

基于GC/MS血中代谢物指纹图谱分析的胰腺癌新诊断法

神戸大学大学院医学研究科病因病态解析学
消化器内科学
质谱分析综合中心
吉田 优

摘要:

以GC/MS测定分别从胰腺癌患者和健康者的血清中提取的代谢物，并利用代谢成分数据库实施代谢物鉴定。其结果检测出60个代谢物。使用SIMCA-P+ (Umetrics公司) 将此结果提供于多变量解析，结果成功地将胰腺癌患者与健康者分组。

关键词: GC/MS, metabolomics, organic acids, amino acids, pancreatic cancer, multivariate analysis

前言:

癌症所造成的死亡持续增加，现已占日本人死因的约3分之1。其中，胰腺癌的早期发现比较困难，治疗效果也不佳，因此，人们期待开发出能够实现早期诊断的疾病标记。近年来，代谢组学作为全面解析代谢物的方法，正不断被引入到医疗领域，特别是正开展着显示疾病诊断、药效评价、药剂毒性的标记发现。

现在已将质谱仪与各类色谱仪连接用于代谢解析。血液等临床检测样品含有多种大量的代谢物，因此，在选择用于解析的色谱仪时，出色的分辨率、定量性、重现性以及具备可进行代谢物鉴定的数据库已是必备条件。为此，在实施临床检测样品的代谢解析之时，我们选择了GC/MS (色谱质联用仪)。为了验证GC/MS代谢解析的有效性，使用GCMS-QP2010 Plus和Umetrics公司的多变量解析软件SIMCA-P+，进行胰腺癌患者以及健康人血中代谢物指纹图谱分析，并进行了比较探讨。

实验:

试剂

将2- 异丙基苹果酸溶解于Milli-Q水，配制1.0 mg/mL浓度的内标。将甲氧胺盐酸盐 (和光纯药工业株式会社 (大阪)) 溶解于吡啶配制用于脎化的甲氧胺溶液，浓度为20 mg/mL。用于三甲基硅 (TMS) 衍生化的MSTFA (N - Methyl - N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) 从GL科学株式会社 (东京) 购入。

前处理

在神戸大学医学部附属病院以及相关医院，经伦理委员会认可后，征得患者以及健康人的同意，分别采集他们的血清用于实验。对于血清按照已发表的前处理步骤进行了处理。首先，血清的起始容量为50μL，作为样品间校正用标准物，加入了5μL已预先溶解于水中的2-异丙基苹果酸。这是人工合成化合物，在血清中无检出。然后，为了去除蛋白质，添加250 μL的甲醇/ 水/ 氯仿溶液 (2.5:1:1)，使用涡旋搅拌器使其混浊。37℃下以1,200 rpm 振荡30分钟。4℃下进行5分钟16,000 × g 离心，将上清225 μL移至新管内，添加200 μL蒸馏水。使用涡旋搅拌器充分混浊后，在4℃下进行5分钟16,000 × g 离心，再次将250 μL上清移至新管内。在室温下，进行20分钟真空离心蒸发浓缩器 (真空下的离心浓缩) 处理，然后将剩余液放入-80℃的超低温槽内10分钟，将样品冷冻后以冷冻干燥装置脱水一晚上。将其溶解在以吡啶溶解的40μL20mg/mL的甲氧胺，(methoxyamine hydrochloride) 中，使用涡旋搅拌器充分混合后，在30℃下以1,200 rpm 振荡90分钟，进行脎化。然后，为进行衍生化，使用20μL的MSTFA在37℃下以1,200 rpm 振荡30分钟，实施三甲基硅化。

GC/MS

GC/MS测定条件

GC/MS使用GCMS-QP2010Plus, GC用毛细管柱使用DB-5 (30 m × 内径0.25 mm × 膜厚1.00 μm) (J&W Scientific)。GC的升温条件为从100℃到320℃以4℃/分的速度升温。进样口温度为280℃, 载气使用氦气、流速为39.0 cm/秒。以无分流模式进样1μL。电子离子化能量为70 eV, 离子源温度为200℃, 扫描M/Z的范围为35—600。

数据解析

按照上述条件得到的胰腺癌患者的、以及从健康人得到的来自血清的水溶性代谢物的TIC (Fig. 1)。使用数据解析软件GCMSolution和GC/MS代谢成分数据库(岛津制作所)对于主要峰进行检索。此数据库由人尿中的代谢物构成, 包括氨基酸、脂肪酸、有机酸等178化合物在某一设置条件下的保留指数和EI质谱在内的数据。鉴定EI谱图相似度在80以上的60种代谢物, 取得了9名健康人群和20名胰腺癌患者(步骤III-IV)群的代谢数据 (Table 1)。因为是代谢物鉴定, 所以确认了根据保留指数推测的保留时间和至少2个特异峰(确认离子、定量离子)的M/Z的存在。

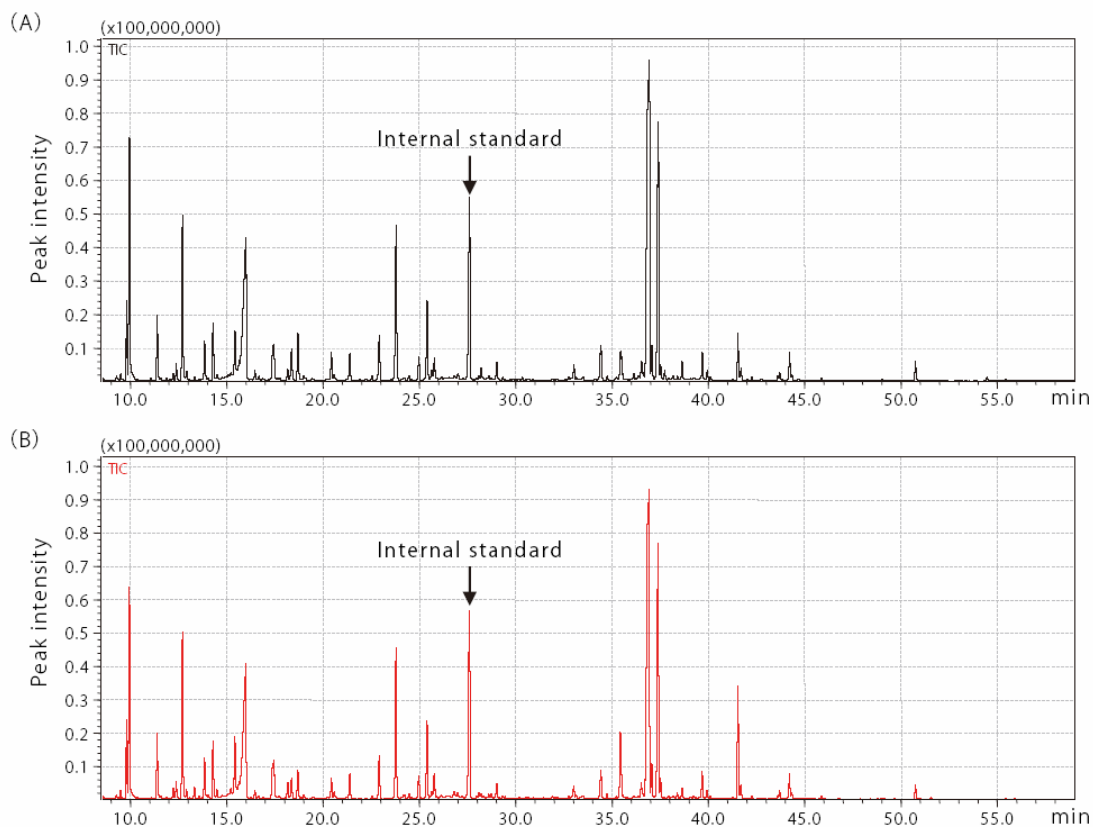


Fig. 1: 来自胰腺癌患者和健康人血清的水溶性代谢物的TIC
纵轴为峰强度, 横轴表示保留时间。使用内标(图中的↓)进行样品间校正。
(A) 胰腺癌患者
(B) 健康人

Table 1 从胰腺癌患者和健康人的血清中检出的水溶性代谢物一览表

	Fold induction	P value	Similarity	Retention time (min)	Quantified ion (m/z)	Confirmed ion (m/z)
01. Lactic acid	1.48	0.00011 ^a	87	8.849	219	191
02. Glycolic acid	0.89	0.45	94	9.246	205	177
03. L-Alanine	1.02	0.83	97	10.262	190	147
04. L-Glycine	0.76	0.033 ^a	95	10.768	204	176
05. Glyoxylic acid	1.16	0.53	86	11.004	233	218
06. Oxalic acid	1.01	0.87	86	11.037	190	219
07. 2-Hydroxybutyric acid	0.83	0.20	90	11.037	219	205
08. 3-Hydroxypropionic acid	1.28	0.32	81	11.576	219	177
09. Pyruvic acid	0.97	0.70	87	11.812	247	232
10. 4-Cresol	1.08	0.88	90	12.115	180	165
11. 3-Hydroxybutyric acid	2.49	0.21	96	12.149	233	191
12. 3-Hydroxyisobutyric acid	1.00	0.99	84	12.216	177	233
13. 2-Hydroxyisovaleric acid	1.36	0.24	95	12.418	247	219
14. Malonic acid	1.05	0.68	91	13.667	233	133
15. L-Valine	0.88	0.27	97	14.215	218	144
16. Urea	0.80	0.0028 ^a	96	14.798	189	171
17. Octanoic acid	0.73	0.00055 ^a	91	15.654	201	117
18. L-Leucine	0.94	0.60	92	16.168	232	218
19. Glycerol	0.73	0.069	90	16.203	218	205
20. Phosphoric acid	0.97	0.76	96	16.237	314	299
21. L-Isoleucine	1.05	0.71	95	16.956	232	218
22. L-Proline	1.26	0.23	98	17.157	216	147
23. Glyceric acid	0.53	0.00063 ^a	87	18.261	292	189
24. Fumaric acid	1.34	0.071	85	18.462	245	217
25. Citraconic acid	1.40	0.45	93	18.796	259	184
26. L-Serine	0.99	0.92	96	19.198	306	278
27. L-Threonine	0.89	0.19	96	20.168	291	218
28. Decanoic acid	0.76	0.016 ^a	81	22.129	229	117
29. Aspartic acid	1.30	0.075	96	24.393	334	306
30. L-Methionine	0.97	0.78	85	24.424	293	250
31. 5-Oxoproline	1.00	0.99	95	24.546	258	230
32. Thiodiglycolic acid	6.27	<0.0001 ^a	82	24.637	294	251
33. 4-Hydroxyproline	1.29	0.12	82	24.668	332	304
34. 7-Hydroxyoctanoic acid	1.38	0.00025 ^a	81	25.065	289	273
35. 2-Hydroxyglutaric acid	1.00	0.55	81	26.043	349	247
36. 3-Hydroxyphenylacetic acid	1.23	0.15	81	27.056	296	281
37. L-Glutamic acid	2.21	0.055	86	27.375	363	348
38. L-Phenylalanine	0.95	0.61	96	27.782	218	192
39. 4-Hydroxyphenylacetic acid	1.89	0.21	82	27.927	296	281
40. Lauric acid	0.76	0.047 ^a	93	28.101	257	145
41. Tartaric acid	1.47	0.36	81	28.130	292	219
42. Asparagine	1.35	0.013 ^a	84	28.942	348	333
43. cis-Glutaconic acid	1.11	0.60	80	30.953	346	331
44. Aconitic acid	1.54	0.030 ^a	84	30.953	375	285
45. L-Glutamine	1.00	0.97	92	31.807	362	347
46. Isocitric acid	0.95	0.52	92	33.244	465	375
47. Citric acid	0.97	0.71	97	33.244	363	347
48. Glucuronic lactone	0.94	0.44	86	33.297	287	259
49. Homogentisic acid	1.26	0.031 ^a	81	33.533	384	341
50. Myristic acid	0.77	0.0073 ^a	95	33.533	285	129
51. Glucuronic lactone	1.14	0.45	86	33.638	230	147
52. L-Tyrosine	0.99	0.92	85	36.297	382	354
53. Palmitoleic acid	1.31	0.36	97	38.017	311	145
54. Palmitic acid	0.79	0.032 ^a	97	38.447	313	145
55. N-Acetyltyrosine	1.57	0.026 ^a	80	40.171	260	218
56. Uric acid	0.61	0.0029 ^a	95	40.354	456	441
57. Margaric acid	0.80	0.018 ^a	92	40.788	327	342
58. Indolelactic acid	1.22	0.54	93	42.198	421	292
59. Stearic acid	0.74	0.0034 ^a	95	42.986	341	145
60. L-Tryptophan	0.98	0.82	95	43.139	405	377
2-Isopropylmalic acid (Internal standard)				27.620	275	147

胰腺癌患者（20人）和健康人（9人）的峰强度比较作为fold induction表示。P值以Student's t test计算。

多变量解析

多变量解析使用了Umetrics公司的SIMCA-P+软件 (Ver. 12.0.0)。最初使用从血清样品鉴定的60个代谢物的代谢数据，进行了多变量解析之一的主成分分析 (Fig. 2)。其结果表示在取得的数据中包括有助于区别胰腺癌患者和健康人群的代谢物。对于60个代谢物，分为2群（癌症患者群和健康人群）进行统计解析，结果有18个代谢物在统计学上存在有意义差。其中包括了乳酸、硫代羟基乙酸、门冬酰胺、乌头酸、甘氨酸、甘油酸。

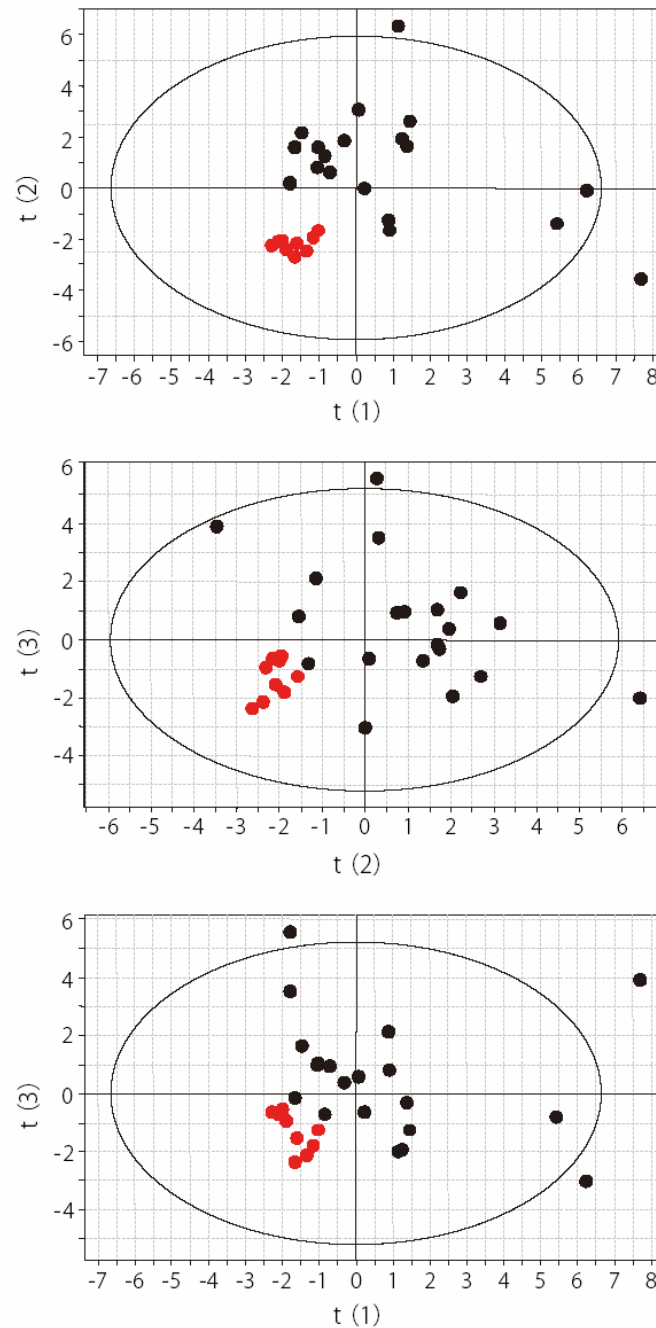


Fig. 2: 胰腺癌患者和健康人的代谢数据主成分分析的得分曲线
健康人群 (●) 与癌症患者群 (●) 可明确地分组。

GC/MS

结束语

本研究显示了基于GC/MS血中代谢物指纹图谱分析的胰腺癌新诊断法的可能性。本方法只要能够获得疾病特异性代谢指纹图谱，就有可能应用于胰腺癌之外的疾病诊断。通过本文所介绍的基于质谱仪的代谢解析，明确了各类疾病特有的代谢指纹图谱，可望迎来从一滴血中早期诊断多种疾病的时代。

谢词

在多位共同研究者的协助下，以本教室的西海信研究员为中心开展本研究。并得到大阪大学大学院生命尖端工学专业的福崎英一郎先生的殷勤指导和莫大帮助。借此机会深表谢意。

参考文献

[1] Nishiumi S, Shinohara M, Ikeda A, Yoshie T, Hatano N, Kakuyama S, Mizuno S, Sanuki T, Kutsumi H, Fukusaki K, Azuma T, Takenawa T, and Yoshida M. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*. 2010 Nov;6(4):518-528

刊登数据不是使用经药事认可的装置采集的数据。

岛津GC/MS和生物体分子的定量

氨基酸、有机酸、脂肪酸等生物体分子具有极性基，挥发性小，因此难以直接使用气相色谱法/质谱分析法(GC/MS)进行测定。为此，需要通过将极性基衍生化转换为具有挥发性的化合物后进行测定。但此操作费事而被敬而远之。

但是，GC/MS与液相色谱仪等其他色谱仪相比，具有高分离度的优点，适用于生物体成分的测定。特别是GC/MS使用毛细管柱时可以容易地实现高分离，并且，即使杂质峰和目的成分峰发生重叠，如果从经电子离子法(EI法)生成的碎片离子选择适当的离子，则可以不受杂质影响地对目的成分进行定量。并且，难以发生在LC/MS/MS中造成问题的离子抑制，因此，适合多杂质样品的定量。

本公司的GCMS-QP2010系列具有适合生物体分析的出色功能。

1. GCMS-QP2010系列具有可测定低浓度生物体分子的灵敏度。
2. 生物体样品含有较多的杂质，进行GC/MS时造成离子源污染。GCMS-QP2010系列不易受到污染，并且，即使离子源发生污染也可容易清洗。
3. 同时分析生物体样品时的设置比较繁琐。在GCMS-QP2010系列用GC/MS用代谢成分数据库中，含包括最优分析条件和定量用参数在内的方法文件。

气相色谱质谱联用仪

GCMS-QP2010 Ultra

GCMS-QP2010 Ultra的特长

1. 高灵敏度
2. 维护方便
3. 可进行基于保留指数的化合



GC/MS代谢成分数据库(氨基酸·脂肪酸·有机酸)

「GC/MS代谢成分数据库」是面向气相色谱质谱联用仪GCMS-QP2010系列工作站 GCMSsolution的谱库。通过利用带保留指数的质谱谱库，大幅减少了候补化合物，提高检索结果的可靠性。

本数据库是由登录有分析条件、质谱图、保留指数等的4种方法文件和包括有CAS号等的化合物信息、质谱图、保留指数在内的谱库、手册(谱库信息的印刷物)构成。方法/谱库中登录有氨基酸、脂肪酸、有机酸的代谢相关成分的261个电子离子化质谱图; 50个化学离子化质谱图。

• 本数据集直接提供本公司所得到的信息及内容，不能保证其正确性以及特定目的时的有用性。本公司不对由于使用本数据集而直接或间接产生的损害负责，因使用本数据集所产生的结果以及现象有客户负责。本数据集的版权为株式会社岛津制作所所有。未经本公司许可不得转载、复制部分或全部内容。本数据集内容如有变动，恕不预先通知。本数据集内容虽力争完美但难免万一发生错误，欢迎指正。