその抱合体が存在し、種々の病態で変化する。本研究では、胆汁酸の包括的測定法を開発し、肝疾患等の病態解析及び法医診断への応用を試みた。

我々は超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計(UPLC-MS-MS)で胆汁酸を一斉分析する方法を開発し、5分以内で21種類の血清中ないし肝臓中胆汁酸を分析した。さらに高脂肪食摂取ラットモデルに応用し、グリシン抱合体と総コール酸および総ケノデオキシコール酸の上昇が認められ、病態との関連が示唆された。次いでナノLCによるスケールダウンを試み、28種類の超微量胆汁酸を精密分析法も開発した。

研究成果の概要(英文)：Bile acids are steroid derivatives in bile that consist of various isomers and their conjugates; bile acid profiles are associated with different pathological states.

We have developed comprehensive methods for measuring bile acids in biological fluids, and have applied them to the analyses of various hepatic diseases in pathology as well as in forensic medicine. We established a rapid quantitation method for 21 bile acids in serum and liver samples by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, achieving complete separation within 5 minutes. Having validated the method, we measured bile acids in the samples of model rats fed with high-fat and high-cholesterol-containing diet, and observed the elevation of glycine conjugates of several bile acids and total cholic and chenodeoxycholic acids. In addition, we also developed a highly sensitive detection method for 28 bile acids using a nano-scale LC-MS-MS.

研究分野：法医学

キーワード：胆汁酸 タンデム質量分析 非アルコール性肝障害 ナノLC 抱合体

## 1. 研究開始当初の背景

胆汁酸は主に哺乳類の胆汁中に存在するステロイド誘導体の総称である。その界面活性作用により、脂質や脂溶性ビタミンの消化吸収を助ける一方、高濃度の胆汁酸は肝細胞毒性を示す。例えば、非アルコール性肝疾患 (NAFLD) は、最近注目されている成人における肝疾患である。そのうち、非アルコール性肝炎 (NASH) は、肝炎にとどまらず、肝繊維症や、肝硬変、肝がんに至るまで進行する重大な病態であり、そのメカニズムの解明が望まれている。従って、胆汁酸とこれら肝障害との関連を明らかにする上では、胆汁酸組成のより詳細なプロファイルが必要であり、高感度かつ精密な分析法が必要とされる。しかし、胆汁酸は、肝臓内でコレステロールから生合成される一次胆汁酸、腸管で細菌により変換される二次胆汁酸、さらにそれらが抱合された抱合体と多様であり、種差や、各成分の濃度差も著しく、胆汁酸の包括的な分析は相当な困難を伴う。

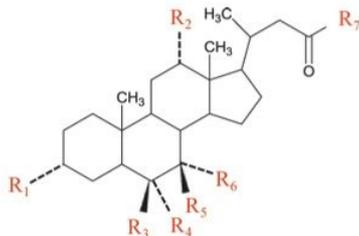


図1：胆汁酸の基本構造

BAs	M.W.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
C	408	OH	OH	H	H	H	OH
CDC	392	OH	H	H	H	H	OH
UDC	392	OH	H	H	H	OH	H
DC	392	OH	OH	H	H	H	H
LC	376	OH	H	H	H	H	H
DHC	402	O	O	H	H	-	O
αMC	408	OH	H	OH	H	H	OH
βMC	408	OH	H	OH	H	OH	H
HDC	392	OH	H	H	OH	H	H

一方、法医診断においては、病理解剖と比べて生前の情報が乏しく、外傷性ショック等、病理的所見に乏しい病態も多い。また、病理診断を補完するために、生化学的検査が施行されることもあるが、死後変化するマーカーも少なからず存在する。例えば、肝の逸脱酵素である ALT や AST、心筋梗塞で上昇するトロポニン等のマーカーは、死後有意に上昇するため、検案や解剖時に使用することはできない。従って、法医解剖に応用される生化学的マーカーは限られており、死後も安定で、病態を反映するマーカーの探索が望まれている。

胆汁酸は、上述したように、種々の病態で組成等が変化することが知られている。従って、法医鑑定において、診断上のバイオマーカーとして応用する可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

上述したように、胆汁酸は、肝疾患を含む種々の病態で変化を示すため、まず、網羅的に胆汁酸を測定できる測定システムの構築

を試みた。胆汁酸は、多数の異性体が存在するため、質量分析 (MS) による検出及び同定が適している。特に、最近広く用いられているタンデム質量分析 (MS/MS) は、胆汁酸分析に威力を発揮する。分析のための一つの方策としては、クロマトグラフィー上で目的分子を迅速に分離することができる、超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (UPLC-MS-MS) を用いて胆汁酸の分離及び同定を行う方法である。もう一つの方法は、分離部の液体クロマトグラフィー (LC) を、ナノ LC によりスケールダウンし、十分な時間をかけ、多種類の胆汁酸を可能な限り分離し、精密な分析を行う方策である。上述した二つの方策は、いずれも長所、短所があり、いずれか一つでカバーできるものではなく、両方の方法を開発する必要がある。

その上で、モデル動物において、病態解明に有用な胆汁酸マーカーを検索し、その知見に基づき、先の分析法を洗練する。最終的には、ヒトの病態応用の応用を試みる。特に、診断が困難であることが多い、外傷性ショックをはじめとする侵襲への反応のマーカーとしても、胆汁酸プロファイルが有用かについて検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

(1) UPLC-MS-MS を用いた胆汁酸の一斉分析  
われわれは、胆汁酸の迅速一斉分析を目的として、UPLC-MS-MS による分析法を構築した。対象としては、コール酸 (CA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、ウルソデオキシコール酸 (UDC)、デオキシコール酸 (DCA)、リトコール酸 (LC)、アルファムリコール酸 (α-MCA)、ベータムリコール酸 (β-MCA)、ヒオデオキシコール酸 (HDCA) と、それらのタウリン及びグリシン抱合体を対象とし、内部標準として、コール酸の重水素標識体 (d<sub>4</sub>-CA) を用いた。

サンプルはラット血清及びラット肝臓を用いた。ラット血清ないし肝臓をホモジゲナイズし、活性炭を加えて内在性の胆汁酸を除去した。血清の場合は 100 μl の血清に 20 ng の内部標準を加え、さらに 0.5 M リン酸バッファー (pH 6.0) を 200 μl 加えた後、アセトニトリル (ACN) を 700 μl 加えて液-液抽出を行い、遠心後上清を乾固した。肝臓の場合は、以下の通りである。約 100 mg の肝臓サンプルに対し、9 倍量の 10 mM リン酸バッファー (pH 6.0) を加えてホモジゲナイズし、その上清のうち、200 μl を用いた。内部標準は 40 ng 添加し、20 μl の飽和硫酸アンモニウム溶液と 800 μl の ACN を加えて液-液抽出を行い、遠心後上清を乾固した。乾固した試料は、0.2 % 酢酸含有 30 % ACN に再構成して UPLC-MS-MS による測定を行った。

LC 及び MS/MS 条件は以下のとおりである。LC-MS-MS は、Waters 社の Waters Acquity UPLC システム及び、Acquity TQD MS-MS を用いた。カラムは、Poroshell 120 EC-C8 (particle

size 2.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50 mm, Agilent)、カラム温度は 30 °C、移動相は A (0.2 % 酢酸)、B (0.2 % 酢酸含有 ACN) を用い、グラジエントは 70 % A/30 % B (0 min) から、62 % A/38 % B (2.6 min) へ、次いで 2 % A/98 % B (6 min) まで変化させた。移動相の流速は 0.5 mL/min であった。MS/MS 条件は下記の通り。キャピラリー電圧は 1.9 kV、ソース温度は 120 度、脱溶媒室温度は 400 度。脱溶媒ガスとコーンガスは窒素を用い、流速はそれぞれ 1000 及び 10 l/hr とした。コリジョンガスはアルゴンを用い、流量は 0.14 ml/min とした。イオン化法はネガティブモードのエレクトロスプレー (ESI) イオン化法を採用し、多重反応モニタリング法 (MRM) で測定した。MRM モードの条件は、コーン電圧が概ね 60 ないし 70 V、コリジョンエネルギーが 10 から 30 V で測定した。

#### (2) 高脂肪食摂取ラットにおける胆汁酸プロファイルの検討

脳卒中易発性高血圧自然発症ラットである、SHRSP ラットを用い、対照群には通常の飼料、高脂肪食 (HFC) 群には HFC 食を与え、2 ないし 8 週間飼育した。その後、ペントバルビタール麻酔後、血液と肝臓を採取した。また、SHRSP ラットの亜系である SHRSP5/Dmcr (Dmcr) ラットについても同様の実験を行い、高脂肪食投与後、それぞれ 2、8、14 週後の肝臓サンプルを採取し以下の実験に使用した。他の実験も含め、全ての動物実験は名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程に則って施行した。

#### (3) nanoLC-MS-MS による胆汁酸の一斉分析

われわれは、スケールダウンした LC-MS-MS システムによる、胆汁酸の一斉分析をさらに構築した。対象とする胆汁酸は、上記の 21 種類の胆汁酸の他、グリコヒデオキシコール酸 (GHDCA)、タウロヒデオキシコール酸 (THDCA)、タウロアルファマリコール酸 (T-a-MCA)、タウロベータマリコール酸 (T-b-MCA) 及び、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、グリコケノデオキシコール酸 (GCDCA)、タウロリトコール酸 (TLCA) の硫酸抱合体 (CDCA-S, GCDCA-S, TCDCA-S, TLCA-S) を追加し、計 28 種類を分析した。また、定量性を高めるため、従来使用していた  $d_4$ -CA に加え、 $d_4$ -CDCA、 $d_4$ -DCA、 $d_4$ -LCA を内部標準として追加した。

LC 及び MS/MS 条件は以下のとおりである。LC は、nanoLC の DiNa システム (KYA Tech) を使用し、MS-MS システムは、AB Sciex 社の 4000 QTRAP を用いた。カラムは、L-column ODS (particle size 3  $\mu\text{m}$ , 0.3 x 1.5 mm, 化学物質評価機構) を用いた。移動相は、移動相は A (10 mM 酢酸アンモニウム-10 % ACN)、B (10 mM 酢酸アンモニウム-98 % ACN) の系と、A [10 mM 酢酸アンモニウム-10 % メタノール (MeOH)]、B (10 mM 酢酸アンモニウム

-98 % MeOH) の系で比較を行った。流速は 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  で、カラム温度は 25 度を保持した。MS/MS 条件は、ネガティブモードのエレクトロスプレー (ESI) イオン化法を用い、多重反応モニタリング法 (MRM) で測定した。イオンスプレーは 3 kV、インターフェース温度は 250 度とした。コリジョンガスは窒素を用いた。MRM モードの条件は、コリジョンエネルギー 15 から 125 V で測定した。

#### (4) ラット肝臓からの胆汁酸抽出条件の再検討

新しく nanoLC-MS-MS を用いた胆汁酸分析法を構築すると同時に、従来の肝臓組織からの胆汁酸抽出の手順が煩雑であるため、再度抽出条件を検討した。ラット肝臓のホモジェネートを調製する際、50 % MeOH、100 % MeOH、MeOH: ACN = 1:1、ACN の四種類のホモジェネート溶液を用い、肝重量の 2 倍量で調製を行い、各胆汁酸の回収率を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) UPLC-MS-MS による胆汁酸分析

先に述べた方法により、われわれは、21 種類の胆汁酸を 5 分以内で分析することに成功した。これら胆汁酸は、約 5 分以内に、クロマトグラム上で良好に分離された。MRM モードにおける、各胆汁酸の MRM トランジション条件は、グリコリトコール酸 (GLCA) が、プレカーサーイオンが  $m/z$  432、プロダクトイオンが  $m/z$  73.9 であったのを除くと、他はすべて、プレカーサーイオン、プロダクトイオンのいずれもが、プロトン付加イオンであった。この理由としては、胆汁酸の構造が比較的強固で、コリジョンチャンパー内での分解が困難であることが示唆された。以下、上述のトランジション条件で実験を進めた。

まず、内在性胆汁酸を除去したブランク血清ないし肝臓ホモジェネートサンプルで直線性の検討を行った。血清サンプルにおいては、CA, TCA, GCA, TCDCA, GCDCA, TDCA, GDCA, TLCA, GLCA は、0.25 ng/ml から 5000 ng/ml までの濃度範囲で良好な直線性が得られ、感度限界は 0.25 ng/ml 未満であった。CDCA, UDCA, GUDCA, DCA, TDHCA, a-MCA, b-MCA, HDCA は 0.5 ng/ml から 5000 ng/ml までで良好な直線性が得られ、感度限界は 0.25 ng/ml であった。一方、LCA 及び GDHCA は感度限界が 0.5 ng/ml であり、直線性は 0.75 ng/ml から 5000 ng/ml で認められ、DHCA は感度限界が 2.5 ng/ml で、7.5 ng/ml から 5000 ng/ml で直線性が認められた。肝臓サンプルでは、17 種類の胆汁酸の感度限界が 2.5 ng/g 未満であり、2.5 ng/g から 50000 ng/g において良好な直線性が得られた。一方、UDCA, LCA, GDHCA は、感度限界が 5 ng/g であり、7.5 ng/g から 50000 ng/g の間で直線性が得られ、DHCA は、感度限界が 10 ng/g で、25 ng/g から 50000 ng/g の間で直線性が得られた。相関係数 ( $r^2$ )

は、いずれも 0.99 以上であった。

次いで、本方法の有用性の評価を行った。血清サンプルでは、DHCA を除き、5 ng/ml, 50 ng/ml, 500 ng/ml の三点で正確度(accuracy)と精度(precision)について、日内変動(n=6)と日間変動(n=5-6)の評価を行った。日内変動では、すべての胆汁酸のいずれの濃度についても、正確度は 83.7 ないし 125%、精度は 20%以下であったが、TCA の 5 ng/ml においては精度が 22.8%であった。日間変動では、正確度は、概ね約 70 から 140%であったが、TDHCA は 53 から 59%、5 ng/ml の LCA では、186%という値を呈した。また、回収率は、65 ないし 146%であった。また、LC-MS-MS においては、目的物質のイオン化効率が、同時に溶出される夾雑物によって影響されることがあり、これをマトリックス効果と呼ぶ。マトリックス効果については、一部の胆汁酸で負のマトリックス効果が認められ、一方、TLCA では強い正のマトリックス効果が観察された。肝臓サンプルでは、50 ng/g, 500 ng/g, 5000 ng/g で同様の評価を行った。日内変動(n=6)の正確度は概ね 70 ないし 140%で、精度は 1.1 から 18%と良好であった。日間変動(n=6)の正確度は、概ね 85 ないし 140%であったが、50 ng/g の DHCA で 180%を示した。精度はほぼ 15%以内であったが、500 ng/g の LCA で 16.7%、50 ng/g の DHCA で 25.9%であった。回収率は 69%から 123%と比較的良好であった。マトリックス効果は、概ね 80%から 130%程度であったものの、50 ng/g の DHCA では 28.5%、TLCA においては 242%から 368%と著しいマトリックス効果を認めた。

本方法は、一部の胆汁酸で高いマトリックス効果等を認めたものの、ハイスループットで多種類の胆汁酸を分析できるため、多数の検体を測定する際には有用と考えられた。

## (2) 高脂肪食摂取ラットの血清中及び肝臓中胆汁酸プロファイルの変化

次いで、上述の方法を応用して、高脂肪食摂取ラットモデルを用い、血清及び肝臓中の胆汁酸プロファイルの変化を検討した。

その結果、血清においては、GCA, GDCA, GDHCA, GCDCA, GLC が HFC により、有意に上昇していた(いずれも  $p < 0.01$ )。下に、GCA の絶対量を示す。

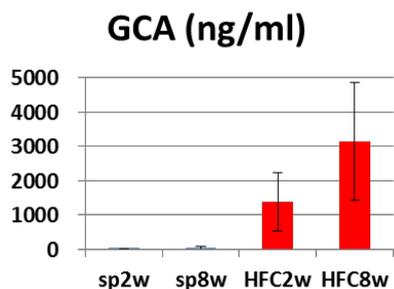


図 2 : 高脂肪食による血清中 GCA の変化  
他方、TUDC は、HFC 群において著明な減少

を認めた。同様の傾向は、肝臓においても認められ、GCA, GDCA, GCDCA, GLCA が高脂肪食で増加しており、TUDCA と TLCA が高脂肪食とともに減少していた(いずれも  $p < 0.01$ )。また、総コール酸(CA, TCA, GCA の和)及び総ケノデオキシコール酸(CDCA, TCDCA, GCDCA の和)は、高脂肪食を投与されたラットの血清で上昇しており、肝臓においては、総コール酸のみが上昇していた。

また、Dmcr ラットにおいては、HFC 投与後 2 週後では、主要な胆汁酸は CA であり、次いで、DCA, CDCA であった。その後、8 週及び 14 週後では CA と DCA は急減し、CDCA の増加傾向が認められた。

これらの所見は HFC の肝障害と関連性があると考えられ、特に CDCA とグリシン抱合体が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

## (3) nanoLC-MS-MS による胆汁酸の一斉分析

今回、新たに nanoLC-MS-MS による胆汁酸の一斉分析法の構築を目指し、28 種類の胆汁酸の分離を試みた。

移動相 A (10 mM 酢酸アンモニウム-10% ACN)、B (10 mM 酢酸アンモニウム-98% ACN) の系では、GUDCA と GHCA、TUCDA と THCA、UDCA と HDCA が共溶出し、分離が困難であった。そこで、移動相 A (10 mM 酢酸アンモニウム-10% MeOH)、B (10 mM 酢酸アンモニウム-98% MeOH) の系で分離をおこなったところ、上記の胆汁酸を分離することが可能となった。

また、28 種類の胆汁酸標準品を、このシステムにアプライし、装置感度を検討したところ、UDCA, LCA, DHCA, T-a-MCA, T-b-MCA 以外では、0.4 pg の添加量でピークを検出することが可能であった。本方法は、従来法と比較して、10 から 250 倍の感度で胆汁酸を検出することができ、有用な方法であることが示された。

## (4) ラット肝臓からの胆汁酸抽出条件の再検討

上に述べたように、今回 4 種類の条件で肝臓ホモジェネートを調製し、抽出効率を比較した。

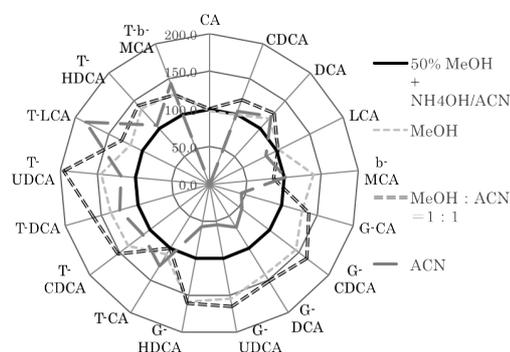


図 3 : 異なるホモジェネート調製法による胆汁酸抽出効率の比較



- (3) Ogawa T, Zaitzu K, Kokaji T, Suga T, Iwai M, Hattori H, Tsuchihashi H, Suzuki O, Ishii A, Seno H. Development of screening library of natural toxins for QTRAP LC/MS/MS system. The 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 福岡国際会議場, 福岡県, 福岡市, June 18, 2014.
- (4) Zaitzu K, Ogawa T, Kokaji T, Suga T, Kusano M, Shiraiishi Y, Hattori H, Sato T, Tsuchihashi H, Seno H, Ishii A. Development of a forensic toxicological database of natural toxins by LC/Q-TOFMS. The 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 福岡国際会議場, 福岡県, 福岡市, June 17, 2014.
- (5) Ishii A. Application of liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOFMS) to forensic toxicology. The 20th Meeting of International Association for Forensic Toxicology (IAFS). Seoul, Korea, Oct. 17, 2014.
- (6) Kamata T, Shima N, Katagi M, Miki A, Tatsuno M, Zaitzu K, Sato T, Nakanishi T, Tsuchihashi H, Suzuki K. Single hair analyses of hypnotics on the supposition of an administration in drug-facilitated crimes. The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. Funchal, Portugal, Sept 3-4, 2013.
- (7) Zaitzu K, Yoshimoto T, Yamamoto T, Ogawa T, Hattori H, Matsumoto T, Hisatsune K, Katagi M, Tsuchihashi H, Ishii A. High-resolution mass spectrometry and accurate mass measurement of synthetic cannabinoids and their metabolites in human biological specimens by LC/Q-TOFMS. The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. Funchal, Portugal, Sept 5, 2013.
- (8) Ogawa T, Ito K, Hattori H, Ueyama J, Iwai M, Iwakura K, Ishii A, Suzuki O, Seno H. Simultaneous analysis of peripheral muscle relaxants in whole blood by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. アクトシティ 浜松, 静岡県, 浜松市, June 6, 2012.
- (9) Ishii A, Suzuki Y, Yasuda T, Nomura M, Hattori H, Ogawa T, Seno H. Simple and simultaneous analysis of eight new

antidepressants in human plasma samples using UPLC-MS-MS. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. アクトシティ 浜松, 静岡県, 浜松市, June 6, 2012.

〔図書〕(計1件)

- (1) 丹羽利光, 野村文雄, 原田健一, 岡尚男, 松山さゆり, 佐藤守, 矢野郁也, 永沢善三, 中西豊文, 山口清次, 重松陽介, 久原とみ子, 大瀬守真, 前田康博, 伊藤哲哉, 紙田正博, 尾野雅哉, 山田哲司, 石井 晃, 財津 桂他. 医用質量分析ハンドブック. 診断と治療社, 2013. 208 ページ (128-139)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

服部 秀樹 (HATTORI, HIDEKI)  
名古屋大学・医学部・招へい教員  
研究者番号: 30107817

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

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  
(平成25年度-平成27年度)

浅野 友美 (ASANO, TOMOMI)  
金城学院大学・生活環境学部・助教  
研究者番号: 90637951  
(平成27年度)